



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0146456
(43) 공개일자 2022년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/303 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7028720
(22) 출원일자(국제) 2021년02월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월19일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/078203
(87) 국제공개번호 WO 2021/170100
국제공개일자 2021년09월02일
(30) 우선권주장
PCT/CN2020/076937 2020년02월27일 중국(CN)

(71) 출원인
난징 레전드 바이오테크 씨오., 엘티디.
중국 211100 지양수 난징 지양닝 디스트릭트 룽미
안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이
언스 타운 넘버 6
(72) 발명자
판, 샤오후
캐나다 알버타 티6더블유 0케이3 에드먼턴 아미티
지 크레센트 에스더블유 1067
마오, 지에
중국 211100 지양수 난징 지양닝 디스트릭트 룽미
안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이
언스 타운 넘버 6
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

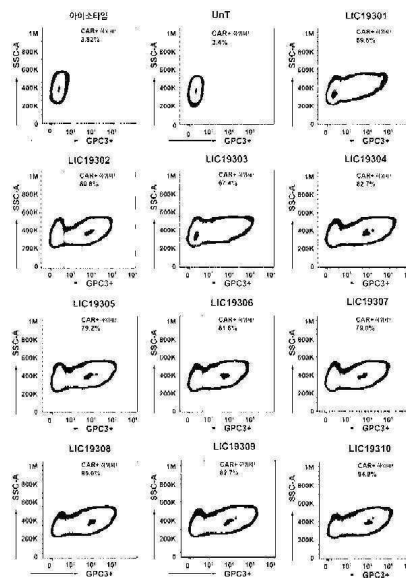
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 글리피칸-3(GPC3)을 표적화하는 항체 및 키메라 항원 수용체 및 이의 이용 방법

(57) 요약

항-글리피칸-3(GPC3) 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 세포의 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 항-GPC3 항체를 함유하는 글리피칸-3(GPC3)에 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)가 제공된다. 개시된 CAR 구조물로 형질도입된 면역 이펙터 세포가 암 면역요법을 위해 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/001174 (2018.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

G01N 33/68 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

G01N 2333/4722 (2013.01)

(72) 발명자

주양, 취추안

중국 지양수 210012 난징 위화타이 디스트릭트 후
아센 스트리트 넘버 9 웨칭 인터내셔널 가든 빌딩
36티에이치 룸 104

왕, 루이슈

중국 211100 지양수 난징 지향닝 디스트릭트 룽미
안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이언스
타운 넘버 6

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 글리피칸-3(glypican-3; GPC3)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

SEQ ID NO: 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 11 내지 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 SEQ ID NO: 21 내지 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및

SEQ ID NO: 31 내지 40으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 41 내지 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 51 내지 60으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3.

청구항 2

제1항에 있어서,

(i) HCDR1이 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하거나,

(ii) HCDR1이 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 52의 아미노산 서열을 포함하거나,

(iii) HCDR1이 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 43의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 53의 아미노산 서열을 포함하거나,

(iv) HCDR1이 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 포함하거나,

(v) HCDR1이 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하거나,

(vi) HCDR1이 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 46의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 56의 아미노산 서열을 포함하거나,

(vii) HCDR1이 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 57의 아미노산 서열을 포함하거나,

(viii) HCDR1이 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 48의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하거나,

(ix) HCDR1이 SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 59의 아미노산 서열을 포함하거나,

(x) HCDR1이 SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2가 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3이 SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1이 SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2가 SEQ ID NO: 50의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3이 SEQ ID NO: 60의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 하기를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편:

(i) SEQ ID NO: 61의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(ii) SEQ ID NO: 62의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 72의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(iii) SEQ ID NO: 63의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 73의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(iv) SEQ ID NO: 64의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 74의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(v) SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 75의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(vi) SEQ ID NO: 66의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 76의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(vii) SEQ ID NO: 67의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 77의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(viii) SEQ ID NO: 68의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 78의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(ix) SEQ ID NO: 69의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 79의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(x) SEQ ID NO: 70의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 80의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xi) SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xii) SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xiii) SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인

메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편:

- (i) SEQ ID NO: 61의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (ii) SEQ ID NO: 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 72의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (iii) SEQ ID NO: 63의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (iv) SEQ ID NO: 64의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 74의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (v) SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 75의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (vi) SEQ ID NO: 66의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 76의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (vii) SEQ ID NO: 67의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (viii) SEQ ID NO: 68의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 78의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (ix) SEQ ID NO: 69의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 79의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (x) SEQ ID NO: 70의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 80의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xi) SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xii) SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xiii) SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xiv) SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xv) SEQ ID NO: 121의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xvi) SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xvii) SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xviii) SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (xix) SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는

VL 도메인, 또는

(xx) SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xxi) SEQ ID NO: 121의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xxii) SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xxiii) SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xxiv) SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xxv) SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xxvi) SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xxvii) SEQ ID NO: 121의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(xxviii) SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'₂ 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv) 또는 이항화물 안정화 가변 단편(dsFv)인 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO: 81 내지 90, 128 및 129 중 어느 하나에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 IgG인 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 인간화 항체인 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 10

제9항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 11

제10항의 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 12

치료적 유효량의, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편, 제9항의 핵산 분자 또는 제10항의 벡터 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 13

제12항의 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 GPC3을 발현하는 암을 갖는 환자의 치료 방법으로서, 선택적으로, 상기 암이 간세포 암종(HCC), 흑색종, 난소 투명 세포 암종(OCCC), 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피내 신생물, 부신 선종, 신경집종, 배아 종양, 위 암종, 결장직장 암종 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 14

조직 시료 내의 GPC3의 검출 방법으로서, 조직 시료를 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및 상기 조직 시료에 대한 항체의 결합을 검출하는 단계로서, 대조군 시료에 대한 항체의 결합에 비한 상기 조직 시료에 대한 항체의 결합의 증가에 의해 조직 시료 내의 GPC3을 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 항체가 검출 가능한 마커로 직접적으로 표지되는 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 항체에 특이적으로 결합하는 제2 항체를 상기 조직 시료와 접촉시키는 단계 및 제2 항체의 결합을 검출하는 단계로서, 대조군 시료에 대한 제2 항체의 결합에 비한 상기 조직 시료에 대한 제2 항체의 결합의 증가에 의해 조직 시료 내의 GPC3을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조직 시료가 간세포 암종(HCC), 흑색종, 난소 투명 세포 암종(OCCC), 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 폐의 선암종, 대세포 폐암종, 소세포 폐암, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피내 신생물, 부신 선종, 신경집종, 배아 종양, 위 암종, 결장직장 암종, 갑상선암 및/또는 식도암의 세포를 포함하는 방법.

청구항 18

하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR):

- (a) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 항원 결합 도메인;
- (b) 막횡단 도메인; 및
- (c) 세포내 신호전달 도메인.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 scFv인 CAR.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 N-말단에 위치한 신호 펩티드를 추가로 포함하는 CAR.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 신호 펩티드가 CD8 α , GM-CSF 수용체 α 및 IgG1 중쇄로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자로부터 유래되는 CAR.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 항원 결합 도메인의 C-말단과 상기 막횡단 도메인의 N-말단 사이에 위치한 힌지 도메인을 추가로 포함하는 CAR.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 힌지 도메인이 CD8 α로부터 유래되는 CAR.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막횡단 도메인이 CD8 α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자로부터 유래되는 CAR.

청구항 25

제18항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인이 동시-자극 신호전달 도메인을 포함하는 CAR.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 동시-자극 신호전달 도메인이 CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, HVEM, ICOS, Myd88, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83의 리간드 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 동시-자극 분자로부터 유래되는 CAR.

청구항 27

제18항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인이 면역 이펙터 세포의 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 일차 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ로부터 유래되는 CAR.

청구항 29

하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 제18항 내지 제28항 중 어느 한 항의 CAR:

- (i) SEQ ID NO: 91의 아미노산 서열, 또는
- (ii) SEQ ID NO: 92의 아미노산 서열, 또는
- (iii) SEQ ID NO: 93의 아미노산 서열, 또는
- (iv) SEQ ID NO: 94의 아미노산 서열, 또는
- (v) SEQ ID NO: 95의 아미노산 서열, 또는
- (vi) SEQ ID NO: 96의 아미노산 서열, 또는
- (vii) SEQ ID NO: 97의 아미노산 서열, 또는
- (viii) SEQ ID NO: 98의 아미노산 서열, 또는
- (ix) SEQ ID NO: 99의 아미노산 서열, 또는
- (x) SEQ ID NO: 100의 아미노산 서열, 또는
- (xi) SEQ ID NO: 107의 아미노산 서열, 또는
- (xii) SEQ ID NO: 108의 아미노산 서열, 또는
- (xiii) SEQ ID NO: 109의 아미노산 서열, 또는
- (xiv) SEQ ID NO: 110의 아미노산 서열, 또는
- (xv) SEQ ID NO: 111의 아미노산 서열, 또는
- (xvi) SEQ ID NO: 112의 아미노산 서열, 또는
- (xvii) SEQ ID NO: 113의 아미노산 서열, 또는

- (xviii) SEQ ID NO: 114의 아미노산 서열, 또는
- (xix) SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열, 또는
- (xx) SEQ ID NO: 116의 아미노산 서열, 또는
- (xxi) SEQ ID NO: 130의 아미노산 서열, 또는
- (xxii) SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열.

청구항 30

제18항 내지 제29항 중 어느 한 항의 CAR을 포함하는 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드가 IL-12의 p40 서브유닛 및/또는 CCL-19를 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 31

제30항에 있어서, p40이 SEQ ID NO: 135의 아미노산 서열을 포함하는 인간 p40이며, CCL-19가 SEQ ID NO: 136의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CCL-19인 폴리펩티드.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, p40과 CCL-19가 제1 자가-절단 펩티드에 의해 연결되는 폴리펩티드.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 제1 자가-절단 펩티드가 SEQ ID NO: 139의 아미노산 서열을 포함하는 2A 자가-절단 펩티드 T2A 단편인 폴리펩티드.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, IL-12의 p40 서브유닛 및 CCL-19가 SEQ ID NO: 134의 아미노산 서열을 포함하는 도메인에 존재하는 폴리펩티드.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 CAR이 제2 자가-절단 펩티드에 의해 도메인에 연결되는 폴리펩티드.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 제2 자가-절단 펩티드가 SEQ ID NO: 138의 아미노산 서열을 포함하는 2A 자가-절단 펩티드 P2A 단편인 폴리펩티드.

청구항 37

제30항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO: 133의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 38

제18항 내지 제29항 중 어느 한 항의 CAR 또는 제30항 내지 제37항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 39

제38항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터인 벡터.

청구항 41

제39항 또는 제40항의 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 숙주 세포가 T 세포, NK 세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 조혈모세포, 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역 이펙터 세포인 숙주 세포.

청구항 43

(i) 제18항 내지 제29항 중 어느 한 항의 CAR, (ii) 외인적으로 도입된 p40 및 (iii) 외인적으로 도입된 CCL-19를 발현하는 면역 이펙터 세포.

청구항 44

치료적 유효량의 제41항 또는 제42항의 숙주 세포 또는 제43항의 면역 이펙터 세포 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 45

제44항의 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 GPC3을 발현하는 암을 갖는 환자의 치료 방법으로서, 상기 암이 선택적으로 간세포 암종(HCC), 흑색종, 난소 투명 세포 암종(OCCC), 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 폐의 선암종, 대세포 폐암종, 소세포 폐암, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피내 신생물, 부신 선종, 신경집종, 배아 종양, 위 암종, 결장직장 암종, 갑상선암 및 식도암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 숙주 세포 또는 상기 면역 이펙터 세포가 환자로부터 획득되는 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 숙주 세포 또는 상기 면역 이펙터 세포가 건강한 공여자로부터 획득되는 방법.

청구항 48

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GPC3이 진뱅크(GenBank) 수탁 번호: NM_001164617 및 NP_001158089, NM_004484 및 NP_004475, NM_001164618 및 NP_001158090, 및 NM_001164619 및 NP_001158091로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 49

GPC3이 진뱅크 수탁 번호: NM_001164617 및 NP_001158089, NM_004484 및 NP_004475, NM_001164618 및 NP_001158090, 및 NM_001164619 및 NP_001158091로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제18항 내지 제29항 중 어느 한 항의 CAR 또는 제30항 내지 제37항 중 어느 한 항의 폴리펩티드.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

상호 참조

[0002]

본 출원은 2020년 2월 27일자 출원된 국제 특허 출원 제PCT/CN2020/076937호의 우선권의 이익을 주장하며, 이의 내용은 이의 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

서열 목록

[0004]

본 출원은 226,307 바이트의 크기를 갖는 2021년 2월 23일자 생성된 명칭이 "14651-019-228_SEQ_LISTING"인, 본 출원과 함께 텍스트 형식으로 제출된 서열 목록을 참조로 포함한다.

[0005]

기술 분야

[0006]

본 개시는 GPC3을 표적화하는 항체, 키메라 항원 수용체 및 조작된 면역 세포, 및 이의 이용 방법의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 글리피칸-3(GPC3), 580개 아미노산의 65-kDa 단백질은 글리코실포스파티딜이노시톨에 의해 세포막에 고정된 헤파란 설페이트 프로테오글리칸이다. 섬유아세포 성장 인자 및 Wnt를 포함하는 다양한 중요한 단백질이 2개의 헤파란 설페이트 쇄에 결합된다. 헤파란 쇄는 기능에 관하여 아직 완전히 정의되지 않았지만, 결합된 단백질이 상응하는 수용체로 회합하는 것을 제어하는 것으로 여겨진다. GPC3은 간세포 암종(HCC), 난소 투명 세포 암종(OCCC), 흑색종, 폐 편평 세포 암종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양) 및 난황낭 종양에서, 그리고 특정 위암, 예를 들어, α -태아단백질을 생성하는 위암에서 발현된다. 이들 암에서의 분비된 및 막-고정된 GPC3의 정확한 기능은 완전히 명확하지 않지만, 예를 들어 HCC에서 신생물 변형에 관여하는 것으로 입증된다(문헌 [Shirakawa H., et al, Cancer Sci. 2009;100:1403-1407]). 현저하게, 당해 단백질은 모든 다른 암 형태에서 거의 존재하지 않는다. 이들 특징에 기초하여, GPC3은 암 면역요법을 위한 잠재적으로 이상적인 표적이다. 새로운 항-GPC3 항체 및 면역요법, 예컨대 GPC3 CAR-T 요법이 당업계에서 필요하다.

발명의 내용

[0008] 일 양태에서, SEQ ID NO: 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 HCDR1, SEQ ID NO: 11 내지 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 HCDR2, 및 SEQ ID NO: 21 내지 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 HCDR3; 및 SEQ ID NO: 31 내지 40으로 이루어진 군으로부터 선택되는 LCDR1, SEQ ID NO: 41 내지 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 51 내지 60으로 이루어진 군으로부터 선택되는 LCDR3을 포함하는, 글리피칸-3(GPC3)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 본원에 제공된다.

[0009] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편에서, (i) HCDR1은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하거나, (ii) HCDR1은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 52의 아미노산 서열을 포함하거나, (iii) HCDR1은 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 43의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 53의 아미노산 서열을 포함하거나, (iv) HCDR1은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 포함하거나, (v) HCDR1은 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하거나, (vi) HCDR1은 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 46의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 56의 아미노산 서열을 포함하거나, (vii) HCDR1은 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 57의 아미노산 서열을 포함하거나, (viii) HCDR1은 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 48의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하거나, (ix) HCDR1은 SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 59의 아미노산 서열을 포함하거나, (x) HCDR1은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 SEQ ID NO: 50의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 SEQ ID NO: 60의 아미노산 서열을 포함한다.

[0010]

[illegible]

서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxvi) SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxvii) SEQ ID NO: 121의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxviii) SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 (i) SEQ ID NO: 61의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (ii) SEQ ID NO: 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 72의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (iii) SEQ ID NO: 63의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (iv) SEQ ID NO: 64의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 74의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (v) SEQ ID NO: 65의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 75의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (vi) SEQ ID NO: 66의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 76의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (vii) SEQ ID NO: 67의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (viii) SEQ ID NO: 68의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 78의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (ix) SEQ ID NO: 69의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 79의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (x) SEQ ID NO: 70의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 80의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xi) SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xii) SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xiii) SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xiv) SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xv) SEQ ID NO: 121의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xvi) SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xvii) SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xviii) SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xix) SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xx) SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxi) SEQ ID NO: 121의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxii) SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxiii) SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxiv) SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxv) SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxvi) SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxvii) SEQ ID NO: 121의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는 (xxviii) SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0012] 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv) 또는 이황화 안정화 가변 단편(dsFv)이다.

[0013] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 81 내지 90, 128 및 129 중 어느 하나에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] 일부 실시형태에서, 항체는 IgG이다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간화 항체이다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자가 본원에 제공된다. 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 핵산 분자를 포함하는 벡터가 본원에 제공된다.

- [0016] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 본원에 제공된다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 치료적 유효량의 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편, 핵산 분자 또는 벡터 및 억제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 GPC3을 발현하는 암을 갖는 환자의 치료 방법이 본원에 제공되며, 선택적으로, 암은 간세포 암종(HCC), 흑색종, 난소 투명 세포 암종(OCCC), 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 폐의 선암종, 대세포 폐암종, 소세포 폐암, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피내 신생물, 부신 선종, 신경집종, 배아 종양, 위 암종, 결장직장 암종, 갑상선암 및 식도암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0019] 또 다른 양태에서, 조직 시료를 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및 조직 시료에 대한 항체의 결합을 검출하는 단계로서, 대조군 시료에 대한 항체의 결합에 비한 조직 시료에 대한 항체의 결합의 증가에 의해 조직 시료 내의 GPC3을 검출하는 단계를 포함하는 조직 시료 내의 GPC3의 검출 방법이 본원에 제공된다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 항체는 검출 가능한 마커로 직접적으로 표시된다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 당해 방법은 항체에 특이적으로 결합하는 제2 항체를 조직 시료와 접촉시키는 단계 및 제2 항체의 결합을 검출하는 단계로서, 대조군 시료에 대한 제2 항체의 결합에 비한 조직 시료에 대한 제2 항체의 결합의 증가에 의해 조직 시료 내의 GPC3을 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조직 시료는 간세포 암종(HCC), 흑색종, 난소 투명 세포 암종(OCCC), 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 폐의 선암종, 대세포 폐암종, 소세포 폐암, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피내 신생물, 부신 선종, 신경집종, 배아 종양, 위 암종, 결장직장 암종, 갑상선암 및/또는 식도암의 세포를 포함한다.
- [0022] 또 다른 양태에서, 하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)가 본원에 제공된다: (a) 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 세포의 항원 결합 도메인; (b) 막횡단 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인.
- [0023] 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 scFv이다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 CAR은 폴리펩티드의 N-말단에 위치한 신호 펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호 펩티드는 CD8 α , GM-CSF 수용체 α 및 IgG1 중쇄로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자로부터 유래된다.
- [0025] 일부 실시형태에서, CAR은 세포의 항원 결합 도메인의 C-말단과 막횡단 도메인의 N-말단 사이에 위치한 힌지 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 로부터 유래된다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인은 CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자로부터 유래된다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 동시-자극 신호전달 도메인은 CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, HVEM, ICOS, Myd88, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83의 리간드 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 동시-자극 분자로부터 유래된다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 이펙터 세포의 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 일차 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 로부터 유래된다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 CAR은 (i) SEQ ID NO: 91의 아미노산 서열, 또는 (ii) SEQ ID NO: 92의 아미노산 서열, 또는 (iii) SEQ ID NO: 93의 아미노산 서열, 또는 (iv) SEQ ID NO: 94의 아미노산 서열, 또는 (v) SEQ ID NO: 95의 아미노산 서열, 또는 (vi) SEQ ID NO: 96의 아미노산 서열, 또는 (vii) SEQ ID NO: 97의 아미노산 서열, 또는 (viii) SEQ ID NO: 98의 아미노산 서열, 또는 (ix) SEQ ID NO: 99의 아미노산 서열, 또는 (x) SEQ ID NO: 100의 아미노산 서열, 또는 (xi) SEQ ID NO: 107의 아미노산 서열, 또는 (xii) SEQ ID NO: 108의 아미노산 서열, 또는 (xiii) SEQ ID NO: 109의 아미노산 서열, 또는 (xiv) SEQ ID NO: 110의 아미노산 서열, 또는 (xv) SEQ ID NO: 111의 아미노산 서열, 또는 (xvi) SEQ ID NO: 112의 아미노산 서열, 또는 (xvii)

SEQ ID NO: 113의 아미노산 서열, 또는 (xviii) SEQ ID NO: 114의 아미노산 서열, 또는 (xix) SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열, 또는 (xx) SEQ ID NO: 116의 아미노산 서열, 또는 (xxi) SEQ ID NO: 130의 아미노산 서열, 또는 (xxii) SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0030] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 CAR, 및 IL-12의 p40 서브유닛 및 CCL-19 중 적어도 하나를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, p40은 SEQ ID NO: 135의 아미노산 서열을 포함하는 인간 p40이며, CCL-19는 SEQ ID NO: 136의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CCL-19이다. 일부 실시형태에서, p40과 CCL-19는 제1 자가-절단 펩티드에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 자가-절단 펩티드는 SEQ ID NO: 139의 아미노산 서열을 포함하는 2A 자가-절단 펩티드 T2A 단편이다. 일부 실시형태에서, IL-12의 p40 서브유닛 및 CCL-19는 SEQ ID NO: 134의 아미노산 서열을 포함하는 도메인에 존재한다. 일부 실시형태에서, CAR은 제2 자가-절단 펩티드에 의해 도메인에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제2 자가-절단 펩티드는 SEQ ID NO: 138의 아미노산 서열을 포함하는 2A 자가-절단 펩티드 P2A 단편이다. 구체적인 실시형태에서, SEQ ID NO: 133의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0031] 또 다른 양태에서, 본원에 제공된 CAR 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자가 본원에 제공된다. 또 다른 양태에서, 핵산 분자를 포함하는 벡터가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터이다.

[0032] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 T 세포, NK 세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 조혈모세포, 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역 이펙터 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포이다.

[0033] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 CAR, 외인적으로 도입된 p40 및 외인적으로 도입된 CCL-19를 발현하는 면역 이펙터 세포가 본원에 제공된다.

[0034] 또 다른 양태에서, 치료적 유효량의 본원에 제공되는 숙주 세포 또는 면역 이펙터 세포 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다.

[0035] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 GPC3을 발현하는 암을 갖는 환자의 치료 방법이 본원에 제공되며, 암은 선택적으로 간세포 암종(HCC), 흑색종, 난소 투명 세포 암종(OCCC), 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 폐의 선암종, 대세포 폐암종, 소세포 폐암, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피내 신생물, 부신 선종, 신경집종, 배아 종양, 위 암종, 결장직장 암종, 갑상선암 및 식도암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0036] 일부 실시형태에서, 숙주 세포 또는 면역 이펙터 세포는 환자로 부터 수득된다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포 또는 면역 이펙터 세포는 건강한 공여자로 부터 수득된다.

[0037] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편 또는 CAR은 하기의 진뱅크(GenBank) 수탁 번호로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 GPC3에 결합한다: NM_001164617 및 NP_001158089, NM_004484 및 NP_004475, NM_001164618 및 NP_001158090, 및 NM_001164619 및 NP_001158091.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 LIC19301 내지 LIC19310 CAR-T 세포의 발현 수준을 보여준다.

도 2는 상이한 비의 E/T를 사용한 GPC3 양성 세포주에 대한 LIC19301 내지 LIC19310의 CAR-T 세포의 시험관내 세포독성을 보여준다. E/T는 이펙터 세포 대 표적 세포의 비를 지칭한다. UnT는 CAR로 전기천공되지 않은 T 세포를 지칭한다.

도 3은 상이한 비의 E/T를 사용한 GPC3 음성 세포주에 대한 LIC19301 내지 LIC19310의 CAR-T 세포의 시험관내 세포독성을 보여준다. E/T는 이펙터 세포 대 표적 세포의 비를 지칭한다. UnT는 CAR로 전기천공되지 않은 T 세포를 지칭한다.

도 4는 24시간 동안 Huh7 또는 SK-HEP1과 동시-배양한 후의 LIC19301 내지 LIC19310의 CAR-T 세포의 사이토카인 분비를 보여준다. UnT는 CAR로 전기천공되지 않은 T 세포를 지칭한다.

도 5는 Huh7 세포가 이식된 NCG 마우스로의 투여 후의 LIC19309 CAR-T 세포의 항종양 활성을 보여준다.

도 6은 인간화 CAR-T 세포의 발현 수준을 보여준다.

도 7은 상이한 비의 E/T를 사용한 GPC3 양성 세포주에 대한 인간화 CAR-T 세포 및 LIC19309 CAR-T 세포의 시험관내 세포독성을 보여준다. E/T는 이펙터 세포 대 표적 세포의 비를 지칭한다. UnT는 CAR로 트랜스펙션되지 않은 T 세포를 지칭한다.

도 8은 상이한 비의 E/T를 사용한 GPC3 음성 세포주에 대한 인간화 CAR-T 세포 및 LIC19309 CAR-T 세포의 시험관내 세포독성을 보여준다. E/T는 이펙터 세포 대 표적 세포의 비를 지칭한다. UnT는 CAR로 트랜스펙션되지 않은 T 세포를 지칭한다.

도 9는 상이한 비의 E/T를 사용하여 HepG2, Huh7 또는 PLC/PRF/5 세포주와 동시-배양하기 전의, 그리고 20시간 동안 동시-배양한 후의, 인간화 CAR-T 세포 및 LIC19309 CAR-T 세포의 IFN- γ 분비를 보여준다. UnT는 CAR로 트랜스펙션되지 않은 T 세포를 지칭한다.

도 10은 상이한 비의 E/T를 사용하여 HepG2, Huh7 또는 PLC/PRF/5 세포주와 동시-배양하기 전의, 그리고 20시간 동안 동시-배양한 후의, 인간화 CAR-T 세포 및 LIC19309 CAR-T 세포의 TNF- α 분비를 보여준다. UnT는 CAR로 트랜스펙션되지 않은 T 세포를 지칭한다.

도 11은 Huh7 세포가 이식된 NCG 마우스로의 투여 후의 인간화 CAR-T 세포의 항종양 활성을 보여준다.

도 12는 H93 CAR 및 H93M CAR의 구조를 보여준다. SP는 신호 펩티드를 지칭한다. TM은 막횡단 도메인을 지칭한다. TAA 결합제는 종양-연관 항원의 결합제 또는 항원 결합 도메인을 지칭한다(즉, 항-GPC3 scFv).

도 13은 인간화 항-GPC3 scFv CAR을 발현하는 H93 CAR-T 세포 및 H93M CAR-T 세포의 양성물을 보여준다. UnT는 CAR로 형질도입되지 않은 T 세포를 지칭한다.

도 14a 및 도 14b는 정상 조건에서 배양된 CAR-T 세포의 IL-23(도 14a) 및 CCL-19(도 14b) 단백질의 생성을 보여준다(RPMI-1640+300IU/ml(IL-2)).

도 15a 및 도 15b는 재-시험감염(re-challenge) 검정에서의 CAR-T 세포의 증대(expansion)를 보여준다. 세포를 2일마다 1:1 E/T 비로 PLC/PRF/5 세포를 사용하여 하룻밤 자극하였다. T 세포의 증대 배수(도 15a) 및 생존력(도 15b)을 각 라운드의 마지막에 기록하였다.

도 16a 내지 도 16c는 재-시험감염 검정에서 상이한 자극 라운드로 처리한 후에, 1:1 E/T 비를 사용한 GPC3 양성 세포주에 대한 CAR-T 세포의 시험관내 세포독성(도 16a), TNF- α 방출 수준(도 16b) 및 IFN- γ 방출 수준(도 16c)을 보여준다.

도 17은 재-시험감염 검정에서 상이한 자극 라운드로 처리한 후의 CAR-T 세포의 양성물을 보여준다.

도 18a 내지 도 18d는 재-시험감염 검정에서 각각의 자극 라운드 24시간 후의 CAR-T 세포에서의 PD-1(도 18a 및 도 18b) 및 LAG3(도 18c 및 도 18d)의 발현을 보여준다.

도 19a 및 도 19b는 96-웰 트랜스웰 챔버에 의해 수행되는 CAR-T 세포의 세포 이동 검정을 보여준다. 상이한 CAR-T 세포를 PLC/PRF/5 세포와 30시간 동안 1:1 E/T 비로 동시-배양하였으며, 세포 배양 상청액을 수집하고, 하부 챔버에 첨가하였다. 4, 6, 8시간 후에 상부 챔버로부터 이동하는 하부 챔버의 T 세포 수(도 19a) 및 동시-배양 상청액 중 CCL-19의 농도(도 19b)를 정량화하였다.

도 20a 내지 도 20d는 NCG 마우스 이중이식편 모델에서의 CAR-T 세포의 항-종양 효과를 보여준다. NCG 마우스에 Huh7 세포를 피하 접종하였으며, 0.2 M 투여량 및 0.6 M 투여량(정맥내)으로 CAR-T 세포로 처리하였다(군마다 n=4마리 마우스). 종양의 부피(도 20a 및 도 20b) 및 NCG 마우스 말초 혈액의 게놈 DNA 내의 CAR 카피 수(도 20c 및 도 20d)를 평가하였다.

도 21a 및 도 21b는 NCG 마우스 이중이식편 모델에서 0.2 M(도 21a) 및 0.6 M(도 21b) 투여량(군마다 n=4마리 마우스)으로 CAR-T 세포로 처리된 마우스의 체중 변화를 보여준다.

도 22a 내지 도 22d는 0.2 M 또는 0.6 M 투여량 CAR-T 세포(군마다 n=3마리 마우스)로 처리한 후의 NCG 마우스 말초 혈액 중 IL-23 단백질(도 22a 및 도 22b) 및 IFN- γ 단백질(도 22c 및 도 22d)의 수준을 보여준다.

도 23은 NCG 마우스 이중이식편 모델에서 동물 실험(n=3)의 종점에 0.2 M UnT, H93 CAR-T 세포 또는 H93M CAR-T 세포로 처리된 마우스의 종양 조직 내의 T 세포의 침윤을 보여준다. 종양 조직을 포르말린으로 고정하고, 파

라핀에 포매하고, 면역조직화학(IHC)을 위해 사용하여 3,3'-다이아미노벤지딘(DAB)에 의해 염색된 T 세포의 침윤을 검출하였다. 이미지를 3D HISTECH(DRNJIER)에 의해 획득하였다. 우측 열은 흑색 사각형의 확대된 영역을 보여준다.

도 24는 NCG 마우스 이종이식편 모델에서 0.2 M UnT, H93 CAR-T 세포 또는 H93M CAR-T 세포로 처리한 후의 종양 조직 내의 마우스 대식구 및 마우스 수지상 세포의 동원을 보여준다. 동물 실험의 종점에, 종양 조직을 포르말린으로 고정하고, 파라핀에 포매하고, 면역조직화학(IHC)을 위해 사용하였다. CD68을 갖는 대식구(좌측 열) 및 CD11c를 갖는 수지상 세포(우측 열)를 3,3'-다이아미노벤지딘(DAB)에 의해 염색하였다. 이미지를 3D HISTECH(DRNJIER)에 의해 획득하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 개시는 부분적으로 GPC3에 결합하는 신규한 항체 및 키메라 항원 수용체, 또는 이를 포함하는 조작된 세포 및 이의 개선된 특성에 기초한다.

[0040] 정의

[0041] 본원에 기술되거나 언급되는 기법 및 절차는 당업자에 의해 기존의 방법, 예컨대, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3d ed. 2001)]; 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. eds., 2003)]; 문헌[Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed. 2009)]; 문헌[Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Albitar ed. 2010)]; 및 문헌[Antibody Engineering Vols 1 and 2 (Kontermann and Dübél eds., 2d ed. 2010)]에 기술된 널리 사용되는 방법을 사용하여 일반적으로 널리 이해되고/되거나 통상적으로 사용되는 것들을 포함한다. 본원에 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술 및 과학 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본 명세서를 해석할 목적으로, 용어의 하기의 설명이 적용될 것이며, 적절할 때마다 단수로 사용되는 용어는 복수도 또한 포함할 것이며 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 제시된 용어의 임의의 설명이 본원에 참조로 포함된 임의의 문서와 상충하는 경우에, 하기에 제시된 용어의 설명이 우선할 것이다.

[0042] 용어 "항체", "면역글로불린" 또는 "Ig"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며, 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 예를 들어 하기에 기재된 바와 같은, 모노클로날 항체(효능제, 길항제, 중화 항체, 전장 또는 온전한 모노클로날 항체 포함), 폴리엠페토프 또는 모노엠페토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 폴리클로날 또는 1가 항체, 다가 항체, 적어도 2개의 온전한 항체로부터 형성되는, 다중특이적 항체(예를 들어, 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체), 단일쇄 항체, 및 이의 단편(예를 들어, 도메인 항체)을 포괄한다. 항체는 인간, 인간화, 키메라 및/또는 친화성 성숙된 것일 수 있고, 다른 중, 예를 들어 마우스, 토끼, 라마 등 유래의 항체일 수 있다. 용어 "항체"는 특정 분자 항원에 결합할 수 있고 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되는 폴리펩티드의 면역글로불린 부류 내의 B 세포의 폴리펩티드 생성물을 포함하는 것으로 의도되며, 여기서 각각의 쌍은 하나의 중쇄(약 50 내지 70 kDa) 및 하나의 경쇄(약 25 kDa)를 갖고, 각각의 사슬의 각각의 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 130개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하고, 각각의 사슬의 각각의 카복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Antibody Engineering (Borrebæck ed., 2d ed. 1995)]; 및 문헌[Kuby, Immunology (3d ed. 1997)]을 참조한다. 항체는 또한 합성 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 낙타과 종(예를 들어, 라마 또는 알파카) 유래의 것을 포함하는 항체 또는 이들의 인간화 변이체, 인트라바디, 항-이디오타입(항-Id) 항체, 및 상기 중 임의의 것의 기능적 단편(예를 들어, 항원 결합 단편)(단편이 유래된 항체의 결합 활성의 일부 또는 전부를 보유하는 항체 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드의 부분을 지칭함)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 기능적 단편(예를 들어, 항원 결합 단편)의 비-제한적인 예는 단일-쇄 Fv(scFv)(예를 들어, 단일특이적, 이중특이적 등 포함), Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab)₂ 단편, F(ab')₂ 단편, 이황화-결합된 Fv(dsFv), Fd 단편, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 미니바디를 포함한다. 특히, 본원에 제공되는 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 예를 들어, 항원-결합 도메인 또는 항원에 결합하는 항원-결합 부위를 함유하는 분자(예를 들어, 항체의 하나 이상의 CDR)를 포함한다. 이러한 항체 단편은 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989)]; 문헌[Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995)]; 문헌[Huston et al., 1993, Cell Biophysics 22:189-224]; 문헌[Plueckthun and Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515]; 및 문헌[Day, Advanced Immunochemistry (2d ed. 1990)]에서 찾을 수 있다. 본원에서 제공되는 항체는 면역글로불린 분자의 임의의 부류(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA) 또는 임의의 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2,

IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)의 것일 수 있다. 항체는 효능성(agonistic) 항체 또는 길항성(antagonistic) 항체일 수 있다. 항체는 효능성도 아니고, 길항성도 아닐 수 있다.

[0043] "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 구조이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐, 또는 기타 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 표적 항원은 폴리펩티드이다. 특정 실시형태에서, 항원은, 세포와 회합되며, 예를 들어, 세포 상에 또는 세포 내에 존재한다.

[0044] "온전한" 항체는 항원-결합 부위, 및 CL 및 적어도 중쇄 불변 영역, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 항체이다. 불변 영역은 인간 불변 영역 또는 이의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 온전한 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.

[0045] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단일-쇄 Fv"는 단일의 폴리펩티드 쇠로 연결되는 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 VH와 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하여, 이는 sFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성하게 한다. sFv의 검토를 위하여, 문헌[Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0046] 용어 "중쇄-단독 항체" 또는 "HCAb"는 4-쇄 항체에서 보통 관찰되는 경쇄가 결여되지만 중쇄를 포함하는 기능적 항체를 지칭한다. 낙타과 동물(예를 들어, 낙타, 라마 또는 알파카)은 HCAb를 생성하는 것으로 알려져 있다.

[0047] 용어 "결합한다" 또는 "결합하는"은 예를 들어 복합체를 형성하는 것을 포함하는 분자 간의 상호작용을 지칭한다. 상호작용은 예를 들어 수소 결합, 이온 결합, 소수성 상호작용 및/또는 반 데르 발스 상호작용을 포함하는 비-공유적 상호작용일 수 있다. 복합체는 또한 공유 또는 비-공유 결합, 상호작용 또는 힘에 의해 유지되는 둘 이상의 분자의 결합을 포함할 수 있다. 항체 상의 단일의 항원-결합 부위와 표적 분자, 예컨대 항원의 단일의 에피토프 사이의 전체 비-공유 상호작용의 세기는 해당 에피토프에 대한 항체 또는 기능적 단편의 친화성이다. 1가 항원에 대한 결합 분자(예를 들어, 항체)의 해리 속도(k_{off}) 대 회합 속도(k_{on})의 비(k_{off}/k_{on})는 친화성과 반비례하는 해리 상수 K_D 이다. K_D 값이 낮을수록 항체의 친화성이 높아진다. K_D 의 값은 항체 및 항원의 상이한 복합체에 대하여 달라지며, k_{on} 및 k_{off} 둘 모두에 좌우된다. 본원에 제공되는 항체에 대한 해리 상수 K_D 는 본원에 제공되는 임의의 방법 또는 당업자에게 널리 공지된 임의의 다른 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 한 결합 부위에서의 친화성이 항체와 항원 간의 상호작용의 실제 세기를 항상 반영하는 것은 아니다. 다가 항원과 같은 다중 반복 항원 결정기를 함유하는 복합 항원이 다중 결합 부위를 함유하는 항체와 접촉할 때, 한 부위에서 항체와 항원의 상호작용은 두 번째 부위에서 반응의 확률을 증가시킬 것이다. 다가 항체와 항원 사이의 이러한 다중 상호작용의 세기는 결합력(avidity)이라고 한다.

[0048] 본원에 기재된 결합 분자와 관련하여 "~에 결합하는", "~에 특이적으로 결합하는"과 같은 용어 및 유사한 용어는 또한 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며, 폴리펩티드와 같은 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 결합 분자를 지칭한다. 항원에 결합하거나 이에 특이적으로 결합하는 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 예를 들어 면역검정, Octet[®], Biacore[®], 또는 당업자에게 공지된 기타 기법에 의해 확인될 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 이것이 방사성면역검정(RIA) 및 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)과 같은 실험 기법을 사용하여 결정된 바와 같이 임의의 교차 반응성 항원에 대해서 보다 더 높은 친화성으로 항원에 결합할 때, 항원에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다. 전형적으로 특이적인 또는 선택적인 반응은 백그라운드 신호 또는 노이즈의 적어도 2배일 것이고, 백그라운드의 10배 초과일 수 있다. 예를 들어, 결합 특이성에 관한 논의에 대해서는 문헌[Fundamental Immunology 332-36 (Paul ed., 2d ed. 1989)]을 참조한다. 특정 실시형태에서, "비-표적" 단백질에 대한 결합 분자 또는 항원 결합 도메인의 결합의 정도는 예를 들어 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석 또는 RIA에 의해 결정되는 바와 같이, 이의 특정 표적 항원으로의 결합 분자 또는 항원 결합 도메인의 결합의 약 10% 미만이다. 항원에 결합하는 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 결합 분자가 예를 들어 항원의 표적화에서 치료제 및/또는 진단제로서 유용하도록 충분한 친화성으로 항원에 결합할 수 있는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원에 결합하는 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 1 μ M, 800 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 300 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.9 nM, 0.8 nM, 0.7 nM, 0.6 nM, 0.5 nM, 0.4 nM, 0.3 nM, 0.2 nM 또는 0.1 nM 이하의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 특정 실시형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 상이한 종 유래의 항원 중에서 보존된 항원의 에피토프에 결합한다.

- [0049] 특정 실시형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 "키메라" 서열을 포함할 수 있고, 여기서 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 나머지 쇠(들)가 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체, 및 이러한 항체의 단편의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이다(미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌[Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-55] 참조). 키메라 서열은 인간화 서열을 포함할 수 있다.
- [0050] 특정 실시형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 인간 면역글로불린(예를 들어, 수여자 항체) 유래의 서열을 포함하는 비인간(예를 들어, 낙타과, 캥거루, 비-인간 영장류) 항체의 "인간화" 형태의 부분을 포함할 수 있고, 여기서 고유 CDR 잔기는 원하는 특이성, 친화성, 및 능력을 갖는 비인간 종, 예컨대 낙타과, 마우스, 랫트, 토끼, 또는 비인간 영장류의 상응하는 CDR 유래의 잔기(예를 들어, 공여자 항체)로 대체된다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린 서열의 하나 이상의 FR 영역 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 더욱 개선하기 위해 이루어진다. 인간화 항체 중쇄 또는 경쇄는 적어도 하나 이상의 가변 영역의 실질적으로 전부를 포함할 수 있으며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR은 비인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 특정 실시형태에서, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다. 더 자세한 내용에 대해서는, 문헌 [Jones *et al.*, Nature 321:522-25 (1986)]; 문헌[Riechmann *et al.*, Nature 332:323-29 (1988)]; 문헌[Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2:593-96 (1992)]; 문헌[Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992)]; 미국 특허 제6,800,738호; 제6,719,971호; 제6,639,055호; 제6,407,213호; 및 제6,054,297호를 참조한다.
- [0051] 특정 실시형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 "완전 인간 항체" 또는 "인간 항체"의 일부를 포함할 수 있으며, 여기서 당해 용어는 본원에서 상호교환 가능하게 사용되고, 인간 가변 영역 및, 예를 들어 인간 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 결합 분자는 항체 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 용어는 인간 기원의 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. "완전 인간" 항체는, 특정 실시형태에서, 폴리펩티드에 결합하고, 인간 생식계열 면역글로불린 핵산 서열의 자연 발생 체세포 변이체인 핵산 서열에 의해 인코딩되는 항체를 또한 포함할 수 있다. 용어 "완전 인간 항체"는 카바트(Kabat) 등에 의해 기술된 바와 같이 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 상응하는 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다(문헌[Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조). "인간 항체"는 인간에 의해 생성되고/되거나 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기법을 사용하여 제조된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리(문헌[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)]; 문헌[Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581 (1991)]) 및 효모 디스플레이 라이브러리(문헌[Chao *et al.*, Nature Protocols 1: 755-68 (2006)])를 포함하는 당업계에 공지된 다양한 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 또한, 문헌[Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985)]; 문헌[Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1):86-95 (1991)]; 및 문헌[van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001)]에 기재된 방법이 인간 모노클로날 항체의 제조를 위해 이용가능하다. 인간 항체는 항원 시험감염에 반응하여 이러한 항체를 생성하도록 변형되었지만 내인성 유전자좌(endogenous loci)가 불능화된 전이유전자 동물, 예를 들어, 마우스에 항원을 투여하여 제조될 수 있다(예를 들어, XENOMOUSE™ 기술에 관하여 문헌[Jakovovits, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66 (1995)]; 문헌[Brueggemann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58 (1997)]; 및 미국 특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호 참조). 또한 예를 들어, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관하여, 문헌[Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-62 (2006)]을 참조한다.
- [0052] 특정 실시형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 "재조합 인간 항체"의 일부를 포함할 수 있고, 여기서 상기 어구는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 단리된 인간 항체, 예컨대 숙주 세포로 트랜스펙션되는 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현되는 항체, 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대하여 전이유전자이고/이거나 전이염색체인 동물(예를 들어, 마우스 또는 소)로부터 단리된 항체(예를 들어, 문헌[Taylor, L. D. *et al.*, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295 (1992)] 참조) 또는 다른 DNA 서열로의 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제

조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 단리된 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래되는 가변 및 불변 영역을 가질 수 있다(문헌[Kabat, E. A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조). 그러나, 특정 실시형태에서, 이러한 재조합 인간 항체를 시험관내 돌연변이 유발(또는, 인간 Ig 서열에 대한 동물 전이유전자가 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이 유발)로 처리하고, 이에 따라 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이와 관련되지만, 생체내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0053] 특정 실시형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 "모노클로날 항체"의 일부를 포함할 수 있고, 여기서 본원에서 사용된 바와 같은 상기 용어는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 예를 들어, 집단을 포함하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이 또는 널리 공지된 변역후 변형, 예컨대 아미노산 이성질화 또는 탈아미드화, 메티오닌 산화 또는 아스파라긴 또는 글루타민 탈아미드화를 제외하고는 동일하며, 각 모노클로날 항체는 전형적으로 항원 상의 단일 에피토프를 인식할 것이다. 구체적인 실시형태에서, 본원에서 사용되는 "모노클로날 항체"는 단일의 하이브리도마 또는 다른 세포에 의해 생성되는 항체이다. 용어 "모노클로날"은 항체를 제조하기 위한 임의의 특정 방법으로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 개시에 유용한 모노클로날 항체는 문헌[Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975)]에 처음 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 박테리아 또는 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조). "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어, 문헌[Clackson *et al.*, Nature 352:624-28 (1991)] 및 문헌[Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-97 (1991)]에 기술된 기법을 이용하여, 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 클론 세포주 및 이에 의해 발현되는 모노클로날 항체의 제조를 위한 기타 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.* eds., 5th ed. 2002)]을 참조한다.

[0054] 전형적인 4-쇄 항체 유닛은 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성된 이종사량체 당단백질이다. IgG의 경우, 4-쇄 유닛은 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L쇄는 하나의 공유적 이황화 결합에 의해 H쇄에 연결되는 반면, 2개의 H쇄는 H쇄 아이소타입에 따라 하나 이상의 이황화 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L쇄는 또한 규칙적으로 이격된쇄내 이황화 가교를 갖는다. 각각의 H쇄는 N-말단에서 가변 도메인(VH)에 이어서, α 및 γ쇄 각각에 대한 3개의 불변 도메인(CH) 및 μ 및 ε 아이소타입에 대한 4개의 CH도메인을 갖는다. 각각의 L쇄는 N-말단에서 가변 도메인(VL)에 이어서, 다른 말단에 불변 도메인(CL)을 갖는다. VL은 VH와 정렬되고, CL은 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. VH와 VL의 쌍은 함께 단일의 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어, 문헌[Basic and Clinical Immunology 71 (Stites *et al.* eds., 8th ed. 1994)]; 및 문헌[Immunobiology (Janeway *et al.* eds., 5th ed. 2001)]을 참조한다.

[0055] 용어 "Fab" 또는 "Fab 영역"은 항원에 결합하는 항체 영역을 지칭한다. 통상적인 IgG는 통상 2개의 Fab 영역을 포함하며, 각각은 Y형 IgG 구조의 2개의 아암(arm) 중 하나에 위치한다. 각각의 Fab 영역은 전형적으로 중쇄 및 경쇄 각각의 하나의 가변 영역 및 하나의 불변 영역으로 구성된다. 보다 구체적으로, Fab 영역에서 중쇄의 가변영역 및 불변 영역은 VH 및 CH1 영역이고, Fab 영역에서 경쇄의 가변영역 및 불변 영역은 VL 및 CL 영역이다. Fab 영역에서 VH, CH1, VL 및 CL은 다양한 방식으로 배열되어, 본 개시에 따른 항원 결합 능력을 부여할 수 있다. 예를 들어, 기존의 IgG의 Fab 영역과 유사하게, VH 및 CH1 영역은 하나의 폴리펩티드 상에 있을 수 있고, VL 및 CL 영역은 개별 폴리펩티드 상에 있을 수 있다. 대안적으로, VH, CH1, VL 및 CL 영역은 모두 동일한 폴리펩티드 상에 있을 수 있고 하기 섹션에 더 상세히 기재된 바와 같이 상이한 순서로 배향될 수 있다.

[0056] 용어 "가변 영역", "가변 도메인", "V 영역" 또는 "V 도메인"은 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 아미노-말단에 위치하며, 중쇄에서 약 120 내지 130개 아미노산 및 경쇄에서 약 100 내지 110개 아미노산의 길이를 가지는, 항체의 경쇄 또는 중쇄의 부분을 지칭하며, 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에서 사용된다. 중쇄의 가변영역은 "VH"로 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변영역은 "VL"로 지칭될 수 있다. 용어 "가변"은 가변영역의 특정 세그먼트가 항체 중에서 서열이 광범위하게 달라진다는 사실을 나타낸다. V영역은 항원 결합을 매개하고 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 정의한다. 그러나 가변성은 가변영역의 110개 아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 대신, V영역은 각각 약 9 내지 12개 아미노산 길이인 "초가변 영역"으로 지칭되는 더 큰 가변성(예를 들어, 극도의 가변성)의 더 짧은 영역에 의해 분리되는 약 15 내지 30개 아미노산의 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 덜 가변성인(예컨대 상대적으로 불변성인) 스트레치로 이루어진다. 중쇄 및 경쇄의 가변영역은 각각 β 시트 구조를 연결하는 루프를 형성하는, 일부 경우에 이의 일부를 형성하는 3개의 초가

변 영역에 의해 연결된, 주로 β 시트 입체배치(configuration)를 채택하는 4개의 FR을 포함한다. 각각의 쇠 내의 추가변 영역은 FR에 의해 밀접하게 유지되고, 다른 사슬로부터의 추가변 영역은, 항체의 항원-결합 부위 형성에 기여한다(예를 들어, 문헌[Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed. 1991)] 참조). 불변 영역은 항체가 항원에 결합하는 데 직접적으로 관여하지 않지만, 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC)에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 가변 영역은 상이한 항체 사이에서 서열이 광범위하게 달라진다. 구체적인 실시형태에서, 가변 영역은 인간 가변 영역이다.

[0057] 용어 "카바트에 따른 가변 영역 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 이의 변형은 상기 문헌[Kabat *et al.*]의 항체 모음(compilation)의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역에 사용되는 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 그 내로의 삽입에 상응하는 더 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 잔기 52 뒤에 단일 아미노산 삽입물(카바트에 따른 잔기 52a) 및 잔기 82 뒤에 3개의 삽입된 잔기(예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링된 서열과의 정렬에 의해 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다. 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인의 잔기(대략 경쇄의 잔기 1 내지 107 및 중쇄의 잔기 1 내지 113)를 언급할 때 사용된다(예를 들어, 상기 문헌[Kabat *et al.*]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 일반적으로 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 잔기를 언급할 때 사용된다(예를 들어, 상기 문헌[Kabat *et al.*]에 보고된 EU 인덱스). "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG 1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 다른 넘버링 시스템은 예를 들어 AbM, 초티아(Chothia), 컨택트(Contact), IMGT 및 AHon에 의해 설명되었다.

[0058] 항체와 관련하여 사용될 때, 용어 "중쇄"는 약 50 내지 70 kDa의 폴리펩티드 쇠를 지칭하며, 여기서 아미노-말단 부분은 약 120 내지 130개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하고, 카복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 불변 영역은 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여, 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)로 지칭되는 5가지 별개의 유형(예를 들어, 아이소타입) 중 하나일 수 있다. 별개의 중쇄는 크기가 상이하다: α , δ 및 γ 는 대략 450개 아미노산을 함유하는 반면, μ 및 ϵ 는 대략 550개의 아미노산을 함유한다. 경쇄와 조합되는 경우, 이들 별개의 유형의 중쇄는 5개의 널리 공지되어 있는 부류(예를 들어, 아이소타입)의 항체, 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM를 생성하며, 이는 4개의 IgG의 하위부류, 즉 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0059] 항체와 관련하여 사용될 때, 용어 "경쇄"는 약 25 kDa의 폴리펩티드 사슬을 지칭하며, 여기서 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하고, 카복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 경쇄의 대략적인 길이는 211 내지 217개 아미노산이다. 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ) 또는 람다(λ)로 지칭되는 2가지 별개의 유형이 존재한다.

[0060] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "초가변 영역", "HVR", "상보성 결정 영역" 및 "CDR"은 상호교환 가능하게 사용된다. "CDR"은 면역글로불린(Ig 또는 항체) VH β -시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3개의 초가변 영역(H1, H2 또는 H3) 중 하나 또는 항체 VL β -시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3개의 초가변 영역(L1, L2 또는 L3) 중 하나를 지칭한다. VH 도메인 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3은 또한, 각각 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3으로도 지칭된다. VL 도메인 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3은 또한, 각각 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3으로도 지칭된다. 따라서, CDR은 프레임워크 영역 서열 내에 산재된 가변 영역 서열이다.

[0061] CDR 영역은 당업자에게 잘 알려져 있고 잘 알려진 넘버링 시스템에 의해 정의되었다. 예를 들어, 카바트 상보성 결정 영역(CDR)은 서열 가변성에 기초하며, 가장 흔히 사용된다(예를 들어, 상기 문헌[Kabat *et al.*]; 문헌[Nick Deschacht *et al.*, *J Immunol* 2010; 184:5696-5704] 참조). 초티아는 대신 구조적 루프의 위치를 나타낸다(예를 들어, 문헌[Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-17 (1987)] 참조). 카바트 넘버링 규칙을 사용하여 넘버링될 때, 초티아 CDR-H1 루프의 끝은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 달라진다(이는 카바트 넘버링 체계가 H35A와 H35B에서 삽입을 배치하기 때문이며; 35A 또는 35B 중 어느 것도 존재하지 않는 경우, 루프는 32에서 끝나며; 35A만 존재하는 경우, 루프는 33에서 끝나고; 35A와 35B가 모두 존재하는 경우, 루프는 34에서 끝난다). AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 초티아 구조적 루프 간의 절충안을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다(예를 들어, 문헌[Antibody Engineering Vol. 2 (Kontermann and D'ubel eds., 2d ed. 2010)] 참조). "컨택트" 초가변 영역은 이용 가능한 복잡한 결정 구조의 분석에 기초한다. 개발되어 널리 채택된 또 다른 보편적인 넘버링 시스템은 ImMunoGeneTics(IMGT) Information System[®]이

다(문헌[Lafranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003)]). IMGT는 인간 및 기타 척추동물의 면역글로불린(IG), T-세포 수용체(TCR) 및 주요 조직적합성 복합체(MHC)에 특화된 통합 정보 시스템이다. 본원에서, CDR은 아미노산 서열 및 경쇄 또는 중쇄 내의 위치 둘 모두에 관하여 언급된다. 면역글로불린 가변 도메인의 구조 내의 CDR의 "위치"가 종 사이에 보존되고, 루프에 지칭되는 구조에 존재하기 때문에, 구조적 특징에 따라 가변 도메인 서열을 정렬하는 넘버링 시스템을 사용하여, CDR 및 프레임워크 잔기는 쉽게 식별된다. 이 정보는 하나의 종의 면역글로불린 유래의 CDR 잔기를 전형적으로 인간 항체 유래의, 수여자 프레임워크 내로 이식하고 대체하는 데 사용될 수 있다. 추가의 넘버링 시스템(AHon)은 문헌[Honegger and Plückthun, J. Mol. Biol. 309: 657-70 (2001)]에 의해 개발되었다. 예를 들어, 카바트 넘버링 및 IMGT 고유 넘버링 시스템을 포함하는 넘버링 시스템 간의 대응은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 상기 문헌[Kabat]; 상기 문헌[Chothia and Lesk]; 상기 문헌[Martin]; 상기 문헌[Lafranc *et al.*] 참조). 이들 추가변 영역 또는 CDR 각각으로부터의 잔기는 하기 표 1에 예시되어 있다.

[표 1]

다양한 넘버링 시스템에 따른 예시적인 CDR

루프	카바트	AbM	초티아	컨택트	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 또는 L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 또는 L50--L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 또는 L89--L97	L89--L96	L105--L117
CDR HI	H31--H35B (카바트 넘버링)	H26--H35B	H26--H32,34	H30--H35B	H27--H38
CDR HI	H31--H35 (초티아 넘버링)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 또는 H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 또는 H95--H102	H93--H101	H105--H117

주어진 CDR의 경계는 식별에 사용되는 체계에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예컨대 가변 영역의 용어 "CDR" 및 "상보성 결정 영역", 뿐만 아니라 항체 또는 이의 영역의 개별 CDR(예를 들어, CDR-H1, CDR-H2)은 상기 본원에 기재된 임의의 공지된 체계에 의해 정의된 상보성 결정 영역을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 경우에, IMGT, 카바트, 초티아 또는 컨택트 방법에 의해 정의된 CDR과 같은 특정 CDR 또는 CDR들의 식별을 위한 체계가 특정된다. 다른 경우에는 CDR의 특정 아미노산 서열이 제공된다. CDR 영역이 또한 다양한 넘버링 시스템의 조합, 예를 들어, 카바트 및 초티아 넘버링 시스템의 조합 또는 카바트 및 IMGT 넘버링 시스템의 조합에 의해 정의될 수 있는 것을 주의해야 한다. 따라서, "특정 VH에 제시된 바와 같은 CDR1"과 같은 용어는 상기 기재된 예시적인 CDR 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 임의의 CDR1을 포함하지만, 이에 의해 제한되지 않는다. 일단 가변 영역(예를 들어, VH 또는 VL)이 주어지면, 당업자는 영역 내의 CDR이 상이한 넘버링 시스템 또는 이의 조합에 의해 정의될 수 있는 것을 이해할 것이다.

초가변 영역은 다음과 같이 "연장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL 내의 24-36 또는 24-34(L1), 46-56 또는 50-56(L2), 및 89-97 또는 89-96(L3), 및 VH 내의 26-35 또는 26-35A(H1), 50-65 또는 49-65(H2) 및 93-102, 94-102 또는 95-102(H3).

용어 "불변 영역" 또는 "불변 도메인"은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만, Fc 수용체와의 상호작용과 같은 다양한 이펙터 기능을 나타내는, 경쇄 및 중쇄의 카복시 말단 부분을 지칭한다. 당해 용어는 항원 결합 부위를 함유하는 가변 영역인 면역글로불린의 다른 부분에 비해 더 보존된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분자의 부분을 지칭한다. 불변 영역은 중쇄의 CH1, CH2 및 CH3 영역과 경쇄의 CL 영역을 함유할 수 있다.

