



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월13일
(11) 등록번호 10-2804751
(24) 등록일자 2025년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70517 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7008094
(22) 출원일자(국제) 2018년08월23일
심사청구일자 2021년08월23일
(85) 번역문제출일자 2020년03월19일
(65) 공개번호 10-2020-0039783
(43) 공개일자 2020년04월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/072750
(87) 국제공개번호 WO 2019/038368
국제공개일자 2019년02월28일
(30) 우선권주장
17187554.5 2017년08월23일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
WO2016090034 A2*
Intl J Cancer, 135(11):2623-2632(2014)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
막스-델부릭-센트럼 쾰러 몰레쿨라레 메디친 인
데어 헬름홀츠-게마인사프트
독일 데-13125 베를린 로베르트-외쉴-스트라쎄 10
(72) 발명자
홉른, 우타
독일 14057 베를린 수와레즈스트라서 41
레흐, 아르민
독일 14057 베를린 수와레즈스트라. 41
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동호

전체 청구항 수 : 총 13 항

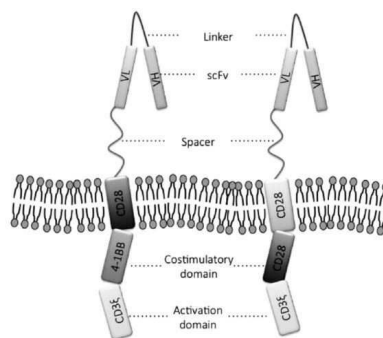
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 CXCR5에 결합하는 키메라 항원 수용체 및 CAR-T 세포

(57) 요약

본 발명은 CXC 케모카인 수용체 타입 5(CXCR5, CXC chemokine receptor type 5) 단백질에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인을 포함하는 단리된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드(CAR) 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산 분자, 본 발명의 CAR을 발현하는 유전자 변형 면역 세포, 바람직하게는 T 세포, CXCR5를 발현하는 병원성 세포, 바람직하게는 병원성 성숙 B 세포 및/또는 기억 B 세포, 및/또는 병원성 T 세포 및/또는 T 폴리클라 헬퍼 세포의 존재와 관련된 의학적 장애, 바람직하게는 성숙한 B 세포 비-호지킨 림프종(B-NHL), T 세포 비-호지킨 림프종, 또는 전신성 홍반성 루푸스(SLE) 또는 류마티스 관절염으로부터 선택되는 자가 항체-의존성자가 면역 질환의 치료에서의 상기 세포의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 16/2866 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/33 (2013.01)

C07K 2319/70 (2013.01)

(72) 발명자

블루홈, 줄리아

독일 10367 베를린 도티스트라. 14

어커르트, 울프강

독일 13125 베를린 스트라서 45 엔알. 28

명세서

청구범위

청구항 1

i. CXC 케모카인 수용체 타입 5(CXCR5, CXC chemokine receptor type 5) 단백질에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인,

ii. 막횡단 도메인, 및

iii. 세포 내 도메인을 포함하고

상기 항원-결합 도메인은 가변 중쇄(VH)를 포함하고, 상기 VH는

- 서열 번호 1 (GFTFSTSG)에 따른 중쇄 상보성 결정 영역 1 (H-CDR1),
 - 서열 번호 2 (ISSSSGFV)에 따른 중쇄 상보성 결정 영역 2 (H-CDR2), 및
 - 서열 번호 3 (ARSEAAF)에 따른 중쇄 상보성 결정 영역 3 (H-CDR3)를 포함하고, 및
- 가변 경쇄(VL)를 포함하고, 상기 VL은
- 서열 번호 4 (KSRLSRMGITP)에 따른 경쇄 상보성 결정 영역 1 (L-CDR1),
 - 서열 번호 5 (RMS)에 따른 경쇄 상보성 결정 영역 2 (L-CDR2) 및
 - 서열 번호 6 (AQFLEYPTT)에 따른 경쇄 상보성 결정 영역 3 (L-CDR3)을 포함하는,
- 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR) 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열 번호 7과 적어도 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인 및 서열 번호 8과 적어도 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드:

서열 번호 7:

EVQLVESGGGLVQPGX1SLX2LSCX3ASGFTFSTSGMX4WFRQAPGKGLX5WVX6YISSSSGFVYADX7VKGRFTISRDNAX8LYLQX9NSLX10X11EDTAX12YYCARSEAAFVGQGLTVTVSS,

여기서 X1: G 또는 K; X2: R 또는 K; X3: A 또는 S; X4: N 또는 H; X5: E 또는 D; X6: S 또는 A; X7: S 또는 A; X8: S 또는 T; X9: M 또는 L; X10: R 또는 K; X11: A 또는 S; X12: V 또는 I;

서열 번호 8:

DIVLTQX1PRSX2PVTSGEX3ASISCRSX4KSRLSRMGITPLNWYLQKPGX5SPQLLIYRMSNX6ASGVPDRFSGSGSX7TDFTLKISKVETEDVGYYCAQFLEYPTFGSGTKLEIK,

여기서 X1: S 또는 A; X2: L 또는 V; X3: P 또는 S; X4: S 또는 N; X5: Q 또는 K; X6: R 또는 L; X7: G 또는 E.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열번호 9 또는 서열번호 10에 따른 VH 도메인 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12에 따른 VL 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드:

서열 번호 9:
(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSGMHWFRQAPGKGLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDN AQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAA
FWGQGTLVTVSS),

서열 번호 10:
(EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSASGFTFTSGMHWFRQAPGKGLDWVAYISSSSGFVYADAVKGRFTISRDN AQNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARSEAA
FWGQGTLVTVSS)

서열 번호 11
(DIVLTQSPRSLPVTGPGEPAISCRSSKSRMSRMGITPLN WYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVG VYYCAQFLEYPP
TFGSGTKLEIK)

서열 번호 12
(DIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSRMSRMGITPLN WYLQKPGKSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSETDFTLKISKVETEDVG VYYCAQFLEYPP
TFGSGTKLEIK).

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 CAR이 유전자 변형 면역 세포에서 발현될 때, 상기 면역 세포는 CXCR5-발현 세포의 표면에서 CXCR5에 결합하여 활성화되고, 따라서 상기 CXCR5-발현 세포에 대한 세포 독성 활성을 유도하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서,

여기서 CXCR5-발현 세포는 DOHH-2, OCI-Ly7, SU-DHL4, JeKo-1, JVM-3, MEC-1 또는 SC-1 세포주인, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

- 상기 세포 외 항원-결합 도메인은 VH 및 VL 도메인 사이에 위치하는 링커 폴리펩티드를 포함하고, 상기 링커는 서열 번호 13에 따른 Whitlow 링커 또는 서열 번호 14에 따른 Gly-Ser 링커로부터 선택되고; 또는

- 상기 세포 외 항원-결합 도메인과 상기 막횡단 도메인 사이에 위치한 스페이서 폴리펩티드를 추가로 포함하고, 상기 스페이서는

- 서열 번호 15에 따른 IgG1 스페이서,
- 서열 번호 16에 따른 IgG1 Δ 스페이서,
- 서열 번호 17에 따른 IgG4 (Hi-CH2-CH3) 스페이서,
- 서열 번호 18에 따른 IgG4 (Hi-CH3) 스페이서 또는
- 서열 번호 19에 따른 IgG4 (Hi) 스페이서로부터 선택되고;

- 상기 막횡단 도메인은 서열 번호 20에 따른 CD8 α 도메인 또는 서열 번호 21에 따른 CD28 도메인으로부터 선택되고; 또는

- 상기 세포 내 도메인은 서열 번호 22에 따른 4-1BB 공동-자극 도메인 또는 서열 번호 23에 따른 CD28 공동-자극 도메인, 또는 인접하게 배열된 서열 번호 22에 따른 4-1BB 및 서열 번호 23에 따른 CD28 공동 자극 도메인 둘 다를 포함하는 공동-자극 도메인으로부터 선택되고; 또는

- 추가적으로 신호 전달 도메인을 포함하고, 여기서 상기 신호 전달 도메인은 서열 번호 24에 따른 CD3zeta 신호 전달 도메인인, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열 번호 25, 26, 27, 28 또는 29 중 어느 하나에 따른 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 8

a) - 제1항 또는 제2항에 따른 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 암호화하고,

- 세포 외 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포 내 도메인을 암호화하며, 여기서 상기 세포 외 항원-결합 도메인은 서열 번호 37, 53 또는 38의 적어도 하나의 서열 및 서열 번호 39, 54 또는 40의 적어도 하나의 서열에 의해 암호화되는

- 서열 번호 31, 32, 33, 34, 또는 35에 따른 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자; 또는

b) a)에 따른 뉴클레오티드 서열에 상보적인 핵산 분자; 또는

c) 상기 유전자 코드의 결과로서 a) 내지 b)에 따른 뉴클레오티드 서열로 축퇴(degenerate)되는 핵산 분자로 구성된 그룹으로부터 선택된,

단리된 핵산 분자.

청구항 9

제8항에 따른 핵산 분자를 포함하고 그리고 제1항 또는 제2항에 따른 CAR을 발현하는 단리된 유전적으로 변형된 면역 세포.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 면역 세포는 T 림프구(T lymphocyte) 및 NK 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 단리된 유전적으로 변형된 면역 세포.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 T 림프구는 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)인, 단리된 유전적으로 변형된 면역 세포.

청구항 12

제9항에 따른 단리된 유전적으로 변형된 면역 세포를 포함하는, CXCR5를 발현하는 병원성 세포의 존재와 관련된 의학적 장애 치료용 약학적 조성물로,

상기 의학적 장애는 B 세포 유래 림프 증식성 장애(B cell derived lymphoproliferative disorder), T 세포 유래 림프 증식성 장애(T cell derived lymphoproliferative disorder) 또는 자가 항체-의존성 자가 면역 질환

(autoantibody-dependent autoimmune disease)으로부터 선택되고,

여기서 상기 B 세포 유래 림프 증식성 장애(B cell derived lymphoproliferative disorder)는 성숙한 B 세포 비-호지킨 림프종(B-NHL), 급성 림프모구성 백혈병(B-ALL, acute lymphoblastic leukemia), 만성 림프구성 백혈병(CLL, chronic lymphocytic leukemia), 소포 림프종(FL, follicular lymphoma), 맨틀 세포 림프종(MCL, mantle cell lymphoma) 및 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma)으로 구성된 그룹으로부터 선택되고,

