

(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 15/867 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/524 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산에 작동적으로 연결된, MND (myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control region deleted, d1587rev primer-binding site substituted: 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실된, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환) 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로서,

상기 CAR는 5'에서 3' 방향으로

- (a) CD8 α 시그널 폴리펩티드;
 - (b) B 세포 성숙화 항원 (BCMA)에 결합하는 단쇄 Fv (single chain variable fragment, scFv);
 - (c) CD8 α 힌지 영역;
 - (d) CD8 α 막관통 도메인;
 - (e) CD137 공-자극 시그널전달 도메인; 및
 - (f) CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인
- 을 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 scFv는 인간 scFv, 무린 scFv, 또는 인간화된 scFv인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CAR이 스페이서 영역 또는 시그널 펩티드를 추가로 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터가 인간 면역결핍 바이러스(HIV); 비스나-마에디 바이러스(VMV); 카프린 관절염-뇌염 바이러스(CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역결핍 바이러스(BIV); 및 시미안 면역결핍 바이러스(SIV)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

좌측(5') 레트로바이러스 LTR, Psi(Ψ) 패키징 시그널, 중앙 폴리퓨린 트랙/DNA 플랩(cPPT/FLAP), 레트로바이러스 유출 요소; CAR를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 우측(3') 레트로바이러스 LTR을 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

- a) 이중성 폴리아데닐화 서열;
- b) 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열 또는 시그널 래빗 β-글로빈 폴리아데닐화 서열인 이중성 폴리아데닐화

서열; 또는

c) B형 간염 바이러스 전사후 조절 요소(HPRE) 또는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE)를 추가로 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 7

제5항에 있어서,

- (a) 상기 5' LTR의 프로모터가 이중성 프로모터로 치환되거나;
- (b) 상기 5' LTR의 프로모터가 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터 또는 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터로 치환되거나;
- (c) 상기 5' LTR 또는 3' LTR이 렌티바이러스 LTR이거나;
- (d) 상기 3' LTR이 하나 이상의 변형을 포함하거나;
- (e) 상기 3' LTR이 하나 이상의 결실을 포함하거나; 또는
- (f) 상기 3' LTR이 자가-불활성화(SIN) LTR인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는, 면역 작동 세포.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 면역 작동 세포가 T 림프구인, 면역 작동 세포.

청구항 10

치료학적 유효량의 제8항의 면역 작동 세포 및 생리학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 암을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 11

치료학적 유효량의 제8항의 면역 작동 세포 및 생리학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 혈액학적 악성종양을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

- 청구항 18
- 삭제
- 청구항 19
- 삭제
- 청구항 20
- 삭제
- 청구항 21
- 삭제
- 청구항 22
- 삭제
- 청구항 23
- 삭제
- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제

- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제
- 청구항 40
- 삭제
- 청구항 41
- 삭제
- 청구항 42
- 삭제
- 청구항 43
- 삭제
- 청구항 44
- 삭제
- 청구항 45
- 삭제
- 청구항 46
- 삭제
- 청구항 47
- 삭제
- 청구항 48
- 삭제
- 청구항 49
- 삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원의 상호 참조**

[0002] 본 출원은, 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입되는, 2014년 4월 25일자로 출원된 미국 가출원 제61/984,561호의 35 U.S.C. § 119(e)하에서의 이익을 주장한다.

[0003] **서열 목록에 관한 진술**

[0004] 본 출원과 관련된 서열 목록은 종이 카피 대신에 텍스트 포맷으로 제공되며, 본 명세서에 참조로서 도입된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 BLBD_027_01WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 27KB이고, 2015년 4월 24일에 작성되었으며, 명세서의 제출과 동시에 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출된다.

[0005] **기술 분야**

[0006] 본 발명은 암 또는 종양을 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR), 이들 CAR을 발현시키기 위해 백터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포 (immune effector cell), 및 다양한 암 또는 종양을 효과적으로 치료하기 위한 이들 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] **관련 기술의 설명**

[0008] 암은 세계적으로 중대한 건강 문제이다. 2008년 내지 2010년의 비율에 기초하여, 오늘 태어난 남성 및 여성의 40.76%는 이들의 일생 동안 어느 시점에서 어느 형태의 암으로 진단될 것이다. 남성의 20.37%는, 여성의 15.30%와 비교하여, 이들의 50회 내지 70회 생일 사이에 암을 발증할 것이다. 2010년 1월 1일, 미국에는, 암의 병력(6,078,974명의 남성 및 6,948,940명의 여성)을 갖는 대략 13,027,914명의 남성 및 여성이 생존한다. 미국에서 1,660,290명의 남성 및 여성(854,790명의 남성 및 805,500명의 여성)이 진단되고, 580,350명의 남성 및 여성이 2013년에 모든 부위의 암으로 사망할 것으로 예측된다[참조: Howlader *et al.* 2013].

[0009] 암의 검출, 예방 및 치료에서 진보가 이루어져 왔지만, 보편적으로 성공한 치료 전략은 아직 실현되지 않았다.

암 치료의 다양한 형태의 반응은 혼합된다. 화학요법 및 방사선요법을 포함하는 암을 치료하는 종래의 방법은 독성 부작용에 기인하여 유용성이 제한되고 있다. 치료용 항체를 사용한 면역요법은, 불량한 약물동태 프로파일, 혈청 프로테아제에 의한 항체의 신속한 제거 및 사구체에서의 여과, 및 종양 부위 내로의 제한된 투과 및 종양 세포에 대한 표적 항원의 발현 수준에 부분적으로 기인하여 제한된 성공을 또한 제공한다. 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전적으로 변형된 세포를 사용하려는 시도는 또한, CAR T 세포의 불량한 생체내 확대(expansion), 주입 후의 세포의 급속한 소실, 및 실망스러운 임상적 활성화에 기인하여 제한적 성공을 거두었다.

[0010] 따라서, 암을 치료하기 위한 보다 임상적으로 유용한 조성물 및 방법에 대한 당해 기술분야의 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 일반적으로 치료학적 T 세포를 생성하기 위한 개선된 벡터 조성물을 제공한다.

[0012] 다양한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체(CAR)에 작동적으로 연결된, MND (myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control region deleted, dl587rev primer-binding site substituted: 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실된, dl587rev 프라이머-결합 부위 치환) 프로모터를 포함하는, 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

[0013] 특정 실시형태에서, CAR은 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 람다, 르위스-Y (Lewis-Y), 카파, 메소텔린 (Mesothelin), Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 및 VEGFR2로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 결합하는 세포의 도메인; CD8 α ; CD4, CD28, CD45, PD1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되는 막관통 도메인; CD28, CD54(ICAM), CD134(OX40), CD137(41BB), CD152(CTLA4), CD273(PD-L2), CD274(PD-L1) 및 CD278(ICOS)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그널전달 (co-stimulatory signaling) 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널 전달 도메인을 포함한다.

[0014] 일부 실시형태에서, 세포의 도메인은 항원에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다.

[0015] 특정 실시형태에서, 카파 경쇄 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편은 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv, (scFv)2, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질("dsFv") 및 단일-도메인 항체(sdAb, 나노바디)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0016] 추가의 실시형태에서, 카파 경쇄 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편은 scFv이다.

[0017] 특정 실시형태에서, 항체는 인간 항체, 무린 항체 또는 인간화 항체이다.

[0018] 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α 로부터 유래한다.

[0019] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 공-자극 시그널전달 도메인은 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0020] 일부 실시형태에서, CAR은 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 공-자극 시그널전달 도메인을 포함한다.

[0021] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공-자극 시그널전달 도메인은 CD28이다.

[0022] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 공-자극 시그널전달 도메인은 CD134이다.

[0023] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 공-자극 시그널전달 도메인은 CD137이다.

[0024] 특정 실시형태에서, CAR은 힌지 영역 폴리펩티드를 추가로 포함한다.

[0025] 추가의 실시형태에서, 힌지 영역 폴리펩티드는 PD1, CD152 또는 CD8 α 의 힌지 영역을 포함한다.

- [0026] 추가의 실시형태에서, 힌지 영역 폴리펩티드는 PD1의 힌지 영역을 포함한다.
- [0027] 추가의 실시형태에서, 힌지 영역 폴리펩티드는 CD152의 힌지 영역을 포함한다.
- [0028] 추가의 실시형태에서, 힌지 영역 폴리펩티드는 CD8 α의 힌지 영역을 포함한다.
- [0029] 일부 실시형태에서, CAR은 스페이서 영역을 추가로 포함한다.
- [0030] 추가의 실시형태에서, 스페이서 영역 폴리펩티드는 IgG1의 CH2 및 CH3 영역을 포함한다.
- [0031] 특정 실시형태에서, CAR은 시그널 펩티드를 추가로 포함한다.
- [0032] 특정 실시형태에서, 시그널 펩티드는 IgG1 중쇄 시그널 펩티드, CD8 α 시그널 폴리펩티드 또는 인간 GM-CSF 수용체 알파 시그널 펩티드를 포함한다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2 내지 3 중의 어느 하나에 기재된 CAR을 코딩한다.
- [0034] 다양한 실시형태에서, 선행 실시형태 중의 어느 하나 또는 본원의 다른 개소에서 의도되는 실시형태에서 의도된 바와 같은 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터가 제공된다.
- [0035] 추가의 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이다.
- [0036] 추가의 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.
- [0037] 특정 실시형태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0038] 특정 실시형태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0039] 추가의 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스(HIV); 비스나-마에디 바이러스(VMV); 카프린 관절염-뇌염 바이러스(caprine arthritis-encephalitis virus: CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역결핍 바이러스(BIV); 및 시미안 면역결핍 바이러스(simian immunodeficiency virus: SIV)로 본질적으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0040] 특정 실시형태에서, CAR은 좌측(5') 레트로바이러스 LTR, Psi(Ψ) 패키징 시그널, 중앙 폴리퓨린 트랙/DNA 플랩(cPPT/FLAP), 레트로바이러스 유출 요소(retroviral export element); 제1항 내지 제19항 중의 어느 한 항의 CAR에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 우측(3') 레트로바이러스 LTR을 추가로 포함한다.
- [0041] 추가의 실시형태에서, CAR은 이중성 폴리아데닐화 서열을 추가로 포함한다.
- [0042] 추가의 실시형태에서, 폴리아데닐화 서열은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 또는 시그널 래빗 β-글로빈 폴리아데닐화 서열이다.
- [0043] 특정 실시형태에서, CAR은 B형 간염 바이러스 전사후 조절 요소(HPRE) 또는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE)를 추가로 포함한다.
- [0044] 일부 실시형태에서, 5'-LTR의 프로모터는 이중성 프로모터로 치환된다.
- [0045] 특정 실시형태에서, 이중성 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터 또는 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터이다.
- [0046] 추가의 실시형태에서, 5' LTR 또는 3' LTR은 렌티바이러스 LTR이다.
- [0047] 추가의 실시형태에서, 3' LTR은 하나 이상의 변형을 포함한다.
- [0048] 특정 실시형태에서, 3' LTR은 하나 이상의 결실을 포함한다.
- [0049] 특정 실시형태에서, 3' LTR은 자가-불활성화(SIN) LTR이다.
- [0050] 특정 실시형태에서, CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 최적화된 코작(Kozak) 서열을 포함한다.
- [0051] 다양한 실시형태에서, 선행 실시형태 중의 어느 하나 또는 본원의 다른 개소에 기재된 실시형태에 기재된 바와 같은 벡터를 포함하는, 면역 작동 세포가 제공된다.
- [0052] 일부 실시형태에서, 면역 작동 세포는 T 림프구이다.
- [0053] 다양한 실시형태에서, 선행 실시형태 중의 어느 하나 또는 본원의 다른 개소에서 의도된 실시형태에서 의도되는

면역 작동 세포 및 생리학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

- [0054] 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 백터를 면역 작동 세포 내로 도입하고, 상기 세포를 CD3에 결합하는 항체 및 CD28에 결합하는 항체와 접촉시켜 상기 세포를 자극시키고 상기 세포의 증식을 유도하고, 이에 의해 면역 작동 세포를 생성하는 것을 포함하는, 면역 작동 세포의 생성 방법이 제공된다.
- [0055] 추가의 실시형태에서, 면역 작동 세포는 백터의 도입 전에 자극되고 증식이 유도된다.
- [0056] 특정 실시형태에서, 면역 작동 세포는 T 림프구를 포함한다.
- [0057] 다양한 실시형태에서, 대상체로부터의 골수, 제대혈 또는 동원 말초혈로부터 CD34+ 세포를 단리하고, 본원에서 의도되는 백터를 상기 단리된 CD34+ 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 면역 작동 세포를 제조하는 방법이 제공된다.
- [0058] 추가의 실시형태에서, CD34+ 세포는, 제20항 내지 제36항 중의 어느 한 항의 백터를 도입하기 전에, FLT3 리간드, TPO, SCF, IL-3 및 IL-6으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 사이토킨으로 사전-자극된다.
- [0059] 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 치료학적 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0060] 특정 실시형태에서, 암은 빌름 종양, 유방 육종, 신경내분비 종양, 신경교아세포종, 신경아세포종, 흑색종, 피부암, 유방암, 결장암, 직장암, 전립선암, 간암, 신장암, 췌장암, 폐암, 담도암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 갑상선 수질암, 난소암, 신경교종, 림프종, 백혈병, 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종 및 방광암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0061] 특정 실시형태에서, 암은 췌장암이고, 세포의 결합 도메인은 PSCA 또는 MUC1의 에피토프에 결합한다.
- [0062] 추가의 실시형태에서, 암은 방광암이고, 세포의 결합 도메인은 PSCA 또는 MUC1의 에피토프에 결합한다.
- [0063] 특정 실시형태에서, 암은 신경교아세포종 다형태이고, 세포의 결합 도메인은 EPHA2, EGFRvIII 또는 CSPG4의 에피토프에 결합한다.
- [0064] 특정 실시형태에서, 암은 폐암이고, 세포의 결합 도메인은 PSCA 또는 GD2의 에피토프에 결합한다.
- [0065] 특정 실시형태에서, 암은 유방암이고, 세포의 결합 도메인은 CSPG4 또는 HER2의 에피토프에 결합한다.
- [0066] 일부 실시형태에서, 암은 흑색종이고, 세포의 결합 도메인은 CSPG4 또는 GD2의 에피토프에 결합한다.
- [0067] 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 치료학적 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 혈액학적 악성종양을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0068] 추가의 실시형태에서, 혈액학적 악성종양은 다발성 골수종(MM), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 또는 비-호지킨 림프종(NHL)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 B-세포 악성종양이다.
- [0069] 특정 실시형태에서, MM은 현성 다발성 골수종 (overt multiple myeloma), 무증상 다발성 골수종 (smoldering multiple myeloma), 형질 세포 백혈병, 비-분비성 골수종, IgD 골수종, 골경화성 골수종, 골의 고립성 형질세포종, 수질외 형질세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0070] 특정 실시형태에서, NHL은 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 미만성 대형 B-세포 림프종 (diffuse large B-cell lymphoma), 여포성 림프종, 면역아구성 대세포 림프종 (immunoblastic large cell lymphoma), 전구체 B-림프아구성 림프종 및 맨틀 세포 림프종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

- [0071] 도 1은 pMMD-CD19 CAR 작제물(A) 및 pMND-카파LC CAR 작제물(B)의 구조를 나타낸다.
- 도 2는 pMND-CD19 CAR의 백터 맵을 나타낸다.
- 도 3은 pMND-카파LC CAR의 백터 맵을 나타낸다.
- 도 4는 통합된 pMND-카파LC CAR 렌티바이러스 입자의 백터 카피 수(VCN)를 나타낸다. VCN는 형질도입 9일 후에 q-PCR에 의해 측정했다. 각각의 원은 정합된 비변형(정방형) T 세포 배양물로 병행하여 수행한 고유한 배양물

을 나타낸다. 제시된 데이터는 6개 공여체로 구성된 12개 고유한 배양물의 것이다. 평균 및 표준 편차는 라인 및 오차 바에 의해 제시되어 있다.

도 5는 pMND-카파LC CAR로 형질도입된 T 세포에서 카파LC 발현을 나타낸다. T 세포 상에서 CAR 발현은 형질도입 6일 내지 9일 후에 유동 세포계수에 의해 측정했다. 각각의 원은 정합된 비변형(정방향) T 세포 배양물로 병행하여 수행한 고유한 배양물을 나타낸다. 제시된 데이터는 6개 공여체로 구성된 12개 고유한 배양물의 것이다. 평균 및 표준 편차는 라인 및 오차 바에 의해 제시되어 있다.

도 6은 pMND- 또는 pEF1 α -CD19 CAR 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 T 세포에서 필적하는 CD19 CAR 형질도입 및 발현을 나타낸다. 이들 벡터는 일차 인간 T 세포의 정합된 평행 배양물을 형질도입하기 위해 사용했다. T 세포 상에서 CAR 발현은 형질도입 6일 후에 유동 세포계수에 의해 측정했다. 통합된 렌티바이러스 입자의 벡터 카피 수(VCN)는 형질도입 9일 후에 q-PCR에 의해 측정했다.

도 7은 pMND-카파LC CAR-변형된 T 세포의 종양 특이적 반응을 나타낸다. 변형된 T 세포는 24시간 동안 카파+ Daudi 또는 카파- HDLM-2 세포와 함께 공-배양했다. 종양 특이적 IFN- γ 방출을 ELISA에 의해 분석했다. 제시된 데이터는 4개 공여체로부터 5개 고유한 T 세포 배양물의 것이다.

도 8은 pMND-카파LC CAR-변형된 T 세포의 양자 이입 (adoptive transfer) 후에 확립된 Daudi 종양의 퇴축을 나타낸다. 변형된 T 세포는 확립된 Daudi 종양을 갖는 마우스를 치료하기 위해 사용했다. 치료후 종양 크기는 무처리 대조군 동물과 비교하여 생체내 영상화에 의해 모니터링했다. 데이터는 2개의 독립 실험을 나타낸다.

도 9는 CAR T 세포의 발현을 사용한 항원 특이적 종양 클리어런스를 나타낸다. (A). 항-BCMA 발현 CAR T 세포는 카복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE)로 표지된 종양 세포를 발현하는 BCMA를 사멸시켰고; 형광은 FACS에 의해 측정했다. (B). 항-BCMA 발현 CAR T 세포를 K562 세포와 함께 공-배양하고, K562 세포는 BCMA를 발현하도록 유전적으로 변형시켰고, 상청액을 24시간 후에 수집하고, ELISA를 통해 IFN- γ 방출에 대해 분석했다.(n=3).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0072] **서열 식별자의 간단한 설명**
- [0073] **서열번호 1**은 MND (골수증식성 육종 바이러스 인헨서, 음성 조절 영역 결실된, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환) 프로모터를 포함하는, 폴리뉴클레오티드 서열을 기재한다.
- [0074] **서열번호 2**는 MND 프로모터 항-CD19 CAR 작제물의 폴리뉴클레오티드 서열을 기재한다.
- [0075] **서열번호 3**은 MND 프로모터 항-카파 경쇄 CAR 작제물의 폴리뉴클레오티드 서열을 기재한다
- [0076] **상세한 설명**
- [0077] **A. 개요**
- [0078] 본 발명은 일반적으로, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 간, 췌장, 폐, 유방, 방광, 뇌, 골, 갑상선, 신장, 피부 및 조혈계의 종양 또는 암을 포함하는 암을 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된, MND (골수증식성 육종 바이러스 인헨서, 음성 조절 영역 결실된, 키메라 항원 수용체를 코딩하는 d1587rev 프라이머-결합 부위 치환) 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포의 양자 세포 요법에 관한 것이다.
- [0079] 유전적 접근법은 암 세포의 면역 인식 및 제거를 증강시키기 위한 잠재적 수단을 제공한다. 한 가지 유망한 전략은 종양 세포에 대해 세포독성을 재지시하는 키메라 항원 수용체를 발현시키기 위해 면역 작동 세포를 유전적으로 조작하는 것이다. 그러나, 종양 또는 암을 치료하는 종래의 양자 세포 면역요법은 치료 세포에서 CAR의 충분한 발현의 지속적 수준을 결여한다. 따라서, 이러한 요법은 임상적으로 바람직하지 않고, 따라서 당해 기술분야에서는 체액성 면역을 제공하는 B-세포 악성종양에 대한 보다 효율적 요법에 대한 필요성이 남아 있다.
- [0080] 본원에 개시된 양자 세포 요법의 개선된 조성물 및 방법은 용이하게 확장될 수 있는 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 제공하고, 생체내에서 장기간 지속성을 나타내며, CAR 폴리펩티드의 지속적 및 충분한 발현을 제공한다. 어떠한 특정 이론에 구속하고자 하는 것은 아니지만, 본 발명은, 부분적으로, MND 프로모터가 휴지중의 활성화된 확장된 T 세포에서 CAR 폴리펩티드의 지속적 발현을 지시하고, 이러한 발현이 종양 또는 암 세포에 대하여 세포독성 활성을 유발하기 위해 본원에서 의도된 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 효율적으로 재지시

하는데 효과적이라는 놀라운 발견을 의도한다.

[0081] 한 가지 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하고, 상기 CAR은 표적 항원, 막관통 도메인 및 하나 이상의 세포내 시그널전달 도메인에 결합하는 세포외 도메인을 포함한다.

[0082] 한 가지 실시형태에서, T 세포는 본원에서 의도된 CAR에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된다. CAR을 발현하는 T 세포는 본원에서 CAR T 세포 또는 CAR 변형된 T 세포로서 지칭된다.

[0083] 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 유전적으로 변형된 CAR T 세포는 암 또는 종양을 갖는 환자에게 투여된다.

[0084] 본 발명의 실시는, 반대로 명확하게 지시하지 않는 한, 당해 기술분야의 숙련가의 범위 내에 있는 화학, 생화학, 유기 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 유전학, 면역학 및 세포 생물학의 통상의 방법을 사용할 것이고, 이들 중 다수는 예시의 목적을 위해 하기에 기재되어 있다[참조: Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*(John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II(IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*,(Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation*(B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*(1984); Harlow and Lane, *Antibodies*,(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; as well as monographs in journals such as *Advances in Immunology*].

[0085] 본원에서 인용된 모든 공보, 특허 및 특허원은 이의 전체가 참조로서 본원에 도입된다.

[0086] **B. 정의**

[0087] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 숙련가에 의해 통상 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있고, 조성물, 방법 및 재료의 바람직한 실시형태는 본원에 기재되어 있다. 본 발명의 목적을 위해, 하기 용어가 이하에 정의된다.

[0088] 관사 "a", "an" 및 "the"는 관사의 문법상 목적어의 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들면, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0089] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 만큼 상이한 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은, 수치를 선행하는 경우, 당해 값 ± 15%, 10%, 5% 또는 1% 범위를 나타낸다.

[0090] 본 명세서 전체에 걸쳐, 당해 문맥이 별도로 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다", "포함한다" 및 "포함하는"은 언급된 단계 또는 요소, 또는 단계 또는 요소의 그룹을 포함하지만, 어떤 다른 단계 또는 요소, 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하지는 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "~로 이루어진"은 문구 "~로 이루어진"에 후속하는 것이 모든 것을 포함하며, 이들로 제한되는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "~로 이루어진"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적인 것이고, 존재할 수 있는 다른 요소가 없음을 나타낸다. "본질적으로 ~로 이루어진"은 문구 다음에 열거된 임의의 요소를 포함하고, 열거된 요소의 개시에 명시된 활성 또는 작용을 저해하지 않거나 명시된 활성 또는 작용에 기여하는 기타 요소들로 제한되는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "본질적으로 ~로 이루어진"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적이지만, 임의적이고 열거된 요소의 활성 또는 작용에 영향을 미치는지 아닌지의 여부에 따라 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있는 기타 요소가 없음을 나타낸다.

[0091] 본 명세서 전체에 걸쳐 "하나의 실시형태" 또는 "실시형태", "특정한 실시형태", "관련 실시형태", "특정 실시형태", "추가 실시형태" 또는 "추가 실시형태" 또는 이들의 조합에 대한 언급은 실시형태와 관련하여 기재된 특정한 양상, 구조 또는 특징이 본 발명의 적어도 하나의 실시형태에 포함되는 것을 의미한다. 따라서, 본 명

세서 전체에 걸쳐 다양한 위치에서 상기 문구의 출현은 반드시 모두가 동일한 실시형태를 지칭하는 것은 아니다. 더욱이, 특정한 특색, 구조 또는 특징은 하나 이상의 실시형태에서 모든 적합한 방식으로 조합될 수 있다.

[0092] **C. 키메라 항원 수용체**

[0093] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 종양 세포에 대해 세포독성을 재지시하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 설계된 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 제공한다. 이들 유전적으로 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)로서 본원에서 지칭된다. CAR은 표적 항원(예: 종양 항원)에 대한 항체-기반 특이성을, 특정의 항-종양 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하기 위해 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 조합하는 분자이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "키메라"는 상이한 단백질의 일부 또는 상이한 기원의 DNA로 구성되는 것을 기재한다.

[0094] 본원에서 의도되는 벡터는 MND 프로모터, 및 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본원에서 의도되는 CAR은 특정의 표적 항원에 결합하는 세포외 도메인(또한 결합 도메인 또는 항원-특이적 결합 도메인으로 지칭됨), 막관통 도메인 및 세포내 시그널전달 도메인을 포함한다. 표적 세포의 표면 상의 이의 표적 항원과 CAR의 항원 결합 도메인의 결속(engagement)은 CAR의 클러스터링을 초래하고, CAR-함유 세포에 대한 활성화 자극을 전달하다. CAR의 주요 특성은 면역 작동 세포 특이성을 재지시하는 이들의 능력이고, 증식, 사이토킨 생성, 식세포작용, 또는 표적 항원 발현 세포의 세포사를 주요 조직적합성(MHC) 독립적 방식으로 매개할 수 있는 분자의 생성을 유발하고, 모노클로날 항체, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공-수용체의 세포 특이적 표적화 능력을 개발하는 것이다.

[0095] 특정 실시형태에서, CAR은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 계류(tethered) 리간드, 공-수용체의 세포외 도메인을 포함하는 세포외 결합 도메인을 포함하고, 이는 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 람다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 및 VEGFR2; 하나 이상의 힌지 도메인 또는 스페이서 도메인; 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD8 α , CD4, CD45, PD1 및 CD152로부터의 막관통 도메인을 포함하는 막관통 도메인; 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD28, CD54(ICAM), CD134(OX40), CD137(41BB), CD152(CTLA4), CD273(PD-L2), CD274(PD-L1) 및 CD278(ICOS)로부터의 세포내 공-자극 시그널전달 도메인을 포함하는 하나 이상의 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 또는 FcR γ 로부터의 일차 시그널전달 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적 항원에 특이적으로 결합한다.

[0096] **1. 결합 도메인**

[0097] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은, 종양 세포 상에서 발현된, 표적 폴리펩티드(예: 표적 항원)에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합 도메인", "세포외 도메인", "세포외 결합 도메인", "항원-특이적 결합 도메인" 및 "세포외 항원 특이적 결합 도메인"은 상호 교대로 사용되고, 목적하는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 CAR을 제공한다. 결합 도메인은, 생물학적 분자(예: 세포 표면 수용체 또는 종양 단백질, 지질, 다당류, 또는 기타 세포 표면 표적 분자, 또는 이의 성분)을 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 보유하는 임의의 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드 또는 펩티드를 포함할 수 있다. 결합 도메인은 목적하는 생물학적 분자를 위한 임의의 천연 발생, 합성, 반합성 또는 제조법에 의해 생성된 결합 파트너를 포함한다.

[0098] 본원에서 사용된 바와 같은, 용어 "특이적 결합 친화성" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적으로 결합된" 또는 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 표적화하는"은 배경 결합보다 큰 결합 친화성으로 또 다른 분자에 대한 한 분자의 결합을 기재한다. 결합 도메인(또는 결합 도메인을 포함하는 CAR 또는 결합 도메인을 함유하는 융합 단백질)은, 예를 들면, 약 $10^5 M^{-1}$ 이상의 친화성 또는 Ka(즉, 1/M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수)로 표적 분자에 결합하거나 이와 연합하는 경우, 표적 분자에 대해 "특이적으로 결합한다". 특정 실시 형태에서, 결합 도메인(또는 이의 융합 단백질)은 약 $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ 또는 $10^{13} M^{-1}$ 이상의 Ka로 표적에 결합한다. "고도 친화성" 결합 도메인(또는 이의 단쇄 융합 단백질)은 적

어도 $10^7 M^{-1}$, 적어도 $10^8 M^{-1}$, 적어도 $10^9 M^{-1}$, 적어도 $10^{10} M^{-1}$, 적어도 $10^{11} M^{-1}$, 적어도 $10^{12} M^{-1}$, 적어도 $10^{13} M^{-1}$ 또는 그 이상의 K_a 를 갖는 결합 도메인을 지칭한다.

[0099] 또는, 친화성은 M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(K_d)(예: $10^{-5} M$ 내지 $10^{-13} M$ 또는 그 이하)로서 정의될 수 있다. 본 개시에 따른 결합 도메인 폴리펩티드 및 CAR 단백질의 친화성은 통상의 기술, 예를 들면, 경쟁 ELISA(효소-결합된 면역흡착 검정)에 의해, 또는 표지된 리간드를 사용하거나 바이아코어(Biacore) T100(이는 뉴저지주 피스카타웨이 바이아코어 인코포레이티드로부터 이용가능함) 등의 표면-플라스몬 공명 장치 또는 각각 코닝(Corning) 및 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)로부터 이용가능한 EPIC 시스템 또는 EnSpire 등의 광학 바이오센서 기술을 사용하는 결합 회합 또는 치환 분석에 의해 용이하게 측정할 수 있다[참조: Scatchard *et al.*(1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; 및 미국 특허 제5,283,173호; 제5,468,614호, 또는 그 등가물].

[0100] 한 가지 실시형태에서, 특이적 결합의 친화성은 배경 결합보다 약 2배 크거나, 배경 결합보다 약 5배 크거나, 배경 결합보다 약 10배 크거나, 배경 결합보다 약 20배 크거나, 배경 결합보다 약 50배 크거나, 배경 결합보다 약 100배 크거나, 배경 결합보다 약 1000배 크다.

[0101] 특정 실시형태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. "항체"는, 펩티드, 지질, 다당류 또는 항원 결정기를 함유하는 핵산, 예를 들면, 면역 세포에 의해 인식되는 것들 등의 항원의 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역을 적어도 포함하는 폴리펩티드인 결합제를 지칭한다.

[0102] "항원(Ag)"은, 동물 내로 주입되거나 흡수되는 조성물(예: 종양-특이적 단백질을 포함하는 것)을 포함하는, 동물에서 항체 또는 T 세포 반응의 생성을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 물질을 지칭한다. 항원은, 개시된 항원 등의 이중성 항원에 의해 유도된 것들을 포함하여 특정의 체액성 또는 세포 면역성의 생성물과 반응한다. "표적 항원" 또는 "목적하는 표적 항원"은, 본원에서 의도되는 CAR의 결합 도메인이 결합하도록 설계되어 있는 항원이다. 특정 실시형태에서, 표적 항원은 펩티드, 지질, 다당류 또는 핵산의 에피토프이고, 여기에 결합 도메인이 특이적으로 결합한다. 바람직한 실시형태에서, 항원은 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드의 에피토프이다.

[0103] "에피토프" 또는 "항원성 결정기"는 결합제가 결합하는 항원의 영역을 지칭한다. 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 연속 아미노산 또는 비연속 아미노산 둘 다로부터 형성될 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매에 대한 노출로 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매를 사용한 처리로 통상 소실된다. 에피토프는 통상적으로 고유한 공간적 입체구조에서 적어도 3, 및 보다 일반적으로 적어도 5, 약 9 또는 약 8 내지 10개 아미노산을 포함한다.