용어 "프레임워크" 또는 "FR"은 CDR에 측접하는 가변 영역 잔기를 지칭한다. FR 잔기는, 예를 들어 키메라, 인간화, 인간, 도메인 항체, 디아바디, 선형 항체, 및 이중특이적 항체에 존재한다. FR 잔기는 초가변 영역 잔기 또는 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

본원에서 용어 "Fc 영역"은 예를 들어, 고유 서열 Fc 영역, 재조합 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는 데 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 종종 위치 Cys226의 아미노산 잔기로부터 또는 Pro230으로부터 이의 카복실-말단

까지 스트레치되도록 정의된다. Fc 영역의 C-말단 라이신(EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어, 항체의 생성 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산을 재조합적으로 조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 온전한 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기가 있거나 없는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. "기능적 Fc 영역"은 고유 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식균 작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향조절 등을 포함한다. 이러한 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 영역 또는 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 영역 또는 도메인)과 조합될 것을 요구하고, 당업자에게 공지된 다양한 검정을 사용하여 평가될 수 있다. "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형(예를 들어, 치환, 부가 또는 결실)으로 인해 고유 서열 Fc 영역의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시 형태에서, 변이체 Fc 영역은, 예를 들어 고유 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 고유 서열 Fc 영역 내에 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역 내에 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 또는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원의 변이체 Fc 영역은 고유 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80%의 상동성, 또는 이와 적어도 약 90%의 상동성, 예를 들어, 이와 적어도 약 95%의 상동성을 가질 수 있다.

[0069] 본원에 사용되는 바와 같이, "에피토프"는 당업계의 용어이고, 결합 분자(예를 들어, 항체)가 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 국소 영역을 지칭한다. 에피토프는 선형 에피토프 또는 입체구조(conformational), 비선형 또는 불연속 에피토프일 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 항원의 경우, 에피토프는 폴리펩티드의 인접 아미노산 일 수 있거나("선형" 에피토프), 에피토프는 폴리펩티드의 2개 이상의 비인접 영역으로부터의 아미노산을 포함할 수 있다("입체구조", "비선형" 또는 "불연속" 에피토프). 일반적으로 선형 에피토프는 2차, 3차, 또는 4차 구조에 의존하거나 의존하지 않을 수 있다는 것이 당업자에게 의해 이해될 것이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 결합 분자는 아미노산이 천연 3차원 단백질 구조로 폴딩되는지 여부에 관계없이 아미노산 그룹에 결합한다. 다른 실시형태에서, 결합 분자는 에피토프를 인식하고 결합하도록 특정 입체구조(예를 들어, 굽힘(bend), 트위스트(twist), 회전(turn) 또는 폴드(fold))를 나타내기 위해 에피토프를 구성하는 아미노산 잔기를 필요로 한다.

[0070] 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열과 관련하여 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%) " 또는 "상동성"은 서열을 정렬하고, 필요하다면 갭을 도입하여, 서열 동일성의 부분으로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성한 후에, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 서열의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하는 목적을 위한 정렬은 공개 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN™(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여, 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대의 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기에 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0071] 용어 "특이성"은 항원의 특정 에피토프에 대한 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 항체)의 선택적인 인식을 지칭한다. 천연 항체는 예를 들어, 단일특이적이다. 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "다중특이적"은 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 항체)이 적어도 2개가 상이한 항원에 결합하는 2개 이상의 항원-결합 부위를 갖는 것을 나타낸다. 본원에 사용되는 바와 같은 "이중특이적"은 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 항체)이 2개의 상이한 항원-결합 특이성을 갖는 것을 나타낸다. 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "단일특이적" CAR은 각각이 동일한 항원에 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 갖는 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 항체)을 나타낸다.

[0072] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "~가"는 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 항체) 내의 특정된 수의 결합 부위가 존재하는 것을 나타낸다. 예를 들어, 천연 항체 또는 전장 항체는 2개의 결합 부위를 가지고, 2가이다. 이와 같이, 용어 "3가", "4가", "5가" 및 "6가"는 각각 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 항체) 내의 2개의 결합 부위, 3개의 결합 부위, 4개의 결합 부위, 5개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다.

[0073] 본원에 사용되는 바와 같은 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 하나 이상의 항원 특이성을 면역 이펙터 세포, 예컨대 T 세포 상으로 이식하는 데 사용될 수 있는 유전학적으로 조작된 수용체를 지칭한다. 일부 CAR은 "인공 T-세포 수용체", "키메라 T 세포 수용체" 또는 "키메라 면역 수용체"로도 알려져 있다. 일부 실시형태에서, CAR은 하나 이상의 항원(예컨대 종양 항원)에 대하여 특이적인 세포의 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 T 세포 및/또는 다른 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. "CAR-T 세포"는 CAR을 발현하는 T 세포를 지칭한다.

- [0074] 용어 "폴리펩티드" 및 "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며, 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 이는 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 이는 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 당해 용어는 또한 천연적으로 또는 개입; 예를 들어, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작 또는 변형에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 또한, 예를 들어, 비천연 아미노산 및 당업계에 공지된 다른 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는 아미노산의 하나 이상의 유사체를 함유하는 폴리펩티드가 당해 정의 내에 포함된다. 본 개시의 폴리펩티드가 항체 또는 번역글로불린 상과의 다른 구성원에 기반할 수 있기 때문에, 특정 실시형태에서, "폴리펩티드"가 단일의쇄로서 또는 둘 이상의 회합된쇄로서 발생할 수 있는 것이 이해된다.
- [0075] 본원에서 상호교환 가능하게 사용되는 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하며, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 메틸화된 뉴클레오티드 및 이들의 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "올리고뉴클레오티드"는 길이가 일반적으로 약 200개 미만의 뉴클레오티드이지만 반드시 그렇지 않은, 짧은, 일반적으로 단일-가닥의 합성 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 설명은 올리고뉴클레오티드에 동일하고 완전하게 적용 가능하다. 본 개시의 결합 분자를 생성하는 세포는 모체 하이브리도마 세포뿐만 아니라 항체를 인코딩하는 핵산이 도입된 박테리아 및 진핵 숙주 세포를 포함할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 개시된 임의의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 말단은 5' 말단이고; 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 방향은 5' 방향으로 지칭된다. 초기 RNA 전사물을 5'에서 3'으로 부가하는 방향은 전사 방향으로 지칭되며; RNA 전사물의 5' 말단에 대하여 5'인 RNA 전사물과 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "업스트림 서열"로 지칭되고; RNA 전사물의 3' 말단에 대하여 3'인 RNA 전사물과 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "다운스트림 서열"로 지칭된다.
- [0076] "단리된 핵산"은 다른 게놈 DNA 서열뿐만 아니라 자연적으로 고유 서열과 동반되는 리보솜 및 중합효소와 같은 단백질 또는 복합체로부터 실질적으로 분리된 핵산, 예를 들어 RNA, DNA, 또는 혼합 핵산이다. "단리된" 핵산 분자는 핵산 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된 것이다. 또한, cDNA 분자와 같은 "단리된" 핵산 분자는 재조합 기법에 의해 생성될 때 다른 세포 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자는 단리되거나 정제된다. 상기 용어는 자연 발생 환경으로부터 제거된 핵산 서열을 포함하며, 재조합 또는 클로닝된 DNA 단리물 및 화학적으로 합성된 유사체 또는 이중 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체를 포함한다. 실질적으로 순수한 분자는 단리된 형태의 분자를 포함할 수 있다. 구체적으로, 본원에 기재된 CAR 또는 항체를 인코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 이것이 생성된 환경에서 대개 회합되어 있는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이다.
- [0077] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로의 축퇴성 버전이고, 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이라는 어구는 또한, 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도까지, 인트론을 포함할 수 있다.
- [0078] 용어 "제어 서열"은 특정 숙주 유기체에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어, 프로모터, 선택적으로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인헨서를 사용하는 것으로 알려져 있다.
- [0079] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "작동 가능하게 연결된" 및 유사한 어구(예를 들어, 유전학적으로 융합된)는 핵산 또는 아미노산과 관련하여 사용될 때, 서로 기능적 관계에 놓여진, 각각 핵산 서열 또는 아미노산 서열의 작동 가능한 연결을 지칭한다. 예를 들어, 작동 가능하게 연결된 프로모터, 인헨서 요소, 오픈 리딩 프레임(open reading frame), 5' 및 3' UTR, 및 종결자 서열은 핵산 분자(예를 들어, RNA)의 정확한 생성을 초래한다. 일부 실시형태에서, 작동 가능하게 연결된 핵산 요소는 오픈 리딩 프레임의 전사, 그리고 궁극적으로는 폴리펩티드의 생성(즉, 오픈 리딩 프레임의 발현)을 초래한다. 또 다른 예로서, 작동 가능하게 연결된 펩티드는 기능성 도메인이 서로 적절한 거리를 두고 위치하여 각각의 도메인의 의도된 기능을 부여하는 것이다.
- [0080] 용어 "벡터"는 핵산 서열을 숙주 세포로 도입하기 위해, 예를 들어, 본원에 기재된 결합 분자(예를 들어, 항체)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 서열을 운반하거나 포함하는 데 사용되는 물질을 지칭한다. 사용

에 적용 가능한 벡터는 예를 들어 발현 벡터, 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 인공 염색체를 포함하며, 숙주 세포의 염색체로의 안정적인 통합을 위해 작동 가능한, 선택 서열 또는 마커를 포함할 수 있다. 추가로, 벡터는 하나 이상의 선택 가능한 마커 유전자 및 적절한 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 포함될 수 있는 선택 가능한 마커 유전자는, 예를 들어, 항생제 또는 독소에 대한 내성을 제공하거나, 영양 요구성 결핍을 보완하거나, 배양 배지에 없는 중요한 영양소를 공급한다. 발현 제어 서열은 구성성(constitutive) 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 등을 포함할 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려져 있다. 둘 이상의 핵산 분자가 동시 발현되어야 하는 경우(예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄 또는 항체 VH 및 VL 둘 모두), 둘 모두의 핵산 분자는 예를 들어 단일 발현 벡터에 삽입되거나 개별 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 단일 벡터 발현의 경우, 인코딩 핵산은 하나의 공통 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결되거나 하나의 유도성 프로모터 및 하나의 구성성 프로모터와 같은 상이한 발현 제어 서열에 연결될 수 있다. 숙주 세포 내로의 핵산 분자의 도입은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 핵산 분석, 예컨대 mRNA의 노던 블롯 또는 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 증폭, 유전자 생성물의 발현에 대한 면역 블롯팅, 또는 도입된 핵산 서열의 발현 또는 그의 상응하는 유전자 생성물을 시험하기 위한 기타 적합한 분석 방법을 포함한다. 당업자는 핵산 분자가 원하는 생성물을 생성하기에 충분한 양으로 발현된다는 것을 이해하고, 발현 수준이 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 충분한 발현을 얻기 위해 최적화될 수 있음을 추가로 이해한다.

[0081] 본원에 사용되는 용어 "숙주"는 동물, 예컨대 포유동물(예를 들어, 인간)과 같은 동물을 지칭한다.

[0082] 본원에 사용되는 용어 "숙주 세포"는 핵산 분자로 트랜스펙션될 수 있는 특정 대상 세포 및 이러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 지칭한다. 이러한 세포의 자손은 후속 세대 또는 숙주 세포 계통 내로의 핵산 분자의 통합에서 발생할 수 있는 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 핵산 분자로 트랜스펙션된 모세포와 동일하지 않을 수 있다.

[0083] 본원에 사용되는 용어 "자가"는 이후에 개체 내로 재도입될, 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭하도록 의도된다.

[0084] "동종이계"는 동일한 종의 상이한 개체로부터 유래된 이식편을 지칭한다.

[0085] 본원에 사용되는 용어 "트랜스펙션된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "트랜스펙션된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 트랜스펙션되거나, 형질전환되거나 형질도입된 것이다. 세포는 일차 대상 세포 및 이의 자손을 포함한다.

[0086] 본원에 사용되는 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 미국 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나, 동물에, 보다 구체적으로 인간에 사용하기 위해 미국 약전, 유럽 약전 또는 기타 일반적으로 인정되는 약전에 열거됨을 의미한다.

[0087] "부형제"는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 용매, 또는 캡슐화 물질과 같은 약제학적으로 허용 가능한 물질, 조성물, 또는 비히클을 의미한다. 부형제는 예를 들어, 흡수 촉진제, 항산화제, 결합제, 완충제, 담체, 코팅제, 착색제, 희석제, 봉해제, 유화제, 증량제, 충전제, 향료, 보습제, 윤활제, 향료, 보존제, 추진제, 이형제, 살균제, 감미료, 가용화제, 습윤제 및 이들의 혼합물과 같은 첨가제 또는 캡슐화 물질을 포함한다. 용어 "부형제"는 또한 희석제, 애주번트(예를 들어, 프로인트 애주번트(Freund's adjuvant)(완전 또는 불완전)) 또는 비히클을 지칭할 수 있다.

[0088] 일부 실시형태에서, 부형제는 약제학적으로 허용 가능한 부형제이다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제의 예는 완충제, 예컨대 인산염, 시트르산염 및 기타 유기산; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저 분자량(예를 들어, 약 10개 미만의 아미노산 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐 피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류, 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알코올; 나트륨과 같은 염 형성 반대이온; 및/또는 TWEEN™, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 PLURONICS™와 같은 비이온성 계면 활성제를 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제의 다른 예는 문헌 [Remington and Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1990)]에 기재되어 있다.

[0089] 일 실시형태에서, 각 구성성분은 약제학적 제형의 다른 성분과 양립할 수 있다는 의미에서 "약제학적으로 허용 가능"하고, 합리적인 이익/위험 비에 상응하는 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성 또는 기타 문제 또는 합병증 없이, 인간 및 동물의 조직 또는 기관과 접촉하여 사용하기에 적합하다. 예를 들어, 문헌[Lippincott

Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005]; 문헌[Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.]; 문헌[Rowe et al., Eds.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009]; 문헌[Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd ed.; Ash and Ash Eds.]; 문헌[Gower Publishing Company: 2007]; 문헌[Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 사용되는 투여량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유동물에 대해 비독성이다. 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 수성 pH 완충 용액이다.

- [0090] 일부 실시형태에서, 부형제는 땅콩유, 대두유, 팥유, 참기름 등과 같은 식유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 것을 포함하는 오일 및 물과 같은 멸균 액체이다. 물은 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)이 정맥 내로 투여될 때 예시적인 부형제이다. 식염수 용액과 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액도 액체 부형제로서, 특히 주사 가능한 용액으로서 사용될 수 있다. 부형제는 또한 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함할 수 있다. 원한다면, 조성물은 또한 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 서방형 제형 등의 형태를 취할 수 있다. 제형을 포함하는 경구 조성물은 표준 부형제, 예컨대 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 사카린 나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다.
- [0091] 약제학적 화합물을 포함하는 조성물은 적합한 양의 부형제와 함께, 예를 들어 단리되거나 정제된 형태의 결합 분자(예를 들어, 항체)를 함유할 수 있다.
- [0092] 본원에 사용되는 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 원하는 결과를 초래하기에 충분한 본원에 제공된 항체 또는 약제학적 조성물 및 작용제를 포함하는 항체 또는 약제학적 조성물의 양을 지칭한다.
- [0093] 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 특정 실시형태에서, 대상체는 비-영장류 또는 영장류(예를 들어, 인간)와 같은 포유동물이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 일 실시형태에서, 대상체는 질병 또는 장애로 진단된 포유동물, 예를 들어 인간이다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 질병 또는 장애가 발생할 위험이 있는 포유동물, 예를 들어 인간이다.
- [0094] "투여하다" 또는 "투여"는 예컨대 점막, 피내, 정맥내, 근육내 전달 및/또는 본원에 기재된 또는 당업계에 알려진 임의의 다른 물리적 전달 방법에 의해, 체외에 존재하는 물질을 환자 내로 주사하거나, 다르게는 물리적으로 전달하는 조치를 지칭한다.
- [0095] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 하나 이상의 요법의 투여로 인한 질병 또는 질환의 진행, 중증도 및/또는 기간의 감소 또는 개선을 지칭한다. 치료는 환자가 여전히 기저 장애를 앓고 있을 수 있음에도 불구하고 환자에게 개선이 관찰되도록 기저 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 감소, 완화 및/또는 경감이 있었는지를 평가함으로써 결정될 수 있다. 용어 "치료"는 질병을 관리하고 개선하는 것 둘 모두를 포함한다. 용어 "관리하다", "관리하는" 및 "관리"는 대상체가 질병의 치유를 반드시 초래하지는 않는 요법으로부터 얻는 유의한 효과를 지칭한다.
- [0096] 용어 "예방하다", "예방하는" 및, "예방"은 질병, 장애, 질환, 또는 관련 증상(들)(예를 들어, 당뇨병 또는 암)의 발병(또는 재발) 가능성을 감소시키는 것을 지칭한다.
- [0097] 본원에서 사용된 바와 같이, 암의 발달의 "지연"은 질병의 발달의 연기, 저해, 둔화, 지체, 안정화 및/또는 연기를 의미한다. 이 지연은 치료할 질병 및/또는 개체의 병력에 따라 다양한 시간 길이일 수 있다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 유의미한 지연은 개체에서 질병이 발달하지 않는다는 점에서 사실상 예방을 포함할 수 있다. 암의 발달을 "지연"시키는 방법은 상기 방법을 이용하지 않는 것과 비교할 때 주어진 시간 프레임 내에서 질병 발달의 가능성을 감소시키고/시키거나 주어진 시간 프레임 내에서 질병의 정도를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는 전형적으로 통계적으로 유의미한 수의 개체를 이용하는 임상 연구를 기반으로 한다. 암 발달은 컴퓨터 축 단층촬영(CAT 스캔), 자기 공명 영상화(MRI), 복부 초음파, 응고 시험, 동맥조영술, 또는 생검을 비롯하여 이로 제한되지 않는 표준 방법을 이용하여 검출 가능할 수 있다. 발달은 또한 초기에 검출 불가능할 수 있고, 발생, 재발 및 발병을 포함하는 암 진행을 지칭할 수 있다.
- [0098] 본원에 사용되는 "GPC3 연관 질병 또는 장애"는 GPC3이 발현되거나 과발현되는 세포 또는 조직을 포함하는 질병 또는 장애를 지칭한다. 일부 실시형태에서, GPC3 연관 질병 또는 장애는 GPC3이 비정상적으로 발현되는 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, GPC3 연관 질병 또는 장애는 GPC3이 세포 내에서 또는 세포 상에서 이의 활성 중

적어도 하나가 결핍된 세포를 포함한다.

[0099] 용어 "약" 및 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 15% 이내, 10% 이내, 9% 이내, 8% 이내, 7% 이내, 6% 이내, 5% 이내, 4% 이내, 3% 이내, 2% 이내, 1% 이내 또는 그 미만을 의미한다.

[0100] 본 개시 및 청구범위에서 사용되는 바와 같은, 단수 형태 "하나" 및 "상기"는 문맥상 명확하게 달리 나타내지 않는 한 복수 형태를 포함한다.

[0101] 본원에서 "포함하는"이라는 용어로 실시형태가 설명되는 경우, "이루어지는" 및/또는 "필수적으로 이루어지는"의 관점에서 설명된 유사한 실시형태가 또한 제공되는 것으로 이해된다. 또한, "필수적으로 이루어지는"이라는 어구와 함께 본원에서 실시형태가 설명되는 경우, "이루어지는"의 관점에서 설명된 유사한 실시형태가 또한 제공된다는 것이 이해된다.

[0102] "A와 B 사이" 또는 "A 내지 B"와 같은 어구에서 사용된 용어 "내지"는 A 및 B 둘 모두를 포함하는 범위를 지칭한다.

[0103] 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에서 사용된 용어 "및/또는"은 A 및 B 둘 모두; A 또는 B; A(단독); 및 B(단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 어구에서 사용된 용어 "및/또는"은 하기의 실시형태의 각각을 포괄하는 것으로 의도된다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0104] 5.2. GPC3 결합 분자

[0105] 5.2.1. GPC3에 결합하는 항체

[0106] 일 양태에서, 글리피칸-3(GPC3)에 결합할 수 있는 항체가 본원에 제공된다. GPC3은 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커에 의해 세포 표면에 부착된 헤파란 술페이트(HS) 프로테오글리칸의 글리피칸 과의 구성원이다(문헌[Films and Selleck, J Clin Invest 108:497-501, 2001]). GPC3 유전자는 대략 70 kD의 코어 단백질을 코딩하며, 이는 푸린에 의해 절단되어 N-말단 40 kD 단편 및 C-말단 30 kD 단편을 생성할 수 있다. 2개의 HS 쇄는 GPC3의 C-말단 부분 상에 부착된다. GPC3 및 기타 글리피칸 과 단백질은 세포 분열 및 세포 성장 조절에서 역할을 수행한다. GPC3은 HCC, 및 흑색종, 폐의 편평 세포 암종 및 난소의 투명 세포 암종을 포함하는 일부 다른 인간 암에서 고도로 발현되지만(문헌[Ho and Kim, Eur J Cancer 47(3):333-338, 2011]), 정상 조직에서는 발현되지 않는다. GPC3은 SGB, DGSX, MXR7, SDYS, SGBS, OCI-5, SGBS1 및 GTR2-2로도 알려져 있다. 인간 GPC3의 알려져 있는 4가지 아이소폼(아이소폼 1 내지 4)이 존재한다. 진뱅크 수탁 번호: NM_001164617 및 NP_001158089(아이소폼 1); NM_004484 및 NP_004475(아이소폼 2); NM_001164618 및 NP_001158090(아이소폼 3); 및 NM_001164619 및 NP_001158091(아이소폼 4)을 포함하는 GPC3의 4가지 아이소폼의 핵산 및 아미노산 서열이 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항-GPC3 항체는 상기 4가지 아이소폼 중 임의의 것에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 인간 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항-GPC3 항체는 하나 이상의 GPC3 활성을 조절한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항-GPC3 항체는 길항제 항체이다.

[0107] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항-GPC3 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)로 GPC3(예를 들어, 인간 GPC3)에 결합한다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, Fab 버전의 관심 항체와 이의 항원을 사용하여 수행되는 RIA에 의한 것(문헌[Chen et al., 1999, J. Mol Biol 293:865-81]); 예를 들어, Octet®Red96 시스템을 사용하는 Octet®에 의한, 또는 예를 들어 Biacore®TM-2000 또는 Biacore®TM-3000을 사용하는 Biacore®에 의한 생물층 간섭계(BLI) 또는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 검정에 의한 것을 포함하는 이들 중 임의의 것은 본 개시의 목적을 위해 사용될 수 있다. "온-속도(on-rate)" 또는 "회합의 속도" 또는 "회합 속도" 또는 "kon"은 또한, 예를 들어, Octet®Red96, Biacore®TM-2000 또는 Biacore®TM-3000 시스템을 사용하여 상기 기재된 동일한 생물층 간섭계(BLI) 또는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기법으로 결정될 수 있다.

[0108] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항-GPC3 항체는 하기 섹션 6에 기재된 것들이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 SEQ ID NO: 61 내지 80 및 117 내지 125 중 어느 하나의 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다. CDR 서열은 널리 공지되어 있는 넘버링 시스템에 따라 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, CDR은 IMGT 넘버링에 따른다. 일부 실시형태에서, CDR은 카바트 넘버링에 따른다. 일부 실시형태에서, CDR은 AbM 넘버링에 따른다. 다른 실시형태에서, CDR은 초티아 넘버링에 따른다. 다른 실시형태에서, CDR은 컨택트 넘버링에

[illegible]

[0112] 다른 실시형태에서, (i) SEQ ID NO: 1 내지 10 중 어느 하나에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; (ii) SEQ ID NO: 11 내지 20 중 어느 하나에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, (iii) SEQ ID NO: 21 내지 30 중 어느 하나에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; (iv) SEQ ID NO: 31 내지 40 중 어느 하나에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1; (v) SEQ ID NO: 41 내지 50 중 어느 하나에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2; 및/또는 (vi) SEQ ID NO: 51 내지 60 중 어느 하나에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 GPC3에 결합하는 항체가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 항-GPC3 항체는 인간화된다. 일부 실시형태에서, 항-GPC3 항체는 수여자 인간 프레임워크, 예를 들어, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크를 포함한다.

[0113] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0114] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 52의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0115] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 43의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 53의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0116] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0117] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0118] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 46의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 56의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0119] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 57의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0120] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 48의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0121] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 59의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0122] 더욱 구체적인 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및 SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및 SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 50의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 60의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0123] 일부 실시형태에서, 항체는 SEQ ID NO: 61 내지 80 및 117 내지 125의 하나 이상의 프레임워크 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시형태에서, 인간화 항체는 하기 섹션 6에 예시된 방법 또는 하기 섹션에 기재된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 본원에 기재된 프레임워크 영역은 CDR 넘버링 시스템의 경계에 기초하여 결정된다. 다시 말하면, CDR이 예를 들어, 카바트, IMGT 또는 초티아에 의해 결정된다면, 프레임워크 영역은 N-말단에서 C-말단으로 하기의 형식으로 가변 영역에서 CDR을 둘러싸는 아미노산 잔기이다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 예를 들어, FR1은 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템 또는 초티아 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 CDR1 아미노산 잔기에 대하여 N-말단인 아미노산 잔기로서 정의되며, FR2는 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템 또는 초티아 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 CDR1과 CDR2 아미노산 잔기 사이의 아미노산 잔기로서 정의되며, FR3은 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템 또는 초티아 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 CDR2와 CDR3 아미노산 잔기 사이의 아미노산 잔기로서 정의되며, FR4는 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템 또는 초티아 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 CDR3 아미노산 잔기에 대하여 C-말단인 아미노산 잔기로서 정의된다.

[0124] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 61을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 62를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 72를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 63을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 73을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 64를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 74를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 65를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 75를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 66을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 76을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 67을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 77을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 68을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 78을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 69를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 79를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 70을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 80을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 117을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 118을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 119를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 120을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 121을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 122를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 117을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 118을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 119를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 120을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 121을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 122를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 117을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 118을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 119를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 120을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID

NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 121을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 122를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 scFv이다.

[0125] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에 제공되는 임의의 항체, 예를 들어, 하기 섹션 6에 기재된 것들에 비하여 소정의 동일성 퍼센트를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0126] 2개의 서열(예를 들어, 아미노산 서열 또는 핵산 서열) 간의 동일성 퍼센트를 결정하는 것은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 두 서열의 비교에 사용되는 수학적 알고리즘의 비제한적인 예는 문헌[Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877 (1993)]에서와 같이 변형된 문헌[Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268 (1990)]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 문헌[Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403 (1990)]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 내로 통합된다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 본원에 기재된 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 획득하기 위해, 예를 들어, 점수=100, 단어 길이=12로 설정된 NBLAST 뉴클레오타이드 프로그램 파라미터로 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본원에 기재된 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 획득하기 위해, 예를 들어, 점수 50, 단어 길이=3으로 설정된 XBLAST 프로그램 파라미터로 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭이 있는 정렬을 획득하기 위해, 문헌[Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)]에 기재된 것과 같은 Gapped BLAST가 사용될 수 있다. 대안적으로, PSI BLAST를 사용하여 분자들 사이의 먼 관계를 검출하는 반복 검색을 수행할 수 있다(*Id.*). BLAST, Gapped BLAST, 및 PSI Blast 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다(예를 들어, worldwide web, ncbi.nlm.nih.gov에서 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI) 참조). 서열의 비교에 사용된 수학적 알고리즘의 또 다른 비제한적인 예는 문헌[Myers and Miller, CABIOS 4:11-17 (1998)]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램(버전 2.0) 내에 통합된다. 아미노산 서열의 비교를 위해 ALIGN 프로그램을 사용할 때, PAM120 가중치 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티가 사용될 수 있다. 2개의 서열 간의 동일성 퍼센트는 갭을 허용하거나, 이를 허용하지 않고, 상기 기재된 것들과 유사한 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 동일성 퍼센트의 계산에서, 전형적으로 정확한 일치만이 계수된다.

[0127] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 기준 서열에 비하여 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 해당 서열을 포함하는 항-GPC3 항체는 GPC3에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시형태에서, 기준 아미노산 서열에서 총 1개 내지 10개의 아미노산이 치환되고/되거나, 삽입되고/되거나, 결실된다. 일부 실시형태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외측 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 선택적으로, 본원에 제공되는 항-GPC3 항체는 기준 서열의 번역후 변형을 포함한다.

[0128] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 61의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 62의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 72의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 63의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 73의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 64의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ

[illegible]

[illegible]

99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 121의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하며, 항체는 GPC3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 scFv이다.

[0129]

일부 실시형태에서, 기능적 에피토프를 예를 들어, 조합 알라닌 스캐닝에 의해 맵핑하여, 본원에 제공된 항-GPC3 항체와의 상호작용에 필요한 GPC3 단백질 내의 아미노산을 확인할 수 있다. 일부 실시형태에서, GPC3에 결합된 항-GPC3 항체의 입체형태 및 결정 구조를 사용하여 에피토프를 확인할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시는 본원에 제공되는 항-GPC3 항체 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 61을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 62를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 72를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 63을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 73을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 64를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 74를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 65를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 75를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 66을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 76을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 67을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 77을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 68을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 78을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 69를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 79를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 70을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 80을 포함하

[illegible]

[0130]

일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항-GPC3 항체 중 어느 하나와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항-GPC3 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 61을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 62를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 72를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 63을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 73을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 64를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 74를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 65를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 75를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 66을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 76을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 67을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 77을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 68을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 78을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 69를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 79를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 70을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 80을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 117을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다.

다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 118을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 119를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 120을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 121을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 122를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 123을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 117을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 118을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 119를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 120을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 121을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 122를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 124를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 117을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 118을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 119를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 120을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 121을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 122를 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 125를 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항-GPC3 항체와 경쟁적으로, GPC3에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, 항체는 scFv이다.

[0131] 일부 실시형태에서, 상기 기재된 항-GPC3 항체 중 어느 하나를 포함하는 GPC3 결합 단백질이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, GPC3 결합 단백질은 마우스, 키메라, 인간화 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 일부 실시형태에서, 항-GPC3 항체는 항체 단편, 예를 들어, scFv이다. 일부 실시형태에서, GPC3 결합 단백질은 본원에 제공되는 항-GPC3 항체를 포함하는 융합 단백질이다. 다른 실시형태에서, GPC3 결합 단백질은 본원에 제공되는 항-GPC3 항체를 포함하는 다중특이적 항체이다. 다른 예시적인 GPC3 결합 분자는 하기 섹션에 더욱 상세히 기재된다.

[0132] 일부 실시형태에서, 상기 실시형태 중 어느 하나에 따른 항-GPC3 항체 또는 항원 결합 단백질은 하기 섹션 5.2.2 내지 5.2.8에 기재된 바와 같은 특징 중 임의의 것을 단독으로 또는 조합하여 통합할 수 있다.

[0133] 5.2.2. 항체 단편

[0134] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 또한, 이의 다양한 항체 단편을 포함한다. 본원에 제공되는 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본원에 제공되는 면역글로불린 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 부류(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA) 또는 임의의 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)의 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시형태에서, IgG 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시형태에서, IgG 항체는 IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체이다.

[0135] 항체의 변이체 및 유도체는 항원에 결합하는 능력을 보유하는 항체 기능적 단편을 포함한다. 예시적인 기능적 단편은 Fab 단편(예를 들어, 항원-결합 도메인을 함유하고 이황화 결합에 의해 가교된 경쇄 및 중쇄의 일부를 포함하는 항체 단편); Fab'(예를 들어, Fab를 포함하는 단일 항원-결합 도메인 및 힌지 영역을 통한 중쇄의 추가 부분을 함유하는 항체 단편); F(ab')₂(예를 들어, 중쇄의 힌지 영역에서 쇠간 이황화 결합에 의해 연결된 2

개의 Fab' 분자; Fab' 분자는 동일하거나 상이한 에피토프에 대해 유도될 수 있음); 이중특이적 Fab(예를 들어, 각각이 상이한 에피토프에 대해 유도될 수 있는 2개의 항원 결합 도메인을 갖는 Fab 분자); scFv로도 알려진, 가변 영역을 포함하는 단일쇄(예를 들어, 10 내지 25개 아미노산의 쇄에 의해 함께 연결된 항체의 단일 경쇄 및 중쇄의 가변 항원-결합 결정 영역); 이항화 연결된 Fv, 또는 dsFv(예를 들어 이항화 결합에 의해 함께 연결된 항체의 단일 경쇄 및 중쇄의 가변 항원-결합 결정 영역); 낙타화 VH(예를 들어, VH 계면에서 일부 아미노산이 자연 발생 낙타 항체의 중쇄에서 발견되는 것들인 항체의 단일 중쇄의 가변 항원-결합 결정 영역); 이중특이적 scFv(예를 들어, 각각이 상이한 에피토프에 대해 유도될 수 있는 2개의 항원-결합 도메인을 갖는 scFv 또는 dsFv 분자); 디아바디(예를 들어, 제1 scFv의 VH 도메인이 제2 scFv의 VL 도메인과 어셈블리하고 제1 scFv의 VL 도메인이 제2 scFv의 VH 도메인과 어셈블리할 때 형성된 이량체화 scFv; 디아바디의 2개의 항원-결합 영역은 동일하거나 상이한 에피토프에 대해 유도될 수 있음); 트리아바디(예를 들어, 디아바디와 유사한 방식으로 형성되지만, 3개의 항원-결합 도메인이 단일 복합체에서 생성되는 삼량체화 scFv; 3개의 항원 결합 도메인은 동일하거나 상이한 에피토프에 대해 유도될 수 있음); 및 테트라바디(예를 들어, 디아바디와 유사한 방식으로 형성되지만, 4개의 항원-결합 도메인이 단일 복합체에서 생성되는 사량체화 scFv; 4개의 항원 결합 도메인은 동일하거나 상이한 에피토프에 대해 유도될 수 있음)를 포함한다.

[0136] 항체 단편의 생성을 위한 다양한 기법이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 온전한 항체의 단백질분해 소화를 통해 유도되었다(예를 들어, 문헌[Morimoto *et al.*, 1992, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-17]; 및 문헌[Brennan *et al.*, 1985, Science 229:81-83] 참조). 그러나, 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성될 수 있다. 예를 들어, Fab, Fv, 및 scFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 효모 세포에서 발현되고 이로부터 분비되어, 이들 단편을 다량으로 손쉽게 생성할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수되고 화학적으로 결합되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다(문헌[Carter *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:163-67]). 또 다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 구체 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 예를 들어, 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 항체 단편의 생성을 위한 다른 기법은 숙련자에게 명백할 것이다. 특정 실시형태에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편(scFv)이다(예를 들어, WO 93/16185호; 미국 특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호 참조). Fv 및 scFv는 불변 영역이 없는 온전한 결합 부위를 가지며; 따라서, 이들은 생체내 사용 동안 감소된 비특이적 결합에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카복시 말단에서 이펙터 단백질의 융합을 제공하도록 구축될 수 있다(예를 들어, 상기 문헌[Borrebaeck ed.] 참조). 항체 단편은 또한 예를 들어, 상기 인용된 참고문헌에 기재된 바와 같이, "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체는 단일특이적 또는 다중특이적, 예컨대 이중특이적일 수 있다.

[0137] 일부 구체적인 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 예를 들어, SEQ ID NO: 61 내지 70 및 117 내지 122를 포함하는 상기 기재된 VH 도메인 중 어느 하나, 및 예를 들어, SEQ ID NO: 71 내지 80 및 123 내지 125를 포함하는 상기 기재된 VL 도메인 중 어느 하나를 포함하는 scFv이다. 더욱 구체적으로, 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 81의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 82의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 83의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 84의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 85의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 86의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 88의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 89의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 90의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 128의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 129의 아미노산 서열을 포함하는 scFv가 본원에 제공된다.

[0138] 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 81의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 82의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 83의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다.

98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 84의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 85의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 86의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 88의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 89의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 90의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 128의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 129의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 scFv가 본원에 제공된다.

[0139] 5.2.3. 인간화 항체

[0140] 본원에 기재된 항체는 인간화 항체를 포함한다. 인간화 항체, 예컨대 본원에 개시된 인간화 항체는 CDR-이식(유럽 특허 제EP 239,400호; 국제 공개 제WO 91/09967호; 및 미국 특허 제5,225,539호, 제5,530,101호 및 제5,585,089호), 비니어링(veneuering) 또는 재표면화(resurfacing)(유럽 특허 제EP 592,106호 및 제EP 519,596호; 문헌[Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991)]; 문헌[Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)]; 및 문헌[Roguska *et al.*, PNAS 91:969-973 (1994)]], 쇠 서플링(미국 특허 제5,565,332호) 및 예를 들어, 미국 특허 제6,407,213호, 미국 특허 제5,766,886호, 제WO 9317105호, 문헌[Tan *et al.*, J. Immunol. 169:1119-1125 (2002)], 문헌[Caldas *et al.*, Protein Eng. 13(5):353-60 (2000)], 문헌[Morea *et al.*, Methods 20(3):267-79 (2000)], 문헌[Baca *et al.*, J. Biol. Chem. 272(16):10678-84 (1997)], 문헌[Roguska *et al.*, Protein Eng. 9(10):895-904 (1996)], 문헌[Couto *et al.*, Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s (1995)], 문헌[Couto *et al.*, Cancer Res. 55(8):1717-22 (1995)], 문헌[Sandhu JS, Gene 150(2):409-10 (1994)] 및 문헌[Pedersen *et al.*, J. Mol. Biol. 235(3):959-73 (1994)]에 개시된 기법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 다양한 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 또한, 각각이 본원에 그의 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 공개 제US 2005/0042664 A1호(2005년 2월 24일)를 참조한다.

[0141] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 인간 GPC3을 포함하는 GPC3에 결합하는 인간화 항체일 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 인간화 단일 쇠 항체는 SEQ ID NO: 61 내지 80 및 117 내지 125에 제시된 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 비-인간 항체를 인간화하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터 이 내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취해지는, "유입" 잔기로서 종종 지칭된다. 인간화는 예를 들어, 문헌[Jones *et al.*, Nature 321:522-25 (1986)]; 문헌[Riechmann *et al.*, Nature 332:323-27 (1988)]; 및 문헌[Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-36 (1988)]의 방법을 따라, 초가변 영역 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 치환함으로써 수행될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체의 인간화는 하기 섹션 6에 기재된 바와 같이 수행된다.

[0142] 일부 경우에, 인간화 항체는 CDR 이식에 의해 구축되며, 여기서 모 비-인간 항체의 CDR의 아미노산 서열이 인간 항체 프레임워크에 이식된다. 예를 들어, Padlan 등은 CDR의 잔기 중 약 1/3만이 실제로 항원과 접촉한다는 것

을 결정하였고, 이들을 "특이성 결정 잔기" 또는 SDR로 명명하였다(문헌[Padlan *et al.*, FASEB J. 9:133-39 (1995)]). SDR 이식 기법에서, SDR 잔기만이 인간 항체 프레임워크 상에 이식된다(예를 들어, 문헌[Kashmiri *et al.*, Methods 36:25-34 (2005)] 참조).

[0143] 인간화 항체를 제조하는 데 사용될 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키는 데 중요할 수 있다. 예를 들어, 소위 "최적합" 방법에 따르면, 비-인간 항체의 가변 도메인의 서열은 알려진 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 비-인간 항체의 서열과 가장 가까운 인간 서열은 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크로서 선택될 수 있다(문헌[Sims *et al.*, J. Immunol. 151:2296-308 (1993)]; 및 문헌[Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 사용한다. 동일한 프레임워크는 몇몇의 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다(문헌[Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992)]; 및 문헌[Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623-32 (1993)]). 일부 경우에, 프레임워크는 가장 풍부한 인간 하위부류인 V_L6 하위군 I(V_L6I) 및 V_H 하위군 III(V_HIII)의 컨센서스 서열로부터 유래된다. 또 다른 방법에서, 인간 생식계열 유전자는 프레임워크 영역의 공급원으로서 사용된다.

[0144] 초인간화로 불리는 CDR의 비교에 기초한 대체 패러다임에서, FR 상동성은 무관하다. 당해 방법은 비-인간 서열과 기능적 인간 생식계열 유전자 레퍼토리의 비교로 이루어진다. 첫과 서열과 동일하거나 밀접하게 관련된 표준 구조를 인코딩하는 유전자가 이어서 선택된다. 다음으로, 비-인간 항체와 표준 구조를 공유하는 유전자 내에서, CDR 내에서 가장 높은 상동성을 갖는 것이 FR 공여자로 선택된다. 마지막으로, 비-인간 CDR은 이들 FR 상으로 이식된다(예를 들어, 문헌[Tan *et al.*, J. Immunol. 169:1119-25 (2002)] 참조).

[0145] 일반적으로 항원에 대한 이들의 친화성 및 다른 유리한 생물학적 특성을 유지하면서, 항체를 인간화하는 것이 추가로 바람직하다. 이 목표를 달성하기 위해, 한 가지 방법에 따르면, 인간화 항체는 모 서열과 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물을 분석하는 과정에 의해 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 이용 가능하며 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태 구조를 예시하고 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 이들은 예를 들어, WAM(문헌[Whitelegg and Rees, Protein Eng. 13:819-24 (2002)]), Modeller(문헌[Sali and Blundell, J. Mol. Biol. 234:779-815 (1993)] 및 Swiss PDB Viewer(문헌[Guex and Peitsch, Electrophoresis 18:2714-23 (1997)])를 포함한다. 이들 디스플레이의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 예를 들어, 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이 방식에서, FR 잔기는 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성과 같은 원하는 항체 특징이 달성되도록 수여자 및 유입 서열로부터 선택 및 조합될 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는 데 직접적으로 및 가장 실질적으로 관여한다.

[0146] 항체 인간화에 대한 또 다른 방법은 인간 스트링 함량(HSC)이라고 부르는 항체 인간성 메트릭에 기초한다. 이 방법은 마우스 서열과 인간 생식계열 유전자의 레퍼토리를 비교하고, 차이를 HSC로 점수화한다. 그 다음에 표적 서열은 다수의 다양한 인간화 변이체를 생성하기 위해 전반적 동일성 척도를 사용하기 보다는 HSC를 최대화함으로써 인간화된다(문헌[Lazar *et al.*, Mol. Immunol. 44:1986-98 (2007)]).

[0147] 상기 기재된 방법에 더하여, 경험적 방법을 사용하여 인간화 항체를 생성 및 선택할 수 있다. 이들 방법은 인간화 변이체의 큰 라이브러리 생성 및 농축 기술 또는 고처리량 스크리닝 기법을 사용한 최적의 클론의 선택에 기초한 것들을 포함한다. 항체 변이체는 파지, 리보솜, 및 효모 디스플레이 라이브러리로부터 뿐만 아니라 박테리아 콜로니 스크리닝에 의해 단리될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hoogenboom, Nat. Biotechnol. 23:1105-16 (2005)]; 문헌[Dufner *et al.*, Trends Biotechnol. 24:523-29 (2006)]; 문헌[Feldhaus *et al.*, Nat. Biotechnol. 21:163-70 (2003)]; 및 문헌[Schlampschy *et al.*, Protein Eng. Des. Sel. 17:847-60 (2004)] 참조).

[0148] FR 라이브러리 접근법에서, 잔기 변이체의 모음이 FR의 특정 위치에 도입된 후 라이브러리를 스크리닝하여 이식된 CDR을 최적으로 지지하는 FR을 선택한다. 치환될 잔기는 CDR 구조에 잠재적으로 기여하는 것으로 확인되거나(예를 들어, 문헌[Foote and Winter, J. Mol. Biol. 224:487-99 (1992)] 참조), 또는 문헌[Baca *et al.*, J. Biol. Chem. 272:10678-84 (1997)]에 의해 확인된 보다 제한된 표적 잔기 세트로부터의 "버니어(Vernier)" 잔기의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다.

[0149] FR 서플링에서, 선택된 잔기 변이체의 조합 라이브러리를 생성하는 대신에 전체 FR은 비인간 CDR과 조합된다(예

를 들어, 문헌[Dall'Acqua *et al.*, Methods 36:43-60 (2005)] 참조). 1-단계 FR 서플링 과정이 사용될 수 있다. 생성된 항체가 향상된 발현, 증가된 친화성, 및 열 안정성을 포함하여 개선된 생화학적 및 물리화학적 특성을 나타내었으므로, 이러한 과정은 효율적인 것으로 나타났다(예를 들어, 문헌[Damschroder *et al.*, Mol. Immunol. 44:3049-60 (2007)] 참조).

[0150] "휴머니어링(humanizing)" 방법은 필수적인 최소 특이성 결정기(MSD)의 실험적 확인에 기초하며, 비인간 단편의 인간 FR 라이브러리로의 순차적 대체 및 결합의 평가에 기초한다. 이 방법은 전형적으로 별개의 인간 V-세그먼트 CDR을 갖는 다수의 하위부류로부터 항체의 에피토프 보유 및 식별을 초래한다.

[0151] "인간 조작" 방법은 원래 비-인간 항체의 바람직한 결합 특성을 유지하더라도 인간에서 면역원성이 감소된 변형된 항체를 생성하도록 항체의 아미노산 서열에 특이적 변화를 가함으로써, 비-인간 항체 또는 항체 단편을 변경하는 것을 수반한다. 일반적으로, 기법은 비-인간 항체의 아미노산 잔기를 "저 위험", "중간 위험" 또는 "고 위험" 잔기로 분류하는 것을 수반한다. 분류는 치환이 생성된 항체의 폴딩에 영향을 미칠 위험에 대해 특정 치환(예를 들어, 인간에서의 면역원성에 대해)을 수행하는 예측된 이점을 평가하는 전반적 위험/보상 계산을 사용하여 수행된다. 비-인간 항체 서열의 주어진 위치에서 치환될 특정 인간 아미노산 잔기(예를 들어, 저 또는 중간 위험)는 비-인간 항체의 가변 영역으로부터의 아미노산 서열을 특이적인 또는 컨센서스 인간 항체 서열의 상응하는 영역과 정렬함으로써 선택될 수 있다. 비-인간 서열의 저 또는 중간 위험 위치에서 아미노산 잔기는 정렬에 따라 인간 항체 서열에서의 상응하는 잔기로 치환될 수 있다. 인간 조작된 단백질을 제조하기 위한 기법은 문헌[Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7:805-14 (1994)]; 미국 특허 번호 제5,766,886호; 제5,770,196호; 제5,821,123호; 및 제5,869,619호; 및 PCT 공개 WO 93/11794호에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0152] 복합 인간 항체는, 예를 들어, Composite Human Antibody™ 기술(안티토프 리미티드(Antitope Ltd.), 영국 케임브리지 소재)을 사용하여 생성될 수 있다. 복합 인간 항체를 생성하기 위해, 가변 영역 서열은, T 세포 에피토프를 회피하는 방식으로 다수의 인간 항체 가변 영역 서열의 단편으로부터 설계되고, 이에 의해 초래되는 항체의 면역원성을 최소화시킨다.

[0153] 탈면역화된 항체는, T-세포 에피토프가 제거된 항체이다. 탈면역화된 항체를 제조하는 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Jones *et al.*, Methods Mol Biol. 525:405-23 (2009), xiv] 및 문헌[De Groot *et al.*, Cell. Immunol. 244:148-153(2006)]을 참조한다. 탈면역화된 항체는, T-세포 에피토프-고갈된 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함한다. 간략하게, 항체의 가변 영역을 클로닝하고, T-세포 에피토프를 T 세포 증식 검정에서 항체의 가변 영역으로부터 유래된 중첩 펩티드를 시험함으로써 이후에 확인한다. T 세포 에피토프는, 인간 MHC 부류 II에 대한 펩티드 결합을 확인하기 위해 인실리코(*in silico*) 방법을 통해 확인된다. 인간 MHC 부류 II에 대한 결합을 저지하기 위해 돌연변이를 가변 영역 내에 도입한다. 돌연변이된 가변 영역을 이어서 사용하여, 탈면역화된 항체를 생성한다.

[0154] 5.2.4. 항체 변이체

[0155] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 GPC3에 결합하는 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 특이성, 열안정성, 발현 수준, 이펙터 기능, 글리코실화, 감소된 면역원성 또는 용해도를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 생물학적 특성을 최적화시키는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 GPC3에 결합하는 항체에 더하여, 본원에 기재된 GPC3에 결합하는 항체의 변이체가 제조될 수 있는 것이 고려된다. 예를 들어, 항체 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 인코딩 DNA 내로 도입함으로써 및/또는 원하는 항체 또는 폴리펩티드의 합성에 의해 제조될 수 있다. 당업자는 아미노산 변화가 항체의 번역후 과정을 변경시킬 수 있는 것을 인식한다.

[0156] 화학적 변형

[0157] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 예를 들어, 항체로의 임의의 유형의 분자의 공유적 부착에 의해 화학적으로 변형된다. 항체 유도체는 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/블로킹기에 의한 유도체화, 단백질 가수분해적 절단, 세포 리간드 또는 기타 단백질로의 연결 또는 하나 이상의 면역글로불린 도메인(예를 들어, Fc 또는 Fc의 일부)으로의 컨주게이션에 의해 화학적으로 변형된 항체를 포함할 수 있다. 수많은 화학적 변형 중 임의의 것은 특이적인 화학적 절단, 아세틸화, 제형화, 튜니카마이신의 대사적 합성 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 공지된 기법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 항체는 하나 이상의 비-전형적인 아미노산을 함유할 수 있다.

[0158] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다.

항체에 대한 글리코실화 부위의 추가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0159] 본원에 제공되는 항체가 Fc 영역에 융합되는 경우, 그에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성된 고유 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297로의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형 바이안테너리(biantennary) 올리고당을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고당은 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc), 갈락토스 및 시알산 뿐만 아니라 바이안테너리 올리고당 구조의 "스텝(stem)"에서 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 특정 개선된 특성을 갖는 변이체를 생성하기 위해 본원에 제공되는 결합 분자에서 올리고당의 변형이 이루어질 수 있다.

[0160] 다른 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체가 Fc 영역에 융합되는 경우, 본원에 제공되는 항체 변이체는 상기 Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 가질 수 있다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어, WO 2008/077546에 기술된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석기에 의해 측정된 Asn 297에 부착된 모든 당구조(예를 들어, 복합, 하이브리드 및 고 만노스 구조)의 합과 비교하여 Asn297에서 당 사슬 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 297번 위치에 위치한 아스파라긴 잔기(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체의 사소한 서열 변이로 인해 위치 297의 업스트림 또는 다운스트림 약 ± 3개 아미노산, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제US 2003/0157108호 및 제US 2004/0093621호를 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체와 관련된 간행물의 예는 다음을 포함한다: 제US 2003/0157108호; 제WO 2000/61739호; 제WO 2001/29246; 제US 2003/0115614호; 제US 2002/0164328호; 제US 2004/0093621호; 제US 2004/0132140호; 제US 2004/0110704호; 제US 2004/0110282호; 제US 2004/0109865호; 제WO 2003/085119호; 제WO 2003/084570호; 제WO 2005/035586호; 제WO 2005/035778호; 제WO2005/053742호; 제WO2002/031140호; 문헌[Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)]; 문헌[Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)]. 탈푸코실화 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포(문헌[Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 제US 2003/0157108호; 및 제WO 2004/056312호) 및 낙아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, *FUT8*, 낙아웃 CHO 세포(예를 들어, 문헌[Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)]; 문헌[Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)]; 및 제WO2003/085107호 참조)를 포함한다.

[0161] 본원에 제공된 항체를 포함하는 결합 분자는 예를 들어, Fc 영역에 부착된 바이안테너리 올리고당이 GlcNAc에 의해 이등분된, 이등분 올리고당과 함께 추가로 제공된다. 이러한 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 변이체의 예는 예를 들어 제WO 2003/011878호(Jean-Mairet 등); 미국 특허 제6,602,684호(Umana 등); 및 제US 2005/0123546호(Umana 등)에 기술되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 변이체가 또한 제공된다. 이러한 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 변이체는 예를 들어, 제WO 1997/30087호; 제WO 1998/58964호; 및 제WO 1999/22764호에 기술되어 있다.

[0162] 본 발명의 항체 및 Fc 영역을 포함하는 분자에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 Fc 영역 내로 도입되어, Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0163] 일부 실시형태에서, 본 출원은 생체내 결합 분자의 반감기가 중요하지만 특정 이펙터 기능(예를 들어, 보체 및 ADCC)은 불필요하거나 유해한, 적용에 바람직한 후보가 되게 하는 전부가 아닌 일부의 이펙터 기능을 보유한 변이체를 고려한다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정은 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체(FcR) 결합 검정은 결합 분자에 FcγR 결합이 결여되어 있지만(이에 따라 ADCC 활성이 결여될 가능성이 있음) FcRn 결합 능력은 유지하는 것을 보장하기 위해 수행될 수 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적인 예는 미국 특허 제5,500,362호(예를 들어, 문헌[Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)] 및 문헌[Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)] 참조); 제5,821,337호(문헌[Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법이 사용될 수 있다 (예를 들어, 유세포분석을 위한 ACTI™ 비방사성 세포독성 검정(셀테크놀로지, 인코포레이티드(CellTechnology,

Inc.), 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재); 및 CytoTox 96[®] 비방사성 세포독성 검정(프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포에는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포가 포함된다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌[Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다. 항체가 C1q에 결합할 수 없고 따라서 CDC 활성이 결여되어 있음을 확인하기 위해 C1q 결합 검정을 수행할 수도 있다. 예를 들어, 제WO 2006/029879호 및 제WO 2005/100402호의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, CDC 검정을 수행할 수 있다(예를 들어, 문헌[Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]; 문헌[Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003)]; 및 문헌[Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 제거/반감기 결정은 또한 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다(예를 들어, 문헌[Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0164] 감소된 이펙터 기능을 갖는 결합 분자는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것들을 포함한다(미국 특허 제6,737,056호). 이러한 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 비롯해 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에서 치환된 Fc 돌연변이체를 포함한다(미국 특허 제7,332,581호).

[0165] FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 특정 변이체가 기재되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,737,056호; 제WO 2004/056312호 및 문헌[Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조).

[0166] 일부 실시형태에서, 변이체는 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334에서의 치환(잔기의 EU 넘버링)을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 미국 특허 제6,194,551호, 제WO 99/51642호 및 문헌[Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이 변경된(즉, 개선되거나 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 초래하는 변경이 Fc 영역에서 이루어진다.

[0167] 증가된 반감기를 갖고 태아로의 모체 IgG의 전달을 담당하는 신생아 Fc 수용체(FcRn)(문헌[Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 문헌[Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)])에 대한 개선된 결합을 갖는 결합 분자가 제US2005/0014934A1호(Hinton 등)에 기재되어 있다. 이들 분자는 FcRn으로의 Fc 영역의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 그 안에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서 치환, 예를 들어, Fc 영역 잔기 434의 치환(미국 특허 제7,371,826호)을 갖는 것들을 포함한다. 또한, Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 문헌[Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 제WO 94/29351호를 참조한다.

[0168] 일부 실시형태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 시스테인 조작된 항체를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시형태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근 가능한 부위에서 발생한다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올 기는 항체의 접근 가능한 부위에 위치되고, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 항체를 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티와 같은 다른 모이어티에 컨쥬게이트하여 면역컨쥬게이트를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0169] **치환, 결실 또는 삽입**

[0170] 변이는 원래의 항체 또는 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열의 변화를 초래하는 항체 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실, 또는 삽입일 수 있다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 CDR 및 FR을 포함한다.

[0171] 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 대체한 결과, 예컨대 세린으로의 류신의 대체, 예를 들어, 보존적 아미노산 대체일 수 있다. 당업자에게 공지된 표준 기법은, 예를 들어, 아미노산 치환을 초래하는 PCR-매개 돌연변이유발 및 위치-지정 돌연변이유발을 포함하여, 본원에 제공된 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 돌연변이를 도입하는 데 사용될 수 있다. 삽입 또는 결실은 선택적으로 약 1 내지 5개 아미노산 범위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 치환, 결실 또는 삽입은 원래 분자에 비해 25개 미만의 아미노산 치환, 20개 미만의 아미노산 치환, 15개 미만의 아미노산 치환, 10개 미만의 아미노산 치환, 5개 미만의 아미노산 치환, 4개 미만의 아미노산 치환, 3개 미만의 아미노산 치환, 또는 2개 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 치환은 하나 이상의 예측된 비-필수 아미노산 잔기에

서 이루어진 보존적 아미노산 치환이다. 허용된 변이는 서열 내 아미노산의 삽입, 결실, 또는 치환을 체계적으로 수행하고, 생성된 변이체를 모 항체에 의해 나타나는 활성에 대해 시험함으로써 결정될 수 있다.

[0172] 아미노산 서열 삽입은 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입 뿐만 아니라 하나의 잔기에서 다수의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다.

[0173] 보존적 아미노산 치환에 의해 생성된 항체가 본 개시에 포함된다. 보존적 아미노산 치환에서, 아미노산 잔기는 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된다. 상기 기재된 바와 같이, 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 과가 당업계에 정의되어 있다. 이들 과는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 대안적으로, 돌연변이는 포화 돌연변이유발에 의해서와 같이, 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있고, 생성된 돌연변이체를 생물학적 활성에 대해 스크리닝하여, 활성을 유지하는 돌연변이를 식별할 수 있다. 돌연변이유발 이후, 인코딩된 단백질을 발현할 수 있고 단백질의 활성을 결정할 수 있다. 특성을 유지하거나 유의미하게 변화시키지 않도록 보존적(예를 들어, 유사한 특성 및/또는 측쇄를 갖는 아미노산 군 내에서) 치환이 이루어질 수 있다. 예시적인 치환은 하기 표 2에 나타나 있다.