여기서 상기 T 세포 유래 림프 증식성 장애(T cell derived lymphoproliferative disorder)는 백혈병 종양 세포 전파가 있거나 없는 T 세포 비-호지킨 림프종, 백혈병 전파(leukemic dissemination)를 갖는 혈관 면역성 T 세포 림프종(angioimmunoblastic T cell lymphoma), 피부 T 세포 림프종(cutaneous T cell lymphoma) 및 T 세포 림프종(T cell lymphoma)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 자가 면역 질환은 전신성 홍반성 루푸스(SLE, systemic lupus erythematosus) 또는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 단리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)에 관한 것으로, 여기서 CAR은 CXC 케모카인 수용체 타입 5(CXCR5) 단백질에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원 결합 도메인을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산 분자, 본 발명의 CAR을 발현하는 유전자 변형 면역 세포, 바람직하게는 T 세포, CXCR5를 발현하는 병원성 세포, 바람직하게는 병원성 성숙 B 세포 및/또는 기억 B 세포, 및/또는 병원성 T 세포 및/또는 T 폴리클라 헬퍼 세포의 존재와 관련된 의학적 장애, 바람직하게는 성숙한 B 세포 비-호지킨 림프종(B-NHL), T 세포 비-호지킨 림프종, 또는 전신성 홍반성 루푸스(SLE) 또는 류마티스 관절염으로부터 선택되는 자가 항체-의존성 자가 면역 질환의 치료에서의 상기 세포의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] B-NHL은 이종(heterogenous)이며 공격적이고 무통성 경과(indolent course)로 구별될 수 있다. 치료 표준은 전형적으로 단독 또는 자가 줄기세포 이식, 면역조절 약물, 방사선 조사, 프로테아좀 억제제, 신호 전달 경로 억제제와 조합된 조합 항체/화학 요법이며, 극소수의 환자에 대해 동종이계 줄기세포 이식(allogeneic stem cell transplantation)이 적용된다. 많은 B-NHL 개체에서 진단 당시의 평균 연령은 >66-72세 이상이므로, 강렬하고 확장된 화학 요법 또는 심지어 동종이계 골수 이식을 배제하는 공존질환(co-morbidities)이 존재한다
- [0003] 성숙한 B 세포 림프종(mature B cell lymphomas)에서 B 세포 수용체(BCR) 신호 전달 억제제, 가장 중요한 이브루티닙(ibrutinib) 및 기타에서는 관해율(remission rate)이 엄청나게 향상되었다. 이들 부류의 키나아제 억제제에 대한 초기의 높은 민감성에도 불구하고, 중앙 박멸이 달성될 수 있는지 여부는 불확실하며, 다음으로, 여러 연구에서 클론성 림프종 및 백혈병 진화(clonal lymphoma and leukemia evolution)가 브루톤 티로신 키나제(BTK, Bruton tyrosine kinase) 억제에 대한 내성의 발생을 초래한다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 표적 요법에 대한 2차 저항(secondary resistance)의 급속한 출현은, 특히 여러 라인의 다른 화학 요법을 받았으며, 따라서 임상 성능(clinical performance, IPI 점수)이 감소된 환자에게 적용 가능한 건널 수 있는 구제 요법에 대한 해결책을 찾는 것이 시급하다는 것을 입증한다.
- [0004] 백혈병 및 림프종 B 세포에서 광범위하게 발현되는 CD19 항원을 표적으로 하는 양성 CAR-T 세포 요법은 실질적인 임상 효능을 가져왔으며, 현재 B-NHL 및 B-ALL의 치료를 위해 약 40개 이상의 CD19 CAR-T 세포 연구가 FDA에 등록되어 있다(www-clinicaltrials.gov). 그러나 B-NHL에 대한 항-CD19 항체 또는 CAR-T 세포 요법에서, 항원 소실로 인해 내성이 발생할 수 있다. 최근의 연구에 따르면, 항-CD19 CAR-T 세포 치료시 대안적으로 스플라이싱된 CD19 이소형에 대한 선택 및 이에 따라 동족(cognate) CD19 CAR 에피토프의 손실로 인한 회피 변이체(escape variant)가 나타났다.
- [0005] 따라서, CXCR5는 기존의 치료 mAb 또는 CAR-T 세포 요법 외에 B-세포 림프종의 면역 요법에 대한 대안적인 표적으로서 등장한다.
- [0006] 급성 림프모구성 백혈병(B-ALL, acute lymphoblastic leukemia), 만성 림프구성 백혈병(CLL, chronic lymphocytic leukemia), 소포 림프종(FL, follicular lymphoma), 맨틀 세포 림프종(MCL, mantle cell lymphoma), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma)과 같은 독특한 결절 로딩(nodal lodging)을 갖는 B 세포 유래 림프구 증식성 질환은 항상 항상성 케모카인 수용체(homeostatic chemokine receptor) CXCR5를 발현한다. CXCR5는 성숙한 재순환 B 세포 및 CD4+ T 세포의 작은 서브 세트, 소포 T-헬퍼 세포(Tfh)에서 생리적으로 발현되며, 2차 림프 기관 내에서 항상성 트래피킹(homeostatic trafficking) 및 B 세포 소포(B-cell follicle)로의 귀환을 조절한다. 중요하게도, CXCR5는 골수(BM) 내의 B 세포 전구체에서 발현되지 않으며, 형질 세포(plasma cell)는 이 수용체를 발현하지도 않는다.
- [0007] 본 발명자의 지식에 따르면, 대안적인 항-CXCR5 CAR 구축물은 이전에 기술된 바 없으며, 본 발명의 의학적 접근법과 관련된 항-CXCR5 항체 연구는 현재 이용 가능하지 않다.
- [0008] Panjideh 등(International Journal of Cancer, vol. 135, no. 11, 29 April 2014)은 비-호지킨 림프종의 치료를 위한 CXCR5 이종 특이적 항체의 사용을 기술하고 있다. Sadelain (Cancer Discovery, vol. 3, no. 4, 1 April 2013)은 CXCR5를 참조하지 않고 다양한 CAR 기술에 대한 검토를 제시한다. WO 2016/090034는 CAR 구축물(constructs)에 대한 다수의 가능한 표적을 개시한다. CD185(CXCR5)는 CAR 구성 요소에 대한 세부 사항 없이, 의학적 용도 또는 타겟의 관련성에 대한 임의의 기준을 언급된다. WO 2016/164731에는 다양한 B 세포 표적 항원에 대한 CAR-T 세포의 사용이 기재되어 있다. CXCR5는 CAR T 표적으로서 언급되지 않았다.
- [0009] 상기 기술된 것과 같은 의학적 증상에 대한 대체 요법, 예를 들어 항-CD19 CAR 구조물, 세포 독성 화학과 같은 표준 요법, 코르티코 스테로이드, IMiD와 같은 면역 조절제, 프로테아좀 억제제, 자가 줄기세포 이식, 동종이계 줄기세포 이식, 신호 억제제, CD20, 리툭시맙 및 항-CD19, 올레투주맙 및 CD19에 대한 그리고 이종 특이적 항체(BITE)를 포함하는, CD19를 표적으로 하는 Fab 단편 및 항-CD3 단편(Blinatumomab)으로 구성되는 항체가 개발 중이거나 최근에 확립되었다.
- [0010] 병원성 B 및 T 세포의 질병에 대한 다수의 대안 치료법이 개발되고 있지만, 이러한 의학적 장애를 해결하기 위한 효과적인 수단을 제공하기 위해서는 상당한 필요성이 남아있다.

발명의 내용

- [0011] 종래 기술에 비추어 본 발명의 기초가 되는 기술적 문제는 병원성(pathogenic) B 세포 및/또는 T 세포와 관련된 질환, 특히 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma) 또는 자가 항체-의존성 자가 면역 질환(autoantibody-dependent autoimmune diseases)을 치료하는데 적합한 물질(agent)을 제공하는 것이었다.
- [0012] 이 문제는 독립항의 특징에 의해 해결된다. 본 발명의 바람직일 실시 예는 종속 항에 의해 제공된다.
- [0013] 따라서, 본 발명은 다음을 포함하는 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR, chimeric antigen receptor)에 관한 것이다:
- [0014] i. CXC 케모카인 수용체 타입 5(CXCR5, CXC chemokine receptor type 5) 단백질에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인(extracellular antigen-binding domain),
- [0015] ii. 막횡단 도메인(transmembrane domain), 및
- [0016] iii. 세포 내 도메인(intracellular domain).
- [0017] 따라서, 본 발명은 항-CXCR5 CAR 구조물(construct) 및 상기 구조물을 발현하는 상응하는 면역 세포, 바람직하게는 T 세포(Tfh 또는 본 명세서에 기재된 다른 T 세포 림프종 제외), 혈장 B 세포 및 이들의 골수 전구체(bone marrow precursor)와 같은 정상적인 조혈 세포를 피하면서(sparing) 정의된 성숙 B-NHL에 대해 높은 세포 독성 활성을 갖는 인간 T 세포를 부여하는 CAR-T 세포 생성물에 관한 것이다. 바람직일 실시 예에서, 모든 골수 세포 및 NK 세포는 마찬가지로 면할 수 있다(spare); 본 발명의 상기 CAR-T 세포 생성물은 이들 세포에 대해 활성을 나타내지 않기 때문이다.
- [0018] 본 발명의 면역 요법 접근법(immunotherapy approach)의 바람직일 실시 예에서, 환자-유래 T 세포는 바람직하게는 레트로바이러스로 형질 도입되고, 세포 외 항체-유래 항원 인식 부분(extracellular antibody-derived antigen recognition part)으로 구성되고, 막횡단면(transmembrane section)에 융합되고, 세포 내 신호 전달 영역이 뒤따르는, 본 명세서에 기술된 인공 면역 수용체를 발현시킨다. 본 명세서에 기재된 구조물은 항-종양 세포 용해 능력(cytolytic capacity)을 갖는 형질 도입된 T 세포(transduced T cell)에 부여한다.
- [0019] T 세포의 바람직한 자가 이식(autologous transfer)으로 인해, 이식편대 숙주 질환(graft-versus-host-disease)은 본 발명의 CAR-T로 치료시 발생할 수 없다. 재발(relapse)의 예방에 중요한 기억 T 세포 형성이 발생할 수 있다.
- [0020] 이러한 성숙한 B-NHL 개체(entities)는 FL(소포성 림프종, follicular lymphoma), DLBCL(광범위 큰 B-세포 림프종, diffuse large B-cell lymphoma), 외투 세포 림프종(MCL, mantle cell lymphoma) 및 CLL(만성 림프구성 백혈병, chronic lymphocytic leukemia)의 특정 단계를 포함한다.
- [0021] 우선, 항-CXCR5 CAR-T 세포는 종양 미세 환경에서 종양 세포의 표적화를 가능하게 할 것이며, 이는 림프종 성장 촉진 Tfh 세포가 동시에 박멸될 것이기 때문이다. 주어진 종양 개체 내의 종양 세포는 표적 항원 CXCR5에 대해 균질하게 양성이므로, 저 발현/비 발현 종양 세포의 바람직하지 않은 양성 선택(positive selection)을 배제한다.
- [0022] 바람직일 실시 예에서, 본 명세서에 기재된 항-CXCR5 CAR-T 세포는 다른 치료에 적합하지 않은 성숙한(mature) B-NHL 환자의 치료에 적용 가능하다. 보다 구체적으로, 본 발명의 실시 예는 다음 환자 집단의 치료에 관한 것이다:
- [0023] i) 다중 약물 내성(multidrug resistance) 환자
- [0024] ii) 동종이계(allogeneic) 줄기세포 이식에 부적합한 환자,
- [0025] iii) 추가 화학 요법을 배제하는 공존질환(co-morbidities) 환자,
- [0026] iv) 화학 요법을 견딜 수 없는 노인 환자,
- [0027] v) 상기 CAR는 진행성 질환 및 다른 표준 치료 요법의 여러 라인이 실패한 후에도 구조 요법(salvage therapy)에 적용 가능하다,
- [0028] vi) 그것은 항체가 실패할 수 있는 표적 종양 세포의 낮은 항원 밀도에서도 적용 가능하다, 및/또는