[0104] 항체는 이의 항원 결합 단편, 예를 들면, 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단쇄 Fv 단백질("scFv"), 비스-scFv, (scFv)₂, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질("dsFv") 및 단일-도메인 항체(sdAb, 나노바디) 및 항원 결합에 관여하는 전장 항체의 일부를 포함한다. 이 용어는 또한 유전적으로 조작된 형태, 예를 들면, 키메라 항체(예: 인간화된 뮤린 항체), 이중접합체 항체(예: 이중특이적 항체) 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다[참조: Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995(Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997].

[0105] 당해 기술분야의 숙련가에 의해 이해되고 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이, 완전 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 각각의 중쇄는 가변 영역과 제1, 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어지고, 각각의 경쇄는 가변 영역과 불변 영역으로 이루어진다. 포유동물 중쇄는 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 분류되고, 포유동물 경쇄는 λ 또는 κ 로 분류된다. α , δ , ϵ , γ 및 μ 중쇄를 포함하는 면역글로불린은, 면역글로불린(Ig) A, IgD, IgE, IgG 및 IgM과 같이 분류된다. 완전 항체는 "Y" 형상을 형성한다. Y의 줄기는 함께 결합된 2개 중쇄의 제2

및 제3 불변 영역(및, IgE 및 IgM의 경우, 제4 불변 영역)으로 이루어지고, 디설파이드 결합(쇄간)은 힌지에서 형성된다. 중쇄 γ , α 및 δ 는 3개의 탠덤(라인으로) Ig 도메인으로 구성된 불변 영역, 및 부가된 가요성을 위한 힌지 영역을 갖고; 중쇄 μ 및 ϵ 은 4개 면역글로불린 도메인으로 구성된 불변 영역을 갖는다. 제2 및 제3 불변 영역은 각각 "CH2 도메인" 및 "CH3 도메인"으로 지칭된다. Y의 각 암은 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합에 관여한다.

[0106] 경쇄 및 중쇄 가변 영역은, 또한 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"로 불리우는 3개의 초가변 영역에 의해 차단된 "프레임워크" 영역을 함유한다. CDR은 카바트(Kabat)(Wu, TT and Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50,(1970); Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443(1987)) 등에 따른 서열[참조: Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, 이는 참조로서 보원에 도입된다], 또는 코티아 등(Chothia) 등에 따른 구조[참조: Choithia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4): 901-917(1987), Choithia, C. *et al*, Nature, 342: 877 - 883(1989)] 등의 통상의 방법에 의해 정의 또는 동정될 수 있다.

[0107] 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 인간 등의 종 내에 비교적 보존되어 있다. 구성 경쇄 및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인 항체의 프레임워크 영역은 3차원 공간으로 CDR을 위치결정 및 정렬하도록 작용한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합에 관여한다. 각 쇄의 CDR은 N-말단으로부터 순차로 출발하여 넘버링되는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 통상 지칭되고, 또한 전형적으로 특정 CDR이 배치되어 있는 쇄에 의해 동정된다. 따라서, 항체의 중쇄의 가변 도메인에 위치한 CDR은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3로 지칭되는 반면, 항체의 경쇄의 가변 도메인에 위치한 CDR은 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로 지칭된다. 상이한 특이성을 갖는 항체(즉, 상이한 항원에 대한 상이한 조합 부위)는 상이한 CDR을 갖는다. 항체마다 상이한 CDR이 있지만, CDR 내의 아미노산 위치의 제한된 수만이 항원 결합에 직접 관여한다. CDR 내의 이들 위치는 특이성 결정 잔기 (specificity determining residue: SDR)이라 한다.

[0108] "V_H" 또는 "VH"에 대한 언급은 본원에 개시된 바와 같이 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 기타 항체 단편의 것을 포함하여 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. "V_L" 또는 "VL"에 대한 언급은 본원에 개시된 바와 같이 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 기타 항체 단편의 것을 포함하여 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0109] "모노클로날 항체"는 B 림프구의 단일 클론, 또는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자가 형질감염되는 세포에 의해 생성된 항체이다. 모노클로날 항체는, 예를 들면, 골수종 세포와 면역 비장 세포와의 융합으로부터 하이브리드 항체-형성 세포를 제조함으로써 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 방법에 의해 생성된다. 모노클로날 항체는 인간화 모노클로날 항체를 포함한다.

[0110] "키메라 항체"는 하나의 종, 예를 들면, 인간으로부터의 프레임워크 잔기, 및 또 다른 종, 예를 들면, 마우스로부터의 CDR(이는 일반적으로 항원 결합을 제공한다)를 갖는다. 특히 바람직한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항원-특이적 결합 도메인을 포함한다.

[0111] 특정의 바람직한 실시형태에서, 항체는 종양 세포 상의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화 항체(예: 인간화 모노클로날 항체)이다. "인간화" 항체는 인간 프레임워크 영역, 및 비-인간(예: 마우스, 랫트, 또는 합성) 면역글로불린으로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린이다. CDR을 제공하는 비-인간 면역글로불린은 "공여체"로 칭명되고, 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린은 "수용체"로 칭명된다. 한 가지 실시형태에서, 모든 CDR은 인간화 면역글로불린 중의 공여체 면역글로불린의 것이다. 불변 영역은 반드시 존재할 필요는 없지만, 이들이 존재하는 경우, 이들은 인간 면역글로불린 불변 영역과 실질적으로 동일, 즉 적어도 약 85 내지 90%, 예를 들면, 약 95% 이상 동일해야 한다. 따라서, 가능하게는 CDR을 제외하고, 인간화 면역글로불린의 모든 부분은 천연 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부분과 실질적으로 동일하다. 인간화 또는 기타 모노클로날 항체는 추가의 보존적 아미노산 치환을 가질 수 있고, 이는 항원 결합 또는 기타 면역글로불린 기능에 대해 실질적으로 어떠한 효과도 갖지 않는다. 인간화 항체는 유전자 조작에 의해 삭제할 수 있다[참조: 미국 특허 제5,585,089호].

[0112] 특정한 실시형태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 낙타 Ig(낙타과 항체 (VHH)), Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv,(scFv)2, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질("dsFv") 및 단일-

도메인 항체(sdAb, 나노바디)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

- [0113] 본원에서 사용된 "낙타 Ig" 또는 "낙타과 VHH"는 중쇄 항체의 최소 공지된 항원-결합 단위를 지칭한다[참조: Koch-Nolte, *et al*, FASEB J., 21: 3490-3498(2007)]. "중쇄 항체" 또는 "낙타과 항체"는 2개의 VH 도메인을 함유하고 경쇄를 함유하지 않는 항체를 지칭한다[참조: Riechmann L. *et al*, J. Immunol. Methods 231:2538(1999); WO94/04678; WO94/25591; 미국 특허 제6,005,079호].
- [0114] "면역글로불린 신규 항원 수용체"의 "IgNAR"는 1개의 가변 신규 항원 수용체(VNAR) 도메인 및 5개의 불변 신규 항원 수용체(CNAR) 도메인의 호모이량체로 이루어진 상어 면역 레퍼토리오로부터의 항체 부류를 지칭한다. IgNAR은 최소 공지된 면역글로불린-기반 단백질 스캐폴드 중의 몇몇을 나타내고, 고도로 안정하며, 효율적 결합 특성을 보유한다. 고유의 안정성은 (i) 뮤린 항체에서 발견된 통상의 항체 VH 및 VL 도메인과 비교하여 상당한 수의 하전된 및 친수성 표면 노출된 잔기를 제시하는 주요 Ig 스캐폴드, 및 (ii) 루프간 디설파이드 브릿지 및 루프간 수소 결합의 패턴을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 루프 중의 구조적 특징의 안정화 둘 다에 기여할 수 있다.
- [0115] 항체의 과과인 소화는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는, "Fab" 단편으로 불리우는, 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 잔류 "Fc" 단편을 생성하고, 이의 명칭은 용이하게 결정화하는 이의 능력을 반영한다. 펩신 처리는 2개의 항원-조합 부위를 갖고 또한 항원을 교차-연결할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 제공한다.
- [0116] "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 한 가지 실시형태에서, 2개-쇄 Fv 중은 단단한 비공유 회합으로 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 단쇄 Fv(scFv) 종에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은, 경쇄 및 중쇄가 2개-쇄 Fv 종의 것과 유사한 "이량체성" 구조로 회합할 수 있도록, 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 연결될 수 있다. 이러한 배열에서, 각 가변 도메인의 3개 초가변 영역(HVR)은 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상에서 항원-결합 부위를 한정한다. 집합적으로, 6개 HVR은 항원-결합 특이성을 항체에 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)은, 전체 결합 부위보다 낮은 친화성이긴 하지만, 항원을 인식하고 항원에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0117] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에 몇몇 잔기의 부가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 그룹을 포함하는 Fab'에 대한 본원에서의 명명이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본질적으로, 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 기타 화학적 결합도 또한 공지되어 있다.
- [0118] 용어 "디아바디"는, 단편이 동일한 폴리펩티드 쇠(VH-VL) 중의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)를 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭한다. 너무 짧아서 동일한 쇠 상의 2개 도메인 사이의 쌍을 이루는 것을 가능하게 하지 않는 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇠의 상보성 도메인과 강제로 쌍을 이루고 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 디아바디는 이가 또는 이중특이적이다. 디아바디는, 예를 들면, 문헌[참조: EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134(2003); and Hollinger *et al.*, PNAS USA 90: 6444-6448(1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌[참조: Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134(2003)]에 기재되어 있다.
- [0119] "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb" 또는 "나노바디"는 항체 중쇄의 가변 영역(VH 도메인) 또는 항체 경쇄의 가변 영역(VL 도메인)으로 이루어진 항체 단편을 지칭한다[참조: Holt, L., *et al*, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490].
- [0120] "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠에 어느 하나의 배향(예: VL-VH 또는 VH-VL)으로 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는 VH 및 VL 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 개설에 대해서는 문헌[참조: Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315]을 참조한다.
- [0121] 바람직한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은, scFv이고 뮤린, 인간 또는 인간화 scFv일 수 있는 항원-특이적 결합 도메인을 포함한다. 단쇄 항체는 목적하는 표적에 특이적인 하이브리도마의 V 영역 유전자를 클론 형성할 수 있다. 이러한 하이브리도마의 생성은 통상적이다. 가변 영역 중쇄(V_H) 및 가변 영역 경쇄(V_L)을 클로닝하기 위해 사용될 수 있는 기술은, 예를 들면, 문헌[참조: Orlandi *et al.*, PNAS, 1989; 86: 3833-3837]에 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, 항원-특이적 결합 도메인은 κ 또는 λ 경쇄 폴리펩티드에 결합하는 scFv

이다. 특정 실시형태에서, scFv는 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드에 결합한다.

[0122] 예시적 인간화 항원-특이적 결합 도메인은 적어도 하나의 인간 프레임워크 영역을 포함하는 종양 항원에 특이적인 면역글로불린 가변 영역이다. "인간 프레임워크 영역"은, 한 가지 측면에서, 면역원성이 감소되도록, 인간 면역글로불린 가변 영역의 야생형(즉, 천연 발생) 프레임워크 영역, 상기 영역에서 아미노산의 약 50% 미만(예를 들면, 바람직하게는 약 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 1% 미만)이 결실 또는 치환(예: 상응하는 위치에서 비인간 면역글로불린 프레임워크 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기로)된 인간 면역글로불린 가변 영역의 변화된 프레임워크 영역, 또는 상기 영역에서 아미노산의 약 50% 미만(예: 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만)이 결실 또는 치환(예: 노출된 잔기의 위치에서 및/또는 상응하는 위치에서 인간 면역글로불린 프레임워크 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기로)된 비인간 면역글로불린 가변 영역의 변화된 프레임워크 영역을 지칭한다.

[0123] 특정 실시형태에서, 인간 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린 가변 영역의 야생형 프레임워크 영역이다. 특정한 기타 실시형태에서, 인간 프레임워크 영역은 1, 2, 3, 4 또는 5개 위치에서 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 인간 면역글로불린 가변 영역의 변화된 프레임워크 영역이다. 다른 실시형태에서, 인간 프레임워크 영역은 1, 2, 3, 4 또는 5개 위치에서 아미노산 결실 또는 치환을 갖는 비-인간 면역글로불린 가변 영역의 변화된 프레임워크 영역이다.

[0124] 특정 실시형태에서, 항원-특이적 결합 도메인은 인간 경쇄 FR1, 인간 중쇄 FR1, 인간 경쇄 FR2, 인간 중쇄 FR2, 인간 경쇄 FR3, 인간 중쇄 FR3, 인간 경쇄 FR4 및 인간 중쇄 FR4로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 인간 프레임워크 영역(FR)을 포함한다.

[0125] 항원-특이적 결합 도메인에 존재할 수 있는 인간 FR은 또한 본원에 제공된 예시적 FR의 변이체를 포함하고, 여기서 예시적 FR의 하나 이상의 아미노산은 치환 또는 결실되어 있다.

[0126] 특정 실시형태에서, 인간화 항원-특이적 결합 도메인은 (a) 인간 경쇄 FR1, 인간 경쇄 FR2, 인간 경쇄 FR3 및 인간 경쇄 FR4를 포함하는 인간화 경쇄 가변 영역, 및 (b) 인간 중쇄 FR1, 인간 중쇄 FR2, 인간 중쇄 FR3 및 인간 중쇄 FR4를 포함하는 인간화 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0127] 본원에 제공된 항원-특이적 결합 도메인은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 CDR을 또한 포함한다. 이러한 CDR은 비인간 CDR일 수 있거나, 경쇄의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 및 중쇄의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3으로부터 선택된 변화된 비인간 CDR일 수 있다. 특정 실시형태에서, 항원-특이적 결합 도메인은 (a) 경쇄 CDRL1, 경쇄 CDRL2 및 경쇄 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 (b) 중쇄 CDRH1, 중쇄 CDRH2 및 중쇄 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0128] **2. 링커**

[0129] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은, 분자의 적절한 간격 및 형태를 위해 부가된, 다양한 도메인, 예를 들면, V_H 및 V_L 사이에 링커 잔기를 포함할 수 있다. 본원에서 의도된 CAR은 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 이상의 링커를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 링커의 길이는 약 1 내지 약 25개 아미노산, 약 5 내지 약 20개 아미노산 또는 약 10 내지 약 20개 아미노산, 또는 아미노산의 임의의 개재하는 길이이다. 일부 실시형태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 그 이상의 아미노산 길이이다.

[0130] 링커의 예시적 예는 글리신 폴리머(G_n); 글리신-세린 폴리머($G_{1-5}S_{1-5}$)_n(여기서, n은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5의 정수이다); 글리신-알라닌 폴리머; 알라닌-세린 폴리머; 및 당해 기술분야에 공지된 기타 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 폴리머는 비교적 비구조화되어 있고, 따라서 본원에 기재된 CAR 등의 융합 단백질의 도메인 사이에서 중성 테더 (neutral tether)로서 작용할 수 있다. 글리신은 알라닌보다 현저히 많이 파이-사이(phi-psi) 공간에 접근하고, 보다 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한된다[참조: Scheraga, Rev.

Computational Chem. 11173-142(1992)]. 당해 기술분야의 숙련가는, 특정 실시형태에서 CAR의 설계가 전부 또는 부분적으로 가요성인 링커를 포함할 수 있고, 이에 의해 상기 링커가 목적하는 CAR 구조를 제공하기 위해 보다 덜 가요성 구조를 제공하는 하나 이상의 부분 뿐만 아니라 가요성 링커를 포함할 수 있음을 인지할 것이다.

[0131] 다른 예시적 링커는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 하기 아미노산 서열을 포함한다: GGG; DGGGS(서열번호 4); TGEKP(서열번호 5)[참조: Liu *et al.*, PNAS 5525-5530(1997)]; GRRR(서열번호 6)[참조: Pomerantz *et al.* 1995, *supra*]; (GGGS)_n(여기서, n = 1, 2, 3, 4 또는 5)(서열번호 7)[참조: Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160(1996.)]; EGKSSGSGSESKVD(서열번호 8)[참조: Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070]; KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 9)[참조: Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426], GRRGGGS(서열번호 10); LRQRDGERP(서열번호 11); LRQKGGGSERP(서열번호 12); LRQKd(GGGS)₂ ERP(서열번호 13). 대안적으로, 가요성 링커는 DNA-결합 부위 및 펩티드 자체 둘 다를 모델링할 수 있는 컴퓨터 프로그램[참조: Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260(1993), PNAS 91:11099-11103(1994)] 또는 상 디스플레이 방법을 사용하여 합리적으로 설계할 수 있다.

[0132] 특정 실시형태에서, CAR은, 가변 영역 연결 서열을 추가로 포함하는 scFV를 포함한다. "가변 영역 연결 서열"은, 생성되는 폴리펩티드가 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 표적 분자에 대해 특이적 결합 친화성을 보유하도록, 중쇄 가변 영역을 경쇄 가변 영역에 연결하고 2개 부-결합 도메인의 상호작용과 화합성인 스페이서 기능을 제공하는 아미노산 서열이다. 한 가지 실시형태에서, 가변 영역 연결 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 그 이상의 아미노산 길이이다. 특정 실시형태에서, 가변 영역 연결 서열은 글리신-세린 폴리머(G₁₋₅S₁₋₅)_n(여기서, n은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5의 정수이다)를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 가변영역 연결 서열은 (G₄S)₃ 아미노산 링커를 포함한다.

[0133] **3. 스페이서 도메인**

[0134] 특정 실시형태에서, CAR의 결합 도메인은 하나 이상의 "스페이서 도메인"이 후속하고, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하도록 작동 세포 표면으로부터 떨어져 항원 결합 도메인을 이동시키는 영역을 지칭한다[참조: Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419]. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래할 수 있다. 특정 실시형태에서, 스페이서 도메인은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 하나 이상의 중쇄 불변 영역(예: CH2 및 CH3)을 포함하는 면역글로불린의 일부이다. 스페이서 도메인은 천연 발생 면역글로불린 힌지 영역 또는 변화된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0135] 한 가지 실시형태에서, 스페이서 도메인은 IgG1의 CH2 및 CH3을 포함한다.

[0136] **4. 힌지 도메인**

[0137] CAR의 결합 도메인은 일반적으로 하나 이상의 "힌지 도메인"이 후속하고, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하도록 작동 세포 표면으로부터 떨어져 항원 결합 도메인의 위치결정에 중요한 역할을 담당한다. CAR은 일반적으로 결합 도메인과 막관통 도메인(transmembrane domain: TM) 사이에 하나 이상의 힌지 도메인을 포함한다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 힌지 도메인은 천연 발생 면역글로불린 힌지 영역 또는 변화된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0138] "변화된 힌지 영역"은 (a) 최대 30%의 아미노산 변화(예: 최대 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5%의 아미노산 치환 또는 결실)를 갖는 천연 발생 힌지 영역, (b) 최대 30% 아미노산 변화(예: 최대 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5%의 아미노산 치환 또는 결실)를 갖는 적어도 10개 아미노산(예: 적어도 12, 13, 14 또는 15개 아미노산) 길이의 천연 발생 힌지 영역의 일부, 또는 (c) 코어 힌지 영역(이는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15, 또는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이일 수 있다)을 포함하는 천연 발생 힌지 영역의 일부를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 천연 발생 면역글로불린 힌지 영역에서 하나 이상의 시스템인 잔기는 하나 이상의 다른 아미노산 잔기(예: 하나 이상의 세린 잔기)로 치환될 수 있다. 변화된 면역글로불린 힌지 영역은 대안적으로 또는 추가적으로 또 다른 아미노산 잔기(예: 세린 잔기)로 치환된 야생형 면역글로불린 힌지 영역의 프롤린 잔기를 가질 수 있다.

[0139] 본원에 기재된 CAR에서 사용하기에 적합한 다른 예시적 힌지 도메인은 CD8 α, CD4, CD28 및 CD7 등의 유형 1 막

단백질의 세포의 영역으로부터 유래하는 힌지 영역을 포함하고, 이는 이들 분자로부터의 야생형 힌지 영역일 수 있거나 변화될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 영역을 포함한다.

[0140] **5. 막관통(TM) 도메인**

[0141] "막관통 도메인"은 세포의 결합 부분 및 세포내 시그널전달 도메인을 융합시키고 면역 작동 세포의 원형질 막에 CAR을 고정시키는 CAR의 일부이다. TM 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래할 수 있다. TM 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD3 엡실론, CD3 제타, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, PD-1 및 CD154로부터 유래할 수 있다(즉, 이들의 적어도 막관통 영역(들)을 포함한다). 특정 실시형태에서, TM 도메인은 합성되고, 류신 및 발린 등의 소수성 잔기를 주로 포함한다.

[0142] 한 가지 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 CD8 α로부터 유래된 TM 도메인을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 CD8 α로부터 유래하는 TM 도메인, 및 바람직하게는 TM 도메인과 CAR의 세포내 시그널전달 도메인을 연결하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커를 포함한다. 글리신-세린 링커는 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0143] **6. 세포내 시그널전달 도메인**

[0144] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 세포내 시그널전달 도메인을 포함한다. "세포내 시그널전달 도메인"은, 작동 세포 기능, 예를 들면, CAR-결합된 표적 세포에 대한 세포독성 인자의 방출을 포함하는 활성화, 사이토킨 생성, 증식 및 세포독성 활성화, 또는 세포의 CAR 도메인에 대한 항원 결합으로 유발된 기타 세포 반응을 유발하기 위해 면역 작동 세포의 내부로 표적 항원에 대한 효과적 CAR 결합의 메시지의 전달에 관여하는 CAR의 부분을 지칭한다.

[0145] 용어 "작동 기능"은 세포의 특수한 기능을 지칭한다. T 세포의 작동 기능은, 예를 들면, 세포용해 활성화일 수 있거나, 사이토킨의 분비를 포함하는 활성을 지원할 수 있거나 활성화일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 시그널전달 도메인"은 작동 기능 시그널을 전달하고 세포가 특수한 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 일부를 지칭한다. 통상적으로 전체 세포내 시그널전달 도메인이 사용될 수 있지만, 대부분의 경우에 전체 도메인을 사용할 필요는 없다. 세포내 시그널전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 한, 이러한 절단된 부분은 작동 기능 시그널을 전달하면 전체 도메인 대신에 사용될 수 있다. 용어 세포내 시그널전달 도메인은 작동 기능 시그널을 전달하기에 충분한 세포내 시그널전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.

[0146] TCR 단독을 통해 생성된 시그널은 T 세포의 충분한 활성화에 불충분하고 이차 또는 공-자극 시그널이 또한 요구되는 것으로 공지되어 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포내 시그널전달 도메인의 2개 상이한 부류에 의해 매개되는 것으로 말할 수 있다: TCR을 통한 항원-의존성 일차 활성화를 개시하는 일차 시그널전달 도메인(예: TCR/CD3 복합체) 및 이차 또는 공-자극 시그널을 제공하기 위해 항원-독립적 방식으로 작용하는 공-자극 시그널전달 도메인. 바람직한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은, 하나 이상의 "공-자극 신호전달 도메인" 및 "일차 시그널전달 도메인"을 포함하는 세포내 시그널전달 도메인을 포함한다.

[0147] 일차 시그널전달 도메인은 TCR 복합체의 일차 활성화를 자극 방식으로 또는 억제 방식으로 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 일차 시그널전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티브 또는 ITAM으로 공지되어 있는 신호전달 모티브를 함유할 수 있다.

[0148] 본 발명에서 특히 유용한 일차 시그널전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예시적 예는 TCR ζ, FcR γ, FcR β, CD3 γ, CD3 δ, CD3 ε, CD3 ζ, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 특히 바람직한 실시형태에서, CAR은 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인 및 하나 이상의 공-자극 시그널전달 도메인을 포함한다. 세포내 일차 시그널전달 및 공-자극 시그널전달 도메인은 임의의 순서로 나란히 막관통 도메인의 카복시 말단에 연결될 수 있다.

[0149] 본원에서 의도되는 CAR은 CAR 수용체를 발현하는 T 세포의 유효성 및 확장을 증강시키기 위해 하나 이상의 공-자극 시그널전달 도메인을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "공-자극 시그널전달 도메인" 또는 "공-자극 도메인"은 공-자극 분자의 세포내 시그널전달 도메인을 지칭한다. 공-자극 분자는, 항원 수용체, 또는 항원에 결합시 T 림프구의 효율적 활성화 및 기능에 요구되는 이차 시그널을 제공하는 Fc 수용체 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 공-자극 분자의 예시적 예는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS(CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT 및 NKD2C 및 CD83을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, CAR은 CD28, CD137 및 CD134로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 공-자극 시그널전달 도메인 및 CD3 ζ

일차 시그널전달 도메인을 포함한다.

- [0150] 또 다른 실시형태에서, CAR은 CD28 및 CD137 공-자극 시그널전달 도메인과 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인을 포함한다.
- [0151] 또 다른 실시형태에서, CAR은 CD28 및 CD134 공-자극 시그널전달 도메인과 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인을 포함한다.
- [0152] 한 가지 실시형태에서, CAR은 CD137 및 CD134 공-자극 시그널전달 도메인과 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인을 포함한다.
- [0153] 한 가지 실시형태에서, CAR은 CD137 공-자극 시그널전달 도메인과 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인을 포함한다.
- [0154] 한 가지 실시형태에서, CAR은 CD134 공-자극 시그널전달 도메인과 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인을 포함한다.
- [0155] 한 가지 실시형태에서, CAR은 CD28 공-자극 시그널전달 도메인과 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인을 포함한다.
- [0156] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α_2 , 람다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM, 또는 종양 세포 상에서 발현되는 VEGFR2 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0157] 한 가지 실시형태에서, CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α_2 , 람다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; CD8 α ; CD4, CD45, PD1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래하는 막관통 도메인; 및 CD28, CD54, CD134, CD137, CD152, CD273, CD274 및 CD278로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.
- [0158] 또 다른 실시형태에서, CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α_2 , 람다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; IgG1 힌지 /CH2/CH3 및 CD8 α 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 힌지 도메인 및 CD8 α ; CD8 α ; CD4, CD45, PD1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래하는 막관통 도메인; 및 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.
- [0159] 또 다른 실시형태에서, CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α_2 , 람다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; IgG1 힌지 /CH2/CH3 및 CD8 α 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 힌지 도메인 및 CD8 α ; CD8 α ; CD4, CD45, PD1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래하는 TM 도메인을 포함하는 막관통 도메인, 및 바람직하게는 TM 도메인을 CAR의 세포내 시그널전달 도메인에 연결하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 길

이의 아미노산 및 짧은 올리고- 및 폴리펩티드 링커; 및 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, 링커를 추가로 포함하는, scFv를 포함한다.

[0160] 특정 실시형태에서, CAR은, 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; PD1 또는 CD152 힌지 폴리펩티드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3개 아미노산의 폴리펩티드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD137 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.

[0161] 특정 실시형태에서, CAR은, 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; PD1 또는 CD152 힌지 폴리펩티드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3개 아미노산의 폴리펩티드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD134 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.

[0162] 특정 실시형태에서, CAR은, 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; PD1 또는 CD152 힌지 폴리펩티드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3개 아미노산의 폴리펩티드 링커를 포함하는 PD1 또는 CD152 막관통 도메인; CD28 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.

[0163] 특정 실시형태에서, CAR은, 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; IgG1 힌지 /CH2/CH3 폴리펩티드 및 CD8 α 폴리펩티드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3개 아미노산의 폴리펩티드 링커를 포함하는 CD8 α 막관통 도메인; CD137 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.

[0164] 특정 실시형태에서, CAR은, 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; CD8 α 폴리펩티드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3개 아미노산의 폴리펩티드 링커를 포함하는 CD8 α 막관통 도메인; CD134 세포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.

- [0165] 특정 실시형태에서, CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 람다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSS, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; CD8 α 폴리펩티드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3개 아미노산의 폴리펩티드 링커를 포함하는 CD8 α 막관통 도메인; CD28 세포포내 공-자극 시그널전달 도메인; 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.
- [0166] 더욱이, 본원에서 의도되는 벡터의 설계는 비-변형된 T 세포 또는 기타 벡터로 변형된 T 세포와 비교하여 T 세포에서 개선된 확장, 장기간 지속성 및 세포독성 특성 및 세포의 수명에 걸쳐 CAR의 지속적 발현을 가능하게 한다.
- [0167] **D. 폴리펩티드**
- [0168] 본 발명은, 부분적으로, CAR 폴리펩티드 및 이의 단편, 이를 함유하는 세포 및 조성물, 및 폴리펩티드를 발현하는 벡터를 의도한다. 바람직한 실시형태에서, 서열번호 2 및 3에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 하나 이상의 CAR을 포함하는 폴리펩티드가 제공된다.
- [0169] "폴리펩티드", "폴리펩티드 단편", "펩티드" 및 "단백질"은, 달리 명시하지 않는 한, 통상의 의미, 즉 아미노산의 서열로서 상호 교대로 사용된다. 폴리펩티드는 특정 길이로 한정되지 않고, 예를 들면, 이들은 전장 단백질 서열 또는 전장 단백질의 단편을 포함할 수 있고, 폴리펩티드의 번역후 변형, 예를 들면, 천연 발생 또는 비-천연 발생의 당해 기술분야에 공지된 다른 변형 뿐만 아니라, 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등을 포함할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR 폴리펩티드는 단백질의 N-말단에 시그널(또는 리더) 서열을 포함하고, 이는 번역과 동시에 또는 번역후 단백질의 전이를 지시한다. 본원에 개시된 CAR에 유용한 적합한 시그널 서열(시그널 펩티드)의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, IgG1 중쇄 시그널 폴리펩티드, CD8 α 시그널 폴리펩티드 또는 인간 GM-CSF 수용체 알파 시그널 펩티드를 포함한다. 폴리펩티드는 임의의 다양한 공지된 재조합 및/또는 합성 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 본원에서 의도되는 폴리펩티드는 구체적으로는 본 명세서의 CAR, 또는 본원에 개시된 CAR의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가 및/또는 치환을 갖는 서열을 포함한다.
- [0170] "단리된 펩티드" 또는 "단리된 폴리펩티드" 등은, 본원에서 사용된 바와 같이, 세포 환경으로부터 및 세포의 다른 성분과의 회합으로부터 펩티드 또는 폴리펩티드 분자의 시험관내 단리 및/또는 정제를 지칭하고, 즉 이는 생체내 물질과 현저하게 회합하지 않는다. 유사하게는, "단리된 세포"는 생체내 조직 또는 기관으로부터 수득되고 세포외 매트릭스를 실질적으로 포함하지 않는 세포를 지칭한다.
- [0171] 폴리펩티드는 "폴리펩티드 변이체"를 포함한다. 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입의 점에서 천연 발생 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 천연 발생일 수 있거나, 예를 들면, 상기 폴리펩티드 서열의 하나 이상을 변형시킴으로써 합성적으로 생성할 수 있다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, CAR 폴리펩티드의 결합 도메인, 힌지, TM 도메인, 공-자극 시그널전달 도메인 또는 일차 시그널전달 도메인 내로 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입을 도입함으로써 CAR의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 이와 적어도 약 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0172] 폴리펩티드는 "폴리펩티드 단편"을 포함한다. 폴리펩티드 단편은, 단량체성 또는 다량체성일 수 있고 천연-발생 또는 재조합-생성된 폴리펩티드의 아미노-말단 결실, 카복실-말단 결실 및/또는 내부 결실 또는 치환을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 폴리펩티드 단편은 적어도 5 내지 약 500개 아미노산 길이의 아미노산 쇄를 포함할 수 있다. 특정한 실시형태에서, 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 또는 450개 아미노산 길이인 것으로 이해된다. 특히 유용한 폴리펩티드 단편은, 항체의 항원-결합 도메인 또는 단편을 포함하는 기능적 도메인을 포함한다. 항-카파 또는 항-람다 경쇄 항체의 경우에, 유용한 단편은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CDR 영역, 중쇄 또는 경쇄의 CDR3 영역; 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역; 항체 쇄의 일부, 또는 2개의 CDR을 포함하는 가변 영역 등을 포함한다.