[표 2]

아미노산 치환			
원래 잔기	예시적인 치환	원래 잔기	예시적인 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Met (M)	Leu; Phe; Ile
Asp (D)	Glu; Asn	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Cys (C)	Ser; Ala	Pro (P)	Ala
Gln (Q)	Asn; Glu	Ser (S)	Thr
Glu (E)	Asp; Gln	Thr (T)	Val; Ser
Gly (G)	Ala	Trp (W)	Tyr; Phe

원래 잔기	예시적인 치환	원래 잔기	예시적인 치환
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신

[0176]

[0177] 아미노산은 이들의 측쇄의 특성의 유사성에 따라 그룹화될 수 있다(예를 들어, 문헌[Lehninger, *Biochemistry* 73-75 (2d ed. 1975)] 참조): (1) 비극성: Ala(A), Val(V), Leu(L), Ile(I), Pro(P), Phe(F), Trp(W), Met(M); (2) 비하전 극성: Gly(G), Ser(S), Thr(T), Cys(C), Tyr(Y), Asn(N), Gln(Q); (3) 산성: Asp(D), Glu(E); 및 (4) 염기성: Lys(K), Arg(R), His(H). 대안적으로, 자연 발생 잔기는 공통 측쇄 특성에 기반하여 그룹으로 나눌 수 있다: (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe. 예를 들어, 항체의 적절한 입체형태를 유지하는 데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 또한 분자의 산화 안정성을 개선하고, 비정상적인 가교를 방지하기 위해 예를 들어, 알라닌 또는 세린과 같은, 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 비-보존적인 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 또 다른 부류로 대체하는 것을 수반할 것이다.

[0178] 하나의 유형의 치환 변이체는, 모 항체(예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택되는 생성된 변이체(들)는 모 항체에 비하여 소정의 생물학적 특성(예를 들어, 증가된 친화성, 감소된 면역원성)에서 변형(예를 들어, 개선)을 가질 것이고/이거나 모 항체의 소정의 생물학적 특성이 실질적으로 유지될 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화성 성숙 항체이며, 이는 예를 들어, 파지 디스플레이-기반의 친화성 성숙 기법, 예컨대 본원에 기재된 것들을 사용하여 편리

하게 생성될 수 있다. 요약하여, 하나 이상의 CDR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체는 파지 상에 디스플레이되고, 특정 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화성)에 대하여 스크리닝된다.

[0179] 변경(예를 들어, 치환)이 CDR에서 이루어져서, 예를 들어, 항체 친화성을 개선할 수 있다. 이러한 변경은 CDR "핫스팟", 즉, 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 인코딩되는 잔기(예를 들어, 문헌[Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)] 참조) 및/또는 SDR(a-CDR)에서 이루어질 수 있으며, 생성되는 변이체 항체 또는 이의 단편은 결합 친화성에 대하여 시험된다. 제2 라이브러리로부터의 구축 및 재선택에 의한 친화성 성숙은, 예를 들어, 문헌[Hoogenboom et al in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되었다. 친화성 성숙의 일부 실시형태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법(예를 들어, 오류-유발(error-prone) PCR, 쉐 서플링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이유발)에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내로 도입된다. 그 다음 2차 라이브러리가 형성된다. 그 다음 라이브러리를 스크리닝하여 요망되는 친화성을 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 CDR-지정 접근법을 포함하며, 여기서 몇몇 CDR 잔기(예를 들어, 한꺼번에 4 내지 6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관여하는 CDR 잔기는, 예를 들어 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 친화성 성숙에 관한 더욱 상세한 설명은 하기 섹션에 제공되어 있다.

[0180] 일부 실시형태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 CDR 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화성을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에서 제공되는 바와 같은 보존적 치환)이 CDR에서 이루어질 수 있다. 본원에 제공된 변이체 항체 서열의 일부 실시형태에서, 각각의 CDR은 변경되지 않거나, 최대 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 함유한다.

[0181] 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인을 위한 유용한 방법은 문헌[Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085]에 의해 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라 지칭된다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 그룹(예를 들어, Arg, Asp, His, Lys 및 Glu와 같은 하전된 잔기)을 확인하고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하여, 항체와 항원의 상호작용이 영향을 받는지 여부를 결정한다. 추가의 치환을 아미노산 위치에 도입하여, 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 입증할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 결정하여 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 치환에 대한 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체를 스크리닝하여 변이체가 요망되는 특성을 함유하는지 여부를 결정할 수 있다.

[0182] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기에서 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합뿐만 아니라, 단일의 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 효소(예를 들어, ADEPT에 대한)에 대한 항체의 N-말단 또는 C-말단에서의 융합을 포함한다.

[0183] 변이는 당업계에 공지된 방법, 예컨대 올리고뉴클레오타이드-매개된(위치-지정) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝 및 PCR 돌연변이유발을 사용하여 이루어질 수 있다. 위치-지정 돌연변이유발(예를 들어, 문헌[Carter, *Biochem J.* 237:1-7 (1986)]; 및 문헌[Zoller et al., *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500 (1982)] 참조), 카세트 돌연변이유발(예를 들어, 문헌[Wells et al., *Gene* 34:315-23 (1985)] 참조) 또는 기타 공지된 기법을 클로닝된 DNA 상에서 수행하여, 항체 변이체 DNA를 생성할 수 있다.

[0184] 5.2.5. 시험관내 친화성 성숙

[0185] 일부 실시형태에서, 모 항체와 비교하여, 개선된 특성, 예컨대 친화성, 안정성, 또는 발현 수준을 갖는 항체 변이체가 시험관내 친화성 성숙에 의해 제조될 수 있다. 천연 원형(prototype)과 같이, 시험관내 친화성 성숙은 돌연변이 및 선택의 원리를 기본으로 한다. 항체의 라이브러리는 유기체(예를 들어, 파지, 박테리아, 효모 또는 포유동물 세포)의 표면 상에서 또는 이들의 인코딩 mRNA 또는 DNA와 (예를 들어, 공유적으로 또는 비-공유적으로) 회합되어 디스플레이된다. 디스플레이된 항체의 친화성 선택은 항체를 인코딩하는 유전 정보를 보유하는 유기체 또는 복합체의 단리를 허용한다. 파지 디스플레이와 같은 디스플레이 방법을 사용한 2 또는 3 라운드의 돌연변이 및 선택은 보통 낮은 나노몰 범위의 친화도를 갖는 항체 단편을 초래한다. 친화성 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 피코몰의 친화도를 가질 수 있다.

[0186] 파지 디스플레이는 항체의 디스플레이 및 선택을 위한 광범위한 방법이다. 항체는 박테리오파지 코팅 단백질에

대한 융합으로서 Fd 또는 M13 박테리오파지의 표면 상에 디스플레이된다. 선택은 항원에 대한 노출을 포함하여, "패닝(panning)"으로 지칭되는 과정으로서, 파지-디스플레이된 항체가 이들의 표적에 결합되게 한다. 항원에 결합된 파지를 회수하고, 이를 사용하여 박테리아를 감염시켜, 추가의 라운드의 선택을 위해 파지를 생성한다. 검토를 위해, 예를 들어 문헌[Hoogenboom, *Methods. Mol. Biol.* 178:1-37 (2002)]; 및 문헌[Bradbury and Marks, *J. Immunol Methods* 290 29-49 (2004)]을 참조한다.

[0187] 효모 디스플레이 시스템(예를 들어, 문헌[Boder *et al.*, *Nat. Biotech.* 15:553-57 (1997)]; 및 문헌[Chao *et al.*, *Nat. Protocols* 1:755-68 (2006)] 참조)에서, 항체는 Aga1p에 대한 이황화 결합을 통해 효모 세포벽에 부착되는 효모 응집소 단백질 Aga2p의 부착 서브유닛에 융합될 수 있다. Aga2p를 통한 단백질의 디스플레이는 상기 단백질이 세포 표면으로부터 멀리 돌출되도록 하여, 효모 세포벽 상의 다른 분자와의 잠재적 상호작용을 최소화한다. 개선된 친화성 또는 안정성을 갖는 항체 선택을 위한 라이브러리를 스크리닝하기 위해 자기 분리 및 유세포분석이 사용된다. 관심 용해성 항원으로서의 결합은 비오틴화된 항원 및 2차 시약, 예컨대 형광단에 컨주게이트된 스트렙타비딘을 이용한 효모의 표지에 의해 결정된다. 항체의 표면 발현의 변이는 단일쇄 항체(예를 들어, scFv)에 측접한 c-Myc 에피토프 태그 또는 혈구응집소 중 어느 하나의 면역형광 표지를 통해 측정될 수 있다. 발현은 디스플레이된 단백질의 안정성과 관련 있는 것으로 나타났으며, 이에 따라, 항체는 개선된 안정성뿐 아니라 친화성에 대해 선택될 수 있다(예를 들어, 문헌[Shusta *et al.*, *J. Mol. Biol.* 292: 949-56 (1999)] 참조). 효모 디스플레이의 추가의 이점은 디스플레이된 단백질이 진행 효모 세포의 소포체에서 폴딩되어, 소포체 샤페론(chaperone) 및 품질-관리 기구를 이용한다는 점이다. 성숙이 완료되면, 항체 친화도는 효모의 표면 상에 디스플레이되는 동안 편리하게 "적정되어", 각각의 클론의 발현 및 정제에 대한 필요성을 제거할 수 있다. 효모 표면 디스플레이의 이론적 제한은 다른 디스플레이 방법의 것에 비해 잠재적으로 더 작은 기능성 라이브러리 크기이나; 최근의 접근법은 효모 세포의 교배 시스템을 사용하여, 10^{14} 개 크기로 추정되는 조합적 다양성을 생성한다(예를 들어, 미국 특허 공개 제2003/0186,374호; 및 문헌[Blaise *et al.*, *Gene* 342:211-18 (2004)] 참조).

[0188] 리보솜 디스플레이에서, 무세포 시스템에서의 선택을 위해 항체-리보솜-mRNA(ARM) 복합체를 생성한다. 항체의 특정 라이브러리를 코딩하는 DNA 라이브러리를 정지 코돈이 결여된 스페이스 서열에 유전학적으로 융합한다. 이 스페이스 서열은 번역될 때 여전히 펩티딜 tRNA에 부착되어 있으며, 리보솜 터널을 차지하므로, 관심 단백질이 리보솜 외부로 돌출되어 폴딩되도록 허용한다. mRNA, 리보솜, 및 단백질의 얻어진 복합체는 표면-결합된 리간드에 결합하여, 리간드를 이용한 친화도 포획을 통하여 항체 및 이의 인코딩 mRNA의 동시의 단리를 허용한다. 그 다음에, 리보솜-결합된 mRNA는 cDNA로 다시 역전사된 다음에, 돌연변이유발을 겪어, 다음 라운드의 선택에 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Fukuda *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 34:e127 (2006)] 참조). mRNA 디스플레이에서, 항체와 mRNA 사이의 공유 결합은 어댑터 분자로서 푸로마이신을 사용하여 확립된다(문헌[Wilson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750-55 (2001)]).

[0189] 이들 방법은 완전히 시험관내에서 수행되기 때문에, 이들은 다른 선택 기술에 비해 2개의 주요 이점을 제공한다. 첫째, 라이브러리의 다양성은 박테리아 세포의 형질전환 효율에 의해 제한되지 않지만, 시험관에 존재하는 리보솜 및 상이한 mRNA 분자의 수에 의해서만 제한된다. 둘째, 무작위 돌연변이는 각각의 선택 라운드 후에, 예를 들어 비-교정(non-proofreading) 증합효소에 의해 용이하게 도입될 수 있으며, 이는 어떠한 라이브러리도 임의의 다양화 단계 후에 형질전환될 필요가 없기 때문이다.

[0190] 일부 실시형태에서, 포유동물 디스플레이 시스템이 이용될 수 있다.

[0191] 다양성은 또한 표적화된 방식으로 또는 무작위 도입을 통해 항체 라이브러리의 CDR 내로 도입될 수 있다. 전자의 접근법은 고수준 또는 저수준의 돌연변이유발을 통해 항체의 모든 CDR을 순차적으로 표적화하거나, 체세포 초돌연변이의 단리된 핫스팟(예를 들어, 문헌[Ho *et al.*, *J. Biol. Chem.* 280:607-17 (2005)] 참조) 또는 실험적 기반 또는 구조적 이유로 친화도에 영향을 미치는 것으로 의심되는 잔기를 표적화하는 것을 포함한다. 다양성은 또한 DNA 서플링 또는 유사한 기법을 통한 천연적으로 다양한 영역의 대체에 의해 도입될 수 있다(예를 들어, 문헌[Lu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278:43496-507 (2003)]; 미국 특허 제5,565,332호 및 제6,989,250호 참조). 프레임워크-영역 잔기 내로 연장된 초가변 루프를 표적화하는 대안적 기법(예를 들어, 문헌[Bond *et al.*, *J. Mol. Biol.* 348:699-709 (2005)] 참조)은 CDR에서의 루프 결실 및 삽입을 사용하거나 혼성화-기반의 다양화(예를 들어, 미국 특허 공개 제2004/0005709호 참조)를 사용한다. CDR에 다양성을 생성하는 추가의 방법은 예를 들어, 미국 특허 제7,985,840호에 개시되어 있다. 항체 라이브러리를 생성하기 위해 사용될 수 있는 추가의 방법 및/또는 항체 친화성 성숙은 예를 들어, 미국 특허 제8,685,897호 및 제8,603,930호, 및 미국 공개

제2014/0170705호, 제2014/0094392호, 제2012/0028301호, 제2011/0183855호 및 제2009/0075378호에 개시되어 있으며, 이의 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0192] 라이브러리의 스크리닝은 당업계에 알려진 다양한 기법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 항체는 고체 지지체, 칼럼, 핀 또는 셀룰로스/폴리(비닐리덴 플루오라이드) 막/다른 필터 상에서 고정화되거나, 부착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에서 발현되거나, 세포 분류에 사용되거나, 스트렙타아비딘-코팅된 비드를 이용한 포획을 위해 비오틴에 컨쥬게이트되거나, 디스플레이 라이브러리를 패닝하는 임의의 다른 방법에서 사용될 수 있다.

[0193] 시험관내 친화성 성숙 방법의 검토를 위해, 예를 들어 문헌[Hoogenboom, *Nature Biotechnology* 23:1105-16 (2005)]; 문헌[Quiroz and Sinclair, *Revista Ingenieria Biomedica* 4:39-51 (2010)] 및 이의 인용문헌을 참고한다.

[0194] 5.2.6. 항체의 변형

[0195] 항체의 공유적 변형은 본 개시의 범주 내에 포함된다. 공유적 변형은 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 항체의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시키는 것을 포함한다. 다른 변형은 각각 상응하는 글루타미드 및 아스파르트산 잔기로의 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 탈아미드화, 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세틸 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실기의 인산화, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의 α -아미노기의 메틸화(예를 들어, 문헌[Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* 79-86 (1983)] 참조), N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카복실기의 아미드화를 포함한다.

[0196] 본 개시의 범주에 포함되는 항체의 다른 유형의 공유적 변형은 상기 기재된 바와 같이 항체 또는 폴리펩티드의 고유 글리코실화 패턴을 변경하는 것(예를 들어, 문헌[Beck *et al.*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:482-501 (2008)]; 및 문헌[Walsh, *Drug Discov. Today* 15:773-80 (2010)] 참조), 및 항체를 예를 들어, 미국 특허 제 4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호; 또는 제4,179,337호에 제시된 방식으로 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에 연결하는 것을 포함한다. 본 개시의 GPC3에 결합하는 항체는 또한, 반감기를 연장시키고/시키거나 공지된 Fc-매개된 이펙터 기능을 부여하기 위하여 하나 이상의 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 부분(예를 들어, Fc)에 유전학적으로 융합되거나 컨쥬게이트될 수 있다.

[0197] 또한, 본 개시의 GPC3에 결합하는 단일쇄 항체는 변형되어, 또 다른 이중 폴리펩티드 또는 아미노산 서열, 예를 들어 에피토프 태그(예를 들어, 문헌[Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:523-33 (2003)] 참조) 또는 IgG 분자의 Fc 영역(예를 들어, 문헌[Aruffo, *Antibody Fusion Proteins* 221-42 (Chamow and Ashkenazi eds., 1999)] 참조)에 융합된 GPC3에 결합하는 단일쇄 항체를 포함하는 키메라 분자를 형성할 수 있다. 또한, 하기에 더욱 상세히 기재된 바와 같이, GPC3에 결합하는 단일쇄 항체를 사용하여 GPC3 결합 키메라 항원 수용체(CAR)를 생성할 수 있다.

[0198] 또한, 본 개시의 GPC3에 결합하는 단일쇄 항체 및 이중 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 항체가 유전학적으로 융합되거나 화학적으로 컨쥬게이트되는 이중 폴리펩티드는 항체를 세포 표면-발현된 GPC3을 갖는 세포에 표적화하는 데 유용하다.

[0199] 또한, GPC3 항원에 결합하는 항체의 패널이 본원에 제공된다. 구체적인 실시형태에서, 항체의 패널은 GPC3 항원에 대해 상이한 회합 속도, 상이한 해리 속도, 상이한 친화성 및/또는 GPC3 항원에 대한 상이한 특이성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 패널은 약 10 내지 약 1000개 이상의 항체를 포함하거나 이로 이루어진다. 항체의 패널이 ELISA와 같은 검정을 위하여 예를 들어, 96-웰 또는 384-웰 플레이트에서 사용될 수 있다.

[0200] 5.2.7. 항체의 제조

[0201] 항체의 제조 방법이 기재된다. 예를 들어, 문헌[Els Pardon *et al.*, *Nature Protocol*, 9(3): 674 (2014)]을 참조한다. 항체(예컨대 scFv 단편)는 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 예컨대 낙타과 종(예컨대, 낙타 또는 라마)을 면역화시키고, 이로부터 하이브리도마를 획득함으로써, 또는 당업계에 공지된 분자 생물학 기법을 사용한 항체의 라이브러리의 클로닝 및 선택되지 않은 라이브러리의 개별 클론을 사용한 ELISA에 의한 또는 파지 디스플레이의 사용에 의한 이후의 선택에 의해 획득될 수 있다.

[0202] 본원에 제공되는 항체는 항체-인코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환되거나 트랜스펙션된 세포를 배양함으로써 생성될 수 있다. 본 개시의 항체의 폴리펩티드 구성성분을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 제조합

기법을 사용하여 수득될 수 있다. 원하는 폴리뉴클레오티드 서열은 항체 생성 세포, 예컨대 하이브리도마 세포 또는 B 세포로부터 단리되고 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기법을 사용하여 합성될 수 있다. 일단 수득되면, 폴리펩티드를 인코딩하는 서열은 숙주 세포에서 이중 폴리뉴클레오티드를 복제하고 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 당업계에서 이용 가능하고 공지된 많은 벡터가 본 개시의 목적을 위해 사용될 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터 내로 삽입될 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환될 특정 숙주 세포에 의존할 것이다. 본 개시의 항체를 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 원핵 생물, 예컨대 원시박테리아(Archaeobacteria) 및 진정박테리아(Eubacteria)를 포함하고, 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모, 무척추동물 세포, 예컨대 곤충 또는 식물 세포, 및 척추동물 세포, 예컨대 포유동물 숙주 세포주를 포함한다. 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 인코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 종래의 영양 배지에서 배양한다. 숙주 세포에 의해 생성된 항체는 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 정제된다.

[0203] 벡터 구축, 발현 및 정제를 포함한 항체 생성을 위한 방법은 문헌[Plueckthun *et al.*, Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation 203-52 (McCafferty *et al.* eds., 1996)]; 문헌[Kwong and Rader, *E. coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments*, in Current Protocols in Protein Science (2009)]; 문헌[Tachibana and Takekoshi, *Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli*, in Antibody Expression and Production (Al-Rubeai ed., 2011)]; 및 문헌 [Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed., 2009)]에 추가로 기재되어 있다.

[0204] 물론, 당업계에 잘 알려진 대안적 방법이 항-GPC3 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다는 것이 고려된다. 예를 들어, 적절한 아미노산 서열, 또는 이의 부분이 고체상 기법(예를 들어, 문헌[Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis (1969)]; 및 문헌[Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-54 (1963)] 참조)을 사용한 직접 펩티드 합성에 의해 생성될 수 있다. 시험관내 단백질 합성은 수동 기법을 사용하거나 자동화에 의해 수행될 수 있다. 항-GPC3 항체의 다양한 부분을 개별적으로 화학적으로 합성할 수 있으며, 원하는 항-GPC3 항체를 생성하기 위한 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 조합할 수 있다. 대안적으로 항체는, 예를 들어 미국 특허 제 5,545,807호 및 제 5,827,690호에 개시된 바와 같이 항체를 발현하도록 조작된 전이유전자 동물의 세포 또는 밀크와 같은 체액으로부터 정제될 수 있다.

[0205] 폴리클로날 항체

[0206] 폴리클로날 항체는, 일반적으로 관련 항원 및 애주번트의 다중 피하(sc) 또는 복강내(ip) 주사에 의해 동물에서 야기된다. 관련 항원을 이작용성 또는 유도체화제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르(시스테인 잔기를 통한 컨쥬게이션), N-하이드록시숙신이미드(라이신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서, R 및 R^1 은 독립적으로 저급 알킬기임)을 사용하여 면역화시킬 중에서 면역원성인 단백질, 예를 들어, 키홀 림프 헤모시아닌(KLH), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 저해제에 컨쥬게이트시키는 것이 유용할 수 있다. 사용될 수 있는 애주번트의 예는 프로인트 완전 애주번트 및 MPL-TDM 애주번트(모노포스포릴 지질 A, 합성 트레할로스 디코리노마이콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은 과도한 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0207] 예를 들어, 동물은 예를 들어, 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 컨쥬게이트(각각 토끼 또는 마우스에 대해)를 3 부피의 프로인트 완전 애주번트와 조합하고 용액을 다중 부위에 피내로 주사함으로써 항원, 면역원성 컨쥬게이트, 또는 유도체에 대해 면역화된다. 1개월 후에, 프로인트 완전 애주번트 내의 펩티드 또는 컨쥬게이트의 원래 양의 1/5 내지 1/10을 다중 부위에 피하 주사함으로써 동물을 부스팅한다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역가가 정제기에 도달할 때까지 동물을 부스팅한다. 컨쥬게이트는 또한 재조합 세포 배양에서 단백질 용해물로서 제조될 수 있다. 또한, 응집제, 예컨대 명반이 면역 반응을 증진시키는 데 적합하다.

[0208] 모노클로날 항체

[0209] 모노클로날 항체는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득되며, 즉, 상기 집단을 포함하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는, 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역후 변형(예를 들어, 이성질화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 별개의 항체의 혼합물이 아닌 것으로서의 항체의 특징을 나타낸다.

- [0210] 예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌[Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호)에 의해 제조될 수 있다.
- [0211] 하이브리도마 방법에서, 적절한 숙주 동물을 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 림프구를 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시켜, 하이브리도마 세포를 형성한다(문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]).
- [0212] 면역화제는 전형적으로 항원성 단백질 또는 그의 융합 변이체를 포함할 것이다. 문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103]. 불멸화 세포주는 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포이다. 이와 같이 제조된 하이브리도마 세포를, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 씨딩하여 성장시킨다. 바람직한 불멸화 골수종 세포는, 효율적으로 융합하고 선택된 항체-생성 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 생성을 지지하고, 배지, 예컨대 HAT 배지에 민감한 세포이다.
- [0213] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 유도된 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정한다. 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지는 원하는 항원에 대해 유도된 모노클로날 항체의 존재에 대해 검정될 수 있다. 이러한 기법 및 검정은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 결합 친화도는 문헌[Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0214] 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고 표준 방법(상기 문헌[Goding])에 의해 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 포유동물에서 종양으로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다.
- [0215] 서브클론에 의해 분리된 모노클로날 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예컨대, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.
- [0216] 모노클로날 항체는 또한 재조합 DNA 방법, 예컨대 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 및 상기 기재된 바와 같은 방법에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체를 인코딩하는 DNA는 통상의 절차(예를 들어, 쪼개 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 사용에 의해)를 사용하여 용이하게 단리되고 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 제공된다. 단리되면 DNA를 발현 벡터 내로 배치하고, 이를 이어서 달리 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 트랜스펙션시켜, 이러한 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성한다. 항체를 인코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 종설 논문은 문헌[Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)] 및 문헌[Pliickthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992)]을 포함한다.
- [0217] 추가의 실시형태에서, 항체는 문헌[McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기법을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 문헌[Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 문헌[Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]. 후속 간행물들에는 사슬 서플링에 의한 고친화성(nM 범위) 인간 항체의 생성(문헌[Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합(문헌[Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)])이 기재되어 있다. 따라서, 이들 기법은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기법에 대한 실행 가능한 대안이다.
- [0218] DNA는 또한, 예를 들어, 코딩 서열을 치환함으로써(미국 특허 제4,816,567호; 문헌[Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]) 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 코딩 서열에 공유적으로 연결함으로써 변형될 수 있다. 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드를 치환하여, 항원에 대하여 특이성을 갖는 하나의 항원-조합 부위 및 상이한 항원에 대하여 특이성을 갖는 또 다른 항원-조합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성할 수 있다.
- [0219] 또한, 키메라 또는 하이브리드 항체는 가교제를 수반하는 것들을 포함하는 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 사용하여 시험관내에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 면역독소는 이황화물-교환 반응을 사용하여 또는 티오에테

르 결합을 형성하여 구축될 수 있다. 이 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레인 및 메틸-4-머캅토부티르이 미데이트를 포함한다.

[0220] **원핵 세포에서의 재조합 생성**

[0221] 본 개시의 항체를 인코딩하는 폴리핵산 서열을 표준 재조합 기법을 사용하여 수득할 수 있다. 원하는 폴리핵산 서열을 항체 생성 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 단리하고 서열분석할 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드를 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기법을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 수득되면, 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 원핵 숙주에서 이중 폴리뉴클레오타이드를 복제하고 발현시킬 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입한다. 당업계에서 이용 가능하고 공지된 많은 벡터는 본 개시의 목적을 위하여 사용될 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 벡터 내로 삽입될 핵산의 크기, 및 벡터로 형질전환시킬 특정 숙주 세포에 주로 좌우될 것이다. 각각의 벡터는, 이것이 존재하는 특정 숙주 세포와 이의 양립 가능성 및 이의 기능(이중 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두)에 따라, 다양한 구성성분을 함유한다. 벡터 구성성분은 비제한적으로 하기를 일반적으로 포함한다: 복제 원점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위(RBS), 신호 서열, 이중 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열.

[0222] 일반적으로, 숙주 세포와 양립 가능한 종으로부터 유래되는 제어 서열 및 레플리콘을 함유하는 플라스미드 벡터는 이들 숙주와 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹 서열을 보유한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인, pBR322를 사용하여 전형적으로 형질전환된다. 특정 항체의 발현에 사용되는 pBR322 유도체의 예는 Carter 등, 미국 특허 제5,648,237호에 상세히 기재된다.

[0223] 또한, 숙주 미생물과 양립 가능한 제어 서열 및 레플리콘을 함유하는 파지 벡터는 이들 숙주와 함께 형질전환 벡터로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 GEM™-11은 민감한 숙주 세포, 예컨대, 이. 콜라이 LE392를 형질전환시키는 데 사용될 수 있는 재조합 벡터의 제조에 이용될 수 있다.

[0224] 본 출원의 발현 벡터는, 각각의 폴리펩티드 구성성분을 인코딩하는, 2개 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 이의 발현을 조절하는 시스트론에 대해 업스트림(5')에 위치한 비번역 조절 서열이다. 원핵 프로모터는 전형적으로 2개의 부류, 유도성 및 구성성에 속한다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어, 영양소의 존재 또는 부재, 또는 온도의 변화에 반응하여 이의 제어 하에서 시스트론의 증가된 전사 수준을 개시하는 프로모터이다.

[0225] 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식된 다수의 프로모터가 널리 공지된다. 선택된 프로모터는 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 본 출원의 벡터 내로 단리된 프로모터 서열을 삽입함으로써 본 발명의 항체를 인코딩하는 시스트론 DNA에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 고유 프로모터 서열 및 많은 이중 프로모터 두 가지 모두는 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 유도하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 프로모터는, 이들이 고유 표적 폴리펩티드 프로모터와 비교하여 발현된 표적 유전자의 더 큰 전사 및 더 높은 수율을 일반적으로 허용하기 때문에, 이용된다.

[0226] 원핵 숙주에 사용하기에 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판(trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터 예컨대 tac 또는 trc 프로모터를 포함한다. 그러나, 박테리아에서 기능성인 다른 프로모터(예컨대 다른 공지된 박테리아 또는 파지 프로모터)도 또한 적합하다. 그들의 핵산 서열은 공개되어 있고, 이에 의해 숙련된 작업자가 임의의 필요한 제한 부위에 공급하기 위한 링커 또는 어댑터를 사용하여 이들을 표적 펩티드(문헌[*Siebenlist et al. Cell* 20: 269 (1980)])를 인코딩하는 시스트론에 작동 가능하게 라이게이션시킬 수 있다.

[0227] 일 양태에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 막을 가로지르는 발현된 폴리펩티드의 전위를 유도하는 분비 신호 서열 구성성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 구성성분일 수 있거나, 이는 벡터 내로 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 가공되는(즉 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것일 것이다. 이중 폴리펩티드에 고유한 신호 서열을 인식하고 처리하지 않는 원핵 숙주 세포에 대하여, 신호 서열은, 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열안정성 장독소 II(STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵 신호 서열에 의해 치환될 수 있다.

[0228] 일부 실시형태에서, 본 개시에 따른 항체의 생성은 숙주 세포의 세포질에서 발생할 수 있고, 이에 따라, 각각의 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 특정 숙주 균주(예를 들어, 이. 콜라이 trxB⁻ 균주)

는 이항화 결합 형성에 바람직한 세포질 조건을 제공하고, 이에 의해 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 어셈블리를 허용한다.

- [0229] 본 개시의 항체를 발현하는 데 적합한 원핵 숙주 세포는 원시박테리아 및 진정박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체를 포함한다. 유용한 박테리아의 예는 에스케리키아(*Escherichia*)(예를 들어, 이. 콜라이), 바실러스(*Bacillus*)(예를 들어, 비. 서브틸리스(*B. subtilis*)), 엔테로박테리아(*Enterobacteria*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종(예를 들어, 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)), 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 쉬겔라(*Shigella*), 리조비아(*Rhizobia*), 비트레오실라(*Vitreoscilla*), 또는 파라코쿠스(*Paracoccus*)를 포함한다. 일 실시형태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 일 실시형태에서, 이. 콜라이 세포가 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예는 균주 W3110(문헌[Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체, 예를 들어 유전자형 W3110 AfhuA(AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan^R을 갖는 균주 33D3을 포함한다(미국 특허 제5,639,635호). 기타 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294(ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 1776(ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308(ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이들 예는 제한적이라기 보다는 예시적이다. 규정된 유전자형을 갖는 상기 언급된 박테리아 중 임의의 것의 유도체를 구축하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내에서 레플리콘의 복제 가능성을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, 레플리콘을 공급하기 위해 널리 공지된 플라스미드, 예컨대 pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410을 사용하는 경우에 숙주로서 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종을 사용하는 것이 적합할 수 있다.
- [0230] 전형적으로, 숙주 세포는 미량의 단백질 가수분해 효소를 분비해야 하고, 추가의 프로테아제 저해제가 세포 배양물에 혼입되는 것이 바람직할 수 있다.
- [0231] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고; 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나 원하는 서열을 인코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적절한 바대로 변형시킨 통상적인 영양 배지에서 배양한다. 형질전환은 DNA를 원핵 숙주 내로 도입하여, DNA가 염색체의 요소로서 복제 가능하거나 염색체 통합물에 의해 복제 가능하도록 하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라서, 형질전환은 이러한 세포에 적절한 표준 기법을 사용하여 수행된다. 염화칼슘을 이용한 칼슘 처리는 일반적으로, 상당한 세포-벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 대해 사용한다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 이용한다. 사용되는 또 다른 기법은 전기천공법이다.
- [0232] 본 출원의 항체를 생성하기 위해 사용되는 원핵 세포는 당업계에 공지되어 있고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장된다. 적합한 배지의 예는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아 브로쓰(LB)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 배지는 또한, 발현 벡터의 구축을 근거로 하여 선택된 선택 작용제를 함유하여, 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선택적으로 허용한다. 예를 들어, 앰피실린 내성 유전자를 발현하는 세포의 성장을 위해 앰피실린을 배지에 첨가한다.
- [0233] 탄소, 질소 및 무기 인산염 공급원 이외의 모든 필수 보충물은, 또한 단독으로 도입되거나 또 다른 보충물 또는 배지, 예컨대 복합 질소 공급원과의 혼합물로서 도입되는 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타민, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트릴톨 및 디티오프레이톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다. 원핵 숙주 세포는 적합한 온도 및 pH에서 배양된다.
- [0234] 유도성 프로모터가 본 출원의 발현 벡터에 사용되는 경우에는, 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 단백질 발현이 유도된다. 본 출원의 일 양태에서, 폴리펩티드의 전사를 제어하기 위해 PhoA 프로모터가 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포를, 유도를 위해 인산염-제한 배지에서 배양한다. 바람직하게는, 인산염-제한 배지는 C.R.A.P. 배지이다(예를 들어, 문헌 [Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* 263:133-147 (2002)] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이, 이용된 벡터 구축물에 따라서 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.
- [0235] 본 개시의 발현된 항체는 숙주 세포의 주변세포질(periplasm) 내로 분비되어, 이로부터 회수된다. 단백질 회수는 전형적으로, 미생물을 일반적으로 삼투압 쇼크, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 파괴하는 것을 포함한다. 일단 세포가 파괴되면, 세포 debris 또는 온전한 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질을, 예를 들어 친화성 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 대안적으로, 단백질을 배양 배지 내로 수송하고, 이 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과한 다음, 생성된 단백질의 추가 정제를 위해 농축시킬 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 통상적으로 공지된 방법, 예

컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 및 웨스턴 블롯(Western blot) 검정을 이용하여 추가로 분리하고 확인할 수 있다.

[0236] 대안적으로, 항체 생성은 발효 과정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 발효 절차가 재조합 단백질의 생성을 위해 이용 가능하다. 본 개시의 항체의 생성 수율과 품질을 개선하기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생성된 이중 단백질의 적당한 폴딩과 용해도를 촉진시키는 것으로 입증되었다. 문헌[Chen *et al.* *J Bio Chem* 274:19601-19605 (1999)]; 미국 특허 제 6,083,715호; 미국 특허 제 6,027,888호; 문헌[Bothmann and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105 (2000)]; 문헌[Ramm and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113 (2000)]; 문헌[Arie *et al.*, *Mol. Microbiol.* 39:199-210 (2001)].

[0237] 발현된 이중 단백질(특히, 단백질 가수분해적으로 감수성인 단백질)의 단백질 가수분해를 최소화하기 위해, 단백질 가수분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 예를 들어, 미국 특허 제 5,264,365호; 미국 특허 제 5,508,192호; 문헌[Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996)]에 기재된 바와 같이, 본 발명에 사용할 수 있다. 단백질 가수분해 효소가 결핍되고 하나 이상의 샤페론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환시킨 이. 콜라이 균주를 본 출원의 항체를 인코딩하는 발현 시스템에서 숙주 세포로서 사용할 수 있다.

[0238] 본원에서 생성된 항체를 추가로 정제하여, 추가의 검정과 사용을 위해 실질적으로 균질한 제제를 수득할 수 있다. 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법을 이용할 수 있다. 하기의 절차는 적합한 정제 절차의 예시이다: 면역친화성 또는 이온-교환 칼럼 상에서의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예컨대 DEAE 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어, 세파팩스 G-75를 이용한 겔 여과. 일부 실시형태에서, 본 개시의 결합 분자의 면역친화성 정제를 위해, 예를 들어, 고체 상에 고정화시킨 단백질 A가 사용될 수 있다. 단백질 A가 고정화되는 고체상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 컬럼, 더욱 바람직하게는 제어 공극 유리 컬럼 또는 규산 컬럼이다. 일부 실시형태에서, 오염물질의 비특이적인 부착을 방지하기 위한 시도로, 컬럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅한다. 이어서, 고체상을 세척하여 고체상에 비특이적으로 결합된 오염물질을 제거한다. 마지막으로, 관심 항체를 용리에 의해 고체상으로부터 회수한다.

[0239] 진핵 세포에서의 재조합 생성

[0240] 진핵 발현을 위하여, 벡터 구성성분은 일반적으로, 다음 중 하나 이상을 포함하지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 원점, 하나 이상의 마커 유전자 및 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열.

[0241] 진핵 숙주에 사용하기 위한 벡터는 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적인 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 인코딩하는 삽입물을 포함할 수도 있다. 선택된 이중 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 가공되는(즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용 가능하다. 이러한 전구체 영역에 대한 DNA는 본 출원의 항체를 인코딩하는 DNA에 리딩 프레임 내에서 라이게이션될 수 있다.

[0242] 일반적으로, 복제 원점 구성성분은 포유동물 발현 벡터에 필요하지 않다(SV40 원점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 이는 단지 이것이 조기 프로모터를 함유하기 때문이다).

[0243] 발현 및 클로닝 벡터는 선택 가능한 마커로도 명명되는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 선택 유전자는 항생제 또는 기타 독소, 예를 들어, 앰피실린, 네오마이신, 메토타렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하는 단백질; 영양요구성 결핍을 보충하는 단백질; 또는 복합 배지로부터 입수 가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 인코딩할 수 있다.

[0244] 선택 계획의 하나의 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키기 위한 약물을 이용한다. 이중 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하므로, 선택 요법을 견뎌낸다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 하이그로마이신을 이용한다.

[0245] 포유동물 세포에 적합한 선택 가능한 마커의 또 다른 예는 본 출원의 항체를 인코딩하는 핵산을 흡수하기에 적합한 세포의 확인을 가능하게 하는 것들이다. 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 먼저, 형질전환체 모두를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토타렉세이트(Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인된다. 야생형 DHFR이 이용되는 경우에 예시적인 적절한 숙주 세포는, DHFR 활성이 결핍된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주이다. 대안적으로, 폴리펩티드 인코딩-DNA 서열, 야생형 DHFR 단백질 및 또 다른 선택 가능한 마커, 예컨대 아미노글리코사이드 3'-포스포트랜스페라제(APH)로 형질전환된 또는 동시-형질전환된 숙주 세포(특히, 내인성

DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는, 선택 가능한 마커, 예컨대 아미노글리코시드 항생제에 대한 선택 작용제를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택될 수 있다.

[0246] 발현 및 클로닝 벡터는 통상, 숙주 유기체에 의해 인식되고 원하는 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결되는 프로모터를 함유한다. 진행 유전자는, 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 업스트림에 위치한 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사의 시작부로부터 70 내지 80개 염기 업스트림에서 발견된 또 다른 서열이 포함될 수 있다. 대부분의 진행 유전자의 3' 말단은 폴리 A 테일을 코딩 서열의 3' 말단에 부가하기 위한 신호일 수 있다. 모든 이들 서열은 진행 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0247] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 폴리펩티드 전사는, 예를 들어, 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 게두 바이러스, 아데노바이러스(예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 유인원 바이러스 40(SV40)의 게놈으로부터 수득된 프로모터에 의해, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터, 열-충격 프로모터로부터 제어되되, 단, 이러한 프로모터는 숙주 세포 시스템과 양립 가능하다.

[0248] 고등 진핵생물에 의한 본 개시의 항체를 인코딩하는 DNA의 전사는 인헨서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 종종 증가된다. 많은 인헨서 서열은 포유동물 유전자(글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질, 및 인슐린)로부터 현재 공지된다. 예에는 복제 원점의 후기 측 상의 SV40 인헨서(100-270 bp), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 원점의 후기 측 상의 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서가 포함된다. 또한, 진행 프로모터의 활성화를 위한 향상 요소에 관하여 문헌[Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인헨서는 폴리펩티드 인코딩 서열에 대해 5' 또는 3' 위치에서 벡터에 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치한다.

[0249] 진행 숙주 세포(효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵의 세포)에서 사용된 발현 벡터는 전사의 종결에 그리고 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 또한 함유한다. 이러한 서열은 진행 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및, 가끔 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용 가능하다. 이들 영역은 폴리펩티드-인코딩 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화된 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 세그먼트를 함유한다. 하나의 유용한 전사 종결 구성성분은 소과 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다.

[0250] 본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는, 척추동물 숙주 세포를 포함하는, 본원에서 기재된 고등 진핵생물 세포를 포함한다. 배양물(조직 배양물) 내의 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되어 왔다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁 배양물 내의 성장을 위하여 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌[Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)]); 어린 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, 문헌[Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포(TM4, 문헌[Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개과 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 랫트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TR1 세포(문헌[Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주(Hep G2)이다.

[0251] 숙주 세포는 항체 생성을 위하여 상기-기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터 유도, 형질전환체 선택, 또는 원하는 서열을 인코딩하는 유전자의 증폭에 적절한 대로 변형된 종래의 영양 배지에서 배양될 수 있다.

[0252] 본 출원의 항체를 생성하는 데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용 가능한 배지, 예컨대 Ham's F10(시그마(Sigma)), 최소 필수 배지((MEM), 시그마), RPMI-1640(시그마) 및 돌베코 변형된 이글 배지((DMEM), 시그마)는 숙주 세포 배양에 적합하다. 또한, 문헌[Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979)], 문헌[Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)], 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; 제WO 90/03430호; 제WO 87/00195호; 또는 미국 특허 Re. 30,985호에 기재된 배지 중 임의의 것은 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 상피 성장 인자), 염(예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 인산염), 완충제(예컨대 HEPES), 뉴클레오티드(예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대 GENTAMYCINTM 약물), (마이크로물 범위의 최종 농도로 일반적으로 존재하는 무기 화합물로서 정의된) 미량 원소, 및 글루코스 또는 등가 에너지 공급원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물도 또한

당업자에게 공지되어 있을 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위하여 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것들이고, 당업자에 명백할 것이다.

[0253] 제조합 기법을 사용하는 경우, 항체는, 주변세포질 공간에서, 세포내로 생성될 수 있거나, 배지 내로 직접적으로 분비될 수 있다. 항체가 세포내로 생성되면, 제1 단계로서, 미립자 데브리스, 숙주 세포 또는 용해된 단편 중 어느 하나는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액은 상업적으로 이용 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 일반적으로 먼저 농축된다. 프로테아제 저해제, 예컨대, PMSF는 단백질 가수분해를 저해하기 위한 임의의 전술한 단계에서 포함될 수 있고, 항생제는 우발적인 오염물질의 성장을 예방하기 위해 포함될 수 있다.

[0254] 세포로부터 제조된 단백질 조성물은, 예를 들어, 수산화인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기법이다. 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔한 아가로스로이지만, 다른 매트릭스가 이용 가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어된 공극 유리 또는 폴리(스티렌-디비닐)벤젠은 아가로스로 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 단백질 정제를 위한 다른 기법, 예컨대 이온-교환 컬럼 상의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 상의 크로마토그래피 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 SEPHAROSE™ 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전은 회수될 항체에 의존하여 또한 이용 가능하다. 임의의 예비 정제 단계(들) 이후, 관심 항체 및 오염물질을 포함하는 혼합물은 저 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피로 처리될 수 있다.

[0255] 5.2.8. 항체를 포함하는 기타 결합 분자

[0256] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 항-GPC3 항체를 포함하는 결합 분자가 본원에 제공된다. 하기 섹션 5.3에 기재된 바와 같은 본원에 제공된 키메라 항원 수용체(CAR)에 더하여, 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 GPC3에 대한 항체는 다른 결합 분자의 부분이다. 본 개시의 예시적인 결합 분자는 본원에 기재된다.

[0257] 융합 단백질

[0258] 다양한 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 또 다른 작용제, 예를 들어, 단백질-기반의 엔티티에 유전학적으로 융합되거나 화학적으로 컨쥬게이트될 수 있다. 항체는 작용제에 화학적으로 컨쥬게이트되거나, 다른게는 작용제에 비-공유적으로 컨쥬게이트될 수 있다. 작용제는 펩티드 또는 항체(또는 이의 단편)일 수 있다.

[0259] 따라서, 일부 실시형태에서, 융합 단백질을 생성하기 위한 이중 단백질 또는 폴리펩티드(또는 이의 단편, 예를 들어, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450 또는 약 500개 아미노산 또는 500개 초과 아미노산의 폴리펩티드)에 제조합적으로 융합되거나 화학적으로 컨쥬게이트된(공유적 또는 비-공유적 컨쥬게이션) 항체 및 이의 용도가 본원에 제공된다. 특히, 본원에 제공되는 항체의 항원 결합 단편(예를 들어, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3) 및 이중 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질이 본원에 제공된다.

[0260] 더욱이, 본원에 제공되는 항체는 마커 또는 "태그" 서열, 예컨대 펩티드에 융합되어 정제를 용이하게 할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 마커 또는 태그 아미노산 서열은 헥사-히스티딘 펩티드, 헤마글루티닌("HA") 태그 및 "FLAG" 태그이다.

[0261] 항체에 모이어티(폴리펩티드 포함)를 융합시키거나 컨쥬게이트시키는 방법이 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Arnon et al., Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 243-56 (Reisfeld et al. eds., 1985)]; 문헌 [Hellstrom et al., Antibodies for Drug Delivery, in Controlled Drug Delivery 623-53 (Robinson et al. eds., 2d ed. 1987)]; 문헌 [Thorpe, Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review, in Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications 475-506 (Pinchera et al. eds., 1985)]; 문헌 [Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy 303-16 (Baldwin et al. eds., 1985)]; 문헌 [Thorpe et al., Immunol. Rev. 62:119-58 (1982)]; 미국 특허 제5,336,603호; 제5,622,929호; 제5,359,046호; 제5,349,053호; 제5,447,851호; 제5,723,125호; 제5,783,181호; 제5,908,626호; 제5,844,095호; 및 제5,112,946호; 제EP 307,434호; 제EP 367,166호; 제EP 394,827호; PCT 공개 제WO 91/06570호, 제WO 96/04388호, 제WO 96/22024호, 제WO 97/34631호 및 제WO 99/04813호; 문헌 [Ashkenazi et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-39 (1991)]; 문헌[Traunecker et al., Nature, 331:84-86 (1988)]; 문헌 [Zheng et al., J. Immunol. 154:5590-600 (1995)]; 및 문헌[Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-41 (1992)] 참조).

- [0262] 예를 들어, 유전자-서플링, 모티프-서플링, 엑손-서플링, 및/또는 코돈-서플링(총칭하여 "DNA 서플링"으로 지칭됨)의 기법을 통해 융합 단백질이 생성될 수 있다. 예를 들어, 더 높은 친화성과 더 낮은 해리 속도를 갖는 항체를 포함하는, 본원에 제공된 항체의 활성을 변경하기 위해 DNA 서플링이 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,605,793호; 제5,811,238호; 제5,830,721호; 제5,834,252호; 및 제5,837,458호; 문헌[Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 (1997)]; 문헌[Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998)]; 문헌[Hansson et al., J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999)]; 및 문헌[Lorenzo and Blasco, Biotechniques 24(2):308-13 (1998)] 참조). 재조합 전에 오류-유발 PCR, 무작위 뉴클레오타이드 삽입, 또는 다른 방법에 의한 무작위 돌연변이유발로 처리함으로써 항체 또는 인코딩된 항체를 변경할 수 있다. 본원에 제공된 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 이중 분자의 하나 이상의 구성성분, 모티프, 섹션, 부분, 도메인, 단편 등과 재조합될 수 있다.
- [0263] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 항체는 제2 항체에 컨주게이트되어, 항체 이중컨주게이트를 형성한다.
- [0264] 다양한 실시형태에서, 항체는 작용제에 유전학적으로 융합된다. 유전학적 융합은 링커(예를 들어, 폴리펩티드)를 항체와 작용제 사이에 배치함으로써 달성될 수 있다. 링커는 유연성 링커일 수 있다.
- [0265] 다양한 실시형태에서, 항체는 치료적 분자에 유전학적으로 컨주게이트되며, 현지 영역은 항체를 치료적 분자에 연결한다.
- [0266] 또한, 본원에 제공되는 다양한 융합 단백질의 제조 방법이 본원에 제공된다. 상기 섹션 5.2.7에 기재된 다양한 방법도 또한 사용하여, 본원에 제공되는 융합 단백질을 제조할 수 있다.
- [0267] 구체적인 실시형태에서, 본원에 제공되는 융합 단백질은 재조합적으로 발현된다. 본원에 제공되는 융합 단백질의 재조합 발현은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 단편을 함유하는 발현 벡터의 구축을 필요로 할 수 있다. 일단 본원에 제공되는 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 단편이 수득되면, 분자의 생성을 위한 벡터는 당업계에 잘 알려져 있는 기법을 사용하여 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 인코딩 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 발현함으로써 단백질을 제조하는 방법은 본원에 기재되어 있다. 당업자에게 잘 알려져 있는 방법을 사용하여, 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법은 예를 들어, 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전학적 재조합을 포함한다. 또한, 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 본원에 제공되는 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 단편 또는 CDR을 포함하는 복제 가능한 벡터가 제공된다.
- [0268] 발현 벡터는, 통상적인 기법에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있고, 트랜스펙션된 세포는 통상적인 기법에 의해 배양되어 본원에 제공된 융합 단백질을 생성한다. 따라서, 또한, 이중 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 본원에 제공된 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 단편을 함유하는 숙주 세포가 본원에 제공된다.
- [0269] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템은, 본원에 제공된 융합 단백질을 발현하는 데 이용될 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은, 관심 코딩 서열이 생성되고 나중에 정제될 수 있는 비히클을 나타내지만, 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열로 형질전환되거나 트랜스펙션된 경우, 본원에 제공된 융합 단백질을 동소에서 발현할 수 있는 세포도 또한 나타낸다. 이들은, 미생물, 예컨대 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예를 들어, 이. 콜라이 및 비. 서브틸리스); 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예를 들어, 사카로마이세스 피키아(*Saccharomyces Pichia*)); 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 배큘로바이러스(baculovirus))로 감염된 곤충 세포 시스템; 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV, 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 계능으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터(late promoter); 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구축물을 보유하는 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, NS0, 및 3T3 세포)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히 완전한 재조합 항체 분자의 발현을 위해, 박테리아 세포, 예컨대 에스케리키아 콜라이 또는 진핵 세포가 재조합 융합 단백질의 발현

에 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스 유래의 주요 즉각적인 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께 중국 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포는, 항체 또는 이의 변이체에 대한 효과적인 발현 시스템이다. 구체적인 실시형태에서, 본원에 제공된 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현은 구성성 프로모터, 유도성 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터에 의해 조절된다.

[0270] 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터는, 발현되는 융합 단백질에 대한 의도된 용도에 따라 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 다량의 이러한 융합 단백질이 생성될 경우, 융합 단백질의 약제학적 조성물의 생성을 위해, 용이하게 정제되는 높은 수준의 융합 단백질 생성물의 발현을 유도하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는, 코딩 서열이 개별적으로 lac Z 코딩 영역과 프레임 내에 벡터 내로 라이게이션되어 융합 단백질이 생성되게 할 수 있는 이. 콜라이 발현 벡터 pUR278(문헌[Ruther *et al.*, EMBO 12:1791 (1983)]); pIN 벡터(문헌[Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985)]; 문헌[Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)]) 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. pGEX 벡터는 또한 글루타티온 5-트랜스퍼라제(GST)와의 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 매트릭스 글루타티온 아가로스 비드로의 흡착 및 결합에 이어서 유리 글루타티온의 존재 하에 서의 용리에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는, 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 모이어티로부터 방출될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계된다.

[0271] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-기반 발현 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심 코딩 서열은, 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어, 후기 프로모터 및 트리파티트 리더 서열(tripartite leader sequence)에 라이게이션될 수 있다. 이 키메라 유전자는 이어서 시험관 내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비-필수 영역(예를 들어, 영역 E1 또는 E3) 내의 삽입은, 감염된 숙주에서 융합 단백질을 발현할 수 있고 생존 가능한 재조합 바이러스를 초래할 것이다(예를 들어, 문헌[Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)] 참조). 삽입된 코딩 서열의 효율적인 번역을 위해 특정 개시 신호가 필요할 수도 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 게다가, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임과 맞게 존재하여야 한다. 이들 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은 다양한 기원, 천연 및 합성 둘 모두의 것일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 요소, 전사 종결자, 등의 포함에 의해 향상될 수 있다(예를 들어, 문헌[Bittner *et al.*, Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)] 참조)

[0272] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 원하는 특정 방식으로 유전자 생성물을 변형하고 처리하는, 숙주 세포 군주가 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예를 들어, 글리코실화) 및 처리(예를 들어, 절단)는 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역-후 가공 및 변형을 위한 특징적이고 특별한 메커니즘을 갖는다. 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하기 위해, 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 이를 위해, 유전자 생성물의 일차 전사물의 적절한 가공, 글리코실화, 및 인산화를 위한 세포 기구를 보유하는 진핵 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포는, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NS0(어떠한 면역글로블린 사슬도 내인적으로 생성하지 않는 쥐과 골수종 세포주), CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0273] 재조합 단백질의 장기, 고-수율 생성을 위해, 안정적인 발현이 이용될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질을 안정적으로 발현하는 세포주는 조작될 수 있다. 바이러스 복제 원점을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 대신, 숙주 세포는, 적절한 발현 제어 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위, 등) 및 선택 가능한 마커에 의해 제어되는 DNA로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후에, 조작된 세포를 농축 배지에서 1-2일 동안 성장되게 할 수 있으며, 그 다음, 선택 배지로 전환시킨다. 재조합 플라스미드 내의 선택 가능한 마커는, 선택에 대한 내성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 그들의 염색체 내로 안정적으로 통합시키고, 성장하여 군집(foci)을 형성하게 하고, 이는 차례로 세포주로 클로닝되고 증대될 수 있다. 이 방법은, 융합 단백질을 발현하는 세포주를 조작하는 데 유리하게 사용될 수 있다. 이러한 조작된 세포주는, 결합 분자와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 조성물의 스크리닝 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

[0274] tk-, hgppt- 또는 aprt-세포에 각각 사용될 수 있는 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제(문헌[Wigler *et al.*, Cell 11:223 (1977)]), 하이포잔틴구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(문헌[Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)]) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(문헌[Lowy *et al.*, Cell 22:8-17 (1980)]) 유전자를 포함하지만, 이에 제한 없는 다수의 선택 시스템이 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성(antimetabolite resistance)은 하기의 유전자에 대한 선택의 기초로서 사용될 수 있다: 메토크세이트에 대한

내성을 부여하는, *dhfr*(문헌[Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980)]; 문헌[O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)]); 미코페놀산에 대한 내성을 부여하는, *gpt*(문헌[Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)]); 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 부여하는, *neo* (문헌[Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991)]; 문헌[Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993)]; 문헌[Mulligan, Science 260:926-932 (1993)]; 및 문헌[Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993)]; 문헌[May, TIB TECH 11(5):155-2 15 (1993)]); 및 하이그로마이신에 내성을 부여하는, *hygro*(문헌[Santerre *et al.*, Gene 30:147 (1984)]). 재조합 DNA 기술의 분야에 통상적으로 알려진 방법은, 원하는 재조합 클론을 선택하기 위해 일상적으로 적용될 수 있으며, 이러한 방법은, 예를 들어, 문헌[Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)]; 문헌[Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]; 및 문헌[Chapters 12 and 13, Dracopoli *et al.* (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994)]; 문헌[Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981)]에 기재되어 있으며, 이들의 전문은 참조로서 본원에 포함된다.

[0275] 융합 단백질의 발현 수준은, 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다(검토를 위해, 문헌[Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)] 참조). 융합 단백질을 발현하는 벡터 시스템에서 마커가 증폭 가능한 경우, 숙주 세포의 배양물에 존재하는 저해제 수준의 증가는, 마커 유전자의 카피의 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역이 융합 단백질 유전자와 회합되어 있기 때문에, 융합 단백질의 생성도 또한 증가할 것이다(문헌[Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)]).

[0276] 숙주 세포는, 본원에 제공된 다수의 발현 벡터로 동시-트랜스펙션될 수 있다. 벡터는 각각의 인코딩 폴리펩티드의 동일한 발현을 가능하게 하는 동일한 선택 가능한 마커를 함유할 수 있다. 대안적으로, 다수의 폴리펩티드를 인코딩하고, 이를 발현할 수 있는 단일의 벡터가 사용될 수 있다. 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0277] 본원에 제공된 융합 단백질이 재조합 발현에 의해 생성되면, 이것은, 폴리펩티드(예를 들어, 번역글로불린 분자)의 정제를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화성, 특히 단백질 A 이후 특이적인 항원에 대한 친화성에 의한, 사이징 컬럼 크로마토그래피 및 카파 선택(kappa select) 친화성 크로마토그래피), 원심분리, 차별 용해도(differential solubility)에 의해, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 기타 표준 기법에 의해 정제될 수 있다. 더욱이, 본원에 제공된 융합 단백질 분자는, 정제를 용이하게 하기 위해 본원에 기재되거나 그렇지 않으면 당업계에 알려진 이중 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.

[0278] 면역컨쥬게이트

[0279] 일부 실시형태에서, 본 개시는 또한, 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 저해제, 독소(예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 또는 이의 단편), 또는 방사성 동위원소에 컨쥬게이트된 본원에 기재된 항-GPC3 항체 중 임의의 것을 포함하는 면역컨쥬게이트를 제공한다.

[0280] 일부 실시형태에서, 면역컨쥬게이트는 항체-약물 컨쥬게이트(ADC)인데, 여기서 항체는 메이탄시노이드(미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호 및 유럽 특허 제EP 0 425 235 B1호 참조); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF(MMAE 및 MMAF)(미국 특허 제5,635,483호 및 제5,780,588호 및 제7,498,298호 참조); 둘라스타틴; 칼리키아마이신 또는 이의 유도체(미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호 및 제5,877,296호; 문헌[Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)]; 및 문헌[Lode *et al.*, *Cancer. Res.* 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라사이클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신(문헌[Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)]; 문헌[Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)]; 문헌[Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)]; 문헌[Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)]; 문헌[Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)]; 문헌[King *et al.*, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 제6,630,579호 참조); 메토크세이트; 빈테신; 탁산, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 약물에 컨쥬게이트된다.