- [0029] vii) 항체의 경우가 아닌 단독 요법(monotherapy)으로 적용 가능하다.
- [0030] 본 명세서에 기재된 항-CXCR5 CAR은 항-종양 효능에 필요한 T 세포에 대한 높은 결합력(avidity)을 부여한다. 본 발명의 항-CXCR5 CAR은 생리학적 혈장 B 세포, T 세포(Tfh 세포 및 특이적 병리학적 CXCR5-발현 T 세포 제외), NK 세포, 모든 골수 세포 계통 및 이들의 전구체에 대해 T 세포 반응성(T cell-reactivity)을 부여하지 않는 것으로 입증되었다. 따라서, 본 발명은 다른 조혈(hematopoietic) 조직에 대한 전례없는 낮은 off-target 반응성을 갖는다.
- [0031] 항-CD19 CAR-T 세포와 대조적으로, 본 발명의 항-CXCR5 CAR은 미성숙한(immature) B-NHL, 전구체 B-세포 신생물(neoplasia) 또는 생리학적 양성(benign) B-세포 전구체에 대한 원치 않는 반응성을 갖지 않는다.
- [0032] 하기 실시 예에서 입증된 바와 같이, 시험관내 공동 배양 시스템에서, 항-CXCR5 CAR-T 세포는 CXCR5-발현 인간 B-NHL 종양 세포주에 노출되면서 활성화된다. 이러한 T 세포는 세포 독성 활성을 예측하는 표현형인 IFN-감마의 높은 수준의 분비를 갖는 이펙터 표현형(effector phenotype)을 생성한다(develop).
- [0033] 또한, 선택된 표적 세포주, B-NHL, B 및 T 세포 백혈병, CXCR5-음성 세포 및 CXCR5-형질 감염체(transfectant)에 대한 세포 독성 실험(51Cr-방출)은 선택적 세포 독성이 CXCR5에 대해 양성인 세포주에서만 획득됨을 보여준다.
- [0034] 추가적인 전임상 시험은 i) 환자의 적절한 B-NHL 세포주에 대한 시험관 내 세포 독성 시험, ii) 이종이식된(xenotransplanted) B-NHL 세포주에 대한 항-CXCR5 CAR 활성화의 생체 내 시험을 포함한다.
- [0035] 이와 같이, 본 발명의 CAR은 본 명세서에 기술된 의학적 상태의 치료에 대한 놀랍고 유리한 접근법을 나타낸다. 항-CXCR5 CAR의 고용(employment)은 이전에 NHL 치료에 대한 유망한 접근법으로 시도되거나 설명되지 않았다. 마커의 선택성으로 인한 최소의 (존재하지 않은 경우) 원하지 않는 부작용은 또한 본 발명의 유익하고 놀라운 측면을 나타낸다. 특히, 항-CD19 치료에 대한 내성이 발생한 환자에서, 본 발명은 악성 종양 퇴치에 대한 매우 유망한 접근법을 나타낸다.
- [0036] 일 실시 예에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이며, 상기 CAR이 유전자 변형 면역 세포, 바람직하게는 T 림프구(lymphocyte)에서 발현될 때, 상기 면역 세포는 CXCR5-발현 세포의 표면에서 CXCR5와 결합하여 활성화되고, 이로써 상기 CXCR5-발현 세포에 대한 세포 독성 활성을 유도한다.
- [0037] CXCR5-발현 세포의 예는 당업자에게 공지되어 있으며, 암 또는 다른 병원성 세포의 추가 스크리닝에 의해 확인될 수 있다. CXCR5를 발현하는 세포주는 바람직하게는 DOHH-2, OCI-Ly7, SU-DHL4, JeKo-1, JVM-3, MEC-1 및/또는 SC-1이다.
- [0038] 일 실시 예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)에 관한 것이다:
- [0039] - CXC 케모카인 수용체 타입 5(CXCR5) 단백질에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포외 항원-결합 도메인, 여기서 상기 항체 또는 항체 단편은 단일 사슬(single chain) 항체 단편의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 바람직하게는 링커 폴리펩티드는 VH와 VL 도메인 사이에 위치하며, 상기 링커는 바람직하게는 항체 단편-CXCR5 항원 상호 작용(antigen interaction)을 방해하지 않도록 구성되고;
- [0040] - 상기 세포 외 항원-결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 위치한 스페이서 폴리펩티드(spacer polypeptide)(힌지라고도 함), 여기서 상기 스페이서 폴리펩티드는 바람직하게는 상기 CAR이 상기 CAR을 발현하는 T 세포에서 발현될 때, 상기 항체 단편-CXCR5 항원 상호 작용 및/또는 T 세포 활성화를 방해하지 않도록 구성되고;
- [0041] - 막횡단 도메인, 여기서 상기 막횡단 도메인은 바람직하게는 상기 CAR이 상기 CAR을 발현하는 T 세포에서 발현될 때, 상기 항체 단편-CXCR5 항원 상호 작용 및/또는 T 세포 활성화를 방해하지 않도록 구성되고;
- [0042] - 및 세포 내 도메인, 여기서 상기 세포 내 도메인은 공동 자극(co-stimulatory) 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하고, 상기 세포 내 도메인은 바람직하게는 예를 들어 사이토카인 생성을 증가시키고 및/또는 T 세포 복제(replication)를 촉진함으로써, 상기 CXCR5 표적에 결합한 T 세포 활성화를 자극하는 신호를 제공하여 세포 독성 효과를 유발하도록 구성된다.
- [0043] 따라서, 본 발명의 CAR은 본 명세서에 기재된 각각의 기능성 도메인에 대해 잠재적으로 상이한 단백질 서열을 포함하는 다양한 포맷을 사용할 수 있다. 당업자는 예를 들어 하기의 실시 예에서 입증된 실험적 접근법에 기초하여 CAR의 원하는 기능을 선택하고 시험할 수 있다. 이와 같이, 본 명세서에서 논의된 임의의 기능적 도메인에

서, 본 발명의 CAR에 사용될 임의의 주어진 특정 단백질 서열의 선택은 기능적 효능을 위한 통상적인 방법을 사용하여 당업자에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, VH 및 VL 도메인 사이에 위치한 다양한 링커 폴리펩티드 서열, 세포 외 항원 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 위치한 다양한 스페이서 폴리펩티드 서열(힌지라고도 함), 다양한 막횡단 도메인 및 다양한 세포 내 도메인, 바람직하게는 공동 자극(co-stimulatory) 및 신호 전달 도메인이 이용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 실시 예에서, 상기 CAR, 및 본 명세서에 언급된 각각의 구성 요소 또는 도메인은 항체 단편-CXCR5 항원 상호 작용을 유해하게 방해하지 않도록 구성되고, 상기 CAR이 상기 CAR을 발현하는 T 세포에서 발현될 때 T 세포 활성화를 유해하게 방해하지 않도록 구성되고, 상기 CXCR5 표적에 결합시 T 세포 활성화를 자극하는 신호를 제공하는 CAR을 유해하게 방해하지 않도록 구성된다.

[0045] CXCR5 CAR의 이들 특성을 평가하기 위한 실험적 접근법이 본 명세서에 기재되어 있어, 본 발명은 하기에 예로써 개시된 특정 서열에 제한되지 않고 본 명세서에 기술된 유형의 다양한 기능적 서열 변이체 및 도메인의 조합을 포함하는 것으로 간주된다. 예를 들어, CXCR5-발현 종양 세포에 의한 본 발명의 CAR-T 세포의 특이적 활성화는 하기에 나타낸 바와 같이 IFN-감마, IL-2 및 TNF-알파의 방출에 의해 입증될 수 있다.

[0046] 본 발명자들의 지식에 따르면, 본 발명은 첫 번째 기술된 CXCR5 CAR, 및 의학적 환경에서 CXCR5 CAR의 바람직한 치료 효과의 기능적 증거에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 다양한 기능적 도메인에 사용된 특정 서열과 독립적으로, CXCR5 CAR의 제공은 병원성 성숙 B 세포 및/또는 기억 B 세포, 및/또는 병원성 T 세포 및/또는 T 폴리클라 헬퍼 세포(T follicular helper cell)와 관련된 많은 질병을 치료하는데 있어서 현저하고 유익한 돌파구를 나타낸다.

[0047] CAR의 항원-결합 도메인과 관련된 실시 예:

[0048] 일 실시 예에서,

[0049] 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것으로, 여기서 항원-결합 도메인은 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 포함하고, 상기 VH는

[0050] - 서열 번호 1(GFTFSTSG)에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (H-CDR1),

[0051] - 서열 번호 2(ISSSSGFV)와 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (H-CDR2), 및

[0052] - 서열 번호 3(ARSEAAF)에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (H-CDR3)를 포함하고,

[0053] 및 상기 VL은 :

[0054] - 서열 번호 4(KSRLSRMGITP)와 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (L-CDR1),

[0055] - 서열 번호 5(RMS)와 66 % 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (L-CDR2), 및

[0056] - 서열 번호 6(AQFLEYPPT)과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (L-CDR3)를 포함한다.

[0057] 일 실시 예에서, 본 발명은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3의 CDR 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6의 CDR 서열을 포함하는 VL을 포함하는 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0058] 바람직할 실시 예에서, 서열 번호 1 내지 6의 특정 CDR 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 변이체(sequence variants)는 서열 번호 1 내지 6의 특정 CDR 서열을 포함하는 VH 및 VL 도메인과 본질적으로 동일하거나 유사한 기능적 특성으로 CXCR5 결합을 유지한다. 즉, CXCR5 결합은 친화성, 특이성 및 에피토프 결합 모드와 관련하여 본질적으로 동일하거나 유사하다.

[0059] scFV 단편의 아미노산 서열은 원래 랫트-항-인간 CXCR5 항체로부터 얻어졌으며, 막횡단 수용체 구조와 관련하여 폴딩 및 발현을 허용하기 위해, 예를 들어 VL 및 VH 쇄의 인간화에 의하여 다수의 개선과 관련하여 변형되었다.

[0060] 또한, 상기 경쇄 및 중쇄 단편의 순서는 상기 항원 결합 단편의 원하는 구성에 따라 반전(inverted)될 수 있다.

[0061] 또한, 일부 실시 예에서, 상기 CAR 기능을 향상시키기 위해 중쇄 및 경쇄 사이의 링커 서열이 예를 들어 단축(shortening)에 의해 변형되었다.

[0062] 또한, 상기 CAR을 암호화하는 핵산 서열은 상기 CAR의 발현을 개선하기 위해 코돈-최적화되었다.