[0173] 폴리펩티드는 또한 프레임 내에서 융합될 수 있거나, 링커, 또는 폴리펩티드의 합성, 정제 또는 동정을 용이하게 하거나 고체 지지체에 대한 폴리펩티드의 결합을 증강시키기 위한 기타 서열에 접합될 수 있다.

[0174] 상술한 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실, 절단 및 삽입을 포함하는 다양한 방식으로 변화시킬 수 있다. 이러한 조작 방법은 일반적으로 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 참조 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체는 DNA의 돌연변이에 의해 제조할 수 있다. 돌연변이유발 및 뉴클레오티드 서열 변화 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Kunkel(1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 488-492), Kunkel *et al.*,(1987, *Methods in Enzymol.*, 154: 367-382), 미국 특허 제4,873,192호, Watson, J. D. *et al.*,(*Molecular Biology of the Gene*, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) 및 본원에 인용된 참조문헌]. 목적하는 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 지침은 문헌[참조: Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)]의 모델에서 발견할 수 있다.

[0175] 특정 실시형태에서, 변이체는 보존적 치환을 함유할 것이다. "보존적 치환"은 아미노산이 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환되는 것이고, 펩티드 화학 분야의 숙련가는 폴리펩티드의 이차 구조 및 소수성 성질이 실질적으로 변화되지 않는 것으로 기대할 것이다. 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 구조에서 이루어질 수 있고, 또한 목적하는 특성을 갖는 변이체 또는 유도성 폴리펩티드를 코딩하는 기능적 분자를 수득한다. 본 발명의 등가물 또는 심지어 개선된 변이체 폴리펩티드를 생성하기 위해 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키는 것이 바람직한 경우, 당해 기술분야의 숙련가는, 예를 들면, 하기 표 1에 따라 코딩 DNA 서열의 하나 이상의 코돈을 변화시킬 수 있다.

표 1

아미노산 코돈

[0176]

아미노산	일문자 코드	삼문자 코드	코돈					
알라닌	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU		
시스테인	C	Cys	UGC	UGU				
아스파르트산	D	Asp	GAC	GAU				
글루탐산	E	Glu	GAA	GAG				
페닐알라닌	F	Phe	UUC	UUU				
글리신	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
히스티딘	H	His	CAC	CAU				
이소류신	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
라이신	K	Lys	AAA	AAG				
류신	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
메티오닌	M	Met	AUG					
아스파라긴	N	Asn	AAC	AAU				
프롤린	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
글루타민	Q	Gln	CAA	CAG				
아르기닌	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
세린	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
트레오닌	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
발린	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
트립토판	W	Trp	UGG					
티로신	Y	Tyr	UAC	UAU				

[0177] 생물학적 활성을 소실하지 않고서 어떤 아미노산 잔기가 치환, 삽입 또는 결실될 수 있는지를 결정하는 지침은 당해 기술분야에 공지된 컴퓨터 프로그램, 예를 들면, DNASTAR™ 소프트웨어를 사용하여 발견할 수 있다. 바람직하게는, 본원에 개시된 단백질 변이체에서 아미노산 변화는 보존적 아미노산 변화, 즉 유사하게 하전되거나 하전되지 않은 아미노산의 치환이다. 보존적 아미노산 변화는 이들의 측쇄에서 관련되는 아미노산 계열 중의 하나의 치환을 수반한다. 천연 발생 아미노산은 일반적으로 4개 계열로 분류된다: 산성(아스파르트레이트, 글루타메이트), 염기성(라이신, 아르기닌, 히스티딘), 비-극성(알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판) 및 하전되지 않은 극성(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌,

티로신) 아미노산. 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 종종 방향족 아미노산으로 함께 분류된다. 펩티드 또는 단백질에서, 아미노산의 적합한 보존적 치환은 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있고, 일반적으로 생성 분자의 생물학적 활성을 변화시키지 않고서 이루어질 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가들은, 일반적으로, 폴리펩티드의 비-필수 영역에서 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않음을 이해할 것이다 [참조: Watson *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224]. 예시적 보존적 치환은, 이의 개시가 본원에서 참조로서 도입되는 미국 특허원 제61/241,647호에 기재되어 있다.

[0178] 이러한 변화를 수행할 때에, 아미노산의 수치(hydrophobic) 지표가 의도될 수 있다. 단백질에 상호작용적 생물학적 기능을 부여하는데 있어서 수치 아미노산 지표의 중요성은 일반적으로 당해 기술분야에서 이해된다[참조: Kyte and Doolittle, 1982, 본원에서 참조로서 도입됨]. 각각의 아미노산은 이의 소수성 및 전하 특성에 기초하여 수치 지표가 할당된다[참조: Kyte and Doolittle, 1982]. 이들 값은 다음과 같다: 이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

[0179] 특정 아미노산이 유사한 수치 지표 또는 스코어를 갖는 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있고 또한 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 제공하며, 즉 생물학적 기능상 동등한 단백질을 수득하는 것은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 변화를 수행할 때에, 수치 지표가 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, ± 1 이내의 것들이 특히 바람직하며, ± 0.5 이내의 것들이 보다 더 특히 바람직하다. 또한, 유사한 아미노산의 치환이 친수성에 기초하여 효과적으로 이루어질 수 있음은 당해 기술분야에서 이해된다.

[0180] 미국 특허 제4,554,101호에 상세된 바와 같이, 하기 친수성 값이 아미노산 잔기에 할당된다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 \pm 1); 글루타메이트(+3.0 \pm 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 트레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 \pm 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 류신(-1.8); 이소류신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4). 아미노산이 유사한 친수성 값을 갖는 또 다른 것으로 치환될 수 있고, 또한 생물학적 등가물 및 특히 면역학적 등가 단백질을 수득하는 것은 당해 기술분야에서 이해된다. 이러한 변화에 있어서, 친수성 값이 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, ± 1 이내의 것들이 특히 바람직하고, ± 0.5 이내의 것들이 보다 더 특히 바람직하다.

[0181] 상기 개설된 바와 같이, 아미노산 치환은 아미노산 측쇄 치환체의 상대적 유사성, 예를 들면, 이들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초할 수 있다.

[0182] 폴리펩티드 변이체는 추가로 글리코실화 형태, 다른 분자와의 응집성 접합체, 및 비관련 화학적 잔기와 공유 접합체(예: 폐결화된 분자)를 추가로 포함한다. 공유 변이체는, 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 관능기를, 아미노산 쇠 또는 N- 또는 C-말단 잔기에서 발견되는 그룹에 연결시킴으로써 제조할 수 있다. 변이체는 또한 대립유전자 변이체, 중 변이체 및 돌연변이 단백질을 포함한다. 단백질의 기능적 활성에 영향을 미치지 않는 영역의 절단 또는 결실은 또한 변이체이다.

[0183] 한 가지 실시형태에서, 2개 이상의 폴리펩티드의 발현이 요구되는 경우, 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 본원의 다른 개소에서 언급된 IRES 서열에 의해 분리될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 2개 이상의 폴리펩티드는 하나 이상의 자가-절단 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질로서 발현될 수 있다.

[0184] 본 발명의 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 융합 폴리펩티드, 및 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, CAR이 제공된다. 융합 폴리펩티드 및 융합 단백질은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 이상의 폴리펩티드 세그먼트를 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 융합 폴리펩티드는 전형적으로, 이들이 또한 C-말단을 C-말단에, N-말단을 N-말단에 또는 N-말단을 C-말단에 연결시킬 수 있지만, C-말단을 N-말단에 연결시킨다. 융합 단백질의 폴리펩티드는 임의의 순서로 또는 지정된 순서로 존재할 수 있다. 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질은, 융합 폴리펩티드의 목적하는 전사 활성이 보존되는 한, 보존적 변형된 변이체, 다형태 변이체, 대립유전자, 돌연변이체, 서브서열 및 중간 상동체를 또한 포함할 수 있다. 융합 폴리펩티드는 화학적 합성 방법 또는 2개 잔기 사이의 화학적 연결에 의해 생성할 수 있거나, 일반적으로 다른 표준 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 융합 폴리펩티드를 포함하는 연결 DNA 서열은 본원의 다른 개소에서 언급된 바와 같이 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동적으로 연결된다.

- [0185] 한 가지 실시형태에서, 융합 파트너는 천연 재조합 단백질 보다 높은 수율로 단백질의 발현을 보조하는 서열(발현 인핸서)을 포함한다. 다른 융합 파트너는 단백질의 용해도를 증가시키거나 단백질이 목적하는 세포 구획으로 표적화되는 것을 가능하게 하거나 세포 막을 통해 융합 단백질의 수송을 용이하게 하도록 선택될 수 있다.
- [0186] 융합 폴리펩티드는 본원에 기재된 각각의 폴리펩티드 도메인 사이에 폴리펩티드 절단 시그널을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 폴리펩티드 부위는 임의의 링커 펩티드 서열에 도입될 수 있다. 예시적 폴리펩티드 절단 시그널은 프로테아제 절단 부위, 뉴클레아제 절단 부위(예: 드문 제한 효소 인식 부위, 자가-절단 리보자임 인식 부위) 및 자가-절단 바이러스 올리고펩티드 등의 폴리펩티드 절단 인식 부위를 포함한다[참조: deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26].
- [0187] 적합한 프로테아제 절단 부위 및 자가-절단 펩티드는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다[참조: Ryan *et al.*, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak *et al.*(2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594]. 예시적 프로테아제 절단 부위는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 포티바이러스 Nia 프로테아제(예: 담배 에치 바이러스 프로테아제), 포티바이러스 HC 프로테아제, 포티바이러스 P1(P35) 프로테아제, 비오바이러스 NIa 프로테아제, 비오바이러스 RNA-2-코딩된 프로테아제, 아프토바이러스 L 프로테아제, 엔테로바이러스 2A 프로테아제, 리노바이러스 2A 프로테아제, 피코르나 3C 프로테아제, 코모바이러스 24K 프로테아제, 네포바이러스 24K 프로테아제, RTSV(벼 툰그로 구형 바이러스) 3C-형 프로테아제, PYVF(파스닙 황색 플렉 바이러스) 3C-형 프로테아제, 헤파린, 트롬빈, 인자 Xa 및 엔테로키나제를 포함한다. 이의 높은 절단 엄격성에 기인하여, TEV(담배 에치 바이러스) 프로테아제 부위, 예를 들면, EXXYXQ(G/S)(서열번호 14), 예를 들면, ENLYFQG(서열번호 15) 및 ENLYFQS(서열번호 16)(여기서, X는 임의의 아미노산(TEV에 의한 절단은 Q와 G 사이 또는 Q와 S 사이에서 발생한다)을 나타낸다)가 한 가지 양태에서 바람직하다.
- [0188] 특정 실시형태에서, 자가-절단 펩티드는 포티바이러스 및 카디오바이러스 2A 펩티드, FMDV(족구 질환 바이러스), 우마 비염 A 바이러스, 토세아 아시그나 바이러스 및 돼지 테스초바이러스로부터 수득된 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0189] 특정 실시형태에서, 자가-절단 폴리펩티드 부위는 2A 또는 2A-형 부위, 서열 또는 도메인을 포함한다[참조: Donnelly *et al.*, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041].

표 2

[0190] 예시적 2A 부위는 하기 서열을 포함한다:

서열번호 17	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 18	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 19	LLKLAGDVESNPGP
서열번호 20	NFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 21	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 22	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 23	VTELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
서열번호 24	LNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 25	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 26	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0191] 바람직한 실시형태에서, 본원에서 의도된 폴리펩티드는 CAR 폴리펩티드를 포함한다.

[0192] **E. 폴리뉴클레오티드**

[0193] 특정 실시형태에서, NMD 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 하나 이상의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 바람직한 실시형태에서, 서열번호 2 및 3에 기재된 하나 이상의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 메신저 RNA(mRNA), RNA, 게놈 RNA(gRNA), 플러스 가닥 RNA(RNA(+)), 마이너스 가닥 RNA(RNA(-)), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA) 또는 재조합 DNA를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 및 이중 가닥 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 전형적으로 변이체가 참조 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 경우에, 본원에 기재된 임의의 참조 서열(참조: 서열 목록)에 대해서 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 변이체를 포함한다. 다양한 예시적 실시양태에서, 본 발명은, 부분적으로, 발현 벡터, 바이러스 벡터 및 전이 플라스미드, 및 이들을 포함하는 조성물 및 세포를 의도한다.

[0194] 특정 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드의 적어도 약 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 또는 2000개 또는 그 이상의 연속 아미노산 잔기 또한 모든 중간 길이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본 발명에 의해 제공된다. 이러한 맥락에서, "중간 길이"는 6, 7, 8, 9 등; 101, 102, 103 등; 151, 152, 153 등; 201, 202, 203 등과 같이 인용된 값 사이의 임의의 길이를 의미하는 것으로 용이하게 이해될 것이다.

[0195] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드 변이체" 및 "변이체" 등은 참조 폴리뉴클레오티드 서열 또는, 이하에 정의된 엄격한 조건하에서 참조 서열과 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드와 실질적 서열 동일성을 나타내는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 이들 용어는 하나 이상의 뉴클레오티드가 부가 또는 결실되거나, 참조 폴리뉴클레오티드와 비교하여 상이한 뉴클레오티드로 대체된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이와 관련하여, 돌연변이, 부가, 결실 및 치환을 포함하는 특성의 변화가 참조 폴리뉴클레오티드에 대해 이루어지고, 이에 의해 변화된 폴리뉴클레오티드가 참조 폴리뉴클레오티드의 생물학적 기능 또는 활성을 보유할 수 있음은 당해 기술분야에서 잘 이해된다.

[0196] 인용 "서열 동일성" 또는, 예를 들면, "와 50% 동일한 서열"은, 본원에 사용된 바와 같이, 서열이 비교 윈도우(window of comparison)에 걸쳐 뉴클레오티드 단위끼리 또는 아미노산 단위끼리 동일한 정도를 지칭한다. 따라서, "서열 동일성의 퍼센트"는, 비교 윈도우에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예: A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예: Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)이 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 측정하여 정합된 위치의 수를 수득하고, 정합된 위치의 수를 비교 윈도우(예: 윈도우 크기)에서 전체 위치 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 퍼센트를 수득함으로써 계산할 수 있다. 전형적으로, 폴리펩티드 변이체가 참조 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 경우, 본원에 기재도니 임의의 참조 서열 중의 어느 하나에 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 및 폴리펩티드가 포함된다.

[0197] 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 사이의 서열 관계를 기재하기 위해 사용된 용어는 "참조 서열", "비교 윈도우", "서열 동일성", "서열 동일성 퍼센트" 및 "실질적 동일성"을 포함한다. "참조 서열"은 길이가 적어도 12개, 그러나 종종 15 내지 18개 및 종종 뉴클레오티드 및 아미노산 잔기를 포함하는 적어도 25개 단량체 단위이다. 2개 폴리뉴클레오티드는 각각 (1) 2개 폴리뉴클레오티드 사이에서 유사한 서열(즉, 완전 폴리뉴클레오티드 서열의 일부만), 및 (2) 2개 폴리뉴클레오티드 사이에서 상이한 서열을 각각 포함하기 때문에, 2개(또는 이상) 폴리뉴클레오티드 사이의 서열 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국소 영역을 동정하고 비교하기 위해 "비교 윈도우"에 걸쳐 2개 폴리뉴클레오티드의 서열을 비교함으로써 수행된다. "비교 윈도우"는 적어도 6개 연속 위치, 통상 약 50 내지 약 100개, 보다 통상적으로 약 100 내지 150개의 개념적 세그먼트를 지칭하고, 여기서 서열은 2개 서열을 최적으로 정렬한 후에 연속 위치의 동일한 수의 참조 서열과 비교한다. 비교 윈도우는 2개 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열과 비교하여(이는 부가 또는 결실을 포함하지 않는다) 약 20% 이하의 부가 또는 결실(즉, 겹)을 포함할 수 있다. 비교 윈도우를 정렬하는 서열의 최적 정렬은 알고리즘의 컴퓨터 실행(GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)에 의해 또는 선택된 임의의 다양한 방법에 의해 생성된 검사 및 최상 정렬(즉, 비교 윈도우에 걸쳐 최고 퍼센트 상동성을 생성)에 의해 수행할 수 있다. 참조는 또한, 예를 들면, 문헌[참조: Altschul *et al.*, 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389]에 개시된 바와 같은 프로그램의 BLAST 계열로 수행할 수 있다. 서열 분석의 상세 언급은 문헌[참조: Unit 19.3 of Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15]에서 발견할 수 있다.

[0198] 본원에 사용된 바와 같이, "단리된 폴리뉴클레오티드"는 천연-발생 상태에서 이에 인접하는 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 통상 단편에 인접하는 서열로부터 제거된 DNA 단편을 지칭한다. "단리된 폴리뉴클레오티드"는 또한 상보성 DNA(cDNA), 재조합 DNA, 또는 천연에 존재하지 않고 인간의 손으로 제조되는 기타 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

[0199] 폴리뉴클레오티드의 배향을 기재하는 용어는 다음을 포함한다: 5'(통상 유리 포스페이트 그룹을 갖는 폴리뉴클레오티드의 말단) 및 3'(통상 유리 하이드록실(OH) 그룹을 갖는 폴리뉴클레오티드의 말단). 폴리뉴클레오티드

서열은 5'에서 3' 배향 또는 3'에서 5' 배향으로 주석을 달 수 있다. DNA 및 mRNA의 경우, 5'에서 3' 가닥은, 이의 서열이 프리메신저(premRNA)의 서열과 동일하기 때문에, "센스", "플러스" 또는 "코딩" 가닥로 지정된다 [RNA에서 우라실(U) 제외, DNA에서 티민(T) 대신]. DNA 및 mRNA의 경우, RNA 폴리머라제에 의해 전사된 가닥인 상보성 3'에서 5' 가닥은 "주형", "안티센스", "마이너스" 또는 비-코딩" 가닥로서 지정된다. 본원에 사용된 바와 같이, "역 배향"은 3'에서 5' 배향으로 기재된 5'에서 3' 서열 또는 5'에서 3' 배향으로 기재된 3'에서 5' 서열을 지칭한다.

[0200] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 염기-쌍 규칙에 의해 관련된 폴리뉴클레오티드(즉, 뉴클레오티드의 서열)을 지칭한다. 예를 들면, DNA 서열 5' AGTCATG 3'의 상보적 가닥은 3' TCAGTAC 5'이다. 후자의 서열은 종종 좌측에 5' 말단 및 우측에 3' 말단을 갖는 역보체 (reverse complement), 5' CATGACT 3'로 기재된다. 이의 역보체에 해당하는 서열은 회문식 서열(palindromic sequence)인 것으로 언급된다. 상보성은, 핵산 염기의 단지 일부가 염기 쌍 규칙에 따라 정합되는 "부분적"일 수 있다. 또는, 핵산들 사이에는 "완전한" 또는 "전체" 상보성이 존재할 수 있다.

[0201] 더욱이, 유전자 코드의 축중의 결과로서, 본원에 기재된 바와 같이, 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 뉴클레오티드 서열 또는 이의 변이체의 단편이 존재하는 것이 당해 기술분야의 숙련자에게 이해될 것이다. 이들 폴리뉴클레오티드의 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오티드에 대하여 최소의 상동성을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용에서의 차이에 기인하여 달라지는 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 인간 및/또는 영장류 코돈 선택을 위해 최적화되는 폴리뉴클레오티드는 구체적으로 본 발명에 의해 의도된다. 추가로, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자의 대립유전자도 또한 사용될 수 있다. 대립유전자는 하나 이상의 돌연변이, 예를 들면, 뉴클레오티드의 결실, 부가 및/또는 치환의 결과로서 변화되는 내인성 유전자이다.

[0202] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산 카세트"는 RNA, 및 이어서 폴리펩티드를 발현할 수 있는 벡터 내의 유전자 서열을 지칭한다. 핵산 카세트는 프로모터 및 목적하는 유전자, 예를 들면, CAR을 함유한다. 핵산 카세트는, 당해 카세트 내의 핵산이 RNA로 전사되고, 필요한 경우에 단백질 또는 폴리펩티드로 번역되고, 형질전환된 세포에서 활성화에 필요한 적절한 번역-후 변형을 겪고, 적절한 세포내 구획에 대한 표적화 또는 세포의 구획 내로의 분비에 의해 생물학적 활성화에 적절한 구획으로 전좌될 수 있도록 벡터 내에 위치적으로 및 순차로 배향된다. 바람직하게는, 카세트는 벡터 내로의 준비된 삽입에 적당한 이의 3' 및 5' 말단을 가지며, 예를 들면, 이는 각각의 말단에 제한 엔도뉴클레아제 부위를 갖는다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 핵산 카세트는 본원에서 의도되는 MND 프로모터 및 키메라 항원 수용체의 서열을 함유한다. 카세트는 제거하고, 단일 유닛으로서 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내에 삽입할 수 있다.

[0203] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 목적하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "목적하는 폴리뉴클레오티드"는 발현시키고자 하는 발현 벡터 내에 삽입된 폴리펩티드(즉, 목적하는 폴리펩티드)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 벡터는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 목적하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 목적하는 폴리뉴클레오티드는 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에서 치료학적 효과를 제공하는 폴리펩티드를 코딩한다. 목적하는 폴리뉴클레오티드 및 이로부터 코딩된 폴리펩티드는 기능적 변이체 및 이의 단편 뿐만 아니라 야생형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 기능적 변이체는 상응하는 야생형 참조 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는다. 특정 실시형태에서, 기능적 변이체 또는 단편은 상응하는 야생형 폴리펩티드의 생물학적 활성화의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%를 갖는다.

[0204] 한 가지 실시형태에서, 목적하는 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩하지 않지만, miRNA, siRNA 또는 shRNA, 리보자임 또는 기타 억제 RNA를 전사하기 위한 주형으로서 작용한다. 다양한 기타 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 CAR를 코딩하는 목적하는 폴리뉴클레오티드 및, 이로서 한정되는 것은 아니지만, siRNA, miRNA, shRNA 리보자임을 포함하는 억제 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 추가의 목적하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0205] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "siRNA" 또는 "짧은 간섭 (short interfering) RNA"는 동물에서 서열-특이적 전사후 유전자 사일런싱, 번역 억제, 전사 억제 또는 후성유전학적 RNAi의 프로세스를 매개하는 단쇄 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다[참조: Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Fire *et al.*, 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton *et al.*, 1999, *Science*, 286, 950-951; Lin *et al.*, 1999, *Nature*, 402, 128-129; Sharp, 1999, *Genes & Dev.*, 13, 139-141; and Strauss, 1999, *Science*, 286, 886]. 특정 실시형태에서, siRNA는 동일한 수의 뉴클레오사이드를 갖는 제1 가닥 및 제2 가닥을 포함한다; 그러나, 제1 가닥 및 제2 가닥은 제1 및 제2

가닥 상의 2개 말단 뉴클레오사이드가 상보성 가닥 상의 잔기와 쌍을 이루지 않도록 오프셋된다. 특정 예에서, 쌍을 이루지 않는 2개 뉴클레오사이드는 티미딘 잔기이다. siRNA는 표적 유전자와 충분한 상동성의 영역을 포함해야 하고, siRNA 또는 이의 단편이 표적 유전자의 하향 조절을 매개할 수 있도록 뉴클레오티드의 측면에서 충분한 길이의 것이어야 한다. 따라서, siRNA는 표적 RNA와 적어도 부분적으로 상보성인 영역을 포함한다. siRNA와 표적 사이에 완전한 상보성이 있을 필요는 없지만, 대응은 siRNA 또는 이의 절단 생성물이 표적 RNA의 RNAi 절단 등의 서열 특이적 사일런싱을 지시하는 것을 가능하게 하도록 충분해야 한다. 상보성, 또는 표적 가닥과의 상동성 정도는 안티센스 가닥에서 가장 중요하다. 특히 안티센스 가닥에서 완전한 상보성이 종종 요구되지만, 일부 실시형태는 표적 RNA에 대하여 하나 이상, 바람직하게는 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 또는 이보다 작은 부정합을 포함한다. 부정합은 말단 영역에서 대부분 허용되고, 존재하는 경우, 말단 영역 또는 영역들, 예를 들면, 바람직하게는 5' 및/또는 3' 말단의 6, 5, 4 또는 3개 뉴클레오티드에 존재한다. 센스 가닥은 분자의 전체 이중-가닥 특성을 유지하기 위해 안티센스 가닥과 충분히 상보성일 필요가 있다.

[0206] 또한, siRNA는 변형되거나 뉴클레오사이드 유사체를 포함할 수 있다. siRNA의 단일 가닥 영역은 변형되거나 뉴클레오사이드 유사체, 예를 들면, 헤어핀 구조의 쌍을 이루지 않은 영역 또는 영역들을 포함할 수 있고, 예를 들면, 2개 상보성 영역을 연결하는 영역은 변형 또는 뉴클레오사이드 유사체를 가질 수 있다. 예를 들면, 엑소 뉴클레아제에 대해 siRNA의 하나 이상의 3'- 또는 5'-말단을 안정화시키거나 안티센스 siRNA 제제가 RISC 내로 도입되는 것을 조장하기 위한 변형이 또한 유용하다. 변형은 C3(또는 C6, C7, C12) 아미노 링커, 티올 링커, 카복실 링커, 비-뉴클레오티드 스페이서(C3, C6, C9, C12, 비염기성, 트리에틸렌 글리콜, 헥사에틸렌 글리콜), 특수한 비오틴, 또는 포스포르아미다이트이고 또 다른 DMT-보호된 하이드록실 그룹을 갖는 형광 시약을 포함하여, RNA 합성 동안 다중 커플링을 가능하게 한다. siRNA의 각각의 가닥은 길이가 30, 25, 24, 23, 22, 21 또는 20개 뉴클레오티드 이하일 수 있다. 가닥은 바람직하게는 길이가 적어도 19개 뉴클레오티드이다. 예를 들면, 각 가닥은 길이가 21 내지 25개 뉴클레오티드일 수 있다. 바람직한 siRNA는 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 또는 25개 뉴클레오티드 쌍의 듀플렉스 영역, 및 2 내지 3개 뉴클레오티드의 하나 이상의 오버행, 바람직하게는 2 내지 3개 뉴클레오티드의 1 또는 2개의 3' 오버행을 갖는다.

[0207] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "miRNA" 또는 "마이크로RNA"는, 프리-miRNA로서 공지된 약 70개 뉴클레오티드 폴드백 RNA 전구체 구조로부터 통상 소화된, 20 내지 22개 뉴클레오티드의 작은 비-코딩 RNA를 지칭한다. miRNA는 miRNA와 표적 사이의 상보성 정도에 따라 2개 방법 중의 하나로 이들의 표적을 음으로 조절한다. 우선, 단백질-코딩 mRNA 서열에 완전 또는 거의 완전한 상보성으로 결합하는 miRNA는 RNA-매개된 간섭(RNAi) 경로를 유도한다. 이들의 mRNA 표적의 3' 비번역된 영역(UTR) 내에서 불완전한 상보성 부위에 결합함으로써 이들의 조절 효과를 발휘하는 miRNA는, RISC 복합체가 RNAi 경로에 사용되는 것과 유사하거나 가능하게는 동일하더라도, 표적-유전자 발현을 명백하게는 번역 수준에서 전사후에 억제한다. 번역 조절과 일치하여, 이러한 메카니즘을 사용하는 miRNA는 이들의 표적 유전자의 단백질 수준을 감소시키지만, 이들 유전자의 mRNA 수준은 단지 최소로 영향을 받는다. miRNA는 임의의 mRNA 서열을 특이적으로 표적화할 수 있는 인공적으로 설계된 miRNA 뿐만 아니라 천연 발생 miRNA 둘 다를 포함한다. 예를 들면, 한 가지 실시형태에서, 당해 기술분야의 숙련가는 인간 miRNA(예: miR-30 또는 miR-21) 일차 전사체로서 발현된 짧은 헤어핀 RNA 작제물을 설계할 수 있다. 이러한 설계는 드로샤(Drosha) 처리 부위를 헤어핀 작제물에 부가하고, 녹다운 유효성을 크게 증가시키는 것으로 밝혀졌다[참조: Pusch *et al.*, 2004]. 헤어핀 줄기는 dsRNA의 22-nt(예: 안티센스는 목적하는 표적과 완전 상보성을 갖는다) 및 인간 miR로부터의 15-19-nt 루프로 이루어진다. 헤어핀의 어느 하나의 부위 또는 두 부위에 miR 루프 및 miR30 인접 서열의 부가는, 마이크로RNA 부재하에 통상의 shRNA 설계와 비교하여, 발현된 헤어핀의 드로샤 및 다이서(Dicer) 처리에서 10배 증가를 제공한다. 증가된 드로샤 및 다이서 처리는 발현된 헤어핀에 대한 보다 큰 siRNA/miRNA 생성 및 보다 큰 효력으로 해석된다.

[0208] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "shRNA" 또는 "단쇄 헤어핀 RNA"는 단일 자가-상보성 RNA 가닥에 의해 형성되는 이중-가닥 구조를 지칭한다. 코딩 또는 비-코딩 서열, 표적 유전자의 일부와 동일한 뉴클레오티드 서열을 함유하는 shRNA 작제물은 억제에 바람직하다. 표적 서열과 비교하여 삽입, 결실 및 단일 점 돌연변이를 갖는 RNA 서열은 또한 억제에 효과적인 것으로 밝혀졌다. 억제 RNA와 표적 유전자의 일부 사이에서 90% 초과 서열 동일성 또는 심지어 100% 서열 동일성이 바람직하다. 특정의 바람직한 실시형태에서, shRNA의 듀플렉스-형성 부분의 길이는, 예를 들면, 다이서-의존성 절단에 의해 생성된 RNA 생성물의 크기에 상응하는, 길이가 적어도 20, 21 또는 22개 뉴클레오티드이다. 특정 실시형태에서, shRNA 작제물은 길이가 적어도 25, 50, 100, 200, 300 또는 400개 염기이다. 특정 실시형태에서, shRNA 작제물은 길이가 400 내지 800개 염기이다. shRNA 작제물은 루프 서열 및 루프 크기의 변화가 매우 허용된다.