- [0281] 일부 실시형태에서, 면역컨쥬게이트는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 차란티아(*Momordica charantia*) 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스(*saponaria officinalis*) 저해제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 효소적 활성 독소 또는 이의 단편에 컨쥬게이트된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다.
- [0282] 일부 실시형태에서, 면역컨쥬게이트는 방사성컨쥬게이트를 형성하도록 방사성 원자에 컨쥬게이트된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성컨쥬게이트의 생성에 이용 가능하다. 예에는 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb 및 Lu의 방사성 동위원소가 포함된다. 방사성컨쥬게이트가 검출에 이용될 때, 이것은 신티그래픽 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어, Tc99m 또는 I123, 또는 핵 자기 공명(NMR) 영상화(자기 공명 영상화, mri로도 또한 알려져 있음)를 위한 스핀 표지, 예컨대 다시 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.
- [0283] 항체 및 세포독성제의 컨쥬게이트는 다양한 이기능성 단백질 커플링 작용제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜 디티오) 프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르(예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌[Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체로의 방사성뉴클레오타이드의 컨쥬게이션을 위한 예시적인 킬레이트제이다. W094/11026호를 참조한다.
- [0284] 링커는 세포에서 컨쥬게이트된 작용제의 방출을 용이하게 하는 "절단 가능한 링커"일 수 있지만, 비-절단 가능한 링커도 또한 본원에서 고려된다. 본 개시의 컨쥬게이트에 사용하기 위한 링커에는 제한 없이, 산 불안정 링커(예를 들어, 하이드라존 링커), 이황화물-함유 링커, 펩티다제-민감성 링커(예를 들어, 아미노산, 예를 들어, 발린 및/또는 시트룰린, 예컨대 시트룰린-발린 또는 페닐알라닌-라이신을 포함하는 펩티드 링커), 광불안정 링커, 디메틸 링커, 티오에테르 링커 또는 다중약물 수송체-매개된 저항성을 회피하도록 설계된 친수성 링커가 포함된다.
- [0285] 본원에서 면역컨쥬게이트 또는 ADC는 상업적으로 이용 가능한(예를 들어, 미국 일리노이주 락포드 소재의 피어스 바이오테크놀로지, 인코포레이티드(Pierce Biotechnology, Inc.)로부터) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC 및 술폰-SMPB 및 SVSB(숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 가교결합제 시약으로 제조된 이러한 컨쥬게이트를 고려하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0286] 다른 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체는 예를 들어, 진단 분자에 컨쥬게이트되거나, 재조합적으로 융합된다. 이러한 진단 및 검출은, 예를 들어, 다양한 효소, 예컨대, 비제한적으로 서양고추냉이 과산화효소, 알칼리성 포스포타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제; 보결 분자단(prosthetic group), 예컨대, 비제한적으로 스트렙타비딘/비오틴 또는 아비딘/비오틴; 형광 물질, 예컨대, 비제한적으로 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아나네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드, 또는 피코에리트린; 발광 물질, 예컨대, 비제한적으로 루미놀; 생물발광 물질, 예컨대, 비제한적으로 루시페라제, 루시페린, 또는 에퀴린; 화학발광 물질, 예컨대 225Ac γ -방출, Auger-방출, β -방출, 알파-방출 또는 양전자-방출 방사성 동위원소를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 검출 가능한 물질에 항체를 커플링시켜 달성될 수 있다.
- [0287] **5.3. 키메라 항원 수용체**
- [0288] 또 다른 양태에서, GPC3에 결합하는 본원에 제공되는 항체(예를 들어, scFv)를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)가 본원에 제공된다. 본 발명의 scFv 단편을 포함하는 예시적인 CAR은

하기 섹션 6에 예시되어 있다.

[0289] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 키메라 항원 수용체(CAR)는 하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다: (a) 본원에 제공되는 바와 같은 GPC3에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인, 및 선택적으로 하나 이상의 추가의 결합 도메인(들); (b) 막횡단 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인. 각각의 구성성분 및 추가의 영역이 하기에 더욱 상세히 기재된다.

[0290] 5.3.1. 세포의 항원 결합 도메인

[0291] 본원에 기재된 CAR의 세포의 항원 결합 도메인은 하나 이상(예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상 중 어느 하나)의 항체를 포함한다. 항체는 직접적으로 펩티드 결합을 통해 또는 펩티드 링커를 통해 서로 융합될 수 있다.

[0292] 항체

[0293] 본 개시의 CAR은 본원에 제공되는 하나 이상의 항체를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인을 포함한다. 항체는 동일한 또는 상이한 기원 및 동일한 또는 상이한 크기의 것일 수 있다. 예시적인 항체는 상기 섹션 5.2에 기재된 scFv 단편을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0294] 일부 실시형태에서, (a) 항-GPC3 항체(예를 들어, scFv)를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인; (b) 막횡단 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 CAR이 본원에 제공되며, 항-GPC3 항체는 예를 들어, 표 3 및 표 4의 하나 이상의 CDR을 포함하는 것들을 포함하는 상기 섹션 5.2에 기재된 바와 같은 항-GPC3 항체이다.

[0295] 더욱 구체적으로, 일부 실시형태에서, (a) 항-GPC3 항체(예를 들어, scFv 단편)를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인; (b) 막횡단 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 CAR이 본원에 제공되며, 항-GPC3 항체(예를 들어, scFv)는 (i) SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (ii) SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 52의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (iii) SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 43의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 53의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (iv) SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (v) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (vi) SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 46의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 56의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (vii) SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 57의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (viii) SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 48의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (ix) SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 59의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (x) SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 50의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 60의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체(예를 들어,

scFv)는 SEQ ID NO: 61 내지 70 및 117 내지 122의 군으로부터 선택되는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71 내지 80 및 123 내지 125의 군으로부터 선택되는 VL 도메인을 포함한다. 더욱 구체적인 실시형태에서, 항체는 SEQ ID NO: 81 내지 90, 128 및 129 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv이다.

[0296] 다른 실시형태에서, 세포의 항원 결합 도메인은 하나 이상의 추가의 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다. 하나 이상의 추가의 항원(들)에 결합하는 하나 이상의 추가의 결합 도메인(들), 예를 들어, 하나 이상의 추가의 항원(들)을 표적화하는 1, 2, 3, 4개 이상의 추가의 항체 결합 영역(항체).

[0297] 일부 실시형태에서, 본 개시의 CAR에 의해 표적화된 추가의 항원(들)은 세포 표면 분자이다. 항체는 특수 병태와 연관된 표적 세포 상의 세포 표면 마커로서 역할을 하는 항원을 인식하도록 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 종양 항원이다. 일부 실시형태에서, 종양 항원은 종양-특이적 항원(TSA) 또는 종양-연관 항원(TAA)이다. TSA는 종양 세포에 고유하고 신체의 다른 세포에서 발생하지 않는다. TAA 연관 항원은 종양 세포에 고유하지 않고, 대신에 항원에 대한 면역학적 관용 상태를 유도하지 못하는 조건 하에 정상 세포 상에서도 발현된다. 종양 상의 항원의 발현은 면역계가 항원에 반응하게 하는 조건 하에 발생할 수 있다. TAA는 면역계가 미성숙하고, 반응할 수 없을 때 태아 발달 동안 정상 세포 상에서 발현되는 항원일 수 있거나 정상 세포 상에서 보통 극도로 낮은 수준으로 존재하지만, 종양 세포 상에서 훨씬 더 높은 수준으로 발현되는 항원일 수 있다.

[0298] 세포의 도메인 내의 항원 결합 도메인에 더하여, 본원에 제공되는 CAR은 각각이 하기에 더욱 상세히 기재되어 있는 하기 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: 링커(예를 들어, 펩티드 링커), 막횡단 도메인, 힌지 영역, 신호 펩티드, 세포내 신호전달 도메인, 동시-자극 신호전달 도메인.

[0299] 예를 들어, 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 이펙터 세포(예컨대 T 세포)의 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 일차 세포내 신호전달 도메인은 CD3ζ로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 동시-자극 신호전달 도메인은 CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83의 리간드, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 동시-자극 분자로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 동시-자극 신호전달 도메인은 CD137로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, GPC3 CAR은 세포의 항원 결합 도메인의 C-말단과 막횡단 도메인의 N-말단 사이에 위치한 힌지 도메인(예컨대, CD8α 힌지 도메인)을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, GPC3 CAR은 폴리펩티드의 N-말단에 위치한 신호 펩티드(예컨대 CD8α 신호 펩티드)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단으로 하기를 포함한다: CD8α 신호 펩티드, 세포의 항원-결합 도메인, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단 도메인, CD137로부터 유래된 동시-자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ로부터 유래된 일차 세포내 신호전달 도메인. 일부 실시형태에서, GPC3 CAR은 단일특이적이다. 일부 실시형태에서, GPC3 CAR은 1가이다. 일부 실시형태에서, GPC3 CAR은 다중특이적이다. 일부 실시형태에서, GPC3 CAR은 다가이다.

[0300] 펩티드 링커

[0301] 다수의 항체가 본 발명의 CAR에 존재하는 경우에, 다양한 항체가 펩티드 링커를 통해 서로 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 어떠한 펩티드 링커도 없이 서로 직접적으로 융합된다. 상이한 항체를 연결하는 펩티드 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. CAR의 상이한 도메인은 또한 펩티드 링커를 통해 서로 융합될 수 있다.

[0302] CAR 내의 각각의 펩티드 링커는 항체 및/또는 다양한 도메인의 구조적 및/또는 기능적 특징에 따라 동일하거나 상이한 길이 및/또는 서열을 가질 수 있다. 각각의 펩티드 링커는 독립적으로 선택되고 최적화될 수 있다. CAR에 사용되는 펩티드 링커(들)의 길이, 유연성 정도 및/또는 다른 특성은 하나 이상의 특정 항원 또는 에피토프에 대한 친화도, 특이성 또는 결합력을 포함하나 이에 제한되지 않는 특성에 대해 약간의 영향을 가질 수 있다. 예를 들어, 2개의 인접한 도메인이 서로 입체적으로 방해하지 않는 것을 보장하도록 더 긴 펩티드 링커가 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 짧은 펩티드 링커는 막횡단 도메인과 CAR의 세포내 신호전달 도메인 사이에 배치될 수 있다. 일부 실시형태에서, 펩티드 링커는 인접한 도메인이 서로에 대해 자유롭게 이동하도록 유연성 잔기(예컨대 글리신 및 세린)를 포함한다. 예를 들어, 글리신-세린 더블릿(doublet)은 적합한 펩티드 링커일 수 있다.

[0303] 펩티드 링커는 임의의 적합한 길이의 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 펩티드 링커는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100개 또는 그 이상

의 아미노산 길이 중 임의의 것이다. 일부 실시형태에서, 펩티드 링커는 약 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5개 또는 그 이하의 아미노산 길이 중 임의의 것 이하이다. 일부 실시형태에서, 펩티드 링커의 길이는 약 1개 아미노산 내지 약 10개 아미노산, 약 1개 아미노산 내지 약 20개 아미노산, 약 1개 아미노산 내지 약 30개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 15개 아미노산, 약 10개 아미노산 내지 약 25개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 30개 아미노산, 약 10개 아미노산 내지 약 30개 아미노산 길이, 약 30개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 약 50개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 또는 약 1개 아미노산 내지 약 100개 아미노산 중 임의의 것이다.

[0304] 펩티드 링커는 자연 발생 서열, 또는 비-자연 발생 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 중쇄 단독 항체의 힌지 영역으로부터 유래된 서열은 링커로서 사용될 수 있다. 예를 들어, W01996/34103호를 참조한다. 일부 실시형태에서, 펩티드 링커는 유연성 링커이다. 예시적인 유연성 링커는 글리신 중합체(G)_n, 글리신-세린 중합체, 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 당업계에 알려진 다른 유연성 링커를 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. 예를 들어, W02016014789호, W02015158671호, W02016102965호, US20150299317호, W02018067992호, US7741465호, 문헌[Colcher *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.* 82:1191-1197 (1990)] 및 문헌[Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988)]에 기재된 바와 같은 당업계에 공지된 다른 링커가 또한 본원에 제공된 CAR에 포함될 수 있으며, 이의 각각의 개시는 본원에 참조로 포함된다.

[0305] 5.3.2. 막횡단 도메인

[0306] 본 개시의 CAR은 세포외 항원 결합 도메인에 직접적으로 또는 간접적으로 융합될 수 있는 막횡단 도메인을 포함한다. 막횡단 도메인은 천연 공급원으로부터 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "막횡단 도메인"은 세포 막, 바람직하게는 진핵 세포 막에서 열역학적으로 안정한 임의의 단백질 구조를 지칭한다. 본원에 기재된 CAR에 사용하기에 양립 가능한 막횡단 도메인은 자연 발생 단백질로부터 수득될 수 있다. 대안적으로, 이는 합성, 비-자연 발생 단백질 세그먼트, 예를 들어, 세포 막에서 열역학적으로 안정한 소수성 단백질 세그먼트일 수 있다.

[0307] 막횡단 도메인은 막횡단 도메인의 3차원 구조에 기반하여 분류된다. 예를 들어, 막횡단 도메인은 알파 나선, 하나 초과 알파 나선의 복합체, 베타-배럴, 또는 세포의 인지질 이중층에 걸칠 수 있는 임의의 다른 안정한 구조를 형성할 수 있다. 더욱이, 막횡단 도메인은 또한 또는 대안적으로 막횡단 도메인이 막을 가로질러 만드는 통과 수 및 단백질의 배향을 포함하는, 막횡단 도메인 토폴로지에 기반하여 분류될 수 있다. 예를 들어, 단일-통과 막 단백질은 세포 막을 한번 교차하고, 다중-통과 막 단백질은 세포 막을 적어도 2회(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7회 이상) 교차한다. 막 단백질은 세포의 내측 및 외측에 대한 이들의 말단 및 막통과 세그먼트(들)의 토폴로지에 따라 유형 I, 유형 II 또는 유형 III으로 정의될 수 있다. 유형 I 막 단백질은 단일의 막-스패닝 영역을 가지며, 단백질의 N-말단이 세포의 지질 이중층의 세포외 측 상에 존재하고 단백질의 C-말단이 세포질 측 상에 존재하도록 배향된다. 유형 II 막 단백질은 또한 단일의 막-스패닝 영역을 갖지만 단백질의 C-말단이 세포외 지질 이중층의 세포외 측 상에 존재하고 단백질의 N-말단이 세포질 측 상에 존재하도록 배향된다. 유형 III 막 단백질은 다중 막-스패닝 세그먼트를 가지며, 막횡단 세그먼트의 수 및 N- 및 C-말단의 위치에 기반하여 추가로 하위-분류될 수 있다.

[0308] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR의 막횡단 도메인은 유형 I 단일-통과 막 단백질로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 다중-통과 막 단백질 유래의 막횡단 도메인은 또한 본원에 기재된 CAR에서 사용하기 위해 양립 가능할 수 있다. 다중-통과 막 단백질은 복합(적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7개 이상) 알파 나선 또는 베타 시트 구조를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 다중-통과 막 단백질의 N-말단 및 C-말단은 지질 이중층의 반대 측 상에 존재하며, 예를 들어, 단백질의 N-말단은 지질 이중층의 세포외 측 상에 존재하고 단백질의 C-말단은 세포외 측 상에 존재한다.

[0309] 일부 실시형태에서, CAR의 막횡단 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 입실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD11a, CD18), ICOS(CD278), 4-1BB(CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM(LIGHTR), SLAMF7, Nkp80(KLRF1), CD160, GPC3, IL-2R 베타, IL-2R 감마, IL-7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, PAG/Cbp, Nkp44, Nkp30, Nkp46, NKG2D 및/또는 NKG2C의

막횡단 도메인으로부터 선택되는 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인은 CD8 α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자로부터 유래된다.

[0310] 일부 구체적인 실시형태에서, 막횡단 도메인은 CD8 α로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인은 SEQ ID NO: 103의 아미노산 서열을 포함하는 CD8 α의 막횡단 도메인이다.

[0311] 본원에 기재된 CAR에 사용하기 위한 막횡단 도메인은 또한, 합성, 비-자연 발생 단백질 세그먼트의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인은 합성, 비-자연 발생 알파 나선 또는 베타 시트이다. 일부 실시형태에서, 단백질 세그먼트는 적어도 대략 20개 아미노산, 예를 들어, 적어도 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 이상의 아미노산이다. 합성 막횡단 도메인의 예는 당업계, 예를 들어, 미국 특허 제7,052,906호 및 PCT 공개 WO 2000/032776호에 공지되어 있으며, 이의 관련 개시는 본원에 참조로 포함된다.

[0312] 본원에 제공되는 막횡단 도메인은 막횡단 영역 및 막횡단 도메인의 C-말단 측에 위치한 세포질 영역을 포함할 수 있다. 막횡단 도메인의 세포질 영역은 3개 이상의 아미노산을 포함할 수 있고, 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인이 지질 이중층에서 배향하는 것을 돕는다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 시스테인 잔기는 막횡단 도메인의 막횡단 영역에 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 시스테인 잔기는 막횡단 도메인의 세포질 영역에 존재한다. 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인의 세포질 영역은 양으로 하전된 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인의 세포질 영역은 아미노산 아르기닌, 세린, 및 리신을 포함한다.

[0313] 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인의 막횡단 영역은 소수성 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 CAR의 막횡단 도메인은 인공 소수성 서열을 포함한다. 예를 들어, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(triplet)은 막횡단 도메인의 C 말단에 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 막횡단 영역은 대부분 소수성 아미노산 잔기, 예컨대 알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 또는 발린을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막횡단 영역은 소수성이다. 일부 실시형태에서, 막횡단 영역은 폴리-류신-알라닌 서열을 포함한다. 단백질 또는 단백질 세그먼트의 소수성, 또는 소수성 또는 친수성 특성은 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 Kyte 및 Doolittle 소수성 분석에 의해 평가될 수 있다.

[0314] 5.3.3. 세포내 신호전달 도메인

[0315] 본 개시의 CAR은 세포내 신호전달 도메인(ISD)을 포함한다. 세포내 신호전달 도메인은 CAR을 발현하는 면역 이펙터 세포의 정상 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 특화된 기능을 지칭한다. 예를 들어, T 세포의 이펙터 기능은 세포용해 활성 또는 사이토카인의 분비를 포함하는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "세포질 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 특수 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 보통 전체 세포질 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 체를 사용할 필요는 없다. 세포질 신호전달 도메인의 절두된 부분이 사용되는 경우라면, 이러한 절두된 부분은 이것이 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 온전한 체 대신에 사용될 수 있다. 따라서, 용어 세포질 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포질 신호전달 도메인의 임의의 절두된 부분을 포함하고자 한다.

[0316] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 이펙터 세포의 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 본질적으로 면역 이펙터 세포의 일차 세포내 신호전달 도메인으로 이루어진 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. "일차 세포내 신호전달 도메인"은 면역 이펙터 기능을 유도하기 위해 자극 방식으로 작용하는 세포질 신호전달 서열을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 일차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 알려진 신호전달 모티프를 함유한다. 본원에 사용된 "ITAM"은 일반적으로 많은 면역 세포에서 발현되는 신호전달 분자의 꼬리 부분에 존재하는 보존된 단백질 모티프이다. 당해 모티프는 6 내지 8개의 아미노산으로 분리된 아미노산 서열 YxxL/I의 2개의 반복체를 포함하여, 보존된 모티프 YxxL/Ix(6-8)YxxL/I를 생성할 수 있으며, 여기서 각각의 x는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 신호전달 분자 내의 ITAM은 신호전달 분자의 활성화 이후 ITAM에서 티로신 잔기의 인산화에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 세포 내의 신호 전달에 중요하다. ITAM은 또한 신호전달 경로에 관여된 다른 단백질에 대한 도킹 부위로서 기능할 수 있다. 예시적인 ITAM-함유 일차 세포질 신호전달 서열은 CD3 ζ, FcR 감마(FCERIG), FcR 베타(Fc 엡실론 Rib), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다.

[0317] 일부 실시형태에서, 일차 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ의 세포질 신호전달 도메인으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 일차 세포내 신호전달 도메인

인은 야생형 CD3 ζ 의 세포질 신호전달 도메인이다. 일부 실시형태에서, CD3 ζ 의 일차 세포내 신호전달 도메인은 SEQ ID NO: 105의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 CD3 ζ 의 일차 세포내 신호전달 도메인. 일부 실시형태에서, 일차 세포내 신호전달 도메인은 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 Q65K를 함유하는 CD3 ζ 의 세포질 신호전달 도메인의 기능적 돌연변이체이다.

[0318] 5.3.4. 동시-자극 신호전달 도메인

[0319] 많은 면역 이펙터 세포는 세포 증식, 분화 및 생존을 촉진할 뿐만 아니라 세포의 이펙터 기능을 활성화시키기 위해 항원-특이적 신호의 자극에 더하여 동시-자극을 필요로 한다. 일부 실시형태에서, CAR은 적어도 하나의 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "동시-자극 신호전달 도메인"은 면역 반응, 예컨대, 이펙터 기능을 유도하기 위해 세포 내에서 신호 전달을 매개하는 단백질의 적어도 일부를 지칭한다. 본원에 기재된 키메라 수용체의 동시-자극 신호전달 도메인은 신호를 전달하고 면역 세포, 예컨대, T 세포, NK 세포, 대식구, 호중구 또는 호산구에 의해 매개되는 반응을 조정하는 동시-자극 단백질 유래의 세포질 신호전달 도메인일 수 있다. "동시-자극 신호전달 도메인"은 동시-자극 분자의 세포질 부분일 수 있다. 용어 "동시-자극 분자"는 동시-자극 리간드와 특이적으로 결합하여 면역 세포에 의한 동시-자극 반응, 예컨대, 비제한적으로 증식 및 생존을 매개하는 면역 세포(예컨대, T 세포) 상의 동종 결합 파트너를 지칭한다.

[0320] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 단일의 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개 이상의(예컨대, 약 2, 3 또는 4개 이상 중 임의의 것의) 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 동일한 동시-자극 신호전달 도메인 중 2개 이상을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 상이한 동시-자극 단백질, 예컨대, 본원에 기재된 임의의 2개 이상의 동시-자극 단백질 유래의 2개 이상의 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 일차 세포내 신호전달 도메인(예컨대, CD3 ζ 의 세포질 신호전달 도메인) 및 하나 이상의 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 동시-자극 신호전달 도메인 및 일차 세포내 신호전달 도메인(예컨대, CD3 ζ 의 세포질 신호전달 도메인)은 선택적인 펩티드 링커를 통해 서로 융합된다. 일차 세포내 신호전달 도메인 및 하나 이상의 동시-자극 신호전달 도메인은 임의의 적합한 순서로 배열될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 동시-자극 신호전달 도메인은 막관통 도메인과 일차 세포내 신호전달 도메인(예컨대, CD3 ζ 의 세포질 신호전달 도메인) 사이에 위치한다. 다중 동시-자극 신호전달 도메인은 상가적 또는 상승적 자극 효과를 제공할 수 있다.

[0321] 숙주 세포(예를 들어, 면역 세포)에서의 동시-자극 신호전달 도메인의 활성화는 사이토카인의 생성 및 분비, 식세포 특성, 증식, 분화, 생존 및/또는 세포독성을 증가시키거나 감소시키도록 세포를 유도할 수 있다. 임의의 동시-자극 분자의 동시-자극 신호전달 도메인은 본원에 기재된 CAR에서 사용하기에 양립 가능할 수 있다. 동시-자극 신호전달 도메인의 유형(들)은 인자, 예컨대, 이펙터 분자가 발현될 면역 이펙터 세포의 유형(예를 들어, T 세포, NK 세포, 대식구, 호중구 또는 호산구) 및 원하는 면역 이펙터 기능(예를 들어, ADCC 효과)에 기반하여 선택된다. CAR에서 사용하기 위한 동시-자극 신호전달 도메인의 예는 비제한적으로 B7/CD28 과의 구성원(예를 들어, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, GITR/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC 및 PDCD6); TNF 상과의 구성원(예를 들어 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB 리간드/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 리간드/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 리간드/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, CD40 리간드/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR 리간드/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, 림포톡신-알파/TNF-베타, OX40/TNFRSF4, OX40 리간드/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-알파 및 TNF RII/TNFRSF1B); SLAM 과의 구성원(예를 들어, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6 및 SLAM/CD150); 및 임의의 다른 동시-자극 분자, 예컨대, CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA 부류 I, HLA-DR, Ikaros, 인테그린 알파 4/CD49d, 인테그린 알파 4 베타 1, 인테그린 알파 4 베타 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, 텍틴-1/CLEC7A, DPP4/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1) 및 NKG2C를 포함하는 동시-자극 단백질의 세포질 신호전달 도메인일 수 있다.

[0322] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 동시-자극 신호전달 도메인은 CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, 림프구 기능-연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드(예컨대 CD83 및 MD2)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0323] 일부 실시형태에서, 본 개시의 CAR 내의 세포내 신호전달 도메인은 CD137(즉, 4-1BB)로부터 유래된 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3ζ의 세포질 신호전달 도메인 및 CD137의 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 SEQ ID NO: 104의 아미노산 서열을 포함하는 CD137의 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다.

[0324] 또한 본 개시의 범주 내에는 동시-자극 신호전달 도메인이 면역 세포의 면역 반응을 조절할 수 있도록 본원에 기재된 동시-자극 신호전달 도메인 중 임의의 것의 변이체가 있다. 일부 실시형태에서, 동시-자극 신호전달 도메인은 야생형 대응물과 비교하여 10개 이하(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 8개)의 아미노산 잔기 변이를 포함한다. 하나 이상의 아미노산 변이를 포함하는 이러한 동시-자극 신호전달 도메인은 변이체로서 지칭될 수 있다. 동시-자극 신호전달 도메인의 아미노산 잔기의 돌연변이는 돌연변이를 포함하지 않는 동시-자극 신호전달 도메인에 비해 신호전달 전달의 증가 및 면역 반응의 향상된 자극을 초래할 수 있다. 동시-자극 신호전달 도메인의 아미노산 잔기의 돌연변이는 돌연변이를 포함하지 않는 동시-자극 신호전달 도메인에 비해 신호전달 전달의 감소 및 면역 반응의 감소된 자극을 초래할 수 있다.

[0325] 5.3.5 힌지 영역

[0326] 본 개시의 CAR은 세포외 항원 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 위치한 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 힌지 도메인은 일반적으로 단백질의 2개의 도메인 사이에서 발견되는 아미노산 세그먼트이며, 단백질의 유연성 및 도메인 중 하나 또는 둘 모두의 서로에 대한 이동을 허용할 수 있다. 이러한 이펙터 분자의 막횡단 도메인에 대한 세포외 항원 결합 도메인의 이동 및 유연성을 제공하는 임의의 아미노산 서열이 사용될 수 있다.

[0327] 힌지 도메인은 약 10 내지 100개의 아미노산, 예를 들어, 약 15 내지 75개의 아미노산, 20 내지 50개의 아미노산 또는 30 내지 60개의 아미노산 중 어느 하나를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 적어도 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 또는 75개 중 어느 하나의 아미노산 길이일 수 있다.

[0328] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 자연 발생 단백질의 힌지 도메인이다. 힌지 도메인을 포함하는 것으로 당업계에 알려진 임의의 단백질의 힌지 도메인은 본원에 기재된 키메라 수용체에 사용하기에 양립 가능하다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 자연 발생 단백질의 힌지 도메인의 적어도 일부이고 키메라 수용체에 유연성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8α로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8α의 힌지 도메인의 일부, 예를 들어, CD8α의 힌지 도메인의 적어도 15개(예를 들어, 20, 25, 30, 35 또는 40개)의 연속 아미노산을 함유하는 단편이다. 일부 실시형태에서, CD8α의 힌지 도메인은 SEQ ID NO: 102의 아미노산 서열을 포함한다.

[0329] 항체, 예컨대, IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD 항체의 힌지 도메인은 또한 본원에 기재된 pH-의존적 키메라 수용체 시스템에서 사용하기에 양립 가능하다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 항체의 불변 도메인 CH1 및 CH2를 연결하는 힌지 도메인이다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 항체의 것이고 항체의 힌지 도메인 및 항체의 하나 이상의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인 및 항체의 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인 및 항체의 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체이다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 IgG1 항체의 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 IgG1 항체의 힌지 영역 및 CH3 불변 영역을 포함한다.

[0330] 비-자연 발생 펩티드는 또한 본원에 기재된 키메라 수용체에 대한 힌지 도메인으로 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 수용체의 세포외 리간드-결합 도메인의 C-말단과 막횡단 도메인의 N-말단 사이의 힌지 도메인은 펩티드 링커, 예컨대, (GxS)_n 링커이며, 여기서 x 및 n은 독립적으로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 이상을 포함하는 3 내지 12의 정수일 수 있다.

[0331] 5.3.6. 신호 펩티드

[0332] 본 개시의 CAR은 폴리펩티드의 N-말단에 신호 펩티드(신호 서열로도 알려짐)를 포함할 수 있다. 일반적으로, 신호 펩티드는 폴리펩티드를 세포에서 원하는 부위에 표적화하는 펩티드 서열이다. 일부 실시형태에서, 신호 펩티드는 이펙터 분자를 세포의 분비 경로에 표적화하고 이펙터 분자를 지질 이중층으로 통합 및 고정되게 할 것이다. 본원에 기재된 CAR에 사용하기에 양립 가능한 자연 발생 단백질의 신호 서열, 또는 합성, 비-자연 발생 신호 서열을 포함하는 신호 펩티드는 당업자에게 명백할 것이다. 일부 실시형태에서, 신호 펩티드는 CD8α, GM-

CSF 수용체 α 및 IgG1 중쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 분자로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 신호 펩티드는 CD8 α 로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, CD8 α 의 신호 펩티드는 SEQ ID NO: 101의 아미노산 서열을 포함한다.

[0333] **5.3.7. CAR 및 추가의 도메인(들)을 포함하는 폴리펩티드**

[0334] 하기 섹션 6에 나타난 바와 같이, CAR, 및 외인적으로 도입된 p40 및 CCL-19를 발현하는 조작된 면역 이펙터 세포는 놀랍게도 뛰어난 효과를 야기하였다. 예를 들어, p40 및 CCL-19 강화된 CAR-T 세포는 더 낮은 용량에서 상응하는 네이티브 CAR-T 세포보다 더 높은 효능을 나타내었다.

[0335] 따라서, 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 CAR, 및 IL-12의 p40 서브유닛 및 CCL-19 중 적어도 하나를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 CAR 및 p40을 포함하는 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 CAR 및 CCL-19를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 다른 실시형태에서, 본원에 제공되는 CAR, 및 p40 및 CCL-19 둘 모두를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, p40은 SEQ ID NO: 135의 아미노산 서열을 포함하는 인간 p40이고/이거나 CCL-19는 SEQ ID NO: 136의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CCL-19이다.

[0336] 본 발명의 폴리펩티드에서, CAR, p40 및/또는 CCL-19는 임의의 순서로 배열될 수 있다. 예를 들어, CAR, p40 및 CCL-19가 전부 폴리펩티드에 존재하는 경우에, 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 폴리펩티드는 N 말단에서 C 말단으로 CAR, p40 및 CCL-19를 포함하며; 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 폴리펩티드는 N 말단에서 C 말단으로 CAR, CCL-19 및 p40을 포함하며; 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 폴리펩티드는 N 말단에서 C 말단으로 CCL-19, p40 및 CAR을 포함하며; 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 폴리펩티드는 N 말단에서 C 말단으로 p40, CCL-19 및 CAR을 포함하며; 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 폴리펩티드는 N 말단에서 C 말단으로 CCL-19, CAR 및 p40을 포함한다.

[0337] 본원에 제공되는 다양한 폴리펩티드의 일부 실시형태에서, CAR, p40 및/또는 CCL-19는 펩티드 링커를 통해 서로 연결된다. 일부 실시형태에서, 펩티드 링커는 자가-절단 펩티드, 예컨대 2A 자가-절단 펩티드이며, CAR, p40 및/또는 CCL-19가 세포에서의 절단 시에 개별 폴리펩티드가 되게 한다. 2A 펩티드의 구성원은 이들이 처음 기재된 바이러스 명칭을 따서 명명된다. 예를 들어, 처음 기재된 2A 펩티드인 F2A는 구제역 바이러스로부터 유래된다. 18 내지 22개 아미노산 길이의 자가-절단 2A 펩티드는 프롤린과 글리신 잔기 사이의 '리보솜 스킵핑'을 매개하고, 다운스트림 번역에 영향을 미치지 않으면서 펩티드 결합 형성을 저해한다. 이들 펩티드는 다수의 단백질을 폴리단백질로서 인코딩되게 하고, 이는 번역 시에 성분 단백질로 분리된다. 자가-절단 펩티드는, 피코나비리드 바이러스 과의 구성원, 예를 들어, 아프토바이러스, 예컨대 구제역 바이러스(FMDV), 말과 A형 비염 바이러스(ERAV), 토세아 아시그나(thosea asigna) 바이러스(TaV) 및 돼지과 테스코바이러스-1(PTV-1)(문헌[Donnelly et al., J. Gen. Virol., 82: 1027-101 (2001)]; 문헌[Ryan et al., J. Gen. Virol., 72: 2727-2732 (2001)] 참조) 및 카디오바이러스, 예컨대, 테일로바이러스(예를 들어, 테일러 췌과 뇌척수염) 및 뇌심근염 바이러스에서 관찰된다. FMDV, ERAV, PTV-1 및 TaV로부터 유래된 2A 펩티드는 때때로 각각 "F2A", "E2A", "P2A" 및 "T2A"로 지칭되며, 예를 들어, 문헌[Donnelly et al., J. Gen. Virol., 78: 13-21 (1997)]; 문헌[Ryan and Drew, EMBO J., 13: 928-933 (1994)]; 문헌[Szymczak et al., Nature Biotech., 5: 589-594 (2004)]; 문헌[Hasegawa et al., Stem Cells, 25(7): 1707-12 (2007)]에 기재된 바와 같이 본 개시에 포함된다. 또 다른 실시형태에서, 인테인 매개된 단백질 스플라이싱 시스템이 예를 들어, 문헌[Shah and Muir, Chem Sci., 5(1): 446-461 (2014)] 및 문헌[Topilina and Mills, Mobile DNA, 5 (5) (2014)]에 기재된 바와 같이 본원에서 사용된다. 당업계에 공지된 다른 방법도 또한 본 구조물에서 사용될 수 있다.

[0338] 일부 실시형태에서, 2A 자가-절단 펩티드는 F2A, E2A, P2A, T2A 또는 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 자가-절단 펩티드는 SEQ ID NO: 138의 아미노산 서열을 포함하는 2A 자가-절단 펩티드 P2A 단편이다. 구체적인 실시형태에서, 자가-절단 펩티드는 SEQ ID NO: 139의 아미노산 서열을 포함하는 T2A 단편이다.

[0339] 일부 구체적인 실시형태에서, p40 및 CCL-19는 제1 자가-절단 펩티드에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 자가-절단 펩티드는 SEQ ID NO: 139의 아미노산 서열을 포함하는 19 자가-절단 펩티드 T2A 단편이다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 IL-12의 p40 서브유닛 및 CCL-19를 포함하는 도메인은 SEQ ID NO: 134의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 제2 자가-절단 펩티드에 의해 도메인에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제2 자가-절단 펩티드는 SEQ ID NO: 138의 아미노산 서열을 포함하는 2A 자가-절단 펩티드 P2A 단편이다.

구체적인 실시형태에서, 본원에 제공되는 CAR은 SEQ ID NO: 133의 아미노산 서열을 포함한다.

[0340] 또 다른 양태에서, 본원에 제공되는 CAR, IL-12의 p40 서브유닛 및/또는 CCL-19를 포함하는 상기 기재된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산이 본원에 제공된다.

[0341] 5.3.8. 예시적인 CAR

[0342] 예시적인 CAR은 하기 섹션 6에 나타난 바와 같이 생성된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 91의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 92의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 93의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 94의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 95의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 96의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 97의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 98의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 99의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 100의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 107의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 108의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 109의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 110의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 111의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 112의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 113의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 114의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 116의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 130의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 133의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CAR이 본원에 제공된다.

[0343] 특정 실시형태에서, 본원에 제공되는 CAR은 하기 섹션 6에 예시된 CAR 중 어느 하나와 비교하여 소정의 동일성 퍼센트를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 91의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 92의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 93의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 94의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 95의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 96의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 97의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 98의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 99의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드

를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 100의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 107의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 108의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 109의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 110의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 111의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 112의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 113의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 114의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 116의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 130의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, SEQ ID NO: 133의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 GPC3 CAR이 본원에 제공된다.

[0344] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 GPC3 CAR 중 임의의 것을 인코딩하는 단리된 핵산이 본원에 제공된다. 핵산 서열 및 벡터에 관한 더욱 상세한 설명은 하기에 제공된다.

[0345] 5.4. 조작된 면역 이펙터 세포

[0346] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 CAR 중 어느 하나를 포함하는 숙주 세포(예컨대 면역 이펙터 세포)가 본원에 제공된다.

[0347] 따라서, 일부 실시형태에서, (a) 하나 이상의 항-GPC3 항체(들)를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인; (b) 막형 단 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 CAR을 포함하는 조작된 면역 이펙터 세포(예컨대 T 세포)가 본원에 제공되며, 항-GPC3 항체는 예를 들어, 표 3 및 표 4의 하나 이상의 CDR을 포함하는 것들을 포함하는 상기 섹션 5.2에 기재된 바와 같은 항-GPC3 항체이며, 더욱 구체적으로, 일부 실시형태에서, 항-GPC3 항체(예를 들어, scFv)는 (i) SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (ii) SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 52의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (iii) SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함

하는 LCDR1, SEQ ID NO: 43의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 53의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (iv) SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (v) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (vi) SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 46의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 56의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (vii) SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 57의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (viii) SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 48의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (ix) SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 59의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (x) SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 50의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 60의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 이펙터 세포에서 발현되는 CAR 내의 항체(예를 들어, scFv)는 SEQ ID NO: 61 내지 70 및 117 내지 122의 군으로부터 선택되는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71 내지 80 및 123 내지 125의 군으로부터 선택되는 VL 도메인을 포함한다. 더욱 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 면역 이펙터 세포의 CAR 내의 항체는 SEQ ID NO: 81 내지 90, 128 및 129 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv이다. 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인은 CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 이펙터 세포(예컨대 T 세포)의 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 일차 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 동시-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 동시-자극 신호전달 도메인은 CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83의 리간드 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 동시-자극 분자로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, CAR은 세포외 항원 결합 도메인의 C-말단과 막횡단 도메인의 N-말단 사이에 위치한 힌지 도메인(예컨대 CD8 α 힌지 도메인)을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 폴리펩티드의 N-말단에 위치한 신호 펩티드(예컨대 CD8 α 신호 펩티드)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단으로 하기를 포함한다: CD8 α 신호 펩티드, 세포외 항원 결합 도메인, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD137로부터 유래된 동시-자극 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 로부터 유래된 일차 세포내 신호전달 도메인.

[0348] 다른 구체적인 실시형태에서, SEQ ID NO: 91 내지 100, 107 내지 116 및 130 내지 131의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 91 내지 100, 107 내지 116 및 130 내지 131의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 CAR을 포함하는 조작된 면역 이펙터 세포(예컨대 T 세포)가 본원에 제공된다.

[0349] 일부 실시형태에서, 조작된 면역 이펙터 세포는 T 세포, NK 세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 조혈 줄기 세포, 만능 줄기 세포 또는 배아 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 이펙터 세포는 자가이다. 일부 실시형태에서, 조작된 면역 이펙터 세포는 동종이계이다.

[0350] 또한, 둘 이상의 상이한 CAR을 포함하는(또는 발현하는) 조작된 면역 이펙터 세포가 제공된다. 임의의 둘 이상의 본원에 기재된 CAR은 조합하여 발현될 수 있다. CAR은 상이한 항원을 표적화함으로써, 상승적 또는 상가적 효과를 제공할 수 있다. 둘 이상의 CAR은 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 인코딩될 수 있다.

- [0351] 조작된 면역 이펙터 세포는 하나 이상의 치료적 단백질 및/또는 면역조절제, 예컨대 면역 체크포인트 저해제를 추가로 발현할 수 있다. 예를 들어, 국제 특허 출원 제PCT/CN2016/073489호 및 제PCT/CN2016/087855호를 참조하며, 이는 이들의 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0352] **5.4.1. 벡터**
- [0353] 본 개시는 본원에 기재된 CAR 중 어느 하나를 클로닝하고 발현하기 위한 벡터를 제공한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 진핵 세포, 예컨대 포유동물 세포에서의 복제 및 통합에 적합하다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터의 예에는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 백시니아 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터 및 이의 유도체가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 바이러스 벡터 기술은 당업계에 널리 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)] 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다.
- [0354] 다수의 바이러스 기반의 시스템이 포유동물 세포 내로의 유전자 전달을 위하여 개발된 바 있다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 이중 핵산은 벡터 내로 삽입되고, 당업계에 공지된 기법을 사용하여 레트로바이러스 입자 내에 패키징될 수 있다. 이어서, 재조합 바이러스를 단리하고, 시험관내 또는 생체외에서 조작된 포유동물 세포에 전달할 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다. 일부 실시형태에서, 자가-비활성화 렌티바이러스 벡터가 사용된다. 예를 들어, 면역조절제(예컨대, 면역 체크포인트 저해제) 코딩 서열을 보유하는 자가-비활성화 렌티바이러스 벡터 및/또는 키메라 항원 수용체를 보유하는 자가-비활성화 렌티바이러스 벡터는 당업계에 공지되어 있는 프로토콜을 사용하여 패키징될 수 있다. 생성된 렌티바이러스 벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 포유동물 세포(예컨대 일차 인간 T 세포)를 형질도입하기 위해 사용될 수 있다. 레트로바이러스, 예컨대 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 이들이 전이유전자의 장기간의 안정적인 통합 및 자손 세포에서의 이의 증식을 가능하게 하기 때문에, 장기간 유전자 전달을 달성하기에 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 또한 면역원성이 낮으며, 비-증식 세포를 형질도입할 수 있다.
- [0355] 일부 실시형태에서, 벡터는 본원에 기재된 CAR을 인코딩하는 핵산 중 어느 하나를 포함한다. 핵산은 예를 들어, 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선택 가능한 마커의 이용을 포함하는 당업계의 임의의 공지된 분자 클로닝 방법을 사용하여 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 포유동물 세포에서의 유전자 발현을 위해 다양한 프로모터가 연구되었으며, 당업계에 공지된 임의의 프로모터가 본 개시에 사용될 수 있다. 프로모터는 크게 구성성 프로모터 또는 조절된 프로모터, 예컨대 유도성 프로모터로 분류될 수 있다.
- [0356] 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 핵산은 구성성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 구성성 프로모터는 이중 유전자(전이유전자로도 지칭됨)가 숙주 세포에서 구성적으로 발현되게 한다. 본원에서 고려되는 예시적인 구성성 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 인간 신장 인자-1 알파(hEF1 α), 유비퀴틴 C 프로모터(UbiC), 포스포글리세로키나제 프로모터(PGK), 유인원 바이러스 40 초기 프로모터(SV40) 및 CMV 초기 인핸서(CAGG)와 커플링된 닭 β -액틴 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 전이유전자 발현의 유도에 대한 이러한 구성성 프로모터의 효율은 수많은 연구에서 널리 비교되어 왔다. 예를 들어, Michael C. Milone 등은 일차 인간 T 세포에서 키메라 항원 수용체 발현을 유도하기 위한 CMV, hEF1 α , UbiC 및 PGK의 효율을 비교하였으며, hEF1 α 프로모터가 가장 높은 수준의 전이유전자 발현을 유도할 뿐만 아니라, CD4 및 CD8 인간 T 세포에서 최적으로 유지되었으므로 결론지었다(문헌[Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009)]). 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 핵산은 hEF1 α 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0357] 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 핵산은 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 유도성 프로모터는 조절된 프로모터의 범주에 속한다. 유도성 프로모터는 하나 이상의 조건, 예컨대 물리적 조건, 조작된 면역 이펙터 세포의 미세환경 또는 조작된 면역 이펙터 세포의 생리학적 상태, 유도제(즉, 유도 물질) 또는 이의 조합에 의해 유도될 수 있다.
- [0358] 일부 실시형태에서, 유도 조건은 약제학적 조성물을 제공받는 조작된 포유동물 세포 및/또는 대상체에서 내인성 유전자의 발현을 유도하지 않는다. 일부 실시형태에서, 유도 조건은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 유도제, 조사(예컨대 이온화 방사선, 광), 온도(예컨대 열), 산화환원 상태, 종양 환경 및 조작된 포유동물 세포

의 활성화 상태.

- [0359] 일부 실시형태에서, 벡터는 또한, 렌티바이러스 벡터를 통해 트랜스펙션된 숙주 세포의 집단으로부터 CAR을 발현하는 세포를 선택하기 위하여 선택 가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자를 함유한다. 선택 가능한 마커 및 리포터 유전자 둘 모두는 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 하도록 적절한 조절 서열이 측접할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열 및 핵산 서열의 발현의 조절에 유용한 프로모터를 함유할 수 있다.
- [0360] 일부 실시형태에서, 벡터는 CAR을 인코딩하는 하나 초과와 핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 제1 CAR을 인코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 CAR을 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 핵산을 포함하며, 제1 핵산은 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 제3 핵산 서열을 통해 제2 핵산에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, 자가-절단 펩티드는 T2A, P2A 및 F2A로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0361] **5.4.2. 면역 이펙터 세포**
- [0362] "면역 이펙터 세포"는 면역 이펙터 기능을 수행할 수 있는 면역 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 이펙터 세포는 적어도 Fc γ RIII을 발현하며, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 면역 이펙터 세포의 예는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 자연 살해(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포, 호중구 및 호산구를 포함한다.
- [0363] 일부 실시형태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8- 또는 이의 조합이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 CAR의 발현 및 표적 세포, 예컨대 GPC3+ 종양 세포로의 결합 시에 IL-2, TFN 및/또는 TNF를 생성한다. 일부 실시형태에서, CD8+ T 세포는 CAR의 발현 및 표적 세포로의 결합 시에 항원-특이적 표적 세포를 용해시킨다.
- [0364] 일부 실시형태에서, 면역 이펙터 세포는 NK 세포이다. 다른 실시형태에서, 면역 이펙터 세포는 확립된 세포주, 예를 들어, NK-92 세포일 수 있다.
- [0365] 일부 실시형태에서, 면역 이펙터 세포는 줄기 세포, 예컨대 조혈 줄기 세포, 만능 줄기 세포, iPS 또는 배아 줄기 세포로부터 분화된다. 조작된 면역 이펙터 세포는 CAR을 면역 이펙터 세포, 예컨대 T 세포 내로 도입함으로써 제조된다. 일부 실시형태에서, CAR은 단리된 핵산 중 어느 하나 또는 상기 기재된 벡터 중 어느 하나를 트랜스펙션시킴으로써 면역 이펙터 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, CAR은 세포가 미세유체 시스템, 예컨대 CELL SQUEEZE[®]를 통과하는 동안 단백질을 세포막 내로 삽입함으로써 면역 이펙터 세포에 도입된다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제20140287509호 참조).
- [0366] 포유동물 세포 내로의 벡터 또는 단리된 핵산의 도입 방법은 당업계에 공지되어 있다. 기재된 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법에 의해 면역 이펙터 세포 내로 전달될 수 있다.
- [0367] 벡터를 면역 이펙터 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생성하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.* (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 전기천공에 의해 세포 내로 도입된다.
- [0368] 벡터를 면역 이펙터 세포 내로 도입하는 생물학적 방법에는 DNA 벡터 및 RNA 벡터의 사용이 포함된다. 바이러스 벡터는 포유동물, 예를 들어, 인간 세포 내로 유전자를 삽입하는 가장 널리 사용되는 방법이 되었다.
- [0369] 벡터를 면역 이펙터 세포 내로 도입하는 화학적 수단은 콜로이드성 분산 시스템, 예컨대, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내에서 전달 비히클로 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜(예를 들어, 인공 막 소포)이다.
- [0370] 일부 실시형태에서, 본원에서 기재된 CAR 중 어느 하나를 인코딩하는 RNA 분자는 통상적인 방법(예를 들어, 시험관내 전사)에 의해 제조된 다음, 공지된 방법, 예컨대 mRNA 전기천공을 통하여 면역 이펙터 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Rabinovich *et al.*, Human Gene Therapy 17:1027-1035 (2006)]을 참조한다.
- [0371] 일부 실시형태에서, 형질도입된 또는 트랜스펙션된 면역 이펙터 세포는 벡터 또는 단리된 핵산의 도입 후에 생체외에서 증식된다. 일부 실시형태에서, 형질도입되거나 트랜스펙션된 면역 이펙터 세포는 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 12일 또는 14일 중 어느 하나 동안 증량되도록 배양된다. 일부 실시형태에서, 형질도입되거나 트랜스펙션된 면역 이펙터 세포는 조작된 포유동물 세포를 선택하기 위하여 추가로 평가되거나

스크리닝된다.

[0372] 리포터 유전자는 잠재적으로 트랜스펙션된 세포를 확인하고, 조절 서열의 기능성을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수여자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나, 발현되지 않는 유전자이며, 폴리펩티드의 발현이 몇몇의 용이하게 검출 가능한 특성, 예를 들어 효소 활성으로 나타나는 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수여자 세포 내로 도입된 후 적절한 시간에 검정된다. 적절한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Ui-Tei *et al.* FEBS Letters 479: 79-82 (2000)]). 적절한 발현 시스템은 널리 공지되어 있고, 공지된 기법을 사용하여 제조되거나 상업적으로 취득될 수 있다.

[0373] 조작된 면역 이펙터 세포 내의 CAR을 인코딩하는 핵산의 존재를 확인하는 다른 방법에는 예를 들어, 당업자에게 널리 공지된 분자 생물학적 검정, 예컨대 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR; 생화학적 검정, 예컨대 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 예를 들어, 면역학적 방법(예컨대 ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 검출하는 것이 포함된다.

[0374] 5.4.3. T 세포의 공급원

[0375] 일부 실시형태에서, T 세포의 증대 및 유전학적 변형 이전에, T 세포의 공급원은 대상체로부터 취득된다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출물, 비장 조직, 및 종양을 포함한 다수의 공급원으로부터 취득될 수 있다. 일부 실시형태에서, 당업계에서 이용 가능한 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포는 당업자에게 알려진 임의의 수의 기법, 예컨대 Ficoll™ 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 취득될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포가 성분채집술에 의해 취득된다. 성분채집술 생성물은 전형적으로, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함하는 림프구를 함유한다. 일부 실시형태에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고, 후속 처리 단계를 위하여 적절한 완충제 또는 배지 중에 세포를 배치할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포를 인간염 완충 염수(PBS)로 세척한다. 일부 실시형태에서, 세척 용액에는 칼슘이 결여되며, 마그네슘이 결여될 수 있거나 전부는 아니지만 많은 2가 양이온이 결여될 수 있다. 칼슘의 부재 하에 초기 활성화 단계는 확대된 활성화를 야기할 수 있다. 당업자는 세척 단계가 당업계에 공지된 방법에 의해, 예컨대 제조처의 설명서에 따라 반자동화 "관류형" 원심분리기(예를 들어, Cobe 2991 세포 처리기, Baxter CytoMate, 또는 Haemonetics Cell Saver 5)를 사용함으로써 달성될 수 있음을 용이하게 인식할 것이다. 세척 후에, 세포는 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대, 예를 들어, Ca^{2+} -무함유, Mg^{2+} -무함유 PBS, PlasmaLyte A, 또는 완충제가 존재하거나 존재하지 않는 다른 염수 용액 중에 재현탁화될 수 있다. 대안적으로, 성분채집술 시료의 바람직하지 않은 구성성분을 제거하고, 세포를 배양 배지 중에 직접적으로 재현탁화시킬 수 있다.

[0376] 일부 실시형태에서, T 세포는, 예를 들어 PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심분리 세정(counterflow centrifugal elutriation)에 의해, 적혈구를 용해시키고 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 분리된다. T 세포의 특정 하위집단, 예컨대 CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및 CD45RO+ T 세포가 양성 또는 음성 선택 기법에 의해 추가로 분리될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택에 충분한 기간 동안 항-CD3/항-CD28(즉, 3x28)-컨쥬게이트된 비드, 예컨대 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와의 인큐베이션에 의해 분리된다. 일부 실시형태에서, 기간은 약 30분이다. 추가의 실시형태에서, 기간은 30분 내지 36시간 이상 및 이들 사이의 모든 정수 값 범위이다. 추가의 실시형태에서, 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간이다. 일부 실시형태에서, 기간은 10 내지 24시간이다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 기간은 24시간이다. 백혈병을 가진 환자로부터의 T 세포의 분리를 위하여, 더 긴 인큐베이션 시간, 예컨대 24시간의 사용은 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 다른 세포 유형에 비하여 T 세포가 적게 존재하는 임의의 상황에서, 예컨대 종양 조직으로부터 또는 면역-손상된 개체로부터 종양 침윤 림프구(TIL)를 분리하는 경우에 T 세포를 분리하는 데 더 긴 인큐베이션 시간이 사용될 수 있다. 또한, 더 긴 인큐베이션 시간의 사용은 CD8+ T 세포의 포획의 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하게 하는 시간을 단순히 단축 또는 연장하고/하거나, 비드 대 T 세포의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써, T 세포의 하위집단이 배양 개시 시점에서 또는 공정 동안의 다른 시점에서 우선적으로 선택되거나 선택에서 제외될 수 있다. 추가적으로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써, T 세포의 하위집단이 배양 개시 시점에서 또는 다른 원하는 시점에서 우선적으로 선택되거나 선택에서 제외

될 수 있다. 당업자는 다수의 라운드의 선택이 또한 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 일부 실시형태에서, 선택 절차를 수행하고, 활성화 및 증대 공정에서 "선택되지 않은" 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "선택되지 않은" 세포는 또한 추가의 선택 라운드를 거칠 수 있다.

[0377] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 농축은 음성 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 유도된 항체의 조합으로 달성될 수 있다. 한 가지 방법은 음성 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 유도된 모노클로날 항체의 카테일을 사용하는 음성 자성 면역부착 또는 유세포측정을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 농축하기 위하여, 모노클로날 항체 카테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 전형적으로 CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺, 및 FoxP3⁺를 발현하는 조절 T 세포를 농축하거나 양성 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 특정 실시형태에서, T 조절 세포는 항-CD25 컨주게이트된 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다.

[0378] 양성 또는 음성 선택에 의한 원하는 세포 집단의 단리를 위하여, 세포의 농도 및 표면(예를 들어, 비드와 같은 입자)이 달라질 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포와 비드의 최대의 접촉을 보장하기 위하여, 비드와 세포가 함께 혼합된 부피를 유의하게 감소시키는(즉, 세포 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 20억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 일 실시형태에서, 10억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 실시형태에서, 1억 개의 세포/ml 초과가 사용된다. 추가의 실시형태에서, 1000만, 1500만, 2000만, 2500만, 3000만, 3500만, 4000만, 4500만, 또는 5000만 개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 7500만, 8000만, 8500만, 9000만, 9500만, 또는 1억 개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가의 실시형태에서, 1억 2500만 또는 1억 5000만 개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도를 사용하면, 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 증대를 초래할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 관심 표적 항원, 예컨대 CD28-음성 T 세포를 약하게 발현할 수 있는 세포, 또는 많은 종양 세포가 존재하는 시료(즉, 혈액, 종양 조직 등)로부터의 세포의 더 효율적인 포획을 가능하게 할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고, 수득하는 것이 바람직할 것이다. 일부 실시형태에서, 높은 세포 농도의 사용은, 통상 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8⁺ T 세포의 더욱 효율적인 선택을 가능하게 한다.

[0379] 일부 실시형태에서, 더 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포와 표면(예를 들어, 입자, 예를 들어, 비드)의 혼합물을 유의미하게 희석시킴으로써, 입자와 세포 간의 상호작용이 최소화된다. 이는 입자에 결합되는 대량의 원하는 항원을 발현하는 세포를 선택한다. 예를 들어, CD4⁺ T 세포는 높은 농도에서 CD8⁺ T 세포보다 더 높은 수준의 CD28을 발현시키고, CD8⁺ T 세포보다 더욱 효율적으로 포획된다. 일부 실시형태에서, 사용된 세포의 농도는 5×10^6 개/ml이다. 일부 실시형태에서, 사용된 농도는 약 1×10^5 개/ml 내지 1×10^6 개/ml, 및 이들 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.

[0380] 일부 실시형태에서, 세포는 2 내지 10°C에서, 또는 실온에서 다양한 속도로 다양한 시간 동안 회전기 상에서 인큐베이션될 수 있다.

[0381] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후에 동결될 수 있다. 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 동결 및 후속 해동 단계는 과립구 및 어느 정도의 단핵구를 세포 집단에서 제거함으로써 더욱 균일한 생성물을 제공할 수 있다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후에, 세포는 동결 용액에 현탁화될 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터가 당업계에 공지되어 있고, 이러한 문맥에서 유용할 것이지만, 하나의 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유한 PBS, 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% Plasmalyte-A, 31.25% 텍스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO를 함유한 배양 배지 또는 예를 들어, Hespan 및 PlasmaLyte A를 함유한 다른 적합한 세포 동결 배지의 이용을 포함한다. 이어서, 세포를 -80°C까지 분당 1° 속도로 동결시키고, 액체 질소 저장 탱크의 증기상에서 저장한다. -20°C에서 또는 액체 질소에서 비제어되어 즉시 동결시키는 것뿐만 아니라 제어된 동결의 다른 방법이 이용될 수 있다.

[0382] 일부 실시형태에서, 동결보존된 세포를 본원에 기재된 바와 같이 해동하고 세척하며, 활성화 이전에 실온에서 1 시간 동안 휴지되게 한다.