- [0063] 이러한 변형은 T 세포에서 충분한 표면 발현을 가능하게 하고 여전히 적절한 항원 결합을 유지한다. CAR-T 세포는 높은 친화도 및 높은 결합력으로 i) 인식, ii) 활성화 및 iii) 높은, 중간 또는 낮은 CXCR5 표면 발현으로 종양 표적 세포를 사멸시킬 수 있다.
- [0064] 본 발명자들의 지식에 따르면, 항-CXCR5 CAR 또는 인간화(humanized) 항-CXCR5 항체는 당업계에 이미 기술되어 있지 않다.
- [0065] 본 명세서에 기재된 항-CXCR5 CAR-T 세포의 항원-결합 도메인의 높은 친화도 및 친화성으로 인해, 심지어 낮은 CXCR5-발현 성숙 B-NHL이 인식될 수 있어 T 세포 활성화 및 종양 세포 사멸이 가능하다.
- [0066] 본 명세서에 기재된 항-CXCR5 CAR-T 세포 생성물은 독특한 특성을 특징으로 한다.
- [0067] 본 명세서에 기재된 바와 같은 항-CXCR5 CAR은 T 세포에 대해 높은 친화성을 가지며 높은 특이성 및 결합성(avidity)을 부여한다. 이들 특성은 CAR-T 세포가 i) 인식, ii) 활성화, 및 iii) 높고 낮은 CXCR5 표면 발현으로 종양 표적 세포를 사멸시킬 수 있게 한다.
- [0068] 종양 세포 표면에서 발현되는 CXCR5 항원의 수는 Quantibrite beads(Becton Dickinson)와 함께 형광 염료에 결합된 항-CXCR5 항체를 사용하여 정량화할 수 있다. 종양 세포 표면에 발현되는 CXCR5 항원을 정량하기 위해 적용되는 선호되는 방법은 "형광 활성화 세포 선별/세포 분석"(FACS)이다. 비드의 형광 강도는 세포에 결합된 형광 항체의 수와 정확하게 관련이 있으며, 이는 세포 상의 CXCR5 분자 수에 대한 척도이다.
- [0069] 본 명세서에 기재된 VH 및 VL 단편은 CAR에서 다중 구성(multiple configurations)으로 배열될 수 있고 표적 에피토프에 대한 높은 특이성 및 높은 친화성을 여전히 유지한다. 일부 실시 예에서, 상기 CAR은 링커, 힌지, 막횡단 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 활성화 도메인의 변화와 함께 VH-VL 또는 VL-VH 구성으로 구성될 수 있고, 여전히 그의 효능을 유지한다. 본 발명의 이러한 놀라운 특징은 CXCR5에 대한 CAR의 설계에 있어서 더 큰 유연성을 가능하게 하여, 추가적인 개발이 필요하거나 원하는 경우, 본 명세서에 기술된 VH 및 VL 도메인에 기초하여 CAR 구조의 추가 변형 및/또는 최적화를 가능하게 한다.
- [0070] 래트 및 인간화된 서열의 서열 정렬이 도 4에 도시되어 있다. 따라서, 하기 서열은 또한 래트 및 인간화 형태의 항원-결합 도메인 둘 모두를 나타내는 일반화된 서열을 포함한다. 아래 서열에서, 각각의 X는 잠재적인 아미노산 변화를 나타낸다. 바람직한 아미노산 치환은 각각 잠재적으로 변경된 위치에 대해 기재된 것들이다.
- [0071] 본 명세서에 제안된 임의의 주어진 잠재적 변이체 잔기("일반화된 서열"에서 X로 식별된)에 대한 모든 가능한 변형의 조합은 본 발명에 포함된다. 이들 다양한 치환 중 하나 이상을 조합함으로써, 본 명세서에 설명된 래트 항원-결합 도메인의 원하는 결합 특성을 나타내는 인간화된 변이체가 생성될 수 있다. 본 명세서에 기재된 CAR 또는 이의 일부는 또한 명시적으로 개시되거나 서열식을 통해 개시된 인간화 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 바람직하게는 90%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0072] 일 실시 예에서, 본 발명은 하기 서열 번호 7에 대하여 적어도 70%, 80% 서열 동일성, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 이상 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인,
- [0073] EVQLVESGGGLVQPGX1SLX2LSCX3ASGFTFTSGMX4WFRQAPGKGLX5VWX6YISSSGFVYADX7VKGRFTISRDAQNAX8LYLQX9NSLX10X11EDTAX12YYCARSEAAFWGQGLTVSS,
- [0074] 여기서 X1-X12는 임의의 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 X1: G 또는 K; X2: R 또는 K; X3: A 또는 S; X4: N 또는 H; X5: E 또는 D; X6: S 또는 A; X7: S 또는 A; X8: S 또는 T; X9: M 또는 L; X10: R 또는 K, X11: A 또는 S; X12: V 또는 I이다;
- [0075] 및 하기의 서열 번호 8에 대해 적어도 80% 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 85%, 90%, 95% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하는 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이다:
- [0076] DIVLTQX1PRSX2PVTGPGEX3ASISCRSX4KSRLSRMGITPLNWYLQKPGX5SPQLLIYRMSNX6ASGVPDRFSGSGSX7TDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPPPTFGSGTKLEIK,
- [0077] 여기서 X1-X7은 임의의 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 X1: S 또는 A; X2: L 또는 V; X3: P 또는 S; X4: S 또는 N; X5: Q 또는 K; X6: R 또는 L; X7: G 또는 E이다.
- [0078] 바람직할 실시 예에서, 본 명세서에 열거된 특정 VH 및 VL 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 변이체는 본 명세서에 언급된 특정 서열을 갖는 VH 및 VL 도메인과 본질적으로 동일하거나 유사한 기능적 특성과 함께

CXCR5 결합을 유지한다. 즉 CXCR5 결합은 친화성, 특이성 및 에피토프 결합 모드와 관련하여 본질적으로 동일하거나 유사하다.

- [0079] 일 실시 예에서, 본 발명은
- [0080] - 서열 번호 9
- [0081] (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSGMHWFRQAPGKGLEWVSYSISSSGFVYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSEAAFWGQGT LVTSS),
- [0082] - 또는 서열 번호 10
- [0083] (EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSASGFTFTSGMHWFRQAPGKGLDWVAYISSSGFVYADAVKGRFTISRDNANQNTLYQLNSLKSEDTAIYYCARSEAAFWGQGT LVTSS)에 따른 VH 도메인
- [0084] - 및 서열 번호 11
- [0085] (DIVLTQSPRS LPTVPGEPAISCRSSKSR LSRMGITPLN WYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVG VYYCAQFLEYPTFGSGTKLEIK),
- [0086] - 또는 서열 번호
- [0087] (DIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSR LSRMGITPLN WYLQKPGKSPQLLIYRMSNLASGV PDRFSGSGSETDFTLKISKVETEDVG VYYCAQFLEYPTFGSGTKLEIK)에 따른 VL 도메인을 포함하는 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0088] 추가의 실시 예에서, 본 발명은 하나 이상의 링커, 스페이서, 막횡단 및 신호 전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이다. 일 실시 예에서, 상기 CAR은 공동-자극 도메인 및 신호 전달(활성화) 도메인을 포함하는 세포 내 도메인을 포함한다.
- [0089] 일 실시 예에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이며, 여기서, 상기 세포 외 항원 결합 도메인은 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 위치하는 링커 폴리펩티드를 포함하고, 상기 링커는 바람직하게는 하기로부터 선택된다:
- [0090] - a Whitlow (서열 번호 13; GSTSGSGKPGSGEGSTKG), 또는
- [0091] - Gly-Ser (서열 번호 14; SSGGGSGGGSGGGGS) 링커, 또는
- [0092] - 서열 번호 13 또는 14에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커.
- [0093] 일 실시 예에서, 본 발명은 세포 외 항원-결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 위치한 스페이서 폴리펩티드를 추가로 포함하는 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것으로, 상기 스페이서는 하기로부터 선택된다:
- [0094] - IgG1 스페이서 (서열 번호 15; PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKDPK),
- [0095] - IgG1△ 스페이서 (서열 번호16; PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK),
- [0096] - IgG4 (Hi-CH2-CH3) 스페이서 (서열 번호17; ESKYGPPCPAPFEFGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK),
- [0097] - IgG4 (Hi-CH3) 스페이서 (서열 번호18; ESKYGPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK),

- [0098] - IgG4 (Hi) 스페이서 (서열 번호19; ESKYGPPCPPCP), 또는
- [0099] - 서열 번호 15 또는 19 중 어느 하나에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 스페이서.
- [0100] 일 실시 예에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이며, 여기서 상기 막횡단 도메인은 하기로부터 선택된다:
- [0101] - a CD8 α 도메인 (서열 번호 20; IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC), 또는
- [0102] - a CD28 도메인 (서열 번호 21; FWVLVVGGVLACYSLLVTAFIIFWV), 또는
- [0103] - 서열 번호 20 또는 21과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 막횡단 도메인.
- [0104] 일 실시 예에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이며, 여기서 상기 세포 내 도메인은 하기로부터 선택된다:
- [0105] - 4-1BB 공동-자극 도메인(서열 번호 22; KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL)으로부터 선택되는 공동-자극 도메인, 및/또는
- [0106] - a CD28 공동-자극 도메인(서열 번호 23; RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSL), 또는
- [0107] - 인접하게 배열된 4-1BB(서열 번호 22) 및 CD28 공동 자극 도메인(서열 번호 23) 둘 다를 포함하는 공동-자극 도메인, 또는
- [0108] - 서열 번호 22 또는 23과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 공동-자극 도메인.
- [0109] 일 실시 예에서, 본 발명은 추가로 신호 전달(signaling) 도메인(또는 활성화 도메인으로 공지됨)을 추가로 포함하는 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것으로, 여기서, 상기 신호 전달 도메인은 하기로부터 선택된다:
- [0110] - a CD3zeta (4-1BB 또는 CD28) 신호 전달 도메인 (서열 번호 24; LRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR), 또는
- [0111] - 서열 번호 24와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 공동-자극 도메인.
- [0112] 일 실시 예에서, 본 발명은 서열 번호 25, 26, 27, 28 또는 29 중 어느 하나에 따른 서열을 포함하는 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0113] 상기 신호 전달 도메인(signaling domains)의 교환은 강력하고 빠른 효과기 단계(effector phase)(CD28 공동-자극 도메인), 또는 T 세포 메모리 집단(4-1BB 신호 전달 도메인)에 의해 확보된 오래 지속되는 재발 제어(long-lasting relapse control)에 대한 요구를 충족시킨다. 본 명세서에 입증된 바와 같이, 상기 다양한 신호 전달 도메인은 유리한 결합 특성의 손실없이 그의 설계에 대해 유연성을 갖는 CAR을 제공하는 다중 구성(multiple configuration)으로 교환될 수 있다.
- [0114] 본 발명의 다른 실시 예에서, 상기 CAR은 다음 구성을 포함할 수 있다 :
- [0115] - H28: MP71-hCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1-CD28-CD28-CD3z
- [0116] - R28: MP71-ratCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1-CD28-CD28-CD3z
- [0117] - HBB1: MP71-hCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1 Δ -CD8 α -4-1BB-CD3z
- [0118] - HBB2: MP71-hCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1-CD28-4-1BB-CD3z
- [0119] - H28BB: MP71-hCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1-CD28-CD28-4-1BB-CD3z
- [0120] 특정 구성은 바람직하지만 비제한적인 실시 예로서 의도된다. 상기 구성은 또한 본 명세서에 설명된 실시 예들의 특정 서열에 의해 제한되도록 의도되지 않는다. 이들 구성과 관련하여 서열 변형이 가능하며 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0121] 링커, 스페이서, 막횡단 및 세포 내 도메인으로 사용된 변이체(대체 성분을 부가함으로써)로 인해, 다양한 구성 요소가 당업자에 의해 교환될 수 있음이 명백해지고, 상기 CXCR5 결합 특성이 유지되어 원하는 생물학적 효과를 유지할 수 있다.

