



등록특허 10-2526538



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월28일
(11) 등록번호 10-2526538
(24) 등록일자 2023년04월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 14/54* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 14/735* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

- (52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7000382

(22) 출원일자(국제) 2016년06월10일
심사청구일자 2020년08월25일

(85) 번역문제출일자 2018년01월05일

(65) 공개번호 10-2018-0008862

(43) 공개일자 2018년01월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/036991

(87) 국제공개번호 WO 2016/201304

국제공개일자 2016년12월15일

(30) 우선권주장

62/173,701 2015년06월10일 미국(US)

62/337,044 2016년05월16일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20080247990 A1*

Frontiers in Immunology, vol.6, Article.195,
pp.1~6(2015)*Experimental Hematology, vol.33,
pp.159~164(2005)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

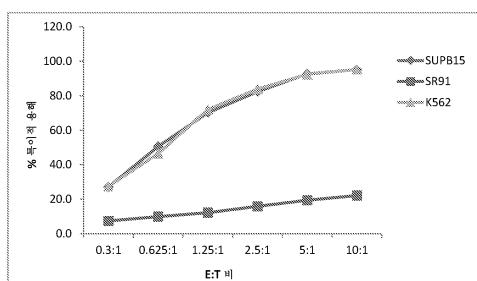
전체 청구항 수 : 총 34 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 암을 치료하기 위한 변형된 NK-92 세포

(57) 요약

적어도 하나의 CAR 및 적어도 하나의 Fc 수용체를 발현하는 NK-92 세포가 본원에 제공된다. 또한 NK-92 세포로 치료가능한 질환, 예컨대 암을 갖거나 또는 갖는 것으로 추측되는 환자의 치료 방법이 제공되며, 이는 환자에게 NK-92-Fc-CAR을 투여하는 것을 포함한다.

대 표 도 - 도1c

(52) CPC특허분류

C07K 14/54 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70535 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C12N 2501/2301 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 하나의 Fc 수용체 및 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형된 NK-92 세포이며, 이에 따라 적어도 하나의 Fc 수용체 및 적어도 하나의 CAR이 NK-92 세포의 세포 표면 상에 디스플레이되고, CAR이 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 것인 NK-92 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, Fc 수용체가 Fc γ RIII-A (CD16) 또는 CD16의 성숙 형태의 위치 158에 발린을 갖는 CD16 폴리펩티드인 NK-92 세포.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, Fc 수용체가 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인 NK-92 세포.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 시토카인을 추가로 발현하는 NK-92 세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 시토카인이 인터류킨-2 또는 그의 변이체인 NK-92 세포.

청구항 9

제7항에 있어서, 시토카인이 내형질 세망에 표적화되는 것인 NK-92 세포.

청구항 10

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 수용체 및 CAR이 상이한 백터에 코딩되는 것인 NK-92 세포.

청구항 11

NK-92 세포주의 세포가 적어도 하나의 Fc 수용체 및 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형된 NK-92 세포주이며, 이에 따라 Fc 수용체 및 CAR이 NK-92 세포의 세포 표면 상에 디스플레이되는 것이고, CAR이 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 것인 NK-92 세포주.

청구항 12

제11항에 있어서, Fc 수용체가 Fc γ RIII-A (CD16) 또는 CD16의 성숙 형태의 위치 158에 발린을 갖는 CD16 폴리펩티드인 NK-92 세포주.

청구항 13

삭제

청구항 14

제11항에 있어서, Fc 수용체가 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인 NK-92 세포주.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제11항, 제12항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 시토카인을 추가로 발현하는 NK-92 세포주.

청구항 18

제17항에 있어서, 시토카인이 인터류킨-2 또는 그의 변이체인 NK-92 세포주.

청구항 19

제17항에 있어서, 시토카인이 내형질 세망에 표적화되는 것인 NK-92 세포주.

청구항 20

제11항, 제12항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 수용체 및 CAR이 상이한 벡터에 코딩되는 것인 NK-92 세포주.

청구항 21

제11항, 제12항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 세포주의 세포가 10회 미만의 집단 배가를 겪는 것인 NK-92 세포주.

청구항 22

제11항, 제12항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 10 U/ml 미만의 IL-2를 함유하는 배지 중에서 배양되는 것인 NK-92 세포주.

청구항 23

소정량의 제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항의 NK-92 세포 또는 제11항, 제12항 및 제14항 중 어느 한 항의 NK-92 세포주를 포함하는 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 적어도 하나의 모노클로날 항체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 적어도 하나의 모노클로날 항체가 네이키드 모노클로날 항체, 접합된 모노클로날 항체 또는 이중특이적 모노클로날 항체인 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, 모노클로날 항체가 알레트주맙, 리툭시맙, 트라스투주맙, 이브리튜모맙, 브렌툭시맙, 겹투주맙, 아도트라스투주맙, 블리나투모맙, 아벨루맙, 다라투무맙 및 엘로투주맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 27

유효량의 제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항의 NK-92 세포 또는 제11항, 제12항 및 제14항 중 어느 한 항의 NK-92 세포주를 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 세포가 환자에게 정맥내, 복강내, 및 피하로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의해 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 29

제27항에 있어서, 유효량의 적어도 하나의 모노클로날 항체를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 모노클로날 항체가 네이키드 모노클로날 항체, 접합된 모노클로날 항체 또는 이중특이적 모노클로날 항체인 제약 조성물.

청구항 31

제29항에 있어서, 모노클로날 항체가 알렙투주맙, 리툭시맙, 트라스투주맙, 이브리투모맙, 브렌툭시맙, 켐투주맙, 아도트라스투주맙, 블리나투모맙, 아벨루맙, 다라투무맙 및 엘로투주맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 32

제29항에 있어서, 모노클로날 항체 및 세포가 공동으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 33

제29항에 있어서, 모노클로날 항체 및 세포가 환자에게 투여하기 전에 함께 혼합되는 것인 제약 조성물.

청구항 34

제29항에 있어서, 모노클로날 항체 및 세포가 순차적으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 35

제27항에 있어서, 암이 백혈병, 림프종, 진성 다혈구혈증, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 종쇄 질환, 육종 및 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 36

제27항에 있어서, 환자의 체표면적의 $\frac{m^2}{당}$ 약 1×10^8 내지 약 1×10^{11} 개 세포가 환자에게 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 37

(a) 적어도 하나의 Fc 수용체를 세포 표면 상에 및 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 세포 표면 상에 발현하도록 변형된 NK-92 세포 및 (b) 사용에 대한 지침서를 포함하고, CAR이 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 암을 치료하기 위한 키트.

청구항 38

제37항에 있어서, (c) 적어도 하나의 모노클로날 항체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 39

제38항에 있어서, 모노클로날 항체가 네이키드 모노클로날 항체, 접합된 모노클로날 항체 또는 이중특이적 모노클로날 항체인 키트.

청구항 40

제38항에 있어서, 모노클로날 항체가 알萊투주맙, 리툭시맙, 트라스투주맙, 이브리투모맙, 브렌툭시맙, 켐투주맙, 아도트拉斯투주맙, 블리나투모맙, 아벨루맙, 다라투무맙 및 엘로투주맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키트.

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 6월 10일에 출원된 미국 가출원 번호 62/173,701 및 2016년 5월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 62/337,044에 대해 우선권의 이익을 주장하며, 이는 각각 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 자연 킬러 (NK) 세포는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구이다. 일반적으로 순환 림프구 중 약 10-15%를 나타내는 NK 세포는, 항원에 대해 비-특이적으로 및 선행 면역 감작 없이, 바이러스-감염된 세포 및 많은 악성 세포를 포함하는 표적화 세포에 결합하고 이를 사멸시킨다. 문헌 [Herberman et al., Science 214:24 (1981)]. 표적화 세포의 사멸은 세포 용해를 유도함으로써 발생한다. 이러한 목적에 사용된 NK 세포는 대상체로부터의 혈액의 말초 혈액 림프구 ("PBL") 분획으로부터 단리되고, 충분한 수의 세포를 수득하기 위해 세포 배양으로 확대되고, 이어서 대상체 내에 재주입된다. NK 세포는 생체외 요법 및 생체내 치료 둘 다에 다소 효과적인 것으로 보여졌다. 그러나, 이러한 요법은 모든 NK 세포가 세포용해성이지는 않고 요법이 치료된 환자에 대해 특이적이라는 사실에 의해 복잡해진다.

[0004] 암의 경우, 종양 세포를 동일한 조직으로부터 유래된 정상 세포로부터 구별하는 표현형 변화는 종종 특정한 유전자 산물의 발현에서의 하나 이상의 변화와 연관되며, 이는 정상 세포 표면 성분의 상실 또는 다른 것 (즉, 상응하는 정상, 비-암성 조직에서는 검출불가능한 항원)의 수득을 포함한다. 신생물성 또는 종양 세포에서 발현되나, 정상 세포에서는 발현되지 않거나, 또는 신생물성 세포에서 정상 세포에서 발견된 것을 실질적으로 초과하는 수준으로 발현되는 항원은 "종양-특이적 항원" 또는 "종양-연관 항원"으로 칭하였다. 이러한 종양-특이적 항원은 종양 표현형에 대한 마커로서의 역할을 할 수 있다. 종양-특이적 항원은 3개의 주요 군에 할당될 수 있다: 암/고환-특이적 항원 (예를 들어 MAGE, BAGE, GAGE, PRAME 및 NY-ESO-1), 멜라닌세포 분화 항원 (예를 들어 티로시나제, Melan-A/MART, gp100, TRP-1 및 TRP-2) 및 돌연변이되거나 또는 이상 발현된 항원 (예를 들어 MUM-1, CDK4, 베타-카테닌, gp100-in4, p15 및 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V).

[0005] 종양-특이적 항원은 암 면역요법을 위한 표적으로서 사용되었다. 하나의 이러한 요법은, T 세포 및 NK 세포를 포함하는 면역 세포의 표면 상에 발현된 키메라 항원 수용체 (CAR)를 이용하여, 암 세포에 대한 세포독성을 개선시킨다. CAR은 적어도 하나의 세포내 신호전달 도메인에 연결된 단일-쇄 가변 단편 (scFv)을 포함한다. scFv는 표적 세포 (예를 들어, 암 세포) 상의 항원을 인식하여 결합하고, 이팩터 세포 활성화를 촉발한다.

[0006] 게다가, 모노클로날 항체 (mAb)로의 항암 치료는, 특히 화학요법과 조합되는 경우, 암을 갖는 환자에서 임상 결과를 유의하게 개선시켰다. 그러나, 암 세포는 악성 세포에 의한 항원의 제시 및 면역 세포의 존재에도 불구하고 면역-매개 거부로부터 빠져나가는 것으로 공지된다. 암 세포가 면역 균절을 빠져나가는 하나의 메카니즘은 검출을 방해하는 것이다. 예를 들어, 종양 회피 메카니즘은 손상되거나 또는 감소된 항원 제시 (예를 들어, 종양 항원의 돌연변이 또는 하향조절)를 포함하며 이는 단일 표적 요법 예컨대 CAR-발현 면역 세포 및 mAb의 효능을 감소시킨다. 이와 같이, 개선된 치료제 및 암 세포를 치료하는 방법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0007] 다중 트랜스진을 발현하도록 조작된 유전자 변형된 NK-92 세포 또는 세포주가 본원에 제공된다. 예를 들어,

NK-92 세포는 적어도 하나의 Fc 수용체 및 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 공동으로 발현하도록 변형되며, 이에 따라 적어도 하나의 Fc 수용체 및 적어도 하나의 CAR은 NK-92 세포의 세포 표면 상에 디스플레이된다.

[0008] 따라서, 본 개시내용은 NK-92 세포주를 제공하며 여기서 NK-92 세포주의 세포는 적어도 하나의 Fc 수용체 및 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형되며, 이에 따라 Fc 수용체 및 CAR은 NK-92 세포의 세포 표면 상에 디스플레이된다.

[0009] 상기한 일반적인 설명 및 다음의 상세한 설명은 예시적이고 설명적인 것이고, 개시내용의 추가의 설명을 제공하기 위한 것이다. 다른 목적, 이점 및 신규한 특징은 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0010] 목적, 특징 및 이점은 첨부된 도면과 관련하여 고려될 때, 다음의 개시내용을 참조하여 보다 용이하게 이해될 것이다.

도 1a, 1b, 및 1c는 시험관내 세포독성 검정을 보여주는 그래프이다. 도 1a는 비-전기천공된 모 NK-92 세포에 의한 표적 세포주의 사멸을 보여준다. 도 1b는 CD19-CAR을 발현하는 모 NK-92 세포에 의한 표적 세포주의 사멸을 보여준다. 도 1c는 CD19-CAR을 발현하는 CD16(158V)-ERIL2 NK-92 세포에 의한 표적 세포주의 사멸을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 적어도 하나의 Fc 수용체 및 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형된 NK-92 세포이며, 이에 따라 적어도 하나의 Fc 수용체 및 적어도 하나의 CAR이 NK-92 세포의 세포 표면 상에 디스플레이되는 것인 NK-92 세포가 본원에 제공된다. 임의로, Fc 수용체는 Fc γ RIII-A (CD16)를 포함한다. 임의로, NK-92 세포는 서열식별번호: 1 (위치 158에 폐널알라닌을 갖는 Fc γ RIII-A 또는 CD16 (F-158))과 적어도 90% 서열 동일성; 또는 서열식별번호: 2 (위치 158에 발린을 갖는 CD16 (F158V), 보다 높은 친화도 형태)에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 Fc 수용체를 발현하도록 유전자 변형된다. 전형적 실시양태에서, CD16 폴리펩티드는 위치 158에 발린을 갖는다. 임의로, NK-92 세포는 서열식별번호: 8 (CD19), 서열식별번호: 9 (CD19), 서열식별번호: 10 (CD33), 서열식별번호: 11 (CD33), 서열식별번호: 12 (CSPG-4), 또는 서열식별번호: 13 (CSPG-4)과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 CAR을 발현하도록 유전자 변형된다. 임의로, CAR은 종양-연관 항원, 예를 들어, CD19, CD20, NKG2D 리간드, CS1, GD2, CD138, EpCAM, HER-2, EBNA3C, GPA7, CD244, CA-125, MUC-1, ETA, MAGE, CEA, CD52, CD30, MUC5AC, c-Met, EGFR, FAB, WT-1, PSMA, NY-ESO1, 및 CD33을 표적화한다. 일부 실시양태에서, 세포주의 NK-92 세포는 10회 미만의 집단 배가를 겪는다.

[0012] 임의로, NK-92 세포는 시토카인, 예를 들어, 인터류킨-2 또는 그의 변이체를 추가로 발현한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7의 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현하도록 변형된다. 추가 실시양태에서, 시토카인은 내형질 세포에 표적화된다. 임의로, 세포주의 NK-92 세포는 10 U/ml 미만의 IL-2를 함유하는 배지 중에서 배양된다.

[0013] 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 NK-92 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 임의로, 본 개시내용은 상기 실시양태의 임의의 NK-92 세포 및 적어도 하나의 항체, 예를 들어, 알렙투주맙, 리툭시맙, 트라스투주맙, 이브리투모맙, 켐투주맙, 브렌툭시맙, 아도트라스투주맙, 블리나투모맙, 다라투무맙 또는 엘로투주맙의 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 네이키드 모노클로날 항체, 접합된 모노클로날 항체 또는 이중 특이적 모노클로날 항체이다.

[0014] 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 임의의 상기 실시양태의 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 환자에게 정맥내, 복강내, 및 피하로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 환자의 체표면적의 m^2 당 약 1×10^8 내지 약 1×10^{11} 개 세포가 환자에게 투여된다. 임의로, 본 개시내용의 방법은 환자에게 유효량의 적어도 하나의 모노클로날 항체, 예를 들어, 알렙투주맙, 리툭시맙, 트라스투주맙, 이브리투모맙, 켐투주맙, 브렌툭시맙, 아도트라스투주맙, 블리나투모맙, 다라투무맙 또는 엘로투주맙을 투여하는 것을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 네이키드 모노클로날 항체, 접합된 모노클로날 항체 또는 이중 특이적 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 환자에게 정맥내, 복강내, 및 피하로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의해 투여된다. 한 실시양태에서, 모노클로날 항체 및 세

포는 공동으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체 및 세포는 환자에게 투여하기 전에 함께 혼합된다. 다른 실시양태에서, 모노클로날 항체 및 세포는 순차적으로 투여된다. 다른 실시양태에서, 대상체는 모노클로날 항체가 투여되고 변형된 NK-92 세포가 모노클로날 항체의 투여 후, 예를 들어, 24시간 내에; 또는 24 내지 72시간 내에 후속적으로 투여된다.

[0015] 한 실시양태에서, 암은, 예를 들어, 백혈병 (예를 들어, 만성 B-세포 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)), 림프종 (예를 들어, 비-호지킨 림프종 (NHL)), 진성 다혈구혈증, 다발성 골수종, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 육종 또는 암종이다.