- [0209] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "리보자임"은 표적 mRNA의 부위-특이적 절단을 가능하게 하는 촉매적 활성 RNA 분자를 지칭한다. 몇몇 서브타입, 예를 들면, 햄머헤드 및 헤어핀 리보자임이 기재되어 있다. 리보자임 촉매 활성 및 안정성은 비촉매적 염기에서 리보뉴클레오티드를 테옥시리보뉴클레오티드로 치환함으로써 개선시킬 수 있다. 부위-특이적 인식 서열에서 mRNA를 절단하는 리보자임이 특정 mRNA를 파괴하기 위해 사용될 수 있지만, 햄머헤드 리보자임의 사용이 바람직하다. 햄머헤드 리보자임은 표적 mRNA와 상보성 염기 쌍을 형성하는 인접 영역에 의해 결정된 위치에서 mRNA를 절단한다. 유일한 요건은 표적 mRNA가 다음과 같은 2개 염기의 서열을 갖는 것이다: 5'-UG-3'. 햄머헤드 리보자임의 작제 및 생성은 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0210] siRNA, miRNA, shRNA 또는 리보자임을 포함하는 목적하는 폴리뉴클레오티드의 바람직한 전달 방법은, 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이, 예를 들면, 강력한 구성 pol III, 예를 들면, 인간 U6 snRNA 프로모터, 마우스 U6 snRNA 프로모터, 인간 및 마우스 H1 RNA 프로모터 및 인간 tRNA-val 프로모터, 또는 강력한 구성 pol II 프로모터 등의 하나 이상의 조절 서열을 포함한다.
- [0211] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 코딩 서열 자체의 길이와 무관하게, 본원의 다른 개소에 개시되거나 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, 다른 DNA 서열, 예를 들면, 프로모터 및/또는 인핸서, 비번역된 영역(UTR), 코작 서열, 폴리아데닐화 시그널, 추가의 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 내부 리보솜 도입 부위(IRES), 재조합효소 (recombinase) 인식 부위(예: LoxP, FRT 및 Att 부위), 종결 코돈, 전사 종결 시그널 및 자가-절단 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 에피토프 태그와 조합되어, 이의 전체 길이는 상당히 달라질 수 있다. 따라서, 거의 모든 길이의 폴리뉴클레오티드 단편이 사용될 수 있는 것으로 의도되며, 전체 길이는 바람직하게는 의도된 재조합 DNA 프로토콜에서 제조 및 사용 용이성에 의해 제한된다.
- [0212] 폴리뉴클레오티드는 당해 기술분야에 공지되고 이용가능한 임의의 다양한 잘 확립된 기술을 사용하여 제조, 조작 및/또는 발현시킬 수 있다. 목적하는 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 적절한 벡터에 삽입할 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 자가 복제 서열 및 전이 요소 (transposable)이다. 추가의 예시적 벡터는, 제한 없이, 플라스미드, 파게미드, 코스미드, 인공 염색체, 예를 들면, 효모 인공 염색체(YAC), 세균 인공 염색체(BAC), 또는 P1-유래된 인공 염색체(PAC), 박테리오파지, 예를 들면, 람다 파지 또는 M13 파지 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터로서 유용한 동물 바이러스 범주의 예는, 제한 없이, 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예: 헤르페스 심플렉스 바이러스), 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 파필로마바이러스 및 파보바이러스(예: SV40)를 포함한다. 발현 벡터의 예는 포유동물 세포에서 발현시키기 위한 pCneo 벡터(Promega); 포유동물 세포에서 렌티바이러스-매개된 유전자 전이 및 발현을 위한 pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ 및 pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 키메라 단백질의 코딩 서열은 포유동물 세포에서 키메라 단백질의 발현을 위해 이러한 발현 벡터에 연결될 수 있다.
- [0213] 발현 벡터에 존재하는 "조절 요소" 또는 "조절 서열"은, 전사 및 번역을 수행하기 위해 숙주 세포 단백질과 상호작용하는 벡터의 비-번역된 영역(복제 기원, 선별 카세트, 프로모터, 인핸서, 번역 개시 시그널(Shine Dalgarno 서열 또는 Kozak 서열) 인트론, 폴리아데닐화 서열, 5' 및 3' 비번역된 영역)이다. 이러한 요소는 이들의 강도 및 특이성이 상이할 수 있다. 사용된 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 편재성 프로모터 및 유도가능한 프로모터를 포함하는 임의의 수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다.
- [0214] 특정 실시형태에서, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 발현 벡터 및 바이러스 벡터를 포함하는, 본 발명의 실시예에 사용하기 위한 벡터는 프로모터 및/또는 인핸서와 같은 외인성, 내인성 또는 이중성 조절 서열을 포함한다. "내인성" 조절 서열은 게놈 내에서 소정 유전자와 자연적으로 연결된 것이다. "외인성" 조절 서열은 당해 유전자의 전사가 연결된 인핸서/프로모터에 의해 지시되도록 유전자 조작(즉, 분자 생물학 기술)의 방법에 의해 유전자에 병렬로 배치된 것이다. "이중성" 조절 서열은 유전적으로 조작된 세포와 상이한 종으로부터 유래하는 외인성 서열이다.
- [0215] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "프로모터"는 RNA 폴리머라제가 결합하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 지칭한다. RNA 폴리머라제는 프로모터에 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드를 개시하고 전사한다. 특정 실시형태에서, 포유동물 세포에서 작동하는 프로모터는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역 및/또는 전사 개시로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견되는 또 다른 서열, N이 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 CNCAAT 영역을 포함한다.
- [0216] 용어 "인핸서"는, 증강된 전사를 제공할 수 있는 서열을 함유하고 일부의 경우에 또 다른 조절 서열에 대해 이들의 배향과는 독립적으로 기능할 수 있는 DNA의 세그먼트를 지칭한다. 인핸서는 프로모터 및/또는 기타 인핸

서 요소와 협동적으로 또는 부가적으로 기능할 수 있다. 용어 "프로모터/인핸서"는 프로모터 및 인핸서 기능 둘 다를 제공할 수 있는 서열을 함유하는 DNA의 세그먼트를 지칭한다.

[0217] 용어 "작동적으로 연결된"은 기재된 성분이 이들을 이들의 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계로 존재하는 병렬관계를 지칭한다. 한 가지 실시형태에서, 상기 용어는 핵산 발현 조절 서열(예를 들면, 프로모터 및/또는 인핸서)과 제2 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들면, 목적하는 폴리뉴클레오티드 사이의 기능적 연결을 지칭하고, 여기서 발현 조절 서열은 제2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 지시한다.

[0218] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "구성적 발현 조절 서열"은 작동적으로 연결된 서열의 전사를 계속해서 또는 연속적으로 가능하게 하는 프로모터, 인핸서 또는 프로모터/인핸서를 지칭한다. 구성적 발현 조절 서열은 광범한 종류의 세포 및 조직 유형에서 발현을 가능하게 하는 "편재성(ubiquitous)" 프로모터, 인핸서 또는 프로모터/인핸서, 또는 제한된 종류의 세포 및 조직 유형에서 각각 발현을 가능하게 하는 "세포 특이적", "세포 유형 특이적", "세포 계통 특이적" 또는 "조직 특이적" 프로모터, 인핸서 또는 프로모터/인핸서일 수 있다.

[0219] 본 발명의 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 예시적인 편재성 발현 조절 서열에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 프로모터, 바이러스성 시미안 바이러스 40(SV40)(예를 들면, 초기 또는 후기), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV) LTR 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터, 백시니아 바이러스로부터의 H5, P7.5 및 P11 프로모터, 신장 인자(elongation factor) 1-알파(EF1a) 프로모터, 초기 성장 반응 1(EGR1), 페리틴 H(FerH), 페리틴 L(FerL), 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH), 진핵성 번역 개시 인자 4A1(EIF4A1), 열 쇼크 70kDa 단백질 5(HSPA5), 열 쇼크 단백질 90kDa 베타, 구성원 1(HSP90B1), 열 쇼크 단백질 70kDa(HSP70), β -키네신(β -KIN), 인간 ROSA 26 유전자좌[참조: Irions *et al.*, (2007) *Nature Biotechnology* 25, 1477-1482], 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 β -액틴(CAG) 프로모터 및 β -액틴 프로모터, 및 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실된, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된(MND) 프로모터를 포함한다[참조: Challita *et al.*, *J Virol.* 69(2):748-55(1995)].

[0220] 특정 실시형태에서, 이는 표적 항원을 발현하는 세포에 T 세포를 재지시하는 충분한 수준의 T 세포에서 안정한 및 장기간 CAR 발현을 제공하는 프로모터로부터 CAR을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 프로모터는 MND 프로모터이다.

[0221] 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 벡터는, MND 프로모터 활성을 증가, 감소 또는 안정화시키는 하나 이상의 뉴클레오티드 삽입, 결실, 치환 또는 변형을 포함하는 MND 프로모터를 포함한다.

[0222] 본원에서 사용된 바와 같이, "조건적 발현(conditional expression)"은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 유도성 발현; 억제성 발현; 특정한 생리학적, 생물학적 또는 질환 상태를 갖는 세포 또는 조직에서의 발현 등을 포함하는 모든 유형의 조건적 발현을 지칭할 수 있다. 이 정의는 세포 유형 또는 조직 특이적 발현을 배제하도록 의도된 것은 아니다. 본 발명의 특정한 실시형태는 목적하는 폴리뉴클레오티드의 조건적 발현을 제공하고, 예를 들면, 발현은 세포, 조직, 생물체 등을, 폴리뉴클레오티드가 발현되도록 야기하거나 목적하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리뉴클레오티드의 발현의 증가 또는 감소를 야기하는 처리 또는 조건에 적용함으로써 조절된다.

[0223] 유도성 프로모터/시스템의 예시적 예로는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 글루코코르티코이드 또는 에스트로겐 수용체를 코딩하는 유전자에 대한 프로모터와 같은 스테로이드-유도성 프로모터(상응하는 호르몬으로 처리함으로써 유도가능), 메탈로티오닌 프로모터(다양한 중금속으로 처리함으로써 유도가능), MX-1 프로모터(인터페론에 의해 유도가능), "진스위치" 미페프리스톤-조절가능한 시스템("GeneSwitch" mifepristone-regulatable system)[참조: Sirin *et al.*, (2003) *Gene*, 323:67], 쿠메이트 유도성 유전자 스위치(WO 2002/088346), 테트라사이클린-의존성 조절 시스템 등을 포함한다.

[0224] 조건적 발현은 또한 부위-특이적 DNA 재조합효소를 사용함으로써 달성될 수 있다. 본 발명의 특정한 실시형태에 따르면, 벡터는 부위-특이적 재조합효소에 의해 매개된 재조합을 위한 적어도 하나(통상 2개)의 부위(들)를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "재조합효소" 또는 "부위-특이적 재조합효소"는 야생형 단백질[참조: Landy, (1993), *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707], 또는 이의 돌연변이체, 유도체(예를 들면, 재조합 단백질 서열 또는 이의 단편을 함유하는 융합 단백질), 단편 및 변이체일 수 있는, 하나 이상의 재조합 부위(예를 들면, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 30, 50개 등)를 수반하는 재조합 반응에 관여하는 소화성 또

는 통합성 단백질, 효소, 보조-인자(co-factors) 또는 연관된 단백질을 포함한다. 본 발명의 특정한 실시형태에서 사용하기에 적합한 재조합효소의 예시적 예로는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin, Tn3 리졸라제(resolvase), TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 및 ParA가 포함된다.

[0225] 벡터는 광범한 종류의 부위-특이적 재조합효소 중의 임의의 것에 대한 하나 이상의 재조합 부위를 포함할 수 있다. 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 통합에 필요한 임의의 부위(들) 이외에도 부위-특이적 재조합효소에 대한 표적 부위가 존재하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 서열", "재조합 부위" 또는 "부위-특이적 재조합 부위"는 재조합효소가 인식하고 결합하는 특정한 핵산 서열을 지칭한다.

[0226] 예를 들면, Cre 재조합효소에 대한 하나의 재조합 부위는 8개의 염기쌍 코어 서열에 인접하는 두 개의 13개 염기쌍 반전 반복체(재조합효소 결합 부위로 작용함)를 포함하는 34개 염기쌍 서열인 loxP이다(참조: 문헌[Sauer, B., (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527]의 도 1). 기타 예시적 loxP 부위에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, lox511(Hoess *et al.*, 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171(Lee and Saito, 1998), lox2272(Lee and Saito, 1998), m2(Langer *et al.*, 2002), lox71(Albert *et al.*, 1995) 및 lox66(Albert *et al.*, 1995)이 포함된다.

[0227] FLP 재조합효소에 대한 적합한 인식 부위에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, FRT(McLeod, *et al.*, 1996), F₁, F₂, F₃(Schlake and Bode, 1994), F₄, F₅(Schlake and Bode, 1994), FRT(LE)(Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE)(Senecoff *et al.*, 1988)가 포함된다.

[0228] 인식 서열의 다른 예는 재조합효소 효소 λ 인테그라제(Integrase), 예를 들면, phi-c31에 의해 인식되는 attB, attP, attL 및 attR 서열이다. ϕ C31 SSR은 단지 이형 부위 attB(길이 34bp) 및 attP(길이 39bp) 사이에서만 재조합을 매개한다[참조: Groth *et al.*, 2000]. 각각 박테리아 및 파지 계통 상의 파지 인테그라제에 대한 부착 부위에 대한 명칭인 attB 및 attP는 둘 다 ϕ C31 호모이량체에 의해 결합될 가능성이 있는 불완전한 반전 반복부위를 함유한다[참조: Groth *et al.*, 2000]. 생성물 부위인 attL 및 attR은 추가의 ϕ C31-매개된 재조합에 대해서 효과적으로 불활성이고[참조: Belteki *et al.*, 2003], 이는 반응을 비가역적으로 만든다. 삽입을 촉진시키는 경우에, attB-보유 DNA는 계놈 attB 부위 내로 attP 부위 삽입보다 더 용이하게 계놈 attP 부위 내로 삽입하는 것으로 밝혀졌다[참조: Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003]. 따라서, 대표적인 전략은, attP-보유 "도킹 부위"를 규정된 유전자좌 내로 상동성 재조합시킨 다음, 삽입을 위한 attB-보유 유입 서열과 쌍을 이루는 것으로 결정된다.

[0229] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "내부 리보솜 도입 부위" 또는 "IRES"는, 시스톤(단백질 인코딩 영역)의 ATG와 같은 개시 코돈으로의 직접적인 내부 리보솜 도입을 촉진시키고 이에 의해 유전자의 캡(cap)-독립적 번역을 유도하는 요소를 지칭한다[참조: Jackson *et al.*, (1990) *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83 and Jackson and Kaminski. (1995) *RNA* 1(10):985-1000]. 특정한 실시형태에서, 본 발명에 의해 의도되는 벡터는 하나 이상의 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 목적하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 다수의 폴리펩티드 각각의 효율적인 번역을 달성하기 위해서, 폴리뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 IRES 서열 또는 자가-절단성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 분리될 수 있다.

[0230] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "코작 서열"은, 리보솜의 작은 아단위에 대한 mRNA의 초기 결합을 크게 촉진시키고 번역을 증가시키는 짧은 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 공통 (consensus) 코작 서열은 (GCC)RCCATGG (서열번호 27)이고, 여기서 R은 퓨린(A 또는 G)이다[참조: Kozak, (1986)*ell.* 44(2):283-92, 및 C Kozak, (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48]. 특정한 실시형태에서, 본 발명에 의해 의도되는 벡터는, 공통 코작 서열을 가지며 바람직한 폴리펩티드(예: CAR)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0231] 본 발명의 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포는, 직접 독성 및/또는 비조절된 증식의 위험을 감소시키기 위해 유도가능한 자살 유전자를 포함하는 자살 유전자를 이용한다. 특정한 측면에서, 자살 유전자는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 또는 세포에 대해 면역원성이 아니다. 사용될 수 있는 자살 유전자의 특정 예는 카스파제-9 또는 파스파제-8 또는 사이토신 데아미나제이다. 카스파제-9는 이량체화의 특정한 화학적 유도인자(CID)를 사용하여 활성화시킬 수 있다.

[0232] 특정 실시형태에서, 벡터는, 본 발명의 면역 작동 세포, 예를 들면, T 세포가 생체내에서 음성 선별에 감수성이도록 하는 것을 유발하는 유전자 세그먼트를 포함한다. "음성 선별"이란 주입된 세포가 개체의 생체내 조건에

서 변화의 결과로서 제거될 수 있음을 의미한다. 음성 선별가능한 표현형은 감수성을 부여된 제제, 예를 들면, 화합물에 제공하는 유전자의 삽입으로부터 발생한다. 음성 선별가능한 유전자는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 특히 다음을 포함한다: 강시클로비르 감수성을 부여하는 헤르페스 심플렉스 바이러스 유형 I 티미딘 키나제 (HSV-I TK) 유전자[참조: Wigler *et al.*, Cell 11:223, 1977]; 세포 하이포크산틴 포스포리보실트랜스퍼라제 (HPRT) 유전자, 세포 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(APRT) 유전자 및 세균 사이토신 데아미나제[참조: Mullen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33(1992)].

[0233] 일부 실시형태에서, 유전적으로 변형된 면역 작동 세포, 예를 들면, T 세포는, 시험관내에서 음성 선별가능한 표현형의 세포의 선별을 가능하게 하는 양성 마커를 추가로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 양성 선별 가능한 마커는, 숙주 세포 내로 도입되면, 유전자를 포함하는 세포의 양성 선별을 가능하게 하는 음성 표현형을 발현하는 유전자일 수 있다. 이러한 유형의 유전자는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 특히 내성을 하이그로마이신 B에 부여하는 하이그로마이신-B 포스포트랜스퍼라제 유전자(hph), 항생제 G418에 대한 내성을 코딩하는 아미노 글리코사이드 포스포트랜스퍼라제 유전자(neo 또는 aph), 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자, 아데노신 데아미나제 유전자(ADA) 및 다중-약물 내성(MDR) 유전자를 포함한다.

[0234] 바람직하게는, 양성 선별가능한 마커 및 음성 선별가능한 요소는, 음성 선별가능한 요소의 소실이 반드시 또한 양성 선별가능한 마커의 소실에 의해 수반되도록 연결된다. 보다 더 바람직하게는, 양성 및 음성 선별가능한 마커는 한쪽 방향의 소실이 의무적으로 다른쪽 방향의 소실을 유도하도록 융합된다. 상기 기재된 목적하는 양성 및 음성 선별 특징 둘 다를 부여하는 폴리펩티드를 발현 생성물로서 제공하는 융합된 폴리뉴클레오티드의 예는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 티미딘 키나제 융합 유전자(HyTK)이다. 이러한 유전자의 발현은, 시험관내에서 양성 선별에 대해 하이그로마이신 B 내성을 부여하고 생체내에서 음성 선별에 대해 간시클로비르 감수성을 부여하는 폴리펩티드를 제공한다[참조: Lupton S. D., et al, Mol. and Cell. Biology 11:3374- 3378, 1991]. 또한, 바람직한 실시형태에서, 키메라 수용체를 코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 융합된 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터, 특히 시험관내에서 양성 선별에 대해 하이그로마이신 B 내성을 부여하고 생체내에서 음성 선별에 대해 간시클로비르 감수성을 부여하는 것들, 예를 들면, 문헌[참조: Lupton, S. D. *et al.* (1991), supra]에 기재된 HyTK 레트로바이러스 벡터에 존재한다. 또한, 음성 양성 선별가능한 마커를 음성 선별가능한 마커와 융합하여 유도된 이작용성 선별가능한 융합 유전자의 사용을 기재하는 문헌[참조: PCT US91/08442 및 PCT/US94/05601, S. D. Lupton]을 참조한다.

[0235] 바람직한 양성 선별가능한 마커는 hph, nco 및 gpt로 이루어진 그룹으로부터 선택된 유전자로부터 유래되고, 바람직한 음성 선별가능한 마커는 사이토신 데아미나제, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT 및 gpt로 이루어진 그룹으로부터 선택된 유전자로부터 유래된다. 특히 바람직한 마커는 이작용성 선별가능한 융합 유전자이고, 여기서 양성 선별가능한 마커는 hph 또는 neo로부터 유래되고, 음성 선별가능한 마커는 사이토신 데아미나제 또는 TK 유전자 또는 선별가능한 마커로부터 유래된다.

[0236] **F. 바이러스 벡터**

[0237] 특정 실시형태에서, 세포(예: T 세포)는 CAR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들면, 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 예를 들면, 벡터는 MND 프로모터를 포함하고, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM, 또는 CD3 ζ 의 세포내 시그널전달 도메인을 갖는 VEGFR2 폴리펩티드, CD28, 4-1BB, O \times 40 또는 이들의 임의의 조합에 결합하는 항체의 항원-특이적 결합 도메인을 조합하는 CAR을 코딩한다. 따라서, 이들 형질도입된 T 세포는 안정한, 장기간 및 지속적 CAR-매개된 T-세포 반응을 야기할 수 있다.

[0238] 레트로바이러스는 유전자 전달을 위한 통상적 도구이다[참조: Miller, 2000, *Nature*. 357: 455-460]. 특정 실시형태에서, 레트로바이러스는 키메라 항원 수용체(CAR)를 세포에 전달하기 위해 사용된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "레트로바이러스"는 이의 게놈 RNA를 선형 이중 가닥 DNA 카피로 역전사시키고, 이어서 이의 게놈 DNA를 숙주 게놈 내에 공유적으로 통합시키는 RNA 바이러스를 지칭한다. 일단 바이러스가 숙주 게놈 내에 통합되면, 이는 "프로바이러스(provirus)"라 지칭된다. 프로바이러스는 RNA 폴리머라제 II에 대한 주형으로 작용하며, 새로운 바이러스 입자를 생산하는데 필요한 구조 단백질 및 효소를 코딩하는 RNA 분자의 발현을 지시한

다.

- [0239] 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 예시적 레트로바이러스는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 몰로니 뮤린 (Moloney murine) 백혈병 바이러스(M-MuLV), 몰로니 뮤린 육종 바이러스(MoMSV), 하베이(Harvey) 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스(MuMTV), 지본 유인원(gibbon ape) 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(FLV), 스푸마바이러스(spumavirus), 프렌드(Friend) 뮤린 백혈병 바이러스, 뮤린 줄기 세포 바이러스(MSCV) 및 라우스(Rous) 육종 바이러스(RSV) 및 렌티바이러스 벡터를 포함한다.
- [0240] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "렌티바이러스"는 복잡한 레트로바이러스의 그룹(또는 속)을 지칭한다. 예시적 레트로바이러스는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, HIV(인간 면역결핍 바이러스; HIV 유형 1, 및 HIV 유형 2 포함); 비스나-메디(visna-maedi) 바이러스(VMV); 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역결핍 바이러스(BIV); 및 시미안 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함한다. 한 가지 실시형태에서, HIV 기반 벡터 골격(즉, HIV 시스-작용 서열 요소)이 바람직하다. 특정 실시형태에서, 렌티바이러스는 MND 프로모터를 포함하고 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하기 위해 사용된다.
- [0241] 레트로바이러스 벡터, 및 더욱 특히 렌티바이러스 벡터는 본 발명의 특정 실시형태를 실시하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "레트로바이러스" 또는 "레트로바이러스 벡터"는 각각 "렌티바이러스" 및 "렌티바이러스 벡터"를 포함하는 것을 의미한다.
- [0242] 용어 "벡터"는 본원에서 또 다른 핵산 분자를 전이시키거나 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위해서 사용된다. 전이된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결되는데, 예를 들면, 벡터 핵산 분자 내에 삽입된다. 벡터는 세포에서의 자율적 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있거나, 숙주 세포 DNA 내로의 통합을 가능하게 하는데 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터는, 예를 들면, 플라스미드(예를 들면, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 트랜스포손, 코스미드, 세균 인공 염색체 및 바이러스 벡터를 포함한다. 유용한 바이러스 벡터는, 예를 들면, 복제 결합 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 포함한다.
- [0243] 당해 기술분야의 기술자에게 명백한 바와 같이, 용어 "바이러스 벡터"는, 전형적으로 핵산 분자의 전이 또는 세포의 게놈 내로의 통합을 용이하게 하는 바이러스-유래된 핵산 요소를 포함하는 핵산 분자(예를 들면, 전이 플라스미드), 또는 핵산 전이를 매개하는 바이러스 입자를 지칭하기 위해서 광범하게 사용된다. 바이러스 입자는 전형적으로 핵산(들) 이외에도 다양한 바이러스 성분 및 종종 또한 숙주 세포 성분들을 포함할 것이다.
- [0244] 용어 바이러스 벡터는 핵산을 세포 내로 전이시킬 수 있는 바이러스 또는 바이러스 입자, 또는 전이된 핵산 그 자체를 지칭할 수 있다. 바이러스 벡터 및 전이 플라스미드는 주로 바이러스로부터 유래된 구조적 및/또는 기능적 유전자 요소를 함유한다. 용어 "레트로바이러스 벡터"는 주로 레트로바이러스로부터 유래된 구조적 및 기능적 유전자 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 지칭한다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는 주로 렌티바이러스로부터 유래된 LTR을 포함한 구조적 및 기능적 유전자 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 지칭한다. 용어 "하이브리드"는 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스 서열 및 비-렌티바이러스 바이러스 서열 둘 다를 함유하는 벡터, LTR 또는 기타 핵산을 지칭한다. 한 가지 실시형태에서, 하이브리드 벡터는 역전사, 복제, 통합 및/또는 패키징을 위한 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스 서열을 포함하는 벡터 또는 전이 플라스미드를 지칭한다.
- [0245] 특정한 실시형태에서, 용어 "렌티바이러스 벡터", "렌티바이러스 발현 벡터"는 렌티바이러스 전이 플라스미드 및/또는 감염성 렌티바이러스 입자를 지칭하기 위해서 사용될 수 있다. 본원에서 클로닝 부위, 프로모터, 조절 요소, 이종성 핵산 등과 같은 요소들을 언급하는 경우에, 이들 요소의 서열은 본 발명의 렌티바이러스 입자에서 RNA 형태로 존재하고 본 발명의 DNA 플라스미드에서 DNA 형태로 존재하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0246] 프로바이러스의 각각의 말단에는 "긴 말단 반복체(long terminal repeat)" 또는 "LTR"로 불리우는 구조가 존재한다. 용어 "긴 말단 반복체(LTR)"는 이들의 천연 서열 환경에서 직접적인 반복체이고 U3, R 및 U5 영역을 함유하는 레트로바이러스 DNA의 말단에 위치하는 염기쌍의 도메인을 지칭한다. LTR는 일반적으로 레트로바이러스 유전자의 발현(예를 들면, 촉진, 개시 및 유전자 전사물의 폴리아데닐화) 및 바이러스 복제에 기본적인 기능을 제공한다. LTR은 전사 조절 요소, 폴리아데닐화 시그널 및 바이러스 게놈의 복제 및 통합에 필요한 서열을 포함하는 다수의 조절 시그널을 함유한다. 바이러스 LTR은 U3, R 및 U5로 불리우는 3개 영역으로 구분된다. U3 영역은 인핸서 및 프로모터 요소를 함유한다. U5 영역은 프라이머 결합 부위와 R 영역 사이의 서열이고, 폴리아데닐화 서열을 함유한다. R(반복체) 영역은 U3 및 U5 영역에 인접하여 있다. U3, R 및 U5 영역으로 구성된

LTR은 바이러스 게놈의 5' 및 3' 말단 둘 다에서 나타난다. 5' LTR에 인접한 것은 게놈의 역전사(tRNA 프라이머 결합 부위)를 위해서, 및 바이러스 RNA의 입자 내로의 효율적 패키징(Psi 부위)을 위해서 필요한 서열이다.

[0247] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "패키징 시그널" 또는 "패키징 서열"은 바이러스 RNA를 바이러스 캡시드 또는 입자 내로 삽입하는데 요구되는 레트로바이러스 게놈 내에 위치한 서열을 지칭한다[참조: Clever *et al.*, 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109]. 몇 가지의 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 캡시드화에 필요한 최소 패키징 시그널(또한 psi[Ψ] 서열로도 지칭됨)을 사용한다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "패키징 서열", "패키징 시그널", "프사이(psi)" 및 기호 "Ψ"는 바이러스 입자 형성 중에 레트로바이러스 RNA 가닥의 캡시드화에 필요한 비-코딩 서열과 관련하여 사용된다.

[0248] 다양한 실시형태에서, 벡터는 변형된 5' LTR 및/또는 3' LTR을 포함한다. LTR 중의 하나 또는 둘 다는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 하나 이상의 결실, 삽입 또는 치환을 포함하는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 3' LTR의 변형은 종종, 바이러스를 복제-결합성으로 되도록 함으로써 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 시스템의 안전성을 개선시키기 위해서 이루어진다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "복제-결합"은 감염성 비리온이 생산되지 않도록 안전하고 효과적인 복제를 할 수 없는 바이러스를 지칭한다(예를 들면, 복제-결합성 렌티바이러스 자손). 용어 "복제-적격(replication-competent)"은 바이러스의 바이러스 복제가 감염성 비리온(예를 들면, 복제-적격 렌티바이러스 자손)을 생산할 수 있도록 복제할 수 있는 야생형 바이러스 또는 돌연변이 바이러스를 지칭한다.

[0249] "자가-불활성화"(SIN) 벡터는, U3 영역으로 알려진 우측(3') LTR 인핸서-프로모터 영역이 바이러스 복제의 일차 라운드를 초과하는 바이러스 전사를 방지하도록 변형(예를 들면, 결실 및/또는 치환에 의해)되어 있는 복제-결합 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 지칭한다. 이것은 우측(3') LTR U3 영역이 바이러스 복제 중에 좌측(5') LTR U3 영역에 대한 주형으로 사용되고, 이에 따라 바이러스 전사체가 U3 인핸서-프로모터의 부재하에 제조될 수 없기 때문이다. 본 발명의 추가의 실시형태에서, 3' LTR은 U5 영역이, 예를 들면, 이상적 폴리(A) 서열로 대체되도록 변형된다. 3' LTR, 5' LTR, 또는 3' 및 5' LTR 둘 다에 대한 변형과 같은 LTR에 대한 변형도 또한 본 발명에 포함되는 것에 유의해야 한다.

[0250] 추가의 안전성 증강은 5' LTR의 U3 영역을 이중성 프로모터로 대체하여 바이러스 입자의 생성 중에 바이러스 게놈의 전사를 유도시킴으로써 제공된다. 사용될 수 있는 이중성 프로모터의 예는, 예를 들면, 바이러스성 시미안 바이러스 40(SV40)(예를 들면, 초기 또는 후기), 사이토메갈로바이러스(CMV)(예를 들면, 즉시 초기), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV), 라우스 육종 바이러스(RSV) 및 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터를 포함한다. 전형적인 프로모터는 Tat-독립적 방식으로 높은 수준의 전사를 유도할 수 있다. 이러한 대체는 복제-적격 바이러스를 생성시키는 재조합의 가능성을 감소시키는데, 이는 바이러스 생성 시스템 내에 완전한 U3 서열이 없기 때문이다. 특정한 실시형태에서, 이중성 프로모터는 바이러스 게놈이 전사되는 방식을 조절하는데 추가적인 이점을 갖는다. 예를 들어, 이중성 프로모터는 유도 인자가 존재하는 경우에만 바이러스 게놈의 전부 또는 일부의 전사가 발생하도록 유도될 수 있다. 유도 인자는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 하나 이상의 화학적 화합물, 또는 숙주 세포가 배양되는 생리학적 조건, 예를 들면, 온도 또는 pH를 포함한다.

[0251] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 TAR 요소를 포함한다. 용어 "TAR"은 렌티바이러스(예를 들면, HIV) LTR의 R 영역 내에 위치한 "트랜스-활성화 반응" 유전자 요소를 지칭한다. 이 요소는 렌티바이러스 트랜스-활성화인자(tat) 유전자 요소와 상호작용하여 바이러스 복제를 증강시킨다. 그러나, 이 요소는 5' LTR의 U3 영역이 이중성 프로모터에 의해 대체되는 실시형태에서 필요하지 않다.

[0252] "R 영역"은 캡핑 그룹의 개시점(즉, 전사의 개시)에서 시작하여 폴리 A 트랙의 개시점 직전에서 종결하는 레트로바이러스 LTR 내의 영역을 지칭한다. R 영역은 또한 U3 및 U5 영역에 인접하는 것으로 정의된다. R 영역은 역전사 중에 게놈의 한 말단으로부터 다른 말단으로 신생 DNA의 전이를 가능하게 하는데 중요한 역할을 한다.

[0253] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "FLAP 요소"는 이의 서열이 레트로바이러스, 예를 들면, HIV-1 또는 HIV-2의 중앙 폴리퓨린 트랙 및 중앙 종결 서열(cPPT 및 CTS)을 포함하는 핵산을 지칭한다. 적합한 FLAP 요소는 미국 특허 제6,682,907호, 및 문헌[참조: Zennou, *et al.*, 2000, *Cell*, 101:173]에 기재되어 있다. HIV-1 역전사 중에, 중앙 폴리퓨린 트랙(cPPT)에서의 플러스-가닥 DNA의 중앙 개시 및 중앙 종결 서열(CTS)에서의 중앙 종결은 3-가닥 DNA 구조: HIV-1 중앙 DNA 플랩의 형성을 유도한다. 어떠한 이론에 구속되는 것을 원하지 않지만, DNA 플랩은 렌티바이러스 게놈 핵 수입의 시스-활성 결정인자로 작용할 수 있고/있거나 바이러스의 역가를 증가시킬 수 있다. 특정한 실시형태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 골격은 벡터 내의 목적하는 이중성 유전자의 상류 또는 하류에 하나 이상의 FLAP 요소를 포함한다. 예를 들면, 특정한 실시형태에서, 전이 플

라스미드는 FLAP 요소를 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 HIV-1로부터 단리된 FLAP 요소를 포함한다.