- [0122] 바람직일 실시 예에서, MP71-백터 및 감마-레트로바이러스 발현 시스템과 조합하여, 인간 T 세포에 대한 비정상적으로 높은 형질 도입율이 달성될 수 있다. 형질 도입 시스템(transduction system)은 상기 CAR 구조물의 모듈형 설계로 인해 가변적이며, 이는 본 발명을 수행할 때 당업자의 요구 및 선호도에 따라 렌티바이러스(lentiviruses) 및 트랜스포손(transposons)이 사용될 수 있음을 의미한다. CXCR5 CAR에 대한 유전자 정보/핵산 분자의 전달은 또한 표적 세포주, 바람직하게는 T 림프구(T lymphocyte), 자연 살해 세포(Natural Killer Cells) 및 유도된 다능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell), iPS로의 CrispR/Cas 및 TALEN 매개 삽입을 포함한다. CXCR5 CAR에 대한 유전자 정보/핵산 분자를 상기 CAR을 발현하는 세포로 전달하기 위한 모든 적합한 방법은 본 발명에 포함되며, 상기 적합한 방법은 본 발명을 수행할 때 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 예를 들어, T 세포를 형질 전환시키는 다수의 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 변형된 레트로비리다에(Retroviridae)에 기초한 것과 같은 임의의 주어진 바이러스-기반 유전자 전달 방법, 및 DNA-기반 트랜스포손 및 전기 천공법에 의한 mRNA의 직접 전달과 같은 비-바이러스성 방법이 포함된다.
- [0123] 또한, 상기 CAR 구조물의 신호 전달 성분은 임상적으로 적용 가능한 항-CXCR5 CAR의 모듈 조성물(modular composition) 및 당업자 의한 맞춤형 구성(tailor-made construction)을 가능하게 하는 3단계 클로닝 절차에서 교환되었다.
- [0124] 본 발명의 다른 실시 예에서, 본 발명은 바람직하게는 백터, 예를 들어 바이러스 백터 또는 트랜스포손 백터와, 바람직하게는 슬리핑 뷰티 백터(sleeping beauty vector)의 형태인, 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택된 단리된 핵산 분자에 관한 것이다:
- [0125] a) 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자, 상기 뉴클레오타이드 서열은
- [0126] - 본 명세서에 기재된 CAR의 임의의 실시 예에 따른 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 암호화하는,
- [0127] - 세포 외 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포 내 도메인을 암호화하며, 여기서 세포 외 항원-결합 도메인은 서열 번호 37 또는 38의 적어도 하나의 서열 및 서열 번호 39 또는 40의 적어도 하나의 서열에 의해 암호화된다,
- [0128] - 서열 번호 31, 32, 33, 34 또는 35에 따른다, 및/또는
- [0129] b) a)에 따른 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 핵산 분자;
- [0130] c) a) 또는 b)에 따른 뉴클레오타이드 서열과 기능적으로 유사하고/동일하도록 충분한 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 바람직하게는 a) 또는 b)에 따른 뉴클레오타이드 서열과 80% 서열 동일성을 포함하는 핵산 분자;
- [0131] d) 상기 유전자 코드의 결과로서 a) 내지 c)에 따른 뉴클레오타이드 서열로 축퇴(degenerate)되는 핵산 분자; 및/또는
- [0132] e) 결실, 부가, 치환, 전좌, 역전 및/또는 삽입에 의해 변형되고 a) 내지 d)에 따른 뉴클레오타이드 서열과 기능적으로 유사/동등한 a) 내지 d)의 뉴클레오타이드 서열에 따른 핵산 분자.
- [0133] 본 발명의 다른 실시 예에서, 본 발명은 바람직하게는 백터, 예를 들어 바이러스 백터 또는 트랜스포손 백터와, 바람직하게는 슬리핑 뷰티 백터(sleeping beauty vector)의 형태인, 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택된 단리된 핵산 분자에 관한 것이다:
- [0134] a) 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자, 상기 뉴클레오타이드 서열은
- [0135] - 본 명세서에 기재된 CAR의 임의의 실시 예에 따른 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 암호화하는,
- [0136] - 세포 외 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포 내 도메인을 암호화하며, 여기서 세포 외 항원-결합 도메인은 서열 번호 37, 53 또는 38의 적어도 하나의 서열 및 서열 번호 39, 54 또는 40의 적어도 하나의 서열에 의해 암호화된다,
- [0137] - 서열 번호 31, 32, 33, 34 또는 35에 따른다, 및/또는
- [0138] b) a)에 따른 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 핵산 분자;
- [0139] c) a) 또는 b)에 따른 뉴클레오타이드 서열과 기능적으로 유사하고/동일하도록 충분한 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, a) 또는 b)에 따른 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80%의 서열 동일성, 바람직하게는

a) 또는 b)에 따른 뉴클레오티드 서열과 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 포함하는 핵산 분자; 여기서 기능적 상동성(functional analogy)은 CXCR5 표적 항원의 결합에 관한 것이며, 상응하는 T 세포가 상기 구조물을 발현할 때, 상기 CAR-T 세포 생성물은 성숙한 B-NHL에 대해 세포 독성 활성을 갖는 T 세포를 부여하고(confers), 동시에, T 세포(Tfh 또는 본 명세서에 기재된 다른 T 세포 림프종 제외), 혈장 B 세포 및 이들의 골수 전구체와 같은 정상적인 조혈 세포를 피하고(sparing); 및/또는

[0140] d) 상기 유전자 코드의 결과로서 a) 내지 c)에 따라 뉴클레오티드 서열로 변성되는 핵산 분자.

[0141] 축퇴하다(degenerate)(또는 축퇴되다) 용어는 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열의 차이를 말하지만, 유전자 코드에 따르면 번역 후 뉴클레오티드 서열의 아미노산 단백질 생성물의 차이를 초래하지는 않는다. 일 실시 예에서, 상기 핵산 분자는 a) 및 b), a), b) 및 c) 또는 a), b) 및 d) 하의 상기 분자에 관한 것이다.

표 1

[0142] 본 발명의 바람직한 아미노산 및 뉴클레오티드 서열

| 서열 번호 | 서열 | 설명 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | GTFTSTSG | H-CDR1 |
| 2 | ISSSSGFV | H-CDR2 |
| 3 | ARSEAAF | H-CDR3 |
| 4 | KSRLSRMGITP | L-CDR1 |
| 5 | RMS | L-CDR2 |
| 6 | AQFLEYPPT | L-CDR3 |
| 7 | EVQLVESGGGLVQPGX1SLX2LSCX3ASGFTFTSTSGMX4WFRQAPGKGLX5WVX6YISSSSGFVYADX7VKGRFTISRDNAX9NSLX10X11EDTAX12YYCARSEAAFVWGQGLTVTVSS 여기서 X1: G 또는 K, X2: R 또는 K; X3: A 또는 S; X4: N 또는 H; X5: E 또는 D; X6: S 또는 A; X7: S 또는 A; X8: S 또는 T; X9: M 또는 L; X10: R 또는 K, X11: A 또는 S; X12: V 또는 I | 랫 및 인간화된 서열 둘 모두를 포함하는 "일 반화된" VH 서열 |
| 7 | EVQLVESGGGLVQPGXSLXLSXASGFTFTSTSGMXWFRQAPGKGLXWVXYISSSSGFVYADXVKGRFTISRDNAXNLXLQXNSLXXEDTAXYYCARSEAAFVWGQGLTVTVSS 여기서 X는 임의의 아미노산, 바람직하게는 상기 아미노산이다. | 랫 및 인간화된 서열 둘 모두를 포함하는 "일 반화된" VH 서열 |
| 8 | DIVLTQX1PRXS2PVTPEGX3ASISCRSX4KSRLSRMGITPLNWLQKPGX5SPQLLIYRMSNX6ASGVPDRFSGSGSX7TDFTLKISKVETEDVGVYYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK 여기서 X1: S 또는 A; X2: L 또는 V; X3: P 또는 S; X4: S 또는 N; X5: Q 또는 K; X6: R 또는 L; X7: G 또는 E | 랫 및 인간화된 서열 둘 모두를 포함하는 "일 반화된" VL 서열 |
| 8 | DIVLTQXPRXPVTPGEXASISCRSXKSRLSRMGITPLNWLQKPGXSPQLLIYRMSNXASGVPDRFSGSGSXTDFTLKISKVETEDVGVYYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK 여기서 X는 임의의 아미노산, 바람직하게는 상기 아미노산이다. | 랫 및 인간화된 서열 둘 모두를 포함하는 "일 반화된" VL 서열 |
| 9 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTSGMNWFRQAPGKGLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNAXNSLXLQNSLRAEDTAVYYCARSEAAFVWGQGLTVTVSS | 인간화된 VH |
| 10 | EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSASGFTFTSTSGMHWFRQAPGKGLDWVAYISSSSGFVYADAVKGRFTISRDNAXNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARSEAAFVWGQGLTVTVSS | 랫t VH |
| 11 | DIVLTQSPRSLPVTPEGASISCRSSKSRLSRMGITPLNWLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVGVYYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK | 인간화된 VL |
| 12 | DIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSRLSRMGITPLNWLQKPGKSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSETDFTLKISKVETEDVGVYYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK | 랫 VL |
| 13 | GSTSGSGKPGSGEGSTKG | Whitlow 링커 |
| 14 | SSGGGSGGGGSGGGGS | Gly-Ser 링커 |
| 15 | PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK | IgG1 스페이서 |
| 16 | PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGKK | IgG1△ 스페이서 |
| 17 | ESKYGPCCPAPAFEGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK | IgG4 (H1-CH2-CH3) 스페이서 |

| | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 18 | ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGK | IgG4 (HI-CH3) 스페이서 |
| 19 | ESKYGPPCPPCP | IgG4 (HI) 스페이서 |
| 20 | IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC | 막형단 도메인CD8 α |
| 21 | FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV | 막형단 도메인CD28 |
| 22 | KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL | 공동-자극 도메인4-1BB |
| 23 | RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSL | 공동-자극 도메인CD28 |
| 24 | LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | 활성화 도메인CD3 zeta (4-1BB) 또는 (CD28) |
| 25 | MDFQVQIFSFLLSASVIMSREVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSGMWNFRQAPGKLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNALQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVLTQSPRSLPVTGPGEASISCRSSKSLSRMGIPTLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVGVVYCAQFLEYPTFTGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | H28 MP71-hCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1-CD28-CD28-CD3z |
| 26 | MDFQVQIFSFLLSASVIMSREVLVESGGGLVQPGKSLKSCASGFTFTSGMWNFRQAPGKLDWVAYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNALQNTLYLQNLKSEDTAIYYCARSEAAFWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSLSRMGIPTLNWYLQKPGKSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSETDFTLKISKVETEDVGVVYCAQFLEYPTFTGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | R28 MP71-ratCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1-CD28-CD28-CD3z |
| 27 | MDFQVQIFSFLLSASVIMSREVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSGMWNFRQAPGKLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNALQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVLTQSPRSLPVTGPGEASISCRSSKSLSRMGIPTLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVGVVYCAQFLEYPTFTGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGKKIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | HBB1 MP71-hCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1 Δ -CD8 α -4-1BB-CD3z |
| 28 | MDFQVQIFSFLLSASVIMSREVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSGMWNFRQAPGKLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNALQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVLTQSPRSLPVTGPGEASISCRSSKSLSRMGIPTLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVGVVYCAQFLEYPTFTGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVSRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | HBB2 MP71-hCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1-CD28-4-1BB-CD3z |
| 29 | MDFQVQIFSFLLSASVIMSREVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSGMWNFRQAPGKLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNALQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVLTQSPRSLPVTGPGEASISCRSSKSLSRMGIPTLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVGVVYCAQFLEYPTFTGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | H28BB MP71-hCXCR5-VH-Whitlow-VL-IgG1-CD28-CD28-4-1BB-CD3z |
| 30 | MDFQVQIFSFLLSASVIMSR | Lkappa Leader |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 31 | <p>ATGGATTTCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCCAGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTGCAG CTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCCGCAGCGGCTTC ACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTTCAGACAGGCCCTGGCAAGGGCCCTGGAATGGGTGTCTACATC AGCAGCAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCAGAGACAACGCCCAG AACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCGAG GCCGCCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACAGTGTCCAGCGGCAGCAAGCGGCTCTGGCAAACCTGGA TCTGGCGAGGGCAGCACCAGGGCGATATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGC GAGCCTGCCAGCATCAGTGCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCTCTGAACTGG TATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCTGCC GATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCTGAAAGATAGCAAGGTGGAACCGAGGACGTG GGCGTGTACTATTGCGCCAGTTCTTGAATACCCCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAATCAAG CCCGCCGAGCCCAAGAGCCCCGACAAGACCCATACCTGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCT AGCGGTGTTCTGTTCCTCCCAAGGCCAAGGACACCTGTATGATCGCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGGATGTGTCTACAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCTGGAAAGTCACAAAC GCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCAT CAGGACTGGTGAACGGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCTCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAGCCCGCGAGCCCGAGGTGTACACACTGCCCTCCAAGCAGGGAGGAGTG ACCAAGAACCAGGTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAAACCTACACGAGAGAGCCCTCTCCTGTCTCCGGGTAAAAAAGATCCCAAAATTTTGGGTG CTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTGTATAGCTGTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCGCCCCGGGCCACCCGC AAGCATTACAGCCCTATGCCCCACCGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGG AGCGCAGACCCCCCGCTACAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCT CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC GAGCGCCGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTGA</p> | <p>H28 MP71-hCXCR5-VH-W hit low-VL-IgG1-C D28-CD28-CD3z</p> |
| 32 | <p>ATGGATTTCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCCAGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTACAG CTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTAGTGCAGCTGGAAGTCCCTGAAACTCTCTGTTCAGCCTCTGGATTTC ACATTAGTACCTCTGGCATGCACTGGTTTCGCCAAGCTCCAGGAAAGGGCTGGATTGGGTGTCATACATT AGTAGTAGCAGCGGTTTCGTCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATGCACAG AACACCCTGTACCTGCAACTCAACAGTCTGAAGTCTGAAGACTGCCATCTATTACTGTGAAGAAGCGAG GCTGCTTTCTGGGGCCAAAGGCACTCTGGTCACTGTCTTTCAGGCAGCACCAGCGCTCCGGCAAGCCTGGC TCTGGCGAGGGCAGCACAAGGGAGATATTGTGTTGACTCAAGCTCCACGCTCTGTATCTGTCACTCCTGGA GAGTCACTTCCATCTCTGCAGGTCTAATAAGAGTCGACTGAGTAGGATGGGCATCACTCCCTTGAATTGG TACCTTCAGAAGCCAGGAAAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCTCAGGAGTTCCA GACAGGTTTAGTGGCAGTGGGTGAGAAACAGATTTTACACTGAAATCAGTAAGGTGGAGACTGAGGATGTT GGCGTTTATTACTGTGCAGATTCTAGAATATCCTCCTACGTTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAA CCTGCCGAGCCTAAGAGCCCCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCT AGCGTGTCTGTTCCTCCCAAGGCCAAGGATACCCTGATGATCGCCCGGACCCCGAAGTCACATGCGTG GTGGTGAGCTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCAC CAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCTCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAAACCTACACGAGAGAGCCCTCTCCTGTCTCCGGGTAAAAAAGATCCCAAAATTTTGGGTG CTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTGTATAGCTGTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCGCCCCGGGCCACCCGC AAGCATTACAGCCCTATGCCCCACCGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGG AGCGCAGACCCCCCGCTACAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCT CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC GAGCGCCGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTGA</p> | <p>R28 MP71-ratCXCR5-VH -Whit low-VL-IgG1 -CD28-CD28-CD3z</p> |

| | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 33 | <p>ATGGATTTCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCCAGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTGCAG CTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTTCAGACAGGCCCTGGCAAGGGCCCTGGAATGGGTGTCTACATC AGCAGCAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCAGAGACAACGCCCAG AACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGTGCCAGAAGCGAG GCCGCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACAGTGTCCAGCGGCAGACAAGCGGCTCTGGCAAACTGGA TCTGGCGAGGGCAGCACCAGGGCGATATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGC GAGCCTGCCAGCATCAGTGCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCCCCTGAACTGG TATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGTGCTGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCTGCC GATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCTGAAGATCAGCAAGGTGGAACCGAGGACGTG GGCGTGTACTATTGCGCCAGTTCTTGAATACCCCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAATCAAG CCCGCGAGCCCAAGAGCCCCGACAAGACCCATACCTGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCT AGCGTGTCTGTTTCCCCCAAGGCCAAGGACACCTGTATGATCGCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGATGTGTCCACAGGATCCCGAAGTGAAGTTCATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAC GCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCAT CAGGACTGGTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAGCCCGCGAGCCCGAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG AGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTG TACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCAGCCTGAGCCCAAGGCAAGAAGATCTACATCTGGGCC CCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGTGCTGTCTCTCGTGATCAGCTGTACTGCAAGCGGGCAGAAAG AAGCTGTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCTATGCGGCCGTGCAGACCCAGGAAGAGGACGGCTGTCTC TGCAGATTTCCCGAGGAAGAAGAGGGCGGTGCGAGCTGTGCGCGTGAAGTTTCTAGAAGCGCGACGCC CCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTG CTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCTGAGATGGGCGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCCGGAAGGCTGT TATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCTACAGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGA GGCAAGGGCCACGATGGACTGTACAGGGCCGTGAGCACCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATG CAGGCTCTGCCCCCAGATAA</p> | <p>HBB1 MP71-hCXCR5-VH-W hit low-VL-IgG1 △-CD8 α-4-1BB-CD3z</p> |
| 34 | <p>ATGGATTTCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCCAGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTGCAG CTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTTCAGACAGGCCCTGGCAAGGGCCCTGGAATGGGTGTCTACATC AGCAGCAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCAGAGACAACGCCCAG AACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGTGCCAGAAGCGAG GCCGCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACAGTGTCCAGCGGCAGACAAGCGGCTCTGGCAAACTGGA TCTGGCGAGGGCAGCACCAGGGCGATATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGC GAGCCTGCCAGCATCAGTGCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCCCCTGAACTGG TATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGTGCTGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCTGCC GATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCTGAAGATCAGCAAGGTGGAACCGAGGACGTG GGCGTGTACTATTGCGCCAGTTCTTGAATACCCCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAATCAAG CCCGCGAGCCCAAGAGCCCCGACAAGACCCATACCTGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCT AGCGTGTCTGTTTCCCCCAAGGCCAAGGACACCTGTATGATCGCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAC GCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCAT CAGGACTGGTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAGCCCGCGAGCCCGAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAAGTGGGAG AGCAATGGGAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCGGGTAAGGATCCCAAAATTTGGGTG CTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTGTATAGCTGTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG AAGCGGGCAGAAAAGAGTGTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCGTGCAGACCCAGGAA GAGGACGGCTGCTCTGCAGATTCCCGAGGAAGAAGAAGCGGCTGCGAGCTGTGAGAGTGAAGTTACG AGGAGCGCAGACGCCCCCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGA GAGGAGTACGATGTTTTGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAA GGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA</p> | <p>HBB2 MP71-hCXCR5-VH-W hit low-VL-IgG1-C D28-4-1BB-CD3z</p> |

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 35 | ATGGATTTCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCCAGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTTCAGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCAGCAGAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCAGAGACAACGCCAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGTGCCAGAAGCGAGGCCGCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGCAGTGTCCAGCGGCAGACAAGCGGCTCTGGCAACCTGGA TCTGGCGAGGGCAGCACCAGGGCGATATCGTGTGACCCAGAGCCCCAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGC GAGCCTGCCAGCATCAGTGCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATACCCCCCTGAACTGG TATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCTGCC GATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCTGAAAGATCAGCAAGGTGGAACCGAGGACGTG GCGTGTACTATTGCGCCAGTTCTTGAATACCCCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAATCAAG CCCCGGAGCCCAAGAGCCCCGACAAGACCCATACCTGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCT AGCGTGTCTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCTGTATGATCGCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGTGTGTGTCACAGGATCCCGAAGTGAAGTTCATTTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAC GCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCAT CAGGACTGGTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCATCGAGAAA ACCCATCTCCAAGGCCAAGGGACAGCCCGCGAGCCCGAGGTGTACACACTGCCTCCAGCAGGGAGGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGCTGCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACTACACGCAAGAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAAGATCCCAAAATTTTGGGTG CTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTGTATAGCTGTAGTAAAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGC AAGCATTACAGCCCTATGCCCCACCGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCCTGAAGCGGGCAGAAAGAG CTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTCATGCGGCCCGTGACACCACAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGC AGATTTCCCGAGGAAGAAGAAGGCGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCG TACCAGCAGGGCCAGAACCAGTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGACCTGTAGATGGGGGAAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCGCTGACAA TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAAGTGGGATGAAGGCGAGCGCGGAGGGGCAAG GGGCAGGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCC CTGCCCTCGCTGA | H28BB MP71-hCXCR5-VH-W hit low-VL-IgG1-C D28-CD28-4-1BB-C D3z |
| 36 | ATGGATTTCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCCAGCGTGATCATGAGCCGC | Lkappa Leader |
| 37 | GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTCGCC AGCGGCTTACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTTCAGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG TCCTACATCAGCAGCAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCAGAGAC AACGCCCAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGTGCC AGAAGCGAGGCGCCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACAGTGTCCAGC | 인간화된 VH Codon-optimized |
| 53 | GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGCGCGGCCCTGGTGCAGCCCGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGC AGCGGCTTACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTTCAGGACAGGCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG AGCTACATCAGCAGCAGCAGCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGAC AACGCCCAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCC AGGAGCGAGCGCCCTTCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTG | 인간화된 VH Non-codon-optimized |
| 38 | GAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTAGTGCAGCTGGAAGTCCCTGAACTCTCCTGTTACGCC TCTGGATTACATTACAGTACCTTGGCATGCACTGGTTTCGCCAAGCTCCAGGAAAGGGGCTGGATTGGGTG GCATACATTAGTAGTAGCAGCGGTTTCGTCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGAC AATGCACAGAACACCTGTACCTGCAACTCAACAGTCTGAAGTCTGAAGCACTGCCATCTATTACTGTGCA AGAAGCGAGGCTGCTTTCTGGGGCCAAAGCACTCTGGTACTGTCTTTCA | 래트 VH |
| 39 | GATATCGTGTGACCCAGAGCCCCAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAGA AGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATACCCCCCTGAACTGGTATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCC CCCCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCTGCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGC GGCACCGACTTACCCCTGAAGATCAGCAAGGTGGAACCGAGGACGTGGCGGTGTACTATTGCGCCAGTTCT GGAATACCCCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAATCAAG | 인간화된 VL |
| 54 | GACATCGTGTGACCCAGAGCCCCGCGAGCCTGCCCGTGACCCCGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGG TCCTCCAAGTCCAGGCTGAGCAGGATGGGCATACCCCCCTGAACTGGTACCTGCAGAACCCCGGCCAGAGC CCCCAGCTGCTGATCTACAGGATGAGCAACAGGGCCAGCGGCTGCCGACAGGTTACAGCGGCAGCGGCAGC GGCACCGACTTACCCCTGAAGATCAGCAAGGTGGAGACCGAGGACGTGGCGGTGTACTACTGCGCCAGTTCT GGGAGTACCCCCACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG | 인간화된 VL Non-codon-optimized |
| 40 | GATATTGTGTTGACTCAAGCTCCACGCTCTGTATCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGCTTCCATCTCCTGCAGG TCTAATAAGAGTCGACTGAGTAGGATGGGCATCACTCCCTTGAATTGGTACCTTCAGAAGCCAGGAAAGTCT CCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCCCTCAGGAGTTCAGACAGGTTTGTGGCAGTGGGTCA GAAACAGATTTTACACTGAAAATCAGTAAGGTGGAGACTGAGGATGTTGGCGTTTATTACTGTGCACAGTTT CTAGAATATCTCTACGTTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAA | 래트 VL |
| 41 | GGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGCAGCACCAAGGGC | 인간화된 Whitlow |
| 42 | GGCAGCACCAGCGGCTCCGGCAAGCCTGGCTCTGGCGAGGGCAGCACAAAGGGA | 래트 Whitlow |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 43 | CCCGCCGAGCCCAAGAGCCCCGACAAGACCCATACCTGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCGCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAAAGATCCCAAA | 인간화된 IgG1 스페이서 |
| 44 | CCTGCCGAGCCTAAGAGCCCCGACAAGACCCACACCTGTCCCTTGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGATACCTGATGATCGCCCGGACCCCGAAGTCACATGCGTGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCTCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAAAGATCCCAAA | 랫 IgG1 스페이서 |
| 45 | CCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTGTGTGGACAGCGACGGCTCATTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCTCTGCAACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCAGCCTGAGCCAGGCAAGAAG | 인간화된 IgG1△ 스페이서 |
| 46 | CCTGCCGAGCCTAAGAGCCCCGACAAGACCCACACCTGTCCCTTGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGATACCTGATGATCGCCCGGACCCCGAAGTCACATGCGTGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCTCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA | 랫 IgG1△ 스페이서 |
| 47 | ATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGTCTGTCTCTCGTGATCACACTGTACTGC | 막형단 도메인CD8α |
| 48 | TTTTGGGTGTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTGTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTCTGGGTG | 막형단 도메인CD28 |
| 49 | AAGCGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTATCGGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGTCTCTGCAGATTCCCGAGGAAGAAGAAGGCGGTGCGAGCTG | 공동-자극 도메인4-1BB |
| 50 | AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGACGCTATCGTCCCTG | 공동-자극 도메인CD28 |
| 51 | CTGCGGTGAAGTTTCTAGAACGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGGTACGACGTGTGATTAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGC AAGCCTAGAAGAAAGAACCCCAAGGAAGGCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAATGAAGGGCAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACC GCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGACGCTCTGCCCCAGATAA | 활성화 도메인CD3 zeta (4-1BB) |
| 52 | AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAG CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCTGTACAATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCTGCCCTCGCTGA | 활성화 도메인CD3 zeta (CD28) |