[0383] 또한, 본원에 기재된 증대된 세포가 필요할 때 이전의 소정의 기간에서의 대상체로부터 혈액 시료 또는 성분채집술 생성물의 수집이 본 개시에서 고려된다. 이와 같이, 증대된 세포의 공급원은 필요한 임의의 시점에 수집될 수 있으며, 원하는 세포, 예를 들어, T 세포는 본원에 기재된 것과 같은 T 세포 요법으로부터 유익할 임의의 수의 질병 또는 질환을 위하여 T 세포 요법에서의 후속 사용을 위해 단리되고, 동결될 수 있다. 일 실시형태에서, 혈액 시료 또는 성분채집술은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취된다. 특정 실시형태에서, 혈액 시료 또는

성분채집술은 질병이 발병할 위험이 있지만, 아직 질병이 발병하지 않은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취되며, 관심 세포는 후속 사용을 위해 단리되고 동결된다. 특정 실시형태에서, T 세포는 증대되고, 동결되고, 나중에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 시료는 본원에 기재된 특정 질병의 진단 직후 그러나 임의의 치료 전에 환자로부터 수집된다. 추가의 실시형태에서, 세포는 작용제, 예컨대 나탈리주맙, 에팔리주맙, 항바이러스제, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대, 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트, 및 FK506, 항체 또는 다른 면역억제제, 예컨대, CAMPATH, 항-CD3 항체, 시톡산, 플루다라빈, 사이클로스포린, FK506, 파라마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 및 조사의 치료 포함하지만, 이로 제한되지 않는 임의의 수의 관련 치료 방식 이전에 대상체로부터 성분채집술 또는 혈액 시료로부터 단리된다. 이들 약물은 칼슘 의존적 포스포타제 칼시뉴린을 저해하거나(사이클로스포린 및 FK506), 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 저해한다(라파마이신)(문헌[Liu et al., Cell 66:807-815 (1991)]; 문헌[Henderson et al., Immun 73:316-321 (1991)]; 문헌[Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773 (1993)]). 추가의 실시형태에서, 세포는 환자를 위해 단리되고, 골수 또는 줄기 세포 이식, 화학요법제, 예컨대 플루다라빈, 외부-빔 방사선 요법(XRT), 사이클로포스파미드 또는 항체, 예컨대 OKT3 또는 CAMPATH 중 어느 하나를 사용하는 T 세포 제거 요법(ablative therapy)과 조합하여(예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 나중에 사용하기 위해 동결된다.

[0384] 일부 실시형태에서, T 세포는 치료 직후에 환자로부터 수득된다. 이와 관련하여, 특정 암 치료, 특히, 면역계를 손상시키는 약물로의 치료 후, 환자가 일반적으로 치료로부터 회복될 때 소정 기간 동안 치료 직후에, 수득된 T 세포의 질은 생체외에서 증대하는 이들의 능력이 최적이거나 개선될 수 있다는 것이 관찰되었다. 마찬가지로, 본원에 기재된 방법을 이용한 생체의 조작 이후, 이들 세포는 향상된 생착 및 생체내 증대를 위해 바람직한 상태에 있을 수 있다. 이에 따라, 본 개시의 맥락 내에, 이의 회복 단계 동안에 T 세포, 수지상 세포, 또는 조혈 계통의 다른 세포를 포함하는 혈액 세포를 수집하는 것이 고려된다. 또한, 특정 실시형태에서, 동원(예를 들어, GM-CSF로의 동원) 및 컨디셔닝 요법은 특히, 치료 후 규정된 시간 윈도우 동안 특정 세포 유형의 재집단화, 재순환, 재생, 및/또는 증대가 유리한 대상체의 상태를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형은 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.

[0385] 5.4.4. T 세포의 활성화 및 증대

[0386] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 CAR을 사용한 T 세포의 유전학적 변형 이전에 또는 그 이후에, T 세포는 일반적으로 예를 들어, 미국 특허 제6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 제6,867,041호; 및 미국 특허 출원 공개 제20060121005호에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 활성화되고 증대될 수 있다.

[0387] 일반적으로, T 세포는 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 T 세포 표면 상의 동시-자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 증대될 수 있다. 특히, T 세포 집단은 예컨대, 표면 상에 고정된 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항-CD2 항체와의 접촉, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화제(예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 본원에 기재된 바와 같이 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자의 동시-자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포의 집단은 T 세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건 하에서 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 사용될 수 있다. 항-CD3 항체의 예는 UCHT1, OKT3, HIT3a(미국 샌디에고 소재의 바이오레전드(BioLegend))를 포함하며, 당업계에 흔히 알려져 있는 다른 방법과 같이 사용될 수 있다(문헌[Graves J, et al., J.Immunol. 146:2102 (1991)]; 문헌[Li B, et al., Immunology 116:487 (2005)]; 문헌[Rivollier A, et al., Blood 104:4029 (2004)]). 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28(프랑스 브장송 소재의 디아클론(Diaclone))을 포함하며, 당업계에 흔히 알려져 있는 다른 방법과 같이 사용될 수 있다(문헌[Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977 (1998)]; 문헌[Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328 (1999)]; 문헌[Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63 (1999)]).

[0388] 일부 실시형태에서, T 세포에 대한 일차 자극 신호 및 동시-자극 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각각의 신호를 제공하는 작용제는 용액 중에 있거나 표면에 커플링될 수 있다. 표면에 커플링되는 경우, 작용제는 동일한 표면(즉, "시스" 형성) 또는 개별 표면(즉, "트랜스" 형성)에 커플링될 수 있다. 대안적으로, 하나의 작용제는 표면 및 용액 중 다른 작용제에 커플링될 수 있다. 일 실시형태에서, 동시-자극 신호를 제공하는 작용제는 세포 표면에 결합되고, 일차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 용액 중에 있거나 표면에 커플링된다. 특정 실시형태에서, 작용제 둘 모두는 용액 중에 있을 수 있다. 또 다른 실시형태에 있어서, 작

용제는 가용성 형태일 수 있고, 이어서 표면, 예컨대, Fc 수용체를 발현하는 세포 또는 항체 또는 작용제에 결합할 것인 다른 결합제에 가교될 수 있다. 이와 관련하여, 본 개시에서 특정 실시형태에서 T 세포의 활성화 및 증대에 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포(aAPC)에 대하여 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 20040101519호 및 제 20060034810호를 참조한다.

[0389] 일부 실시형태에서, T 세포는 약제-코팅된 비드와 조합되고, 비드 및 세포는 후속적으로 분리된 다음, 세포가 배양된다. 대안적인 실시형태에서, 배양 전에, 작용제-코팅된 비드 및 세포는 분리되지 않고 함께 배양된다. 추가의 실시형태에서, 비드 및 세포는 먼저 힘, 예컨대, 자성력의 인가에 의해 농축되어 세포 표면 마커의 증가된 라이게이션을 초래하여, 세포 자극을 유도한다.

[0390] 예로서, 항-CD3 및 항-CD28이 부착된 상자성 비드(3x28 비드)가 T 세포와 접촉하도록 허용함으로써 세포 표면 단백질을 라이게이션시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 세포(예를 들어, 10^4 내지 4×10^8 개의 T 세포) 및 비드(예를 들어, 1:100의 권고된 역가의 항-CD3/CD28 MACSiBead 입자)는 완충제, 바람직하게는 PBS(2가 양이온, 예컨대, 칼슘 및 마그네슘이 부재함) 중에서 조합된다. 당업자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있음을 용이하게 인식할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포는 시료에서 매우 드물고, 시료의 0.01%만을 구성할 수 있거나, 전체 시료(즉, 100%)가 관심 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수가 본 개시의 맥락 내에 있다. 특정 실시형태에서, 세포 및 입자의 최대 접촉을 보장하기 위해, 입자 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 것(즉, 세포의 농도 증가를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 약 20억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 1억개의 세포/ml의 초과가 사용된다. 추가의 실시형태에서, 1000만, 1500만, 2000만, 2500만, 3000만, 3500만, 4000만, 4500만 또는 5000만 개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 7500만, 8000만, 8500만, 9000만, 9500만 또는 1억 개의 세포/ml로부터의 세포 농도가 사용된다. 추가의 실시형태에서, 1억 2500만 또는 1억 5000만 개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 고농도를 사용하는 것은 증가된 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 증대를 초래할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대, CD28-음성 T 세포의 보다 효율적인 포획을 허용할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고 특정 실시형태에서 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고농도의 세포를 사용하는 것은 일반적으로 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T 세포의 보다 효율적인 선택을 허용한다.

[0391] 일부 실시형태에서, 혼합물은 몇시간(약 3시간) 내지 약 14일 동안 또는 그 사이의 임의의 시간 정수 값 동안 배양될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 혼합물은 21일 동안 배양될 수 있다. 일 실시형태에서, 비드 및 T 세포는 약 8일 동안 함께 배양된다. 또 다른 실시형태에서, 비드 및 T 세포는 2 내지 3일 동안 함께 배양된다. T 세포의 배양 시간이 60일 이상이 될 수 있도록 몇 사이클의 자극이 또한 요구될 수 있다. T 세포 배양에 적절한 조건은 혈청(예를 들어, 소 태아 또는 인간 혈청), 인터류킨-2(IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β 및 TNF- α 또는 당업자에게 알려진 세포 성장을 위한 임의의 기타 첨가제를 포함하여 증식 및 생존력에 필요한 인자를 함유할 수 있는 적절한 배지(예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 X-Vivo 15(론자(Lonza)))를 포함한다. 세포 성장을 위한 기타 첨가제는 계면활성제, 플라스마네이트 및 환원제, 예컨대, N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 배지는 아미노산, 피루브산나트륨 및 비타민이 첨가되거나, 무혈청이거나, 적절한 양의 혈청(또는 혈장) 또는 정의된 호르몬 세트 및/또는 T 세포의 성장 및 증대에 충분한 양의 사이토카인(들)이 보충된, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 및 X-Vivo 20, 옵티마이저를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어, 페니실린 및 스트렙토마이신은 대상체 내로 주입될 세포 배양물이 아닌 실험 배양물에만 포함된다. 표적 세포는 성장을 지지하는 데 필요한 조건, 예를 들어, 적절한 온도(예를 들어, 37°C) 및 대기(예를 들어, 공기 + 5% CO₂) 하에서 유지된다. 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특징을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 성분채집술 말초 혈액 세포 생성물은 세포독성 또는 억제인자 T 세포 집단(TC, CD8)보다 더 많은 헬퍼 T 세포 집단(TH, CD4+)을 가진다. CD3 및 CD28 수용체의 자극에 의한 T 세포의 생체의 증대는 약 제8일 내지 제9일 이전에는 주로 TH 세포로 이루어진 T 세포 집단을 생성하는 반면, 약 제8일 내지 제9일 후에는 T 세포 집단은 점점 더 많은 TC 세포 집단을 포함한다. 따라서, 치료 목적에 따라, 주로 TH 세포를 포함하는 T 세포 집단을 대상체에 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, TC 세포의 항원-특이적 하위세트가 단리된 경우 이 하위세트를 더 큰 정도로 증대시키는 것이 유리할 수 있다.

[0392] 또한, CD4 및 CD8 마커에 더하여, 다른 표현형 마커는 유의하게 달라지지만, 대부분 세포 증대 과정의 진행 동안 재현가능하게 달라진다. 따라서, 이러한 재현성은 활성화된 T 세포 생성물을 특정 목적에 맞추는 능력을 가

능하게 한다.

[0393] **5.4.5. 외인적으로 도입된 p40 및 CCL-19를 발현하는 CAR-T 세포**

[0394] 특정 실시형태에서, 본원에 제공되는 T 세포는 외인적으로 도입된 p40 및 CCL-19를 추가로 발현한다. 상기 및 하기 섹션 6에 기재된 바와 같이, 이러한 CAR-T 세포는 놀랍게도 뛰어난 효과를 나타내었다.

[0395] 이러한 CAR-T 세포는 상기 섹션 5.3.7에 기재된 폴리펩티드를 T 세포 내로 도입함으로써 생성될 수 있다.

[0396] 더욱 구체적으로, 일부 실시형태에서, 외인적으로 도입된 p40 및 CCL-19를 발현하는 CAR-T 세포는 섹션 5.3.7에 기재된 폴리펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 핵산(들)을 도입함으로써 생성될 수 있다.

[0397] CAR, p40 및 CCL-19는 각각 개별 폴리펩티드로서 T 세포 내로 개별적으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공되는 CAR을 인코딩하는 핵산, p40을 인코딩하는 핵산 및 CCL-19를 인코딩하는 핵산은 T 세포 내로 개별적으로 도입된다.

[0398] 대안적으로, 3가지 중 임의의 2개 또는 이들 3개 모두는 세포에서의 번역 시에 절단될 하나의 핵산을 통해 단일의 폴리펩티드로서 T 세포 내로 함께 도입될 수 있다. 예를 들어, 자가-절단 펩티드 링커를 통해 연결된 본원에 제공되는 CAR 및 p40을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산이 T 세포 내로 도입되고, 개별적으로, CCL-19를 인코딩하는 핵산이 T 세포 내로 도입된다. 유사하게, 자가-절단 펩티드 링커를 통해 연결된 본원에 제공되는 CAR 및 CCL-19를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산이 T 세포 내로 도입되고, 개별적으로, p40을 인코딩하는 핵산이 T 세포 내로 도입된다. 일부 실시형태에서, 자가-절단 펩티드 링커를 통해 서로 연결된 CAR, p40 및 CCL-19 3개 모두를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산이 T 세포 내로 도입될 수 있다. 자가-절단 펩티드 링커는 상기에 더욱 상세히 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, 2A 자가-절단 펩티드는 F2A, E2A, P2A, T2A 또는 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 자가-절단 펩티드는 SEQ ID NO: 138의 아미노산 서열을 포함하는 2A 자가-절단 펩티드 P2A 단편이다. 구체적인 실시형태에서, 자가-절단 펩티드는 SEQ ID NO: 139의 아미노산 서열을 포함하는 T2A 단편이다.

[0399] 대안적으로, 본원에 제공되는 CAR-T 세포는 다수의 영역, 예를 들어, CAR을 인코딩하는 영역, p40을 인코딩하는 영역 및/또는 CCL-19를 인코딩하는 영역을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 생성될 수 있다. 상이한 영역은 동일한 프로모터에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 내부 리보솜 진입 부위(IRES)는 하나의 프로모터로부터 다수의 유전자를 발현하도록 본원에서 사용된다. 다른 실시형태에서, 상이한 영역은 개별 프로모터에 의해 제어된다.

[0400] 다른 특성 중에, 외인적으로 도입된 p40 및 CCL-19를 발현하는 CAR-T 세포는 외인적으로 도입된 p40 및 CCL-19가 없는 CAR-T 세포에 비하여, 더 높은 수준의 IL-23을 갖는다. 일부 실시형태에서, IL-23의 수준은 적어도 20% 더 높다. 일부 실시형태에서, IL-23의 수준은 적어도 50% 더 높다. 일부 실시형태에서, IL-23의 수준은 적어도 80% 더 높다.

[0401] **5.5. 폴리뉴클레오타이드**

[0402] 특정 실시형태에서, 본 개시는 GPC3에 결합하는 본 발명의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 본원에 기재된 GPC3에 결합하는 항체를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 본 개시의 폴리뉴클레오타이드는 RNA의 형태 또는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하며; 이중-가닥이거나 단일-가닥일 수 있고, 단일 가닥이면, 코딩 가닥 또는 비-코딩(안티-센스) 가닥일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 cDNA의 형태이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 합성 폴리뉴클레오타이드이다.

[0403] 특정 실시형태에서, 본 개시는 본원에 제공되는 GPC3 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본 개시의 폴리뉴클레오타이드는 RNA의 형태 또는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하며; 이중-가닥이거나 단일-가닥일 수 있고, 단일 가닥이면, 코딩 가닥 또는 비-코딩(안티-센스) 가닥일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 cDNA의 형태이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 합성 폴리뉴클레오타이드이다.

[0404] 본 개시는 추가로 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드의 변이체에 관한 것이며, 변이체는 예를 들어, 본 개시의 GPC3에 결합하는 항체 또는 CAR의 단편, 유사체 및/또는 유도체를 인코딩한다. 특정 실시형태에서, 본 개시는 본 개시의 GPC3에 결합하는 항체 또는 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드와 적어도 약 75% 동일한, 적어도 약 80% 동일한, 적어도 약 85% 동일한, 적어도 약 90% 동일한, 적어도 약 95% 동일한, 일부 실시형태에서, 적어도 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를

제공한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 어구 "참조 뉴클레오타이드 서열과 적어도, 예를 들어, 95% "동일한" 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드"는 폴리뉴클레오타이드의 서열이 참조 뉴클레오타이드 서열의 각 100개 뉴클레오타이드 당 최대 5개의 점 돌연변이를 포함할 수 있다는 것을 제외하고는, 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열이 참조 서열과 동일하다는 것을 의미한다. 즉, 참조 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 획득하기 위해, 참조 서열에서 최대 5%의 뉴클레오타이드가 결실되거나 또 다른 뉴클레오타이드로 치환되거나, 참조 서열에서 전체 뉴클레오타이드의 최대 5%의 뉴클레오타이드의 수가 참조 서열에 삽입될 수 있다. 참조 서열의 이들 돌연변이는 참조 뉴클레오타이드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서 또는 참조 서열의 뉴클레오타이드 사이에 개별적으로 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 인접기에 산재된 이들 말단 위치 사이의 임의의 위치에서 발생할 수 있다.

[0405] 폴리뉴클레오타이드 변이체는 코딩 영역, 비-코딩 영역, 또는 둘 모두에 변형을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 침묵 치환, 추가, 또는 결실을 생성하지만 코딩된 폴리펩티드의 특성 또는 활성을 변경하지 않는 변형을 함유한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 (유전 코드의 축퇴성으로 인해) 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경하지 않는 침묵 치환을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드 변이체는 다양한 이유로, 예를 들어 특정 숙주에 대한 코돈 발현을 최적화하기 위해 생성될 수 있다(즉, 인간 mRNA의 코돈을 이. 콜라이와 같은 박테리아 숙주가 선호하는 코돈으로 변경). 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 서열의 비-코딩 또는 코딩 영역에 적어도 하나의 침묵 돌연변이를 포함한다.

[0406] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 인코딩된 폴리펩티드의 발현(또는 발현 수준)을 조절하거나 변경하기 위해 생성된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 인코딩된 폴리펩티드의 발현을 증가시키기 위해 생성된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 인코딩된 폴리펩티드의 발현을 감소시키기 위해 생성된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 부모 폴리뉴클레오타이드 서열에 비해 인코딩된 폴리펩티드의 증가된 발현을 갖는다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 부모 폴리뉴클레오타이드 서열에 비해 인코딩된 폴리펩티드의 감소된 발현을 갖는다.

[0407] 본원에 기재된 핵산 분자를 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 일 실시형태에서, 핵산 분자는 재조합 발현 벡터 내로 혼입될 수 있다. 본 개시는 본 개시의 핵산 중 임의의 것을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "재조합 발현 벡터"는 유전학적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 구축물을 의미하는 것으로서, 이러한 구축물이 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 벡터가 숙주 세포 내에서 mRNA, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 발현하기에 충분한 조건 하에서 세포와 접촉될 때, 숙주 세포에 의한 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드의 발현을 가능하게 한다. 본원에 기재된 벡터는 전체적으로 자연 발생하지는 않지만; 벡터의 일부는 자연 발생할 수 있다. 기재된 재조합 발현 벡터는 DNA 및 RNA를 포함하지만 이로 한정되지 않는 임의의 유형의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 이는 단일 가닥 또는 이중 가닥이거나, 합성되거나, 천연 공급원으로부터 부분적으로 획득될 수 있고, 천연, 비천연 또는 변경된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 자연 발생 또는 비-자연 발생 뉴클레오타이드간 연결기, 또는 두 연결기 유형 모두를 포함할 수 있다. 비-자연 발생 또는 변경된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드간 연결기는 벡터의 전사 또는 복제를 방해하지 않는다.

[0408] 일 실시형태에서, 본 개시의 재조합 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있으며, 임의의 적합한 숙주를 형질전환시키거나 트랜스펙션시키는 데 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 증식 및 증대를 위해 또는 발현을 위해 또는 둘 모두를 위해 설계된 것들, 예컨대 플라스미드 및 바이러스를 포함한다. 벡터는 pUC 시리즈(미국 메릴랜드주 글렌 버니 소재의 퍼멘타스 라이프 사이언스즈(Fermentas Life Sciences)), pBluescript 시리즈(미국 캘리포니아주 라졸라 소재의 스트라타진(Stratagene)), pET 시리즈(미국 위스콘신주 매디슨 소재의 노바젠(Novagen)), pGEX 시리즈(스웨덴 옉살라 소재의 파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech)), 및 pEX 시리즈(미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 클론테크(Clontech))로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 박테리오파지 벡터, 예컨대 λGT10, λGT11, λEMBL4, 및 λNM1149, λZapII(스트라타진)가 사용될 수 있다. 식물 발현 벡터의 예에는 pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3, 및 pBIN19(클론테크)가 포함된다. 동물 발현 벡터의 예에는 pEUK-C1, pMAM, 및 pMAMneo(클론테크)가 포함된다. 재조합 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 감마 레트로바이러스 벡터일 수 있다.

[0409] 일 실시형태에서, 재조합 발현 벡터는, 예를 들어 상기 문헌[Sambrook et al.], 및 상기 문헌[Ausubel et al.]에 기재된 표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 제조된다. 원형 또는 선형인 발현 벡터의 구축물은 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 기능적인 복제 시스템을 함유하도록 제조될 수 있다. 복제 시스템은, 예를 들어 ColE1,

SV40, 2 μ 플라스미드, λ , 소 유두종 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다.

- [0410] 재조합 발현 벡터는 적절한 경우에 그리고 벡터가 DNA- 또는 RNA-기반인지의 여부를 고려하여, 벡터가 도입될 숙주의 유형(예를 들어, 박테리아, 식물, 진균, 또는 동물)에 특이적인 조절 서열, 예컨대 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 포함할 수 있다.
- [0411] 재조합 발현 벡터는 형질전환된 또는 트랜스펙션된 숙주의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커 유전자를 포함할 수 있다. 마커 유전자는 살생제 저항성, 예를 들어 항생제, 중금속 등에 대한 저항성, 영양요구성 숙주에서 원영양성을 제공하기 위한 보완성 등을 포함한다. 기재된 발현 벡터에 적합한 마커 유전자는, 예를 들어 네오마이신/G418 저항성 유전자, 히스티딘올 x 저항성 유전자, 히스티딘올 저항성 유전자, 테트라사이클린 저항성 유전자 및 엠포실린 저항성 유전자를 포함한다.
- [0412] 재조합 발현 벡터는 본 개시의 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 고유 또는 비고유 프로모터를 포함할 수 있다. 예를 들어 강한, 약한, 조직-특이적, 유도성 및 발생-특이적인 프로모터의 선택은 당업자의 기술 내에 있다. 유사하게, 뉴클레오타이드 서열을 프로모터와 조합하는 것이 또한 당업자의 기술 내에 있다. 프로모터는 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, RSV 프로모터, SV40 프로모터, 또는 쫓과 줄기 세포 바이러스의 긴 말단 반복부에서 발견되는 프로모터일 수 있다.
- [0413] 재조합 발현 벡터는 일시적 발현을 위해, 안정한 발현을 위해, 또는 둘 모두를 위해 설계될 수 있다. 또한, 재조합 발현 벡터는 구성성 발현을 위해 또는 유도성 발현을 위해 제조될 수 있다.
- [0414] 또한, 재조합 발현 벡터는 자살 유전자를 포함하도록 제조될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "자살 유전자"는 자살 유전자를 발현하는 세포가 죽게 하는 유전자를 지칭한다. 자살 유전자는, 유전자가 발현되는 세포 상에 작용제, 예를 들어 약물에 대한 감수성을 부여하고, 세포가 작용제와 접촉되거나 그에 노출될 때 세포가 죽게 하는 유전자일 수 있다. 자살 유전자는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 티미딘 키나제(TK) 유전자, 시토신 데아미나제, 퓨린 뉴클레오타이드 포스포릴라제, 및 니트로리덕타제를 포함한다.
- [0415] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 단리된다. 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 실질적으로 순수하다.
- [0416] 본원에 기재된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 숙주 세포는 이중 핵산을 함유하는 임의의 세포일 수 있다. 이중 핵산은 벡터(예를 들어, 발현 벡터)일 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 세포에 의한 물질의 생성, 예를 들어 세포에 의한 유전자, DNA 또는 RNA 서열, 단백질 또는 효소의 발현을 위하여 임의의 방식으로 선택되거나, 변형되거나, 형질전환되거나, 성장되거나, 사용되거나, 조작된 임의의 유기체로부터의 세포일 수 있다. 적절한 숙주가 결정될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 벡터 백본 및 원하는 결과에 기초하여 선택될 수 있다. 예로서, 플라스미드 또는 코스미드가 몇몇 유형의 벡터의 복제를 위하여 원핵 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. DH5 α , JM109 및 KCB, SURE® 컴피턴트 세포, 및 SOLOPACK 골드 세포와 같은 그러나 이로 한정되지 않는 박테리아 세포가 벡터 복제 및/또는 발현을 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 추가적으로, 박테리아 세포, 예컨대 이. 콜라이 LE392가 파지 바이러스를 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 숙주 세포로서 사용될 수 있는 진핵 세포는 효모(예를 들어, YPH499, YPH500 및 YPH501), 곤충 및 포유동물을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 벡터의 복제 및/또는 발현을 위한 포유동물 진핵생물 숙주 세포의 예에는 HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, Saos, PC12, SP2/0(미국 버지니아주 머내서스 소재의 ATCC(American Type Culture Collection), CRL-1581), NS0(영국 윌트셔주 솔즈베리 소재의 ECACC(European Collection of Cell Cultures), ECACC No. 85110503), FO(ATCC CRL-1646) 및 Ag653(ATCC CRL-1580) 쫓과 세포주가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 예시적인 인간 골수종 세포주는 U266(ATCC CRL-TIB-196)이다. 다른 유용한 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 예컨대 CHO-K1SV(미국 메릴랜드주 위커스빌 소재의 론자 바이올로지스(Lonza Biologics)), CHO-K1(ATCC CRL-61) 또는 DG44로부터 유래되는 것들을 포함한다.
- [0417] **5.6. 약제학적 조성물**
- [0418] 일 양태에서, 본 개시는 본 개시의 항체, 결합 분자 또는 항체를 포함하는 치료 분자 또는 조작된 면역 이펙터 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 추가로 제공한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 치료적 유효량의 본 개시의 항체, 결합 분자 또는 항체를 포함하는 치료 분자 또는 조작된 면역 이펙터 세포 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함한다.
- [0419] 일부 실시형태에서, 치료적 유효량의 본원에 제공되는 항체 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약

제학적 조성물이 본원에 제공된다.

- [0420] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 항체 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 치료적 유효량의 치료적 분자(예컨대 융합 단백질, 면역결합제 및 다중특이적 결합 분자)를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다.
- [0421] 다른 실시형태에서, 치료적 유효량의 본원에 제공되는 항체를 포함하는 CAR 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다.
- [0422] 다른 실시형태에서, 치료적 유효량의 본원에 제공되는 조작된 면역 세포 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다.
- [0423] 다른 실시형태에서, 예를 들어, 벡터 내에 본원에 제공되는 치료적 유효량의 핵산 및 예를 들어, 유전자 요법에 적합한, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다.
- [0424] 구체적인 실시형태에서, 용어 "부형제"는 또한 희석제, 애주번트(예를 들어, 프로인트 애주번트(완전 또는 불완전), 담체 또는 비히클을 지칭할 수 있다. 약제학적 부형제는 멸균 액체, 예컨대, 물 및 오일, 예를 들면, 석유, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 것, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등일 수 있다. 염수 용액 및 수성 텍스트로스와 및 글리세롤 용액은 또한 액체 부형제로서 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루(flour), 백악(chalk), 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 탈지 분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은, 바람직한 경우 또한 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 액체, 현탁제, 유제, 정제, 환제, 캡슐제, 산제, 지연 방출형 제형 등의 형태를 취할 수 있다. 적합한 약제학적 부형제의 예는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA]에 기재되어 있다. 이러한 조성물은 환자로의 적절한 투여를 위한 형태를 제공하도록 적합한 양의 부형제와 함께, 예컨대 순수한 형태의, 예방적 또는 치료적 유효량의 본원에 제공되는 활성 성분을 함유할 것이다. 제형은 투여 방식에 적합해야 한다.
- [0425] 일부 실시형태에서, 부형제의 선택은 부분적으로 특정 세포, 결합 분자 및/또는 항체에 의해 및/또는 투여 방법에 의해 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제형이 존재한다.
- [0426] 전형적으로, 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 비독성이며, 완충제, 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E, 메타중아황산나트륨을 포함하는 항산화제; 보존제, 등장화제, 안정화제, 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 킬레이트제, 예컨대, EDTA 및/또는 비-이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0427] 특히, 안정성이 pH 의존적인 경우, 치료적 효과를 최적화하는 범위에서 pH를 제어하기 위해 완충제가 사용될 수 있다. 본 개시에 사용하기에 적합한 완충제는 유기 및 무기 산 및 염 모두를 포함한다. 예를 들어, 시트르산염, 인산염, 숙신산염, 주석산염, 푸마르산염, 글루콘산염, 옥살산염, 락트산염, 아세트산염. 추가로, 완충제는 히스티딘 및 트리메틸아민 염, 예컨대, 트리스를 포함할 수 있다.
- [0428] 보존제는 미생물 성장을 지연시키기 위해 첨가될 수 있다. 본 개시에 사용하기에 적합한 보존제는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 할라이드(예를 들어, 염화물, 브롬화물, 요오드화물), 벤즈에토늄 클로라이드; 티메로살, 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조시놀; 사이클로헥산올, 3-펜탄올 및 m-크레졸을 포함한다.
- [0429] 때때로 "안정화제"로서 알려진 등장화제는 조성물에서 액체의 장성을 조정하거나 유지하기 위해 존재할 수 있다. 크고 하전된 생체분자, 예컨대, 단백질 및 항체와 함께 사용되는 경우, 아미노산 측쇄의 하전된 그룹과 상호작용할 수 있어 분자-간 및 분자-내 상호작용의 가능성이 줄어들기 때문에 종종 "안정화제"라고 칭한다. 예시적인 등장화제는 다가 당 알코올, 3가 이상의 당 알코올, 예컨대, 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다.
- [0430] 추가의 예시적인 부형제는 하기를 포함한다: (1) 증량제, (2) 용해도 향상제, (3) 안정화제 및 (4) 변성 또는 용기 벽에 대한 부착을 방지하는 작용제. 이러한 부형제는 하기를 포함한다: 다가 당 알코올(상기 나열됨); 아미노산, 예컨대, 알라닌, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 라이신, 오르니틴, 류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대, 수크로스, 락토스, 락티톨, 트레할로스, 스타키오스, 만노스, 소르보스, 자일로스, 리보스, 리비톨, 미오이니시토스, 미오이니시톨, 갈락토스, 갈락티톨,

글리세롤, 사이클리톨(예컨대, 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 황 함유 환원제, 예컨대, 우레아, 글루타티온, 티옥트산, 티오글리콜산나트륨, 티오글리세롤, α -모노티오글리세롤 및 소듐 티오 술페이트; 저 분자량 단백질, 예컨대, 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 다른 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리비닐 피롤리돈; 당당류(예를 들어, 자일로스, 만노스, 프룩토스, 글루코스; 이당류(예를 들어, 락토스, 말토스, 수크로스); 삼당류, 예컨대, 라피노스; 및 다당류, 예컨대, 텍스트린 또는 텍스트란.

[0431] 비-이온성 계면활성제 또는 세제("습윤제"로도 또한 알려짐)는 치료제의 가용화를 돕고 교반-유도 응집에 대해 치료 단백질을 보호하기 위해 존재할 수 있으며, 이는 또한 제형이 활성 치료 단백질 또는 항체의 변성을 일으키지 않고 전단 표면 스트레스에 노출되도록 허용한다. 적합한 비-이온성 계면활성제는 예를 들어, 폴리소르베이트(20, 40, 60, 65, 80 등), 폴록사머(184, 188 등), PLURONIC® 폴리올, TRITON®, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르(TWEEN®-20, TWEEN®-80, 등), 라우로마크로골(lauromacrogol) 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 사용될 수 있는 음이온성 세제는 소듐 라우릴 술페이트, 디옥틸 소듐 술포숙시네이트 및 디옥틸 소듐 술포네이트를 포함한다. 양이온성 세제는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드를 포함한다.

[0432] 약제학적 조성물을 생체내 투여에 사용하기 위해, 이들은 바람직하게는 무균이다. 약제학적 조성물은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 무균이 될 수 있다. 본원의 약제학적 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어, 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 배치될 수 있다.

[0433] 투여 경로는 알려지고 허용된 방법에 따르며, 예컨대, 단일 또는 다중 볼루스 또는 적합한 방식으로 장기간에 걸친 주입, 예를 들어, 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 병변내 또는 관절내 경로에 의한 주사 또는 주입, 국부 투여, 흡입 또는 지속 방출 또는 연장-방출 수단에 의한다.

[0434] 또 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 제어 방출형 또는 지속 방출형 시스템으로서 제공될 수 있다. 일 실시형태에서, 펌프를 사용하여 제어되거나 지속된 방출을 달성할 수 있다(예를 들어, 문헌[Sefton, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-40 (1987)]; 문헌[Buchwald *et al.*, Surgery 88:507-16 (1980)]; 및 문헌[Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321:569-74 (1989)] 참조). 또 다른 실시형태에서, 중합체 물질을 사용하여 본원에 제공된 예방제 또는 치료제(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 융합 단백질) 또는 조성물(예를 들어, 문헌[Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., 1974)]; 문헌[Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., 1984)]; 문헌[Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61-126 (1983)]; 문헌[Levy *et al.*, Science 228:190-92 (1985)]; 문헌[During *et al.*, Ann. Neurol. 25:351-56 (1989)]; 문헌[Howard *et al.*, J. Neurosurg. 71:105-12 (1989)]; 미국 특허 제5,679,377호; 제5,916,597호; 제5,912,015호; 제5,989,463호; 및 제5,128,326호; PCT 공개 제WO 99/15154호 및 제WO 99/20253호 참조)의 제어된 또는 지속된 방출을 달성할 수 있다. 지속 방출 제형에 사용된 중합체의 예는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 다가무수물, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일 실시형태에서, 지속 방출 제형에 사용된 중합체는 불활성이며, 누출 가능한 불순물을 함유하지 않고, 저장시 안정하며, 멸균성이고, 생분해성이다. 또 다른 실시형태에서, 제어된 또는 지속된 방출 시스템을 특정 표적 조직, 예를 들어, 비강 통로 또는 폐에 근접하게 위치시킴으로써, 오직 소정의 분율의 전신 용량만을 필요로 할 수 있다(예를 들어, 문헌[Goodson, Medical Applications of Controlled Release Vol. 2, 115-38 (1984)] 참조). 제어 방출 시스템은 예를 들어, 문헌[Langer, Science 249:1527-33 (1990)]에 논의되어 있다. 당업자에게 공지된 임의의 기법을 사용하여 본원에 기재된 하나 이상의 작용제를 포함하는 지속 방출 제형을 생성할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,526,938호, PCT 공개 제WO 91/05548호 및 제WO 96/20698호, 문헌[Ning *et al.*, Radiotherapy & Oncology 39:179-89 (1996)]; 문헌[Song *et al.*, PDA J. of Pharma. Sci. & Tech. 50:372-97 (1995)]; 문헌[Cleek *et al.*, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-54 (1997)]; 및 문헌[Lam *et al.*, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-60 (1997)] 참조).

[0435] 본원에 기재된 약제학적 조성물은 또한 치료될 특정 적응증에 필요한 하나 초과 활성 화합물 또는 작용제를 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 세포독성제, 화학요법제, 사이토카인, 면역억제제 또는 성장 저해제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적합하게 존재한다.

- [0436] 활성 성분은 또한 예를 들어, 코아세르베이션 기법에 의해 또는 계면 중합화에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로캡슐, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀전에서 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 포획될 수 있다. 이러한 기법은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition]에 개시된다.
- [0437] 다양한 조성물 및 전달 시스템이 알려져 있으며, 본원에 제공되는 치료제와 함께 사용될 수 있으며, 리포솜, 마이크로입자, 마이크로캡슐 내의 캡슐화, 본원에 제공되는 항체 또는 치료적 분자를 발현할 수 있는 재조합 세포, 레트로바이러스 또는 기타 벡터의 부분으로서의 핵산의 구축 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0438] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 약제학적 조성물은 결합 분자 및/또는 세포를 질병 또는 장애를 치료하거나 예방하기에 유효한 양, 예컨대 치료적 유효량 또는 예방적 유효량으로 함유한다. 치료적 또는 예방적 효능은 일부 실시형태에서, 치료되는 대상체의 주기적 평가에 의해 모니터링된다. 몇일 이상에 걸친 반복 투여에 있어서, 질환에 따라, 치료는 원하는 질병 증상의 억제 발생할 때까지 반복된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있고, 결정될 수 있다.
- [0439] **5.7. 방법 및 용도**
- [0440] 또 다른 양태에서, 항-GPC3 항체, 키메라 항원 수용체(CAR) 및/또는 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포를 포함하는 본원에 제공되는 GPC3 결합 분자의 이용 방법 및 용도가 본원에 제공된다.
- [0441] **5.7.1. 치료 방법 및 용도**
- [0442] 이러한 방법 및 용도는 예를 들어, GPC3을 발현하거나 GPC3 발현과 연관된 질병, 질환 또는 장애를 갖는 대상체 및/또는 이의 세포 또는 조직이 GPC3을 발현하는 대상체에 분자, 세포 또는 이를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료적 방법 및 용도를 포함한다. 일부 실시형태에서, 분자, 세포 및/또는 조성물은 질병 또는 장애의 치료를 시행하기에 유효한 양으로 투여된다. 용도는 이러한 방법 및 치료에서의, 그리고 이러한 치료 방법을 수행하기 위한 의학의 제조에서의 항체 및 세포의 용도를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 항체 또는 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 질병 또는 질환을 갖거나, 이를 갖는 것으로 의심되는 대상체에 투여함으로써 수행된다. 일부 실시형태에서, 이에 의해, 당해 방법은 대상체에서 질병 또는 장애를 치료한다.
- [0443] 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 치료는 질병 또는 장애 또는 증상, 역효과 또는 결과 또는 이와 관련된 표현형의 완전한 또는 부분적인 개선 또는 감소를 야기한다. 치료의 바람직한 효과는 질병의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 호전, 질병의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이의 예방, 질병 진행의 속도의 감소, 병태의 개선 또는 완화, 및 관해 또는 개선된 예후를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 당해 용어는 질병의 완전한 치유 또는 임의의 증상의 완전한 제거 또는 모든 증상 또는 결과에 대한 영향(들)을 포함하지만 이를 암시하지 않는다.
- [0444] 본원에 사용되는 바와 같이, 일부 실시형태에서, 본원에 제공되는 치료는 질병 또는 장애의 발달을 지연시키며, 예를 들어, 질병(예컨대 암)의 발달을 미루고/미루거나, 방해하고/하거나, 늦추고/늦추거나, 지연시키고/시키거나, 안정화시키고/시키거나, 억제하고/하거나 연기한다. 이 지연은 질병의 이력 및/또는 치료되고 있는 개체에 따라 다양한 길이의 시간일 수 있다. 당업자에게 분명한 바와 같이, 충분한 또는 유의미한 지연은, 사실상, 개체가 질병 또는 장애를 발달시키지 않는다는 점에서 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 후기 암, 예컨대 전이의 발생이 지연될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본원에 제공되는 방법 또는 용도는 질병 또는 장애를 예방한다.
- [0445] 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 GPC3 연관 질병 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 GPC3-양성 암, 즉, GPC3을 발현하거나 이를 과발현하는 암이다. GPC3-양성 암의 예는 HCC, 흑색종, 난소 투명 세포 암종, 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 폐의 선암종, 대세포 폐암종, 소세포 폐암, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피내 신 생물, 부신 선종, 신경림종, 배아 종양, 위암(예컨대 α -태아단백질을 생성하는 위암), 결장직장 암종, 식도암 및 갑상선암을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 HCC이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 흑색종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 난소 투명 세포 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 난황낭 종양(YST)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신경모세포종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 간모세포종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신장모세포종(윌름스 종양)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 폐의 편평 세포 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 폐의 선암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 대세포 폐암종이다. 일부 실시형태에서,

질병 또는 장애는 소세포 폐암이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 정소 비정상피종성 생식 세포 종양이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 지방육종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 자궁경부 상피 내 신생물이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 부신 선종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신경집종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 배아 종양이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 위 암종(예컨대 α -태아단백질을 생성하는 위암)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 결장직장 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 식도암이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 갑상선암이다.

[0446] 일부 실시형태에서, 당해 방법은 제공된 GPC3-표적화된 CAR을 발현하는 유전학적으로 조작된 세포가 대상체에게 투여되는 입양 세포 요법을 포함한다. 이러한 투여는 GPC3-표적화된 방식으로 세포의 활성화(예를 들어, T 세포 활성화)를 촉진시킴으로써 질병 또는 장애의 세포가 파괴의 표적이 되게 할 수 있다.

[0447] 일부 실시형태에서, 당해 방법은 대상체, 조직 또는 세포로서, 예컨대 질병 또는 장애를 갖거나 이의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로 의심되는 대상체, 조직 또는 세포에 세포 또는 세포를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포, 집단 및 조성물은 예를 들어, 입양 세포 요법, 예컨대 입양 T 세포 요법을 통해 치료될 특정 질병 또는 장애를 갖는 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 조성물은 대상체, 예컨대 질병 또는 장애를 갖거나, 이에 대한 위험이 있는 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 당해 방법은 이에 의해, 예컨대 GPC3-발현 암에서 종양 부담을 경감시킴으로써 질병 또는 장애의 하나 이상의 증상을 치료, 예를 들어, 개선한다.

[0448] 입양 세포 요법을 위한 세포의 투여 방법은 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2003/0170238호; 미국 특허 제 4,690,915호; 문헌[Rosenberg, *Nat Rev Clin Oncol.* 8 (10):577-85 (2011)]; 문헌[Themeli et al., *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933 (2013)]; 문헌[Tsukahara et al., *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9 (2013)]; 및 문헌[Davila et al., *PLoS ONE* 8(4): e61338 (2013)]에 기재된 바와 같이 공지되어 있다. 이들 방법은 본원에 제공되는 방법 및 조성물과 함께 사용될 수 있다.

[0449] 일부 실시형태에서, 세포 요법(예를 들어, 입양 T 세포 요법)은 자가 전달에 의해 수행되며, 세포는 세포 요법을 받을 대상체로부터 또는 이러한 대상체로부터 유래된 시료로부터 분리되고/되거나 다르게는 제조된다. 따라서, 일부 양태에서, 세포는 치료를 필요로 하는 대상체로부터 유래되고 세포는 분리 및 처리 후 동일한 대상체에게 투여된다. 다른 실시형태에서, 세포 요법(예를 들어, 입양 T 세포 요법)은 동종이계 전달에 의해 수행되며, 세포는 세포 요법을 받을 예정이거나 궁극적으로 받을 대상체 이외의 대상체, 예를 들어 제1 대상체로부터 분리되고/되거나 다르게는 제조된다. 이러한 실시형태에서, 세포는 이어서 동일한 종의 상이한 대상체, 예를 들어 제2 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 대상체는 유전학적으로 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 대상체는 유전학적으로 유사하다. 일부 실시형태에서, 제2 대상체는 제1 대상체와 동일한 HLA 부류 또는 수퍼타입을 발현한다. 다른 실시형태에서, 세포 요법(예를 들어, 입양 T 세포 요법)은 동종이계 전달에 의해 수행된다.

[0450] 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단 또는 조성물이 투여되는 대상체는 영장류, 예컨대 인간이다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있고, 유아, 청소년, 청소년, 성인 및 노인 대상체를 포함하는 임의의 적합한 연령일 수 있다. 일부 예에서, 대상체는 질병, 입양 세포 요법을 위한 및/또는 독성 결과를 평가하기 위한 입증된 동물 모델이다.

[0451] GPC3-결합 분자, 예컨대 GPC3에 결합하는 항체 및 키메라 항원 수용체 및 이를 발현하는 세포는 임의의 적합한 수단에 의해, 예를 들어, 주사, 예를 들어, 정맥내 또는 피하 주사, 안구내(intraocular) 주사, 안구주위(periorbital) 주사, 망막하(subretinal) 주사, 유리체내(intravitreal) 주사, 중격경유성(trans-septal) 주사, 공막하(subscleral) 주사, 맥락막내(intrachoroidal) 주사, 전방내(intracameral) 주사, 결막하 주사(subconjunctival injection), 결막하 주사(subconjunctival injection), 서브-테논(sub-Tenon) 주사, 안구뒤(retrobulbar) 주사, 안구주위(peribulbar) 주사 또는 후부 공막주변(posterior juxtасcleral) 전달에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들은 비경구, 폐내 및 비강내로 투여되며, 국소 치료가 바람직한 경우 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다.

[0452] 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료에 효과적일 본원에 제공되는 예방제 또는 치료제의 양은 표준 임상 기법에 의해 결정될 수 있다. 유효 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다. 질병의 예방 또는 치료를 위하여, 결합 분자 또는 세포의 적절한 투여량은 치료될 질병 또는 장애의 유형, 결합 분자의 유형, 질병 또는 장애의 중증도 및 과정, 치료제가 예방 목적을 위해 투여되는지 치료 목적을 위해 투여되는지 여부, 이전의 치료법, 환자의 임상적 이력 및 작용제에 대한 반응, 및 담당의의

결정에 따라 달라질 수 있다. 조성물, 분자 및 세포는 일부 실시형태에서, 한꺼번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 적합하게 환자에게 투여된다.

[0453] 예를 들어, 질병의 유형 및 중증도에 따라, 항체의 투여량은 약 10 μ g/kg 내지 100 mg/kg 이상을 포함할 수 있다. 다수의 용량은 간헐적으로 투여될 수 있다. 더 높은 초기 로딩 용량에 이어서, 하나 이상의 더 낮은 용량이 투여될 수 있다. 약제학적 조성물이 본원에 기재된 항체 중 어느 하나를 포함하는 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 투여 경로에 따라 1일당 약 10 ng/kg 내지 최대 약 100 mg/kg(개체의 체중) 이상의 투여량, 예를 들어, 약 1 mg/kg/일 내지 10 mg/kg/일로 투여된다. 구체적인 투여량 및 전달 방법에 관한 지침은 문헌에 제공된다(예를 들어, 미국 특허 제4,657,760호; 제5,206,344호; 및 제5,225,212호 참조).

[0454] 결합 분자를 함유하는 유전학적으로 조작된 세포에 관하여, 일부 실시형태에서, 대상체에는 약 100만개 내지 약 1000억개 세포의 범위 및/또는 체중 킬로그램당 상기 세포의 양이 투여될 수 있다. 약제학적 조성물이 본원에 기재되는 조작된 면역 세포 중 어느 하나를 포함하는 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 적어도 약 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 또는 10^9 개의 세포/kg(개체의 체중) 중 어느 하나의 투여량으로 투여된다. 투여량은 질병 또는 장애 및/또는 환자 및/또는 기타 치료에 특정한 속성에 따라 달라질 수 있다.

[0455] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 단회 투여된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 다회(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6회 이상 중 어느 하나) 투여된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 투여 사이클 동안 1회 또는 다회 투여된다. 투여 사이클은 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5주 이상 또는 1, 2, 3, 4, 5개월 이상일 수 있다. 특정 환자를 위한 최적의 투여량 및 치료 요법은 의약 분야의 숙련자에 의해, 환자를 질병의 증후에 대하여 모니터링 하고 이에 따라 치료를 조정함으로써 결정될 수 있다.

[0456] 일부 실시형태에서, 세포 또는 항체는 또 다른 치료적 개입, 예컨대 또 다른 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 작용제, 예컨대 세포독성 또는 치료제와 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 조합 치료의 일부로서 투여된다.

[0457] 일부 실시형태에서, 세포 또는 항체는 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 하나 이상의 추가의 치료제와 또는 또 다른 치료적 개입과 함께 동시-투여된다. 일부 상황에서, 세포는 세포 집합이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 향상시키도록 하거나 그 반대의 경우를 위해 충분히 근접한 시간에 또 다른 치료제와 동시-투여된다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 항체는 하나 이상의 추가의 치료제 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 항체는 하나 이상의 추가의 치료제 후에 투여된다.

[0458] 특정 실시형태에서, 일단 세포가 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여되면, 조작된 세포 집단 및/또는 항체의 생물학적 활성은 다수의 공지된 방법 중 어느 하나에 의해 측정된다. 평가하기 위한 파라미터는 생체내에서, 예를 들어, 영상화에 의한 또는 생체외에서, 예를 들어, ELISA 또는 유세포측정에 의한 항원-항체의 결합 또는 천연 T 세포 또는 다른 면역 세포의 특이적인 결합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적 세포를 파괴하는 조작된 세포의 능력은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법, 예컨대, 예를 들어, 문헌[Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)] 및 문헌[Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기재된 세포독성 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포의 생물학적 활성은 또한, 특정 사이토카인, 예컨대 CD107a, IFN γ , IL-2 및 TNF의 발현 및/또는 분비를 검정함으로써 측정될 수 있다. 일부 양태에서, 생물학적 활성은 임상 결과, 예컨대 종양 부담 또는 부하의 감소를 평가함으로써 측정된다.

[0459] 일부 구체적인 실시형태에서, 예를 들어, 표 3 및 표 4의 CDR을 갖는 것들, 더욱 구체적으로 (i) SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (ii) SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 52의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (iii) SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 43의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 53의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (iv) SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2

및 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (v) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (vi) SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 46의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 56의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (vii) SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 57의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (viii) SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 48의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (ix) SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 59의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 (x) SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, SEQ ID NO: 50의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 SEQ ID NO: 60의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-GPC3 항체를 포함하여, 상기 섹션 5.2에 기재된 바와 같은 GPC3에 결합하는 항체를 포함하는 결합 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서의 질병 또는 장애의 치료 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 항체는 SEQ ID NO: 61 내지 70 및 117 내지 122의 군으로부터 선택되는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71 내지 80 및 123 내지 125의 군으로부터 선택되는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 GPC3 연관 질병 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 GPC3-양성 암, 즉, GPC3을 발현하거나 과발현하는 암이다. GPC3-양성 암의 예에는 HCC, 흑색종, 난소 투명 세포 암종, 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 폐의 선암종, 대세포 폐암종, 소세포 폐암, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피내 신생물, 부신 선종, 신경집종, 배아 종양, 위암(예컨대 α -태아단백질을 생성하는 위암), 결장직장 암종, 식도암 및 갑상선암이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 HCC이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 흑색종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 난소 투명 세포 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 난황낭 종양(YST)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신경모세포종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 간모세포종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신장모세포종(윌름스 종양)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 폐의 편평 세포 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 폐의 선암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 대세포 폐암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 소세포 폐암이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 정소 비정상피종성 생식 세포 종양이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 지방육종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 자궁경부 상피내 신생물이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 부신 선종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신경집종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 배아 종양이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 위 암종(예컨대 α -태아단백질을 생성하는 위암)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 결장직장 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 식도암이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 갑상선암이다.

[0460]

다른 구체적인 실시형태에서, 본원에 제공되는 CAR, 예를 들어, 표 3 및 표 4의 CDR을 갖는 것들 및 SEQ ID NO: 61 내지 70 및 117 내지 122의 군으로부터 선택되는 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 71 내지 80 및 123 내지 125의 군으로부터 선택되는 VL 도메인을 포함하는 것들을 포함하여, 상기 섹션 5.2에 기재된 바와 같은 GPC3에 결합하는 항체(예컨대 scFv)를 포함하는 CAR을 발현하는 조작된 면역 이펙터 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서의 질병 또는 장애의 치료 방법이 본원에 제공된다. 더욱 구체적인 실시형태에서, 질병 또는 장애를 치료하기 위한 본 발명의 면역 이펙터 세포의 CAR에서의 항체는 SEQ ID NO: 81 내지 90, 128 및 129 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 scFv이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 질병 또는 장애를 치료하기 위한 조작된 면역 이펙터 세포(예컨대 T 세포)는 SEQ ID NO: 91 내지 100, 107 내지 116 및 130 내지 131의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 91 내지 100, 107 내지 116 및 130 내지 131의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 GPC3 연관 질병 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 GPC3-양성 암, 즉, GPC3을 발현하거나 과발현하는 암이다. GPC3-양성 암의 예에는 HCC, 흑색종, 난소 투명 세포 암종, 난황낭 종양(YST), 신경모세포종, 간모세포종, 신장모세포종(윌름스 종양), 폐의 편평 세포 암종, 폐의 선암종, 대세포 폐암종, 소세포 폐암, 정소 비정상피종성 생식 세포 종양, 지방육종, 자궁경부 상피 내 신생물, 부신 선종, 신경집종, 배아 종양, 위암(예컨대 α -태아단백질을 생성하는 위암), 결장직장 암종, 식도암 및 갑상선암이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 HCC이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 흑색종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 난소 투명 세포 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 난황낭 종양(YST)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신경모세포종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 간모세포종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신장모세포종(윌름스 종양)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 폐의 편평 세포 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 폐의 선암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 대세포 폐암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 소세포 폐암이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 정소 비정상피종성 생식 세포 종양이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 지방육종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 자궁경부 상피내 신생물이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 부신 선종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 신경집종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 배아 종양이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 위 암종(예컨대 α -태아단백질을 생성하는 위암)이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 결장직장 암종이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 식도암이다. 일부 실시형태에서, 질병 또는 장애는 갑상선암이다.

[0461] 5.7.2. 진단 및 검출 방법 및 용도

[0462] 또 다른 양태에서, 검출, 예후, 진단, 병기 결정, 하나 이상의 조직 또는 세포 유형에 대한 특정 치료의 결함의 결정, 및/또는 예컨대 GPC3의 검출 및/또는 항체에 의해 인식되는 그의 에피토프의 존재에 의해 대상체에서 치료적 결정의 정보를 제공하기 위한 본원에 제공되는 결함 분자, 예를 들어, GPC3에 결합하는 항체 및 이러한 항체를 함유하는 분자(예컨대 컨쥬게이트 및 복합체)의 이용을 포함하는 방법이 본원에 제공된다.

[0463] 일부 실시형태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-GPC3 항체(예컨대 본원에 기재된 항-GPC3 항체 중 어느 하나)가 제공된다. 추가의 양태에서, 생물학적 시료 내의 GPC3의 존재의 검출 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 당해 방법은 생물학적 시료 내의 GPC3 단백질의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, GPC3은 인간 GPC3이다. 일부 실시형태에서, 당해 방법은 GPC3-발현 질병 또는 장애와 연관된 진단 및/또는 예후 방법이다. 당해 방법은 일부 실시형태에서, 생물학적 시료를 항체와 인큐베이션시키고/시키거나 이로 프로빙하는 단계 및/또는 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 생물학적 시료는 세포 또는 조직 또는 이의 부분, 예컨대 종양 또는 암 조직 또는 그의 생검 또는 섹션을 포함한다. 특정 실시형태에서, 접촉은 시료에 존재하는 GPC3으로의 항-GPC3 항체의 결합을 허용하는 조건 하에서 이루어진다. 일부 실시형태에서, 당해 방법은 시료 내의 GPC3과 항-GPC3 항체 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 것, 예컨대 이러한 결합의 존재 또는 부재 또는 수준을 검출하는 것을 추가로 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체 내 방법일 수 있다. 일 실시형태에서, 항-GPC3 항체는 예를 들어, GPC3이 환자 선택을 위한 바이오마커인 경우 항-GPC3 항체 또는 조작된 항원 수용체를 이용한 치료법에 적절한 대상체를 선택하기 위해 사용된다.

[0464] 일부 실시형태에서, 시료, 예컨대 세포, 조직 시료, 용해물, 조성물, 또는 그로부터 유래된 기타 시료를 항-GPC3 항체와 접촉시키고 항체와 시료(예를 들어, 시료 중 GPC3) 간의 복합체 형성 또는 결합을 결정하거나 검출한다. 동일한 조직 유형의 참조 세포와 비교하여, 시험 시료에서 결합이 입증되거나 검출되는 경우, 이것은 관련된 질병 또는 장애의 존재를 나타낼 수 있고/있거나 항체를 함유하는 치료제가, 시료가 유래된 조직 또는 세포 또는 다른 생물학적 물질과 동일하거나 동일한 유형인 조직 또는 세포에 특이적으로 결합할 것임을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 시료는 인간 조직 유래의 것이며, 예를 들어, 치료될 질병 또는 장애를 갖는 대상체 및/또는 이러한 대상체와 동일한 종이지만 치료될 질병 또는 장애를 갖지 않는 대상체로부터의 이환된 조직 및/또는 정상 조직 유래일 수 있다. 일부 경우에, 정상 조직 또는 세포는 치료될 질병 또는 장애를 갖는 대상체 유래이지만, 그 자체가 이환된 세포 또는 조직이 아닌 것, 예컨대 주어진 대상체에 존재하는 암과 동일한 또는 상이한 기관으로부터의 정상 조직이다.