[0016] 본 개시내용은 암을 치료하는 임의의 상기 방법에 사용될 키트를 제공하며, 여기서 키트는 (a) 세포 표면 상에 적어도 하나의 Fc 수용체 및 세포 표면 상에 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형된 소정량의 NK-92 세포 및 (b) 본 개시내용의 적어도 하나의 방법을 기재하는 지침서 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 적어도 하나의 모노클로날 항체를 추가로 포함한다.

[0017] 본 설명을 읽은 후, 다양한 대안적 실시양태 및 대안적 적용을 어떻게 구현하는 지가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 것이다. 그러나, 모든 실시양태가 본원에 기재되는 것은 아니다. 여기서 제시된 실시양태는 제한이 아니라 단지 예시로서 제시된다는 것이 이해될 것이다. 이와 같이, 다양한 대안적 실시양태의 이러한 상세한 설명은 본원에 제시된 바와 같은 본 개시내용의 범주 또는 폭을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 하기 기재된 측면은 이와 같이 특정 조성물, 이러한 조성물의 제조 방법, 또는 그의 용도로 제한되지는 않는 것은 물론 변경될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0018] 용어

[0019] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0020] 본 명세서 및 하기 청구범위에서, 하기 의미를 갖는 것으로 정의될 수 있는 다수의 용어가 언급될 것이다.

[0021] 본원에 사용된 용어는 특정한 실시양태를 기재하기 위한 것일 뿐이며 제한하고자 함은 아니다. 본원에 사용된 단수 형태는, 문맥이 명확하게 달리 나타내지 않는 한, 복수 형태 또한 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 예를 들어, "자연 킬러 세포"에 대한 언급은 복수의 자연 킬러 세포를 포함한다.

[0022] 숫자로 나타낸 모든 명칭, 예를 들어 pH, 온도, 시간, 농도 양, 및 분자량 (범위 포함)은 적절한 경우에 0.1 또는 1.0의 증분에 의해 (+) 또는 (-)로 달라지는 근사치이다. 항상 분명하게 언급되지는 않지만, 숫자로 나타낸 명칭 모두는 그 앞에 용어 "약"이 있는 것으로 이해해야 한다.

[0023] 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 바와 같이, 임의의 및 모든 목적을 위해, 특히 서면 기재사항을 제공하는 관점에서, 본원에 개시된 모든 범위는 또한 임의의 및 모든 가능한 하위범위 및 그의 하위범위의 조합을 포함한다. 임의의 열거된 범위는 동일한 범위가 적어도 2등분, 3등분, 4등분, 5등분, 10등분 등으로 분해되는 것을 충분하게 기재하고 가능하게 함으로써 용이하게 인식될 수 있다. 비-제한적 예로서, 본원에 논의된 각각의 범위는 하위 3분의 1, 중간 3분의 1 및 상위 3분의 1 등으로 용이하게 분해될 수 있다. 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 바와 같이, 모든 언어 예컨대 "최대", "적어도", "초과", "미만" 등은 언급된 수를 포함하고, 상기 논의된 바와 같은 하위범위로 후속적으로 분해될 수 있는 범위를 지칭한다. 최종적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 바와 같이, 범위는 각각의 개별 구성원을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 1-3개 세포를 갖는 군은 1, 2, 또는 3개 세포를 갖는 군을 지칭한다. 유사하게, 1-5개 세포를 갖는 군은 1, 2, 3, 4, 또는 5개 세포를 갖는 군 등을 지칭한다.

[0024] 항상 명확하게 언급되지는 않지만, 본원에 기재된 시약은 단지 예시적인 것이고, 그의 등가물이 관련 기술분야에 공지되어 있다는 것을 이해해야 한다.

[0025] "임의의" 또는 "임의로"는 후속적으로 기재되는 사건 또는 상황이 발생할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다는 것, 및 그 기재가 사건 또는 상황이 발생하는 경우 및 그렇지 않은 경우를 포함한다는 것을 의미한다.

[0026] 용어 "포함하는"은 조성물 및 방법이 열거된 요소를 포함하나, 다른 요소는 제외하지 않음을 의미하는 것으로 의도된다. 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용되는 경우의 "로 본질적으로 이루어지는"은 조합에 대해 임의의 본질적인 유의성이 있는 다른 요소를 제외하는 것을 의미할 것이다. 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 요소로 본질적으로 이루어지는 조성물은 청구범위의 기본 및 신규 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 다른 요소는 제외하지 않을 것이다. "~로 이루어지는"은 미량보다 많은 다른 성분 및 실질적인 방법 단계를 제

외하는 것을 의미할 것이다. 각각의 이들 전환 용어에 의해 정의된 실시양태는 개시내용의 범주 내에 포함된다.

[0027] 본원에 사용된 "공동" 또는 "공동으로"는 적어도 2종의 작용체 (예를 들어 NK-92-Fc-CAR 세포 및 모노클로날 항체)의 동시의 또는 거의 동시의 투여를 지칭한다.

[0028] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 목적하는 치료 효과를 달성하기에 충분한 조성물의 양, 예를 들어, 암 세포 또는 암과 연관된 하나 이상의 증상의 호전을 일으키는 양을 지칭한다. 치료 용도의 맥락에서, 대상체에게 투여되는 NK-92 세포 또는 항체의 양은 암의 유형 및 진행, 및 개체의 특징, 예컨대 전반적 건강, 연령, 성별, 체중 및 내약성에 따라 달라질 것이다. 이는 또한 질환의 정도, 중증도 및 유형에 따라 달라질 것이다. 통상의 기술자는 이들 및 다른 인자에 따라 달라지는 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. NK-92 세포는 또한 1종 이상의 추가의 치료 화합물 (예를 들어, 항체)과 조합하여 투여될 수 있다.

[0029] 본원에 사용된 용어 "발현"은 폴리뉴클레오티드가 mRNA로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA가 후속적으로 웨티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다. 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA로부터 유래되는 경우, 발현은 진핵 세포에서의 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다. 유전자의 발현 수준은 세포 또는 조직 샘플에서 mRNA 또는 단백질의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 한 측면에서, 하나의 샘플로부터의 유전자의 발현 수준은 대조군 또는 참조 샘플로부터의 그 유전자의 발현 수준과 직접적으로 비교될 수 있다. 또 다른 측면에서, 하나의 샘플로부터의 유전자의 발현 수준은 NK-92 세포의 투여 후 동일한 샘플로부터의 그 유전자의 발현 수준과 직접적으로 비교될 수 있다.

[0030] 본원에 사용된 "면역요법"은 단독으로든 또는 조합으로든 변형된 또는 비변형된 NK-92 세포, 자연 발생 또는 변형된 NK 세포 또는 T-세포의 사용을 의미하며, 이들은 표적 세포에 접촉하는 경우 세포독성을 유도할 수 있다.

[0031] 본원에 사용된 "자연 킬러 (NK) 세포"는 특정한 항원 자극의 부재 하에, 및 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 클래스에 따른 제한 없이 표적 세포를 사멸시키는 면역계의 세포이다. 표적 세포는 암 또는 종양 세포일 수 있다. NK 세포는 CD56의 존재 및 CD3 표면 마커의 부재를 특징으로 한다.

[0032] 용어 "내인성 NK 세포"는 NK-92 세포주와 구별되는 것으로서, 공여자 (또는 환자)로부터 유래된 NK 세포를 지칭하는 데 사용된다. 내인성 NK 세포는 일반적으로 NK 세포가 풍부화된 세포의 불균질 집단이다. 내인성 NK 세포는 환자의 자가 또는 동종이계 치료를 위한 것일 수 있다.

[0033] "NK-92 세포"는 비-호지킨 텁프종을 갖는 환자로부터 원래 수득된 불멸 NK 세포주인 NK-92를 지칭한다. 용어 "NK-92"는 원래의 NK-92 세포주 뿐만 아니라 (예를 들어, 외인성 유전자의 도입에 의해) 변형된 NK-92 세포주를 지칭하도록 의도된다. NK-92 세포 및 그의 예시적이고 비-제한적인 변형은 미국 특허 번호 7,618,817; 8,034,332; 및 8,313,943 (이들 모두는 그의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0034] "변형된 NK-92 세포"는 Fc 수용체, CAR, IL-2 및/또는 자살 유전자를 포함하는 트랜스진을 코딩하는 벡터를 추가로 포함하는 NK-92 세포를 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 변형된 NK-92 세포는 적어도 하나의 트랜스제닉 단백질을 발현한다.

[0035] 본원에 사용된 "비-조사된 NK-92 세포"는 조사되지 않은 NK-92 세포이다. 조사는 세포를 성장 및 증식하지 못하게 한다. 조사와 주입 사이의 시간이 최적의 활성을 보존하기 위해 4시간보다 길지 않아야 하기 때문에, NK-92 세포는 치료 시설 또는 환자의 치료 전의 일부 다른 포인트에서 조사될 것이 고려된다. 대안적으로, NK-92 세포는 또 다른 메카니즘에 의해 비활성화될 수 있다.

[0036] 본원에 사용된 NK-92 세포의 "불활성화"는 그들을 성장하지 못하게 한다. 불활성화는 또한 NK-92 세포의 사멸과 관련될 수 있다. NK-92 세포가 치료적 적용에서 병리상태와 관련된 세포의 생체외 샘플을 효과적으로 퍼징한 후에, 또는 그들이 신체 내에 존재하는 많은 또는 모든 표적 세포를 효과적으로 사멸시키기에 충분한 기간 동안 포유동물의 신체 내에 체류한 후에 불활성화될 수 있다는 것이 고려된다. 불활성화는 비-제한적인 예로서 NK-92 세포가 그에 대해 감수성인 불활성화제를 투여함으로써 유도될 수 있다.

[0037] 본원에 사용된 용어 "세포독성" 및 "세포용해"는 이펙터 세포 예컨대 NK 세포의 활성을 기재하는 데 사용되는 경우, 동의어이도록 의도된다. 일반적으로, 세포독성 활성은 임의의 다양한 생물학적, 생화학적 또는 생물물리학적 메카니즘에 의한 표적 세포의 사멸과 관련된다. 세포용해는 보다 구체적으로 이펙터가 표적 세포의 형질막을 용해시키고, 그에 따라 그의 물리적 완전성을 파괴하는 활성을 지칭한다. 이는 표적 세포의 사멸을 일으킨다. 이론에 얹매이는 것을 원하지는 않으나, NK 세포의 세포독성 효과는 세포용해로 인한 것으로 여겨진다.

- [0038] 세포/세포 집단에 대한 용어 "사멸"은 그 세포/세포 집단의 사멸에 이르게 할 임의의 유형의 조작을 포함하도록 지시된다.
- [0039] 용어 "Fc 수용체"는 Fc 영역으로 공지된 항체의 부분에 결합함으로써 면역 세포의 보호 기능에 기여하는 특정 세포 (예를 들어, 자연 킬러 세포)의 표면 상에서 발견되는 단백질을 지칭한다. 세포의 Fc 수용체 (FcR)에 대한 항체의 Fc 영역의 결합은 항체-매개 식세포작용 또는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 통해 세포의 식세포작용 또는 세포독성 활성을 자극한다. FcR은 그들이 인식하는 항체의 유형에 기초하여 분류된다. 예를 들어, Fc-감마 수용체 (Fc γ R)는 항체의 IgG 클래스에 결합한다. Fc γ RIII-A (또한 CD16으로도 불림)는 IgG 항체에 결합하여 ADCC를 활성화시키는 저친화도 Fc 수용체이다. Fc γ RIII-A는 전형적으로 NK 세포에서 발견된다. NK-92 세포는 Fc γ RIII-A를 발현하지 않는다. 천연 형태의 CD16을 코딩하는 대표적인 폴리뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 5에 제시된다.
- [0040] 본원에 사용된 용어 "키메라 항원 수용체" (CAR)는 세포내 신호전달 도메인에 융합된 세포외 항원-결합 도메인을 지칭한다. CAR은 T 세포 또는 NK 세포에서 발현되어 세포독성을 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 세포외 항원-결합 도메인은 관심 세포에서 발견된 항원에 특이적인 scFv이다. CAR-발현 NK-92 세포는 scFv 도메인의 특이성에 기초하여, 세포 표면 상에 특정 항원을 발현하는 세포에 표적화된다. scFv 도메인은 종양-특이적 항원을 포함하는 임의의 항원을 인식하도록 조작될 수 있다.
- [0041] 본원에 사용된 용어 "종양-특이적 항원"은 암 또는 신생물성 세포에 존재하나 암 세포와 동일한 조직 또는 계열로부터 유래된 정상 세포에서는 검출가능하지 않은 항원을 지칭한다. 본원에 사용된 종양-특이적 항원은 또한 종양-연관 항원, 즉 암 세포 상에서 암 세포와 동일한 조직 또는 계열로부터 유래된 정상 세포에 비해 보다 높은 수준으로 발현되는 항원을 지칭한다.
- [0042] 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"는 상호교환가능하게 사용되고, 임의의 길이의 중합체 형태의 뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 또는 이들의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고 공지되거나 또는 공지되지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 하기는 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편 (예를 들어, 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 폴리뉴클레오티드의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에는 비-뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 이 용어는 또한 이중- 및 단일-가닥 분자 둘 다를 지칭한다. 달리 특정되거나 또는 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오티드는 이중-가닥 형태 및 이중-가닥 형태를 구성하는 것으로 공지되거나 또는 예측되는 2개의 각각의 상보성 단일-가닥 형태 둘 다를 포괄한다.
- [0043] 폴리뉴클레오티드는 4개의 뉴클레오티드 염기: 아데닌 (A); 시토신 (C); 구아닌 (G); 티민 (T); 및 폴리뉴클레오티드가 RNA인 경우 티민을 대신하는 우라실 (U)의 특정한 서열로 구성된다. 따라서, 용어 "폴리뉴클레오티드 서열"은 폴리뉴클레오티드 분자의 알파벳 표현이다.
- [0044] 본원에 사용된 "퍼센트 동일성"은 2개의 웨티드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 동일성을 지칭한다. 퍼센트 동일성은 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각각의 서열에서의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교된 서열 내 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유된 경우에, 분자는 그 위치에서 동일하다. 본원에 사용된 어구 "상동" 또는 "변이체" 뉴클레오티드 서열, 또는 "상동" 또는 "변이체" 아미노산 서열은 뉴클레오티드 수준 또는 아미노산 수준에서 적어도 명시된 백분율의 동일성을 특징으로 하는 서열을 지칭한다. 상동 뉴클레오티드 서열은 자연 발생 대립유전자 변이체 및 본원에 제시된 뉴클레오티드 서열의 돌연변이를 코딩하는 서열을 포함한다. 상동 뉴클레오티드 서열은 인간 이외의 포유동물 종의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상동 아미노산 서열은 보존적 아미노산 치환을 함유하고 폴리펩티드가 동일한 결합 및/또는 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상동 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열은 비교 서열과 적어도 60% 또는 그 초과, 예를 들어 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 적어도 85% 또는 그 초과의 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상동 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열은 비교 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상동 아미노산 서열은 15개 이하, 10개 이하, 5개 이하 또는 3개 이하의 보존적 아미노산 치환을 갖는다. 퍼센트 동일성은 예를 들어, 스미스(Smith) 및

워터맨(Waterman)의 알고리즘 (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)을 사용하는 캡 프로그램 (위스콘신 서열 분석 패키지, UNIX용 버전 8, 제네티스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 유니버시티 리서치 파크(University Research Park), 위스콘신주 매디슨)에 의해 결정될 수 있다.