[0254] 한 가지 실시형태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 전이 벡터는 하나 이상의 수출 요소를 포함한다. 용어 "수출 요소"는 핵으로부터 세포의 세포질로 RNA 전사체의 수출을 조절하는 시스-작용성 전사-후 조절 요소를 지칭한다. RNA 수출 요소의 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) rev 반응 요소(RRE)[참조: Cullen *et al.*, 1991. *J. Virol.* 65: 1053; and Cullen *et al.*, 1991. *Cell* 58: 423], 및 간염 B 바이러스 전사-후 조절 요소(HPRE)를 포함한다. 일반적으로, RNA 수출 요소는 유전자의 3' UTR 내에 배치되며, 하나 또는 다수의 카피로서 삽입될 수 있다.

[0255] 특정한 실시형태에서, 바이러스 벡터 내의 이중성 서열의 발현은 벡터 내에 전사-후 조절 요소, 효율적인 폴리 아데닐화 부위 및 임의로 전사 종결 시그널을 도입시킴으로써 증가된다. 다양한 전사-후 조절 요소, 예를 들면, 우드척 간염 바이러스 전사-후 조절 요소[참조: WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886]; 간염 B 바이러스에 존재하는 전사-후 조절 요소(HPRE)[참조: Huang and Yen, 1995, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864] 및 기타[참조: Liu *et al.*, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766]는 단백질에서 이중성 핵산의 발현을 증가시킬 수 있다. 특정한 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 WPRE 또는 HPRE와 같은 전사-후 조절 요소를 포함한다.

[0256] 특정 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 WPRE 또는 HPRE와 같은 전사-후 조절 요소를 결여하거나 포함하지 않는데, 이는 일부 경우에 이들 요소가 세포 형질전환의 위험을 증가시키고/시키거나 mRNA 전사체의 양 또는 mRNA의 안정성을 실질적으로 또는 상당히 증가시키지 않거나 mRNA의 안정성을 증가시키기 때문이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 부가된 안전성 척도로서 WPRE 또는 HPRE를 결여하거나 포함하지 않는다.

[0257] 이중성 핵산 전사체의 효율적인 종결 및 폴리 아데닐화를 지시하는 요소는 이중성 유전자 발현을 증가시킨다. 전사 종결 시그널은 일반적으로 폴리 아데닐화 시그널의 하류에서 발견된다. 특정 실시형태에서, 벡터는 발현되는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 폴리 아데닐화 서열 3'를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리 A 부위" 또는 "폴리 A 서열"은 RNA 폴리머라제 II에 의한 신생 RNA 전사체의 종결 및 폴리 아데닐화 둘 다를 지시하는 DNA 서열을 나타낸다. 폴리 아데닐화 서열은 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일을 부가하여 mRNA 안정성을 촉진시킬 수 있고, 따라서 증가된 번역 유효성에 기여할 수 있다. 재조합 전사체의 효율적인 폴리 아데닐화가 바람직한데, 이는 폴리 A 테일을 결여하는 전사체가 불안정하고 신속하게 분해되기 때문이다. 본 발명의 벡터에서 사용될 수 있는 폴리 A 시그널의 예시적 예는 이상적 폴리 A 서열(예를 들면, AATAAA, ATTAAGTAAA), 소 성장 호르몬 폴리 A 서열(BGHpA), 래빗 β -글로빈 폴리 A 서열(r β gpA), 또는 당해 기술분야에서 공지된 또 다른 적합한 이중성 또는 내인성 폴리 A 서열을 포함한다.

[0258] 특정한 실시형태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터는 하나 이상의 절연체(insulator) 요소를 추가로 포함한다. 절연체 요소는, 게놈 DNA에 존재하는 시스-작용성 요소에 의해 매개될 수 있고 전이된 서열의 탈조 절된 발현을 유도할 수 있는 통합 부작용으로부터 렌티바이러스-발현된 서열, 예를 들면, 치료학적 폴리펩티드를 보호하는데 기여할 수 있다(즉, 위치 효과; 참조: Burgess-Beusse *et al.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99:16433; 및 Zhan *et al.*, 2001, *Hum. Genet.*, 109:471). 일부 실시형태에서, 전이 벡터는 3' LTR 내에 하나 이상의 절연체 요소를 포함하고, 숙주 게놈 내로 프로바이러스의 통합시에 당해 프로바이러스는 3' LTR을 복제하는 측면에서 5' LTR 또는 3' LTR 둘 다에 하나 이상의 절연체를 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 절연체는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 닭 β -글로빈 절연체[참조: Chung *et al.*, 1993. *Cell* 74:505; Chung *et al.*, 1997. *PNAS* 94:575; and Bell *et al.*, 1999. *Cell* 98:387; 본원에서 참조로 인용됨]를 포함한다. 절연체 요소의 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 닭 HS4와 같은 β -글로빈 유전자좌로부터의 절연체를 포함한다.

[0259] 본 발명의 특정한 구체적 실시형태에 따르면, 바이러스 벡터 골격 서열의 대부분 또는 전부는 렌티바이러스, 예를 들면, HIV-1로부터 유래된다. 그러나, 레트로바이러스 및/또는 렌티바이러스 서열의 다수의 상이한 공급원이 사용될 수 있거나, 특정한 렌티바이러스 서열 중에서 조합된 및 다수의 치환 및 변화가 본원에 기재된 기능을 수행하는 전이 벡터의 능력을 손상시키지 않고서 수용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 다양한 렌티바이러스 벡터는 당해 기술분야에서 공지되어 있다[참조: Naldini *et al.*, (1996a, 1996b, 및 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, 미국 특허 제6,013,516호; 및 5,994,136호; 이들 중 다수는 본 발명의 바이러스 벡터 또는 전이 플라스미드를 생산하기 위해 채용될 수 있다].

[0260] 다양한 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함한다. 벡터는 하나 이상의 LTR을 가질 수 있고, 여기서 LTR은 하나 이상의 변형, 예를 들면, 하

나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 도는 결실을 포함한다. 벡터는 형질도입 유효성(예: cPPT/PLAP), 바이러스 팩키징(예: Psi(Ψ)) 팩키징 시그널, RRE)를 증가시키기 위해 하나 이상의 보조 요소, 및/또는 치료 유전자 발현을 증가시키는 기타 요소(예: 폴리(A) 서열)를 추가로 포함할 수 있고, 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함할 수 있다.

- [0261] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 전이 벡터는 좌측(5') 레트로바이러스 LTR; 중앙 폴리퓨린 트랙/DNA 플랩 (cPPT/FLAP); 레트로바이러스 유출 요소; 본원에 의도되는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 우측(3') 레트로바이러스 LTR; 및 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함한다.
- [0262] 특정 실시형태에서, 본 발명의 전이 벡터는 좌측(5') 레트로바이러스 LTR; 레트로바이러스 유출 요소; 본원에서 의도되는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 우측(3') 레트로바이러스 LTR; 및 폴리(A) 서열; 및 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함한다. 또 다른 특정 실시형태에서, 본 발명은, 좌측(5') LTR; cPPT/FLAP; RRE; 본원에서 의도된 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 우측(3') LTR; 및 폴리아데닐화 서열; 및 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 제공한다.
- [0263] 특정 실시형태에서, 본 발명은, 좌측(5') HIV-1 LTR; Psi(Ψ) 팩키징 시그널; cPPT/FLAP; RRE; 본원에서 의도되는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 우측(3') 자가-불활성화 (SIN) HIV-1 LTR; 및 래빗 β -글로빈 폴리아데닐화 서열; 및 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 제공한다.
- [0264] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은, 적어도 하나의 LTR; 중앙 폴리퓨린 트랙/DNA 플랩(cPPT/FLAP); 레트로바이러스 유출 요소; 본원에서 의도되는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0265] 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 적어도 하나의 LTR; cPPT/FLAP; RRE; 본원에서 의도되는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 폴리아데닐화 서열; 및 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0266] 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 SIN HIV-1 LTR; Psi(Ψ) 팩키징 시그널; cPPT/FLAP; RRE; 본원에서 의도되는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 래빗 β -글로빈 폴리아데닐화 서열; 및 임의로 WPRE 또는 HPRE를 제공한다.
- [0267] 당해 기술분야의 숙련가는 다수의 기타 상이한 실시형태가 본원의 기존의 실시형태로부터 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.
- [0268] "숙주 세포"는 본 발명의 제조법 벡터 또는 폴리뉴클레오티드에 의해 생체내, 생체의 또는 시험관내에서 형질감염되거나 감염되거나 형질도입된 세포를 포함한다. 숙주 세포는 팩키징 세포, 생산자 세포, 및 바이러스 벡터로 감염된 세포를 포함할 수 있다. 특정한 실시형태에서, 본 발명의 바이러스 벡터로 감염된 숙주 세포는 치료가 필요한 대상체에게 투여된다. 특정한 실시형태에서, 용어 "표적 세포"는 숙주 세포와 상호 교대로 사용되고, 목적하는 세포 유형의 형질감염된, 감염된 또는 형질도입된 세포를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 표적 세포는 T 세포이다.
- [0269] 대규모 바이러스 입자 생성은 종종 합리적인 바이러스 역가를 달성하기 위해서 필요하다. 바이러스 입자는 전이 벡터를, 바이러스 구조 및/또는 보조 유전자, 예를 들면, gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx 또는 nef 유전자 또는 기타 레트로바이러스 유전자를 포함하는 팩키징 세포주 내로 형질감염시킴으로써 생산된다.
- [0270] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "팩키징 벡터"는, 팩키징 시그널을 결여하고 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 바이러스 구조 및/또는 보조 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 바이러스 벡터를 지칭한다. 전형적으로, 팩키징 벡터는 팩키징 세포 내에 포함되고, 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해 세포 내로 도입된다. 형질감염, 형질도입 또는 감염의 방법은 당해 기술분야의 기술자에게 공지되어 있다. 본 발명의 레트로바이러스/렌티바이러스 전이 벡터는 형질감염, 형질도입 또는 감염에 의해 팩키징 세포주 내로 도입되어 생산자 세포 또는 세포주를 생성시킬 수 있다. 본 발명의 팩키징 벡터는, 예를 들면, 칼슘 포스페이트 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공을 포함하는 표준 방법에 의해 인간 세포 또는 세포주 내로 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 팩키징 벡터는 네오마이신, 하이그로마이신, 퓨로마이신, 블라스토시딘, 제오신, 티미딘 키나제, DHFR, Gln 신세타제 또는 ADA와 같은 우성 선별가능한 마커와 함께 세포 내로 도입되고, 이어서 적절한 약물의 존재하에서의 선별 및 클론의 단리가 수행된다. 선별가능한 마커 유전자는 팩키징 벡터에 의해, 예를 들

면, IRES 또는 자가 절단성 바이러스 캡티드에 의해 코딩하는 유전자에 물리적으로 연결될 수 있다.

[0271] 바이러스 외피 단백질(env)은 세포주로부터 생성된 재조합 레트로바이러스에 의해 궁극적으로 감염 및 형질전환될 수 있는 숙주 세포의 범위를 결정한다. HIV-1, HIV-2, SIV, FIV 및 EIV와 같은 렌티바이러스의 경우에, env 단백질은 gp41 및 gp120을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 팩키징 세포에 의해 발현된 바이러스 env 단백질은 전술한 바와 같이 바이러스 gag 및 pol 유전자로부터 별개의 벡터 상에서 코딩된다.

[0272] 본 발명에서 사용될 수 있는 레트로바이러스-유래된 env 유전자의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, MLV 외피, 10A1 외피, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, 에볼라(Ebola), 센다이(Sendai), FPV(조류 독감(Fowl plague) 바이러스) 및 인플루엔자 바이러스 외피를 포함한다. 유사하게는, RNA 바이러스[예를 들면, 피코르나비리다에(Picornaviridae), 칼시비리다에(Calciviridae), 아스트로비리다에(Astroviridae), 토가비리다에(Togaviridae), 플라비비리다에(Flaviviridae), 코로나비리다에(Coronaviridae), 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae), 라브도비리다에(Rhabdoviridae), 필로비리다에(Filoviridae), 오르토믹소비리다에(Orthomyxoviridae), 분야비리다에(Bunyaviridae), 아레나비리다에(Arenaviridae), 레오비리다에(Reoviridae), 버나비리다에(Birnaviridae), 레트로비리다에(Retroviridae)의 RNA 바이러스 계열]로부터 뿐만 아니라 DNA 바이러스[헤파드나비리다에(Hepadnaviridae), 서코비리다에(Circoviridae), 파르보비리다에(Parvoviridae), 파포바비리다에(Papovaviridae), 아데노비리다에(Adenoviridae), 헤르페스비리다에(Herpesviridae), 포시이리다에(Poxyiridae) 및 이리도비리다에(Iridoviridae) 과]로부터의 외피를 코딩하는 유전자가 사용될 수 있다. 대표적인 예는 FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, 래비스(Rabies), ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 및 EIAV를 포함한다.

[0273] 다른 실시형태에서, 본 발명의 바이러스를 슈도타이핑(pseudotyping)하기 위한 외피 단백질은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 다음의 바이러스들을 포함한다: H1N1, H1N2, H3N2 및 H5N1(조류 독감)과 같은 인플루엔자 A, 인플루엔자 B, 인플루엔자 C 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 로타바이러스, 노르워크(Norwalk) 바이러스 그룹의 임의의 바이러스, 장 아데노바이러스(adenoviruses), 파르보바이러스(parvovirus), 뎅기열(Dengue fever) 바이러스, 원숭이 두창(Monkey pox), 모노네가비랄레스(Mononegavirales), 광견병 바이러스, 라고스 배트(Lagos bat) 바이러스, 모콜라(Mokola) 바이러스, 두벤하제(Duvenhage) 바이러스, 유로피안 배트(European bat) 바이러스 1 및 2 및 오스트랄리안 배트(Australian bat) 바이러스와 같은 리사바이러스(Lyssavirus), 에페메로바이러스(Ephemerovirus), 베시쿨로바이러스(Vesiculovirus), 수포성 구내염(Vesicular Stomatitis) 바이러스(VSV), 단순 포진 바이러스 유형 1 및 2, 수두 대상포진(varicella zoster), 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바르(Epstein-Bar) 바이러스(EBV), 인간 헤르페스바이러스(HHV), 인간 헤르페스바이러스 유형 6 및 8, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 파필로마 바이러스(papilloma virus), 쥐 감마헤르페스바이러스와 같은 헤르페스바이러스, 아레나바이러스(Arenaviruses), 예를 들면, 아르헨티나 출혈열(Argentine hemorrhagic fever) 바이러스, 볼리비아 출혈열 바이러스, 사비아(Sabia)-연관된 출혈열 바이러스, 베네주엘라 출혈열 바이러스, 라사열(Lassa fever) 바이러스, 마추포(Machupo) 바이러스, 림프구성 맥락수막염(Lymphocytic choriomeningitis) 바이러스(LCMV), 분야비리다에, 예를 들면, 크리미언-콩고(Crimean-Congo) 출혈열 바이러스, 한타바이러스(Hantavirus), 신장 증후군 야기 바이러스에 의한 출혈열, 리프트 밸리열(Rift Valley fever) 바이러스, 에볼라 출혈열 및 마르버그(Marburg) 출혈열을 포함하는 필로비리다에(필로바이러스), 케이사누르 산림병(Kaysanur Forest disease) 바이러스를 포함하는 플라비비리다에, 옴스크(Omsk) 출혈열 바이러스, 진드기-매개 뇌염 야기 바이러스 및 파라믹소비리다에, 예를 들면, 헨드라(Hendra) 바이러스 및 니파(Nipah) 바이러스, 바리올라 메이저(variola major) 및 바리올라 마이너(variola minor)(천연두), 알파바이러스, 예를 들면, 베네주엘라 말 뇌염 바이러스, 동부형 말 뇌염(eastern equine encephalitis) 바이러스, 서부형(western) 말 뇌염 바이러스, SARS-연관된 코로나바이러스(SARS-CoV), 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 임의의 뇌염-야기 바이러스.

[0274] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 VSV-G 당단백질로 슈도타입화된 재조합 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스를 생성하는 팩키징 세포를 제공한다.

[0275] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "슈도타입" 또는 "슈도타이핑"은 이의 바이러스 외피 단백질이 바람직한 특성을 갖는 다른 바이러스의 것으로 치환된 바이러스를 지칭한다. 예를 들면, HIV 외피 단백질(env 유전자에 의해 코딩됨)은 통상적으로 바이러스를 CD4+ 제시 세포에 대해서 표적화하기 때문에, HIV는 HIV가 더 넓은 범위의 세포를 감염시키도록 하는 소포성 구내염 바이러스 G-단백질(VSV-G) 외피 단백질로 슈도타입화될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 렌티바이러스 외피 단백질은 VSV-G에 의해 슈도타입화된다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 VSV-G 외피 당단백질로 슈도타입화된 재조합 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스를 생성하

는 팩키징 세포를 제공한다.

[0276] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "팩키징 세포주"는 팩키징 시그널을 함유하지 않지만, 바이러스 입자의 정확한 팩키징에 필요한 바이러스 구조 단백질 및 복제 효소(예를 들면, gag, pol 및 env)를 안정적으로 또는 일시적으로 발현하는 세포주와 관련하여 사용된다. 임의의 적합한 세포주는 본 발명의 팩키징 세포를 제조하기 위해서 사용될 수 있다. 일반적으로, 세포는 포유동물 세포이다. 특정한 실시형태에서, 팩키징 세포주를 생성하기 위해 사용된 세포는 인간 세포이다. 사용될 수 있는 적합한 세포주는, 예를 들면, CHO 세포, BHK 세포, MDCK 세포, C3H 10T1/2 세포, FLY 세포, Psi-2 세포, BOSC 23 세포, PA317 세포, WEHI 세포, COS 세포, BSC 1 세포, BSC 40 세포, BMT 10 세포, VERO 세포, W138 세포, MRC5 세포, A549 세포, HT1080 세포, 293 세포, 293T 세포, B-50 세포, 3T3 세포, NIH3T3 세포, HepG2 세포, Saos-2 세포, Huh7 세포, HeLa 세포, W163 세포, 211 세포 및 211A 세포를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 팩키징 세포는 293 세포, 293T 세포 또는 A549 세포이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 세포는 A549 세포이다.

[0277] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "생산자 세포주"는, 팩키징 세포주 및 팩키징 시그널을 포함하는 전이 벡터를 포함하는, 재조합 레트로바이러스 입자를 생성할 수 있는 세포주를 지칭한다. 감염성 바이러스 입자 및 바이러스 저장 용액의 생성은 통상적인 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 바이러스 저장 용액을 제조하는 방법은 당해 기술분야에서 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌[참조: Y. Soneoka *et al.*(1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633, 및 N. R. Landau *et al.*(1992) *J. Virol.* 66:5110-5113]에 예시되어 있다. 감염성 바이러스 입자는 통상적인 기술을 사용하여 팩키징 세포로부터 수집될 수 있다. 예를 들면, 감염성 입자는 당해 기술분야에서 공지된 바와 같이 세포 용해, 또는 세포 배양물의 상층액의 수집에 의해 수집될 수 있다. 임의로, 수집된 바이러스 입자는 필요에 따라 정제될 수 있다. 적합한 정제 기술은 당해 기술분야에서 기술자에게 공지되어 있다.

[0278] 형질감염이 아닌 바이러스 감염에 의해 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용한 유전자(들) 또는 기타 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 "형질도입"으로 지칭된다. 한 가지 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 감염 및 프로바이러스 통합을 통해 세포 내로 형질도입된다. 특정한 실시형태에서, 표적 세포(예: T 세포)는, 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해 세포에 전달된 유전자 또는 기타 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 경우, "형질도입"된다. 특정 실시형태에서, 형질도입된 세포는 이의 세포 게놈에 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터에 의해 전달된 하나 이상의 유전자 또는 기타 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0279] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 폴리펩티드를 발현하는 본 발명의 바이러스 벡터로 형질도입된 숙주 세포는 B-세포 악성종양을 치료하고/하거나 예방하기 위해 대상체에게 투여된다. 본 발명의 특정 실시형태에 따라 이용될 수 있는, 유전자 요법에서 바이러스 벡터의 사용에 관한 기타 방법은 문헌[참조: Kay, M. A.(1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M.(1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. *et al.*(1999) *Liver* 19:265-74; Oka, K. *et al.*(2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. and Liu, J. M.(2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S.(1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; Alt, M.(1995) *J. Hepatol.* 23:746-58; Brody, S. L. and Crystal, R. G.(1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S.(1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S.(2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49; and Lee, H. C. *et al.*(2000) *Nature* 408:483-8]에서 발견할 수 있다.

[0280]

[0281] **G. 유전적으로 변형된 세포**

[0282] 본 발명은, 특정 실시형태에서, 암의 치료에 사용하기 위해, 본원에서 의도된 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 의도한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전적으로 조작된" 또는 "유전적으로 변형된"은 세포에서 전체 유전자 재료로 DNA 또는 RNA의 형태로 외부 유전자 재료의 부가를 지칭한다. 용어 "유전적으로 변형된 세포", "변형된 세포" 및 "제지시된 세포"는 상호 교대로 사용된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 요법"은, 유전자의 발현을 회복, 교정 또는 변형시키는 세포 또는 치료학적 폴리펩티드, 예를 들면, CAR을 발현시킬 목적을 위한 세포에서 전체 유전자 재료로 DNA 또는 RNA의 형태로 외부 유전자 재료의 도입을 지칭한다.

[0283] 특정 실시형태에서, MND 프로모터를 포함하고 본원에서 의도된 CAR을 발현시키는 벡터는 이들의 특이성을 목적하는 표적 항원으로 재지시하도록 면역 작동 세포에 도입되고 발현된다. "면역 작동 세포"는 하나 이상의 작동 기능(예를 들면, 세포독성 세포 사멸 활성화, 사이토킨의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는 면역계의 임의의 세포이다.

- [0284] 본 발명의 면역 작동 세포는 자기/자가("자기") 또는 비-자기("비-자기", 예를 들면, 동종이계, 동계 또는 이종)일 수 있다.
- [0285] 본원에서 사용되는 "자기"는 동일한 대상체로부터의 세포를 지칭한다.
- [0286] 본원에서 사용되는 "동종"은 비교하는 세포와 유전적으로 상이한 동일한 종의 세포를 지칭한다.
- [0287] 본원에서 사용되는 "동계"는 비교하는 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 지칭한다.
- [0288] 본원에서 사용되는 "이종"은 비교하는 세포와 상이한 종의 세포를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 세포는 동종이계이다.
- [0289] 본원에서 고려되는 CAR을 포함하는 벡터로 사용된 예시적 면역 작동 세포는 T 림프구를 포함한다. 용어 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 당해 기술분야에서 인식되고, 흥선세포, 미성숙 T 림프구, 성숙 T 림프구, 휴지 T 림프구 또는 활성화 T 림프구를 포함하는 것으로 의도된다. T 세포는 T 헬퍼(Th) 세포, 예를 들면, T 헬퍼 1(Th1) 또는 T 헬퍼 2(Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 헬퍼 T 세포(HTL; $CD4^+$ T 세포) $CD4^+$ T 세포, 세포독성 T 세포(CTL; $CD8^+$ T 세포), $CD4^+CD8^+$ T 세포, $CD4^-CD8^-$ T 세포 또는 T 세포의 임의의 기타 조합일 수 있다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 T 세포의 기타 예시적 모집단은 천연 T 세포 및 기억 T 세포를 포함한다.
- [0290] 당해 기술분야의 숙련가에게 이해되는 바와 같이, MND 프로모터를 포함하고 CAR을 코딩하는 벡터는, 면역 작동 세포로서 또한 사용될 수 있는 다른 세포에 도입될 수 있다. 특히, 면역 작동 세포는 또한 NK 세포, NKT 세포, 호중구 및 마크로파지를 포함한다. 면역 작동 세포는 또한 작동 세포의 전구세포를 포함하고, 여기서 이러한 전구 세포는 생체내 또는 시험관내에서 면역 작동 세포로 분화하도록 유도될 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서, 면역 작동 세포는, 대상체에 투여시 성숙 면역 작동 세포로 분화하거나 성숙 면역 작동 세포로 분화하도록 시험관내에서 유도될 수 있는 제대혈, 골수 또는 동원 말초혈로부터 유래된 세포의 $CD34^+$ 모집단 내에 함유된 조혈 줄기 세포(HSC) 등의 면역 작동 세포의 전구세포를 포함한다.
- [0291] 본원에서 사용된 바와 같이, MND 프로모터를 포함하고 항원-특이적 CAR을 코딩하는 벡터를 함유하도록 유전적으로 조작된 면역 작동 세포는 "항원-특이적 재지시된 면역 작동 세포"로서 지칭될 수 있다.
- [0292] 본원에서 사용되는 용어 " $CD34^+$ 세포"는 이의 세포 표면 상에서 $CD34$ 단백질을 발현하는 세포를 지칭한다. 본원에서 사용되는 " $CD34$ "는, 종종 세포-세포 부착 인자로서 작용하고 림프절로 T 세포 도입에 관여하는 세포 표면 당단백질(예: 시알로뮤친 단백질을 지칭한다. $CD34^+$ 세포 모집단은 조혈 줄기 세포(HSC)를 함유하고, 이는 환자에게 투여시에 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 호중구 및 단핵구/마크로파지 계열의 세포를 포함하는 모든 조혈 계통으로 분화하고 기여한다.
- [0293] 본 발명은 본원에서 의도된 CAR을 발현하는 면역 작동 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 한 가지 실시형태에서, 상기 방법은 면역 작동 세포가 본원에 기재된 하나 이상의 CAR을 발현하도록 개체로부터 단리된 면역 작동 세포를 형질감염 또는 형질도입시키는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 면역 작동 세포는 개체로부터 단리되고, 시험관내에서 추가의 조작 없이 유전적으로 변형된다. 이어서, 이러한 세포를 개체로 직접 재-투여할 수 있다. 추가의 실시형태에서, 면역 작동 세포를 먼저 활성화시키고 자극시켜 시험관내에서 증식시킨 다음, CAR을 발현하도록 유전적으로 변형시킨다. 이와 관련하여, 면역 작동 세포는 유전적으로 변형되기 전 및/또는 후(즉, 본원에서 의도된 CAR을 발현하도록 형질도입 또는 형질감염됨)에 배양할 수 있다.
- [0294] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 면역 작동 세포의 시험관내 조작 또는 유전자 변형 전에, 세포 공급원은 대상체로부터 수득된다. 특정 실시형태에서, CAR-변형된 면역 작동 세포는 T 세포를 포함한다. T 세포는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흥선 조직, 감염 부위로부터 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 수득할 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 침강, 예를 들면, FICOLL™ 분리 등의 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 임의의 다수의 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 수득할 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 분리반출법(apheresis)에 의해 수득된다. 분리반출법 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 핵화 백혈구 세포, 적혈구 세포 및 혈소판을 포함하는 림프구를 함유한다. 한 가지 실시형태에서, 분리반출법에 의해 수집된 세포는 세척하여 혈장 분획을 제거하고 후속 처리를 위해 적절한 완충제 또는 매질에 세포를 위치시킬 수 있다. 세포는 PBS, 또는 칼슘, 마그네슘 및 대부분(그러나 전부는 아님) 이가 양이온을 결

여하는 또 다른 적합한 용액으로 세척할 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 세척 단계는 당해 기술분야에 공지된 방법, 예를 들면, 반자동 유동 원심분리를 사용하여 달성할 수 있다(예를 들면, 코베(Cobe) 2991 세포 프로세서, 박스터 사이토메이트(Baxter CytoMate) 등). 세척 후, 세포는 다양한 생체적 합성 완충제, 또는 완충제의 존재 또는 부재하에 기타 식염수 용액에 재현탁시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 분리반출 샘플의 바람직하지 않은 성분은 배양 배지에 직접 재현탁된 세포에서 제거될 수 있다.

- [0295] 특정 실시형태에서, T 세포는 적혈구 세포를 용해시키고 단핵구를, 예를 들면, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 고갈시킴으로써 말초혈 단핵구(PBMC)로부터 단리한다. 하나 이상의 하기 마커: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA 및 CD45RO를 발현하는 T 세포의 특정 아집단은 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 추가로 단리할 수 있다. 한 가지 실시형태에서, CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA 및 CD45RO를 발현하는 T 세포의 특성의 아집단은 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 추가로 단리된다. 예를 들면, 음성 선별에 의한 T 세포 모집단의 농후화는 음으로 선별된 세포에 특유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합으로 달성할 수 있다. 본원에서 사용하기 위한 한 가지 방법은, 음으로 선별된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 모노클로날 항체의 각 테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유동 세포계수를 통한 세포 분류 및/또는 선별이다. 예를 들면, 음성 선별에 의한 CD4⁺ 세포를 농후화시키기 위해, 모노클로날 항체 각테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 유동 세포계수 및 세포 분류는 또한 본 발명에서 사용하기 위한 목적하는 세포 모집단을 단리하기 위해 사용될 수 있다.
- [0296] PBMC는, 본원에서 고려된 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 직접 유전적으로 변형될 수 있다. 특정 실시형태에서, PBMC의 단리 후, T 림프구는 추가로 단리되고, 특정 실시형태에서, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구는 유전자 변형 및/또는 확장 전 또는 후에 천연, 기억 및 작동 T 세포 아집단으로 분류될 수 있다.
- [0297] CD8⁺ 세포는 표준 방법을 사용하여 수득할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD8⁺ 세포는, 이들 유형의 CD8⁺ 세포 각각과 연관되는 세포 표면 항원을 동정함으로써 천연, 중앙 기억 및 작동 세포로 추가로 분류된다.
- [0298] 특정 실시형태에서, 천연 CD8⁺ T 림프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및 CD45RA를 포함하는 천연 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 한다.
- [0299] 특정 실시형태에서, 기억 T 세포는 CD8⁺ 말초혈 림프구의 CD62L⁺ 및 CD62L⁻ 서브세트 둘 다에 존재한다. PBMC는 항-CD8 및 항-CD62L 항체로 염색시킨 후에 CD62L⁻CD8⁺ 및 CD62L⁺CD8⁺ 분획으로 분류된다. 일부 실시형태에서, 중앙 기억 T 세포의 표현형 마커의 발현은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및 CD127을 포함하고, 그랜자임 B에 대해 음성이다. 일부 실시형태에서, 중앙 기억 T 세포는 CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺ T 세포이다.
- [0300] 일부 실시형태에서, 작동 T 세포는 CD62L, CCR7, CD28 및 CD127에 대해 음성이고, 그랜자임 B 및 퍼포린에 대해 양성이다.
- [0301] 특정 실시형태에서, CD4⁺ T 세포는 아집단으로 추가로 분류된다. 예를 들면, CD4⁺ T 헬퍼 세포는 표면 세포 표면 항원을 갖는 세포 모집단을 동정함으로써 천연, 중앙 기억 및 작동 세포로 분류될 수 있다. CD4⁺ 림프구는 표준 방법에 의해 수득할 수 있다. 일부 실시형태에서, 천연 CD4⁺ T 림프구는 CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ CD4⁺ T 세포이다. 일부 실시형태에서, 중앙 기억 CD4⁺ 세포는 CD62L 양성이고 CD45RO 양성이다. 일부 실시형태에서, 작동 CD4⁺ 세포는 CD62L 및 CD45RO 음성이다.
- [0302] T 세포 등의 면역 작동 세포는 공지된 방법을 사용한 단리 후에 유전적으로 변형될 수 있거나, 면역 작동 세포는 유전적으로 변형되기 전에 시험관내에서 활성화 및 확장될 수 있다(또는 전구세포의 경우에 분화됨). 특정 실시형태에서, T 세포 등의 면역 작동 세포는 본원에서 고려되는 키메라 항원 수용체로 유전적으로 변형되고(예를 들면, MND 프로모터를 포함하는 바이러스 벡터 및 CAR을 코딩하는 핵산으로 형질도입됨), 이어서 시험관내에서 활성화 및 확장된다. 다양한 실시형태에서, T 세포는, 예를 들면, 문헌[참조: 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 특허출원공보 제20060121005호]에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여

CAR을 발현하도록 유전자 변형 전 또는 후에 활성화 및 확장될 수 있다.