[0465] 특이적인 항체-항원 결합을 검출하기 위해 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예시적인 면역검정에는 형광 분극 면역검정(FPIA), 형광 면역검정(FIA), 효소 면역검정(EIA), 혼탁 저해 면역검정(NIA), 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 및 방사성면역검정(RIA)이 포함된다. 검정 장비에 이용 가능한 것으로 명시되거나

나 호환 가능한 번역검정 절차로 종종 알려진 다양한 방법의 이용의 필요를 만족하도록, 지시자 모이어티 또는 표지 기가 사용될 수 있다. 예시적인 표지는 방사성핵종(예를 들어, ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H 또는 ^{32}P 및/또는 크롬(^{51}Cr), 코발트(^{57}Co), 불소(^{18}F), 가돌리늄(^{153}Gd , ^{159}Gd), 게르마늄(^{68}Ge), 홀뮴(^{166}Ho), 인듐(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 요오드(^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 란타넘(^{140}La), 루테튬(^{177}Lu), 망간(^{54}Mn), 몰리브덴(^{99}Mo), 팔라듐(^{103}Pd), 인(^{32}P), 프라세오디뮴(^{142}Pr), 프로메티움(^{149}Pm), 레늄(^{186}Re , ^{188}Re), 로듐(^{105}Rh), 루테튬(^{97}Ru), 사마륨(^{153}Sm), 스칸듐(^{47}Sc), 셀레늄(^{75}Se), (^{85}Sr), 황(^{35}S), 테크네튬(^{99}Tc), 티튬(^{201}Ti) 주석(^{113}Sn , ^{117}Sn), 삼중수소(^3H), 제논(^{133}Xe), 이테르븀(^{169}Yb , ^{175}Yb), 이트륨(^{90}Y), 효소(예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 과산화효소, 루시페라제 또는 β -갈락토시다제), 형광 모이어티 또는 단백질(예를 들어, 플루오레세인, 로다민, 피코에리트린, GFP 또는 BFP) 또는 발광 모이어티(예를 들어, 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 퀀텀 닷 코포레이션(Quantum Dot Corporation)에 의해 공급되는 QdotTM 나노입자)를 포함한다. 상기 기재된 다양한 번역검정을 수행하는 데 사용될 다양한 일반적인 기법이 공지되어 있다.

[0466] 특정 실시형태에서, 표지된 항체(예컨대 항-GPC3 항체)가 제공된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티(예컨대, 형광, 색소생성, 전자밀도, 화학발광 및 방사성 표지), 및 예를 들어, 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 다른 실시형태에서, 항체는 표지되지 않으며, 이의 존재는 항체 중 어느 하나에 결합하는 표지된 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

[0467] 5.8. 키트 및 제조 물품

[0468] 본원에 기재된 항체, 키메라 항원 수용체 또는 조작된 면역 이펙터 세포 중 어느 하나를 포함하는 키트, 단위 투여량 및 제조 물품이 추가로 제공된다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물 중 어느 하나를 함유하고, 바람직하게는 이의 이용에 대한 설명서를 제공하는 키트가 제공된다.

[0469] 본 출원의 키트는 적합한 패키징으로 존재한다. 적합한 패키징은 바이얼, 보틀, 병, 가요성 패키징(예를 들어, 밀봉된 Mylar 또는 플라스틱 백) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 키트는 선택적으로 추가의 구성성분, 예컨대 완충제 및 설명 정보를 제공할 수 있다. 이에 따라, 본 출원은 또한, 바이얼(예컨대 밀봉된 바이얼), 보틀, 병, 가요성 패키징 등을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0470] 제조 물품은 용기, 및 용기 상의 또는 용기와 연관된 표지 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어, 보틀, 바이얼, 주사기 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 일반적으로, 용기는 본원에 기재된 바와 같은 질병 또는 장애(예컨대, 암)를 치료하는 데 효과적인 조성물을 수용하며, 멸균 접근 포트(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥 내 용액 백 또는 바이얼일 수 있음)를 가질 수 있다. 표지 또는 패키지 삽입물은 조성물이 개체에서 특정 질환을 치료하는 데 사용됨을 나타낸다. 표지 또는 패키지 삽입물은 개체에 조성물을 투여하기 위한 설명서를 추가로 포함할 것이다. 표지는 재구성 및/또는 사용 지침을 나타낼 수 있다. 약제학적 조성물을 수용하는 용기는 재구성된 제형의 반복 투여(예를 들어, 2 내지 6회 투여)를 허용하는 다중-이용 바이얼일 수 있다. 패키지 삽입물은 이러한 치료적 생성물의 사용에 관한 적응증, 사용, 투여량, 투여, 금기사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 치료적 생성물의 상업적 패키지에 관례적으로 포함된 설명서를 지칭한다. 추가로, 제조 물품은 약제학적으로-허용 가능한 완충제, 예컨대, 주사용 정균수(BWFI), 인산염-완충된 식염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0471] 키트 또는 제조 물품은 약국, 예를 들어, 병원 약국 및 복합 약국에서 저장 및 사용하기에 충분한 양으로 포장된, 다중 단위 용량의 약제학적 조성물 및 사용 설명서를 포함할 수 있다.

[0472] 간결성을 위해, 특정 약어가 본원에 사용된다. 하나의 예는 아미노산 잔기를 나타내는 1 문자 약어이다. 아미노산 및 이들의 상응하는 3 문자 및 1 문자 약어는 다음과 같다:

아미노산	3 문자	1 문자	아미노산	3 문자	1 문자
알라닌	Ala	(A)	류신	Leu	(L)
아르기닌	Arg	(R)	라이신	Lys	(K)
아스파라긴	Asn	(N)	메티오닌	Met	(M)
아스파르트산	Asp	(D)	페닐알라닌	Phe	(F)
시스테인	Cys	(C)	프롤린	Pro	(P)
글루탐산	Glu	(E)	세린	Ser	(S)
글루타민	Gln	(Q)	트레오닌	Thr	(T)
글리신	Gly	(G)	트립토판	Trp	(W)
히스티딘	His	(H)	티로신	Tyr	(Y)
이소류신	Ile	(I)	발린	Val	(V)

[0473]

[0474]

본 개시는 일반적으로 수많은 실시형태를 기재하기 위하여 긍정어를 사용하여 본원에 개시된다. 본 개시는 또한 구체적으로 물질 또는 재료, 방법 단계 및 조건, 프로토콜, 절차, 검정 또는 분석과 같은 특정 주제가 완전히 또는 부분적으로 배제된 실시형태를 포함한다. 따라서, 일반적으로 본 개시가 포함하지 않는 것이 본 개시에서 표현되지 않더라도, 명시적으로 본 개시에 포함되지 않은 양태가 그럼에도 불구하고 본원에 개시된다.

[0475]

본 개시의 다수의 실시형태가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 다양한 변형이 본 개시의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 하기 실시예는 청구범위에 기재된 본 개시의 범위를 제한하지 않고 예시하는 것으로 의도된다.

[0476]

6. 실시예

[0477]

하기는 연구에 사용된 다양한 방법 및 재료의 설명이며, 당업자에게 본 개시를 실행하고 사용하는 방법의 완전한 개시 및 설명을 제공하도록 제시되고, 본 발명자들이 이들의 개시로 간주하는 것의 범주를 제한하도록 의도되는 것도 아니고 하기 실험이 수행되었고, 모든 실험이 수행될 수 있음을 이들이 나타내도록 의도되는 것도 아니다. 현재 시제로 작성된 예시적인 설명은 반드시 수행된 것은 아니지만 본 개시의 교시와 관련된 데이터 등을 생성하기 위해 설명이 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 백분율 등)와 관련하여 정확도를 보장하기 위한 노력이 이루어졌지만, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다.

[0478]

6.1. 실시예 1 - 항-GPC3 항체의 생성

[0479]

동물 면역화 및 면역 반응 시험

[0480]

GPC3에 대한 항체를 진스크립트(GenScript)의 서비스 주문을 이용하여 하이브리도마 플랫폼에 의해 발생시켰다. 인간 재조합 단백질 GPC3(ACRO, 카탈로그 번호 GP3-H5223)을 진스크립트의 이뮤노플러스(ImmunoPlus)TM 기술에 의해 변형시켰다. 200 μ l의 프로인트 완전 애쥬번트(시그마, 카탈로그 번호 F5881) 및 50 μ g GPC3 융합 단백질(SEQ ID NO: 106)을 함유하는 1:1 에멀전을 사용하여 암컷 Balb/c 및 C57bl/6 마우스를 피하로 면역화시켰다. 이어서, 면역성을 향상시키기 위하여, 2주마다 프로인트 불완전 애쥬번트(시그마, 카탈로그 번호 F5506) 및 25 μ g GPC3 융합 단백질을 함유하는 1:1 에멀전을 사용하여 피하와 교대로 복강내 주사를 마우스에서 사용하였다. 409번 및 416번을 제외하고, 다른 마우스의 혈청 역가는 5회의 면역화 후에 10⁵ 초과였다.

[0481]

가장 높은 항체 역가를 갖는 2마리의 마우스(410번 및 412번)에는 25 μ g GPC3 융합 단백질(애쥬번트 부재)로의 복강내 부스트를 제공하였으며, 하이브리도마 융합을 위하여 선택하였다. 2마리의 면역화된 마우스의 혈청은 또한, 전형적인 GPC3⁺ HepG2 세포(ATCC, 카탈로그 번호 HB-8065)에 대하여 유의미한 결합 활성을 보였다. 시험-출혈 혈청 중 항체는 HepG2 세포로의 결합을 보였으며, 410번 마우스에 대하여 19.1 내지 112이고, 412번 마우스에 대하여 19.1 내지 62.9였다.

[0482]

항-GPC3 항체의 스크리닝

[0483]

전장 인간, 마우스 또는 사이노물구스 원숭이 GPC3 인코딩 cDNA(각각 NM_004484.3, NM_016697.3 또는 XM_005594608.2)를 진스크립트의 서비스를 이용하여 플라스미드 PLVX-puro(클론테크(Clontech), 카탈로그 번호 632164) 내로 합성한 다음, 플라스미드를 각각 PLVX-huGPC3, PLVX-muGPC3 또는 PLVX-cmGPC3으로 명명하였다. 고-역가 재조합 렌티바이러스를 생성하였으며, SK-HEP-1 세포(ATCC, 카탈로그 번호 HTB-52)로 형질도입하였다. 100 μ l의 렌티바이러스 상청액(100 $\times$ 농축)을 6-웰 플레이트 내의 50만개의 표적 세포에 첨가하고, 혼합물을 원심분리기(1200g, 32 $^{\circ}$ C, 90분)를 통해 인큐베이션시켰다. 푸로마이신을 사용한 스크리닝 후에, GPC3의 시험관내

세포의 발현을 유세포측정을 통해 모니터링하였다. PE 컨쥬게이트된 항-GPC3 특이적인 모노클로날 항체(R&D, 카탈로그 번호 FAB2119P)를 검출 항체로서 사용하였다. 이 방법 후에, 표지된 SK-HEP-1-huGPC3의 평균 형광 세기(MFI)는 SK-HEP-1 세포의 것보다 7.67배 더 높았다(각각 MFI 값 1350, 176). 표지된 SK-HEP-1-cmGPC3의 MFI는 SK-HEP-1 세포의 것보다 4.36배 더 높았다(각각 MFI 값 768, 176). 동시에, 표지된 SK-HEP-1-muGPC3의 MFI는 또한, SK-HEP-1 세포의 것보다 더 높았다.

[0484] 마지막 부스트 3일 후에, 우수한 역가를 갖는 마우스 유래의 비장세포를 멸균적으로 준비하고, 표준 하이브리도마 생성 프로토콜에 따라 sp2/0 세포와 융합시켰다. 인간 또는 사이노물구스 GPC3 트랜스펙션된 SK-HEP-1 세포를 1×10^5 개 세포/웰의 밀도로 96-웰 U-바닥 플레이트(BD)에 플레이팅하였다. 하이브리도마 상청액을 플레이트로 옮기고, 4°C에서 1시간 동안 세포와 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 염색 완충제(BSA/1×PBS)로 2회 세척하였다. PE-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG Fc 항체(잭슨(Jackson), 카탈로그 번호 115115164)를 첨가하고, 암 중에 4°C에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 2회 세척하고, 100 μ l의 염색 완충제 중에 재현탁화시켰다. 형광 세기를 유세포측정에 의해 측정하고, FlowJo에 의해 분석하였다.

[0485] 하이브리도마 상청액을 일차 스크린을 위해 사용하였다. 일차 결합 스크린에 의해, 항원-특이적 결합 항체를 생성할 수 있었던 30개의 하이브리도마를 확인하였다. 양성 결합제를 서브클로닝을 위해 선택하였다. 각각의 선택된 세포주의 하이브리도마 세포를 96-웰 플레이트에 1개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 10 내지 12일 동안 가습 인큐베이터에서 유지하였다. 단일의 클론을 선택하고, FACS에 의해 시험하였다. 선택된 서브클론을 정제하고, 결합 검정, 교차-과 결합 검정 및 비닝 검정에서 추가로 평가하였다.

[0486] 모노클로날 항체를 신속 ELISA SBA 클로노타이핑 시스템(Clonotyping System)-HRP 키트(서던 바이오테크(Southern Biotech), 카탈로그 번호 5300-05)에 의해 확인하였다. 전체 RNA를 TRIzol에 의해 하이브리도마 세포로부터 추출하고, 항체 하위유형의 특이적인 및 범용 프라이머(타카라(Takara), 카탈로그 번호 6210A)를 사용함으로써 cDNA로 역전사시켰다. 마우스 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄 V-영역 단편을 RACE-PCR(타카라, 카탈로그 번호 28001488)에 의해 증폭시키고, pMD18-T 벡터 시스템(타카라, 카탈로그 번호 D101A) 내로 서브클로닝하였다. 삽입된 단편을 벡터-특이적 프라이머에 의해 서열분석하였다. 마지막으로, LAb19301, LAb19302, LAb19303, LAb19304, LAb19305, LAb19306, LAb19307, LAb19308, LAb19309 및 LAb19310의 특유한 V-영역 뉴클레오티드/단백질 서열을 획득하였다. 항체 아이소타입을 클로노타이핑 시스템-HRP(서던바이오테크)를 사용하여 결정하였다. 선택된 항원 특이적 클론의 CDR 서열은 하기와 같이 표 3 및 표 4에 나타나 있다.

[0487] [표 3]

선택된 클론 유래의 중쇄 CDR 영역의 아미노산 서열

클론 식별번호	HCDR1	HCDR2	HCDR3
LAb19301	SGFSWH (SEQ ID NO: 1)	FMQYSGNTNYPNLSKS (SEQ ID NO: 11)	REEGAWFAY (SEQ ID NO: 21)
LAb19302	TYGMS (SEQ ID NO: 2)	YISSGGATTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 12)	LSIMIRGWFAY (SEQ ID NO: 22)
LAb19303	DYEMH	AIDPETGATAYNQKFKG	YYSFAY

[0488]

	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 23)
LAbl9304	AYEMH (SEQ ID NO: 4)	GIDPETGNTAYSQKFKG (SEQ ID NO: 14)	YYSEAY (SEQ ID NO: 24)
LAbl9305	AYEMH (SEQ ID NO: 5)	GIDPETGNTAYSQNFKG (SEQ ID NO: 15)	YYSEAY (SEQ ID NO: 25)
LAbl9306	TYDMS (SEQ ID NO: 6)	YISSGGATTYYPDsvKG (SEQ ID NO: 16)	LsLMIRGWFAY (SEQ ID NO: 26)
LAbl9307	TYDMS (SEQ ID NO: 7)	YISSGGNSPYYPQTVKG (SEQ ID NO: 17)	QNIARRGAMDF (SEQ ID NO: 27)
LAbl9308	TYGMS (SEQ ID NO: 8)	YISSGGANTYYPDsvKG (SEQ ID NO: 18)	LSTLVRGWFAY (SEQ ID NO: 28)
LAbl9309	DYEMH (SEQ ID NO: 9)	GIDPETGNTAYSQKFKG (SEQ ID NO: 19)	YYSEAY (SEQ ID NO: 29)
LAbl9310	VSPMT (SEQ ID NO: 10)	LIHPYNGDTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 20)	WGNYYPYAMDY (SEQ ID NO: 30)

[표 4]

전역원: 유래의 정제 CDR 영역의 아미노산 서열

클론 식별번호	LCDR1	LCDR2	LCDR3
LAbl9301	GSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 31)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 41)	SQSTHFPFT (SEQ ID NO: 51)
LAbl9302	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 32)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 42)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 52)
LAbl9303	RSSQSFVHSNGNTYLQ (SEQ ID NO: 33)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 43)	FQGSHPVYT (SEQ ID NO: 53)
LAbl9304	RSSQTIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 34)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 44)	FQVSHVPYT (SEQ ID NO: 54)
LAbl9305	RSSQTIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 35)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 45)	FQVSHVPYT (SEQ ID NO: 55)
LAbl9306	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 36)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 46)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 56)
LAbl9307	TSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 37)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 47)	SQSTHVPPT (SEQ ID NO: 57)
LAbl9308	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 38)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 48)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 58)

	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 58)
LAbl9309	RSSQTIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 39)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 49)	FQVSHVPYT (SEQ ID NO: 59)
LAbl9310	KASQNVRSIVA (SEQ ID NO: 40)	LTSNRHT (SEQ ID NO: 50)	LQHWNPYT (SEQ ID NO: 60)

항-GPC3 항체의 정제

pH를 7.0으로 조정 한 후에, 수거된 하이브리도마 상청액을 단백질 A 컬럼(지이 헬스케어(GE Healthcare), 카탈로그 번호 17040201)에 로딩하였다. 항체를 글리신에 의해 용리한 후에, 1 M 트리스를 사용하여 즉시 중화시켰다. 항체 농도를 나노 드롭(Nano Drop)에 의해 시험하였다. 단백질의 순도를 SDS-PAGE(진스크립트 카탈로그 번호 M42012)에 의해 평가하였다. 농도를 A280 방법에 의해 결정하였다. 단백질 발현의 대표적인 데이터는 표 5에 요약되어 있다.

[0495] [표 5]

항체 발현 정보

세포 코드	순도	농도 (mg/mL)
LAbl9301	약 92%	0.607
LAbl9302	약 97%	1.407
LAbl9303	약 92%	1.299
LAbl9304	약 95%	1.407
LAbl9305	약 98%	1.458
LAbl9306	약 91%	1.779
LAbl9307	약 93%	0.607
LAbl9308	약 93%	1.710
LAbl9309	약 93%	1.279
LAbl9310	약 93%	0.607

[0496]

[0497] 항-GPC3 항체의 친화성

[0498] 제조함 인간 GPC3에 대한 항체의 결합 반응속도를 표면 플라즈몬 공명(SPR)(예를 들어, 비아코어(Biacore))에 의해 측정하였다. 결합 속도(K_a) 및 해리 속도(K_d)를 간단한 일대일 랑뮤어(Langmuir) 결합 모델(비아코어 평가 소프트웨어(Biacore Evaluation Software))을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수(K_D)는 비 K_d/K_a 로 계산된다. 항-인간 GPC3 항체의 측정된 결합 친화성은 표 6에 나타나 있다.

[0499] [표 6]

단백질에 대한 GPC3 항체의 친화도 측정

리간드	분석물	Chi^2 (RU ²)	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)	R_{max} (RU)
LAbl9301	hGPC3	0.0976	1.69E-04	2.07E-03	1.22E-07	31.63
LAbl9302	hGPC3	0.28	2.58E-04	0.001835	7.12E-08	45.74
LAbl9303	hGPC3	0.449	3.34E-04	4.60E-04	1.38E-08	41.41
LAbl9304	hGPC3	0.35	2.70E-04	1.38E-04	5.11E-09	56.51
LAbl9305	hGPC3	0.0782	3.11E-04	1.30E-04	4.19E-09	32.97
LAbl9306	hGPC3	0.216	2.71E-04	7.70E-04	2.84E-08	16.7
LAbl9307	hGPC3	0.347	3.02E-04	0.001776	5.87E-08	64.69
LAbl9308	hGPC3	0.0532	2.47E-04	0.001022	4.14E-08	33.46
LAbl9309	hGPC3	0.268	2.33E-04	1.95E-04	8.38E-09	60.01
LAbl9310	hGPC3	1.4	3.69E-04	4.65E-04	1.26E-08	70.87

[0500]

[0501] FACS에 의한 GPC3 세포주로의 결합

[0502] SK-HEP-1-huGPC3 세포 및 SK-HEP-1-cmGPC3을 96-웰 U-바닥 플레이트(BD)에서 1×10^5 개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 정제된 항체를 염색 완충제 중에 희석하고, 4℃에서 1시간 동안 세포와 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 염색 완충제(BSA/1×PBS)로 2회 세척하였다. PE-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG Fc 항체를 첨가하고, 4℃에서 암 중에 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 2회 세척하고, 100 μ l의 염색 완충제 중에 재현탁화시켰다. 형광 세기를 유세포측정에 의해 측정하고, FlowJo에 의해 분석하였다.

[0503] 표 7에 나타낸 바와 같이, 모든 항체는 SK-HEP-1-huGPC3에 특이적으로 결합할 수 있었지만, 빈 SK-HEP-1 세포에는 그렇지 않았다. 또한, 일부 GPC3 항체는 또한, 마우스 GPC3과 교차-반응할 수 있으며, 이는 잠재적인 안전성 평가 방법을 제공할 것이다.

[0504] [표 7]

GPC3 세포주에 대한 항체의 결합 능력

단백질 코드	양성 결합, %			
	SK-HEP-1 상의 결합	SK-HEP-1-huGPC3 상의 결합	SK-HEP-1-muGPC3 상의 결합	SK-HEP-1-cmGPC3 상의 결합
LAB19301	n.s.	72.6	17.5	18.5

[0505]

LAB19302	n.s.	91.5	81.8	12.3
LAB19303	n.s.	92.6	0.72	83.1
LAB19304	n.s.	91.9	25.6	94.6
LAB19305	n.s.	92.6	17.0	94.2
LAB19306	n.s.	86.2	75.8	3.32
LAB19307	n.s.	92.9	83.3	11.6
LAB19308	n.s.	91.4	82.4	9.55
LAB19309	n.s.	92.7	1.02	91.9
LAB19310	n.s.	91.3	83.9	22.3
아이소타입	n.s.	0.85	0.91	0.43

[0506]

[0507] 6.2. 실시예 2 - 단일특이적 scFv 기반의 키메라 항원 수용체(CAR)의 제조 및 시험관내 스크리닝

[0508]

N-말단에서 C-말단으로 CD8 α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 102), CD8 α 막횡단 도메인(SEQ ID NO: 103), CD137 동시-자극 신호전달 도메인(SEQ ID NO: 104) 및 CD3 ζ 세포질 신호전달 도메인(SEQ ID NO: 105)을 포함하는 CAR 백본 폴리펩티드를 인코딩하는 CAR 백본 서열을 화학적으로 합성하고, 사전-변형된 PT7 벡터 내에 다운스트림으로 구성성 T7 프로모터에 작동 가능하게 연결되게 클로닝하였다. 생성된 CAR 백본 벡터는 명칭이 "PT7-T7-LB193"이었다. 벡터 내의 다중-클로닝 부위(MCS)는 항-GPC3 scFv 단편의 N-말단에 융합된 CD8 α 신호 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열(SEQ ID NO: 101)에 작동 가능하게 연결된 코작 서열을 포함하는 핵산 서열이 CAR 백본 벡터 내에 업스트림으로 CAR 백본 서열에 작동 가능하게 연결되어 삽입되게 한다. CD8 α 신호 펩티드 및 항-GPC3 scFv 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 화학적으로 합성하고, 당업계에서 공지되어 있는 분자 클로닝 기법에 의해 *Mlu*I(5'-ACGCGT-3')(SEQ ID NO: 140) 및 *Spe*I(5'-ACTAGT-3')(SEQ ID NO: 141) 제한 부위를 통해 PT7-T7-LB193 내로 클로닝하였다. RNA의 시험관내 전사에 필요한 요소를 pUC57 벡터(진스크립트, 카탈로그 번호 SD1176)에 클로닝함으로써 PT7-T7-LB193 벡터를 구축하였다.

[0509]

각각 LAB19301 내지 LAB19310 모노클로날 항체(SEQ ID NO: 81 내지 90)의 VH와 VL을 조합함으로써 10개의 항-GPC3 scFv, LAB19301 내지 LAB19310 scFv를 생성하여, 단일특이적 CAR을 PT7-T7-LB193 벡터 백본 내로 구축하였다. 인간 CD8 α 리더 서열, 인간 CD8 α 막횡단 도메인 및 인간 T 세포 수용체의 CD137 및 CD3 제타쇄의 세포 내 신호전달 도메인을 융합시킴으로써 각각의 항-GPC3 scFv를 추가로 변형시켜, 키메라 항원 수용체를 생성하였다. 선택된 scFv 클론을 인코딩하는 핵산 서열을 CD8 α 신호 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열의 3'에 작동 가능하게 연결하였다. 융합 핵산 서열을 화학적으로 합성하고, 당업계에서 공지되어 있는 분자 클로닝 기법에 의해 *Mlu*I(5'-ACGCGT-3')(SEQ ID NO: 140) 및 *Spe*I(5'-ACTAGT-3')(SEQ ID NO: 141) 제한 부위를 통해 PT7-T7-LB193 CAR 백본 내로 클로닝하였다.

[0510]

GPC3 CAR DNA를 선형화시킨 다음, mMESSAGE mMACHINE T7 RNA 전사 키트(써모피셔(ThermoFisher)#AM1344)를 사용하여, RNA를 합성하였다. 전사 키트를 사용하여, 모든 RNA를 생성하였다. 번역 개시 효율을 향상시키기 위한 시험관내 전사된 RNA의 폴리아데닐화를 위하여, 폴리(A) 테일링(Tailing) 키트(써모피셔#AM1350)를 사용하여, 모든 mRNA는 적어도 150개 뉴클레오타이드 길이의 폴리(A) 테일을 RNA의 3' 말단에 부가하였다. RNA를 캡핑 및 폴리(A) 테일링 후에 RNeasy Mini 키트(퀴아젠(QIAGEN)#74104)로 정제하였다.

[0511]

T 세포 정제

[0512]

PBMC를 헤마케어(Hemacare)(#17044560)부터 구입하였다. 인간 T 세포를 하기 기재된 바와 같은 제조처의 프로토콜에 따라 Pan T 세포 분리 키트(밀테니이(Miltenyi) #130-096-535)를 사용하여 PBMC로부터 정제하였다. 세포

수를 결정하고, 세포 현탁액을 300 g에서 10분 동안 원심분리하였다. 이어서, 상청액을 완전히 흡인하고, 세포 펠렛을 10^7 개의 총 세포당 $40 \mu\text{l}$ 의 완충제 중에 재현탁화시켰다. 10^7 개의 총 세포당 $10 \mu\text{l}$ 의 Pan T 세포 비오틴-항체 카테일을 첨가하고, 완전히 혼합하고, 냉장고(2 내지 8°C)에서 약 5분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 10^7 개의 세포당 $30 \mu\text{l}$ 의 완충제를 첨가하였다. 10^7 개의 세포당 $20 \mu\text{l}$ 의 Pan T 세포 마이크로비드 카테일을 첨가하였다. 세포 현탁액 혼합물을 잘 혼합하고, 냉장고(2 내지 8°C)에서 추가 10분 동안 인큐베이션시켰다. 자성 분리에는 최소 $500 \mu\text{l}$ 가 필요하였다. 자성 분리를 위하여, LS 컬럼을 적합한 MACS 분리기의 자기장에 배치하였다. 3 ml 의 완충제로 행굼으로써 컬럼을 준비하였다. 이어서, 세포 현탁액을 컬럼 상에 적용하고, 비표지된 세포를 함유하는 통과액을 수집하였으며, 이는 농축된 T 세포 분획을 나타낸다. 컬럼을 3 ml 의 완충제로 세척하고, 통과하는 비표지된 세포를 수집함으로써 추가의 T 세포를 수집하였다. 이들 비표지된 세포는 다시 농축된 T 세포를 나타내었으며, 이전 단계로부터의 통과액과 조합하였다. 이어서, 플링된 농축된 T 세포를 원심분리하고, RPMI-1640+300IU/ml(IL-2)에 재현탁화시켰다.

[0513] 항-CD3/CD28 MACSiBead 입자를 $10 \mu\text{l}$ /백만개의 비드-대-세포 비로 첨가하는 제조처의 프로토콜에 따라 준비된 T 세포를 이어서 인간 T 세포 TransAct 키트(밀테니이#130-111-160)를 사용하여 48시간 동안 사전-활성화시켰다.

[0514] CAR-T 세포 제조를 위하여, 사전-활성화된 T 세포를 $130 \mu\text{l}$ 의 전기천공법 완충제(셀레트릭스(Celetrix)#13-0104) 중에 5×10^6 개의 세포로 재현탁화시켰으며, $10 \mu\text{g}$ 의 mRNA를 전기천공법을 위해 첨가하였다. 비-전기천공된 T 림프구를 음성 대조군으로서 사용하였으며, 상이한 항-GPC3 scFv CAR을 발현하는 전기천공된 T 세포의 양성률은 67.4% 내지 85.6%였다(도 1).

[0515] 세포독성 검정

[0516] 표적 세포는 GPC3 양성 인간 간세포 암종(HCC) 세포주 HepG2.Luc(ATCC#HB-8065), Huh7.Luc(코비오에르(Cobioer)#CBP60202) 또는 GPC3 음성 세포주 SK-HEP1.Luc(ATCC#HTB-52), A549.Luc(ATCC#CRM-CCL-185) 세포주였다. 모든 세포주를 당업계에 공지된 기법을 사용하여 반딧불이 루시퍼라제를 발현하도록 조작하였다. GPC3 CAR-T 세포 및 표적 세포를 상이한 비로 혼합하고(각각 2×10^3 개 세포/웰), 384-웰 플레이트에서 24시간 동안 배양하였다. 종양 세포에 대한 CAR-T의 세포독성을 검정하기 위하여, One-glo 발광 루시퍼라제 검정 시약(프로메가(Promega)#E6110)을 제조처의 프로토콜에 따라 제조하고, 동시-배양된 세포에 첨가하여, 웰 내의 남아 있는 루시퍼라제 활성을 검출하였다. 루시퍼라제가 종양 세포에서만 발현되기 때문에, 웰 내의 남아 있는 루시퍼라제 활성은 웰 내의 생존 가능한 표적 세포의 수와 직접적인 상관 관계가 있다. 배양 배지를 이펙터 세포의 부재 하에 표적 세포에 첨가함으로써 최대 루시퍼라제 활성을 수득하였다. 트리톤(Triton) X-100을 세포독성 검정이 개시되는 시간에 1%의 최종 농도로 첨가함으로써 최소 루시퍼라제 활성을 결정하였다. 특이적인 세포독성을 하기 식에 의해 계산하였다: 특이적 세포독성%= $100 \times (1 - (\text{RLU시료} - \text{RLU최소}) / (\text{RLU최대} - \text{RLU최소}))$.

[0517] 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, GPC3 CAR-T 세포는 용량 의존적 방식으로 GPC3 양성-HCC 세포주 HepG2.Luc 및 Huh7.Luc 세포에 대하여 상이한 수준의 세포독성을 나타내었다. 그러나 CAR-T 세포는 UnT와 비교하여 GPC3 음성 세포주 SK-HEP1.Luc 및 A549.Luc에 대하여 강력한 세포독성을 보이지 않았다. 이들 클론 중에, LIC19301 CAR-T 세포, LIC19303 CAR-T 세포 및 LIC19309 CAR-T 세포는 세포독성 데이터에 따라 가장 강력하였다. LIC19301 CAR-T 세포, LIC19303 CAR-T 세포 및 LIC19309 CAR-T 세포는 5:1의 E/T 비에서 HepG2.Luc 및 Huh7.Luc 세포 둘 모두에 대하여 거의 100% 세포독성을 보였다.

[0518] IFN-감마 및 TNF-알파 방출

[0519] GPC3 양성 암 세포에 대한 세포독성 활성화에 더하여, IFN- γ 및 TNF- α 를 생성하는 GPC3 CAR-T 세포의 능력을 분석하였다. GPC3 CAR-T 세포 및 표적 세포(Huh7 또는 SK-HEP1)를 2(각각 2×10^3 개의 표적 세포/웰)의 E/T 비로 혼합하고, 384-웰 플레이트에서 24시간 동안 배양하고, 배양 상청액에서 생성되는 IFN- γ 및 TNF- α 의 농도를 ELISA에 의해 측정하였다. 결과적으로, 상기 10가지 유형의 scFv 클론으로부터 유래된 모든 GPC3 CAR-T 세포는 GPC3의 발현에 따라 IFN- γ 및 TNF- α 를 생성하는 능력을 보였다. IFN- γ 및 TNF- α 방출은 둘 모두 CAR 및 GPC3 항원 특이적이었지만, 상이한 CAR-T 세포 간에 달라졌으며, 세포독성 효력과 유의미한 상관관계를 보이지 않았다. 도 4에 나타난 바와 같이, CAR-T 세포에 의해 분비되는 IFN- γ 및 TNF- α 의 농도는 GPC3-기반의 활성화 후에 5809.7 내지 24997.2 pg/ml (IFN- γ) 및 1638.1 내지 5667.9 pg/ml (TNF- α)의 범위 내에서 유의미하게 증가되었다. LIC19303 CAR-T 세포, LIC19304 CAR-T 세포, LIC19305 CAR-T 세포 및 LIC19309 CAR-T 세포는 GPC3 양성 Huh7 세포와의 동시-배양 후에 시험된 모든 CAR-T 세포 중에 가장 높은 사이토카인 방출 수준을 나타내는

한편, 모든 항-GPC3 CAR-T 세포는 GPC3 음성 SK-HEP1 세포와 동시-배양되어 특이적인 활성화 및 사이토카인 분비를 보이지 않았다.

[0520] **6.3. 실시예 3 - 생체내에서의 입양 전달 후의 GPC3 CAR-T 세포의 항-종양 효과**

[0521] LIC19309 CAR-T 세포의 생체내 항-종양 효능을 NCG 마우스 이종이식편 모델에서 평가하였다. NOD/Nju 마우스 내의 *Prkdc* 및 *I12rg* 유전자좌의 순차적인 CRISPR/Cas9 편집에 의해 이 모델을 생성하여, NOD/Nju와 유사유전자형인 마우스를 생성하였다. NOD/Nju는 외래 조혈 줄기 세포의 생착을 가능하게 하는 *Sirpa*(*SIRP α*) 유전자 내의 돌연변이를 보유한다(문헌[Schuler et al., Cell, 1986, 46(7): 963-972]; 문헌[Sugamura et al., Annual review of immunology, 1996, 14(1): 179-205]; 문헌[Yamauchi et al., The Journal of the American Society of Hematology, 2013, 121(8): 1316-1325]).

[0522] *Prkdc* 낙아웃은 적절한 T-세포 및 B-세포 형성이 결여된 SCID-유사 표현형을 생성한다. *I12rg* 유전자의 낙아웃은 SCID-유사 표현형을 추가로 악화시키는 한편, NK 세포 생성의 감소를 추가로 초래한다. 이 "삼중-면역결핍" 마우스 스트레인은 SCID 및 누드 마우스를 포함하는 통상적으로 사용되는 면역결핍 마우스 스트레인보다 더 면역억제된다. *Prkdc* 및 *I12rg*는 T 세포, B 세포, NK 세포 및 더 낮은 정도로 수지상 세포의 성숙 및 형성에 영향을 미치는 유전자의 SCID(중증 복합 면역결핍) 과의 부분이다. DNA-의존적 단백질 키나제 효소의 촉매적 서브유닛을 인코딩하는 *Prkdc* 유전자의 파괴는 성숙 T 및 B 세포의 항체 다양성을 전파하는 데 필요한 V(D)J 재조합에 필요한 기능을 감소시킨다. IL-2 및 다수의 IL 수용체(IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21)에서 관찰되는 공통 감마 서브유닛을 인코딩하는 *I12rg*의 파괴는, 수용체가 결합하고, 사이토카인-매개된 신호전달을 유도하는 데 필요하기 때문에, 미성숙 림프구(T, B 및 NK 세포) 및 기타 백혈구가 성숙에 도달하는 것을 방지한다. NCG 마우스 스트레인은 이종이식편 세포, 조직 및 인간 면역계 구성성분을 관리할 수 있는 다른 삼중-면역결핍 모델과 유사하며, 이에 따라, 종양 생물학 및 면역-종양학, 감염성 질병, 이식편-대-숙주병(GvHD), 조혈의 연구 및 조직 이식 연구를 가능하게 한다.

[0523] 이 스트레인을 추가로 2016년도에 찰스 리버(Charles River)로 전달하였으며, 현재 북미 소비자에게 이용 가능하며, 명칭은 NOD-*Prkdc*^{em26Cd52}*I12rg*^{em26Cd22}/NjuCr1 및 스트레인 코드: 572이다. NCG 모델의 성능 데이터는 예를 들어, 문헌[Shultz et al., The Journal of Immunology, 1995, 154(1): 180-191]; 문헌[Covassin et al., Clinical & Experimental Immunology, 2011, 166(2): 269-280]; 및 문헌[Ma and Huang, The FEBS journal, 2014, 281(23): 5186-5193]에 기재되었다.

[0524] 피하 이종이식편 모델을 위하여, 6 내지 7주령의 40마리의 NCG 마우스에 Huh7 세포를 우측 앞다리에 피하 접종하였다(1×10^7 개의 세포/마우스). 평균 종양 부피가 100 mm³(이종이식편 접종 6일 후)에 도달한 때, 마우스를 3개의 군으로 무작위화시키고, 각각 꼬리 정맥 주사에 의해 LIC19309 CAR-T 세포(2 M/마우스), 비-전기천공된 T 세포(2 M/마우스) 및 용매 단독으로 처리하였다. 종양 크기를 디지털 캘리퍼를 사용하여 주 2회 측정하였다. 종양 부피를 하기 식에 따라 계산하였다:

$$\text{종양 부피} = \frac{(\text{길이}) \times (\text{너비})^2}{2}$$

. 또한, 마우스 혈액 중 인간 CD3 양성 T 세포를 입양 전달 후 제7일, 제14일 및 제21일에 FACS에 의해 검출하였다.

[0525] 도 5(파트 a)에 나타난 바와 같이, LIC19309 CAR-T 세포의 입양 전달을 시행한 마우스는 제16일에 UnT 군에 비하여 종양 크기의 78.9% 감소(100.0 mm³ 대 474.8 mm³)를 갖는 것으로 관찰되었으며, 이는 LIC19309 CAR-T 세포가 종양 감소에 있어 강력한 것을 뒷받침한다. 도 5(파트 b)에 나타난 바와 같이, 마우스 말초 혈액 세포에서의 CAR 유전자 카피 수를 디지털 PCR에 의해 검출하였으며, LIC19309 CAR-T는 제7일부터 표적-의존적인 유의미한 증대를 나타내었으며, 적어도 2주 동안 계속되었다. 제14일의 LIC19309 CAR-T 세포의 카피수는 제0일의 것보다 281.4배였다(107.888 대 0.3833). 이 실험 동안 모든 3개의 군에서 마우스 체중 감소가 관찰되지 않았다(도 5, 파트 c).

[0526] **6.4. 실시예 4 - 항-GPC3 인간화 항체의 생성**

[0527] 마우스 항체의 인간화 설계

[0528] 항체 인간화를 수행하기 위하여 항체 LAb19309 및 LAb19305를 선택하였다. 항-GPC3 mAb의 가변 도메인 서열을 인간 IgG 생식계열 데이터베이스에 대하여 검색하였다. 각각의 항체에 대하여 높은 상동성을 갖는 3개의 인간 프레임워크 서열을 경쇄 및 중쇄 둘 모두를 위한 인간 수여자로서 선택하였다. 첫과 항체의 CDR을 인간 생식계열의 FR에 이식함으로써 인간화된 VH 쇄 또는 VL 쇄를 제조하였다. 일부 예에서, 복귀돌연변이는 첫과 생식계열

과 일치할 수 있지만, 다른 경우에, 그렇지 않을 수 있다(체세포 돌연변이의 경우와 같음). 3개의 중쇄의 인간화 LAB19309 및 LAB19305 가변 도메인을 각각 9VH1, 9VH2, 9VH3 및 5VH1, 5VH2, 5VH3으로 표기하는 한편, 3개의 경쇄의 인간화 가변 도메인을 VL1, VL2, VL3으로 표기하였다. 인간화된 VH 및 VL뿐만 아니라 상응하는 인간 생식계열의 서열 정보는 표 8에 나타나 있다.

[표 8]

인간화 항체 가변 도메인

인간화 가변 체 코드	인간화 가변 체 SEQ ID NO.
9VH1	SEQ ID NO: 117
9VH2	SEQ ID NO: 118
9VH3	SEQ ID NO: 119
5VH1	SEQ ID NO: 120
5VH2	SEQ ID NO: 121
5VH3	SEQ ID NO: 122
VL1	SEQ ID NO: 123
VL2	SEQ ID NO: 124
VL3	SEQ ID NO: 125

인간화 항체의 생성 및 친화도

인간화 가변 중쇄 및 인간화 가변 경쇄를 상기 기재된 바와 같이 설계하였다. 인간화 VL 도메인을 인간 카파 불변 영역(hIgKCL, SEQ ID NO: 126)에 융합시킴으로써 키메라 경쇄(LC)를 구축하고, 인간화 VH 도메인을 인간 IgG1 불변 영역(hIgG1CH, SEQ ID NO: 127)에 융합시킴으로써 키메라 중쇄(HC)를 구축하였다. 중쇄 및 경쇄의 설계된 플라스미드를 pTT5 벡터 내로 삽입하여, 전장 인간 IgG의 발현 플라스미드를 구축하였으며, 이를 진스크립트의 서비스를 이용하여 위탁하였다. 리더 서열을 포함하는 인간화 중쇄(즉, 9VH1-hIgG1CH, 9VH2-hIgG1CH, 9VH3-hIgG1CH, 5VH1-hIgG1CH, 5VH2-hIgG1CH, 5VH3-hIgG1CH) 발현 서열은 SEQ ID NO: 144 내지 149에 나타나 있다. 리더 서열을 포함하는 인간화 경쇄(즉, VL1-hIgKCL, VL2-hIgKCL, VL3-hIgKCL) 발현 서열은 SEQ ID NO: 150 내지 152에 나타나 있다.

전장의 중쇄 및 경쇄를 갖는 전체 항-GPC3 인간화 항체를 HC 및 LC 플라스미드 동시-형질도입에 의해 생성하였다. 마우스 VH를 hIgG1CH와 융합시킴으로써 키메라 중쇄 및 마우스 VL을 hIgKCL과 융합시킴으로써 키메라 경쇄를 포함하는 키메라 LAB19309-hIgG1 및 LAB19305-hIgG1을 또한 양성 대조군으로서 생성하였다.

인간화 항체를 10 ml HEK293-6E 세포 배양물에서 발현시켰다. 세포를 회전 침강시키고, 상청액을 보관하였다. 비아코어에 의해 배지로 분비된 미정제 항체를 사용하여 친화도 순위결정을 수행하였다. 친화도 순위결정을 위하여, 항체를 Fc 포획 방법을 통해 센서 칩 상에 고정화시켰다. GPC3을 분석물로서 사용하였다. 이어서, HEK293 또는 CHO-S 세포 배양물에서 발현하도록 몇몇의 결합제를 선택하였다. 배지로 분비된 재조합 IgG를 수지 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 정제된 IgG는 SDS-PAGE에서 비-환원 조건 하에서 약 150 kDa 밴드로서, 그리고 환원 조건 하에서 약 50 kDa 및 약 25 kDa 밴드로서 이동하였다. SDS-PAGE로부터 판단하여, 인간화 IgG의 순도는 모두 90% 초과였다.

GPC3에 결합하는 정제된 항체의 친화도를 비아코어 T200을 사용하여 개별적으로 확인하였다. 항체를 Fc 포획 방법을 통해 센서 칩 상에 고정화시켰다. GPC3을 분석물로서 사용하였다. 또 다른 항체의 주입 이전에 표면을 재생시켰다. 모든 항체를 분석할 때까지 과정을 반복하였다. 비아코어 T200 평가 소프트웨어를 사용하여 실험 데이터를 1:1 상호작용 모델에 국소로 피팅시켜, 항체의 오프-속도를 수득하였다. 해리(kd) 및 회합(ka) 속도 상수(KD)의 데이터를 ka에 대한 kd의 비로부터 계산하였다. 항체에 대한 GPC3의 친화도는 표 9 및 표 10에 요약되어 있다.

[0536] [표 9]

정제된 인간화 LAB19309 항체에 대한 GPC3의 친화도

명칭	분석물	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)	Chi ² (RU ²)
키메라 LAB19309- hIgG1	GPC3	6.71E+04	2.39E-04	3.56E-09	62.95	0.0911
9VH1VL3- hIgG1	GPC3	9.13E+04	1.40E-04	1.53E-09	78.8	0.299
9VH3VL2- hIgG1	GPC3	1.34E+05	9.01E-05	6.72E-10	71.14	0.237

[0537]

[0538]

[0539]

[표 10]

정제된 인간화 LAB19305 항체에 대한 GPC3의 친화도

리간드	분석물	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)	Chi ² (RU ²)
5VH2VL3- hIgG1	GPC3	1.61E+05	8.76E-05	5.44E-10	61.3	0.0401
5VH2VL2- hIgG1	GPC3	1.56E+05	8.91E-05	5.72E-10	78.55	0.0665
키메라 LAB19305- hIgG1	GPC3	1.23E+05	1.03E-04	8.40E-10	107.4	0.0675
5VH1VL2- hIgG1	GPC3	1.07E+05	1.17E-04	1.10E-09	80.25	0.0252

[0540]

[0541]

6.5. 실시예 5 - 인간화 단일특이적 scFv 기반의 CAR의 제조 및 시험관내 스크리닝

[0542]

인간화 항체의 친화도 순위결정에 기초하여, 9VH1VL3-hIgG1 mAb 및 9VH3VL2-hIgG1 mAb의 VH 채 및 VL 채를 선택하여, 각각 huLIC19309a 및 huLIC19309b로 명명되는 키메라 항원 수용체를 구축하였다.

[0543]

huLIC19309a CAR에 있어서, 9VL3 및 9VH1 영역을 링커 펩티드(SEQ ID NO: 132)를 통해 융합시킴으로써 LAB9VH1VL3 scFv(SEQ ID NO: 128)를 구축하였다. 생성되는 CAR(huLIC19309a CAR)은 SEQ ID NO: 130을 포함한다. 유사하게, huLIC19309b CAR에 있어서, 9VL2 및 9VH3 서열을 링커(SEQ ID NO: 132)를 사용하여 융합시킴으로써 LAB9VH3VL2 scFv(SEQ ID NO: 129)를 구축하였다. 생성된 CAR(huLIC19309b CAR)은 SEQ ID NO: 131을 포함한다.

[0544]

N-말단에서 C-말단으로 CD8 α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 102), CD8 α 막횡단 도메인(SEQ ID NO: 103), CD137 동시-자극 신호전달 도메인(SEQ ID NO: 104) 및 CD3 ζ 세포질 신호전달 도메인(SEQ ID NO: 105)을 포함하는 CAR 백본 폴리펩티드를 인코딩하는 CAR 백본 서열을 화학적으로 합성하고, 시험관내 전사를 위해 사전-변형된 렌티 바이러스 벡터(pLSINK-BBzBB) 내에 다운스트림으로 구성성 hEF1 α 프로모터에 작동 가능하게 연결되게 클로닝하였다. 벡터 내의 다중-클로닝 부위(MCS)는 항-GPC3 인간화 scFv 단편의 N-말단에 융합된 CD8 α 신호 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열(SEQ ID NO: 101)에 작동 가능하게 연결된 코작 서열을 포함하는 핵산 서열이 CAR 백본 벡터 내에 업스트림으로 CAR 백본 서열에 작동 가능하게 연결되어 삽입되게 하였다. CD8 α 신호 펩티드 및 항-GPC3 인간화 scFv 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 화학적으로 합성하고, 당업계에 공지되어 있는 분자 클로닝 기법에 의해 *EcoRI* (5'-GAATTC-3')(SEQ ID NO: 142) 및 *SpeI* (5'-ACTAGT-3')(SEQ ID NO: 141) 제한 부위를 통해 pLSINK-BBzBB CAR 백본 내로 클로닝하였다.

[0545]

pMDLg.pRRE(애드진(Addgene)#12251), pRSV-REV(애드진#12253) 및 pMD2.G(애드진#12259)를 함유하는 렌티바이러스 패키징 플라스미드 혼합물을 폴리에테르이미드(PEI)와 함께 사전-최적화된 비로 CAR 구축물을 발현하는 벡터와 사전-혼합한 다음, 25℃에서 5분 동안 인큐베이션시켰다. 그 다음, HEK293 세포를 트랜스펙션 믹스 내로 첨가하였다. 이후에, 세포를 37℃에서 5% CO2를 갖는 세포 인큐베이터에서 하룻밤 인큐베이션시켰다. 4℃ 및 3000 g에서 15분 동안 원심분리한 후, 상청액을 수집하고, 0.45 μm PES 필터를 통해 여과한 후, 렌티바이러스 농축을 위하여 초원심분리하였다. 그 다음, 상청액을 조심히 폐기하고, 바이러스 펠렛을 조심스럽게 사전-냉각된 DPBS로 행구었다. 바이러스를 적절하게 용출시키고, -80℃에서 보관하였다. CHO(중국 햄스터 난소) 세포주의 형질도

입을 통한 적정 방법에 의해 바이러스 역가를 결정하였다.

[0546] CAR-T 세포 제조

[0547] PBMC를 올셀즈(Allcells)(#LP190116)로부터 구입하였다. 인간 T 세포를 PBMC로부터 정제하고, 실시예 2의 방법을 사용하여 사전-활성화시켰다.

[0548] CAR-T 세포 제조를 위하여, 사전-활성화된 T 세포를 1 mL 완전 배지(Tex MACS GMP 배지 +300IU/mL(IL-2)) 중에 1×10^6 개 세포/mL로 재현탁화시키고, 상이한 렌티바이러스(MOI=10)를 트랜스펙션을 위해 첨가하였다. 비-트랜스펙션된 T 림프구(UnT)를 음성 대조군으로서 사용하였다. LIC19309, huLIC19309a 및 huLIC19309b CAR-T의 양성률은 각각 62.4%, 53.6% 및 34.3%였다(도 6).

[0549] 세포독성 검정

[0550] 표적 세포는 GPC3 양성 인간 간세포 암종(HCC) 세포주 HepG2(ATCC#HB-8065), Huh7(코비오에르#CBP60202), PLC/PRF/5(ATCC#CRL-8024) 또는 GPC3 음성 세포주 K562(ATCC#CCL-243), Kato III(ATCC#HTB-103), A549(ATCC#CRM-CCL-185), NUGC4 (JCRB#01262018)였다. 당업계에 공지된 기법을 사용하여 모든 세포주가 반딧불이 루시페라제를 발현하도록 조작하였다. GPC3 CAR-T 세포 및 표적 세포를 상이한 비로 혼합하고(각각 2×10^3 개 세포/웰), 384-웰 플레이트에서 24시간 동안 배양하였다. 종양 세포에 대한 CAR-T의 세포독성을 검정하기 위하여, One-glo 발광 루시페라제 검정 시약(프로메가#E6110)을 제조사의 프로토콜에 따라 제조하였다.

[0551] 도 7 및 도 8에 나타난 바와 같이, 인간화 GPC3 CAR-T 세포는 용량 의존적 방식으로 GPC3 양성-HCC 세포주 HepG2.Luc, Huh7.Luc 및 PLC/PRF/5.Luc 세포에 대한 상이한 수준의 세포독성을 나타내었다. 3:1의 E/T 비에서, LIC19309 CAR-T 세포는 HepG2 세포, Huh7 세포 및 PLC/PRF/5 세포에 대하여 각각 98.30%, 94.06% 및 82.33%의 강력한 사멸 효율을 보였다. 동일한 조건에서, huLIC19309a CAR-T 세포 및 huLIC19309b CAR-T 세포 둘 모두는 이들 3가지 세포주에 대하여 93.75%, 97.47%, 73.51% 및 97.00%, 94.06%, 72.21%의 비슷한 세포독성 효력을 보였으며, 이는 항체 인간화에 의해 CAR-T 세포의 효력 저하가 일어나지 않았음을 나타낸다. CAR-T 세포 중 어느 것도 UnT와 비교하여 GPC3 음성 세포주에 대하여 유의미한 세포독성을 보이지 않았다(도 8).

[0552] IFN-감마 및 TNF-알파 방출

[0553] GPC3 양성 암 세포에 대한 세포독성 활성화에 더하여, IFN- γ 및 TNF- α 를 생성하는 인간화 GPC3 CAR-T 세포의 능력을 분석하였다. 단독의 GPC3 CAR-T 세포 또는 상이한 E/T 비(각각 2×10^3 개 표적 세포/웰, E/T=3:1, 1:1, 1:3)로 표적 세포(HepG2, Huh7 또는 PLC/PRF/5)와 혼합된 GPC3 CAR-T 세포를 384-웰 플레이트에서 20시간 동안 배양하고, 2가지 배양 상청액에서 생성된 IFN- γ 및 TNF- α 의 농도를 HTRF에 의해 측정하였다. IFN- γ 및 TNF- α 방출은 둘 모두가 CAR 및 GPC3 항원 특이적이었지만, 상이한 CAR-T 세포 간에 달라졌으며, 세포독성 효력과 유의미한 상관관계를 보이지 않았다. 도 9 및 도 10에 나타난 바와 같이, IFN- γ 및 TNF- α 의 방출 수준은 항원-특이적 CAR-T 활성화와 함께 유의미하게 증가되었다. huLIC19039a CAR-T 세포를 3:1의 E/T로 20시간 동안 GPC3 양성 HepG2 세포와 동시-배양한 후에, IFN- γ 방출 수준은 1015.99 pg/mL에서 31037.50 pg/mL까지 증가되었고, TNF- α 는 21.51 pg/mL에서 5447.91 pg/mL까지 증가되었다. 동일한 조건에서, HepG2와의 20시간의 동시-배양 후의 huLIC19309b CAR-T 세포 및 LIC19309 CAR-T 세포의 IFN- γ 방출 수준은 각각 24848.92 pg/mL 및 29339.66 pg/mL인 한편, TNF- α 방출 수준은 각각 6080.85 pg/mL 및 5256.41 pg/mL였다(도 9 및 도 10). 포괄적인 관점에서, 인간화 huLIC19309a CAR-T 세포 및 huLIC19309b CAR-T 세포는 비-인간화 LIC19309 CAR-T 세포와 비슷한 사이토카인 방출 수준을 나타내었다.

[0554] **6.6. 실시예 6 - 생체내에서의 입양 전달 후의 인간화 GPC3 CAR-T 세포의 항-종양 효과**

[0555] LIC19309 CAR-T 세포 및 huLIC19309b CAR-T 세포를 선택하여 생체내 효능 연구를 수행하였다. 피하 이종이식편 모델에 있어서, 6 내지 7주령의 28마리의 NCG 마우스에 Huh7 세포를 우측 앞다리에 피하 접종하였다(1×10^7 개 세포/마우스). 평균 종양 부피가 100 mm³에 도달했을 때(이종이식편 접종 후 6일), 마우스를 7개의 군으로 무작위화시키고, 각각 꼬리 정맥 주사에 의해 huLIC19309b CAR-T 세포(0.33, 1, 3 M/마우스), LIC19309 CAR-T 세포(0.33, 1, 3 M/마우스) 및 용매 단독(비히클)로 처리하였다. 종양 크기를 디지털 캘리퍼를 사용하여 주 2회 측

정하였다. 종양 부피를 하기 식에 따라 계산하였다:

$$\text{종양 부피} = \frac{(\text{길이}) \times (\text{너비})^2}{2}$$

[0556] 도 11(파트 a)에 나타난 바와 같이, 1747.02 mm³의 평균 부피를 갖는 대조군(비히클)에 비하여, 3 M huLIC19309b

CAR-T 세포를 처리한 G7 군 마우스는 제17일에 종양 크기의 97.4% 감소를 가지며, 45.41 mm³의 평균 부피를 갖는 것으로 관찰되었으며, 2마리의 마우스는 종양 부재 상태이며, 이는 huLIC19309b CAR-T 세포의 강력한 항-종양 효능을 보여주었다. G4에서 3 M LIC19309 CAR-T 세포로 처리된 마우스는 564.75 mm³의 부피와 함께 67.7% 종양 감소를 보였다. 종양 부피 데이터에 기초하여, 인간화 huLIC19309b CAR-T 세포는 0.33 M, 1 M 및 3 M의 모든 3 가지 용량에서, LIC19309 CAR-T 세포에 비하여 유의미한 생체내 효능 이점을 보였다.

[0557] CAR-T 증대 효력을 분석하기 위하여, 마우스 혈액 중 CAR 카피 수를 또한 입양 전달 후 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일에 ddPCR(드롭렛 디지털 PCR)에 의해 검출하였다. 도 11(파트 b)에 나타난 바와 같이, huLIC19309b CAR-T는 제7일부터 제14일까지 표적-의존적인 유의미한 증대를 나타내었으며, 119.09 카피/ng의 가장 높은 카피 수에 도달하였다. 피크에 도달한 후에, 이는 2주 동안 약 50 카피/ng를 유지하였다.

[0558] 마우스 체중은 종양 부담과 음의 상관관계를 보였다. 종양 부담이 증가하고, 일반적인 거동 상태가 악화됨에 따라, 대조군(비히클)에서 마우스의 체중은 동시에 감소되었다. 제17일에, 대조군의 평균 체중은 19.50 g이었던 한편, LIC19309 CAR-T 세포 처리된 마우스의 평균 체중은 0.33 M, 1 M 및 3 M의 용량에서 19.95 g, 22.61 g 및 23.34 g이었다. huLIC19309b CAR-T 세포 처리된 마우스는 비히클 또는 LIC19309 CAR-T 세포 처리된 마우스와 비교하여, 제17일에 0.33 M, 1 M 및 3 M의 용량에서 21.41 g, 23.21 g 및 25.57 g의 더 높은 체중을 보였으며, 이는 huLIC19309b CAR-T 세포의 더욱 강력한 효능 및 더욱 건강한 마우스 상태를 나타낸다(도 11, 파트 c).