- [0045] 용어 "발현"은 유전자 산물의 생산을 의미한다. 발현을 지칭하는 경우 용어 "일시적인"은 폴리뉴클레오티드가 세포의 계놈에 흔입되지 않음을 의미한다.
- [0046] 용어 "시토카인" 또는 "시토카인들"은 면역계의 세포에 영향을 미치는 생물학적 분자의 일반 클래스를 지칭한다. 예시적인 시토카인은 인터페론 및 인터류킨 (IL), 특히 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 시토카인은 IL-2이다.
- [0047] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 예를 들어 형질전환 과정에 의해 허용 세포 내에 위치되는 경우 벡터가 복제될 수 있도록 무손상 레플리콘을 포함하는 비-염색체 핵산을 지칭한다. 벡터는 하나의 세포 유형, 예컨대 박테리아에서 복제될 수 있으나, 또 다른 세포, 예컨대 포유동물 세포에서는 제한된 복제 능력을 갖는다. 벡터는 바이러스성 또는 비-바이러스성일 수 있다. 핵산을 전달하기 위한 예시적인 비-바이러스 벡터는 네이키드 DNA; 단독으로 또는 양이온성 중합체와 조합하여 양이온성 지질과 복합체화된 DNA; 음이온성 및 양이온성 리포솜; 일부 경우에 리포솜에 함유된 양이온성 중합체, 예컨대 이종 폴리리신, 규정된-길이의 올리고펩티드, 및 폴리에틸렌이민과 축합된 DNA를 포함하는 DNA-단백질 복합체 및 입자; 및 바이러스 및 폴리리신-DNA를 포함하는 3원 복합체의 사용을 포함한다.
- [0048] 본원에 사용된 용어 "표적화된"은 세포에서 또는 그의 외부에서 적절한 목적지에 단백질 또는 폴리펩티드를 지시하는 것을 포함하도록 의도되나, 이에 제한되지는 않는다. 전형적으로 표적화는 신호 펩티드 또는 표적화 펩티드를 통해 달성되며, 이는 폴리펩티드 쇄에서 아미노산 잔기의 스트레치이다. 이들 신호 펩티드는 폴리펩티드 서열 내의 어딘가에 위치될 수 있으나, 종종 N-말단에 위치된다. 폴리펩티드는 또한 C-말단에 신호 펩티드를 갖도록 조작될 수 있다. 신호 펩티드는 폴리펩티드를 세포의 구역, 형질 막에 대한 위치, 골지, 엔도솜, 내 형질 세망, 및 다른 세포 구획에 대해 지시할 수 있다. 예를 들어, 그의 C-말단에 특정한 아미노산 서열 (예를 들어, KDEL)을 갖는 폴리펩티드는 ER 루멘에 유지되거나 ER 루멘으로 다시 수송된다.
- [0049] 용어 "자살 유전자"는 세포의 음성 선택을 가능하게 하는 것이다. 자살 유전자는 유전자를 발현하는 세포가 선택적 작용제의 도입에 의해 사멸될 수 있게 하는 안전 시스템으로 사용된다. 이는 재조합 유전자가 비제어된 세포 성장을 유도하는 돌연변이를 일으키는 경우에 바람직하다. 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 (TK) 유전자, 시토신 데아미나제 유전자, 수두-조스터 바이러스 티미딘 키나제 유전자, 니트로리덕타제 유전자, 에스캐리키아 콜라이(*Escherichia coli*) gpt 유전자, 및 이. 콜라이 Deo 유전자를 포함하는 다수의 자살 유전자 시스템이 확인되었다 (또한, 예를 들어, 문헌 [Yazawa K, Fisher W E, Brunicardi F C: Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J. Surg.* 2002 July; 26(7):783-9] 참조). 한 실시양태에서, 자살 유전자는 유도성 카스파제 9 (iCas9)이다 (Di Stasi, (2011) "Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy." *N Engl J Med* 365: 1673-1683). 또한, 문헌 [Morgan, "Live and Let Die: A New Suicide Gene Therapy Moves to the Clinic" *Molecular Therapy* (2012); 20: 11-13]을 참조한다. TK 유전자는 악생형 또는 돌연변이체 TK 유전자 (예를 들어, tk30, tk75, sr39tk)일 수 있다. TK 단백질을 발현하는 세포는 간시클로비르를 사용하여 사멸될 수 있다.
- [0050] 용어 "환자", "대상체", "개체" 등은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 본원에 기재된 방법에 적용가능한 임의의 동물, 또는 시험관내이든지 또는 계내이든지 그의 세포를 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 환자, 대상체, 또는 개체는 포유동물이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 환자, 대상체, 또는 개체는 인간이다.
- [0051] 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 대상체, 예컨대 인간에서, 본원에 기재된 질환 또는 장애의 치료를 포함하고, (i) 질환 또는 장애를 억제, 즉 그의 진행을 정지시키는 것; (ii) 질환 또는 장애를 경감, 즉 장애의 퇴행을 유발하는 것; (iii) 장애의 진행을 저속화시키는 것; 및/또는 (iv) 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 진행을 억제, 경감 또는 저속화시키는 것을 포함한다. 대상체에 대한 모노클로날 항체 또는 자연 킬러 세포의 "투여하는" 또는 "투여"라는 용어는 의도된 기능을 수행하기 위해 항체 또는 세포를 임의의 경로로 도입 또는 전달하는 것을 포함한다. 투여는 세포 또는 모노클로날 항체의 전달에 적합한 임의의 경로에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 전달 경로는 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하 전달을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체 및/또는 NK-92 세포는 예를 들어, 종양 내로의 주사에 의해 종양에 직접 투여된다. 투여는 자기-투여 및 또 다른 것에 의한 투여를 포함한다.

[0052]

본원에 사용된 유효 용량 또는 양은 목적하는 효과 (예를 들어, 질환을 치료하거나 또는 예방하는 것)를 생성하는 작용제 또는 작용제를 함유하는 조성물의 용량을 의미한다. 나노입자의 정확한 용량 및 제제는 치료의 목적에 따라 달라질 것이고 공지된 기술을 사용하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 확인가능할 것이다 (예를 들어 문헌 [Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Remington (2005); 및 Pickar, Dosage Calculations (9th edition) (1999)] 참조). 예를 들어, 주어진 파라미터에 대해, 치료 유효량은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 또는 적어도 100%의 증가 또는 감소를 보여줄 것이다. 치료 효능은 또한 "-배" 증가 또는 감소로 표현될 수 있다. 예를 들어, 치료 유효량은 표준 대조군에 비해 적어도 1.2-배, 1.5-배, 2-배, 5-배, 또는 그 초과의 효과를 가질 수 있다. 치료 유효 용량 또는 양은 질환의 1종 이상의 증상을 호전시킬 수 있다. 치료 유효 용량 또는 양은 그것이 투여되는 것에 대한 효과가 질환이 발병할 위험에 있는 사람을 치료하기 위한 것인 경우에 질환 또는 질환의 1종 이상의 증상의 개시를 방지하거나 또는 지연시킬 수 있다.

[0053]

본원에 사용된 용어 "항체"는 이뮤노글로불린 또는 그의 단편을 지칭한다. 항체는 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD)을 가질 수 있다. 바람직하게는, 항체는 IgG이다. 항체는 비-인간 (예를 들어, 마우스, 염소, 또는 임의의 다른 동물로부터의 것), 완전 인간, 인간화, 또는 키메라일 수 있다. 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있다. 임의로, 항체는 모노클로날이다.

[0054]

본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 배양물에서 성장된 세포의 단일 클론으로부터 생산되고 무한대로 증식 할 수 있는 순수한 표적-특이적 항체를 지칭한다. 사용될 수 있는 모노클로날 항체는 암성 세포 상의 항원에 부착하고 이를 차단하는 네이키드 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 네이키드 모노클로날 항체는 림프구의 CD52 항원에 결합하는 알萊투주맙이다. 사용될 수 있는 모노클로날 항체에는 또한 접합된 모노클로날 항체, 예컨대 태그부착된, 표지된 또는 로딩된 항체가 포함된다. 구체적으로, 항체는 약물 또는 독소로 태그부착되거나 또는 로딩되거나, 또는 방사성 표지될 수 있다. 이러한 항체의 예는 CD20 항원을 표적화하는 이브리투모맙; CD30 항원을 표적화하는 브렌툭시맙, 및 HER2 단백질을 표적화하는 트라스투주맙을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 사용될 수 있는 다른 모노클로날 항체는 이중특이적 모노클로날 항체, 예컨대 림프종 세포의 CD19 및 T 세포의 CD3을 표적화하는 블리나투모맙이다.

[0055]

본원에 사용된 용어 "항체 단편"은 에피토프를 인식하는 항체의 임의의 부분을 지칭한다. 항체 단편은 글리코실화될 수 있다. 비-제한적 예로서, 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, rIgG 단편, 기능적 항체 단편, 상기의 단일 쇄 재조합 형태 등일 수 있다. F(ab')2, Fab, Fab' 및 Fv는 IgG 및 IgM의 가변 영역으로부터 생성될 수 있는 항원-결합 단편이다. 그들은 크기, 결합가, 및 Fc 함량이 다양하다. 단편은 세포 또는 세포주, 또는 다중 세포 또는 세포주에 의한 구성성분 (예를 들어, 중쇄 및 경쇄 부분)의 발현을 포함하는 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다. 바람직하게는, 항체 단편은 에피토프를 인식하고 Fc 영역의 충분한 부분을 함유하여 그것이 Fc 수용체에 결합할 수 있도록 한다.

[0056]

본원에 사용된 용어 "암"은 백혈병, 암종 및 육종을 포함하여, 포유동물에서 발견되는 모든 유형의 암, 신생물, 또는 악성 종양을 지칭한다. 예시적인 암은 뇌암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 두경부암, 간암, 신장암, 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 중피종, 난소암, 육종, 위암, 자궁암 및 수모세포종을 포함한다. 추가의 예는 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 난소암, 횡문근육종, 원발성 혈소판증가증, 원발성 마크로글로불린혈증, 원발성 뇌 종양, 암, 악성 체장 인슐린종, 악성 카르시노이드, 방광암, 전암성 피부 병변, 고환암, 림프종, 갑상선암, 신경모세포종, 식도암, 비뇨생식관 암, 악성 고칼슘혈증, 자궁내막암, 부신 피질암, 내분비 및 외분비 체장의 신생물 및 전립선암을 포함한다.

[0057]

표제 또는 부표제는 독자의 편의를 위해 본 명세서에 사용될 수 있으며, 이는 본 개시내용의 범주에 영향을 미치도록 의도된 것은 아니다. 추가적으로, 본 명세서에 사용된 일부 용어는 하기에 보다 구체적으로 정의되어 있다.

[0058]

NK-92 세포

[0059]

NK-92 세포주는 인터류킨 2 (IL-2)의 존재 하에 증식하는 것으로 밝혀진 고유한 세포주이다. 문헌 [Gong et al., Leukemia 8:652-658 (1994)]. 이들 세포는 다양한 암에 대해 높은 세포용해 활성을 갖는다. NK-92 세포주는 확장 후 예측가능한 수율로 광범위한 항-종양 세포독성을 갖는 동종 암성 NK 세포 집단이다. I상 임상 시험은 그의 안전성 프로파일을 확인하였다. NK-92는 비-호지킨 림프종을 앓고 있는 대상체의 혈액 중에서 발견되고 이어서 생체외에서 불멸화되었다. NK-92 세포는 NK 세포로부터 유래되나, 정상 NK 세포에 의해 디스플레

이되는 주요 억제 수용체가 결여되는 한편, 대부분의 활성화 수용체를 유지한다. 그러나, NK-92 세포는 정상 세포를 공격하지 않으며, 이들은 인간에서 허용되지 않는 면역 거부 반응을 도출하지 않는다. NK-92 세포주의 특징화는 WO 1998/49268 및 미국 특허 출원 공개 번호 2002-0068044에 개시되어 있다.

[0060] NK-92 세포주는 CD56^{브라이트}, CD2, CD7, CD11a, CD28, CD45, 및 CD54 표면 마커를 나타내는 것으로 보인다. 이는 게다가 CD1, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD14, CD16, CD19, CD20, CD23, 및 CD34 마커를 디스플레이하지 않는다. 배양물에서 NK-92 세포의 성장은 재조합 인터류킨 2 (rIL-2)의 존재에 대해 의존성이며, 1 IU/mL만큼 낮은 용량이 증식을 유지하기에 충분하다. IL-7 및 IL-12는 장기간 성장을 지원하지 않으며, IL-1α, IL-6, 종양 괴사 인자 α, 인터페론 α, 및 인터페론 γ를 포함하는 시험된 다른 시토카인도 이를 지원하지 않는다. NK-92는 심지어 1:1의 낮은 이팩터:표적 (E:T) 비에서도 높은 세포독성을 갖는다. 상기문헌 [Gong, et al.]. NK-92 세포는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection) (ATCC), 명칭 CRL-2407로 기탁되어 있다.

[0061] 이전에, 내인성 NK 세포에 대한 연구는 IL-2 (1000 IU/mL)가 운송 동안 NK 세포 활성화에 중요하나, 세포가 37 °C 및 5% 이산화탄소로 유지될 필요는 없다는 것을 나타냈다. 문헌 [Koepsell, et al., *Transfusion* 53:398-403 (2013)].

[0062] 변형된 NK-92 세포는 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 번호 7,618,817, 8,034,332, 및 8,313,943, 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0040386 (이들 모두는 그의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것들, 예컨대 야생형 NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16-γ, NK-92-CD16-ζ, NK-92-CD16(F157V), NK-92mi 및 NK-92ci를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0063] NK-92 세포는 NK 세포와 연관된 거의 모든 활성화 수용체 및 세포용해 경로를 보유하나, 이들은 그의 세포 표면 상에 CD16을 발현하지 않는다. CD16은 항체의 Fc 부분을 인식하고 결합하여 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 위해 NK 세포를 활성화시키는 Fc 수용체이다. CD16 수용체의 부재로 인해, NK-92 세포는 ADCC 메카니즘을 통해 표적 세포를 용해시킬 수 없고, 이와 같이, 내인성 또는 외인성 항체 (즉, 리툭시맙 및 헤르셉틴)의 항-종양 효과를 강화할 수 없다.

[0064] 내인성 NK 세포에 대한 연구는 IL-2 (1000 IU/mL)가 운송 동안 NK 세포 활성화에 중요하나, 세포가 37°C 및 5% 이산화탄소로 유지될 필요는 없다는 것을 나타냈다. 문헌 [Koepsell, et al., *Transfusion* 53:398-403 (2013)]. 그러나, 내인성 NK 세포는 그의 특징적인 기원 때문에 큰 부분에서 NK-92 세포와 유의하게 상이하다: NK-92는 암-유래 세포주인 반면, 내인성 NK 세포는 공여자 (또는 환자)로부터 수거되고 환자에게의 주입을 위해 처리된다. 내인성 NK 세포 체계는 이종 세포 집단인 반면, NK-92 세포는 동종 클론 세포주이다. NK-92 세포는 세포독성을 유지하면서 배양물 중에서 용이하게 증식하는 반면, 내인성 NK 세포는 그렇지 않다. 게다가, NK 세포의 내인성 이종 집단은 고 밀도로 응집하지 않는다. 게다가, 내인성 NK 세포는 NK-92 세포에 의해 발현되지 않는 CD-16 수용체를 포함하는 Fc 수용체를 발현한다.

Fc 수용체

[0065] Fc 수용체는 항체의 Fc 부분에 결합한다. 여러 Fc 수용체는 공지되어 있고, 그의 바람직한 리간드, 친화도, 발현, 및 항체에 대한 결합 후 효과에 따라 상이하다.

[0067]

표 1. 예시적인 Fc 수용체

수용체 명칭	주요 항체 리간드	리간드에 대한 친화도	세포 분포	항체에 대한 결합 후 효과
FcγRI (CD64)	IgG1 및 IgG3	고 ($K_d \sim 10^{-9} M$)	대식세포 호중구 호산구 수지상 세포	식세포작용 세포 활성화 호흡 폭발의 활성화 미생물 사멸의 유도
FcγRIIA (CD32)	IgG	저 ($K_d > 10^{-7} M$)	대식세포 호중구 호산구 혈소판 랑게르ハン스 세포	식세포작용 탈과립화 (호산구)
FcγRIIB1 (CD32)	IgG	저 ($K_d > 10^{-7} M$)	B 세포 비만 세포	식세포작용 없음 세포 활성의 억제
FcγRIIB2 (CD32)	IgG	저 ($K_d > 10^{-7} M$)	대식세포 호중구 호산구	식세포작용 세포 활성의 억제
FcγRIIIA (CD16a)	IgG	저 ($K_d > 10^{-6} M$)	NK 세포 대식세포 (특정 조직)	항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)의 유도 대식세포에 의한 시토카인 방출의 유도
FcγRIIIB (CD16b)	IgG	저 ($K_d > 10^{-6} M$)	호산구 대식세포 호중구 비만 세포 여포성 수지상 세포	미생물 사멸의 유도
FcϵRI	IgE	고 ($K_d \sim 10^{-10} M$)	비만 세포 호산구 호염기구 랑게르ハン스 세포	탈과립화 식세포작용

[0068]

			단핵구	
FcεRII (CD23)	IgE	저 (Kd > 10^{-7} M)	B 세포 호산구 랑게르ハン스 세포	가능한 부착 분자 인간 장 상피를 가로지르는 IgE 수송 알레르기성 감작을 증진시키기 위한 양성- 페드백 메카니즘 (B 세포)
FcαRI (CD89)	IgA	저 (Kd > 10^{-6} M)	단핵구 대식세포 호중구 호산구	식세포작용 미생물 사멸의 유도
Fcα/μR	IgA 및 IgM	IgM의 경우 고, IgA의 경우 중	B 세포 혈관간 세포 대식세포	세포내이입 미생물 사멸의 유도
FcRn	IgG		단핵구 대식세포 수지상 세포 상피 세포 내피 세포 간세포	IgG를 모체로부터 태아에게 태반을 통해 전달함 IgG를 모체로부터 유아에게 유액 중에 전달함 IgG를 분해로부터 보호함

[0069]

일부 실시양태에서, NK-92 세포는 세포 표면 상에서 Fc 수용체 단백질을 발현하도록 변형된다.