- [0303] 일반적으로, T 세포는, CD3 TCR 복합체 연관된 시그널을 자극하는 제제 및 T 세포의 표면 상에서 공-자극 분자를 자극하는 리간드가 부착되는 표면과 접촉시킴으로써 확장된다. T 세포 모집단은 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 표면 상에 고정된 항-CD2 항체와의 접촉, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화인자(예: 브리오스타틴)과의 접촉에 의해 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자의 공-자극도 또한 의도된다.
- [0304] 특정 실시형태에서, PBMC 또는 단리된 T 세포는, 예를 들면, IL-2, IL-7 및 IL-15 등의 적절한 사이토킨을 갖는 배양 배지에서, 일반적으로 비드 또는 기타 표면에 부착된, 항-CD3 및 항-CD28 항체 등의 자극제 및 공자극제와 접촉된다. CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 사용된다. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28(Diacione, Besancon, France)를 포함하고, 당해 기술분야에 통상적으로 공지된 다른 방법을 사용할 수 있다[참조: Berg *et al.*, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garland *et al.*, J. Immunol Meth. 227(1 -2):53-63, 1999]. 동일한 비드에 부착된 항-CD3 및 항-CD28 항체는 "대리 (surrogate)" 항원 제시 세포(APC)로서 작용한다. 다른 실시형태에서, T 세포는 문헌[참조: US6040177; US5827642; 및 W02012129514]에 기재된 것들과 같은 방법을 사용하여 피더 (feeder) 세포 및 적절한 항체 및 사이토킨을 증식시키기 위해 활성화 및 자극시킬 수 있다.
- [0305] 다른 실시형태에서, 인공 APC(aAPC)는 다양한 공-자극 분자 및 사이토킨의 안정적인 발현 및 분비를 지시하기 위해 K562, U937, 721.221, T2 및 C1R 세포를 유전자 조작함으로써 제조된다. 특정 실시형태에서, K32 또는 U32 aAPC는 APC 세포 표면 상에 하나 이상의 항체-기반 자극 분자의 표시를 지시하기 위해 사용된다. aAPC 상에 유전자의 다양한 조합의 발현은, aAPC가 특성의 성장 요건 및 상이한 기능을 갖는 T-세포 서브세트의 최적 증식을 위해 조정될 수 있도록, 인간 T-세포 활성화 요건의 정확한 결정을 가능하게 한다. aAPC는, 천연 APC의 사용과 대조적으로, 외인성 사이토킨의 부가를 필요로 하지 않고서, 기능적 인간 CD8 T 세포의 생체의 성장 및 장기간 확장을 지지한다. T 세포의 모집단은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD137L(4-1BBL), CD134L(OX40L) 및/또는 CD80 또는 CD86을 포함하는 다양한 공자극 분자를 발현하는 aAPC에 의해 확장될 수 있다. 마지막으로, aAPC는, 변형된 T 세포를 유전적으로 확장시키고 CD8 T 세포 상에 CD28 발현을 유지하기 위한 충분한 플랫폼을 제공한다. WO 03/057171 및 US 2003/0147869에 제공된 aAPC는 이들의 전체가 본원에서 참조로서 도입된다.
- [0306] 한 가지 실시형태에서, CD34⁺ 세포는 본 발명에 따라 핵산 작제물로 형질도입된다. 특정한 실시형태에서, 형질도입된 CD34⁺ 세포는 대상체, 일반적으로 세포가 최초로 단리되는 대상체에 투여 후에 생체내에서 성숙 면역 작동 세포로 분화한다. 또 다른 실시형태에서, CD34⁺ 세포는, 본원에 기재된 바와 같은 CAR에 노출되기 전에 또는 CAR로 유전적으로 변형된 후에, 하나 이상의 하기 사이토킨: Flt-3 리간드(FLT3), 줄기 세포 인자(SCF), 거핵구 성장 분화 인자(TPO), IL-3 및 IL-6로 문헌[참조: Asheuer *et al.*, 2004; Imren, *et al.*, 2004]에 이미 기재된 방법에 따라 시험관내에서 자극시킬 수 있다.
- [0307] 본 발명은 암의 치료를 위한 변형된 면역 작동 세포의 모집단을 제공하고, 상기 변형된 면역 작동 세포는 본원에 개시된 CAR을 포함한다. 예를 들면, 변형된 면역 작동 세포의 모집단은 본원에 기재된 B 세포 악성종양으로 진단된 환자(자가 공여체)로부터 수득된 말초혈 단핵구 세포(PBMC)로부터 제조된다. PBMC는 CD4⁺, CD8⁺ 또는 CD4⁺ 및 CD8⁺일 수 있는 T 림프구의 이중성 모집단을 형성한다.
- [0308] PBMC는 또한 NK 세포 또는 NKT 세포 등의 기타 세포독성 림프구를 포함할 수 있다. 프로모터(예: MND 프로모터) 및 본원에서 의도된 CAR의 코딩 서열을 포함하는 발현 벡터는 인간 공여체 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포의 모집단에 도입될 수 있다. 발현 벡터를 포함하는 성공적으로 형질도입된 T 세포는 CD3 양성 T 세포를 단리하기 위해 유동 세포계수를 사용하여 분류할 수 있고, 이어서 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체 및 IL-2 또는 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같은 당해 기술분야에 공지된 임의의 기타 방법을 사용하는 세포 활성화 이외에 T 세포를 발현하는 이들 CAR 단백질의 수를 증가시키기 위해 증식시킨다. 표준 공정은 인간 대상체에서 사용하는 저장 및/또는 제조를 위해 CAR 단백질 T 세포를 발현하는 T 세포의 동결보존에 사용된다. 한 가지 실시형태에서, T 세포의 시험관내 형질도입, 배양 및/또는 확장은 태아 송아지 혈청 및 태소 혈청 등의 비-인간 동물 유래 생성물의 부재하에 수행된다. PBMC의 이중성 모집단이 유전적으로 변형되기 때문에, 수득되는 형질도입된 세포는 본원에서 의도된 항원-특이적 표적화 CAR을 포함하는 변형된 세포의 이중성 모집단이다.
- [0309] 추가의 실시형태에서, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 상이한 발현 벡터의 혼합물이 면역 작동 세포

의 공여체 모집단을 유전적으로 변형시키는데 사용될 수 있고, 여기서 각각의 벡터는 본원에서 의도된 상이한 키메라 항원 수용체 단백질을 코딩한다. 수득되는 변형된 면역 작동 세포는 변형된 세포의 혼합된 모집단을 형성하고, 변형된 세포의 모집단은 하나 이상의 상이한 CAR 단백질을 발현한다.

[0310] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은, 세포가 해동시 생존 상태로 존재하도록 면역 작동 세포를 동결보존하는 것을 포함하는, 면역 작동 세포를 발현하는 유전자 변형된 무인, 인간 또는 인간화 CAR 단백질을 저장하는 방법을 제공한다. CAR 단백질을 발현하는 면역 작동 세포의 분획은 암이 발병된 환자의 장래의 치료를 위한 이러한 세포의 영구적 공급원을 제공하기 위해 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해 동결보존될 수 있다. 필요한 경우, 동결보존된 형질전환된 면역 작동 세포는 보다 많은 이러한 세포를 위해 해동, 성장 및 확장시킬 수 있다.

[0311] 본원에서 사용된 바와 같이, "동결보존"은 (전형적으로) 77K 또는 -196°C(액체 질소의 비점) 등과 같이 빙점으로 냉각시킴으로써 세포의 보존을 지칭한다. 동결보존제는 저온에서의 동결 또는 실온에서의 가온에 기인하여 세포가 손상으로부터 보존되는 것을 방지하기 위해 빙점에서 사용된다. 동결보존제 및 최적 냉각 속도는 세포 손상을 보호할 수 있다. 사용될 수 있는 동결보존제는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 디메틸 설펜사이드(DMSO)[참조: Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205], 글리세롤, 폴리비닐피롤리딘[참조: Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576] 및 폴리에틸렌 글리콜[참조: Slovirer and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48]을 포함한다. 바람직한 냉각 속도는 1°C 내지 3°C/1분이다. 적어도 2시간 후, T 세포는 -80°C의 온도에 도달하고, 장기간 극저온 저장 용기와 같은 영구 보존을 위해 액체 질소(-196°C)에 직접 배치할 수 있다.

[0312] **H. 조성물 및 제형**

[0313] 본원에서 의도된 조성물은, 본원에서 고려된 바와 같이, 하나 이상의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 벡터, 유전적으로 변형된 면역 작동 세포 등을 포함할 수 있다. 조성물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 약제학적 조성물을 포함한다. "약제학적 조성물"은, 단독으로 또는 하나 이상의 기타 양식의 요법과 조합하여, 세포 또는 동물에게 투여하기 위한 약제학적으로 허용되는 또는 생리학적으로 허용되는 용액에서 제형화된 조성물을 지칭한다. 또한, 필요한 경우, 본 발명의 조성물은 다른 제제, 예를 들면, 사이토킨, 성장 인자, 호르몬, 소분자, 화학요법제, 프로-드러그, 약물 향체 또는 기타 다양한 약제학적 활성제와 조합하여 투여할 수 있는 것으로 이해된다. 조성물에 또한 포함될 수 있는 다른 성분에는 실질적으로 제한이 없지만, 단 추가의 제제는 의도된 요법을 전달하는 조성물의 능력에 역으로 영향을 미치지 않아야 한다.

[0314] 문구 "약제학적으로 허용되는"은, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비에 비례하여, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 용량형을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0315] 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"는, 제한 없이, 인간 또는 가축 동물에서 사용하기 위해 허용되는 것으로 미국 식품의약청에 의해 승인된 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활주제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향미 증강제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장성제, 용매, 계면활성제 또는 유화제를 포함한다. 예시적 약제학적으로 허용되는 담체는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 당(예: 락토스, 글루코즈 및 슈크로즈); 전분(예: 옥수수 전분 및 감자 전분); 셀룰로즈 및 이의 유도체(예: 나트륨 카복실메틸 셀룰로즈, 에틸 셀룰로즈 및 셀룰로즈 아세테이트); 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터, 왁스, 동물 및 식물 지방, 파라핀, 실리콘, 벤토나이트, 실리산, 산화아연; 오일(예: 땅콩유, 면실유, 해바라기유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유); 글리콜(예: 프로필렌 글리콜); 폴리에틸렌 글리콜(예: 폴리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜); 에스테르(예: 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트); 아가; 완충제(예: 수산화망간 및 수산화알루미늄); 알긴산; 피로젠-비함유 물; 등장성 식염수; 링거액; 에틸 알콜; 인산염 완충 용액; 및 약제학적 제형에 사용된 임의의 기타 호환성 물질을 포함한다.

[0316] 특정 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 본원에서 의도된 유전적으로 변형된 면역 작동 세포의 양을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "양"은 임상 결과를 포함하여 유리한 또는 목적하는 예방적 또는 치료적 결과를 달성하기 위한 유전적으로 변형된 세포(예: T 세포)의 "효과적 양" 또는 "유효량"을 지칭한다.

[0317] "예방적 유효량"은 목적하는 예방적 결과를 달성하기에 효과적인 유전적으로 변형된 치료 세포의 양을 지칭한다. 전형적으로, 그러나 반드시 필요한 것은 아니지만, 예방적 용량은 질환의 초기 단계 전에 또는 초기 단계에 대상체에서 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적다.

[0318] 유전적으로 변형된 치료 세포의 "치료학적 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적

하는 반응을 유발하는 줄기 및 전구 세포의 능력 등의 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 또한 바이러스 또는 형질도입된 치료 세포의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료학적으로 유리한 효과가 상회하는 것이다. 용어 "치료학적 유효량"은 대상체(예: 환자)를 "치료"하는데 효과적인 양을 포함한다. 치료적 유효량이 지시되는 경우, 투여되는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자(대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 대사 정도 및 상태를 고려하여 주치의에 의해 결정될 수 있다. 이는 일반적으로 본원에 기재된 T 세포를 포함하는 약제학적 조성물이, 이들 범위 내의 모든 정수를 포함하여, 10^2 내지 10^{10} 세포/체중 kg, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 세포/체중 kg의 용량으로 투여될 수 있음을 말한다. 세포의 수는, 그 안에 포함된 세포 유형과 같이 조성물이 의도되는 궁극적 용도에 의존할 것이다. 본원에 제공된 용도를 위해, 세포는 일반적으로 1리터 이하의 용적으로 존재하고, 500mL 이하, 심지어 250mL 또는 100mL 이하일 것이다. 따라서, 목적하는 세포의 밀도는 전형적으로 10^6 세포/ml 초과이고, 일반적으로 10^7 세포/ml 초과, 일반적으로 10^8 세포/ml 이상이다. 면역 세포의 임상적으로 관련되는 수는 점증적으로 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} 또는 10^{12} 세포와 동등하거나 이를 초과하는 다중 주입으로 배분될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 특히 모든 주입된 세포는 특정 표적 항원(예: κ 또는 λ 경쇄)로 재시도되기 때문에, 10^6 /킬로그램(환자당 10^6 - 10^{11}) 범위의 보다 적은 수의 세포가 투여될 수 있다. CAR 발현 세포 조성물은 이들 범위 내의 용량의 복수회 투여할 수 있다. 세포는 치료를 받는 환자에 대해 동종이계, 동계, 이종 또는 자가일 수 있다. 필요한 경우, 치료는 또한 면역 반응의 유도를 증강시키기 위해 본원에 기재된 바와 같이 미토겐(예: PHA) 또는 림포카인, 사이토킨 및/또는 케모킨(예: IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-알파, IL-18 및 TNF-베타, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α 등)의 투여를 포함할 수 있다.

[0319] 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이 활성화 및 확장된 세포를 포함하는 조성물은 면역절충되는 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 사용할 수 있다. 특히, 본원에서 의도된 CAR-변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 암의 치료에 사용된다. 본 발명의 CAR-매개된 T 세포는 단독으로, 또는 담체 희석제, 부형제 및/또는 IL-2 또는 기타 사이토킨 또는 세포 모집단 등의 다른 성분과 조합하여 투여할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 유전적으로 변형된 T 세포의 양을 포함한다.

[0320] T 세포 등의 CAR-발현 면역 작동 세포 모집단을 포함하는 본 발명의 약제학적 조성물은 완충제(예: 중성 완충된 식염수, 인산염 완충된 식염수 등); 탄수화물(예: 글루코즈, 만노즈, 슈크로즈 또는 텍스트란, 만니톨); 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산(예: 글리신); 항산화제; 킬레이트제(예: EDTA 또는 글루타티온); 보조제(예: 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 비경구 투여, 예를 들면, 혈관내(정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여를 위해 제형화된다.

[0321] 액체 약제학적 조성물은, 이들이 용액, 현탁액 또는 기타 유사 형태이든지, 하나 이상의 하기 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제(예: 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리학 적 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 고정유, 예를 들면, 용매 또는 현탁 매질로서 사용될 수 있는 합성 모노 또는 디글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매); 항균제(예: 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤); 항산화제(예: 아스코르브산 또는 아황산나트륨); 킬레이트제(예: 에틸렌디아민테트라아세트산); 완충제(예: 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트) 및 등장성 조절제(예: 염화나트륨 또는 텍스트로즈). 비경구 제제는 앰플, 휴대가능한 시린지, 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다중 용기 바이알에 봉입될 수 있다. 주사가 가능한 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균성이다.

[0322] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 치료제와 조합하여 유효량의 CAR-발현 면역 작동 세포를 포함한다. 따라서, CAR-발현 면역 작동 세포 조성물은 단독으로 또는 기타 공지된 암 치료제, 예를 들면, 방사선 요법, 화학요법, 이식, 면역요법, 호르몬 요법, 광선역학 요법 등과 조합하여 투여할 수 있다. 조성물은 또한 항생물질과 조합하여 투여할 수 있다. 이러한 치료제는 특정 암 등의 본원에 기재된 특정 질환 상태에 대한 표준 치료로서 당해 기술분야에서 허용될 수 있다. 의도되는 예시적 치료제는 사이토킨, 성장 인자, 스테로이드, NSAID, DMARD, 항-염증제, 화학요법, 방사선요법, 치료학적 항체 또는 기타 활성화제 및 보조제를 포함한다.

[0323] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 CAR-발현 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은 임의의 수의 화학요법제와 조합하여 투여할 수 있다. 화학요법제의 예시적 예는 알킬화제(예: 티오펜과 및 사이클로포스파미드(CYTOXAN™)); 알킬 설포네이트(예: 부셀판, 임프로셀판 및 피포셀판); 아지리딘(예: 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레

도파); 알트레타민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포오르아미드 및 트리메틸올멜라민 레습; 질소 머스타드(예: 클로람부틸, 클로르나프진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 벨팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프로드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드); 니트로소우레아(예: 카부스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴); 항생물질(예: 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 카르티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 켈로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로돌라마이신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 조니스타틴, 조루비신); 항-대사물질(예: 메토티렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체(예: 테노프테린, 메토티렉세이트, 프레토포테린, 트리메트렉세이트); 퓨린 유사체(예: 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌); 피리미딘 유사체(예: 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘, 5-FU); 안드로겐(예: 칼루스테론, 드로모스타솔론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄, 테스톨락톤); 항-아드레날린(예: 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄); 엽산 보충제(예: 프롤린산); 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코사이드; 아미노레불린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트라세이트; 데포프아민; 데메콜린; 디아지쿠온; 엘포르미딘; 엘리트니움 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 레티난; 로니다민; 미토구아존; 미토크산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK®; 라죽산; 시조피란; 스피로게르마니움; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리 에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드(예: 파클리탁셀(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀(TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France)); 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 백금 유사체(예: 시스플라틴 및 카보플라틴); 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미토크산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로미틴(DMFO); 레티산 유도체(예: Targretin™(백사로텐), Panretin™(알리트레티노인); ONTAK™(데니류킨 디프티톡스); 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 임의의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한, 이 정의에는 종양에 대해 호르몬 작용을 조절하거나 억제하도록 작용하는 항-호르몬제(예: 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(Fareston)); 항-안드로겐제(예: 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린); 및 상기 임의의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0324] 다양한 기타 치료제가 본원에 기재된 조성물과 조합하여 사용될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, CAR-발현 면역 작용 세포를 포함하는 조성물은 항-염증제와 함께 투여된다. 항-염증제 또는 약물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 스테로이드 및 글루코코르티코이드(베타메타손, 부테소나이드, 텍사메타손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손, 메틸프로드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트리아시놀론 포함), 아스피린, 이부프로펜, 나프록센, 메토티렉세이트, 설파살라진, 레플루노미드, 항-TNF 의약, 사이클로포스파미드 및 마이코페놀레이트를 포함하는 비스테로이드 항-염증 약물(NSAIDs)을 포함한다.

[0325] 기타 예시적 NSAID는 이부프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, Cos-2 억제제(예: VIOXX®(로페콕시브) 및 CELEBREX®(셀레콕시브)) 및 시알릴레이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 진통제는 아세트아미노펜, 옥시코돈, 프로포르지펜 하이드로클로라이드의 트라마돌로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 글루코코르티코이드는 코르티손, 텍사메타손, 하이드로코르티손, 메틸프로드니솔론, 프로드니솔론 또는 프레드니손으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 생물학적 반응 변형제는 세포 표면 마커에 대해 지시된 분자(예: CD4, CD5 등), 사이토킨 억제제, 예를 들면, TNF 길항제(예: 에타네르셉트(ENBREL®), 아달리누맙(HUMIRA®) 및 인플릭시맙(REMICADE®)), 케모킨 억제제 및 부착 분자 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 생물학적 반응 변형제는 제조 형태 분자 뿐만 아니라 모노클로날 항체를 포함한다. 예시적 DMARD는 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 사이클로스포린, 메토티렉세이트, 페니실라민, 레플루노미드, 설파살라진, 하이드록시클로로퀸, 골드(경구(오라노핀) 및 근육내) 및 미노사이클린을 포함한다.

[0326] 본원에서 의도된 CAR 변형된 T 세포와 조합하기에 적합한 치료학적 항체의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 아바코보맙, 아데카투무맙, 아푸투주맙, 알렘투주맙, 알투모맙, 아마톡시맙, 아나투모맙, 아르시투모

맵, 바비톡시맵, 베크투모맵, 베바시주맵, 비바투주맵, 블리나투모맵, 브렌톡시맵, 칸투주맵, 카투막소맵, 세톡시맵, 시타투주맵, 식수투무맵, 클리바투주맵, 코나투무맵, 다라투무맵, 드로지투맵, 돌리고투맵, 두시지투맵, 테투모맵, 다세투주맵, 달로투주맵, 에크로백시맵, 엘로투주맵, 엔시톡시맵, 에르투막소맵, 에타라시주맵, 파리에투주맵, 필클라투주맵, 피지투무맵, 플란보투맵, 푸톡시맵, 가니투맵, 겐투주맵, 기렌톡시맵, 글렘바투무맵, 이브리투모맵, 이고보맵, 임가투주맵, 인다톡시맵, 이노투주맵, 인테투무맵, 이필리무맵, 이라투무맵, 라베투주맵, 렉사투무맵, 린투주맵, 로르보투주맵, 루카투무맵, 마파투무맵, 마투주맵, 밀라투주맵, 민레투모맵, 미투모맵, 목세투모맵, 나르나투맵, 나프투모맵, 네시투모맵, 니모투주맵, 노페투모맵, 오카라투주맵, 오파투무맵, 올라라투맵, 오나르투주맵, 오포르투주맵, 오레고보맵, 파니투무맵, 파르사투주맵, 파트리투맵, 팜투모맵, 퍼투주맵, 핀투모맵, 프리투무맵, 라코투모맵, 라드레투맵, 릴로투무맵, 리톡시맵, 로바투무맵, 사투모맵, 시브로투주맵, 실톡시맵, 심투주맵, 솔리토맵, 타카투주맵, 타폴리투모맵, 테나투모맵, 테프로투무맵, 티가투주맵, 토시투모맵, 트라스투주맵, 투코투주맵, 우빌리톡시맵, 벨투주맵, 보르세투주맵, 보투무맵, 잘루투무맵, CC49 및 3F8을 포함한다.

[0327] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물은 사이토킨과 조합하여 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같이 "사이토킨"이란 세포내 매개인자로서 또 다른 세포에 작용하는 한 세포 모집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반 용어를 의미한다. 이러한 사이토킨의 예는 림포카인, 모노카인 및 종래의 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토킨 중에서는 성장 호르몬(예: 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬); 파라티로이드 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렉락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬(예: 난포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체형성 호르몬(LH)); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 중앙 피사 인자-알파 및 -베타; 밀러관-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-연관 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자(예: NGF-베타); 혈소판-성장 인자; 혈절전환 성장 인자(TGF)(예: TGF-알파 및 TGF-베타); 인슐린-양 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도성 인자; 인터페론(예: 인터페론-알파, 베타 및 -감마); 콜로니 자극 인자(CSF)(예: 마크로파지-CSF(M-CSF)); 파립구-마크로파지-CSF(GM-CSF); 및 파립구-CSF(G-CSF); 인터류킨(IL)(예: IL-1, IL-1알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15); 중앙 피사 인자(예: TNF-알파 또는 TNF-베타); 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함하는 기타 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 사이토킨은 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질, 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성 등 가물을 포함한다.

[0328] **I. 표적 세포 및 항원**

[0329] 본 발명은, 부분적으로, 표적 세포(예: 중앙 또는 암 세포)에 대해 제지시되고, 세포 상의 표적 항원에 결합하는 결합 도메인을 갖는 CAR을 포함하는 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 의도한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 일반적으로 비정상 세포가 조절 없이 분열하고 부근 조직으로 침입할 수 있는 질환 또는 상태의 부류에 관한 것이다. 암 세포는 또한 혈액 및 림프 시스템을 통해 신체의 다른 부분으로 확산할 수 있다. 암의 몇몇 주요 유형이 있다. 암종은 내부 기관을 배열하거나 커버하는 피부 또는 조직에서 개시하는 암이다. 육종은 골, 연골, 지방, 근육, 혈관 또는 기타 결합 또는 지지 조직에서 개시하는 암이다. 백혈병은 혈액-형성 조직, 예를 들면, 골수에서 개시하고 다수의 비정상 혈액 세포가 생성되어 혈액으로 유입되도록 하는 암이다. 림프종 및 다발성 골수종은 면역계의 세포에서 개시하는 암이다. 중추신경계 암은 뇌 및 척수의 조직에서 개시하는 암이다.

[0330] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "악성"은 중앙 세포의 그룹이 하나 이상의 비조절된 성장(즉, 정상 한계를 초과하는 분열), 침윤(즉, 인접 조직으로의 침입 및 파괴) 및 전이(즉, 림프 또는 혈액을 통해 신체 중의 다른 장소로의 확산)를 나타내는 암이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "전이"는 신체의 한 부분으로부터 다른 부분으로의 암의 확산을 지칭한다. 확산된 세포에 의해 형성된 종양은 "전이성 종양" 또는 "전이"라 불리운다. 전이성 종양은 본래(원발) 종양의 것과 유사한 세포를 함유한다.

[0331] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "양성" 또는 "비-악성"은 보다 크게 성장할 수 있지만 신체의 한 부분으로부터 다른 부분으로 확산하지 않는 종양을 지칭한다. 양성 종양은 자체-제한되고, 전형적으로 침입 또는 전이하지 않는다.

[0332] "암 세포" 또는 "중앙 세포"는 암 성장의 개개 세포 또는 조직을 지칭한다. 종양은 일반적으로 세포의 비정상 성장에 의해 형성된 팽윤 또는 병변을 지칭하고, 이는 양성, 프리-악성 또는 악성일 수 있다. 대부분의 암은 종양을 형성하지만, 일부, 예를 들면, 백혈병은 반드시 종양을 형성하는 것은 아니다. 종양을 형성하는 이들

암의 경우, 용어 암(세포) 및 종양(세포)는 상호 교대로 사용된다. 개체에서 종양의 양은 종양의 수, 용적 또는 종량으로 측정될 수 있는 "종양 양"이다.

[0333] 한 가지 실시형태에서, 표적 세포는 다른 정상(목적하는) 세포의 표면에서 실질적으로 발견되지 않는 항원, 예를 들면, 표적 항원을 발현한다. 한 가지 실시형태에서, 표적 세포는 췌장실질 세포, 췌관 세포, 간세포, 심근 세포, 골격근 세포, 골아 세포, 골격 근아세포, 신경세포, 혈관 내피 세포, 색소 세포, 평활근 세포, 글리아 세포, 지방 세포, 골 세포, 연골세포, 췌도 세포, CNS 세포, PNS 세포, 간 세포, 지방 세포, 신장 세포, 폐 세포, 피부 세포, 난소 세포, 여포 세포, 상피 세포, 면역 세포 또는 내피 세포이다.

[0334] 특정 실시형태에서, 표적 세포는 췌장 조직, 신경 조직, 심장 조직, 골수, 근육 조직, 골 조직, 피부조직, 간 조직, 모낭, 혈관 조직, 지방 조직, 폐 조직 및 신장 조직의 일부이다.

[0335] 특정 실시형태에서, 표적 세포는 종양 세포이다. 또 다른 특정 실시형태에서, 표적 세포는 암 세포, 예를 들면, 암을 갖는 환의 세포이다. 개시된 방법으로 사멸시킬 수 있는 예시적 세포는 하기 종양의 세포를 포함한다: 액체 종양, 예를 들면, 급성 백혈병(예: 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 골수아구, 진골수구, 골수단구성, 단구 및 적백혈병), 만성 백혈병(예: 만성 골수성(과립구) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병)을 포함하는 백혈병, 진성다혈증, 림프종, 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 다발형 골수종, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 중쇄 질환).

[0336] 또 다른 실시형태에서, 세포는 고형 종양 세포 (solid tumor cell), 예를 들면, 육종 및 암종, 섬유육종, 점액 육종, 지방육종, 연골육종, 골원성육종 및 기타 육종, 활막종, 증피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장암, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 폐암, 결직장암, 편평상피암, 기저 세포암, 선암(예: 췌장, 결장, 난소, 폐, 유방, 위장, 전립선, 자궁경부 또는 식도의 선암), 한선암, 피지선암, 유두상암, 유두상 선암, 수양암, 기관지암, 신장 세포암, 간암, 담즙관암, 흉모막암, 빌름 종양, 자궁경부암, 정소 종양, 방광암, CNS 종양(예: 신경교종, 성상세포종, 수아종, 두개인두종, 상의종, 송과체종, 혈관아종, 청신경종, 뱀지돌기신경교종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종 및 망막아세포종)이다.

[0337] 한 가지 실시형태에서, 암은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 청구항 제1항의 방법에서 암은 빌름 종양, 유잉 육종, 신경내분비 종양, 신경교아세포종, 신경아세포종, 흑색종, 피부암, 유방암, 결장암, 직장암, 전립선암, 간암, 신장암, 췌장암, 폐암, 담도암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 갑상선 수질암, 난소암, 신경교종, 림프종, 백혈병, 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종 및 방광암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0338] 한 가지 실시형태에서, 표적 세포는 간, 췌장, 폐, 유방, 방광, 뇌, 골, 갑상선, 신장, 피부 및 조혈 시스템의 악성 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 표적 세포는 간암, 췌장암, 폐암, 유방암, 방광암, 뇌암, 골암, 갑상선암, 신장암, 피부암 또는 혈액암의 세포이다.

[0339] 한 가지 실시형태에서, 표적 항원은 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 람다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드의 에피토프이다.

[0340] **J. 치료 방법**

[0341] 본원에서 고려되는 유전적으로 변형된 T 세포는 다양한 종양 및 암의 치료에서 사용하기 위한 양자 면역요법의 개선된 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 일차 T 세포의 특이성은 본원에서 의도된 CAR을 갖는 일차 T 세포를 유전적으로 변형시켜 종양 또는 암 세포에 대해 제지시킨다. 다양한 실시형태에서, 바이러스 벡터는 MND 프로모터를 포함하고 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 면역 작동 세포를 유전적으로 변형시키기 위해 사용되며, 상기 CAR은 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-

1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드에 결합하는 항원-특이적 결합 도메인; 힌지 도메인; CD8 α ; CD4, CD45, PD1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래하는 TM 도메인, 및 TM 도메인을 CAR의 세포내 시그널전달 도메인에 연결하는, 바람직하게는 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커를 포함하는 막관통 도메인; 및 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그널전달 도메인 및 CD3 ζ 일차 시그널전달 도메인을 포함한다.