[0559] 6.7. 실시예 7 - 인간 IL12p40 및 인간 CCL-19를 과발현하는 CAR-T 세포의 제조

[0560] 6.7.1. 키메라 항원 수용체의 구축

[0561] 인간화 항-GPC3 scFv CAR(H93 CAR)을 구축하기 위하여, N-말단에서 C-말단으로 CD8 α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 102), CD8 α 막횡단 도메인(SEQ ID NO: 103), CD137 동시-자극 신호전달 도메인(SEQ ID NO: 104) 및 CD3 ζ 세포질 신호전달 도메인(SEQ ID NO: 105)을 포함하는 CAR 백본 폴리펩티드를 인코딩하는 CAR 백본 서열을 화학적으로 합성하고, 시험관내 전사를 위해 사전-변형된 렌티바이러스 벡터(pLSINK-BBzBB) 내에 다운스트림으로 구성성 hEF1 α 프로모터에 작동 가능하게 연결되게 클로닝하였다. 벡터 내의 다중-클로닝 부위(MCS)는 항-GPC3 인간화 scFv 단편(즉, SEQ ID NO: 129의 아미노산 서열을 포함하는 상기 기재된 LAb9VH3VL2 scFv)의 N-말단에 융합된 CD8 α 신호 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열(SEQ ID NO: 101)에 작동 가능하게 연결된 코작 서열을 포함하는 핵산 서열이 CAR 백본 벡터 내에 업스트림으로 CAR 백본 서열에 작동 가능하게 연결되어 삽입되게 하였다. CD8 α 신호 펩티드 및 항-GPC3 인간화 scFv 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 화학적으로 합성하고, 당업계에 공지되어 있는 분자 클로닝 기법에 의해 *EcoRI*(5'-GAATTC-3') 및 *SpeI*(5'-ACTAGT-3') 제한 부위를 통해 pLSINK-BBzBB CAR 백본 내로 클로닝하였다. 생성된 H93 CAR의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 131이다. H93 CAR은 상기 기재된 huLIC19309b CAR의 또 다른 명칭이다. CAR 코딩 영역은 도 12의 상부에 제시되어 있다.

[0562] H93 CAR 백본에 기초하여, H93M CAR 벡터 내의 MCS는 2A 자가-절단 펩티드(예를 들어, SEQ ID NO: 138에 나타난 P2A 단편)의 C-말단에 융합된 또 다른 2A 자가-절단 펩티드(예를 들어, SEQ ID NO: 139에 나타난 T2A 펩티드)에 의해 연결된 인간 IL12p40(SEQ ID NO: 135) 및 인간 CCL-19(SEQ ID NO: 136)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열이 업스트림으로 CD3 ζ 세포질 신호전달 도메인의 C-말단에 작동 가능하게 연결되어 삽입되게 하였다. P2A 펩티드 및 IL12p40-T2A-CCL-19 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 화학적으로 합성하고, *HpaI*(5'-GTTAAC-3')(SEQ ID NO: 143) 및 *MluI*(5'-ACGCGT-3')(SEQ ID NO: 140) 제한 부위를 통해 pLSINK-BBzBB CAR 백본 내로 클로닝하였다. 생성된 H93M CAR의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 133이고, H93M CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 137에 나타나 있다. H93M의 CAR 코딩 영역은 도 12의 중간 부분에 제시되어 있다. 임의의 이론에 결부시키지 않고, H93M CAR-T 세포 내의 과발현된 IL12p40은 TCR 자극시에 T 세포에 의해 상호조절되는 것으로 보고된 내인성 IL-23 α p19 서브유닛과 함께 IL-23을 형성할 수 있었다. 예를 들어, 문헌 [Ma, et al., Interleukin-23 engineering improves CAR T cell function in solid tumors. Nat Biotechnol. 2020 Apr;38(4):448-459]을 참조한다.

[0563] pMDLg.pRRE(애드진#12251), pRSV-REV(애드진#12253) 및 pMD2.G(애드진#12259)를 함유하는 렌티바이러스 패키징 플라스미드 혼합물을 폴리에테르이미드(PEI)와 함께 사전-최적화된 비로 CAR 구축물을 발현하는 벡터와 사전-혼합한 다음, 25℃에서 5분 동안 인큐베이션시켰다. 그 다음, HEK293 세포를 트랜스펙션 믹스 내로 첨가하였다. 이후에, 세포를 37℃에서 5% CO₂를 갖는 세포 인큐베이터에서 하룻밤 인큐베이션시켰다. 4℃ 및 3000 g에서 15분 동안 원심분리한 후, 상청액을 수집하고, 0.45 μm PES 필터를 통해 여과한 후, 렌티바이러스 농축을 위하여 초원심분리하였다. 상청액을 조심히 폐기하고, 바이러스 펠렛을 조심스럽게 사전-냉각된 DPBS로 행구었다. 바이러스를 적절하게 용출시키고, -80℃에서 보관하였다. CHO(중국 햄스터 난소) 세포주의 형질도입을 통한 적정 방

법에 의해 바이러스 역가를 결정하였다.

[0564] **6.7.2. CAR-T 세포 제조**

[0565] PBMC를 TPCS(#A19Z284097)로부터 구입하였다. 인간 T 세포를 Pan T 세포 분리 키트(밀테니이 #130-096-535)를 사용하여 PBMC로부터 정제하고, 실시예 2의 방법을 사용하여 사전-활성화시켰다.

[0566] CAR-T 세포 제조를 위하여, 사전-활성화된 T 세포를 0.5×10^6 개 세포/웰의 밀도로 24-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 그 다음, 정제된 바이러스를 웰에 첨가하였다. 하룻밤 후에, 형질도입된 세포를 수집, 원심분리 및 신선한 RPMI-1640+300IU/ml(IL-2)를 사용한 재현탁화 후에 24-웰 G-Rex(윌슨 울프(Wilson Wolf) #80192M) 내에 배치하였다. 비-형질도입된 T 세포(UnT)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 제7일에, 네이키드 H93 CAR-T 세포 및 H93M CAR-T 세포의 CAR 양성률은 각각 39.3% 및 32.5%였다(도 13).

[0567] **6.7.3. IL-23 및 CCL-19 발현**

[0568] H93M CAR의 구조를 입증하기 위하여, CAR-T 세포를 보통의 조건(RPMI-1640+300IU/ml(IL-2))에서 배양하고, IL-23 및 CCL-19의 분비를 분석하였다. 요약하여, 세포를 6-웰 플레이트에서 1×10^6 개 세포/ml로 배양하고, 상청액을 각각 제12일, 제14일 및 제17일에 수거하였다. 인간 IL-23 키트(CISBIO#62HIL23PEG) 및 CCL-19 ELISA 키트(아브캄#ab100601)를 사용하여 제조처의 프로토콜에 따라 IL-23 및 CCL-19의 양을 결정하였다. 도 14에 나타난 바와 같이, H93 CAR-T 세포 및 UnT(IL-23 또는 CCL-19 발현 중 어느 것도 검출되지 않았음)와 비교하여 H93M CAR-T 세포만이 IL-23(10^6 개 세포당 286.9 pg 내지 10^6 개 세포당 570.3 pg) 및 CCL-19(10^6 개 세포당 65.4 pg 내지 10^6 개 세포당 237.2 pg)를 분비했다.

[0569] **6.8. 실시예 8 - 시험관내 CAR-T 세포 반복 시험감염 검정**

[0570] 시험관내에서 CAR-T 세포의 지속성 및 소진을 평가하기 위하여, CAR-T 세포 반복 시험감염 모델을 준비하였다. CAR-T 세포를 여러 회의 라운드에 걸쳐 GPC3 양성 종양 세포에 의해 지속적으로 자극하여, CAR-T 세포의 소진 표현형을 얻었다. 재-시험감염 검정에서 3가지 처리군이 존재하였다: H93 CAR-T 군(초기 CAR-T 세포는 H93 CAR-T 세포였음), H93M CAR-T 군(초기 CAR-T 세포는 H93M CAR-T 세포였음) 및 UnT(초기 T 세포는 CAR로 형질도입되지 않은 T 세포였음). 제1 라운드(라운드 1)의 재시험감염에 있어서, CAR-T 세포를 6-웰 플레이트에서 종양 세포와 1:1 E/T 비로 동시-배양하였다. 하룻밤 후에, 웰 내의 CAR-T 세포를 온건하게 수집하고, 원심분리하고, 신선한 CAR-T 배양 배지(RPMI-1640+300 IU/ml(IL-2)) 중에 재현탁화시켰다. 이어서, CAR-T 세포를 새로운 플레이트에 또 다시 2일 동안 첨가하였다. 그 후, 웰 내의 CAR-T 세포를 수집하고, 신선한 배지에 다시 재현탁화시키고, 신선한 종양 세포가 씨앗된 새로운 플레이트에 첨가하였다(라운드 2). 첨가되는 신선한 종양 세포의 수를 이전 라운드의 마지막에서의 CAR-T 세포의 양성률에 의해 계산하였다. 이 절차를 남아 있는 CAR-T 세포의 세포 수 및 생존력에 따라 여러 회의 라운드에 걸쳐 반복할 수 있다. CAR+ T 세포에서 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 소진 마커 PD-1 및 LAG3을 각각의 라운드의 종양 세포 재-시험감염 24시간 후에 분석하였다. T 세포를 각각의 라운드의 마지막에 계수하였으며, 세포독성 검정을 자극 72시간 후에 GPC3 양성 HCC 세포주 PLC/PRF/5에서 수행하였다.

[0571] **6.8.1. T 세포의 증대**

[0572] H93M CAR-T 세포의 증대 기능의 이익을 결정하기 위하여, 전체 T 세포의 세포 수 및 생존력을 각각의 라운드의 재-시험감염의 마지막에 기록하였다.

[0573] 도 15a에 나타난 바와 같이, PLC/PRF/5 세포를 사용한 반복 자극은 H93 CAR-T 군(라운드 6에서 10.5배) 및 UnT 군(라운드 6에서 0.2배)과 비교하여 H93M CAR-T 군(라운드 6에서 138.4배)에서 유의미한 세포의 증대를 초래하였다. 이와 동시에, H93M CAR-T 군의 세포 생존력은 높게 유지되었으며, 대조적으로, H93 CAR-T 군 및 UnT 군은 각각의 자극 후에 점차 감소되었다(도 15b).

[0574] **6.8.2. 세포독성 검정 및 사이토카인 방출**

[0575] CAR-T 세포의 세포독성을 또한, CAR-T 재-시험감염 검정에서 1:1의 전체 T 세포 : 표적 세포 비로 매 2 라운드의 마지막에 평가하였다. 표적 세포는 GPC3 양성 PLC/PRF/5 세포였으며, 이를 당업계에 공지되어 있는 기법을 사용하여 반딧불이 루시퍼라제를 발현하도록 조작하였다. 매 2 라운드의 마지막에 수집된 세포 및 표적 세포를 혼합하고(각각 2×10^3 개 세포/웰), 384-웰 플레이트에서 24시간 동안 배양하였다. 종양 세포에 대한 CAR-T 세포

의 세포독성을 검정하기 위하여, One-glo 발광 루시페라제 검정 시약(프로메가#E6110)을 제조사의 프로토콜에 따라 제조하고, 동시-배양된 세포에 첨가하여, 웰 내의 남아 있는 루시페라제 활성을 검출하였다. 루시페라제가 종양 세포에서만 발현되기 때문에, 웰 내의 남아 있는 루시페라제 활성은 웰 내의 생존 가능한 표적 세포의 수와 직접적인 상관관계가 있다. 배양 배지를 이펙터 세포의 부재 하에 표적 세포에 첨가함으로써 최대 루시페라제 활성을 획득하였다. 트리톤 X-100을 세포독성 검정이 개시되는 시간에 1%의 최종 농도로 첨가함으로써 최소 루시페라제 활성을 결정하였다. 특이적인 세포독성을 하기 식에 의해 계산하였다: 특이적인 세포독성% = $100\% \times (1 - (RLU_{시료} - RLU_{최소}) / (RLU_{최대} - RLU_{최소}))$.

[0576] 도 16a에 나타난 바와 같이, H93M CAR-T 군은 라운드 1 이후에 동일한 세포독성(21.1% 대 22.4%)을 보였던 것을 제외하고, 라운드 3 이후에 H93 CAR-T 군보다 더 높은 세포독성을 보였다. 구체적으로, H93M CAR-T 군은 라운드 3 이후에 74.4%의 평균 세포독성을 나타내었으며, 라운드 5(80.7%) 및 라운드 7(83.4%) 이후에 약간 증가되었다. 상대적으로 더 낮은 세포독성이 H93 CAR-T 군에서 관찰되었지만, 이는 각각 52.7%(라운드 3), 57.9%(라운드 5) 및 47.0%(라운드 7)의 평균 세포독성을 보였다. H93M CAR-T 군의 표시는 GPC3 양성-HCC 세포주 PLC/PRF/5.Luc 세포에 대하여 지속적으로 높은 수준의 세포독성을 가졌다.

[0577] 재-시험감염 검정에서 H93 CAR-T 세포와 비교하여 GPC3 양성 종양 세포에 대한 H93M CAR-T 세포의 지속적인 세포독성 활성을 추가로 입증하기 위하여, 24시간 동안 CAR-T 세포를 PLC/PRF/5.Luc 세포와 1:1 E/T 비(전체 T 세포 : 표적 세포)로 동시배양한 후에, TNF- α 및 IFN- γ 생성을 ELISA에 의해 분석하였다. 결과적으로, H93M CAR-T 군의 TNF- α 및 IFN- γ 의 생성 능력은 H93 CAR-T 군과 비교하여 유의미하게 더 높았으며, 모든 라운드에서 세포독성 효력과 유의미한 상관관계를 보였다. 도 16b 및 16c에 나타난 바와 같이, H93M CAR-T 군에서 세포에 의해 분비되는 TNF- α 및 IFN- γ 의 농도는 라운드 3 내지 라운드 5 이후에, 451.2 내지 1151.1 pg/ml(TNF- α) 및 18353.7 내지 37072.7 pg/ml(IFN- γ)의 범위 내에서 유의미하게 증가된 한편, H93 CAR-T 군에서 세포에 의해 분비되는 TNF- α 및 IFN- γ 의 농도는 라운드 3 내지 라운드 7 이후에 197.1 내지 129.2 pg/ml(TNF- α) 및 4993.1 내지 1672.1 pg/ml(IFN- γ)의 범위 내에서 점차 감소되었다.

[0578] 6.8.3. 양성 CAR-T 세포의 비율 변화

[0579] H93 CAR-T 세포 및 H93M CAR-T 세포의 양성률을 각 2 라운드 이후에 계산하였으며, 이는 30% 내지 86% 범위 내에서 자극 라운드에 따라 거의 동일하게 증가하였다. 마지막으로, H93 CAR-T 세포 및 H93M CAR-T 세포의 양성률은 라운드 5 이후에 증가되지 않았다(도 17). H93M CAR-T 세포는 라운드 5 재-시험감염 후에 증가하는 세포독성(도 16a)과 평평한 CAR+(도 17)를 비교하여 높은 세포독성을 보였다.

[0580] 6.8.4. T 세포의 소진

[0581] T 세포 소진을 재-시험감염 검정에서 각 라운드 24시간 후에 평가하였다. 2가지 소진 마커로서 PD-1 및 LAG-3을 각각 항-인간 PD-1 항체(바이오레전드(Biolegend)#329908) 및 항-LAG-3 항체(인비트로젠#17-2239-42)를 사용하여 표시하였으며, CD4+CAR+ T 세포 및 CD8+CAR+ T 세포 이중 양성 하위세트의 발현 수준을 분석하였다. 도 18a 내지 18d에 나타난 바와 같이, H93M CAR-T 군은 모든 라운드에서 H93 CAR-T 군에 비하여 소진 마커 PD-1 및 LAG3의 발현의 감소를 보였다. 특히, 라운드 3 내지 5에서, H93M CAR-T 군에서 CD4+CAR+ 이중 양성 하위세트의 PD-1 발현은 13% 내지 18%였던 한편, H93 CAR-T 군은 30% 초과였다(도 18a). H93M CAR-T 군은 모든 라운드(R2 내지 R7)의 CD4+CAR+ 이중 양성 하위세트에서 H93 CAR-T 군(30% 내지 49%)보다 유의미하게 더 낮은 LAG-3 발현(12% 내지 25%)을 가졌다(도 18c). CD8+CAR+ 이중 양성 하위세트에서, H93M CAR-T 군에서의 PD-1의 발현 수준은 여전히 H93 CAR-T 군보다 더 낮았으며(라운드 3 내지 라운드 7에서 1.3% 내지 4.1% 대 5.6% 내지 9.4%)(도 18b), H93M CAR-T 군의 LAG3 발현 수준은 라운드 3 내지 라운드 5에서 H93 CAR-T 군(82.7% 내지 88.1%)의 것보다 더 낮은 56.6% 내지 82.9%였으며(도 18d), 이는 H93M CAR-T 세포가 소진에 대한 저항성 능력을 갖는 것을 나타낸다.

[0582] 6.9. 실시예 9 - 세포 이동 검정

[0583] CCL-19의 화학주성 기능을 평가하기 위하여, 세포 이동 검정을 수행하였다. 응답자 T 세포의 화학주성을 96-웰 트랜스웰(transwell) 챔버(코닝(Corning))에서 5- μ m 공극-크기의 폴리카보네이트 필터를 통한 이동에 의해 측정하였다. CAR-T 세포 및 UnT 세포를 GPC3 양성 인간 HCC 세포주 PLC/PRF/5 세포로 자극하고, 동시-배양 상청액을 30시간 후에 수집하였다. 이어서, 125 μ l의 상청액을 하부 챔버에 배치하고, 75 μ l의 미처리 T 세포(0.075 M)를 상부 챔버에서 인큐베이션시켰다. 4, 6 및 8시간 후에, 상부 챔버로부터 하부 챔버로 이동한 T 세포를 혈구 계수 챔버에 의해 계수하였다. 세포 이동 검정에는 3개의 처리군이 존재하였다: H93 CAR-T 군(하부 챔버 내의 상

청액은 PLC/PRF/5 세포와 동시-배양된 H93 CAR-T 세포 유래였음), H93M CAR-T 군(하부 챔버 내의 상청액은 PLC/PRF/5 세포와 동시-배양된 H93M CAR-T 세포 유래였음) 및 UnT 군(하부 챔버 내의 상청액은 PLC/PRF/5 세포와 동시-배양된 UnT 세포 유래였음).

[0584] **도 19a**에 나타난 바와 같이, 더 많은 T 세포가 상이한 시기에 PLC/PRF/5 세포와 동시-배양된 H93 CAR-T 세포의 상청액 및 PLC/PRF/5 세포와 동시-배양된 UnT 세포의 상청액보다 PLC/PRF/5 세포와 동시-배양된 H93M CAR-T 세포(CCL-19의 분비 존재)의 상청액 내로 유입되었다(H93M CAR-T 군 대 H93 CAR-T 군: $P < 0.0001$). 구체적으로, H93M CAR-T 군은 제6시간에 상부 챔버의 모든 T 세포를 완전히 유입할 수 있었던 한편(0.104 M), CCL-19의 생성을 갖지 않는 H93 CAR-T 군 및 UnT 군에서는 심지어 제8시간에 단지 각각 0.032 M 및 0.026 M로 더 적은 T 세포가 이동되었다. 또한, 동시-배양 상청액 중 CCL-19의 농도를 CCL-19 ELISA(아브캅#ab100601)에 의해 측정하였다. 이 결과는 PLC/PRF/5 세포와 동시-배양된 H93M CAR-T 세포 유래의 상청액이 CCL-19의 분비($4590.15 \pm 380.85 \text{ pg/ml}$)를 가졌음을 나타내었으며, 이는 H93M CAR-T 세포의 화학주성 기능을 추가로 입증한다(**도 19b**).

[0585] 6.10. 실시예 10 - 생체내에서의 입양 전달 후의 CAR-T 세포의 항-종양 효과

[0586] CAR-T 세포의 생체내 항-종양 효능을 NCG 마우스 이종이식편 모델에서 평가하였다. 피하 이종이식편 모델에 있어서, 6 내지 7주령의 NCG 마우스에 Huh7 세포를 우측 앞다리에 피하 접종하였다(1.5×10^6 개 세포/마우스). 평균 종양 부피가 100 mm³에 도달했을 때(이종이식편 접종 후 제11일), 마우스를 6개의 군으로 무작위화시키고, 각각 꼬리 정맥 주사에 의해 H93 CAR-T 세포(0.2 M 또는 0.6 M 투여량), H93M CAR-T 세포(0.2 M 또는 0.6 M 투여량), UnT(2.3 M 투여량, CAR-T 군과 동일한 세포 수의 전체 T 세포) 및 용매 단독(비히클)으로 처리하였다. 종양 크기를 디지털 캘리퍼를 사용하여 주 2회 측정하였다. 종양 부피를 하기 식에 따라 계산하였다: 종양 부피 = ((길이) × (너비)²)/2. 또한, 마우스 혈액 중 CAR-T 세포의 카피 수를 입양 전달 후 각각 제0일, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일에 디지털 PCR에 의해 검출하였다.

[0587] 비히클, UnT 및 H93 CAR-T 세포로 처리된 마우스를 동물 윤리 때문에 제20일에 희생시켰으며, 이들 3개의 군의 종양 부피는 2000 mm³ 초과에 도달하였다. H93M CAR-T 세포로 처리된 마우스를 제27일(투여량: 0.2 M) 및 제49일(투여량: 0.6 M)까지 계속 기록하였다. **도 20a**에 나타난 바와 같이, H93M CAR-T 세포의 입양 전달이 시행된 마우스는 UnT 및 H93 CAR-T 세포 군에 비하여, 제20일에 각각 종양 크기의 76.8% 및 74.6% 감소를 갖고(584.3 mm³ 대 2514.7 mm³, 2297.3 mm³), 제20일 후에, 종양 크기가 여전히 점차 감소되는 것이 관찰되었으며, 이는 더 낮은 투여량(0.2 M/마우스)에서 H93M CAR-T 세포가 H93 CAR-T 세포보다 더 나은 치료력을 갖는 것을 뒷받침한다. **도 20b**에 나타난 바와 같이, 투여량이 0.6 M/마우스로 증가한 경우, H93M CAR-T 세포의 투여는 제20일에 UnT와 비교하여(101.6 mm³ 대 2514.7 mm³) 96.0%의 성장 저해율과 함께, 종양 성장에 대하여 명백한 저해 효과를 가졌지만, 유사한 종양 감소가 H93M CAR-T 세포 처리군 및 H93 CAR-T 세포 처리군(101.6 mm³ 대 137.3 mm³)에서 관찰되었다. 제34일에, H93M CAR-T 세포로 처리된 마우스는 거의 종양이 없었다.

[0588] 마우스 말초 혈액 세포에서의 CAR 유전자 카피 수를 디지털 PCR에 의해 검출하였으며, H93M CAR-T 세포는 0.2 M 투여량에서 제21일에 유의미한 증대를 나타내었으며, 이후에 감소된 한편, H93 CAR-T 세포 및 UnT로 처리된 마우스에서는 처리 내내 명백한 증대가 존재하지 않았다(**도 20c**). 0.2 M 투여량에서, 제21일의 H93M CAR-T 세포의 카피 수는 제0일의 카피 수의 335.6배였다(133.4175 카피 대 0.3975 카피). H93M CAR-T 세포 및 H93 CAR-T 세포 둘 모두는 0.6 M 투여량에서 제7일 이후에 유의미한 증대를 보였으며, H93M CAR-T 세포는 H93 CAR-T 세포보다 더 나은 증대 능력을 가졌다(제21일에 272.2850 카피 대 83.6275 카피)(**도 20d**).

[0589] 이 실험 동안 투여량이 0.2 M이든, 0.6 M이든, 모든 3개의 군에서 마우스 체중 감소가 관찰되지 않았다(**도 21a** 및 **21b**). 그러나, H93 CAR-T 세포로 처리된 마우스는 0.2 M 투여량에서 제20일에 강모(bristling), 아치형 등 및 쇄악과 같은 증상을 보인 한편, H93M CAR-T 세포로 처리된 마우스는 정상이었다. 0.6 M 투여량에서, 둘 모두의 군의 마우스는 정상 외양을 가졌다.

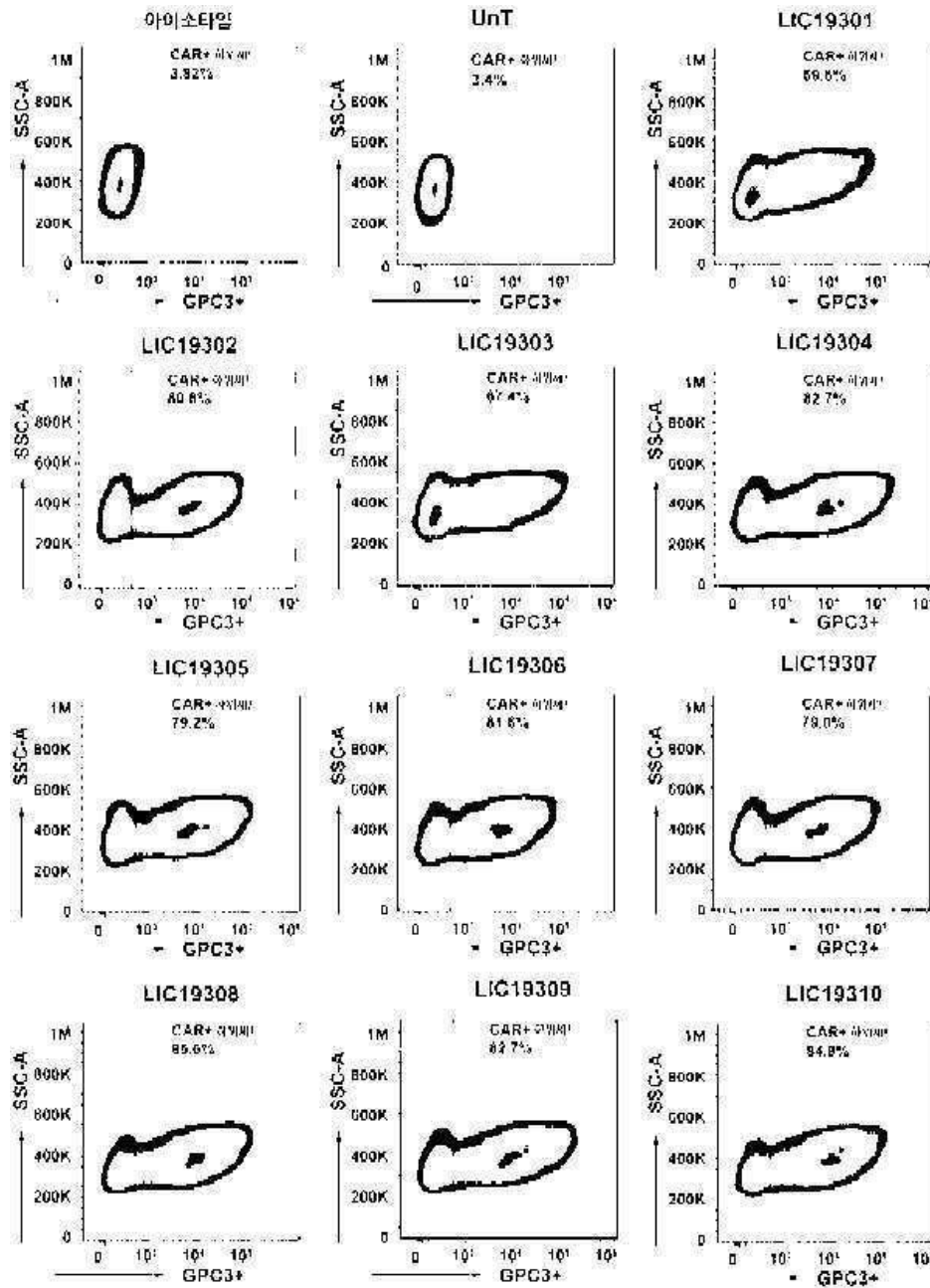
[0590] H93M CAR-T 세포에서 IL-23의 활성화-의존적 생성을 입증하기 위하여, CAR-T 세포로 처리된 후의 NCG 마우스 말초 혈액 중 IL-23 및 IFN- γ 의 분비 수준을 인간 IL-23 키트(CISBIO#62HIL23PEG) 및 인간 IFN- γ 키트(CISBIO#62HIFNGPEG)를 사용함으로써 분석하였다. **도 22a**에 나타난 바와 같이, H93M CAR-T 세포 처리군은 저용량(0.2 M, 제21일)에서 H93 CAR-T 세포 처리군과 비교하여 최대 3배 더 높은 IL-23의 분비 수준을 보였다. 고용량(0.6 M)에서 H93M CAR-T 세포 처리된 마우스 및 H93 CAR-T 세포 처리된 마우스에서의 유사한 IL-23의 낮은 수준이 관찰되었다(**도 22b**). 병행하여, 마우스 말초 혈액 중에서 활성화-의존적 생성이었던 IFN- γ 의 분비 거동은 IL-23과 유사하였으며(**도 22c** 및 **22d**), 이는 H93M CAR-T 세포에서의 IL-23의 활성화-의존적 생성을

나타낸다.

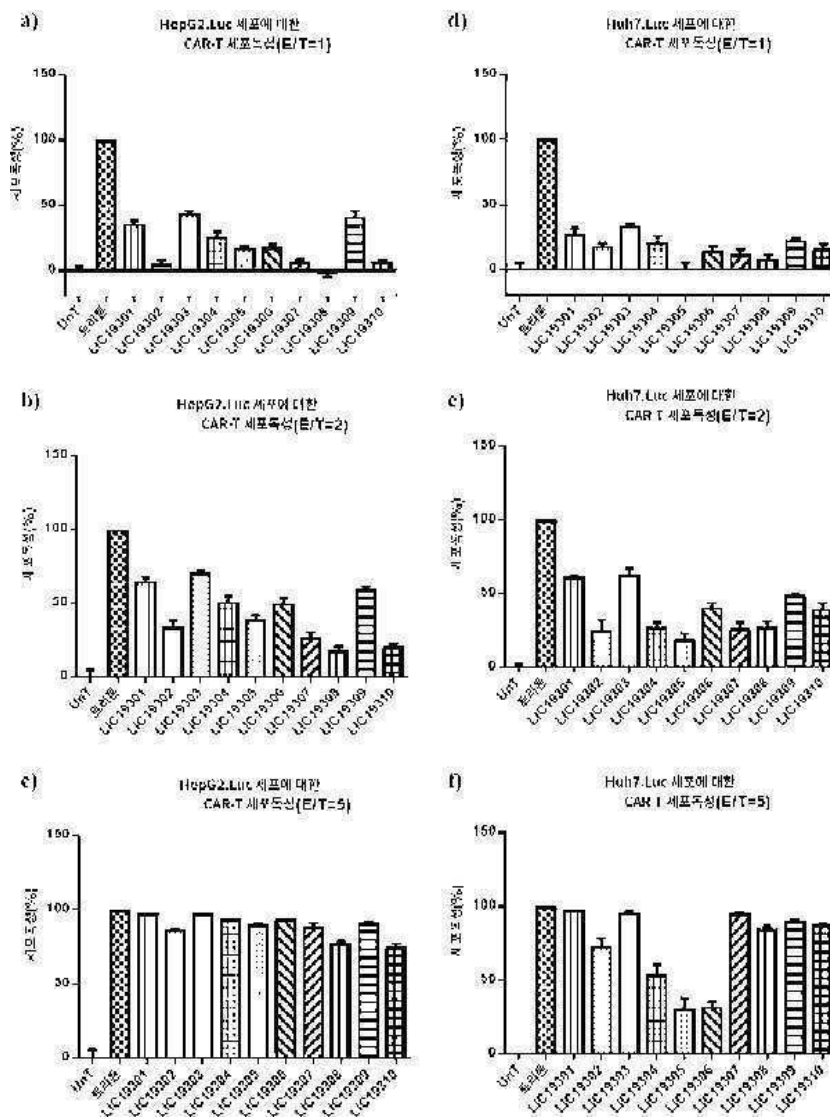
- [0591] 생체내에서 H93M CAR-T 세포의 항-종양 효과를 조사하기 위하여, 면역조직화학(IHC)을 사용하여, 종양 부위에서 T 세포의 침윤 및 대식구 및 수지상 세포(DC)의 동원을 연구하였다. 요약하여, 조직 파라핀 섹션 슬라이드를 60℃에서 60분 동안 가열한 다음, 자일렌 중에서 각각 10분 동안 3회 왁스제거하고, 100%, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올 및 물 중에서 각각 5분 동안 재수화시켰다. 슬라이드를 항원 회수 완충제 중에서 20분 동안 비등시킴으로써 항원 회수를 수행한 다음, 슬라이드를 항원 회수 완충제 중에 침지시키고, 실온(RT)으로 냉각시킨 후에, 슬라이드를 메탄올 중 3% 과산화수소로 10분 동안 처리하여, 내인성 과산화효소 활성을 제거하였다. 비특이적인 백그라운드 염색을 감소시키기 위하여, 슬라이드를 블로킹 완충제(DPBS로 희석된 5% 염소 혈청)와 2 내지 8℃에서 하룻밤 인큐베이션시켰다.
- [0592] 하룻밤 후에, 슬라이드를 실온에서 30분 동안 인큐베이션시킨 다음, 37℃에서 2시간 동안 희석된 일차 항체와, 그리고 실온에서 15분 동안 암 중에서 제2 항체 HRP 컨쥬게이트된 항-마우스 IgG 항체(푸조우 마이신 바이오테크 컴퍼니 리미티드(Fuzhou Maixin Biotech. Co., Ltd.) # KIT-5002)와 인큐베이션시켰다. DAB 기질을 제조처의 설명에 따라 제조하고, 200 내지 500 μ l의 DAB 기질을 슬라이드에 첨가하고, 암 중에서 2분 동안 인큐베이션시켰다. 증류수로 5분 동안 세척함으로써 염색을 중단시켰다. 마지막으로, 슬라이드에 중성 발삼(neutral balsam)을 첨가하고, 헤마톡실린으로 대조염색하고, 1% 염산 알코올 중에서 분별하고, 알코올 중에서 탈수시킨 후에 봉입하였다.
- [0593] 더 낮은 투여량(0.2 M)에서 H93M CAR-T 세포의 향상된 항종양 능력의 메커니즘을 설명하기 위하여, 처리된 마우스의 종양 조직에서 T 세포 침윤을 TCR α (H-1)(산타 크루즈 바이오테크놀로지(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)#sc-515719)를 사용하여 IHC에 의해 조사하였다. 도 23에 나타낸 바와 같이, H93 CAR-T 세포 및 UnT 처리군에 비하여, H93M CAR-T 세포 처리군에서의 모든 3마리의 마우스의 종양 부위 내로의 개선된 T 세포 침윤이 존재하였다. H93M CAR-T 세포 처리군에서 중심 종양 세포소(tumor nest) 내로 더 많은 T 세포가 침윤한 한편, 3마리의 H93 CAR-T 세포 처리 마우스 중 오직 1마리의 마우스만이 종양 주변 영역에서 더 적은 T 세포 침윤을 가졌으며, 다른 마우스는 종양 부위에서 매우 적은 T 세포를 가졌다. UnT 처리군에서, 3마리의 마우스 중에서 종양 부위에서 관찰되는 T 세포 침윤이 존재하지 않았다.
- [0594] 또한, 종양 조직에서의 대식구 및 DC 동원을 조사하였다. 항-CD68 항체(아브캅#ab125212) 및 항-CD11c 항체(셀 시그널링 테크놀로지(Cell signaling technology)#97585S)를 사용하여, 종양 조직에서 마우스 대식구 및 DC를 검출하였다. 도 24에 나타낸 바와 같이, CD68+ 대식구(좌측 열) 및 CD11c+ DC(우측 열)를 DAB에 의해 염색하였다. 종양 부위의 대식구 및 DC 동원은 H93M CAR-T 세포 처리군에서 유의미하게 더 높았던 한편, UnT 및 H93 CAR-T 세포 처리군만이 종양 조직의 주변에서 대식구 동원을 가졌다. 이들 데이터는, H93M CAR-T 세포가 H93 CAR-T 세포 및 UnT에 비하여 종양 조직에서 더 많은 대식구 및 DC 동원을 유도할 수 있으며, 종양 조직에서 선천 면역 반응을 유도하는 데 더욱 강력하다는 것을 나타낸다.
- [0595] 본원에 언급된 모든 특허, 공개 출원 및 참고문헌의 교시는 이들 전체가 참조로 포함된다. 예시적인 실시형태가 특별히 나타나 있고 기재되어 있지만, 첨부된 청구범위에 의해 포함되는 실시형태의 범주로부터 벗어나지 않고, 그 안에서 형태 및 상세사항의 다양한 변경이 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.
- [0596] 상기로부터, 구체적인 실시형태가 예시의 목적을 위하여 본원에 기재되어 있지만, 본원에 제공된 것의 목적과 범주를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음이 인식될 것이다. 상기에서 언급된 모든 참고문헌은 이들 전체가 본원에 참조로 포함된다.