[0071]

일부 실시양태에서, Fc 수용체는 CD16이다. 본 개시내용의 목적을 위해, CD16의 특정한 아미노산 잔기는 서열식별번호: 2, 또는 서열식별번호: 2에 비해 한 위치에서 상이한 서열식별번호: 1을 참조하여 지정된다. 따라서, CD16 폴리펩티드의 "위치 158"의 아미노산 잔기는 CD16 폴리펩티드 및 서열식별번호: 2가 최대로 정렬되는 경우에 서열식별번호: 2 (또는 서열식별번호: 1)의 위치 158에 상응하는 아미노산 잔기이다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 성숙 형태의 단백질, 예를 들어 서열식별번호: 1의 위치 158에 페닐알라닌을 갖는 인간 CD16을 발현하도록 변형된다. 전형적인 실시양태에서, NK-92 세포는 성숙 형태의 단백질, 예를 들어 서열식별번호: 2의 위치 158에 발린을 갖는 고친화도 형태의 인간 CD16을 발현하도록 변형된다. 성숙 단백질의 위치 158은 천연 신호 웨პ티드를 포함하는 CD16 서열의 위치 176에 상응한다. 일부 실시양태에서, CD16 폴리펩티드는 서열식별번호: 3 또는 서열식별번호: 4의 전구체 (즉, 천연 신호 웨პ티드를 가짐) 폴리펩티드 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다.

[0072]

일부 실시양태에서, CD16 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 전장 CD16의 위치 176 (성숙 CD16 단백질의 위치 158에 상응함)에 페닐알라닌을 갖는, 신호 웨პ티드를 포함하는 전장 자연 발생 CD16을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 약 70% 폴리뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD16 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 위치 176 (성숙 단백질의 위치 158에 상응함)에 발린을 갖는, 신호 웨პ티드를 포함하는 전장 자연 발생 CD16을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 약 70% 폴리뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD16을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 5에 대해 적어도 70% 동일성을 갖고 신호 웨პ티드를 포함하는 전장 CD16 폴리펩티드의 위치 176을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 위치에 발린을 코딩하는 코돈을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD16을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 5와 적어도 90% 동일성을 갖고 전장 CD16의 위치 176에 발린을 코딩하는 코돈을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD16을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 5를 포함하나, 전장 CD16의 위치 176에 발린을 코딩하는 코돈을 갖는다.

[0073]

일부 실시양태에서, CD16 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 70% 동일성, 또는 적어도 80% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하고 서열식별번호: 2를 참조하여 결정된 바와 같이 위치 158에 발린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 2에

대해 적어도 90% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하고 서열식별번호: 2를 참조하여 결정된 바와 같이 위치 158에 발린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하고, 서열식별번호: 2를 참조하여 결정된 바와 같이 위치 2에 발린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 2를 코딩한다. 일부 실시양태에서, CD16 폴리뉴클레오티드는 신호 서열이 존재하거나 또는 존재하지 않는 CD16의 세포외 도메인, 또는 전장 CD16의 임의의 다른 단편, 또는 또 다른 단백질의 아미노산 서열에 융합된 CD16의 적어도 부분적인 서열을 포괄하는 키메라 수용체를 코딩한다. 다른 실시양태에서, 항-에피토프 태그 웨프티드 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 사용함으로써 세포 표면 검출을 돋기 위해 에피토프 태그 웨프티드, 예컨대 FLAG, myc, 폴리히스티딘 또는 V5가 성숙 폴리펩티드의 아미노 말단 도메인에 첨가될 수 있다.

[0074] 일부 실시양태에서, 상동 CD16 폴리뉴클레오티드의 길이는 약 150 내지 약 700, 약 750, 또는 약 800개의 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 700 내지 800개 초과의 폴리뉴클레오티드를 갖는 CD16 변이체도 본 개시내용의 범주 내에 포함된다.

[0075] 상동 폴리뉴클레오티드 서열은 CD16의 변이체를 코딩하는 폴리펩티드 서열을 코딩하는 것들을 포함한다. 상동 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 서열식별번호: 5와 관련된 자연 발생 대립유전자 변이를 포함한다. NK-92 세포를 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열, 그의 자연 발생 변이체, 또는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 70% 동일하거나 또는 적어도 80%, 90% 또는 95% 동일한 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 임의의 폴리뉴클레오티드로 형질감염시키는 것은 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 일부 실시양태에서, 상동 폴리뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2에서 보존적 아미노산 치환을 코딩한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 천연 폴리뉴클레오티드 서열과는 다르나 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 축중성 상동 CD16 폴리뉴클레오티드 서열을 사용하여 형질감염된다.

[0076] 다른 예에서, CD16 아미노산 서열을 변화시키는 다형성을 갖는 cDNA 서열, 예컨대, 예를 들어 CD16 유전자에서 유전적 다형성을 나타내는 개체 사이의 대립유전자 변이가 NK-92 세포를 변형시키는 데 사용된다. 다른 예에서, 서열식별번호: 5의 서열과 상이한 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 다른 종으로부터의 CD16 유전자가 NK-92 세포를 변형시키는 데 사용된다.

[0077] 예에서, 변이체 폴리펩티드는 관련 기술분야에 공지된 방법 예컨대 올리고뉴클레오티드-매개 (부위-지정) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이유발을 사용하여 제조된다. 부위 지정 돌연변이유발 (Carter, 1986; Zoller and Smith, 1987), 카세트 돌연변이유발, 제한 선택 돌연변이유발 (Wells et al., 1985) 또는 다른 공지된 기술이 클로닝된 DNA에 대해 수행되어 CD16 변이체를 생산할 수 있다 (Ausubel, 2002; Sambrook and Russell, 2001).

[0078] 일부 실시양태에서, CD16을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 CD16의 기능을 변경하지 않으면서 CD16을 코딩하는 아미노산 서열을 변경하도록 돌연변이된다. 예를 들어, "비-필수" 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 유도하는 폴리뉴클레오티드 치환은 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2에서 이루어질 수 있다.

[0079] 하나의 클래스의 아미노산이 동일한 클래스의 또 다른 아미노산으로 대체되는, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2 내의 보존적 치환은 치환이 폴리펩티드의 활성을 실질적으로 변경하지 않는 한, 개시된 CD16 변이체의 범주 내에 속한다. 보존적 치환은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. (1) 폴리펩티드 백본의 구조, 예컨대 β -시트 또는 α -나선 입체형태, (2) 전하, (3) 소수성, 또는 (4) 표적 부위의 측쇄의 부피에 영향을 미치는 비-보존적 치환은 CD16 폴리펩티드 기능 또는 면역학적 동일성을 변형시킬 수 있다. 비-보존적 치환은 이들 클래스 중 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반한다. 치환은 보존적 치환 부위 내로, 또는 보다 바람직하게는 비-보존 부위 내로 도입될 수 있다.

[0080] 일부 실시양태에서, CD16 폴리펩티드 변이체는 길이가 적어도 200개의 아미노산이고 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 70% 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD16 폴리펩티드 변이체는 길이가 적어도 225개의 아미노산이고 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 70% 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD16 폴리펩티드 변이체는 서열식별번호: 2를 참조하여 결정된 바와 같이 위치 158에 발린을 갖는다.

[0081] 일부 실시양태에서, CD16 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 CD16 융합 단백질을 코딩할 수 있다. CD16 융합 폴리펩티드는 비-CD16 폴리펩티드와 융합된 CD16의 임의의 부분 또는 전체 CD16을 포함한다. 융합 폴리펩티드는 재

조합 방법을 사용하여 편리하게 생성된다. 예를 들어, CD16 폴리펩티드 예컨대 서열식별번호: 1 또는 서열식별 번호: 2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 비-CD16 코딩 폴리뉴클레오티드 (예컨대 이종 단백질의 신호 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열)와 인-프레임으로 융합된다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드 서열이 CD16의 C-말단에 융합되거나 또는 CD16의 내부에 위치하는 융합 폴리펩티드가 생성될 수 있다. 전형적으로, CD16 세포질 도메인의 최대 약 30%가 대체될 수 있다. 이러한 변형은 발현을 증진시키거나 또는 세포독성 (예를 들어, ADCC 반응성)을 증진시킬 수 있다. 다른 예에서, 키메라 단백질, 예컨대 Ig-a, Ig-B, CD3-e, CD3-d, DAP-12 및 DAP-10을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 림프구 활성화 수용체로부터의 도메인은 CD16 세포질 도메인의 일부를 대체한다.

[0082] 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기 및 후속적으로 어닐링되고 재증폭되어 키메라 유전자 서열을 생성할 수 있는 2개의 연속적인 유전자 단편 사이의 상보적 오버행을 일으키는 앵커 프라이머를 사용하는 PCR 증폭을 포함하는 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다 (Ausube1, 2002). 융합 모이어티에 CD16을 인-프레임으로 서브클로닝하는 것을 용이하게 하는 많은 벡터가 상업적으로 입수 가능하다.

[0083] 키메라 항원 수용체

[0084] 본원에 기재된 바와 같이, NK-92 세포는 세포 표면 상에 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 추가로 조작된다. 임의로, CAR은 종양-특이적 항원에 특이적이다. 종양-특이적 항원은, 비-제한적 예로서, US 2013/0189268; WO 1999024566 A1; US 7098008 ; 및 WO 2000020460 A1에 기재되어 있으며, 이는 각각 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 종양-특이적 항원은, 비제한적으로, NKG2D, CS1, GD2, CD138, EpCAM, EBNA3C, GPA7, CD244, CA-125, ETA, MAGE, CAGE, BAGE, HAGE, LAGE, PAGE, NY-SEO-1, GAGE, CEA, CD52, CD30, MUC5AC, c-Met, EGFR, FAB, WT-1, PSMA, NY-ESO1, AFP, CEA, CTAG1B, CD19 및 CD33을 포함한다. 추가의 비-제한적 종양-연관 항원, 및 그와 연관된 악성종양은 표 1에서 찾아볼 수 있다.

[0085]

표 1: 종양-특이적 항원 및 연관된 악성종양

표적 항원	연관된 악성종양
α -플레이트 수용체	난소암
CAIX	신세포 암종
CD19	B-세포 악성종양 만성 림프구성 백혈병 (CLL) B-세포 CLL (B-CLL)
	급성 림프모구성 백혈병 (ALL); 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 후 ALL
	림프종; 불응성 여포성 림프종; B-세포 비-호지킨 림프종 (B-NHL)
	백혈병
	HSCT-후 B-세포 악성종양
	제대 혈액 이식 (UCBT) 후 B-계열 림프성 악성종양
CD19/CD20	림프모구성 백혈병
CD20	림프종 B-세포 악성종양 B-세포 림프종 외투 세포 림프종 무통성 B-NHL 백혈병
CD22	B-세포 악성종양
CD30	림프종; 호지킨 림프종
CD33	AML
CD44v7/8	자궁경부 암종
CD138	다발성 골수종
CD244	신경모세포종
CEA	유방암 결장직장암
CS1	다발성 골수종
EBNA3C	EBV 양성 T-세포
EGP-2	다발성 악성종양
EGP-40	결장직장암
EpCAM	유방 암종
Erb-B2	결장직장암
	유방암 및 기타
	전립선암

[0086]

Erb-B 2,3,4	유방암 및 기타
FBP	난소암
태아 아세틸콜린 수용체	횡문근육종
GD2	신경모세포종
GD3	흑색종
GPA7	흑색종
Her2	유방 암종
	난소암
	상피 기원의 종양
Her2/신규	수모세포종
	폐 악성종양
	진행성 골육종
	교모세포종
IL-13R-a2	신경 교종
	교모세포종
	수모세포종
KDR	종양 신생혈관계
k-경쇄	B-세포 악성종양
	B-NHL, CLL
LeY	암종
	상피 유래 종양
L1 세포 부착 분자	신경모세포종
MAGE-A1	흑색종
메소텔린	다양한 종양
MUC1	유방암; 난소암
NKG2D 리간드	다양한 종양
종양태아성 항원 (h5T4)	다양한 종양
PSCA	전립선 암종
PSMA	전립선/종양 혈관계
mAb IgE에 의해 표적화된 TAA	다양한 종양
TAG-72	선암종
VEGF-R2	종양 신생혈관계

[0087]

[0088] 일부 실시양태에서, CAR은 CD19, CD33 또는 CSPG-4를 표적화한다. CD19, CD33 및 CSPG-4 CAR에 대한 대표적인 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 서열식별번호: 8 (CD19 CAR 폴리뉴클레오티드), 서열식별번호: 9 (CD19 CAR 폴리펩티드), 서열식별번호: 10 (CD33 CAR 폴리뉴클레오티드), 서열식별번호: 11 (CD33 CAR 폴리펩티드), 서열식별번호: 12 (CSPG-4 CAR 폴리뉴클레오티드), 및 서열식별번호: 13 (CSPG-4 CAR 폴리펩티드)에 제공된다. 일부 실시양태에서, CD19 CAR 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 9에 대해 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. 임의로, CD19 CAR 폴리펩티드는 서열식별번호: 9에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD33 CAR 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 11에 대해 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. 임의로, CD33 CAR 폴리펩티드는 서열식별번호: 11에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CSPG-4 CAR 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 13에 대해 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. 임의로, CSPG-4 CAR 폴리펩티드는 서열식별번호: 13에 대해 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항-에피토프 태그 웹티드 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 사용함으로써 세포 표면 검출을 돋기 위해 에피토프 태그 웹티드, 예컨대 FLAG, myc, 폴리히스티딘, 또는 V5가 폴리펩티드의 아미노 말단 도메인에 첨가될 수 있다.

[0089]

예에서, 변이체 폴리펩티드는 관련 기술분야에 공지된 방법 예컨대 올리고뉴클레오티드-매개 (부위-지정) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이유발을 사용하여 제조된다. 부위 지정 돌연변이유발 (Carter, 1986; Zoller and Smith, 1987), 카세트 돌연변이유발, 제한 선택 돌연변이유발 (Wells et al., 1985) 또는 다른 공지된 기술을 클로닝된 DNA에 대해 수행하여 CD16 변이체를 생산할 수 있다 (Ausubel, 2002; Sambrook and

Russell, 2001).

[0090] 일부 실시양태에서, CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 CAR의 기능을 변경하지 않으면서 CAR을 코딩하는 아미노산 서열을 변경하도록 돌연변이된다. 예를 들어, "비-필수" 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 유도하는 폴리뉴클레오티드 치환은 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11 또는 서열식별번호: 13에서 이루어질 수 있다.

[0091] 하나의 클래스의 아미노산이 동일한 클래스의 또 다른 아미노산으로 교체되는, 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11 또는 서열식별번호: 13 내의 보존적 치환은 치환이 폴리펩티드의 활성을 실질적으로 변경하지 않는 한, 개시된 변이체의 범주 내에 속한다. 보존적 치환은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. (1) 폴리펩티드 백본의 구조, 예컨대 β -시트 또는 α -나선 입체형태, (2) 전하, (3) 소수성, 또는 (4) 표적 부위의 측쇄의 부피에 영향을 미치는 비-보존적 치환은 폴리펩티드 기능 또는 면역학적 동일성을 변형시킬 수 있다. 비-보존적 치환은 이들 클래스 중 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반한다. 치환은 보존적 치환 부위 내로 또는 보다 바람직하게는 비-보존 부위 내로 도입될 수 있다.

[0092] 임의로, CAR은 특정한 암 유형과 연관된 항원을 표적화한다. 임의로, 암은 급성 백혈병 (예를 들어, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병 (골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 및 적백혈병 포함)) 및 만성 백혈병 (예를 들어, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병)을 포함하는 백혈병, 진성 다혈구증, 림프종 (예를 들어, 호지킨병 및 비-호지킨병), 다발성 골수종, 밸덴스트롬 마크로불린증, 중쇄질환, 육종 및 암종 예컨대 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질성 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 간세포암, 담즙 관 암종, 음모막암종, 정상피종, 배아성 암종, 월름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 흡지교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고형 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0093] CAR은, 예를 들어, 특히 공개 번호 WO 2014039523; US 20140242701; US 20140274909; US 20130280285; 및 WO 2014099671 (각각 그의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 조작될 수 있다. 임의로, CAR은 CD19 CAR, CD33 CAR 또는 CSPG-4 CAR이다.

[0094] 추가의 변형 - 시토카인

[0095] NK-92 세포의 세포독성은 시토카인 (예를 들어, 인터류킨-2 (IL-2))의 존재에 대해 의존성이다. 상업적 규모의 배양에서 NK-92 세포를 유지하고 확장하는 데 필요한, 외인성으로 첨가된 IL-2를 사용하는 비용은 상당하다. NK92 세포의 활성화를 계속하기에 충분한 양으로 IL-2를 인간 대상체에게 투여하는 것은 유해 부작용을 일으킬 것이다.