- [0342] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 세포 요법의 유형을 포함하고, T 세포는 표적 항원을 발현하는 암 세포를 표적화하는 CAR을 발현시키기 위해 유전적으로 변형되고, CAR T 세포는 이를 필요로 하는 수용자에게 주입된다. 주입된 세포는 수용자에서 종양 세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR T 세포는 생체내에서 복제할 수 있고, 이는 지속된 암 요법을 유도할 수 있는 장기간 지속성을 제공한다.
- [0343] 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 CAR T 세포는 강력한 생체내 T 세포 확장을 겪을 수 있고, 연장된 시간 동안 지속할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 CAR T 세포는 임의의 추가 종양 형성 또는 성장을 억제하기 위해 재활성화될 수 있는 특이적 기억 T 세포로 진화한다.
- [0344] 특정 실시형태에서, CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은, 제한 없이, 간암, 췌장암, 폐암, 유방암, 방광암, 뇌암, 골암, 갑상선암, 신장암 또는 피부암을 포함하는 고형 종양 또는 암의 치료에 사용된다.
- [0345] 특정 실시형태에서, PSCA 또는 MUC1의 에피토프에 결합하는 항원-특이적 결합 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은 췌장암의 치료에 사용된다.
- [0346] 특정 실시형태에서, EPHA2, EGFRvIII 또는 CSPG4의 에피토프에 결합하는 항원-특이적 결합 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은 신경교아세포종 다형태의 치료에 사용된다.
- [0347] 특정 실시형태에서, PSCA 또는 MUC1의 에피토프에 결합하는 항원-특이적 결합 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은 방광암의 치료에 사용된다.
- [0348] 특정 실시형태에서, PSCA 또는 GD2의 에피토프에 결합하는 항원-특이적 결합 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은 폐암의 치료에 사용된다.
- [0349] 특정 실시형태에서, CSPG4 또는 HER2의 에피토프에 결합하는 항원-특이적 결합 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은 유방암, 예를 들면, 삼중 음성 유방암의 치료에 사용된다.
- [0350] 특정 실시형태에서, GD2 또는 CSPG4의 에피토프에 결합하는 항원-특이적 결합 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은 흑색종의 치료에 사용된다.
- [0351] 특정 실시형태에서, CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은, 액체 종양, 예를 들면, 급성 백혈병(예: ALL, AML 및 골수아구, 전골수구, 골수단구성, 단구 및 적백혈병), 만성 백혈병(예: CLL, SLL, CML, HCL)을 포함하는 백혈병, 진성다혈증, 림프종, 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증 및 중쇄 질환의 치료에 사용된다.
- [0352] 특정 실시형태에서, CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 다발성 골수종(MM), 비-호지킨 림프종(NHL) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는 B-세포 악성종양의 치료에 사용된다.
- [0353] 다발성 골수종은 이들 세포 유형의 단일 클론의 종양성 형질전환을 특징으로 하는 성숙 형질 세포 형태의 B-세포 악성종양이다. 이들 형질 세포는 BM에서 증식하고, 인접한 골 및 종종 혈액으로 침입한다. 변이체 형태의 다발성 골수종은 명백한 다발성 골수종, 무증상 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 비-분비성 골수종, IgD 골수

중, 골경화성 골수종, 골의 고립성 형질세포종 및 수질의 형질세포종을 포함한다[참조: 예를 들면, Braunwald, *et al.*(eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Edition(McGraw-Hill 2001)].

- [0354] 비-호지킨 림프종은 림프구(백혈구 세포)의 거대 그룹의 암을 포함한다. 비-호지킨 림프종은 모든 연령에서 발생할 수 있고, 종종 정상보다 큰 림프절, 발열 및 체중 감소로 나타난다. 다수의 상이한 유형의 비-호지킨 림프종이 있다. 예를 들면, 비-호지킨 림프종은 적극적(신속-성장) 및 무통성(느린-성장) 유형으로 나뉠 수 있다. 비-호지킨 림프종은 B-세포 및 T-세포로부터 유래할 수 있고, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비-호지킨 림프종" 및 "B-세포 비-호지킨 림프종"은 상호 교대로 사용된다. B-세포 비-호지킨 림프종(NHL)은 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 미만성 대형 B-세포 림프종, 여포성 림프종, 면역아구성 대세포 림프종, 전구체 B-림프아구성 림프종 및 맨틀 세포 림프종을 포함한다. 골수 또는 줄기 세포 이식 후에 발생하는 림프종은 통상 B-세포 비-호지킨 림프종이다.
- [0355] 만성 림프구성 백혈병(CLL)은, B 림프구로 불리우는 미성숙 백혈구 세포 또는 B 세포에서 느린 증가를 유발하는 완만한(느린-성장) 암이다. 암 세포는 혈액 및 골수를 통해 확산하고, 또한 림프절 또는 간 및 비장 등의 다른 기관에 영향을 미칠 수 있다. CLL은 결국 골수의 실패를 유발한다. 종종, 질환의 후기 단계에서, 상기 질환은 소림프구성 림프종으로 불리운다.
- [0356] 특정 실시형태에서, 본원에서 고려되는 치료학적 유효량의 CAR-발현 면역 작동 세포 또는 이를 포함하는 조성물을, 단독으로 또는 하나 이상의 치료제와 조합하여, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 세포는 암을 발증할 위험에 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은, 치료학적 유효량의 본 발명의 CAR-변형된 T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0357] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "개체" 및 "대상체"는 종종 상호 교대로 사용되며, 본원의 다른 개소에 기재된 유전자 치료 벡터, 세포-기반 치료제 및 방법에 의해 치료될 수 있는 암의 증상을 나타내는 모든 동물을 지칭한다. 적합한 대상체(예: 환자)는 실험실 동물(예: 마우스, 랫트, 래빗 또는 기니아 피그), 농장 동물 및 가축 또는 애완동물(예: 고양이 또는 개)을 포함한다. 비-인간 영장류 및, 바람직하게는, 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체는, 암을 갖거나, 암으로 진단되거나, 암을 가질 위험에 있는 인간 환자를 포함한다.
- [0358] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "환자"는 본원의 다른 개소에 개시된 유전자 치료 벡터, 세포-기반 치료제 및 방법으로 치료될 수 있는 특정 암으로 진단된 대상체를 지칭한다.
- [0359] 본원에 사용된 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 병리학적 상태의 증상 또는 병리학에 대한 모든 유의하거나 바람직한 효과를 포함하며, 치료될 질환 또는 상태(예: 암)의 하나 이상의 측정가능한 마커의 최소 감소도 포함할 수 있다. 치료는 임의로, 질환 또는 상태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 질환 또는 상태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. "치료"는 질환 또는 상태, 또는 이의 연관된 증상을 반드시 완전히 근절하거나 치유하는 것을 나타내는 것은 아니다.
- [0360] 본원에서 사용된 바와 같이, "예방하다", 및 "예방된", "예방하는" 등의 유사한 단어들은 질환 또는 상태(예: 암)의 출현 또는 재발의 가능성을 방지, 억제 또는 감소시키는 접근법을 나타낸다. 또한, 이는 질환 또는 상태의 발현 또는 재발을 지연시키거나, 질환 또는 상태의 증상의 출현 또는 재발을 지연시키는 것을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, "예방" 및 유사한 단어들은 또한 질환 또는 상태의 발현 또는 재발 전에 질환 또는 상태의 강도, 영향, 증상 및/또는 부담을 감소시키는 것을 포함한다.
- [0361] "증강" 또는 "촉진" 또는 "증가" 또는 "확장"이란 일반적으로, 비히클 또는 대조군 분자/조성물에 의해 유발된 반응과 비교하여, 보다 많은 생리학적 반응(즉, 하류 효과를 생성, 유도 또는 유발하는 본원에서 의도된 조성물, 예를 들면, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 CAR을 코딩하는 벡터의 능력을 지칭한다. 측정가능한 생리학적 반응은, 당해 기술분야에서의 이해 및 본원의 기재로부터 명백한 것들 중에서, T 세포 확장, 활성화, 지속성의 증가 및/또는 암 세포 사멸 능력에서의 증가를 포함할 수 있다. "증가된" 또는 "증강된" 양은 통상 "통계학적으로 유의한" 양이고, 비히클 또는 대조군 조성물에 의해 형성된 반응과 비교하여 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 이상(예: 500, 1000배)(1 사이 및 1 초과의 모든 정수 및 소수점, 예를 들면, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함함)인 증가를 포함할 수 있다.
- [0362] "감소" 또는 "저하" 또는 "저감" 또는 "경감" 또는 "완화"란, 비히클 또는 대조군 분자/조성물에 의해 유발된 반응과 비교하여 보다 적은 생리학적 반응(즉, 하류 효과)을 생성, 유도 또는 유발하는 본원에서 의도된 조성물의 능력을 일반적으로 지칭한다. "저하" 또는 "감소된" 양은 통상 "통계학적으로 유의한" 양이고, 비히클, 대

조군 조성물 또는 특정 세포 계통에서의 반응 (기준 반응)으로 생산된 반응과 비교하여 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 이상(예: 500, 1000배)(1 사이 및 1 초과인 모든 정수 및 소수점, 예를 들면, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함함)인 감소를 포함할 수 있다.

- [0363] "유지하다" 또는 "보존하다" 또는 "유지" 또는 "변화 없는" 또는 "실질적 변화 없는" 또는 "실질적 감소 없는"이란 비히클, 대조군 분자/조성물에 의해 유발된 반응 또는 특정 세포 계통에서의 반응과 비교하여 세포에서 보다 적은 생리학적 반응 (예: 하류 효과)을 생성, 유도 또는 유발하는 본원에서 의도된 조성물의 능력을 일반적으로 지칭한다. 필적하는 반응은 기준 반응으로부터 유의적 차이 또는 측정가능한 차이가 없는 것이다.
- [0364] 한 가지 실시형태에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법은 본원에서 의도된 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 유효량, 예를 들면, 치료학적 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 투여 양 및 빈도는, 적절한 용량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있지만, 환자의 상태 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.
- [0365] 특정 실시형태에서, 활성화된 T 세포를 대상체에게 투여한 다음 후속적으로 혈액(또는 아페레시스 수행)을 교체하고, 본 발명에 따라 T 세포를 이로부터 활성화시키고, 이들 활성화된 및 확장된 T 세포를 환자에게 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 프로세스는 몇주마다 복수회 수행할 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 10cc 내지 400cc의 혈액 교체로부터 활성화될 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 100cc, 150cc, 200cc, 250cc, 300cc, 350cc 또는 400cc 이상의 혈액 교체로부터 활성화된다. 이론에 국한시키고자 하는 것은 아니지만, 이러한 복수 혈액 교체/복수 재주입 프로토콜을 사용하는 것은 T 세포의 특정 모집단을 선별하도록 작동할 수 있다.
- [0366] 본원에서 의도된 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 경구섭취, 수액, 주입 또는 이식을 포함하는 임의의 통상의 방법으로 수행할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 조성물은 비경구 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같은 문구 "비경구 투여" 및 "비경구 투여된"은 통상 주사에 의한, 장용 및 국소 투여를 제외한 투여 방식을 지칭하고, 제한 없이, 혈관내, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 낭내, 안와내, 종양내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 관절내, 피막내, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 본원에서 의도된 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위 내로 직접 주사에 의해 대상체에게 투여된다.
- [0367] 한 가지 실시형태에서, 이를 필요로 하는 대상체는 대상체에서 암에 대한 세포 면역 반응을 증가시키기 위해 유효량의 조성물이 투여된다. 면역 반응은 감염된 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 T 세포에 의해 매개된 세포 면역 반응, 조절 T 세포 및 헬퍼 T 세포 반응을 포함한다. B 세포를 활성화시켜 항체 생성을 유도할 수 있는 헬퍼 T 세포에 의해 주로 매개된 체액성 면역 반응이 또한 유도될 수 있다. 본 발명의 조성물에 의해 유도된 면역 반응의 유형을 분석하기 위해 다양한 기술이 사용될 수 있고, 이는 당해 기술분야에 잘 기재되어 있다[참조: Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober(2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.].
- [0368] T 세포-매개된 사멸의 경우에, CAR-리간드 결합은 T 세포에 대한 CAR 시그널전달을 개시하여, T 세포가 다양한 메커니즘에 의한 표적 세포 아포토시스를 유도할 수 있는 단백질을 생성 또는 방출하는 것을 유도하는 다양한 T 세포 시그널전달 경로의 활성화를 제공한다. 이들 T 세포-매개된 메커니즘은, (이로써 한정되는 것은 아니지만) T 세포로부터 표적 세포로 세포내 세포독성 과립의 전이, 직접 표적 세포 사멸(또는 다른 킬러 작동 세포의 동원을 통해 간접적으로)을 유도할 수 있는 프로-염증 사이토킨의 T 세포 분비, 및 표적 세포 아포토시스를 유도하는 T 세포 표면 상에서 사멸 수용체 리간드(예: FasL)의 상향 조절, 이어서 표적 세포 상에서 이들의 동족 사멸 수용체(예: Fas)에 대한 결합을 포함한다.
- [0369] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은, 대상체로부터 면역 작동 세포를 제거하고, 상기 면역 작동 세포를 본원에서 의도된 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 유전적으로 변형시키고, 이에 의해 변형된 면역 작동 세포의 모집단을 생성하고, 변형된 면역 작동 세포의 모집단을 동일한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암으로 진단된 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 면역 작동 세포는 T 세포를 포함한다.
- [0370] 특정 실시형태에서, 본 발명은 또한, CAR 분자를 코딩하는 핵산 작제물을 발현하는 면역 작동 세포 모집단을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 표적 세포 모집단에 대한 면역 작동 세포 매개된 면역 조절인자 반응을 자극하는 방법을 제공한다.
- [0371] 본원에 기재된 세포 조성물을 투여하는 방법은, 대상체에서 본 발명의 CAR을 직접 발현하는 생체의 유전적으로 변형된 면역 작동 세포의 재도입, 또는 대상체 내로 도입시에 CAR을 발현하는 성숙 면역 작동 세포로 분화하는

면역 작동 세포의 유전적으로 변형된 전구세포를 제공하는데 효과적인 모든 방법을 포함한다. 한 가지 방법은 말초혈 T 세포를 생체외에서 본 발명에 따라 핵산 작제물로 형질도입시키고 형질도입된 세포를 대상체에 반송하는 것을 포함한다.

[0372] 한 가지 실시형태에서, 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편 또는 이에 대한 항체는, 전형적으로 대상체 또는 모집단 대상체가 특정의 의학적 치료에 양호하게 반응하는지를 평가하기 위한, 동반 진단 (companion diagnostic) 방법의 일부이다.

[0373] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "동반 진단"은 특정 CAR 또는 유전적으로 변형된 면역 작동 세포 요법에 연결되는 진단 시험을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 진단 방법 및 키트는, 생물학적 샘플에서 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM, 또는 VEGFR2 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 발현 수준의 검출을 포함하고, 이에 의해 본 발명에 따르는 치료에 적합한 환자의 신속한 동정을 가능하게 한다.

[0374] 예를 들면, 암에 대한 소정의 치료제(예: 본원에서 의도된 CAR 또는 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 면역 작동 세포)는 대상체(들)가 소정 질환 또는 상태에 대한 하나 이상의 선별된 바이오마커를 갖는지에 기반하여 대상체 또는 대상체의 특정 모집단에 적합한 것으로 동정될 수 있다. 바이오마커의 예는 의학적 영상화 기술에 의해 동정될 수 있는 마커 뿐만 아니라 혈청/조직 마커를 포함한다. 특정 실시형태에서, 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM, 또는 VEGFR2 폴리펩티드 단편(또는 이의 상응하는 폴리뉴클레오티드)은, 특정 대상체 또는 대상체의 특정 모집단에서 약물 결과를 측정하거나 약물 사용의 바람직함을 평가하기 위해 사용될 수 있는 혈청 및/또는 조직 바이오마커를 자체로 제공할 수 있다. 특정한 측면에서, 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM, 또는 VEGFR2 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 참조 서열을 발현하는 치료가능한 징후의 동정은, 선택된 대상체, 선택된 조직, 또는 본원에 기재되고 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 기타 방법에서든, 당해 서열의 시차적 발현을 특징으로 하는 것을 포함할 수 있다.

[0375] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 방법은, 대상체의 암에서 알파 플레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, '글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 램다, 르위스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM, 또는 VEGFR2 폴리펩티드의 프리-mRNA, mRNA 또는 단백질 발현의 수준을 측정하거나 정량화하는 것을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 대상체는, 마커의 발현이 대조군 샘플 또는 공지된 표준에서 마커의 발현

보다 생물학적 샘플에서 10배, 25배, 50배, 100배 또는 1000배 더 높은 경우, 본원에서 의도된 조성물을 치료 가능한 특정 암을 갖는 것으로 동정된다. 특정 실시형태에서, 대상체는, 생물학적 샘플에서 바이오마커의 발현이 검출가능하고 마커의 발현이 동일한 방법을 사용하여 대조군 샘플 또는 공지된 표준에서 검출 수준보다 낮은 경우, 치료가능한 징후를 갖는 것으로 동정된다.

[0376] 잠재적 암에서 바이오마커 단백질 발현의 존재, 부재 또는 상대적 수준은, 예를 들면, 조직화학 기술, 면역학적 기술, 전기영동, 웨스턴 블롯 분석, FACS 분석, 유동 세포계수 등에 의해 분석할 수 있다. 또한, 바이오마커 RNA 발현의 존재, 부재 또는 상대적 수준은, 예를 들면, PCR 기술, 노던 블롯 분석, 적합한 올리고뉴클레오티드 프로브의 사용 등을 사용하여 검출할 수 있다.

[0377] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허된 및 허여된 특허는, 각각의 개개 간행물, 특허된 또는 허여된 특허가 구체적 및 개별적으로 참조로서 도입되는 것을 나타내는 것과 같이, 본원에서 참조로서 도입된다.

[0378] 상기 본 발명이 이해의 명확성을 목적으로 예시 및 실시예에 의해 일부 상세하게 기재되었지만, 특정한 변화 및 변형이 첨부된 특허청구범위의 정신 또는 범위로부터 벗어나지 않고서 이루어질 수 있음은 본 발명의 교시에 비추어 당해 기술분야의 숙련자에게 용이하게 명백할 것이다. 하기 실시예는 한정하는 것이 아닌 예시를 위해서만 제공된다. 당해 기술분야의 숙련가는 본질적으로 유사한 결과를 획득하기 위해 변화 또는 변형될 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 용이하게 인식할 것이다.

[0379] **실시예**

[0380] 실시예 1

[0381] *CAR*의 작제

[0382] **1. CD19 특이적 CAR(pMND-CD19 CAR)**

[0383] CD19 특이적 CAR은 항-CD19 scFv에 작동적으로 연결된 MND 프로모터, CD8 α 로부터 힌지 및 막관통 도메인, 및 CD137 공-자극 도메인 이어서 CD3 ζ 쇠의 세포내 시그널전달 도메인을 함유하도록 설계했다. 도 1A. CD19 CAR은 면역 작동 세포 상에 표면 발현을 위한 CD8 α 시그널 펩티드(SP) 서열을 포함한다. pMND-CD19 CAR의 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 2에 기재되어 있고, 벡터 맵은 도 2에 제시되어 있다. 표 3은 pMND-CD19 CAR 렌티 바이러스 벡터의 다양한 뉴클레오티드 세그먼트에 대한 속성, 진뱅크 참조, 공급원 명칭 및 인용을 나타낸다.

표 3

[0384]

뉴클레오티드	속성	진뱅크 참조	공급원 명칭	인용
1-185	pUC19 플라스미드 골격	수탁 #L09137.2 nt 1-185	pUC19	New England Biolabs
185-222	링커	해당 없음	합성	해당 없음
223-800	CMV	해당 없음	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS, 및 팩키징 서열	수탁 #M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11): 5732-43
1137-1139	정지 코돈(TAG)로 변화된 Gag 개시 코돈(ATG)	해당 없음	합성	해당 없음
1140-1240	HIV-1 gag 서열	수탁 #M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	제2 정지 코돈으로 변화된 HIV-1 gag 서열	해당 없음	합성	해당 없음
1244-1595	HIV-1 gag 서열	수탁 #M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43

1596-1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	수탁 #M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, 단리 HXB3 env 영역 (RRE)	수탁 #M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature(1988) 335:181-183
2518-2693	HIV-1 env 서열 S/A	수탁 #M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-3231	MND	해당 없음	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et al.(1995) J.Virol. 69: 748-755
3232-3247	링커	해당 없음	합성	해당 없음
3248-3310	시그널 펩티드	수탁 # NM_001768	합성	해당 없음
3311-4036	CD19 scFv(FMC63)	해당 없음	합성	해당 없음
4037-4243	CD8a 힌지 및 TM	수탁 # NM_001768	합성	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4244-4369	CD137(4-1BB) 시그널전달 도메인	수탁 # NM_001561	합성	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4370-4708	CD3-시그널전달 도메인	수탁 # NM_000734	합성	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4709-4838	HIV-1 ppt 및 3' U3의 부분	수탁 #M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
4839-4935	HIV-1 R 및 3' U3(U3에서 399bp 결실)	수탁 #M19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
4936-4961	합성 폴리 A	해당 없음	합성	Levitt, N. Genes & Dev(1989) 3:1019-1025
4962-5010	링커	해당 없음	합성	해당 없음
5011-7425	pUC19 골격	수탁 #L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	New England Biolabs

[0385] 2. 카파 경쇄(κ_{LC}) 특이적 CAR(pMND- κ_{LC} CAR)

[0386] 카파 경쇄 특이적 CAR은 항-카파 경쇄 scFv에 작동적으로 연결된 MND 프로모터, CD8 α 로부터의 힌지 및 막관통 도메인, 및 CD137 공-자극 도메인 이어서 CD3 ζ 쇄의 세포내 시그널전달 도메인을 함유하도록 설계했다. 도 1B. 카파 $_{LC}$ CAR은 면역 작동 세포 상에서 표면 발현을 위한 CD8 α 시그널 펩티드(SP) 서열을 포함한다. pMND-카파 $_{LC}$ CAR의 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 3에 기재되어 있고, 벡터 맵은 도 3에 제시되어 있다. 표 4는 pMND-카파 경쇄 CAR 렌티바이러스 벡터의 다양한 뉴클레오티드 세그먼트에 대한 속성, 진뱅크 참조, 공급원 명칭 및 인용을 제시한다.

표 4

뉴클레오티드	속성	진뱅크 참조	공급원 명칭	인용
1-185	pUC19 플라스미드 골격	수탁 #L09137.2 nt 1 185	pUC19	New England Biolabs

185-222	링커	해당 없음	합성	해당 없음
223-800	CMV	해당 없음	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS, 및 팩키징 서열	수탁 #M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	정지 코돈(TAG)로 변화된 Gag 개시 코돈(ATG)	해당 없음	합성	해당 없음
1140-1240	HIV-1 gag 서열	수탁 #M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	제2 정지 코돈으로 변화된 HIV-1 gag 서열	해당 없음	합성	해당 없음
1244-1595	HIV-1 gag 서열	수탁 #M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	수탁 #M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, 분리주 HXB3 env 영역(RRE)	수탁 #M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature(1988) 335:181-183
2518-2693	HIV-1 env 서열 S/A	수탁 #M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-3231	MND	해당 없음	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et al. (1995) J.Virol. 69: 748-755
3232-3245	링커	해당 없음	합성	해당 없음
3246-3302	시그날 펩티드	해당 없음	합성	해당 없음
3303-4061	kappa scFv	해당 없음	합성	해당 없음
4062-4268	CD8a 힌지 및 TM	수탁 # NM_001768	합성	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4269-4394	CD137(4-1BB) 시그날전달 도메인	수탁 # NM_001561	합성	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4395-4733	CD3- ζ 시그날전달 도메인	수탁 # NM_000734	합성	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4734-4960	HIV-1 ppt, U3 및 R	수탁 #M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al.(1991) J Virol: 65(11):5732-43
4961-4985	합성 폴리 A	해당 없음	합성	Levitt, N. Genes & Dev(1989) 3:1019-1025
4986-5025	링커	해당 없음	합성	해당 없음
5026-7450	pUC19 골격	수탁 #L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	New England Biolabs

- [0388] 실시예 2
- [0389] *T 세포의 형질도입*
- [0390] 렌티바이러스 벡터(LV) 상청액은 문헌[참조: Naldini *et al.*, 1996, Dull *et al.*, 1998 and Zufferey *et al.*, 1998]에 기재된 바와 같이 HEK 293T 세포에서 생성한다. 5-플라스미드(HIV gag-pol을 코딩하는 HPV 275, VSV-G 외피 단백질을 코딩하는 ψ N 15, HIV rev 단백질을 코딩하는 p633, HIV tat 단백질을 코딩하는 HPV601 및 CAR 발현 벡터)의 일시적 형질감염은 PCT 공개공보 제WO2012/170911호에 기재된 바와 같이 사용한다. 이어서, LV 상청액은 초원심분리 또는 이온-교환 컬럼, 이어서 탄젠트 유동 여과(TFF)에 의해 농축시키고, SCGM(CellGenix Inc., DE) 배지로 제형화하고, 단일 사용 크리오바이알에서 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 에서 동결보존한다. 감염 역가는 형질도입된 골육종(HOS) 세포의 유동 세포계수 분석에 의해 측정한다[참조: Kutner *et al.*, 2009, Nature Protocols 4:495-505]. 인간 T 림프구의 형질도입을 위해, 일차 인간 T 세포는 RosetteSep 키트(Stem Cell Technologies)를 사용한 음성 선별에 의해 백혈구분리반출 (leukapheresis)에 따라 건강한 지원자 공여체로부터 단리한다. T 세포는 10% FCS, 100IU/ml 페니실린, 100g/ml 스트렙토마이신 설페이트, 10mM 헤페스가 보충된 RPMI 1640에서 배양하고, 1:3 세포 대 비드 비율로 항-CD3/항-CD28 항체로 코팅된 자기 비드로 자극시킨다. CD8 T 세포의 경우, 인간 IL-2(Chiron)을 30IU/ml의 최종 농도로 격일로 첨가한다. 대략 활성화 24시간 후, T 세포에 5의 MOI에서 렌티바이러스 벡터를 형질도입한다. T 세포의 형질도입은 형질도입후 7 내지 10일에서 바이러스 벡터에 특이적인 프라이머를 사용한 폴리머라제 연쇄 반응 및 유동 세포계수에 의해 평가한다.
- [0391] 실시예 3
- [0392] *CAR 형질도입된 T 세포의 VCN*
- [0393] pMND-kappa_LC CAR 렌티바이러스에 의한 일차 인간 T 세포의 형질도입에 대한 벡터 카피 수를 측정했다. 말초혈 단핵구 세포(PBMC)는 정상 공여체로부터 수거하고, IL-2(CellGenix)를 함유하는 배지에서 CD3 및 CD28(Miltenyi Biotec)에 특이적인 항체와 함께 배양하여 활성화시켰다. 활성화 후, PBMC 배양물을 렌티바이러스 벡터로 형질도입하거나 무처리 상태로 유지시켰다. 배양물은 T 세포의 성장 및 확장(7 내지 10일)을 가능하게 하도록 유지시켰다. 수거 시점에서, 배양물은 대략 2log 확장된 T 세포를 포함한다.
- [0394] 통합된 렌티바이러스 입자의 벡터 카피 수(VCN)는 형질도입 9일 후에 q-PCR에 의해 측정했다. 6개 공여체로부터 12개 고유한 배양물의 평균 VCN은 3.1이었다(도 4).
- [0395] 실시예 4
- [0396] *형질도입된 T 세포에서 CAR 발현*
- [0397] 일차 인간 T 세포 상에서 MND 프로모터(pMND-kappa_LC CAR)로부터 발현된 카파에 특이적인 키메라 항원 수용체의 세포 표면 발현을 측정했다. 말초혈 단핵구 세포(PBMC)를 정상 공여체로부터 수거하고, IL-2(CellGenix)를 함유하는 배지에서 CD3 및 CD28(Miltenyi Biotec)에 특이적인 항체와 함께 배양하여 활성화시켰다. 활성화 후, PBMC 배양물은 렌티바이러스 벡터로 형질도입하거나 무처리 상태로 유지시켰다. 배양물은 T 세포의 성장 및 확장(7 내지 10일)을 가능하게 하도록 유지시켰다. 수거 시점에서, 배양물은 대략 2log 확장된 T 세포를 포함한다.
- [0398] Kappa_LC 발현은 단지 pMND-kappa_LC CAR-변형된 T 세포 상에 존재하는 마우스 Ig(BD Biosciences)에 특이적인 항체를 사용한 유동 세포계수에 의해 측정했다. 유동 세포계수는 형질도입 6 내지 9일 후에 수행했다. 6개 공여체로부터 12개 고유한 배양물의 kappa_LC의 평균 발현 수준은 35.6%였다(도 5).
- [0399] 실시예 5
- [0400] *MND 프로모터는 EF1 α 프로모터에 필적하는 T 세포에서 CAR 발현을 유도한다.*
- [0401] 변형된 T 세포에서 MND 프로모터 유래된 CD19 CAR 발현은 EF1 α 프로모터 유래된 CD19 CAR 발현에 필적했다. 말초혈 단핵구 세포(PBMC)를 정상 공여체로부터 수거하고, IL-2(CellGenix)를 함유하는 배지에서 CD3 및 CD28(Miltenyi Biotec)에 특이적인 항체와 함께 배양하여 활성화시켰다. 활성화 후, PBMC 배양물은 렌티바이러스 벡터로 형질도입하거나 무처리 상태로 유지시켰다. 배양물은 T 세포의 성장 및 확장(7 내지 10일)을 가능하게 하도록 유지시켰다. 수거 시점에서, 배양물은 대략 2log 확장된 T 세포를 포함한다. 배양 말기에, T 세포

형질도입은 바이러스 입자에 특이적인 프라이머를 사용한 정량적 폴리머라제 연쇄 반응(qPCR)에 의해 분석했다. CD19 CAR 발현은 단지 CD19 CAR-변형된 T 세포 상에 존재하는 마우스 Ig(BD Biosciences)에 특이적인 항체를 사용한 유동 세포계수에 의해 형질도입 6일 후에 측정했다. CD19 CAR 발현 및 VCN 둘 다는 상이한 작제물 사이에서 필적했다(도 6).

[0402] 실시예 6

[0403] *CAR T 세포의 항원 특이적 반응성*

[0404] pMND kappa_{LC} CAR T 세포의 항원-특이적 반응성을 측정했다. 말초혈 단핵구 세포(PBMC)는 정상 공여체로부터 수거하고, IL-2(CellGenix)를 함유하는 배지에서 CD3 및 CD28(Miltenyi Biotec)에 특이적인 항체와 함께 배양하여 활성화시켰다. 활성화 후, PBMC 배양물은 렌티바이러스 벡터로 형질도입하거나 무처리 상태로 유지시켰다. 배양물은 T 세포의 성장 및 확장(7 내지 10일)을 가능하게 하도록 유지시켰다. 수지 시점에서, 배양물은 대략 2log 확장된 T 세포를 포함한다.

[0405] 배양 말기에, 종양 반응성은 인터페론-감마(IFN γ) 방출을 사용하여 검정했다. pMND-kappa_{LC} CAR로 변형시킨 T 세포는 kappa⁺ 다우디 세포(kappa_{LC} 발현)와 함께 공-배양후 IFN γ 를 분비한다. 대조적으로, pMND0-kappa_{LC} CAR로 변형시킨 T 세포와 kappa-음성 HDLM-2 세포와의 공-배양은, T 세포를 단독으로 배양한 경우에 관찰된 양에 필적하는 IFN γ 방출을 제공했다. IFN γ 방출은 kappa-양성 다우디 또는 kappa-음성 HDLM-2 세포와 공-배양 24 시간 후 ELISA 키트를 사용하여 측정했다(도 7).

[0406] 실시예 7

[0407] *CAR T 세포의 항-종양 기능*

[0408] pMND-kappa_{LC} CAR을 발현하도록 조작된 CAR T 세포의 항-종양 기능을 측정했다. 말초혈 단핵구 세포(PBMC)를 정상 공여체로부터 수거하고, IL-2(CellGenix)를 함유하는 배지에서 CD3 및 CD28(Miltenyi Biotec)에 특이적인 항체와 함께 배양하여 활성화시켰다. 활성화 후, PBMC 배양물은 렌티바이러스 벡터로 형질도입하거나 무처리 상태로 유지시켰다. 배양물은 T 세포의 성장 및 확장(7 내지 10일)을 가능하게 하도록 유지시켰다. 수거 시점에서, 배양물은 대략 2log 확장된 T 세포를 포함한다.

[0409] 반딧불 루시퍼라제 유전자로 표지된 2×10^6 다우디 세포는 정맥내 주사에 의해 NOD scid IL-2 수용체 감마쇄 녹아웃 마우스(NSG)에서 확립했다. 종양 세포를 마우스에 주사한지 3일, 6일 및 9일 후, 1×10^7 pMND-kappa_{LC} CAR-변형된 T 세포를 마우스에 양자 전이시키고, 종양 성장은 제노젠-IVIS 영상화 시스템을 사용한 생물발광에 의해 모니터링했다. 종양 양은 무처리 마우스의 종양 양과 비교하여 변형된 CAR T 세포를 투여한 마우스에서 감소되었다(도 8).