도면

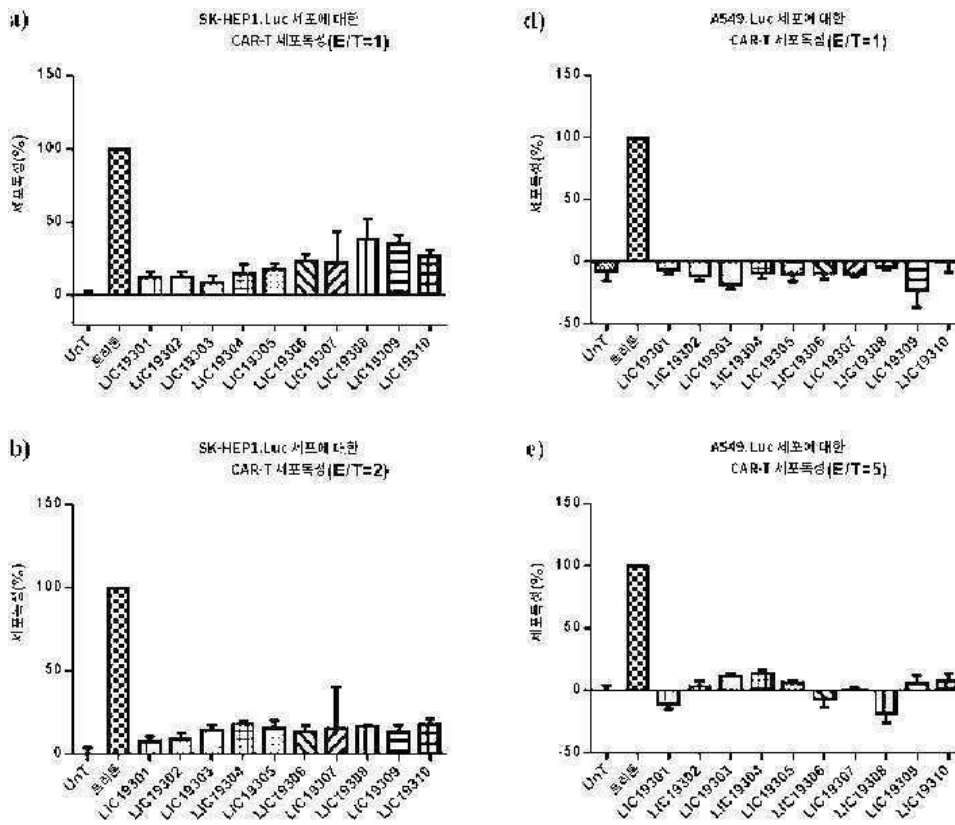
도면1



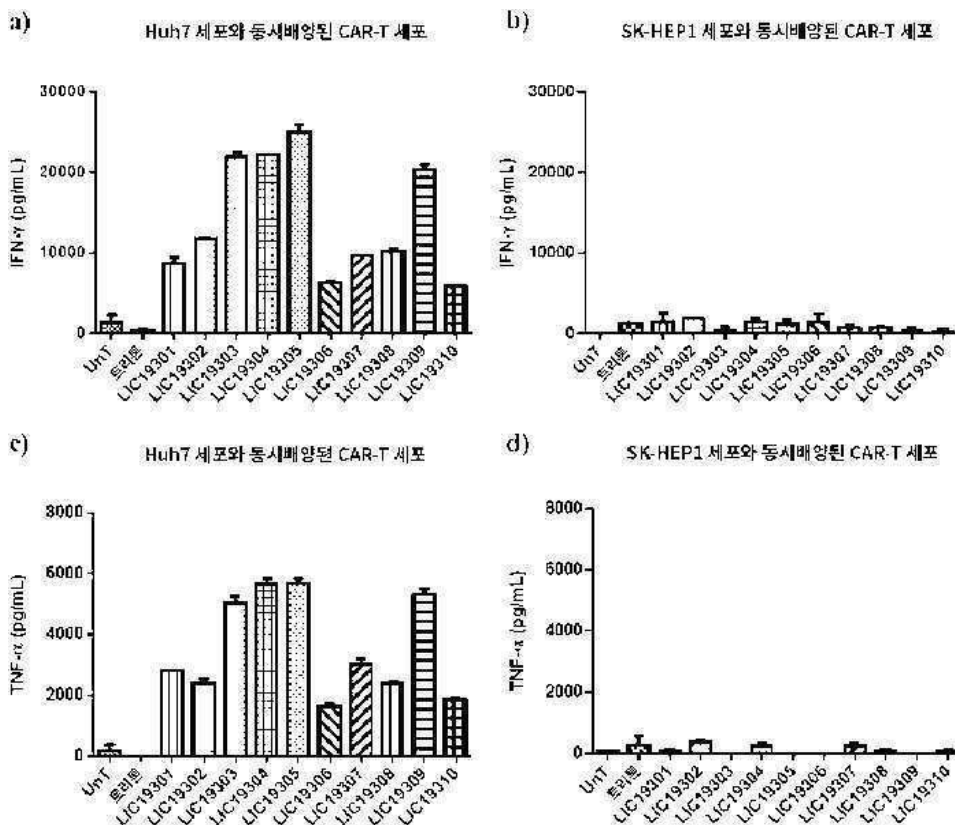
도면2



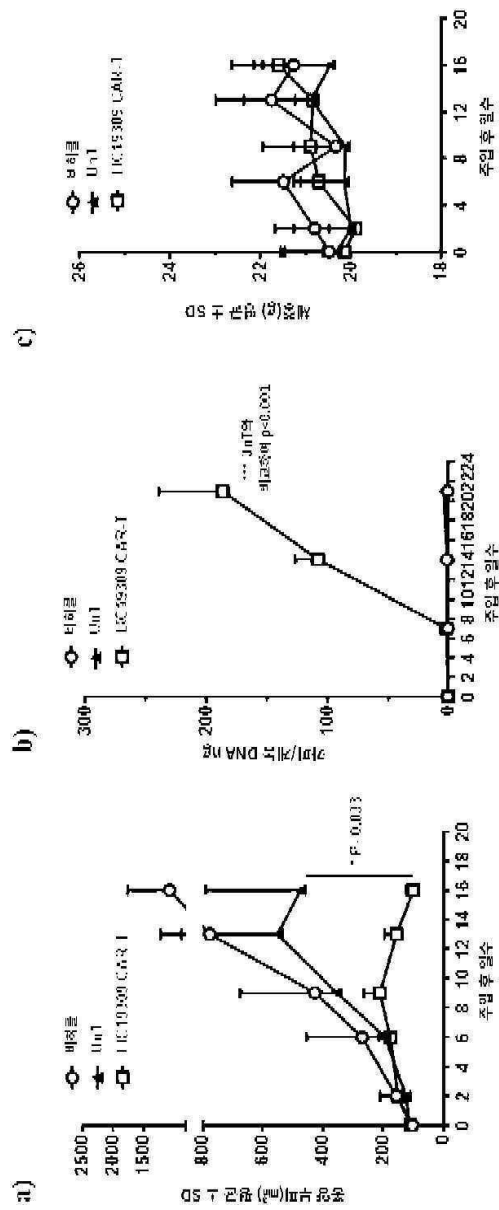
도면3



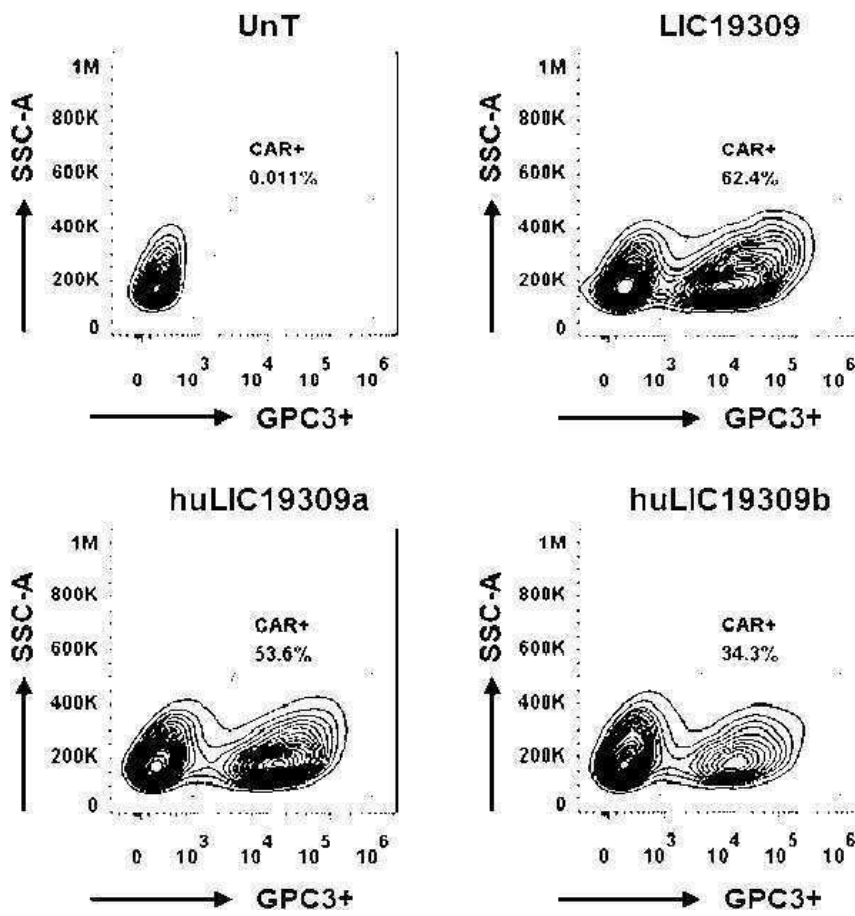
도면4



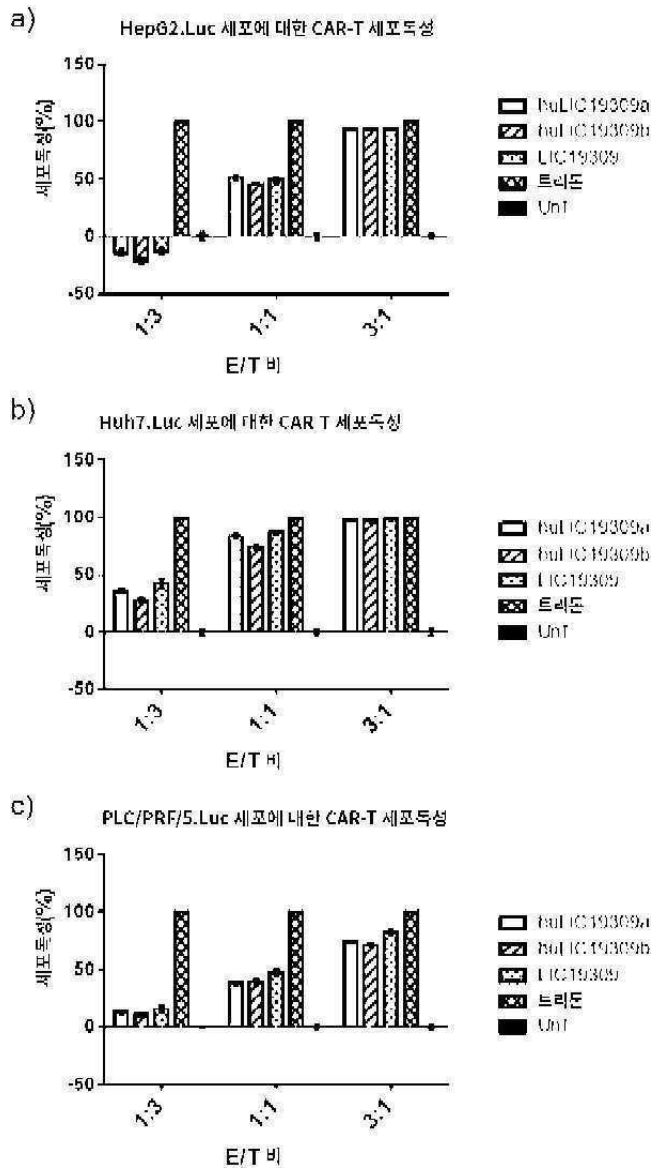
도면5



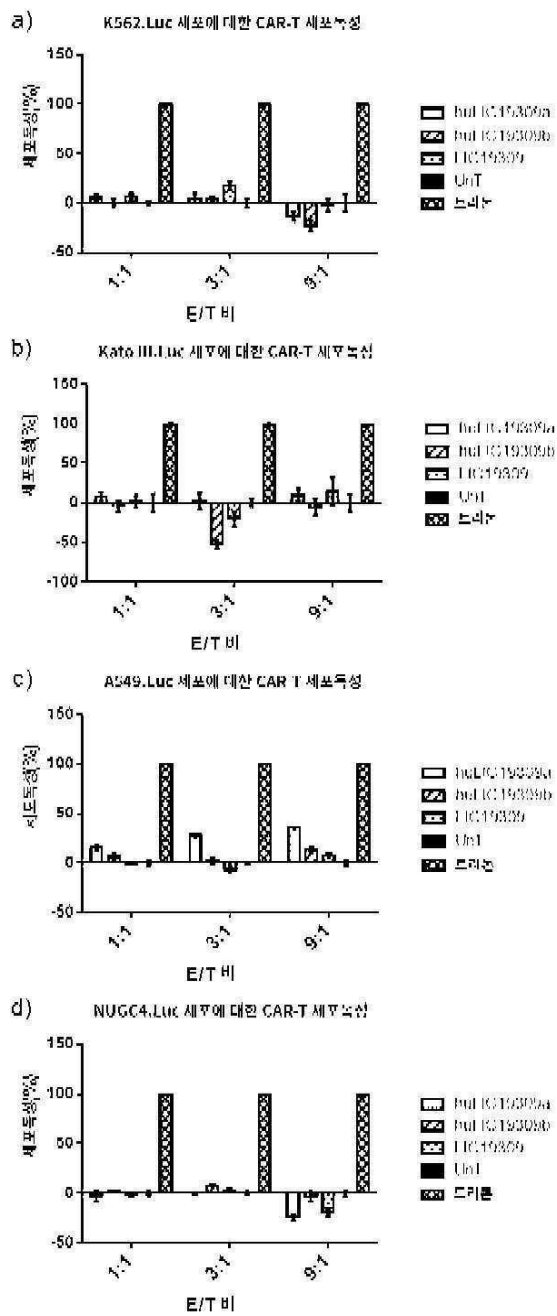
도면6



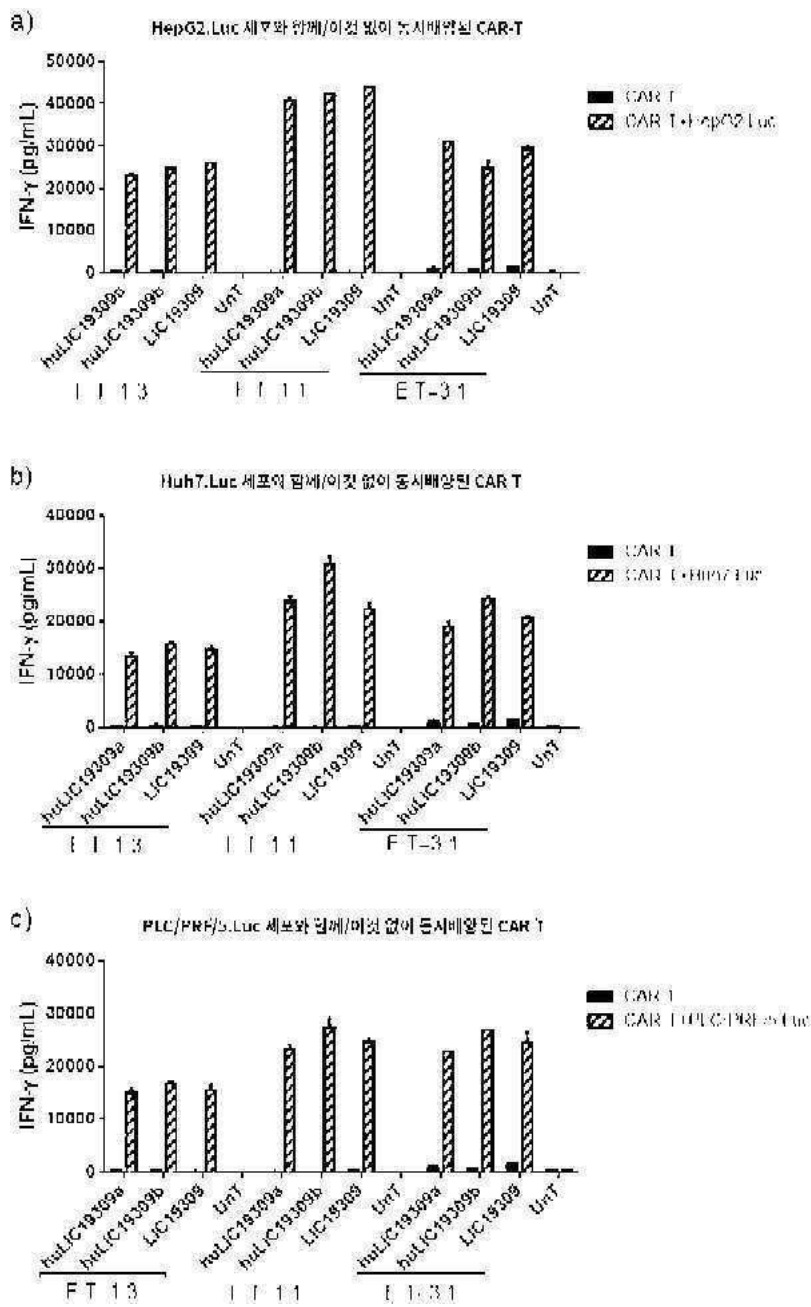
도면7



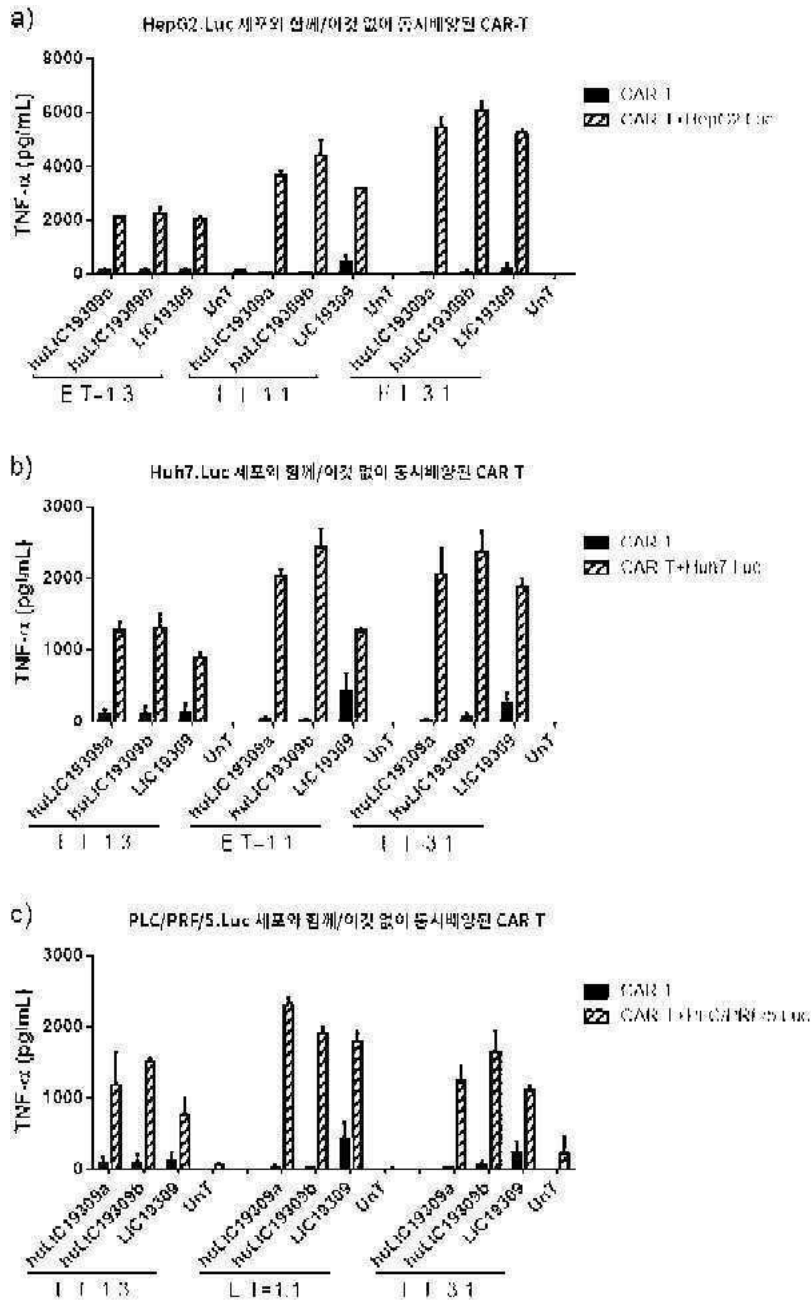
도면8



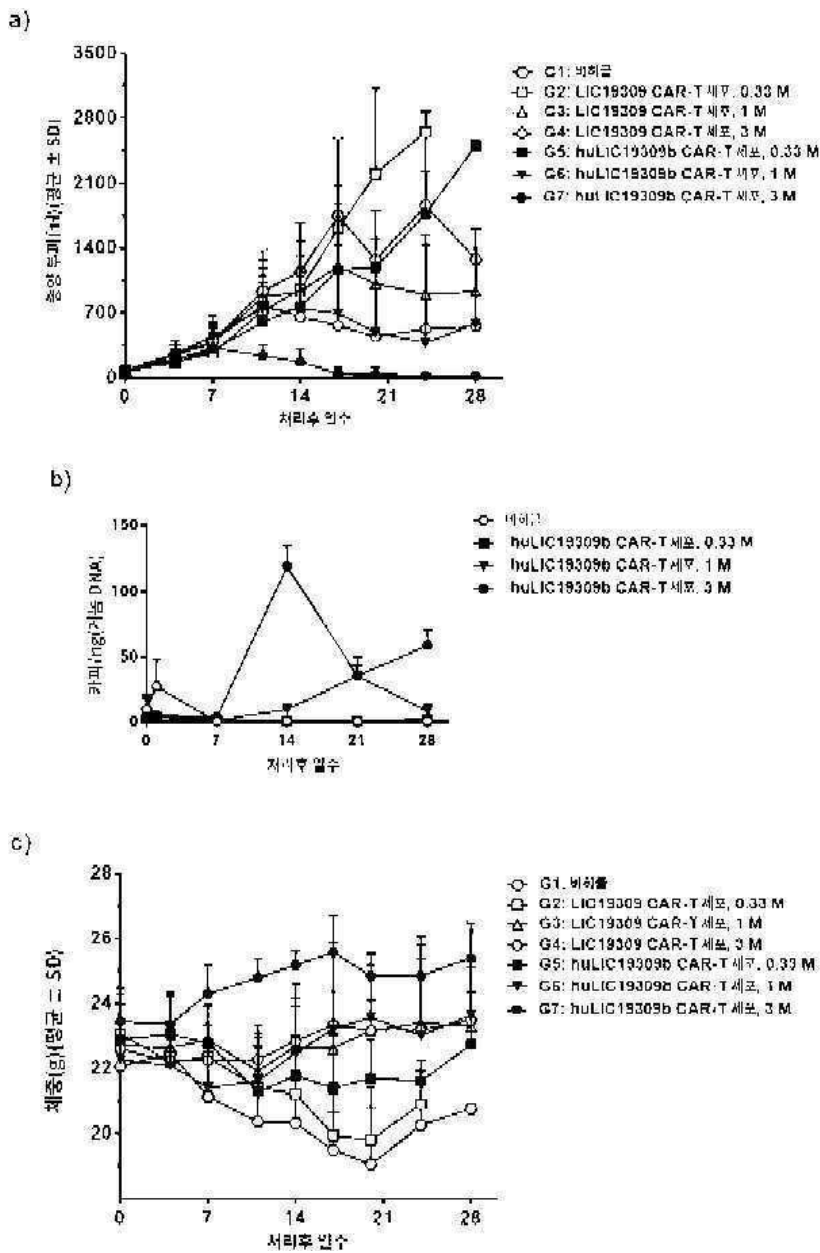
도면9



도면10

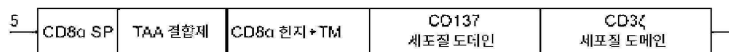


도면11

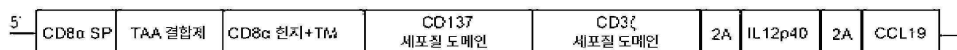


도면12

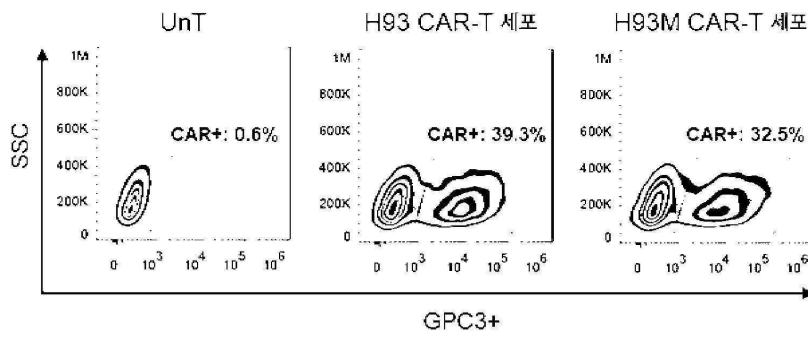
H93 CAR



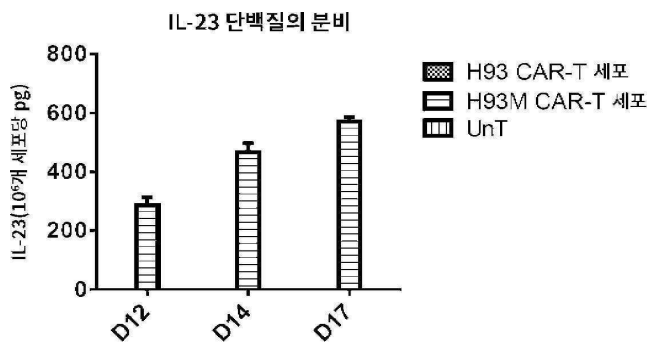
H93M CAR



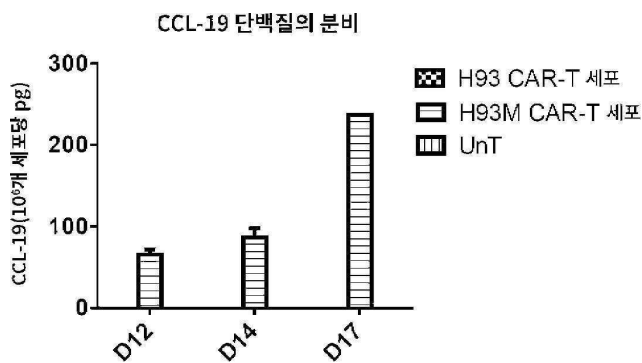
도면13



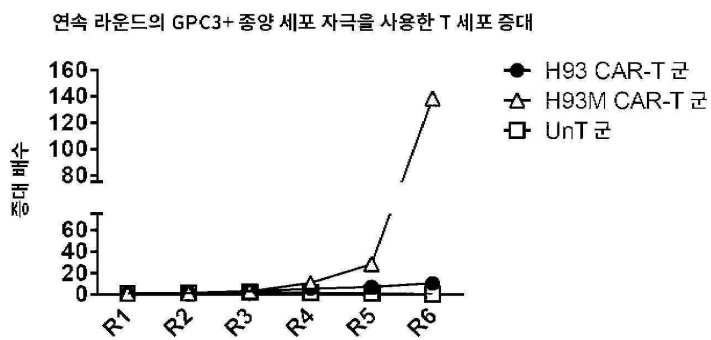
도면14a



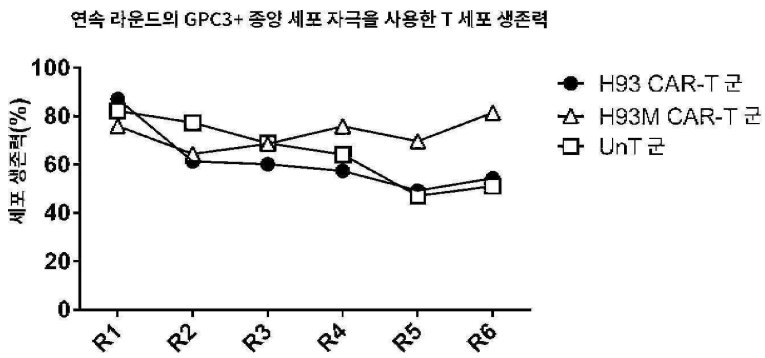
도면14b



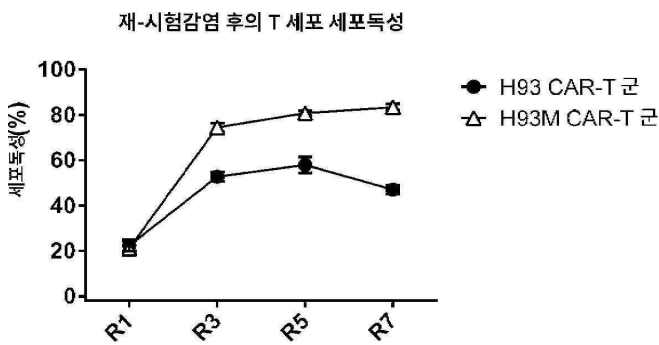
도면15a



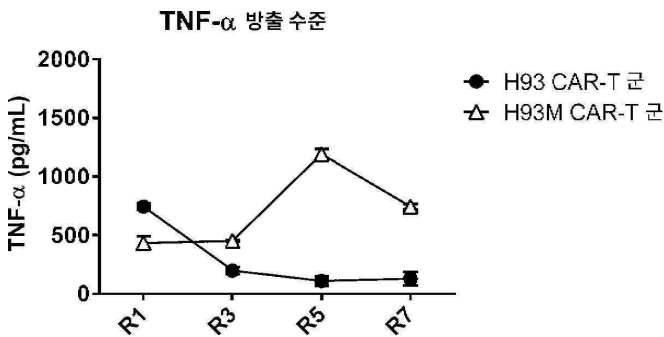
도면15b



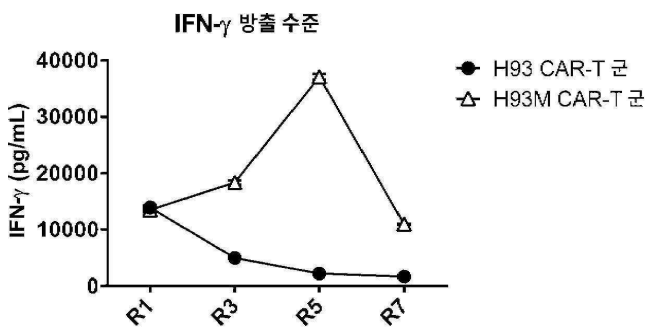
도면16a



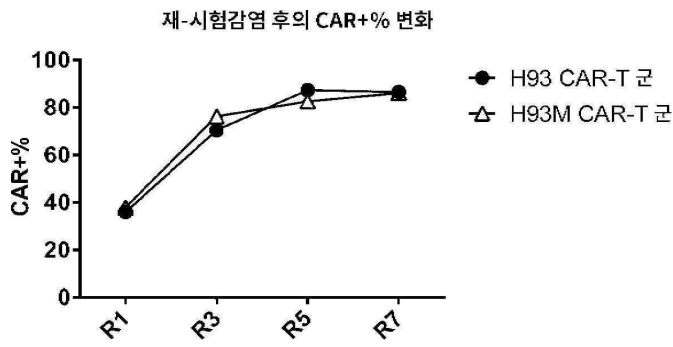
도면16b



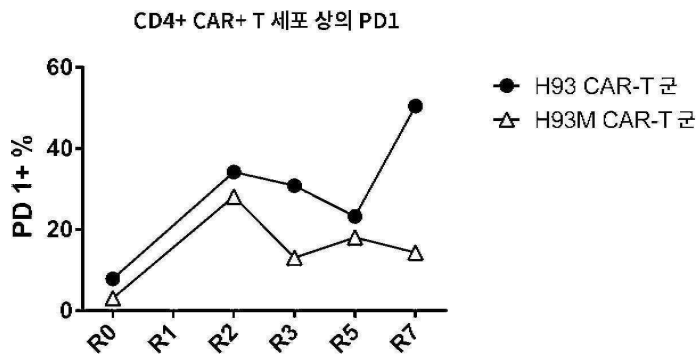
도면16c



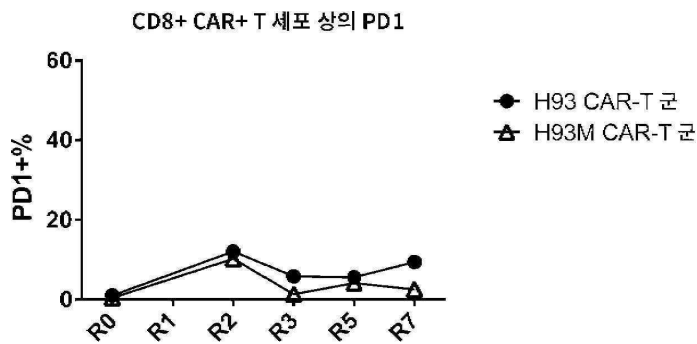
도면17



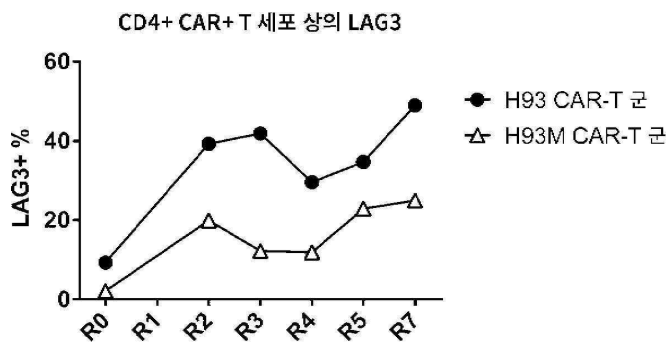
도면18a



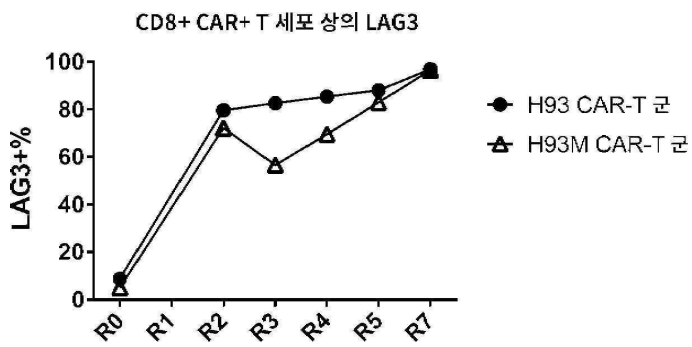
도면18b



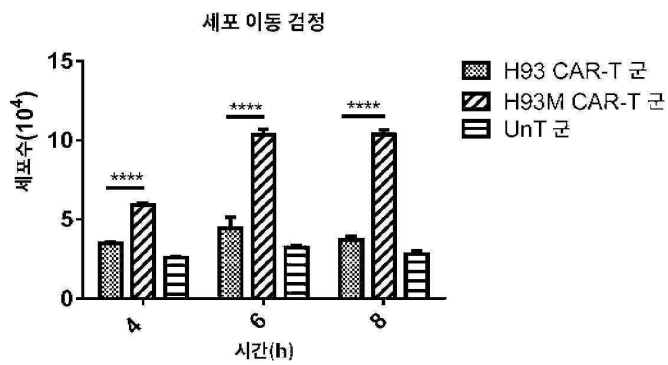
도면18c



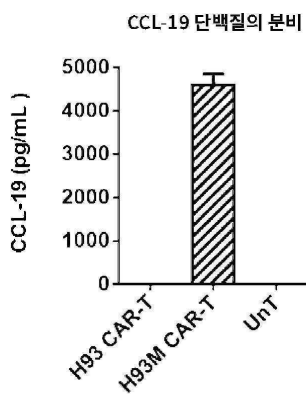
도면18d



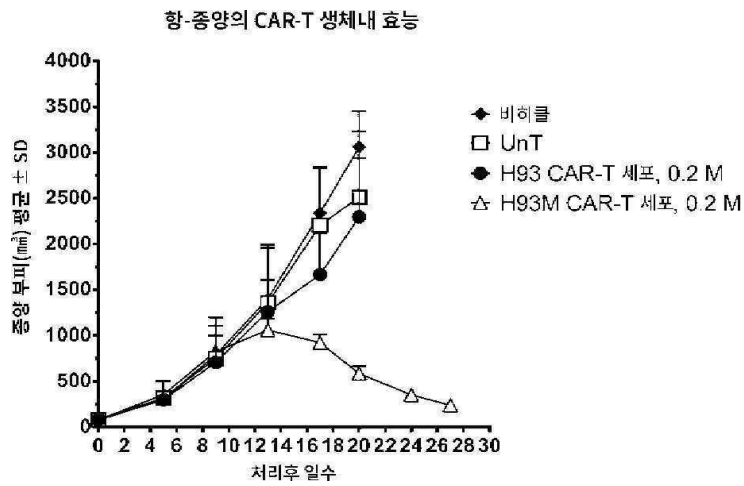
도면19a



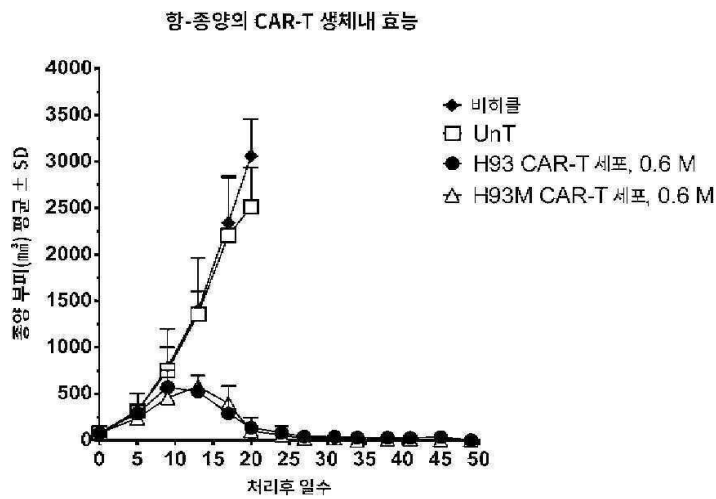
도면19b



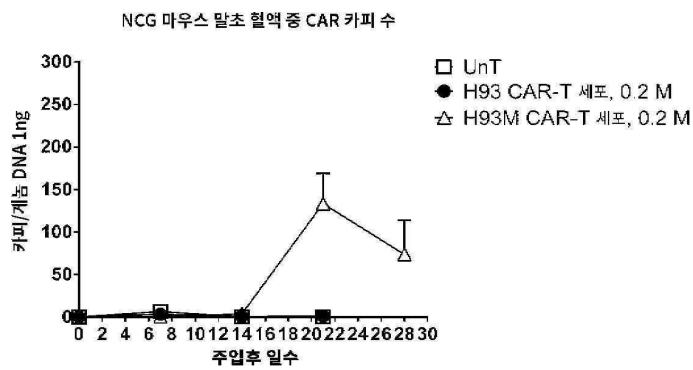
도면20a



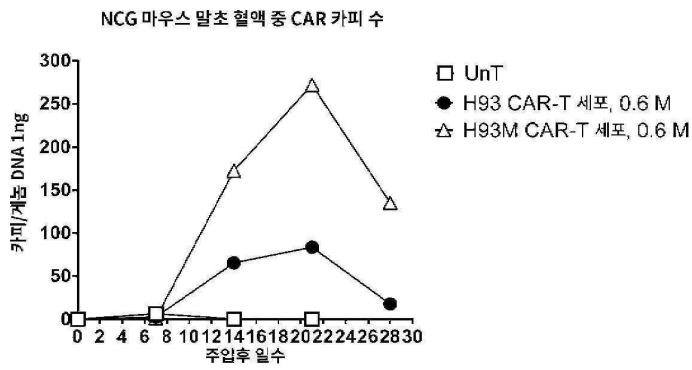
도면20b



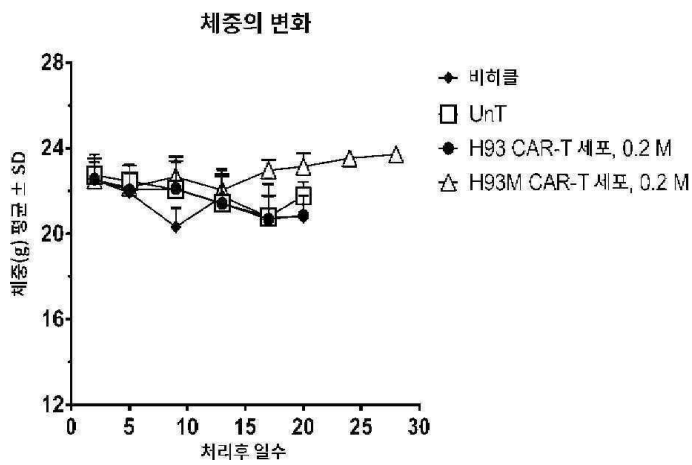
도면20c



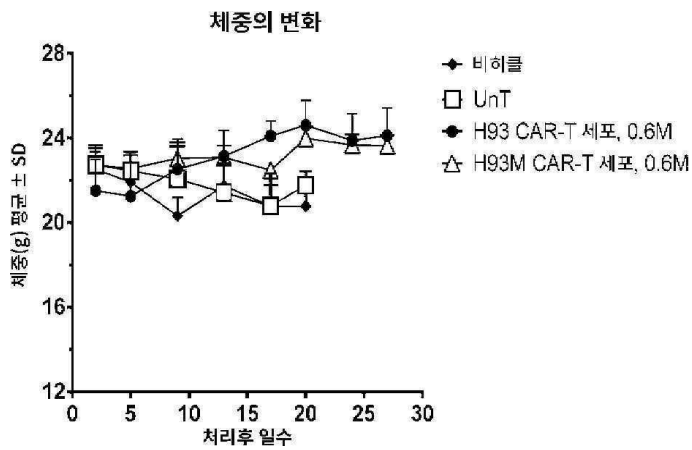
도면20d



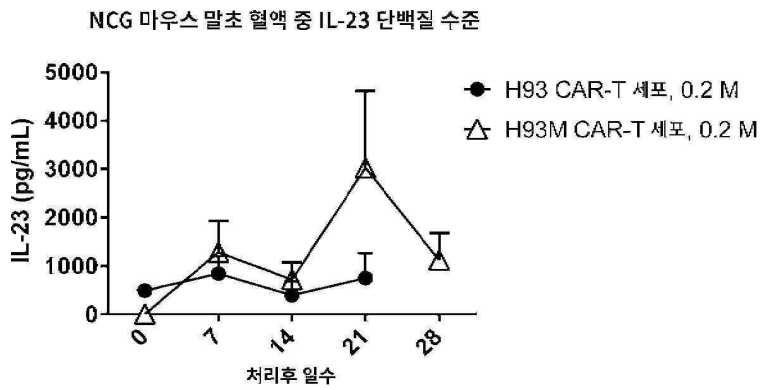
도면21a



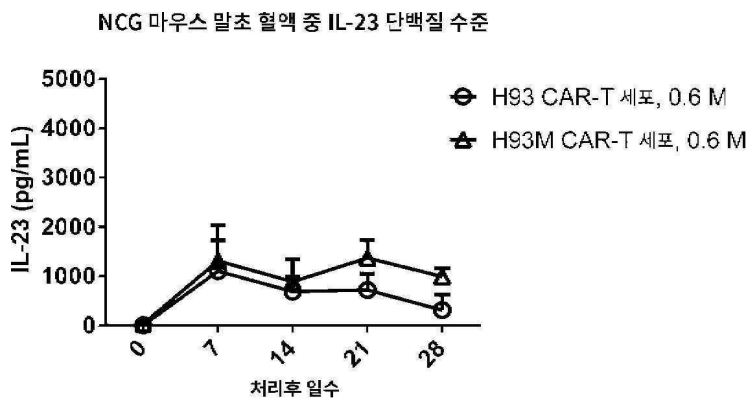
도면21b



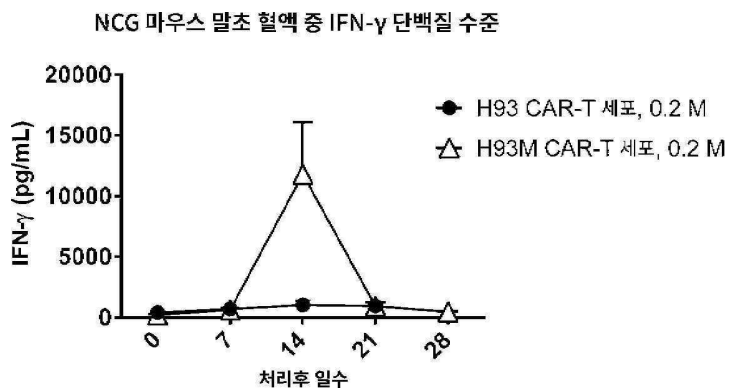
도면22a



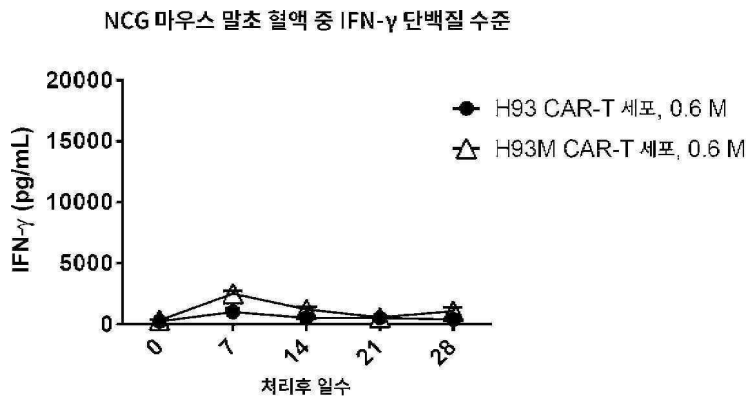
도면22b



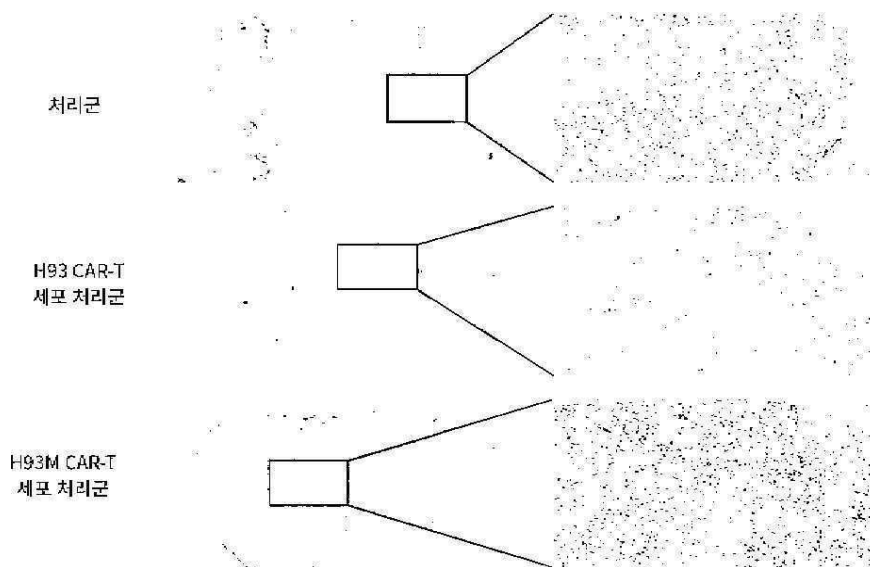
도면22c



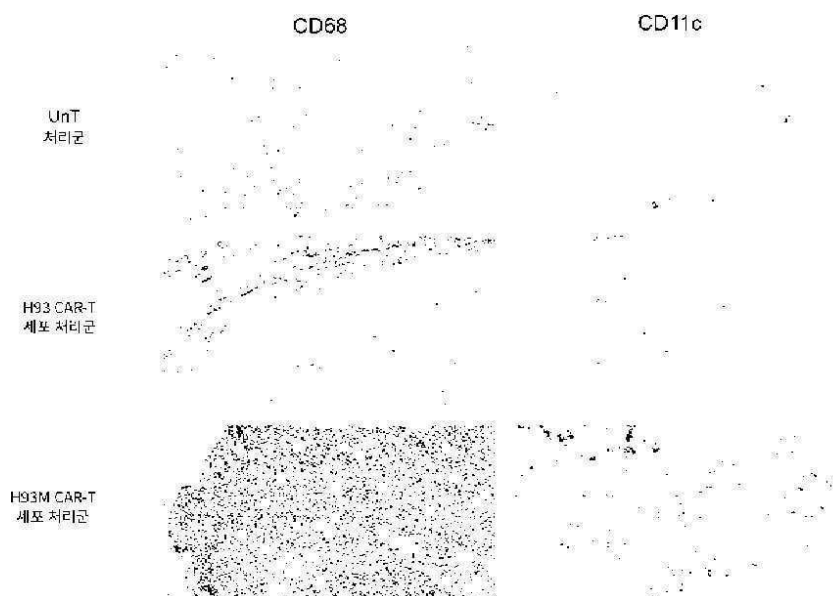
도면22d



도면23



도면24



서열목록

<110> NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.
 <120> ANTIBODIES AND CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS TARGETING GLYPICAN-3
 (GPC3) AND METHODS OF USE THEREOF
 <130> 14651-019-228
 <140> PCT/CN2021/078203
 <141> 2021-02-26
 <150> PCT/CN2020/076937
 <151> 2020-02-27
 <160> 152
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR1
 <400> 1
 Ser Gly Phe Ser Trp His
 1 5
 <210> 2
 <211>
 > 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR1
 <400> 2
 Thr Tyr Gly Met Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR1
 <400> 3
 Asp Tyr Glu Met His
 1 5
 <210> 4

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR1
 <400> 4

Ala Tyr Glu Met His
 1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> HCDR1
 <400> 5

Ala Tyr Glu Met His
 1 5

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR1

<400> 6

Thr Tyr Asp Met Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR1

<400> 7

Thr Tyr Asp Met Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 8

Thr Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 9

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 10

Val Ser Pro Met Thr

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 11

Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 12

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 13

Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Ala Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 14

Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 15

Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Asn Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 16

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 17

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser Pro Tyr Tyr Pro Gln Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 18

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR2
 <400> 19

Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2
 <400> 20

Leu Ile His Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR3
 <400> 21

Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR3
 <400> 22

Leu Ser Ile Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 23

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 24

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 25

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 26

Leu Ser Leu Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10
 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR3
 <400> 27

Gln Asn Ile Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Phe

1 5 10
 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR3
 <400> 28

Leu Ser Thr Leu Val Arg Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10
 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR3
 <400> 29

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5
 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR3
 <400> 30

Trp Gly Asn Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10
 <210> 31

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 31

Gly Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 32

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 33

Arg Ser Ser Gln Ser Phe Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln

1 5 10 15

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 34

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 35

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 36

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 37

Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 38

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 39

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> LCDR1

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Ser Thr Val Ala

1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 41

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 42

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 43

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 44

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 45

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> LCDR2

<400> 46

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 47

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 48

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 49

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 50

Leu Thr Ser Asn Arg His Thr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<400> 51

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3

<400> 52
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3

<400> 53
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3

<400> 54
 Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<400> 55
 Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 56

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3
 <400> 56
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3
 <400> 57
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 58
 <211> 9
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3
 <400> 58
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3
 <400> 59
 Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<400> 60

Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 61

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAB19301 VH

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly His Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAB19302 VH

<400> 62
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 63

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAB19303 VH

<400> 63

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

50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[illegible]

<220><223> LAb19304 VH

<400> 64

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

[illegible]

<220><223> LAb19305 VH

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val Tyr Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Asn Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 66

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb19306 VH

<400> 66

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Leu Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 67

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAB19307 VH

<400> 67

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser Pro Tyr Tyr Pro Gln Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Asn Ile Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lab19308 VH

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 69

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lab19309 VH

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

100 105 110
 Val Ser Ala

115

<210> 70

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb19310 VH

<400> 70

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Val Ser
 20 25 30
 Pro Met Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lab19301 VL

<400> 71

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Gly Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lab19302 VL

<400> 72

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

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

85

90

95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> LAB19303 VL

<400> 73

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Phe Val His Ser

20

25

30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

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

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lab19304 VL

<400> 74

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

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

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Val
85	90	95													
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
100	105	110													

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lab19305 VL

<400> 75

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb19306 VL

<400> 76

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 77

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb19307 VL

<400> 77

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Gln Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 78

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> LAb19308 VL

<400> 78

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 79

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lab19309 VL

<400> 79

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly

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

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Val
85	90	95													
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
100	105	110													

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lab19310 VL

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAB19301 scFv

<400> 81

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Gly Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

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

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

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
145 150 155 160

Ser Gly Phe Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly His Lys Leu
165 170 175

Glu Trp Met Gly Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro

180 185 190
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
195 200 205

Phe Phe Leu Gln Leu Lys Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

245

<210> 82

<211>

250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb19302 scFv

<400> 82

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro
130 135 140
Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser
145 150 155 160
Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Glu
165 170 175
Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp
180 185 190
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
195 200 205
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
210 215 220
Tyr Cys Ala Ser Leu Ser Ile Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
225 230 235 240
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
245 250
<210> 83
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LAb19303 scFv
<400> 83
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Phe Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
130 135 140
Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn
145 150 155 160
Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu
165 170 175
Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Ala Thr Ala Tyr Asn Gln
180 185 190
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
195 200 205
Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220
Tyr Cys Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ala
245
<210> 84
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LAb19304 scFv
<400> 84

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30

 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

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

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

245

<210> 85

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb19305 scFv

<400> 85

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val Tyr Gly Leu Glu

165 170 175

Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln

180 185 190

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

195 200 205
Ala Tyr Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
210 215 220
Tyr Cys Ser Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ala
245
<210> 86
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LAB19306 scFv

<400> 86
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
130 135 140

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser

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

 210 215 220
 Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Leu Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

 245 250

<210> 87

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb19307 scFv

<400> 87

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Gln Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

 35 40 45

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

 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
 130 135 140
 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly
 145 150 155 160

Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
 165 170 175
 Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser Pro Tyr Tyr Pro Gln
 180 185 190
 Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Ile Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Phe Trp

225 230 235 240
 Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 88
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LAb19308 scFv
 <400> 88

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

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

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

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

 245 250

<210> 89

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb19309 scFv

<400> 89

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly

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

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

 115 120 125
 Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 145 150 155 160
 Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu
 165 170 175
 Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln
 180 185 190

 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 195 200 205
 Ala Tyr Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ala
 245
 <210> 90

<211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LAb19310 scFv

<400> 90
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Ser Thr
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Thr Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Gln
 115 120 125
 Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Pro Ser Leu Lys
 130 135 140
 Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Val Ser Pro Met Thr
 145 150 155 160
 Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
 165 170 175
 His Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys
 180 185 190
 Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 195 200 205

Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp

210 215 220
Gly Asn Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ser

245
<210> 91
<211> 473
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LIC19301 CAR
<400> 91

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Gly Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

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

Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro
130 135 140
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
145 150 155 160

Ser Gly Phe Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly His Lys Leu

165 170 175

Glu Trp Met Gly Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro

180 185 190

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

195 200 205

Phe Phe Leu Gln Leu Lys Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg

275 280 285

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly

290 295 300

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser

355 360 365

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu

370 375 380

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg

385 390 395 400

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

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

450 455 460
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

465 470

<210> 92

<211> 475

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19302 CAR

<400> 92

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45
 Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125

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

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

 180 185 190
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Ser Leu Ser Ile Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro
 245 250 255

 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 260 265 270
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 275 280 285
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 290 295 300
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 305 310 315 320
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe

 325 330 335
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 340 345 350
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 355 360 365
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 370 375 380
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

385	390								395								400							
Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn									
				405								410								415				
Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu									
				420								425								430				
Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly									
				435								440								445				
His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr									
				450								455								460				
Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg														
465								470								475								
<210>		93																						
<211>		470																						
<212>		PRT																						
<213>		Artificial Sequence																						
<220><223>		LIC19303 CAR																						
<400>		93																						
Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly									
1				5				10				15												
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ser									
				20								25								30				
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser									
				35								40								45				
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro									
				50								55								60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile									
65				70				75				80												
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly									
				85								90								95				
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys									
				100								105								110				

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn

145 150 155 160

Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

210 215 220

Tyr Cys Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro

245 250 255

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

260 265 270

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

275 280 285

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly

290 295 300

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

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

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

<210> 94
<211> 470
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19304 CAR

<400> 94

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val

85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 145 150 155 160
 Ala Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu
 165 170 175
 Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln
 180 185 190
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 195 200 205
 Ala Tyr Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ser Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 245 250 255
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 260 265 270
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 275 280 285
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 290 295 300
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 325 330 335
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu

340 345 350

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

355 360 365

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
435 440 445
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
450 455 460

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
465 470

<210> 95

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19305 CAR

<400> 95

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

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

65				70				75				80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Val
85				90				95							
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
100				105				110							
Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr
115				120				125							
Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro
130				135				140							
Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
145				150				155				160			
Ala	Tyr	Glu	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Val	Tyr	Gly	Leu	Glu
165				170				175							
Trp	Ile	Gly	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Asn	Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln
180				185				190							
Asn	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr
195				200				205							
Ala	Tyr	Met	Glu	Val	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr
210				215				220							
Tyr	Cys	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
225				230				235				240			
Val	Thr	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro
245				250				255							
Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu
260				265				270							
Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp
275				280				285							
Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly
290				295				300							
Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg
305				310				315				320			

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

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

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
355 360 365

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
370 375 380

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

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

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

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
435 440 445

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
465 470

<210> 96
<211> 475
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LIC19306 CAR
<400> 96

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

165 170 175
Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp
180 185 190
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
195 200 205
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
210 215 220
Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Leu Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
225 230 235 240

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

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr

370 375 380

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

385 390 395 400

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

405 410 415

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

465 470 475

<210> 97

<211> 475

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19307 CAR

<400> 97

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Gln Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly

145 150 155 160

Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu

165 170 175

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

180 185 190

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Ile Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Phe Trp

225 230 235 240

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro

245 250 255

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

260 265 270

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His

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

 325 330 335
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 340 345 350
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 355 360 365
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 370 375 380
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 385 390 395 400

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

 465 470 475
 <210> 98
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LIC19308 CAR
 <400> 98
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

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

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

 115 120 125
 Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
 130 135 140
 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ile
 145 150 155 160
 Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
 165 170 175
 Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp
 180 185 190

 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Ser Leu Ser Thr Leu Val Arg Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro
 245 250 255

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

260 265 270
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His

275 280 285
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu

290 295 300
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr

305 310 315 320
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe

325 330 335

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
340 345 350

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
355 360 365

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
370 375 380

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

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

405 410 415
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu

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

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

450 455 460
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

465 470 475

<210> 99

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19309 CAR

<400> 99

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu

165 170 175

Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln

180 185 190

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

195 200 205

Ala Tyr Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr

210 215 220

Tyr Cys Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 245 250 255
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 260 265 270

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

 340 345 350
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 355 360 365
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 370 375 380
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 385 390 395 400
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 405 410 415

 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 420 425 430
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 435 440 445
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 <210> 100

<211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LIC19310 CAR

<400> 100
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Ser Thr
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Thr Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Gln
 115 120 125
 Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Pro Ser Leu Lys
 130 135 140
 Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Val Ser Pro Met Thr
 145 150 155 160
 Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
 165 170 175
 His Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys
 180 185 190
 Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 195 200 205

Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp

210

215

220

Gly Asn Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

225

230

235

240

Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro

245

250

255

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

260

265

270

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

275

280

285

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly

290

295

300

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg

305

310

315

320

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

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

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

450		455		460
Gln Ala Leu Pro Pro Arg				
465		470		
<210>	101			
<211>	21			
<212>	PRT			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	CD8alpha signal peptide			
<400>	101			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu				
1	5	10	15	

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 102

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8alpha hinge domain

<400> 102

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

<210>	103
<211>	24
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	CD8alpha transmembrane domain
<400>	103
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu	
1	5
10	15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 104

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD137 cytoplasmic domain

<400> 104

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> 105

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3zeta cytoplasmic domain

<400> 105

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> 106
<211> 541
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> GPC3 fusion protein
<400> 106

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
1 5 10 15
Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
20 25 30

Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
35 40 45
Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn
50 55 60
Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile
65 70 75 80
Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg
85 90 95
His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser
100 105 110
Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val
115 120 125
Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn
130 135 140
Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn
145 150 155 160
Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly
165 170 175

Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met
180 185 190

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

Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe
210 215 220

Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr
225 230 235 240

Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val
245 250 255

Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp
260 265 270

Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg
275 280 285

Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His
290 295 300

Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr
305 310 315 320

Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Phe Ala
325 330 335

Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala
340 345 350

His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile
355 360 365

Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr
370 375 380

Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn
385 390 395 400

Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly
405 410 415

Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu
420 425 430

Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu
435 440 445

Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu
450 455 460

Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu
465 470 475 480

Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
485 490 495

Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
500 505 510

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
515 520 525

His Asn Leu Gly Asn Val His His His His His His His

530 535 540

<210> 107

<211> 494

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19301 CAR

<400> 107

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
20 25 30

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

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
100 105 110

Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr

115

120

125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe

180

185

190

Pro Gly His Lys Leu Glu Trp Met Gly Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn

195

200

205

Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp

210

215

220

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

225

230

235

240

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe

245

250

255

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

340

345

350

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

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

 405 410 415
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 420 425 430
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 435 440 445
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 450 455 460
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 465 470 475 480

 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

 <210> 108
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LIC19302 CAR
 <400> 108
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

 35 40 45
 Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

65	70	75	80
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
	85	90	95
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr			
	100	105	110
Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr			
	115	120	125
Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser			
	130	135	140
Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly			
145	150	155	160
Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser			
	165	170	175
Gly Phe Ala Phe Ser Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro			
	180	185	190
Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr			
	195	200	205
Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp			
	210	215	220
Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu			
225	230	235	240
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Ser Ile Met Ile Arg Gly			
	245	250	255
Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr			
	260	265	270
Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile			
	275	280	285
Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala			
	290	295	300
Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr			
305	310	315	320

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

325 330 335

Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

<210> 109

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19303 CAR

<400> 109

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

				20				25				30			
Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln
35				40				45							
Ser	Phe	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln	Trp	Tyr	Leu	Gln
50				55				60							
Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg
65				70				75				80			
Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
85				90				95							
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr
100				105				110							
Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
115				120				125							
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser
130				135				140							
Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala
145				150				155				160			
Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser
165				170				175							
Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Asp	Tyr	Glu	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro
180				185				190							
Val	His	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Ala
195				200				205							
Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp
210				215				220							
Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu
225				230				235				240			
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp
245				250				255							
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro
260				265				270							

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

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460

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

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 110
<211> 491
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19304 CAR

<400> 110

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

20 25 30

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

35 40 45

Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro

180 185 190

Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn

195 200 205

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

210 215 220

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

225					230					235					240				
Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp				
245					250					255									
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro				
260					265					270									
Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu				
275					280					285									
Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His				
290					295					300									
Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu				
305					310					315					320				
Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr				
325					330					335									
Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe				
340					345					350									
Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg				
355					360					365									
Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser				
370					375					380									
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr				
385					390					395					400				
Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys				
405					410					415									
Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn				
420					425					430									
Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu				
435					440					445									
Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly				
450					455					460									
His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr				
465					470					475					480				

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

490

<210> 111

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19305 CAR

<400> 111

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

1

5

10

15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

20

25

30

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

35

40

45

Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln

50

55

60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

65

70

75

80

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

85

90

95

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr

100

105

110

Tyr Cys Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115

120

125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro

180

185

190

Val Tyr Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn
195 200 205

Thr Ala Tyr Ser Gln Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp
210 215 220

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

225 230 235 240

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp
245 250 255

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

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

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
290 295 300

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

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

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

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

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

370 375 380

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

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

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

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu

	435						440					445							
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly																			
	450						455					460							
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr																			
465						470					475							480	
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg																			
					485					490									
<210>	112																		
<211>	496																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	LIC19306 CAR																		
<400>	112																		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu																			
1				5					10						15				
His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu																			
			20					25						30					
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln																			
	35						40						45						
Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln																			
	50					55					60								
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg																			
65						70					75							80	
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp																			
			85						90						95				
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr																			
	100							105					110						
Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr																			
	115						120						125						
Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser																			
130						135						140							

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

145 150 155 160

Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

165 170 175

Gly Phe Ala Phe Ser Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro

180 185 190

Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr

195 200 205

Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Leu Met Ile Arg Gly

245 250 255

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 405 410 415
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 420 425 430
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

 435 440 445
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 450 455 460
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
465 470 475 480
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495
<210> 113
<211> 496
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223
> LIC19307 CAR
<400> 113
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Gln
 20 25 30
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln
 35 40 45
Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 65 70 75 80
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr

100	105	110	
Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr			
115	120	125	
Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser			
130	135	140	
Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly			
145	150	155	160
Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser			
165	170	175	
Gly Phe Ala Phe Gly Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro			
180	185	190	
Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser			
195	200	205	
Pro Tyr Tyr Pro Gln Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp			
210	215	220	
Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu			
225	230	235	240
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Ile Ala Arg Arg Gly			
245	250	255	
Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Thr			
260	265	270	
Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile			
275	280	285	
Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala			
290	295	300	
Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr			
305	310	315	320
Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu			
325	330	335	
Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile			
340	345	350	

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
355 360 365
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
370 375 380
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
385 390 395 400
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
405 410 415
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
420 425 430
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
435 440 445
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
450 455 460
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
465 470 475 480
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490 495

<210> 114
<211> 496
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LIC19308 CAR
<400> 114

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

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

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

 195 200 205
 Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Ser Thr Leu Val Arg Gly
 245 250 255
 Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr
 260 265 270

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

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
325 330 335

Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

<210> 115

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LIC19309 CAR

<400> 115

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

20 25 30

Pro Val Asn Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
35 40 45

Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Tyr Cys Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser
130 135 140

Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
145 150 155 160

Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser
165 170 175

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro
180 185 190

Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn
195 200 205

Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp
210 215 220

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu
225 230 235 240

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp
245 250 255

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

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

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

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

 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480

 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

 <210> 116
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LIC19310 CAR

<400> 116

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met
20 25 30
Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
35 40 45
Asn Val Arg Ser Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
50 55 60
Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro
65 70 75 80
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His
100 105 110
Trp Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
130 135 140
Lys Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
145 150 155 160
Gly Pro Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
165 170 175
Val Ser Pro Met Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu
180 185 190
Trp Ile Gly Leu Ile His Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln
195 200 205
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
210 215 220
Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Asn Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

245						250						255											
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro								
260						265						270											
Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu								
275						280						285											
Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His								
290						295						300											
Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu								
305						310						315						320					
Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr								
325						330						335											
Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe								
340						345						350											
Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg								
355						360						365											
Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser								
370						375						380											
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr								
385						390						395						400					
Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys								
405						410						415											
Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn								
420						425						430											
Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu								
435						440						445											
Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly								
450						455						460											
His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr								
465						470						475						480					
Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro														
485						490																	

<210> 117

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9VH1

<400> 117

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 118

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9VH2

<400> 118

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

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

Val Ser Ser

115
<210> 119
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 9VH3
<400> 119

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

Val Ser Ser

115

<210> 120

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5VH1

<400> 120

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 121

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5VH2

<400>

> 121

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

1 5 10 15

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

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser

115
<210> 122
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 5VH3
<400> 122

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 123

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL1

<400> 123

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val

85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 124

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL2

<400> 124

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val

85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 125

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL3

<400> 125

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 126

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgKCL

<400> 126

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 127

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG1CH

<400> 127

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 128

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LAb9VH1VL3 scFv

<400> 128

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

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

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

145 150 155 160
Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu

165 170 175
 Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln
 180 185 190
 Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr
 195 200 205
 Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 129
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LAB9VH3VL2 scFv
 <400> 129

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125
 Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 145 150 155 160
 Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu
 165 170 175

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

245

<210> 130
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> huLIC19309a CAR
 <400> 130

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu
 20 25 30
 Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln
 35 40 45

 Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

65	70							75							80		
Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp		
85								90				95					
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr		
100								105				110					
Tyr	Cys	Phe	Gln	Val	Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr		
115								120				125					
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser		
130								135				140					
Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala		
145								150				155				160	
Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser		
165								170				175					
Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro		
180								185				190					
Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Asn		
195								200				205					
Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp		
210								215				220					
Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu		
225								230				235				240	
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp		
245								250				255					
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro		
260								265				270					
Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu		
275								280				285					
Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His		
290								295				300					
Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu		
305								310				315				320	
Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr		

325 330 335
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480

 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490
 <210> 131
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> huLIC19309b CAR (H93 CAR)
 <400> 131
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 20 25 30

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

35 40 45

Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr

180 185 190

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn

195 200 205

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

210 215 220

Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu

225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp

245 250 255

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro

260 265 270

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

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

 325 330 335
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400

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

 465 470 475 480
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

 <210> 132
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> "whitlow" linker

<400> 132

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 133

<211> 962

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> H93M CAR amino acid

<400> 133

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu

20 25 30

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

35 40 45

Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

	165		170		175										
Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr
	180							185						190	
Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Asn
	195							200						205	
Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asn
	210					215					220				
Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu
225					230					235				240	
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp
			245						250				255		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro
	260							265					270		
Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu
	275							280					285		
Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His
	290					295						300			
Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu
305					310						315			320	
Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr
			325							330			335		
Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe
	340							345					350		
Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg
	355							360					365		
Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser
	370					375							380		
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr
385					390					395				400	
Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys
			405							410				415	

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

420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Val Asn Gly Ser Gly

485 490 495

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

500 505 510

Pro Gly Pro Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu

515 520 525

Val Phe Leu Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp

530 535 540

Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met

545 550 555 560

Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr

565 570 575

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

580 585 590

Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly

595 600 605

Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp

610 615 620

Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn

625 630 635 640

Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr

645 650 655

Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys

660 665 670
 Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala
 675 680 685
 Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr
 690 695 700
 Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser

 705 710 715 720
 Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu
 725 730 735
 Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro
 740 745 750
 Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu
 755 760 765
 Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe
 770 775 780

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

 850 855 860
 Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Trp Thr Ser Pro
 865 870 875 880
 Ala Pro Thr Leu Ser Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser
 885 890 895
 Val Thr Gln Lys Pro Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr
 900 905 910
 Leu Leu Ile Lys Asp Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr

915 920 925

Leu Arg Gly Arg Gln Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu

930 935 940

Arg Ile Ile Gln Arg Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg

945 950 955 960

Ser Ser

<210> 134

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL12p40-T2A-CCL-19

<400> 134

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu

1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val

20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu

35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val

85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp

100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe

115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp

130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg

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

 225 230 235 240
 Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
 245 250 255
 Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
 260 265 270
 Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
 275 280 285
 Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300

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

 370 375 380
 Lys Pro Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr Leu Leu Ile
 385 390 395 400

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

<210> 135
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human IL12p40
 <400> 135

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30
 Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
 35 40 45
 Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
 50 55 60
 Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
 65 70 75 80
 Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
 85 90 95
 Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
 100 105 110
 Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
 115 120 125
 Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
 130 135 140
 Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
325

<210> 136

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Human CCL-19

<400> 136

Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Trp Thr Ser Pro
1 5 10 15

Ala Pro Thr Leu Ser Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser
20 25 30

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

<210> 137

<211> 2886

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H93M CAR nucleic acid

<400> 137

atggccctgc ctgtgaccgc tctgtctgtg cctctggctc tgctgtctga cgctgcccgc 60
 cctgacattg tgatgaccca gtctccctg tccctgccag tgaccctgg agagccagcc 120

tccatctctt gcaggagctc ccagaccatc gtgcacagca acggcaatac atacctggag 180
 tggtatctgc agaagcccgg ccagtcacct cagctgtgta tctacaaggt gtctaacagg 240
 ttcagcggag tgccagaccg ctttagcgga tccggtctg gcaccgattt cacactgaag 300
 atctctagag tggaggccga ggacgtgggc gtgtactatt gcttccaggt gagccacgtg 360
 ccataacct ttggcggcgg cacaagctg gagatcaagg gcagcacctc cggatctggc 420
 aagccaggat ccggagaggg atctacaaag ggacaggtgc agctggtgca gagcggagca 480
 gaggtgaaga agcctggagc cagcgtgaag gtgtcctgta aggcctctgg ctacaccttc 540

acagactatg agatgcactg ggtgcggcag gcaaccggac agggcctgga gtggatggga 600
 ggaatcgacc cagagacagg caacacagcc tactcccaga agttaaagg cgggtgacc 660
 atgacaagaa ataccagcat ctccacagcc tatatggagc tgtctagcct gagatctgag 720
 gatacagccg tgiactattg tgctcgctac tattcctttg cctactgggg acaggggaca 780
 ctggtcaccg tctcatcaac tagtaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 840
 cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 900

ggcgcagtcg acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgccttg	960
gccgggactt gtgggtcct tctcctgtca ctggttatca cctttactg caaacggggc	1020
agaaagaaac tctgtatat attcaaaaaa ccatttatga gaccagtaca aactactcaa	1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga	1140
gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat	1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg	1260
gacctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaacctc aggaaggcct gtacaatgaa	1320
ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg	1380
aggggcaagg ggcacgatgg ccttiaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac	1440
gacgcccctc acatgcaggc cctgccccct cgcgttaacg gcagcggagc taaaaactc	1500
agtcttctaa aacaggtcgg tgacgtggag gagaatcccg gccctatgtg ccatcagcag	1560
ctggtcattt ctiggttctc tctggtgttt ctggctagtc ctctggtcgc tatttgggaa	1620
ctgaaaaaag atgtgtacgt ggtggagctg gactggtatc cagatgcacc aggagagatg	1680
gtggtgctga cctgcgacac acccgaggag gatggcatca cctggacact ggaccagagc	1740
tccgaggtgc tgggaagcgg caagacctg acaatccagg tgaaggagt t cggcgatgcc	1800
ggccagtaca catgtcaciaa gggcggcgag gtgtgtctc acagcctgct gctgtgcac	1860
aagaaggagg acggcatctg gtccacagac atcctgaagg atcagaagga gcctaagaac	1920
aagaccttc tgcggtcgca ggccaagaat tattctggcc ggttcacctg ttggtggctg	1980
accacaatct ctaccgacct gaccttcagc gtgaagtcta gccggggctc ctctgatcca	2040
caggagtgat catgcggagc agccacctg agcgcggagc gggtagagg cgacaacaag	2100
gagtacgagt atagcgtgga gtgccaggag gattccgct gtccagcagc agaggagtcc	2160
ctgcctatcg aagtgatggt ggacgccgtg cacaagctga agtacgagaa ttatacaagc	2220
tccttcttta tcaggacat catcaagcca gatcccccta agaacctgca gctgaagccc	2280
ctgaagaatt cccgccaggt ggaggtgtct tgggagtacc ctgatactg gtccacacca	2340
cacagctatt tctccctgac cttttgcgtg cagggtgcagg gcaagtctaa gagggagaag	2400
aaggaccgcg tggtcaccga taagacaagc gccaccgtga tctgtcggaa gaacgcctcc	2460
atctctgtgc gggctcagga ccgatattac tcatcatcat ggagtgaatg ggcctcagt	2520
ccttgctcag gcagtggaga gggcagagga agtctgctaa catgcggtga cgtcaggag	2580
aatcctggcc caatggctct gctgtggca ctgagtctgc tggctcctgtg gacatcacct	2640

gcacctaccc tgagtggaac taatgacgct gaagattgtt gcctgagcgt gacccagaag 2700
 ccaatccccg gctacatcgt gaggaacttc cactatctgc tgatcaagga cggatgcagg 2760
 gtgcctgcag tgggtgttac cacactgcgg ggcagacagc tgtgcgcacc acctgatcag 2820
 ccctgggtcg agagaattat tcagagactg cagcgcacct cagctaagat gaaacgccgc 2880
 tcaagt 2886

<210> 138
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P2A
 <400> 138

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

1 5 10 15
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 139
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T2A
 <400> 139

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

1 5 10 15
 Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 140
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MluI restriction site
 <400>

140
 acgcgt 6
 <210> 141

<211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SpeI restriction site
 <400> 141
 actagt 6
 <210> 142
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EcoRI restriction site
 <400> 142
 gaattc 6
 <210> 143

 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HpaI restriction site
 <400> 143
 gttaac 6
 <210> 144
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9VH1-hIgG1CH
 <400> 144
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu

50 55 60
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

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

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

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

305	310								315								320							
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr									
325								330				335												
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr									
340								345				350												
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu									
355								360				365												
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys									
370								375				380												
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser									
385				390				395				400												
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp									
405								410				415												
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser									
420								425				430												
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala									
435								440				445												
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
450								455				460												
<210>	145																							
<211>	464																							
<212>	PRT																							
<213>	Artificial Sequence																							
<220><223>	9VH2-hIgG1CH																							
<400>	145																							
Met	Gly	Trp	Ser	Trp	Ile	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Gly									
1	5				10				15															
Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys									
20				25				30																
Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe									
35				40				45																

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

50

55

60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser

65

70

75

80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp

85

90

95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115

120

125

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

130

135

140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

145

150

155

160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

165

170

175

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

180

185

190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

195

200

205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

210

215

220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

225

230

235

240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

245

250

255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

260

265

270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

275

280

285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

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

 340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 146
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9VH3-hIgG1CH
 <400> 146
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

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

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

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

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

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

355 360 365

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

370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

405 410 415

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

420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455 460

<210> 147

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5VH1-hIgG1CH

<400> 147

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

1 5 10 15

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

20					25					30						
Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
35					40					45						
Ala	Tyr	Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	
50					55					60						
Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Asn	Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln	
65					70					75					80	
Asn	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	
85					90					95						
Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
100					105					110						
Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
115					120					125						
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
130					135					140						
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
145					150					155					160	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
165					170					175						
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
180					185					190						
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
195					200					205						
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
210					215					220						
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	
225					230					235					240	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
245					250					255						
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
260					265					270						

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

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

<210> 148
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5VH2-hIgG1CH
 <400> 148

Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
20 25 30
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
35 40 45
Ala Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln
65 70 75 80
Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr
85 90 95
Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145 150 155 160
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
165 170 175
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
180 185 190
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
195 200 205
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
210 215 220
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 149
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5VH3-hIgG1CH
 <400> 149

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Glu Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln

65 70 75 80

Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr

85 90 95

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Thr Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

115 120 125

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

130 135 140

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

145 150 155 160

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

195 200 205

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

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

290 295 300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

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

435 440 445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 150

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL1-hIgKCL

<400> 150

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

1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

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

115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

165 170 175

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

180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

210 215 220

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

225 230 235

<210> 151

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL2-hIgKCL

<400> 151

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

1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

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

115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

165 170 175

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

180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 152
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL3- hIgKCL
 <400> 152
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235