[0096] 일부 실시양태에서, FcR-발현 NK-92 세포는 적어도 하나의 시토카인 및 자살 유전자를 발현하도록 추가로 변형된다. 구체적 실시양태에서, 적어도 하나의 시토카인은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 또는 그의 변이체이다. 바람직한 실시양태에서, 시토카인은 IL-2 (서열식별번호: 6)이다. 특정 실시양태에서, IL-2는 내형질 세망에 표적화되는 변이체이고, 자살 유전자는 iCas9이다.

[0097] 한 실시양태에서, IL-2는 IL-2를 내형질 세망으로 지시하는 신호 서열과 함께 발현된다. 일부 실시양태에서, IL-2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호 7의 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. 이론에 얹매이는 것을 원하지는 않으나, IL-2를 내형질 세망으로 지시하는 것은 자가분비 활성화에 충분한 수준의 IL-2의 발현을 가능하게 하나, IL-2를 세포외로 방출하지는 않는다. 문헌 [Konstantinidis et al. "Targeting IL-2 to the endoplasmic reticulum confines autocrine growth stimulation to NK-92 cells" Exp Hematol. 2005 Feb;33(2):159-64]을 참조한다. FcR-발현 NK-92 세포의 지속적인 활성화는, 예를 들어, 자살 유전자의 존재에 의해 방지될 수 있다.

[0098] 추가의 변형 - 자살 유전자

[0099] 용어 "자살 유전자"는 세포의 음성 선택을 가능하게 하는 것이다. 자살 유전자는 유전자를 발현하는 세포가 선택적 작용제의 도입에 의해 사멸될 수 있게 하는 안전 시스템으로 사용된다. 이는 재조합 유전자가 비제어된 세포 성장을 유도하는 돌연변이를 일으키는 경우에 바람직하다. 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 (TK) 유전자, 시토신 데아미나제 유전자, 수두-조스터 바이러스 티미딘 키나제 유전자, 니트로리덕타제 유전자, 에스케리

키아 콜라이 gpt 유전자 및 이. 콜라이 Deo 유전자를 포함하는 다수의 자살 유전자 시스템이 확인되었다 (또한, 예를 들어, 문헌 [Yazawa K, Fisher W E, Brunicardi F C: Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J. Surg.* 2002 July; 26(7):783-9] 참조). 본원에 사용된 바와 같이, 자살 유전자는 NK-92 세포에서 활성이다. 전형적으로, 자살 유전자는 세포에 질병-효과를 주지 않으나, 특정 화합물의 존재 하에 세포를 사멸시킬 단백질을 코딩한다. 따라서, 자살 유전자는 전형적으로 시스템의 일부이다.

[0100] 한 실시양태에서, 자살 유전자는 티미딘 키나제 (TK) 유전자는 TK 유전자는 야생형 또는 돌연변이체 TK 유전자 (예를 들어, tk30, tk75, sr39tk)일 수 있다. TK 단백질을 발현하는 세포는 간시클로비르를 사용하여 사멸될 수 있다.

[0101] 또 다른 실시양태에서, 자살 유전자는 5-플루오로시토신의 존재 하에 세포에 독성인 시토신 데아미나제이다. 문헌 [Garcia-Sanchez et al. "Cytosine deaminase adenoviral vector and 5-fluorocytosine selectively reduce breast cancer cells 1 million-fold when they contaminate hematopoietic cells: a potential purging method for autologous transplantation." *Blood* 1998 Jul 15;92(2):672-82].

[0102] 또 다른 실시양태에서, 자살 유전자는 이포스파미드, 또는 시클로포스파미드의 존재 하에 독성인 시토크롬 P450이다. 예를 들어, 문헌 [Touati et al. "A suicide gene therapy combining the improvement of cyclophosphamide tumor cytotoxicity and the development of an anti-tumor immune response." *Curr Gene Ther.* 2014;14(3):236-46]을 참조한다.

[0103] 또 다른 실시양태에서, 자살 유전자는 iCas9이다. 문헌 [Di Stasi, (2011) "Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy." *N Engl J Med* 365: 1673-1683]. 또한, 문헌 [Morgan, "Live and Let Die: A New Suicide Gene Therapy Moves to the Clinic" *Molecular Therapy* (2012); 20: 11-13]을 참조한다. iCas9 단백질은 소분자 AP1903의 존재 하에 아폽토시스를 유도한다. AP1903은 임상 연구에서 내약성 우수한 것으로 밝혀졌고, 입양 세포 요법의 맥락에서 사용된 생물학적으로 불활성인 소분자이다.

[0104] 한 실시양태에서, 변형된 NK-92 세포는 환자에게의 투여 전에 조사된다. NK-92 세포의 조사는 예를 들어, 미국 특히 번호 8,034,332에 기재되어 있으며, 이는 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 한 실시양태에서, 자살 유전자를 발현하도록 조작되지 않은 변형된 NK-92 세포가 조사된다.

트랜스진 발현

[0105] 트랜스진 (예를 들어, CD19 CAR 및 CD16)은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 메카니즘에 의해 발현 벡터 내로 조작될 수 있다. 트랜스진은 동일한 발현 벡터 또는 상이한 발현 벡터 내로 조작될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 트랜스진은 동일한 벡터 내로 조작된다.

[0107] 일부 실시양태에서, 벡터는 세포의 게놈 내로의 트랜스진(들)의 혼입을 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 양성 선택 마커를 갖는다. 양성 선택 마커는 유전자를 발현하지 않는 세포를 사멸시킬 조건 하에 세포를 성장하게 하는 임의의 유전자를 포함한다. 비-제한적 예는 항생제 내성, 예를 들어, 제네티신 (Tn5로부터의 Neo 유전자)을 포함한다.

[0108] 임의의 수의 벡터가 Fc 수용체 및/또는 CAR을 발현하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 플라스미드이다. 한 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터, 수두 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0109] 트랜스진은, 비-제한적 예로서, 감염, 전기천공, 리포펙션, 뉴클레오펙션, 또는 "유전자-총"을 포함하는 관련 기술분야에 공지된 임의의 형질감염 방법을 사용하여 NK-92 세포 내에 도입될 수 있다.

항체

[0111] 임의로, 항체는 암성 세포 또는 암-연관 마커를 발현하는 세포를 표적화하는 데 사용될 수 있다. 다수의 항체가 단독으로 암의 치료를 위해 승인되었다.

[0112]

표 2. FDA 승인된 치료 모노클로날 항체의 예

항체	상표명	회사	표적	적응증 (표적화된 질환)
알렙투주맙	캄파트®	겐자임	CD52	만성 림프구성 백혈병
브렌툭시맙 베도틴	애드세트 리스®		CD30	역형성 대세포 림프종 (ALCL) 및 호지킨 림프종
세툭시맙	에르비툭 스®	브리스톨- 마이어스 스퀘/일라이 멀리/미크 카게아아	표피 성장 인자 수용체	결장직장암, 두경부암
캡투주맙	밀로타르 그®	와이어쓰	CD33	급성 골수 백혈병 (칼리케아미신 사용)
이브리투모맙 티옥세탄	제발린®	스펙트럼 파마슈티칼스 , 인크.	CD20	비-호지킨 림프종 (이트롭-90 또는 인톱- 111 사용)
이필리무맙 (MDX-101)	에르보이 ®		CTLA-4 차단	흑색종
오파투무맙	아르제라 ®		CD20	만성 림프구성 백혈병
팔리비주맙	시나기스 ®	메드아문	RSV F 단백질의 에피토프	호흡기 세포융합 바이러스
파니투무맙	벡티빅스 ®	암젠	표피 성장 인자 수용체	결장직장암
리툭시맙	리툭산® , 맙테라®	비오젠 아이텍/제넨 테크	CD20	비-호지킨 림프종
토시투모맙	백사르®	글락소스미스 클라인	CD20	비-호지킨 림프종
트라스투주맙	헤르셉틴 ®	제넨테크	ErbB2	유방암
블리나투모맙			이중특이적 CD19- 지시 CD3 T-세포 연관체	필라델피아 염색체- 음성 재발성 또는 불응성 B 세포 전구체 급성 림프모구성 백혈병 (ALL)
아벨루맙			항-PD-L1	비-소세포 폐암, 전이성 메르켈 세포 암종; 위암, 유방암, 난소암, 방광암,

[0113]

				흑색종, 중피종 (전이성 또는 국부 진행성 고형 종양 포함)
다라투무맙			CD38	다발성 골수종
엘로투주맙			SLAMF7-지시 (CD 319로서 또한 공지됨) 면역자극 항체	다발성 골수종

[0114]

항체는 다수의 메카니즘을 통해 암을 치료할 수 있다. 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)은 면역 세포, 예컨대 NK 세포가 Fc 수용체, 예컨대 CD16을 통해 표적 세포에 결합된 항체에 결합하는 경우에 발생한다.

[0115]

따라서, 일부 실시양태에서, CD16 및/또는 CAR을 발현하는 NK-92 세포는 환자에게 특정한 암-연관 단백질, 예를

들어, 알렙투주맙, 베바시주맙, 이브리투모맙 티옥세탄, 오파투무맙, 리툭시맙, 및 트라스투주맙에 대해 지시된 적어도 하나의 모노클로날 항체의 유효량과 함께 투여된다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 네이키드 모노클로날 항체, 접합된 모노클로날 항체 또는 이중특이적 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 암 세포에 결합하고 또한 NK-92 세포의 표면 상에 존재하는 세포-표면 단백질에 결합하는 이중특이적 항체가 사용될 수 있다.

[0117] 암-특이적 항체는 암 세포의 표면 상에 발현된 특정한 단백질 항원에 결합한다. NK-92 세포는 항체가 NK-92 세포 표면과 회합되도록 변형될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 암에 특이적이다. 이러한 방식으로, NK-92 세포는 암에 특이적으로 표적화될 수 있다. 중화 항체가 또한 단리될 수 있다. 예를 들어, 분비 당단백질인 YKL-40은 다수의 유형의 진행성 인간 암에서 상승된다. YKL-40에 대한 항체가 종양 성장, 혈관신생 및/또는 전이를 억제하는 데 사용될 수 있었다는 것이 고려된다. 문헌 [Faibisoff et al., (2011) Mol. Cancer Ther. 10(5):742-751].

[0118] 항체는 NK-92 세포의 투여와 함께 투여될 수 있다. 치료될 암에 특이적인 항체는 NK-92 세포의 투여 전에, 그 와 공동으로, 및/또는 그 후에 투여될 수 있다.

[0119] 암에 대한 항체는 상업적으로 입수 가능한 공급원으로부터 구입될 수 있거나, 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 항체는 암에 의해 감염되고 샘플이 취해졌을 때 회복하였거나 또는 회복하는 중이었던 이전의 1명 이상의 환자로부터 B 세포, 끌수, 또는 다른 샘플을 수득함으로써 생산될 수 있다. 이를 샘플로부터 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체)를 확인하고, 스크리닝하고, 성장시키는 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리는 관심 샘플 또는 세포로부터 RNA를 단리하고, 단리된 RNA로부터 cDNA를 제조하고, cDNA를 중쇄 및/또는 경쇄 cDNA에 대해 풍부화시키고, 파지 디스플레이 벡터를 사용하여 라이브러리를 생성함으로써 제조될 수 있다. 라이브러리는 예를 들어, 문헌 [Maruyama, et al.] (그의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 제조되고 스크리닝될 수 있다. 항체는 재조합 방법 또는 임의의 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 단리, 스크리닝, 특징화, 및 생산은 또한 문헌 [Beerli, et al., PNAS (2008) 105(38):14336-14341]에 기재되어 있으며, 이는 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

치료

[0120] 환자를 본원에 기재된 바와 같은 변형된 NK-92 세포로 치료하는 방법이 또한 제공된다. 한 실시양태에서, 환자는 암을 앓고 있고 NK-92 세포에 의해 발현된 CAR은 그 암의 표면 상에 발현된 항원에 특이적이다. NK-92는 그 암의 표면 상에 발현된 항원에 특이적인 CAR 뿐만 아니라 Fc 수용체를 발현한다 (즉, NK-92-Fc-CAR). 예를 들어, NK-92 세포는 CD16 및 MAGE를 그의 세포 표면 상에 발현할 수 있었다 (즉, NK-92-CD16-MAGE). 임의로, 환자는 변형된 NK92 세포 및 또한 항체로 치료된다.

[0121] NK-92 세포는 개체에게 절대적인 수의 세포로 투여될 수 있고, 예를 들어, 상기 개체는 약 1000개의 세포/주사 내지 최대 약 100억개의 세포/주사, 예컨대 주사당 약, 적어도 약, 또는 최대 약, 1×10^8 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^3 , 5×10^3 개 (등)의 NK-92 세포, 또는 종점을 포함한 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0122] 다른 실시양태에서, 상기 개체는 약 1000개의 세포/주사/ m^2 내지 최대 약 100억개의 세포/주사/ m^2 , 예컨대 주사당 약, 적어도 약, 또는 최대 약, 1×10^8 개/ m^2 , 1×10^7 개/ m^2 , 5×10^7 개/ m^2 , 1×10^6 개/ m^2 , 5×10^6 개/ m^2 , 1×10^5 개/ m^2 , 5×10^5 개/ m^2 , 1×10^4 개/ m^2 , 5×10^4 개/ m^2 , 1×10^3 개/ m^2 , 5×10^3 개/ m^2 (등)의 NK-92 세포, 또는 종점을 포함한 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0123] 다른 실시양태에서, NK-92 세포는 이러한 개체에게 상대적인 수의 세포로 투여될 수 있고, 예를 들어, 상기 개체는 개체의 킬로그램당 약 1000개의 세포 내지 최대 약 100억개의 세포, 예컨대 개체의 킬로그램당 약, 적어도 약, 또는 최대 약, 1×10^8 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^3 , 5×10^3 개 (등)의 NK-92 세포, 또는 종점을 포함한 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0124] 다른 실시양태에서, NK-92 세포는 이러한 개체에게 상대적인 수의 세포로 투여될 수 있고, 예를 들어, 상기 개체는 개체의 킬로그램당 약 1000개의 세포 내지 최대 약 100억개의 세포, 예컨대 개체의 킬로그램당 약, 적어도 약, 또는 최대 약, 1×10^8 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^3 , 5×10^3 개 (등)의 NK-92 세포, 또는 종점을 포함한 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0125] 다른 실시양태에서, 총 용량은 체표면적의 m^2 에 의해 계산될 수 있으며, 이는 m^2 당 약 1×10^{11} , 1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 개, 또는 종점을 포함한 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위를 포함한다. 평균적으로 사람은 약

1.6 내지 약 1.8 m^2 이다. 바람직한 실시양태에서, 약 10억 내지 약 30억개의 NK-92 세포가 환자에게 투여된다. 다른 실시양태에서, 용량당 주사되는 NK-92 세포의 양은 체표면적의 m^2 에 의해 계산될 수 있으며, 이는 m^2 당 1×10^{11} , 1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 개를 포함한다. 평균적으로 사람은 1.6-1.8 m^2 이다.

[0126] NK-92 세포, 및 임의로 다른 항암제는, 암을 갖는 환자에게 1회 투여될 수 있거나, 또는 다수회, 예를 들어, 요법 동안 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23시간마다 1회, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다 1회, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 주마다 1회, 또는 종점을 포함한 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0127] 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 NK-92 세포 및 매질, 예컨대 인간 혈청 또는 그의 등가물을 포함하는 조성물로 투여된다. 일부 실시양태에서, 매질은 인간 혈청 알부민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 매질은 인간 혈장을 포함한다. 일부 실시양태에서, 매질은 약 1% 내지 약 15% 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 매질은 약 1% 내지 약 10% 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 매질은 약 1% 내지 약 5% 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 매질은 약 2.5% 인간 혈청 또는 인간 혈청 등가물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈청은 인간 AB 혈청이다. 일부 실시양태에서, 인간 치료제에 사용하는 데 허용되는 혈청 대체물이 인간 혈청 대신에 사용된다. 이러한 혈청 대체물은 관련 기술분야에 공지되어 있거나, 또는 미래에 개발될 수 있다. 15% 초과의 인간 혈청의 농도가 사용될 수 있으나, 약 5% 초과의 농도가 비용-제한적일 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 NK-92 세포 및 세포 생존율을 지원하는 등장성 액체 용액을 포함하는 조성물로 투여된다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 동결보존된 샘플로부터 재구성된 조성물로 투여된다.