[0410] 실시예 8

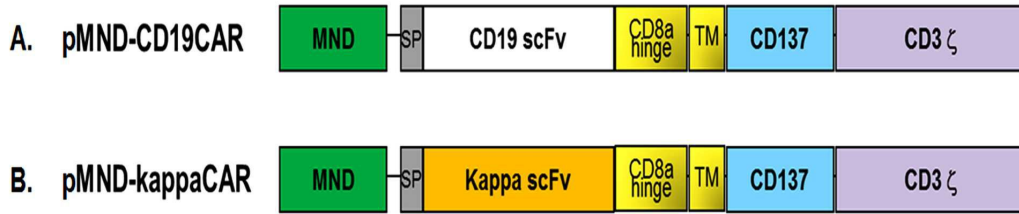
[0411] *기능적 CAR T 약물 생성물의 생성*

[0412] 항-BCMA 발현 CAR T 세포는 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조했다. 이들 CAR T 세포는 항원 특이적 종양 클리어런스를 나타냈다. 항-BCMA 발현 CAR T 세포는 4시간 동안 K562 세포와 함께 공-배양하거나, BCMA를 발현하도록 변형시킨 K562 세포와 함께 공-배양했다. 항원 발현 종양 세포는 카복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE)로 표지하고, 형광은 FACS로 측정했다. 항-BCMA 발현 CAR T 세포는 BCMA 발현 K562 세포를 사멸시켰고(도 9A), IFN- γ 를 방출했다(도 9B)(n=3).

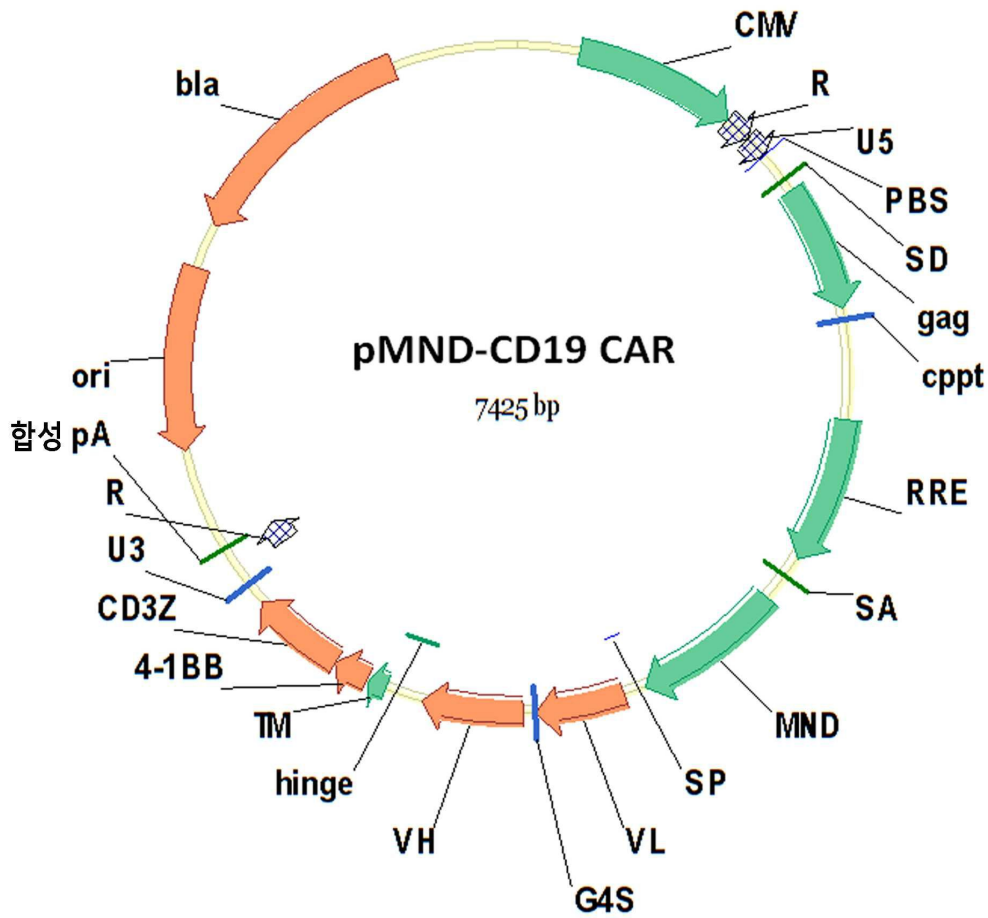
[0413] 일반적으로, 하기 특허청구범위에서, 사용된 용어는 특허청구범위를 명세서 및 특허청구범위에 개시된 특정의 실시형태로 한정하는 것으로 해석되는 것은 아니며, 이러한 특허청구범위가 권한을 부여한 등가물의 전체 범위와 함께 모근 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 특허청구범위는 본 개시에 의해 한정되지 않는다.

도면

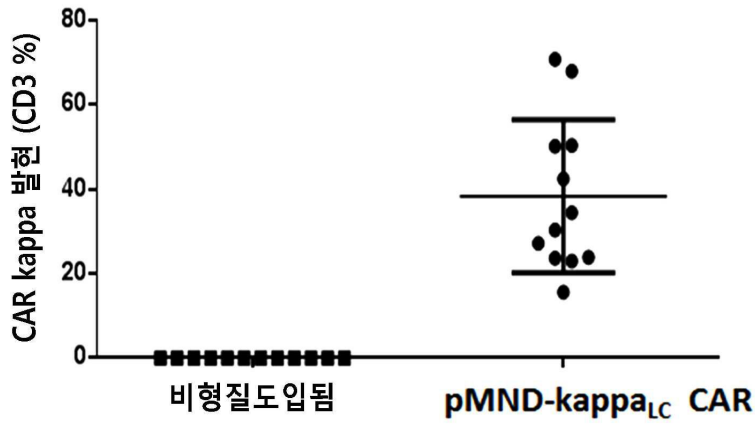
도면1



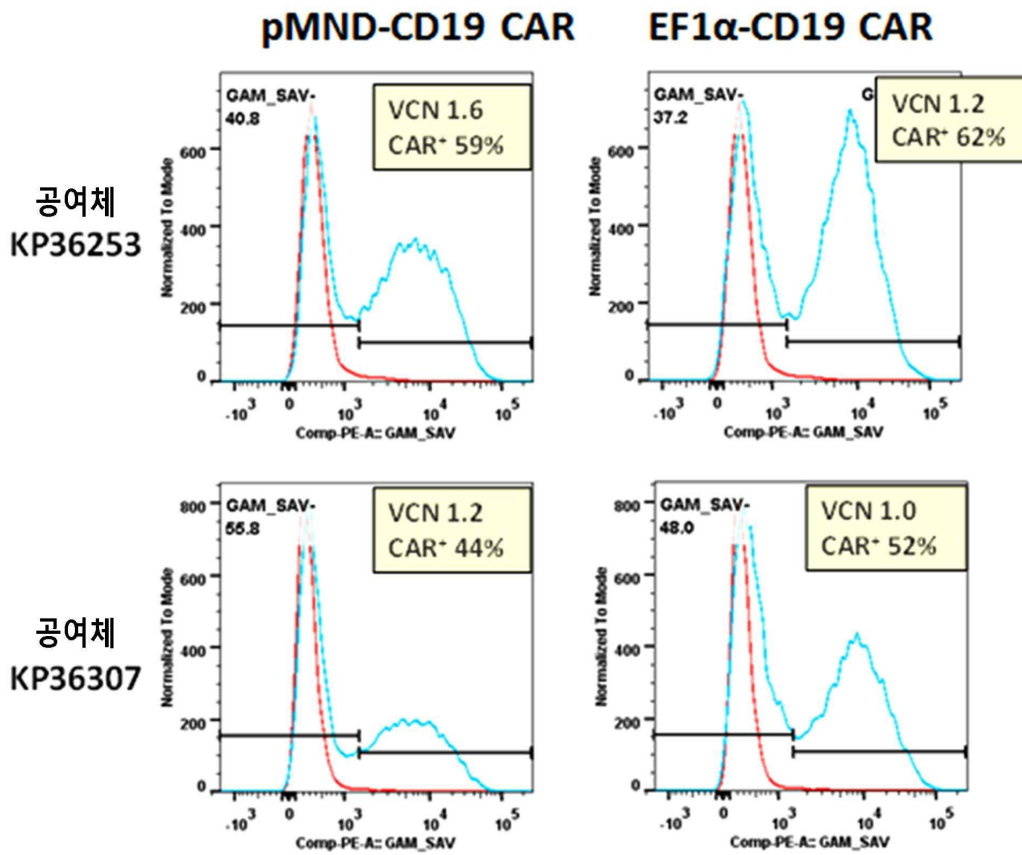
도면2



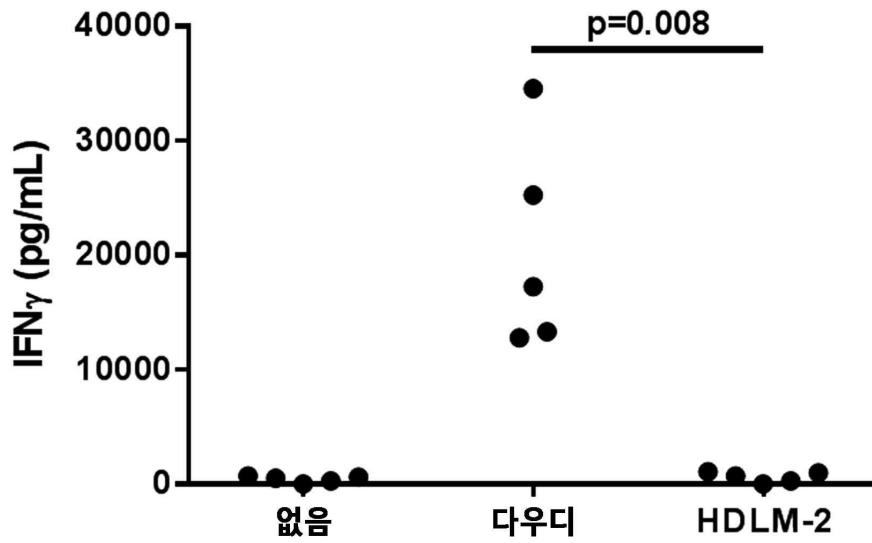
도면5



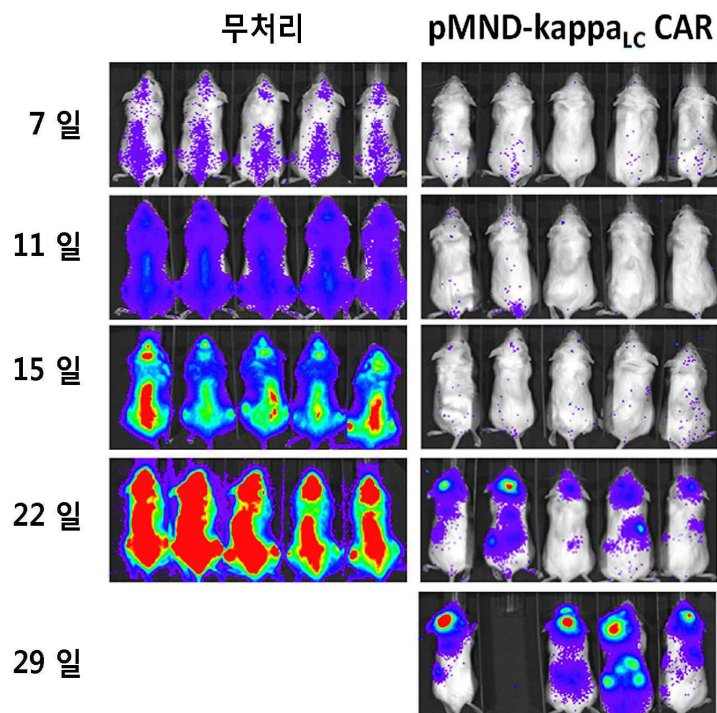
도면6



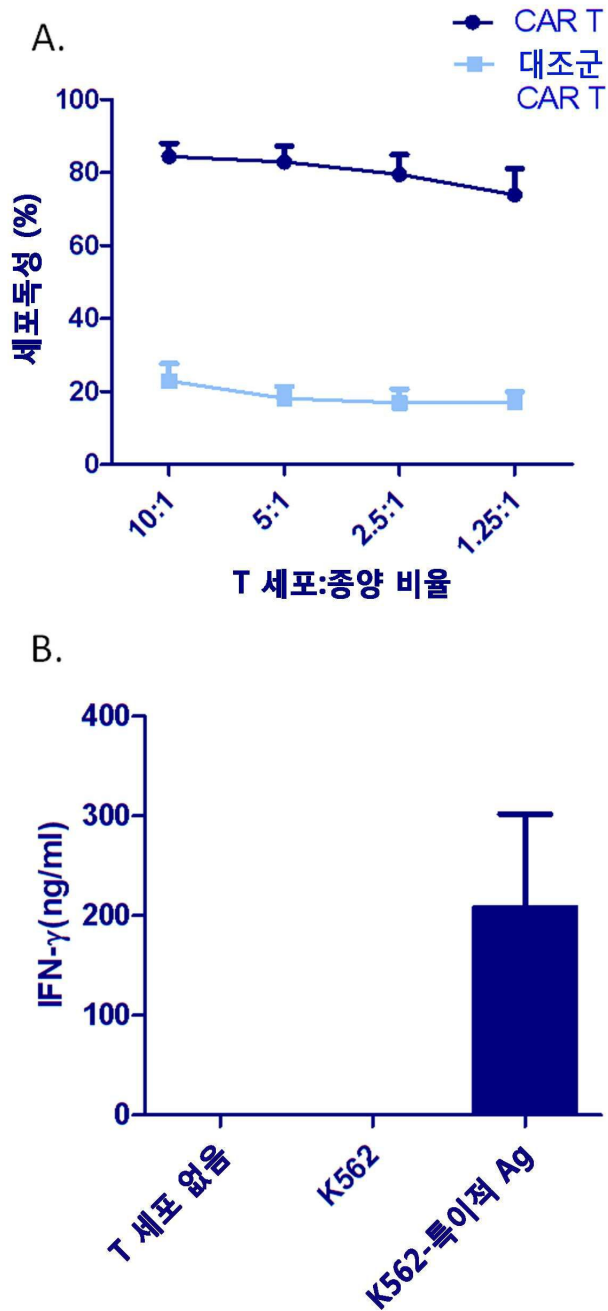
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> bluebird bio, Inc.
- <120> MND PROMOTER CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS
- <130> IPA161429-US
- <150> US 61/984,561
- <151> 2014-04-25
- <160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide sequence the myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control region deleted, dl587rev primer-binding site substituted (MND) promoter

<400> 1

```

tttatttagt ctccagaaaa aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct      60
aggatcaagg ttaggaacag agagacagca gaatatgggc caaacaggat atctgtggta      120
agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagttggaa cagcagaata tgggccaaac      180
aggatatctg tggtaaagcag ttctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggteccag      240
atgcgggtccc gcctcagca gtttctagag aaccatcaga tgtttccagg gtgcccacag      300
gacctgaaat gaccctgtgc cttattttaa ctaaccaatc agttcgttc tcgcttctgt      360
tcgcgcgctt ctgctcccc agctcaataa aagagccca      399
    
```

<210> 2

<211> 7425

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide sequence of a MND promoter anti-CD19 CAR construct

<400> 2

```

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca      60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg      120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc      180
accatcatat gccagcctat ggtgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat      240
tacggggtea ttagttcata gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa      300
tgcccgcctt ggctgaccgc ccaacgacc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt      360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggtg      420
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt      480
caatgacggt aatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgacctat gggactttcc      540
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggtgatgc ggttttggca      600
    
```

gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 660
 tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aatcaacgg gactttcaa aatgtcgtaa 720
 caactccgcc ccattgacgc aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag 780

 cagagctcgt ttagtgaacc gggctctctct ggttagacca gatctgagcc tgggagctct 840
 ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgctcaaag 900
 tagtggtgtc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt 960
 cagtgtggaa aatctctagc agtggcgccc gaacaggac ttgaaagcga aagtaaagcc 1020
 agaggagatc tctcgacgca ggactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg 1080
 gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt gactagcggg ggctagaagg agagagtagg 1140
 gtgcgagagc gtcggtatta agcggggggag aattagataa atgggaaaaa attcggttaa 1200

 ggccaggggg aaagaaacaa tataaactaa aacatatagt tagggcaagc agggagctag 1260
 aacgattcgc agttaatcct ggccttttag agacatcaga aggctgtaga caaatactgg 1320
 gacagctaca accatccctt cagacaggat cagaagaact tagatcatta tataatacaa 1380
 tagcagtccct ctattgtgtg catcaaagga tagatgtaaa agacaccaag gaagccttag 1440
 ataagataga ggaagagcaa aacaaaagta agaaaaaggc acagcaagca gcagctgaca 1500
 caggaacaa cagccaggtc agccaaaatt accctatagt gcagaacctc caggggcaaa 1560
 tggtagatca ggccatatca cctagaactt taaattaaga cagcagtaca aatggcagta 1620

 ttcatccaca attttaaag aaaagggggg attggggggt acagtcagg gaaagaata 1680
 gtagacataa tagcaacaga catacaaaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt 1740
 caaaattttc gggtttatta caggacagc agagatccag tttggaaagg accagcaaag 1800
 ctctctgga aagtgaaagg ggcagtagta atacaagata atagtgacat aaaagtagtg 1860
 ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt 1920
 gtggcaagta gacaggatga ggattaacac atggaaaaga ttagtaaac accatagctc 1980
 tagagcgatc ccgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt ggagaagtga 2040

 attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 2100
 gagaagagtg gtcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 2160
 ctgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 2220
 acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 2280
 acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 2340
 tgtgaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttct ctggaaaact 2400

catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggacacagat 2460

 ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttgg 2520
 aggtttaaga atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc 2580
 accattatcg tttcagacct acctcccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2640
 agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatccat 2700
 cgattagtcc aatttgtaa agacaggata tcagtgggcc aggcctctagt ttgactcaa 2760
 caatatcacc agctgaagcc tatagagtac gagccataga tagaataaaa gattttattt 2820
 agtctccaga aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctaggatca 2880

 aggttaggaa cagagagaca gcagaatat ggccaacag gatatctgtg gtaagcagtt 2940
 cctgccccgg ctcagggccca agaacagttg gaacagcaga atatgggcca aacaggatat 3000
 ctgtggtaag cagtctctgc cccggctcag ggccaagaac agatgggtccc cagatcgggt 3060
 cccgacctca gcagtttcta gagaacctc agatgtttcc agggtgcccc aaggacctga 3120
 aatgaccctg tgccttattt gaactaacca atcagttcgc ttctcgcttc tgttcgcgcg 3180
 ctctcgctcc ccgagctcaa taaaagagcc cacaaccct cactcggcgc gacgcgtcat 3240
 agccaccatg gccttaccag tgaccgcctt gctcctgccg ctggccttgc tgctccacgc 3300

 cgccaggccg gacatccaga tgacacagac tacatctccc ctgtctgcct ctctgggaga 3360
 cagagtcacc atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca 3420
 gcagaaacca gatggaactg ttaaactcct gatctacat acatcaagat tacactcagg 3480
 agtcccatca aggttcagtg gcagtggttc tggacacagat tattctctca ccattagcaa 3540
 cctggagcaa gaagatatg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac 3600
 gttcggaggg gggaccaagc tggagatcac aggtggcggg ggctccggcg gtggtgggtc 3660
 tgggtggcgc ggaagcgagg tgaaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgcctc 3720

 acagagcctg tccgtcacat gcactgtctc aggggtctca ttaccgact atggtgtaag 3780
 ctggattcgc cagcctccac gaaaggtctt ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga 3840
 aaccacatac tataattcag ctctcaaatc cagactgacc atcatcaagg acaactcca 3900
 gagccaagtt ttcttaaaaa tgaacagtct gaaaactgat gacacagcca ttactactg 3960
 tgccaaacat tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc 4020
 ggtcaccgtc tcctcaacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat 4080
 cgctcgcag ccctgtccc tgcgccaga ggctgcccgg ccagcggcgg gggcgcagt 4140

gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tatctacatc tgggcgcctt tggccgggac 4200
 ttgtggggtc ctctcctgt cactggtgat caccctttac tgcaaacggg gcagaaagaa 4260
 actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga 4320
 tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt 4380
 cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct 4440
 caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga 4500
 gatgggggga aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa 4560

agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa 4620
 ggggcacgat ggccctttacc agggctctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct 4680
 tcacatgcag gccctgcccc ctgcgtaatg acaggtacct ttaagaccaa tgacttaaa 4740
 ggcagctgta gatcttagcc actttttaaa agaaaagggg ggactggaag ggctaattca 4800
 ctcccaaaga agacaagatc tgctttttgc ctgtactggg tctctctggt tagaccagat 4860
 ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg cttaacctc aataaagctt 4920
 gccttgagtg cttcaatgtg tgtgttgggt ttttgtgtgt cgaaattcta gcgattctag 4980

cttggcgtac cagcctatgg cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa 5040
 gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact 5100
 gcccgccttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 5160
 ggggagagggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg 5220
 ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc 5280
 cacagaatca ggggataacg caggaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 5340
 gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca 5400

tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg gcgaaaccg acaggactat aaagatacca 5460
 ggcgtttccc cciggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg 5520
 atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag 5580
 gtatctcagt tcgggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 5640
 tcagcccgac cgctgcgctt tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca 5700
 cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 5760
 cgggtctaca gagtcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa gaacagtatt 5820

tggtatctgc gctctgctga agccagttac ctccgaaaa agagttgta gctcttgatc 5880
 cggcaaaaca accaccgctg gtagecgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg 5940
 cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg 6000

gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta 6060
 gatcctttta aattaaaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg 6120
 gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg 6180
 ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc 6240

 atctggcccc agtgctgcaa tgataccgag agaccacgc tcaccggctc cagatttacc 6300
 agcaataaac cagccagccg gaaggccgga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 6360
 ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 6420
 ttgacgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgttggtg tcacgctcgt cgtttggtat 6480
 ggcttcattc agctccggtt cccaacgac aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg 6540
 caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttctc agaagtaagt tggccgcagt 6600
 gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 6660

 atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg 6720
 accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt 6780
 aaaagtgcct atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct 6840
 gttgagatcc agttcgatg aaccactcgc tgcaccaac tgatcttcag catcttttac 6900
 tttcaccage gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggat 6960
 aaggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat 7020
 ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catattgaa tgtatttaga aaaataaaca 7080

 aataggggtt ccgcgacat ttccccgaaa agtgccacct gggactagct ttttgcaaaa 7140
 gcctaggcct ccaaaaaagc ctctcacta ctctggaat agctcagagg ccgagcggc 7200
 ctcgccctct gcataaataa aaaaaattag tcagccatgg ggcggagaat gggcggaact 7260
 gggcggagtt agggcggga tggcggagt tagggcggg actatggttg ctgactaatt 7320
 gagatgagct tgcatgccga cattgattat tgactagtcc ctaagaaacc attcttatca 7380
 tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggcctt tcgtc 7425

<210> 3

<211> 7450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide sequence of a MND promoter anti-kappa light chain

CAR construct.

<400> 3

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatcatat gccagcctat ggtgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300
tggcccgcct ggetgaccgc ccaacgacce cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420
aactgccac ttggcagtac atcaagtgtat tcatatgccca agtaccccc ctattgacgt 480
caatgacggt aaatggcccc cctggcattat tgcccagtag atgacctat gggactttcc 540
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca 600
gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 660
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 720
caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag 780

cagagctcgt ttagtgaacc gggctctctt ggttagacca gatctgagcc tgggagctct 840
ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgctcaaag 900
tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt 960
cagtggtgaa aatctctagc agtggcgcgc gaacagggac ttgaaagcga aagtaaagcc 1020
agaggagatc tctcgacgca ggactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg 1080
gcggcgactg gtgagtacgc caaaaattt gactagcgga ggctagaagg agagagtagg 1140
gtcgcgagagc gtcggtatta agcgggggag aattagataa atgggaaaaa attcgttaa 1200

ggccaggggg aaagaaacaa tataaactaa aacatatagt tagggcaagc agggagctag 1260
aacgattcgc agttaatcct ggccttttag agacatcaga aggetgtaga caaatactgg 1320
gacagctaca accatccctt cagacaggat cagaagaact tagatcatta tataatacaa 1380
tagcagtcct ctattgtgtg catcaaagga tagatgtaaa agacaccaag gaagccttag 1440
ataagataga ggaagagcaa aacaaaagta agaaaaagc acagcaagca gcagctgaca 1500
caggaacaa cagccaggtc agccaaaat acctatagt gcagaacctc caggggcaaa 1560
tggtacatca ggccatata cctagaactt taaattaaga cagcagtaca aatggcagta 1620

ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggg acagtgcagg ggaaagaata 1680
gtagacataa tagcaacaga catacaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt 1740
caaaaatttc gggtttatta cagggacagc agagatccag tttggaaagg accagcaaag 1800
ctcctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata atagtacat aaaagtatg 1860

ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt 1920
 gtggcaagta gacaggatga ggattaacac atggaaaaga ttagtaaaac accatagctc 1980
 tagagcgatc ccgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt ggagaagtga 2040

attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 2100
 gagaagagtgt gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 2160
 ctggggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacagccag 2220
 acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgagcgca 2280
 acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 2340
 tgtggaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 2400
 catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 2460

ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttgg 2520
 aggtttaaga atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc 2580
 accattatcg tttcagaccc acctccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2640
 agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatccat 2700
 cgattagtcc aatttgtaa agacaggata tcagtgttcc aggctctagt ttgactcaa 2760
 caatatcacc agctgaagcc tatagagtac gagccataga tagaataaaa gattttattt 2820
 agtctccaga aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctaggatca 2880

aggttaggaa cagagagaca gcagaatatg ggccaacag gatatctgtg gtaagcagtt 2940
 cctgccccgg ctgaggcca agaacagttg gaacagcaga atatgggcca aacaggatat 3000
 ctgtggaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggtccc cagatgcggt 3060
 cccgccctca gcagtttcta gagaaccatc agatgtttcc agggtgcccc aaggacctga 3120
 aatgacctg tgccttattt gaactaacca atcagttcgc ttctcgcttc tgttcgcgcg 3180
 cttctgctcc ccgagctcaa taaaagagcc cacaaccct cactcggcgc gacgcgttag 3240
 ccacatgga gtttgggctg agctggcttt ttcttgggc tattttaaa ggtgtccagt 3300

gcatggttat gctgaccaa actccactct cctgcctgt cagtcttga gatcaagcct 3360
 ccatctcttg cagatctagt cagagcattt tacatagtac tggagacacc tatttagaat 3420
 ggtacctgca gaaaccaggc cagtctccaa agctcctgat caacaaagt tccaatcgat 3480
 tgtctgggt cccagacagg ttcagtgga gtggatcagg gacagattc aactcaaga 3540
 tcagcagagt ggaggctgag gatctgggag ttattactg ctttcaaggt tcacatgttc 3600
 cgtggacgtt cgggtggaggc accaagctgg aatcaaacg ggctgatgct gcaccaactg 3660

tatccatctt cccaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc ggcggatcac 3720

aggtgaagct tcagcagtca ggacctagcc tggagaagcc tggggcttca gtgaagatgt 3780

cctgcaagge ttctggatac accttactg acttctacat gaagtgggtg aagcagagcc 3840

atggaagag ccttgagtgg attggagata ttaatcctaa cattggtgat actttctaca 3900

accagaaatt caagggcaag gccacattga ctgtcgacaa atcctccagc acagcctaca 3960

tgcagctcaa cagcctgaca tctgaggact ctgcagtcta tttctgttca gttgggtact 4020

tcgatgtctg gggcgcaggg accacggtca ccgtctctc aaccacgacg ccagcggcgc 4080

gaccaccaac accggcgccc accatcgct cgcagcccct gtcctgcgc ccagaggcgt 4140

gccggccagc ggcggggggc gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgatatct 4200

acatctgggc gcccttgcc gggacttgtg gggctcttct cctgtcactg gtgatcaccc 4260

tttactgcaa acggggcaga aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac 4320

cagtacaac tactcaagag gaagatggct gtagctgccg atttcagaa gaagaagaag 4380

gaggatgtga actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgccccgcg taccagcagg 4440

gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg 4500

acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg 4560

aagcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt gagattggga 4620

tgaaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt ctcagtacag 4680

ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggcctt gccccctcgc taatgacagg 4740

taccttaag accaatgact tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa 4800

aggggggact ggaagggcta attcactccc aaagaagaca agatctgctt tttgcctgta 4860

ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctaggaacc 4920

cactgettaa gctcaataa agcttgcctt gagtgcctca atgtgtgtgt tggttttttg 4980

tgtgtcgaat ttctagcgt tctagcttgg cgtaccagcc tatggcgctc acaattccac 5040

acaacatacg agccggaagc ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac 5100

tcacattaat tgcgttgcgc tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 5160

tgcattaatg aatcgcccaa cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg cgctcttccg 5220

cttctcget cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 5280

actcaaaggc ggiataacgg ttatccacag aatcagggga taacgagga aagaacatgt 5340

gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 5400

ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 5460
 acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 5520
 ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 5580
 cgcttttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc 5640
 tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 5700
 gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggagcagcc actggtaaca 5760
 ggattagcag agcgaggtat gtaggcggig ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 5820

 acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 5880
 gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 5940
 ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 6000
 tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga 6060
 gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa 6120
 tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac 6180
 ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagtgc ctgactcccc gtcgtgtaga 6240

 taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgagagacc 6300
 cacgctcacc ggtccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca 6360
 gaagtggtec tgcaacttta tccgcteca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta 6420
 gagtaagtag ttcgccagt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg 6480
 tgggtgcacg ctcgctgctt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc 6540
 gaggttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggt cctccgatcg 6600
 ttgtcagaag taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt 6660

 ctcttactgt catgceatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt 6720
 cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata 6780
 ataccgccc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc 6840
 gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacce actcgtgcac 6900
 ccaactgac ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa 6960
 ggcaaaatgc cgcaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct 7020
 tcctttttca atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc ggatacatat 7080

 ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc 7140
 cacctgggac tagctttttg caaaagccta ggcctccaaa aaagcctct cactactct 7200
 ggaatagctc agaggccgag gcggcctcgg cctctgcata aataaaaaaa attagtcagc 7260

catggggcgg agaatgggcg gaactgggcg gagttagggg cgggatgggc ggagttaggg 7320
 gcgggactat ggttgctgac taattgagat gagcttgcac gccgacattg attattgact 7380
 agtcctaag aaaccattct tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tadcacgagg 7440
 ccctttcgtc 7450

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 4

Asp Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 5

Thr Gly Glu Lys Pro

1 5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 6

Gly Gly Arg Arg

1

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 8

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp

1 5 10

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 9

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

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 10

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 11

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro

1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 12

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

1 5 10

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 13

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

1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide cleavage sequences

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> Xaa = Any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Gly or Ser

<400> 14

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide cleavage sequences

<400> 15

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide cleavage sequences

<400> 16

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1 5

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 17

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 18

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 19

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

1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 20

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

1 5 10 15

Pro

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 21

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

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 22

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 22

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 23

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 23

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro

1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys

20

25

30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr

35

40

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 24

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

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 25

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 25

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val

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

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic self-cleaving polypeptide

<400> 26

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu

1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 20 25 30

Pro

<210> 27

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus Kozak sequence

<400> 27

gccrccatgg

10