[0143] 본 발명의 추가 실시 예는 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자, 바람직하게는 바이러스 벡터, 보다 바람직하게는 감마 레트로바이러스 벡터를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본 발명의 다른 실시 예에서, 본 발명은 본 발명의 CAR을 인코딩하고 바람직하게는 발현하는 트랜스포존 벡터, 바람직하게는 슬리핑 뷰티 벡터에 관한 것이다.

[0144] 본 발명의 추가 실시 예는 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 면역 세포에 관한 것이다.

[0145] 바람직일 실시 예에서, "슬리핑 뷰티" 트랜스포존 시스템, 특히 슬리핑 뷰티 트랜스포사제(sleeping beauty transposase)를 이용하여, 본원에 기재된 항-CXCR5 CAR을 암호화하고 발현하는, 본원에 언급된 질환의 치료에 투여하기 위한 상기 면역 세포는 본원에 기재된 바와 같은 핵산으로 유전자 변형된다. 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템은 본원에 기재된 바와 같이 상기 CAR을 발현하도록 면역 세포를 변형시키기 위해 본 발명의 맥락에서 척추동물의 염색체에 정의된 DNA 서열을 정확하게 도입하도록 설계된 합성 DNA 트랜스포존이다. 슬리핑 뷰티 트랜스포존은 바이러스와 네이키드(naked) DNA의 장점을 결합한다. 바이러스는 새로운 숙주 세포에서 감염 및 복제

하는 능력에 기초하여 진화적으로 선택되었다. 동시에, 세포는 바이러스 감염으로부터 스스로를 보호하기 위해 주요 분자 방어 메커니즘을 진화시켰다. 바이러스 사용을 피하는 것도 사회적 및 규제적 이유로 중요하다. 슬리핑 뷰티 트랜스포손과 같은 비-바이러스성 벡터의 사용은 세포가 벡터에 대해 전부는 아니지만 사용하는 많은 방어를 피한다.

- [0146] 본 발명의 추가의 실시 예에서, 핵산을 인코딩하는 CXCR5 CAR의 CrispR/Cas 및 TALEN-매개 삽입이 사용될 수 있다. 박테리아에서 자연 발생 과정으로부터 적응된 당업자에게 공지된 CrispR/Cas는 DNA를 정확하고 효율적으로 편집하여 적절한 코딩 서열을 관심있는 면역 세포, 바람직하게는 T 세포에 삽입하기 위해 사용될 수 있다. 가위의 분자 쌍으로 작용하는 단백질인 Cas9는 관련 RNA 분자(가이드 RNA)에 의해 특정 DNA 서열로 안내된다. Cas9가 DNA의 목표 위치에 도달하면, 해당 유전자의 기능에 영향을 미치는 국소 유전자 코드의 변화를 촉진한다. CRISPR/Cas9는 CAR 유전자를 T 세포 게놈 내의 매우 특정한 부위로 전달할 수 있으며, 이는 부정확하거나 바람직하지 않은 위치에서 유전자 삽입의 위험을 감소시킬 수 있다. 이러한 이유로, 슬리핑 뷰티 시스템은 환자에게 투여하기 위해 면역 세포의 특히 효과적이고 안전한 유전자 변형을 가능하게 한다.
- [0147] 일 실시 예에서, 상기 면역 세포는 바람직하게는 T 림프구 또는 NK 세포, 보다 바람직하게는 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0148] 바람직일 실시 예에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터를 포함하고, 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하는 유전자 변형된 면역 세포는 그것이 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포, 바람직하게는 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 혼합물인 것을 특징으로 한다. 이들 T 세포 집단, 바람직하게는 CD4+ 및 CD8+ 형질 전환 세포(transformed cell) 둘 다를 포함하는 상기 조성물은 다양한 악성 B 세포, 예컨대 B-NHL에 대해, 바람직하게는 본원에 기재된 그러한 세포 및/또는 관련된 의학적 증상에 대해 특히 효과적인 세포 용해 활성(cytolytic activity)을 나타낸다.
- [0149] 바람직일 실시 예에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터를 포함하고, 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하는 유전자 변형된 면역 세포는 CD4 + 및 CD8 + T 세포, 바람직하게는 1:10 내지 10:1의 비율, 더욱 바람직하게는 5:1 내지 1:5, 2:1 내지 1:2 또는 1:1의 비율이다. 본원에 기재된 상기 CAR을 발현하는 CXCR5-지향적 변형된 CAR-T 세포(CXCR5-directed modified CAR-T cell)의 언급된 비율, 바람직하게는 1:1 CD4 + / CD8 + 비율로의 투여는 본원에 언급된 질환의 치료 동안 유리한 특성을 초래하며, 예를 들어 이러한 비율은 치료 반응 개선 및 독성 감소로 이어진다.
- [0150] 본 발명의 부가적이고 놀라운 측면은 본 명세서에 개시된 바와 같은 CAR의 개선된 안정성이다. 상기 CAR 폴리펩티드는 결합 친화력의 손실 없이 적절한 조건하에서 연장된 기간 동안 쉽게 저장될 수 있다.
- [0151] 본 발명의 추가 측면은 CXCR5를 발현하는 병원성 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 면역 세포에 관한 것이다.
- [0152] 일 실시 예에서, 상기 치료될 의학적 장애는 병원성 성숙 B 세포 및/또는 기억 B 세포의 존재와 관련이 있다.
- [0153] 일 예에서, 상기 치료될 의학적 장애는 성숙한 B 세포 비-호지킨 림프종(B-NHL, mature B cell non-Hodgkin's lymphoma)이다.
- [0154] 다른 실시 예에서, 치료될 의학적 장애는 바람직하게는 급성 림프모구성 백혈병(B-ALL, acute lymphoblastic leukemia), 만성 림프구성 백혈병(CLL, chronic lymphocytic leukemia), 소포 림프종(FL, follicular lymphoma), 맨틀 세포 림프종(MCL, mantle cell lymphoma), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma)과 같은 독특한 결절 로딩(nodal lodging)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 B 세포 유래 림프 증식성 장애(B cell derived lymphoproliferative disorder)이다.
- [0155] 일 실시 예에서, 상기 치료될 의학적 장애는 병원성 T 세포 및/또는 T 폴리콜라 헬퍼 세포(T follicular helper cell)의 존재와 관련이 있다.
- [0156] 일 실시 예에서, 상기 치료될 의학적 장애는 백혈병 종양 세포 전파(leukemic tumor cell dissemination)가 있는 또는 없는 T 세포 비-호지킨 림프종(T cell non-Hodgkin's lymphoma)이다.
- [0157] 일 실시 예에서, 상기 치료될 의학적 장애는 백혈병 전파(leukemic dissemination)를 갖는 혈관 면역성 T 세포 림프종(angioimmunoblastic T cell lymphoma), 피부 T 세포 림프종(cutaneous T cell lymphoma) 및 T 세포 림프종(T cell lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 T 세포 유래 림프 증식성 장애(T cell

derived lymphoproliferative disorder)이다.

- [0158] 본 발명의 추가의 실시 예는 자가 항체-의존성 자가 면역 질환(autoantibody-dependent autoimmune disease)의 치료에서 의약으로서 사용하기 위해 본 발명의 CAR을 발현하는 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 면역 세포에 관한 것이다.
- [0159] 바람직할 실시 예에서, 상기 자가 면역 질환은 전신성 홍반성 루푸스(SLE, systemic lupus erythematosus) 또는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)으로부터 선택된다.
- [0160] 최근에만 CAR-T 세포가 자가 항체 매개 질환을 치료하기 위한 표적화된 접근법으로 논의되었다(Ellebrecht et al. (2016) Science 353:179-184). CXCR5를 표적화하는 능력은 자가 반응성 B 세포 및 Tfh 세포의 공동-위치화(co-localization)를 억제할 것이며, 이는 자가 면역 질환의 치료에 큰 이점이 될 것이다.
- [0161] 경증의 자가 면역 질환은 대개 NSAID(nonsteroidal anti-inflammatory drugs) 또는 DMARD(disease-modifying antirheumatic drugs)로 치료된다. 활동성 질환으로 인한 장기 기능 장애를 수반하는 보다 심각한 형태의 SLE(Systemic Lupus Erythematosus) 및 RA(rheumatoid arthritis)는 일반적으로 사이클린 세포를 표적으로 하는 세포 독성 물질인 시클로포스파미드(cyclophosphamide)와 같은 강력한 면역 억제제와 함께 스테로이드로 치료된다. 최근에는 자가면역 질환을 앓고 있는 환자의 혈청에서 증가한 수준에서 발견되는 사이토카인 BAFF를 표적으로 하는 항체인 벨리무맙(Belimumab)만이 SLE에서의 사용을 위해 FDA(Food and Drug Administration)의 승인을 받았다.
- [0162] 그러나 새로 형성된 B 세포만이 인간 생존을 위해 BAFF에 의존하는 반면, 기억 B 세포 및 형질 세포는 선택적 BAFF 억제에 덜 민감하다(Jacobi et al. (2010) Arthritis Rheum 62:201-210). 류마티스 관절염(RA)의 경우, TNF 저해제가 최초의 허가된 생물학적 제제였고, 아바타셉트, 리툽시맙, 토실리주맙 등이 뒤를 이었다; 그들은 염증과 파괴에 관여하는 주요 염증 경로를 억제하고, 그러나 이것은 상대적 면역억제로 인한 감염 위험 증가를 가져온다(Chan et al. (2010) Nat Rev Immunol 10:301-316, Keyser (2011) Curr Rheumatol Rev 7:77-87).
- [0163] 순환(circulation)에서 B 세포를 고갈시키는 모노클로날 항체인 리툽시맙은 특히 RA의 치료뿐만 아니라 다발혈관염 동반성 육아종증(granulomatosis with polyangiitis) 및 다른 항호중구 세포질 항체-연관 혈관염(antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides)에 대해 점차 처방되고 있다. 그러나 리툽시맙은 위험이 없으며 사이클로포스파미드와 유사한 부작용 위험률을 나타낸다(Shah et al. (2015) ImmunoTargets and Therapy 4:173-183). 따라서, 자가 반응성 B 세포 및 자가 항체 반응을 표적으로 하는 보다 미세조정되고 오래 지속되는 접근법이 보장된다.
- [0164] 본 발명은 또한 치료적으로 유효량의 CAR 또는 상기 CAR을 발현하는 면역 세포를 상기 치료가 필요한 환자에게 전형적으로 투여하는 단계를 포함하는, 본원에 기술된 의학적 증상의 치료 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0165] 본 발명은 본 명세서에 개시된 실시 예 및 도면에 의해 실시 예로서 설명된다. 상기 도면들은 본 발명의 하나 이상의 비한정적인 실시 예들의 기술적인 지지를 향상시키는 가능한 및 잠재적으로 가능일 실시 예들의 추가 설명을 제공하는 것으로 간주되어야 한다.
- 도 1: 바람직한 CAR 구조의 개략도.
- 도 2: 바람직한 CAR 구축물 H28, R28, HBB1, HBB2 및 H28BB의 개략도.
- 도 3: 본원에 설명된 상기 CAR의 다양한 구조 요소의 바람직한 구성 및 잠재적 조합의 목록.
- 도 4: mAb 결합 영역과 본 CAR에 사용된 바람직한 인간화 서열 사이의 서열 비교.
- 도 5: mAb 결합 영역 hHC를 암호화하는 DNA 서열의 서열 묘사.
- 도 6: mAb 결합 영역 hLC를 암호화하는 DNA 서열의 서열 묘사.
- 도 7: 인간화 및 래트 CXCR5-CAR 서열을 갖는 GeneArt™ 플라스미드.
- 도 8: 제한(restriction) 후 구조물 및 벡터의 겔 전기영동.
- 도 9: 레트로 바이러스 형질 도입 후 인간 T 세포에서 CXCR5 CAR-발현의 유세포 분석에 의한 확인.