[0128] 제약상 허용되는 조성물은 다양한 담체 및 부형제를 포함할 수 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어, 완충 염수 등이 사용될 수 있다. 이들 용액은 멸균되고 일반적으로 바람직하지 않은 물질을 함유하지 않는다. 적합한 담체 및 부형제 및 그의 제제는 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005)]에 기재되어 있다. 제약상 허용되는 담체는 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 물질을 의미하며, 즉, 물질은 대상체에게 바람직하지 않은 생물학적 효과를 일으키거나 또는 이를 함유하는 제약 조성물 중의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 투여된다. 대상체에게 투여되는 경우, 담체는 활성 성분의 분해를 최소화하고 대상체에서 유해 부작용을 최소화하도록 임의로 선택된다. 본원에 사용된 용어 제약상 허용되는은 생리학상 허용되는 및 약리학상 허용되는과 동의어로 사용된다. 제약 조성물은 일반적으로 완충 및 보관 중 보존을 위한 작용제를 포함할 것이고 투여 경로에 따라 적절한 전달을 위한 완충제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0129] 생체내 또는 시험관내에서 사용하기 위한 이들 조성물은 통상적인, 널리 공지된 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 생리학적 조건에 가까워지기 위해 필요에 따라 허용가능한 보조 물질 예컨대 pH 조정 및 완충 작용제, 독성 조정 작용제 등, 예를 들어, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨 등을 함유할 수 있다. 이들 제제 및/또는 다른 작용제에서 세포의 농도는 달라질 수 있고 선택된 특정한 투여 방식 및 환자의 필요에 따라, 주로 유체 부피, 점도, 체중 등에 기초하여 선택될 것이다.

[0130] 한 실시양태에서, NK-92 세포는 치료되는 암에 대한 하나 이상의 다른 치료와 함께 환자에게 투여된다. 이론에 얹매이지 않고, NK-92 세포 및 암에 대한 또 다른 요법으로의 환자의 공-치료가 NK-92 세포 및 대체 요법이 내인성 면역계에게 이전에 이러한 내인성 작용을 암도하였던 암을 소거할 기회를 주게 할 것으로 여겨진다. 일부 실시양태에서, 치료되는 암에 대한 2종 이상의 다른 치료는, 예를 들어, 항체, 방사선, 화학요법제, 줄기 세포 이식, 또는 호르몬 요법을 포함한다.

[0131] 한 실시양태에서, 항체는 NK-92 세포와 함께 환자에게 투여된다. 한 실시양태에서, NK-92 세포 및 항체는 함께, 예를 들어, 동일한 제제로; 개별적으로, 예를 들어, 개별 제제로, 공동으로 환자에게 투여되거나; 또는 개별적으로, 예를 들어, 상이한 투여 스케줄로 또는 하루 중 상이한 시간에 투여될 수 있다. 개별적으로 투여되는 경우, 항체는 임의의 적합한 경로, 예컨대 정맥내 또는 경구 투여로 투여될 수 있다.

[0132] 이론에 얹매이지 않고, Fc 수용체 및 CAR의 조합을 발현하는 NK-92 세포가 모노클로날 항체와 투여되는 경우 회피 돌연변이체를 보다 용이하게 예상하고, 또한 회피 돌연변이체를 선택하는 것을 방지할 것으로 고려된다. 게다가, 환자 자신의 이펙터 세포는 모노클로날 항체와 함께 ADCC에 참여하여 암 세포를 표적화할 수 있다. 이러한 이중 시스템 (Fc 수용체 및 CAR 둘 다)은 또한 비-암성 세포보다 암 세포에 대해 더 선택적일 수 있다 (종양을 벗어나 표적에 적중함). 암 세포 상에서만 독점적으로 발현되는 종양 연관 항원은 거의 없으나, 비-암성 세

포가 2종의 종양 연관/특이적 항원을 과다발현하는 것은 드물다. 예를 들어, 램프구는 통상적으로 CD19 및 CD20 둘 다를 발현하며, 종종 이 중 하나는 상향조절되는 반면 다른 하나는 하향조절되고 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 이브리투모맙 티옥세탄 또는 리툭시맙과 조합된 NK-92-CD16-CD19는 특정 램프종을 치료하는 데 효과적일 수 있다.

[0133] 키트

세포 표면 상에 적어도 하나의 Fc 수용체 및 세포 표면 상에 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형된 소정량의 NK-92 세포를 포함하는 조성물 및 암의 치료에서의 사용에 대한 지침서를 사용하는 암의 치료를 위한 키트가 또한 개시된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 키트는 또한 적어도 하나의 모노클로날 항체를 포함할 수 있다.

키트의 구성요소는 하나의 또는 상이한 용기 예컨대 하나 이상의 바이알에 함유될 수 있다. 항체는 보관-수명을 증진시키기 위해 액체 또는 고체 형태 (예를 들어, 동결건조 후)로 존재할 수 있다. 액체 형태로 존재하는 경우, 구성요소는 첨가제 예컨대 안정화제 및/또는 보존제 예컨대 프롤린, 글리신, 또는 수크로스 또는 보관-수명을 증진시키는 다른 첨가제를 포함할 수 있다.

특정 실시양태에서, 키트는 변형된 NK-92 세포 또는 NK-92 세포 및 항체의 투여 전에, 그와 동시에 또는 그 후에 투여될 추가의 화합물 예컨대 치료 활성 화합물 또는 약물을 함유할 수 있다. 이러한 화합물의 예는 비타민, 미네랄, 플루드로코르티손, 이부프로펜, 리도카인, 퀴니딘, 화학요법제 등을 포함한다.

다양한 실시양태에서, 키트의 사용에 대한 지침서는 암의 치료에서 키트 구성요소를 사용하기 위한 지시사항을 포함할 것이다. 지침서는 항체 및 NK-92 세포를 제조 (예를 들어, 동결-건조된 단백질의 경우, 희석 또는 재구성)하는 방법 (예를 들어, 해동 및/또는 배양)에 관한 정보를 추가로 함유할 수 있다. 지침서는 투여량 및 투여 빈도에 관한 안내를 추가로 포함할 수 있다.

개시된 방법 및 조성물을 위해 사용될 수 있거나, 그와 함께 사용될 수 있거나, 그의 제조에서 사용될 수 있거나, 또는 그의 생성물인 물질, 조성물, 및 성분이 개시된다. 이를 및 다른 물질이 본원에서 개시되고, 이를 물질의 조합, 하위세트, 상호작용, 군 등이 개시되는 경우 이를 화합물의 각각의 다양한 개별적 및 포괄적 조합 및 순열의 구체적 언급이 명백히 개시되지 않을 수 있으나, 각각 본원에서 구체적으로 고려되고 기재되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 방법이 개시 및 논의되고 방법을 포함하여 다수의 문자에 대해 이루어질 수 있는 다수의 변형이 논의되는 경우, 방법의 각각 및 모든 조합 및 순열, 및 가능한 변형이 구체적으로 반대로 지시되지 않는 한 구체적으로 고려된다. 마찬가지로, 이들의 임의의 하위세트 또는 조합이 또한 구체적으로 고려되고 개시된다. 이러한 개념은 개시된 조성물을 사용하는 방법에서의 단계를 포함하나 이에 제한되지는 않는 본 개시 내용의 모든 측면에 적용된다. 따라서, 수행될 수 있는 다양한 추가의 단계가 존재하는 경우, 각각의 이를 추가의 단계가 개시된 방법의 임의의 특정 방법 단계 또는 방법 단계의 조합과 함께 수행될 수 있고, 각각의 이러한 조합 또는 조합의 하위세트가 구체적으로 고려되고 개시된 것으로 간주되어야 하는 것으로 이해된다.

[0139] 실시예

하기 실시예는 단지 예시적 목적만을 위한 것이고, 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 이용가능한 다양한 대체 기술 및 절차가 존재하며, 이는 유사하게 관련 기술분야의 통상의 기술자가 하기 실시예를 성공적으로 수행할 수 있게 한다.

[0141] 실시예 1: NK-92-Fc-CAR로의 치료 후 연장된 생존

T-계열-급성 램프모구성 백혈병 (ALL) 환자, 급성 골수성 백혈병 (AML) 환자, 및 전-B-ALL 환자로부터 유래된 CD19-양성 백혈병성 세포를 NSG 마우스에서 S.C. 접종에 의해 입양 성장시키고 확장시킨다. 마우스에서의 백혈병성 결절로부터 회수된 백혈병성 세포 (제1 계대)를 사용한다. 각 군의 NSG 마우스를 0.2 mL PBS 중 제1 계대로부터의 5×10^6 개 백혈병성 세포로 I.P. 접종한다. 모든 인간 백혈병은 NSG 마우스에서 공격적으로 성장한다. 24시간 후 (a) 리툭시맙 (b) NK-92-CD16-CD19 세포 또는 (c) 리툭시맙 및 NK-92-CD16-CD19 세포로 치료한다. 치료는 마우스에게 4개월 동안 매주 주어진다. NK-92-CD16-CD19 세포 또는 리툭시맙 및 NK-92-CD16-CD19 세포의 조합으로의 치료가 리툭시맙 단독으로의 치료에 비해 마우스의 생명을 유의하게 연장하고 생존을 연장하는 것으로 고려된다.

[0143] 실시예 2. NK-92 세포는 Fc 수용체 및 CAR을 발현할 수 있음.

- [0144] Fc 수용체 및 CAR을 발현하는 NK-92 세포를 분석하기 위해, 세포주 K562 (NK-92 민감성, CD19 음성), SUP-B15 (NK-92 저항성, CD19 양성), 및 SR-91 (NK-92 저항성, CD19 음성)에 대한 CD19-CAR을 코딩하는 mRNA로 전기천공된 NK-92 세포의 시험관내 세포독성을 검정을 수행하였다. 결과는 도 1a, 1b 및 1c에 제시된다. 도 1a는 비전기천공된 모 NK-92 세포에 의한 표적 세포주의 사멸을 보여준다. 도 1b는 CD19-CAR을 발현하는 모 NK-92 세포에 의한 표적 세포주의 사멸을 보여준다. 도 1c는 CD19-CAR을 발현하는 CD16(158V)-ERIL2 NK-92 세포에 의한 표적 세포주의 사멸을 보여준다. NK-저항성, CD19 양성 SUP-B15 세포는 CD19-CAR 발현 NK-92 세포 및 CD16(158V)-ERIL2 NK-92 세포에 대해 감수성이 되는 반면, NK-저항성, CD19 음성 SR-91 세포는 저항성을 유지한다. K562의 사멸은 CD19-CAR의 발현에 의해 영향을 받지 않는다.
- [0145] 실시예 3. 키메라 항원 수용체 (CAR)에 대한 mRNA의 인간 NK 세포주 내로의 전기천공은 높은 형질감염 효율 및 표적 특이적 세포독성을 일으킴.
- [0146] 제1 세대 CAR 구축물에 기초한 3종의 상이한 CAR: CD19, CD33 및 CSPG-4의 mRNA 형질감염, 발현 및 세포독성에 대한 데이터를 제공한다. mRNA 형질감염을 위한 표적 세포주는 aNK (모 NK-92 세포) 및 haNK (고친화도 FcR 발현 NK-92)였다. scFv 서열을 진아트(GeneArt)에 주문하여 제조하고 (코돈 최적화됨) mRNA를 맥스사이트 (MaxCyte) GT로 형질감염시켜 taNK (표적-활성화 NK 세포)를 생성하였다. 발현을 상응하는 항체를 사용하여 면역 형광에 의해 결정하고 세포독성을 표준 유동 세포측정법 검정을 사용하여 측정하였다.
- [0147] 형질감염 프로토콜을 전압 및 전기 펄스의 시간에 대해 최적화한 후, aNK 및 haNK 둘 다는 모든 3종의 mRNA CAR 구축물로 효과적으로 형질감염될 수 있는 것으로 결정되었다. 형질감염 후 형질감염된 NK 세포의 생존율은 일관되게 80% 초과이고 상응하는 CAR의 발현은 6시간에서 55-60%이고, 24시간에서 80-95%이고 48시간에서 80% 초과였다. 특이적 세포독성을 aNK 저항성 세포주에 대해 결정하였다 (CD19에 대해 SUP-B15, CD33에 대해 SR-91 및 CSPG-4에 대해 SK-MEL). 형질감염 후, 24시간에서의 aNK 저항성 세포주에 대한 세포독성은 일관되게 80% 초과였다.
- [0148] aNK 및 haNK 둘 다는 다양한 CAR 구축물에 대한 mRNA로 확실하고 일관되게 형질감염될 수 있으며 이는 적어도 48시간 동안 형질감염된 NK 세포의 높은 생존율, CAR의 탁월한 발현 뿐만 아니라 표적 세포 특이적 세포독성을 유지한다. 이러한 기술은 CAR 발현 NK 세포주의 임상 등급 생산까지 규모-확대될 수 있다. haNK가 효과적으로 형질감염 (t-haNK가 됨)될 수 있다는 사실은 악성종양의 이중 수용체 비 교차-반응성 표적화 (즉, CD19 CAR과 CD20 항체)의 가능성을 연다.
- [0149] 본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 단지 예시적 목적만을 위한 것이고, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 시사될 것이며, 본 출원의 취지 및 범위, 및 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다. 본원에 인용된 모든 공개, 서열 수탁 번호, 특허, 및 특허 출원은 그의 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.
- [0150] 예시적인 서열
- [0151] 서열식별번호: 1 저친화도 아미노글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-A 아미노산 서열 (성숙 형태). 위치 158의 페닐알라닌은 밑줄표시된다
- ```

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu
Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp
Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu
Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Asp Pro Ile His
Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys
Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly
Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile
Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys
Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

```
- [0152]

[0153]

서열식별번호: 2 고친화도 변이체 F158V 이뮤노글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-A 아미노산 서열 (성숙 형태). 위치 158의 발린은 밀줄표시된다

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu  
 Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp  
 Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp  
 Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu  
 Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Asp Pro Ile His  
 Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
 Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly  
 Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile  
 Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys  
 Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile  
 Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

[0154]

서열식별번호: 3 저친화도 이뮤노글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-A 아미노산 서열 (전구체 형태). 전구체 형태의 위치 176은 성숙 형태의 위치 158에 상응한다. 위치 176의 Phe는 밀줄표시된다.

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu  
 Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser  
 Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn  
 Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly  
 Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly  
 Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys  
 Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe  
 Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly  
 Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met  
 Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr  
 Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

[0156]

서열식별번호: 4 고친화도 변이체 이뮤노글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-A 아미노산 서열 (전구체 형태). 전구체 형태의 위치 176은 성숙 형태의 위치 158에 상응한다. 위치 176의 Val은 밀줄표시된다.

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu  
 Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser  
 Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn  
 Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly  
 Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly  
 Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys  
 Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe  
 Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly  
 Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met  
 Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr  
 Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

[0158]

[0159]

서열식별번호: 5 저친화도 이뮤노글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-A (전구체)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드  
 (위치 158에서 페닐알라닌을 코딩함)

atgtggcagc tgctccccc aactgctcg ctacttctag tttcagctgg catgcggact gaagatctcc caaaggctgt  
 ggtgttcctg gagcccaat ggtacagggt gctcgagaag gacagtgtga ctctgaagtcc ccagggagcc tactccctg  
 aggacaattc cacacagtgg ttccacaatg agaggctcat ctaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca  
 gtcgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaaccctct ccaccctcag tgaccgggt cagctagaag tccatatcgg  
 ctggctgttg ctccaggccc ctgggtgggt gttcaaggag gaagacccta ttcaccttag gtgtcacagc tggaagaaca  
 ctgctctgca taaggtcaca tatttacaga atgccaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca  
 aaagccacac tcaaaagacag cggccctac ttctgcaggg ggcttttgg ggtaaaaat gtgtcttcag agactgtgaa  
 catcaccatc actcaagggtt tggcagtgtc aaccatctca tcattttc cacctggta ccaagtcctt ttctgcttgg  
 tgatggtaact ccttttgcgtt gttggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaaccattc gaagctcaac aagagactgg  
 aaggaccata aatttaaatg gagaaggac cctcaagaca aatga

[0160]

[0161]

서열식별번호: 6 야생형 IL-2

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro  
 Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile  
 Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr  
 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu  
 Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser  
 Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp  
 Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr  
 Leu Thr

[0162]

[0163]

서열식별번호: 7 IL-2-ER

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro  
 Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile  
 Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr  
 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu  
 Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser  
 Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp  
 Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr  
 Leu Thr Gly Ser Glu Lys Asp Glu Leu

[0164]

서열식별번호: 8 CD19-CAR DNA 서열

CCCGGGAATT CGCCACCATG GACTGGATCT GGCGGATCCT GTTCCTCGTG  
 GGAGCCGCCA CAGGCGCCA TTCTGCCAG CCCGCCGACA TCCAGATGAC  
 CCAGACCACC AGCAGCCTGA GCGCCAGCCT GGGCGACAGA GTGACCATCA  
 GCTGCCGGGC CAGCCAGGAC ATCAGCAAGT ACCTGAACTG GTATCAGCAG  
 AAACCCGACG GCACCGTGAA GCTGCTGATC TACCACACCA GCCGGCTGCA  
 CAGCGCGTG CCCAGCAGAT TTTCTGGCAG CGGCAGCGGC ACCGACTACA  
 GCCTGACCAT CTCCAACCTG GAACAGGAAG ATATCGCTAC CTACTTCTGT  
 CAGCAAGGCA ACACCCCTGCC CTACACCTTC GGCGGAGGCA CCAAGCTGGA  
 ACTGAAGAGA GGCGGCGGAG GCTCTGGTGG AGGCGGATCT GGGGGCGGAG  
 GAAGTGGCGG GGGAGGATCT GAAGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGCCCTGGC  
 CTGGTGGCCC CTAGCCAGAG CCTGTCCGTG ACCTGTACCG TGTCCGGCGT  
 GTCCCTGCC GACTACGGCG TGTCCTGGAT CGGCAGGCC CCCAGAAAGG  
 GCCTGGAATG GCTGGCGTG ATCTGGGCAGC GCGAGACAAC CTACTACAAC  
 AGCGCCCTGA AGTCCCGGCT GACCATCATC AAGGACAACA GCAAGAGCCA  
 GGTGTTCTG AAGATGAACA GCCTGCAGAC CGACGACACC GCCATCTACT  
 ACTGCGCAA GCACTACTAC TACGGCGGCA GCTACGCCAT GGACTACTGG  
 GGCCAGGGCA CCACCGTGAC CGTGTCCAGC GCCCTGTCCA ACAGCATCAT  
 GTACTTCAGC CACTCGTGC CGTGTTTCT GCCCGCCAAG CCCACCCACCA  
 CCCCTGCC TAGACCTCCC ACCCCAGGCC CAACAATCGC CAGCCAGCCT  
 CTGTCCCTGC GGCCCGAACG TAGCAGACCT GCTGCCGGCG GAGCCGTGCA  
 CACCAAGAGGC CTGGACCCCCA AGCTGTGCTA CCTGCTGGAC GGCATCCTGT  
 TCATCTATGG CGTGATCCTG ACCGCCCTGT TCCTGAGAGT GAAGTTCAGC  
 AGAAGCGCCG ACGCCCCCTGC CTACCAGCAG GGCCAGAACCC AGCTGTACAA  
 CGAGCTGAAC CTGGGCAGAC GGGAAAGAGTA CGACGTGCTG GACAAGCGGA  
 GAGGCAGGGGA CCCCGAGATG GGCGGCAAGC CCAGACGGAA GAACCCCCAG  
 GAAGGCCTGT ATAACGAAC GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG  
 CGAGATCGGC ATGAAGGGCG AGCGGGCGGAG GGGCAAGGGC CACGATGGAC  
 TGTACCAGGG CCTGAGCACC GCCACCAAGG ACACCTACGA CGCCCTGCAC  
 ATGCAGGCC TGCCCCCCAG ATGACAGCCA GGGCATTCT CCCTCGAGCG  
 GCCGC

[0166]

[0167]

서열식별번호: 9 CD19-CAR 아미노산 서열

MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIQMTQT TSSLSASLGD RVTISCRASQ  
DISKYLNWYQ QKPDGTVKLL IYHTSRLHSG VPSRFSGSGS GTDYSLTISN  
LEQEDIATYF CQQGNTLPYT FGGGTKEELK RGGGGSGGGG SGGGGSGGGG  
SEVQLQQSGP GLVAPSQSL S VTCTVSGVSL PDYGVSWIRQ PPRKGLEWL  
VIWGSETTYY NSALKSRLTI IKDNSKSQVF LKMNSLQTDD TAIYYCAKHY  
YYGGSYAMDY WGQGTTVTVS SALNSNSIMYF SHFVPVFLPA KPTTPAPRP  
PTPAPTIASQ PLSLRPEASR PAAGGAVHTR GLDPKLCYLL DGILFIYGVI  
LTALFLRVKF SRSADAPAYQ QGQNQLYNEL NLGRREYDV LDKRRGRDPE  
MGGKPRRKNP QEGLYNELQK DKMAEAYSEI GMKGERRRGK GHDGLYQGLS  
TATKDTYDAL HMQALPPR

[0168]

[0169]

서열식별번호: 10 CD33-CAR DNA 서열

CCCGGGAATT CGCCACCATG GACTGGATCT GGCGGATCCT GTTCCTCGTG  
 GGAGCCGCCA CAGGCGCCA TTCTGCCAG CCCGCCGACA TCCAGATGAC  
 CCAGAGCCCT AGCAGCCTGA GCGCCAGCGT GGGCGACAGA GTGACCATCA  
 CCTGTGGGC CAGCGAGAGC GTGGACAACT ACGGCATCAG CTTCATGAAC  
 TGGTTCCAGC AGAACGCCGG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACGCCGC  
 CAGCAATCAG GGCAGCGGCG TGCCCAGCAG ATTCAGCGGC TCTGGCAGCG  
 GCACCGACTT CACCCCTGACC ATCAGCAGCC TGCAGCCCGA CGACTTCGCC  
 ACCTACTACT GCCAGCAGAG CAAAGAGGTG CCCTGGACCT TCGGCCAGGG  
 CACCAAGGTG GAAATCAAGG GCGGAGGCAG CAGCGGAGGT GGAGGAAGTG  
 GCGGCGGAGG ATCTCAGGTG CAGCTGGTGC AGTCTGGCGC CGAAGTGAAG  
 AAACCCGGCA GCAGCGTGAA GGTGTCCCTGC AAGGCCAGCG GCTACACCTT  
 CACCGACTAC AACATGCACT GGGTCCGCCA GGCCCCAGGC CAGGGACTGG  
 AATGGATCGG CTACATCTAC CCCTACAACG GCGGCACCGG CTACAACCAG  
 AAGTTCAAGA GCAAGGCCAC CATCACCGCC GACGAGAGCA CCAACACCGC  
 CTACATGGAA CTGAGCAGCC TGCGGAGCGA GGACACCGCC GTGTACTACT  
 GCGCCAGAGG CAGACCCGCC ATGGACTACT GGGGCCAGGG AACCCCTGGTG  
 ACAGTGTCCA GCGCCCTGAG CAACAGCATC ATGTACTTCA GCCACTTCGT  
 GCCCGTGTGTT CTGCCGCCA AGCCCACAC CACCCCTGCC CCTAGACCTC  
 CCACCCCGC CCCAACAAATC GCCAGCCAGC CTCTGTCCCT GCGGCCCGAA  
 GCTAGCAGAC CTGCTGCCGG CGGAGCCGTG CACACCAGAG GCCTGGACCC  
 CAAGCTGTGC TACCTGCTGG ACGGCATCCT GTTCATCTAC GGCGTGATCC  
 TGACCGCCCT GTTCCTGAGA GTGAAGTTCA GCAGAAGCGC CGACGCCCT  
 GCCTACCAGC AGGGCCAGAA CCAGCTGTAC AACGAGCTGA ACCTGGGCAG  
 ACGGGAAGAG TACGACGTGC TGGACAAGCG GAGAGGCAGG GACCCCGAGA  
 TGGGCGGCAA GCCCAGACGG AAGAACCCCC AGGAAGGCCT GTATAACGAA  
 CTGCAGAAAG ACAAGATGGC CGAGGCCTAC AGCGAGATCG GCATGAAGGG  
 CGAGCGGCCGG AGGGGCAAGG GCCACGATGG ACTGTACCAAG GGCCTGAGCA  
 CCGCCACCAA GGACACCTAC GACGCCCTGC ACATGCAGGC CCTGCC  
 AGATGACAGC CAGGGCATT CTCCCTCGAG CGGCCGC

[0170]

[0171]

서열식별번호: 11 CD33-CAR 아미노산 서열

MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIQMTQS PSSLSASVGD RVTITCRASE  
 SVDNYGISFM NWFQQKPGKA PKLLIYAASN QGSGVPSRFS GSGSGTDFLT  
 TISSLQPDDF ATYYCQQSKE VPWTFGQGTK VEIKGGGGSG GGGSGGGGSQ  
 VQLVQSGAEV KKPGSSVKVS CKASGYTFTD YNMHWVRQAP QQGLEWIGYI  
 YPYNNGGTGYN QKFKSKATIT ADESTNTAYM ELSSLRSEDT AVYYCARGRP  
 AMDYWGQGTL VTVSSALSNS IMYFSHFVPV FLPAKPTTTP APRPPTPAPT  
 IASQPLSLRP EASRPAAGGA VHTRGLDPKL CYLDGILFI YGVILTALFL  
 RVKFSRSADA PAYQQQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR  
 RKNPQEGLYN ELQDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDT  
 YDALHMQALP PR

[0172]

서열식별번호: 12 CSPG4-CAR DNA 서열

CCCGGAATT CGCCACCATG GACTGGATCT GGCGCATCCT CTTCCCTCGTC  
 GGCGCTGCTA CCGCGCTCA TTCGGCCCAG CCGGCCGATA TCGAGCTCAC  
 CCAATCTCCA AAATTCTATGT CCACATCAGT AGGAGACAGG GTCAGCGTCA  
 CCTGCAAGGC CAGTCAGAAT GTGGATACTA ATGTAGCGTG GTATCAACAA  
 AAACCAGGGC AATCTCCTGA ACCACTGCTT TTCTCGGCAT CCTACCGTTA  
 CACTGGAGTC CCTGATCGCT TCACAGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTCA  
 CTCTCACCAT CAGCAATGTG CAGTCTGAAG ACTTGGCAGA GTATTCTGT  
 CAGCAATATA ACAGCTATCC TCTGACGTT GGTGGCGGCA CCAAGCTGGA  
 AATCAAACGG GCTGCCAG AAGGTGGAGG CGGTCAGGT GGCGGAGGTT  
 CCGCGGAGG TGGCTCTGGC GGTGGCGGAT CGGCCATGGC CCAGGTGAAG  
 CTGCAGCAGT CAGGAGGGGG CTTGGTGCAA CCTGGAGGAT CCATGAAACT  
 CTCCTGTGTT GTCTCTGGAT TCACTTCAG TAATTACTGG ATGAACCTGGG  
 TCCGCCAGTC TCCAGAGAAG GGGCTTGAGT GGATTGCAGA ATTAGATTG  
 AAATCCAATA ATTTGGAAG ATATTATGCG GAGTCTGTGA AAGGGAGGTT  
 CACCATCTCA AGAGATGATT CCAAAAGTAG TGCCCTACCTG CAAATGATCA  
 ACCTAAGAGC TGAAGATACT GGCATTTATT ACTGTACCAAG TTATGGTAAC  
 TACGTTGGGC ACTATTTGA CCACTGGGGC CAAGGGACCA CGGTACCGT  
 ATCGAGTGCC GCGGTTCTAG AGCTCTTGAG CAACTCCATC ATGTACTTCA  
 GCCACTTCGT GCCGGTCTTC CTGCCAGCGA AGCCCACCAC GACGCCAGCG  
 CCGCGACCAC CAACACCGGC GCCCACCAC TCGTCGCAGC CCCTGTCCCT  
 GCGCCCAGAG GCGTCCGGC CAGCGGCGGG GGGCGCAGTG CACACGAGGG  
 GGCTGGACCT GCTGGATCCC AAACTCTGCT ACCTGCTGGA TGGAATCCTC  
 TTCATCTATG GTGTCATTCT CACTGCCTG TTCTGAGAG TGAAGTTCA  
 CAGGAGCGCA GACGCCCG CGTACCAAGCA GGGCCAGAAC CAGCTCTATA  
 ACGAGCTCAA TCTAGGACGA AGAGAGGAGT ACGATTTTG GGACAAGAGA  
 CGTGGCCGGG ACCCTGAGAT GGGGGAAAG CCGCAGAGAA GGAAGAACCC  
 TCAGGAAGGC CTGTACAATG AACTGCAGAA AGATAAGATG GCGGAGGCCT  
 ACAGTGAGAT TGGGATGAAA GGCAGCGCC GGAGGGCAA GGGGCACGAT  
 GCCCTTACCG AGGGTCTCAG TACAGCCACC AAGGACACCT ACGACGCCCT  
 TCACATGCAG GCCCTGCCCT CTCGCTAACCA GCCAGGGCAT TTCTCCCTCG  
 AGCGGCCGC

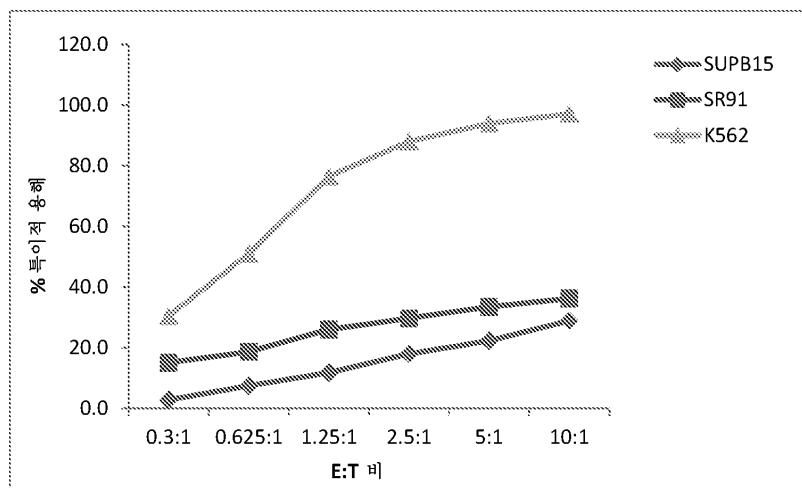
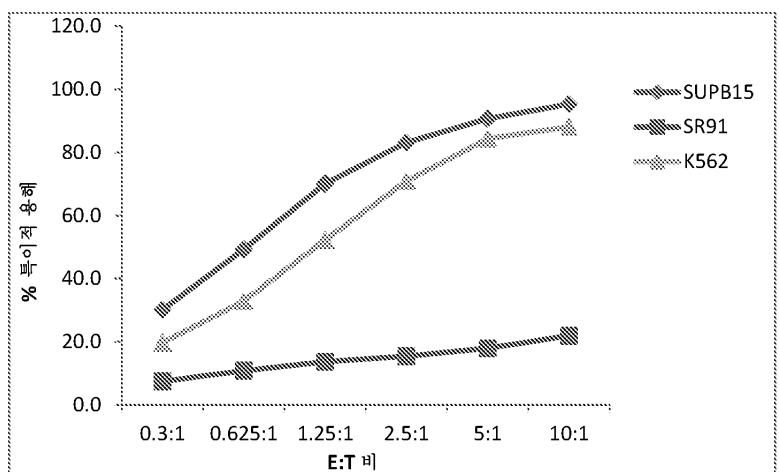
[0174]

[0175]

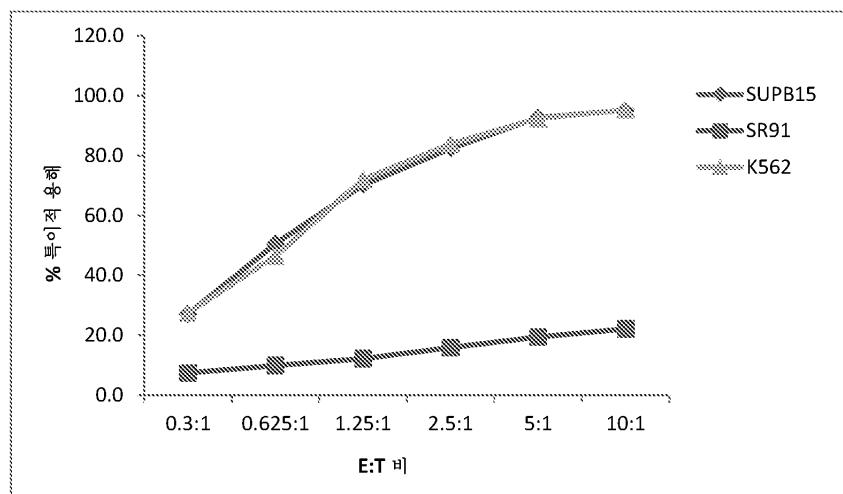
서열식별번호: 13 CSPG4-CAR 아미노산 서열

MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIELTQS PKFMSTSGD RVSVTCKASQ  
 NVDTNVAWYQ QKPGQSPEPL LFSASYRYTG VPDRFTGSGS GTDFTLTISN  
 VQSEDLAEYF CQQYNSYPLT FGGGTKEIK RAAAEGGGGS GGGGSGGGGS  
 GGGGSAMAQV KLQQSGGGLV QPGGSMKLSC VVSGFTFSNY WMNWVRQSPE  
 KGLEWIAEIR LKSNNFGRYY AESVKGRFTI SRDDSKSSAY LQMINLRAED  
 TGIYYCTSYG NYVGHYFDHW GQGTTVTVSS AAVLELLSNS IMYFSHFVPV  
 FLPAKPTTTP APRPPTPAPT IASQPLSLRP EACRPAAGGA VHTRGLDLLD  
 PKLCYLLDG1 LFIYGVLTA LFLRVKFSRS ADAPAYQQQQ NQLYNELNLG  
 RREEYDVLDK RRGRDPEMGG KPQRRKNPQE GLYNELQKDK MAEAYSEIGM  
 KGERRRGKGH DGLYQGLSTA TKDTYDALHM QALPPR

[0176]

**도면****도면 1a****도면 1b**

## 도면1c



## 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; NANTKWEST, INC.

Lee, Tien

&lt;120&gt; MODIFIED NK-92 CELLS FOR TREATING CANCER

&lt;130&gt; 1013959

&lt;140&gt; PCT/US16/36991

&lt;141&gt; 2016-06-10

&lt;150&gt; US 62/173,701

&lt;151&gt; 2015-06-10

&lt;150&gt; US 62/337,044

&lt;151&gt; 2016-05-16

&lt;160&gt; 13

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic Low Affinity Immunoglobulin Gamma Fc Region Receptor

III-A amino acid sequence (mature form)

&lt;400&gt; 1

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu

35 40 45

Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp

50 55 60

Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp

65 70 75 80

Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro

85 90 95

Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser

100 105 110

Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys

115 120 125

Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala

130 135 140

Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser

180 185 190

Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr

195 200 205

Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp

210 215 220

His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

225 230 235

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic High Affinity Variant F158V Immunoglobulin Gamma Fc

Region Receptor III-A amino acid sequence (mature form)

&lt;400&gt; 2

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu

35 40 45

Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp

50 55 60

Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp

65 70 75 80

Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro

85 90 95

Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser

100 105 110

Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys

115 120 125

Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser

180 185 190

Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr  
 195 200 205  
 Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp  
 210 215 220  
 His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
 225 230 235  
 <210> 3  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic Low Affinity Immunoglobulin Gamma Fc Region Receptor  
 III-A amino acid sequence (precursor form)

<400> 3

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

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

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn  
 130 135 140  
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys         |     |     |     |
| 245                                                             | 250 |     |     |

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 254

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic High Affinity Variant Immunoglobulin Gamma Fc Region

Receptor III-A amino acid sequence (precursor form)

&lt;400&gt; 4

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala

1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro

20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln

35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu

50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr

65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu

85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln

100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys

115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn

130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln

180 185 190

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

195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp

225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

245 250

<210> 5

<211> 765

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic Polynucleotide Encoding the Low Affinity Immunoglobulin

Gamma Fc Region Receptor III-A (Precursor)

<400> 5

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact 60

gaagatctcc caaaggctgt ggtgttcccg gagcctaatt ggtacagggt gctcgagaag 120

gacagtgtga ctctgaagtg ccagggagcc tactccccgt aggacaattc cacacagtgg 180

tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 240

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gtcgacgaca | gtggagagta | caggtgccag | acaaacctct | ccaccctcag | tgaccggtg  | 300 |
| cagctagaag | tccatatcg  | ctggctgtt  | ctccaggccc | ctcggtgggt | gttcaaggag | 360 |
| gaagacccta | ttcacctgag | gtgtcacagc | tggaagaaca | ctgctctgca | taaggtcaca | 420 |
| tatttacaga | atggcaaagg | caggaagtat | tttcatcata | attctgactt | ctacattcca | 480 |
| aaagccacac | tcaaagacag | cggctctac  | ttctgcaggg | ggcttttgg  | gagtaaaaat | 540 |

|            |            |            |            |             |            |     |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| gtgttttcag | agactgtgaa | catcaccatc | actcaaggtt | tggcagtgtc  | aaccatctca | 600 |
| tcatttttc  | cacctggta  | ccaagtctct | ttctgttgg  | tgatggtaact | ccttttgc   | 660 |
| gtggacacag | gactatattt | ctctgtgaag | acaaacattc | gaagctcaac  | aagagactgg | 720 |
| aaggaccata | aatitaaatg | gagaaaggac | cctcaagaca | aatiga      |            | 765 |

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 153

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic polypeptide - Wild-Type IL-2

&lt;400&gt; 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu

65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

100 105 110

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

115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 130                                                             | 135 | 140 |
| <br>                                                            |     |     |
| Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr                             |     |     |
| 145                                                             | 150 |     |
| <210> 7                                                         |     |     |
| <211> 160                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |
| <220><223> synthetic polypeptide IL-2-ER                        |     |     |
| <400> 7                                                         |     |     |
| Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu     |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Gln Leu Glu His Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile     |     |     |
| <br>                                                            |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| <br>                                                            |     |     |
| Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile |     |     |
| <br>                                                            |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| <br>                                                            |     |     |
| Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| <br>                                                            |     |     |
| Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Ser Glu Lys Asp Glu Leu |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| <210> 8                                                         |     |     |
| <211> 1455                                                      |     |     |
| <212> DNA                                                       |     |     |

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic CD19-CAR DNA sequence

&lt;400&gt; 8

|                                                                             |      |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|
| cccggaatt cggcaccatg gactggatct ggccggatctt ctcgtggacccca                   | 60   |
| caggcgccta ttctgcccag cccggcaca tccatgtac ccagaccacc agcagcctga             | 120  |
| gcccgcgcctt gggcgacaga gtgaccatca gctgccggc cagccaggac atcagcaagt           | 180  |
| acctgaactg gtatcagcag aaacccgacg gcaccgtgaa gctgctgatc taccacacca           | 240  |
| gccggctgca cagcggcgtt cccagcagat ttctggcag cgccagcggc accgactaca            | 300  |
| gcctgaccat ctccaacctg gaacaggaag atatcgctac ctacttctgt cagcaaggca           | 360  |
|                                                                             |      |
| acaccctgcc ctacacccctt ggcggaggca ccaagctgga actgaagaga ggcggcggag          | 420  |
| gctctgggtgg aggccggatctt gggggcggag gaagtggcgg gggaggatctt gaagtgcgc        | 480  |
| tgcagcagag cggccctggc ctggtgccccctt ctagccagag cctgtccgtt acctgtaccg        | 540  |
| tgtccggcgtt gtccctgccc gactacggcg tgccctggat ccggcagccc cccagaaagg          | 600  |
| gcctggaatg gctgggcgtt atctgggca gcgagacaac ctactacaac agcggccctga           | 660  |
| agtcccggtt gaccatcatc aaggacaaca gcaagagcca ggtgttctt aagatgaaca            | 720  |
| gcctgcagac cgacgacacc gccatctact actgcgcctt gcaactactac tacggcggca          | 780  |
|                                                                             |      |
| gctacgcccattt ggactactgg ggccaggcaccaccgttac cgtgtccagc gcccgttcca          | 840  |
| acagcatcat gtacttcagc cacttcgttc ccgttttctt gcccggcaag cccaccacca           | 900  |
| ccccctggccccc tagacctccc accccagccc caacaatcgc cagccagcctt ctgtccctgc       | 960  |
| ggcccgaaaggc tagcagacctt gctgccggcg gagccgttca caccagaggc ctggaccctt        | 1020 |
| agctgtgttta cctgtggac ggcattctgtt tcattatgg cgtgtatctt accggccctgtt         | 1080 |
| tcctgagagt gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctaccaggac ggccagaacc           | 1140 |
| agctgtacaa cgactgttacac ctggcagac ggaaagagta cgacgtgtt gacaagcgga           | 1200 |
|                                                                             |      |
| gaggcaggga ccccgagatggcggcaaggccacccgttac gaaaccccttggcgtt                  | 1260 |
| ataacgaactt gcaaaaaggac aagatggccg aggccctacag cgagatcgcc atgaagggcg        | 1320 |
| agcggcggag gggcaaggcgtt caccatggac ttttaccaggc cctgagccacc gcccaccaagg      | 1380 |
| acacccatgtt cccctgttccat atgcaggccc ttggcccttggcgtt atgacagccatggcatttttctt | 1440 |
| ccctcgagcc gccgc                                                            | 1455 |

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 468

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic CD19-CAR amino acids sequence

&lt;400&gt; 9

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly

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

Ala His Ser Ala Gln Pro Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser

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

Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala

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

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp

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

Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
|----|----|----|----|

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

|    |    |    |
|----|----|----|
| 85 | 90 | 95 |
|----|----|----|

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
|-----|-----|-----|

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

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

Leu Lys Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
|-----|-----|-----|

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

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

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser

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

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro

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

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

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

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

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

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp  
 225 230 235 240  
 Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr  
 245 250 255

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 260 265 270

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu  
 275 280 285

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
 290 295 300

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg  
 305 310 315 320

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Pro Lys Leu  
 325 330 335

Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr  
 340 345 350

Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala  
 355 360 365

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg  
 370 375 380

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu  
 385 390 395 400

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
 405 410 415

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

Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
 435 440 445

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
 450 455 460

Leu Pro Pro Arg

465

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1437

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic CD33-CAR DNA sequence

&lt;400&gt; 10

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| cccggaatt cggcaccatg gactggatct ggccgatctt cttctcggt ggagccgcca     | 60  |
| caggcgccca ttctgcccag cccgcgaca tccagatgac ccagagccct agcagcctga    | 120 |
| gcgcgcagcgt gggcagacaga gtgaccatca cctgtcggtc cagcgagagc gtggacaact | 180 |

|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| acggcatcag ctcatgaac tggttccagc agaagccccgg caaggccccca aagctgtga      | 240 |
| tctacgcccgc cagcaatcag ggcagcggcg tgcccagcag attcagcggc tctggcagcg     | 300 |
| gcaccgactt caccctgacc atcagcagcc tgcagccccga cgacttcgcc acctactact     | 360 |
| gccagcagag caaaagaggtg ccctggacct tcggccaggg caccaaggtg gaaatcaagg     | 420 |
| gcccggggcgg cagcggaggtt ggaggaagtgc gcggccggagg atctcagggtc cagctggcgc | 480 |
| agtctggcgc cgaagtgaag aaacccggca gcagcgtgaa ggtgtccctgc aaggccagcg     | 540 |
| gctacacctt caccgactac aacatgcact gggtccgcca ggccccagc cagggactgg       | 600 |

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| aatggatcg ctacatctac ccctacaacg gcccgcacccgg ctacaaccag aagttaaga     | 660  |
| gcaaggccac catcaccgc gacgagagca ccaacaccgc ctacatggaa ctgagcagcc      | 720  |
| tgcggagcga ggacaccgcgt gtgtactact gcccgcaggcagg cagaccgcgc atggactact | 780  |
| ggggccaggg aaccctggtg acagtgtcca gcccgcctgag caacagcatc atgtacttca    | 840  |
| gccacttcgt gccgtgttt ctgcccgcac agcccccac caccctgcc cctagacctc        | 900  |
| ccaccccccac cccaacaatc gccagccagc ctctgtccct gcccgcggaa gctagcagac    | 960  |
| ctgctggcgg cggagccgtg cacaccagag gcctggaccc caagctgtgc tacctgtgg      | 1020 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| acggcatcct gttcatctac ggcgtgtatcc tgaccgcctt gttcctgaga gtgaagtta | 1080 |
| gcagaagcgc cgacgcccct gcctaccagc agggccagaa ccagctgtac aacgagctga | 1140 |
| acctggcagc acgggaagag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggcagg gaccccgaga | 1200 |
| tggcggcaa gcccagacgg aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag  | 1260 |
| acaagatggc cgaggcctac agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggcgg agggcaagg  | 1320 |
| gccacgatgg actgtaccag ggcctgagca cgcgcaccaa ggacacctac gacccctgc  | 1380 |
| acatgcaggc cctgcccccc agatgacagc caggcattt ctccctcgag cggccgc     | 1437 |

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 462

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic CD33-CAR amino acid sequence

&lt;400&gt; 11

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser Ala Gln Pro Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser

20 25 30

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala

35 40 45

Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln

50 55 60

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn

65 70 75 80

Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

85 90 95

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr

100 105 110

Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

180 185 190

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly

195 200 205

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

210 215 220

Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr

225 230 235 240

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly

245 250 255

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met

260 265 270

Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr

275 280 285

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

290 295 300

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala

305 310 315 320

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

| 450         | 455                              | 460        |            |             |            |      |
|-------------|----------------------------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| <210>       | 12                               |            |            |             |            |      |
| <211>       | 1509                             |            |            |             |            |      |
| <212>       | DNA                              |            |            |             |            |      |
| <213>       | Artificial Sequence              |            |            |             |            |      |
| <220><223>  | synthetic CSPG4-CAR DNA sequence |            |            |             |            |      |
| <400>       | 12                               |            |            |             |            |      |
| cccggaatt   | cgccaccatg                       | gactggatct | ggcgcatcct | cttcctcgta  | ggcgctgcta | 60   |
| ccggcgctca  | ttcggccag                        | ccggccgata | tcgagctcac | ccaatctcca  | aaattcatgt | 120  |
| ccacatcagt  | aggagacagg                       | gtcagcgtca | cctgcaaggc | cagtcaagaat | gtggatacta | 180  |
| atgttagctg  | gtatcaacaa                       | aaaccagggc | aatctcctga | accactgctt  | ttctcggcat | 240  |
| cctaccgtta  | cactggagtc                       | cctgatcgct | tcacaggcag | tggatctggg  | acagattca  | 300  |
| ctctcaccat  | cagcaatgtg                       | cagtctgaag | acttggcaga | gtatttctgt  | cagcaatata | 360  |
| acagctatcc  | tctgacgttc                       | ggtggcggca | ccaagctgga | aatcaaacgg  | gctgccgcag | 420  |
| aagggtggagg | cggttcaggt                       | ggcggagggt | ccggcggagg | tggctctggc  | ggtggcggat | 480  |
| cggccatggc  | ccaggtgaag                       | ctgcagcagt | caggaggggg | cttggtgcaa  | cctggaggat | 540  |
| ccatgaaact  | ctcctgtgtt                       | gtctctggat | tcactttcag | taattactgg  | atgaactggg | 600  |
| tccggccagtc | tccagagaag                       | gggcttgagt | ggattgcaga | aattagattt  | aaatccaata | 660  |
| attttggaaag | atattatgcg                       | gagtctgtga | aaggaggtt  | caccatctca  | agagatgatt | 720  |
| ccaaaagtag  | tgcctacctg                       | caaatgatca | acctaagagc | tgaagatact  | ggcattttt  | 780  |
| actgtaccag  | ttatggtaac                       | tacgttgggc | actatttga  | ccactggggc  | caagggacca | 840  |
| cggtcaccgt  | atcgagtgcc                       | cggtttctag | agctctttag | caactccatc  | atgtacttca | 900  |
| gccacttcgt  | gccgttcttc                       | ctgccagcga | agcccaccac | gacgccagcg  | ccgcgaccac | 960  |
| caacacccggc | gcccaccatc                       | gcgtcgcagc | ccctgtccct | gcccagag    | gcgtgccggc | 1020 |
| cagccggccgg | ggcgcagtg                        | cacacgggg  | ggctggacct | gctggatccc  | aaactctgt  | 1080 |
| acctgctgga  | tggaatcctc                       | ttcatctatg | gtgtcattct | cactgccttg  | ttcctgagag | 1140 |
| tgaagttcag  | caggagcgca                       | gacgcccccg | cgtaccagca | ggccagaac   | cagctctata | 1200 |
| acgagctcaa  | tctaggacga                       | agagaggagt | acgatgttt  | ggacaagaga  | cgtggccggg | 1260 |
| accctgagat  | gggggaaag                        | ccgcagagaa | ggaagaaccc | ttaggaaggc  | ctgtacaatg | 1320 |
| aactgcagaa  | agataagatg                       | gcggaggcct | acagttagat | tggatgaaa   | ggcgagcgcc | 1380 |
| ggagggcaa   | ggggcacat                        | ggccttacc  | agggtctcag | tacagccacc  | aaggacacct | 1440 |

acgacgcct tcacatgcag gccctgcccc ctcgctaaca gccaggcat ttctccctcg 1500  
 agcggccgc 1509  
 <210> 13  
 <211> 486  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic CSPG4-CAR amino acid sequence  
 <400> 13  
 Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Ala His Ser Ala Gln Pro Ala Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys  
 20 25 30  
 Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala  
 35 40 45  
 Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 Gln Ser Pro Glu Pro Leu Leu Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 85 90 95  
 Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln  
 100 105 110  
 Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125  
 Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Met Ala Gln Val  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Gln Gln Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser Met  
 165 170 175  
 Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met  
 180 185 190

Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Glu

195 200 205

Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Phe Gly Arg Tyr Tyr Ala Glu Ser Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Gln Met Ile Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys

245 250 255

Thr Ser Tyr Gly Asn Tyr Val Gly His Tyr Phe Asp His Trp Gly Gln

260 265 270

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Val Leu Glu Leu Leu Ser

275 280 285

Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala

290 295 300

Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

305 310 315 320

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

325 330 335

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Leu Leu Asp Pro Lys

340 345 350

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu

355 360 365

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

370 375 380

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435

440

445

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

450

455

460

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

465

470

475

480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485