도 10: 기능 분석에서 평가된 세포 유형에 대한 CXCR5 발현.

도 11: 상이한 표적 세포주를 갖는 CAR 형질 도입된 인간 T 세포의 공동-배양은 별개의 CXCR5+ B-NHL 및 대조군 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 보여준다.

도 12: 세포 독성 분석은 CXCR5-양성(positive) 세포주의 선택적 사멸을 나타낸다.

도 13. CXCR5 재지향된 CAR-T 세포는 이종 이식된(xenografted) NSG 마우스 모델에서 B 세포 비-호지킨 림프종(B-NHL)에 대해 효과적이다.

도 14: 상이한 표적 세포주를 갖는 CAR 형질 도입된 인간 T 세포의 공동 배양은 별개의 CXCR5+ B-NHL 및 대조군 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 보여준다.

도 15: 표적으로서 상이한 인간 조직의 CXCR5-음성 1차 세포(CXCR5-negative primary cell)와 CAR-유도된 인간 T 세포의 공동-배양물은 표적 외 T 세포 활성화를 나타내지 않으며, 반면에, CXCR5-발현 B-NHL 세포주 JeKo-1은 특이적 T 세포 활성화를 매개하고 양성 대조군으로서 작용한다.

도면의 구체적인 설명:

도 1: 바람직한 CAR 구조의 개략도. VH 및 VL 도메인 사이에 위치한 링커를 포함하여 항원-결합 도메인의 VL 및 VH 도메인이 도시되어 있다. 또한 상기 항원-결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 위치한 스페이서 영역이 도시되어 있다. 또한 예를 들어 공동-자극 및 활성화 도메인을 포함하는 세포 내 도메인의 변이체가 도시되어 있다.

도 2: 바람직한 CAR 구조물 H28, R28, HBB1, HBB2 및 H28BB의 개략도. 본 발명의 바람직한 구조물은 막횡단 도메인, 공동-자극 및 활성화 도메인의 변이체를 포함한다. 본질적으로, 본 발명의 바람직한 실시 예는 당업자에게 공지된 유사한 기능을 갖는 추가의 도메인을 포함하지만, 이러한 다양한 도메인, 바람직하게는 본원에 개시된 특정 실시 예의 교환을 가능하게 한다.

도 3: 본원에 기술된 바와 같은 CAR의 다양한 구조적 요소의 바람직한 구성 및 잠재적 조합의 목록.

도 4: mAb 결합 영역과 본 CAR에 사용된 바람직한 인간화 서열 사이의 서열 비교. 래트와 인간화된 hHC 및 hLC 서열 사이의 서열 동일성을 나타내는 정렬이 도시되어 있다. 도시된 바와 같이, 인간화 및 래트 hHC 서열 사이에 89% 서열 동일성이 명백하고, 인간화 및 래트 hLC 서열 사이에 93% 서열 동일성이 명백하다.

도 5: mAb 결합 영역 hHC를 암호화하는 DNA 서열의 서열 묘사, 특히 인간화 hHC를 암호화하는 최초 및 코돈 최적화된 (CO) DNA 서열 간의 서열 비교.

도 6: mAb 결합 영역 hLC를 암호화하는 DNA 서열의 서열 묘사, 특히 인간화 hLC를 암호화하는 최초 및 코돈 최적화된 (CO) DNA 서열 간의 서열 비교.

도 7: 인간화 및 래트 CXCR5-CAR 서열을 갖는 GeneArt 썬 플라스미드. 절단된(Excised) scFV는 겔 전기영동을 사용하여 입증되었다.

도 8: 제한 후 구조물 및 벡터의 겔 전기영동. CAR-코딩 구조물을 포함하는 플라스미드 MP71이 또한 도시되어 있다.

도 9: 래트로 바이러스 형질 도입 후 인간 T 세포에서 CXCR5 CAR-발현의 유세포 분석에 의한 확인: CAR 발현, 구조물 H28, SP6, 형질 도입되지 않음.

도 10: (A) 기능 분석(functional assays)에서 평가된 일부 세포 유형에서의 CXCR5 발현. B-NHL 세포주 DOHH-2, SU-DHL4, OCI-Ly7 및 JeKo-1, 일차 환자-유래 MCL 이종이식(xenograft), B-ALL 세포주 NALM6, REH, MM 세포주 NCI-H929, 및 T-ALL 세포주 Jurkat이 평가되었다. 분석으로부터 알 수 있는 바와 같이, CXCR5는 B-NHL DOHH-2, SU-DHL4, OCI-Ly7 및 JeKo-1 세포주에서 발현되었다. (B) 본 발명의 CXCR5 CAR-T 세포가 건강한 인간 조직과 교차 반응성(crossreactivity)을 나타내는 것을 배제하기 위해, CXCR5 발현은 인간 건강한 조직으로부터 유래된 1차 세포의 패널에서 평가되었다. 시험된 1차 인간 세포(HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; HUAEC, human umbilical artery endothelial cells; HA, human astrocytes; HN, human neurons; HPNC, human perineurial cells; HCoEpiC, human colonic epithelial cells) 중 어느 것도 항-CXCR5 면역 염색 및 유세포 분석에 의한 CXCR5 표면 발현을 나타내지 않았다. (C) 선택된 B-NHL 세포주(SU-DHL4, OCI-Ly7, DOHH-2, SC-1, JeKo-1, MEC-1, JVM-3)에서, MM 세포주(NCI-H929)에서, B-(REH, NALM-6) 및 T-ALL(Jurkat) 세포주에서, 결장 선종 세포주(SW-620) 및 비- 또는 CXCR5-트랜스펙션된 배아 신장 세포주(각각 HEK293, HEK-CXCR5)에서 세

포 당 CXCR5 밀도의 정량적 측정은 QuantiBRITE PE 교정 비드 및 CXCR5 특이적 항체를 사용하여 수행하였다.

도 11: 상이한 표적 세포주를 갖는 CAR-형질도입된(transduced) 인간 T 세포의 공동-배양은 별개의 CXCR5+ B-NHL 및 대조군 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 보여준다. 기능적 시험관내 공동 배양 및 IFN-감마 ELISA를 수행하였다. 방출된 IFN- 감마의 수준은 T 세포 활성화를 나타낸다. 형질 도입(Untransduced)되지 않은 (UT; 각 시리즈의 왼쪽 막대), CXCR5-CAR 발현 T 세포 (CXCR5 (H28); 각 시리즈의 중간 막대) 및 SP6 T 세포 (SP6; 각 시리즈의 오른쪽 막대)를 표적 세포주 DOHH-2, SU-DHL4, OCI-Ly7, JeKo-1, NALM6, REH, NCI-H929 및 Jurkat 세포와 공동 배양하였다. DOHH-2, SU-DHL4, OCI-Ly7 및 JeKo-1 표적 세포는 본 발명의 CXCR5 CAR-T 세포로의 처리에 반응하여 특이적인 IFN-감마 방출을 나타낸다. JVM-3은 또한 처리(treatment) 후 IFN-감마 방출을 보여준다.

도 12: 세포 독성 분석은 CXCR5-양성 세포주의 선택적 사멸을 나타낸다; CXCR5-음성 세포주에서는 본질적으로 사멸이 보이지 않았다. 2개의 독립적인 기능적 시험관내 공동 배양 및 ⁵¹Cr 방출 분석을 수행하였다. (A, B) DOHH-2, SU-DHL4, OCI-Ly7, SC-1((B)에서만) JeKo-1 표적 세포주는 본 발명의 CAR-T로 처리한 후 용해를 나타내지만, CXCR5를 발현하지 않는 세포는 (Nalm6 및 NCI-H929)는 용해되지 않았다.

도 13: CXCR5 리디렉션된 CAR-T 세포(CXCR5 redirected CAR-T cell)는 이종 이식된(xenografted) NSG 마우스 모델에서 B-세포 비-호지킨 림프종(B-NHL)에 대해 효과적이다. CXCR5 CAR로 변형된 T 세포의 강한 시험관내 활성이 생체 내에서 효과적인 항종양 활성으로 변환된다는 개념 증명을 제공하기 위해, 5×10^5 외투 세포 림프종 세포(MCL, mantle cell lymphoma) JeKo-1(도 13A-C)로 NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1 Wjl}/SzJ (NSG) 마우스의 코호트에 정맥 내 접종하였다. 루시퍼라제 유전자로 GFP와 함께 형질 도입됨. NSG 마우스는 T, B 및 NK 세포를 발달시키지 않으므로 이종 이식된 인간 세포의 내성 및 성장에 적합하다. (A) 이종 이식된 NSG 마우스 모델에서 MCL 종양의 생착. MCL 세포의 정맥내(i.v) 이식에 의해 마우스에 도전하였다. 종양 접종 5일 후, IVIS 영상화에 의해 종양 세포 성장을 시각화하였다. 종양 부담의 발병을 측정하기 위해, 영상화를 120초(0일)로 연장시켰다. (B) 치료 효능을 따르고 더 나은 제시를 위해 생물 발광 강도를 축소시키기 위해, (A)에서와 같이 마우스를 0일에 10초 동안 다시 이미지화 하였다. 동일한 날, 마우스는 3×10^6 항-CXCR5 CAR-형질 도입된 T 세포 (n = 4)를 받았으며, 음성 대조군으로서 SP6-CAR-형질 도입된 T 세포(n = 3)를 사용하였다(0일). CAR-T 세포 전달 후의 후속 IVIS-노출은 0일과 19일 사이의 더 나은 비교를 가능하게 하기 위해 10초에서 수행되었다. (C) 각 마우스의 몸 전체를 덮고 있는 관심 영역에서 얻은 생물 발광 신호의 평균값이 각 시점에서 각 그룹에 대해 표시된다(도 13C). 본질적으로 모든 SP6 CAR 처리된 동물은 뒷다리, 흉부 및 복부 기관에서 골수를 통해 강한 발광 신호를 특징으로 하는 진행성 림프종(lymphoma) 질환을 가졌지만, 이는 CXCR5 CAR 처리 그룹의 경우에는 분명히 그렇지 않았다. 이것은 CXCR5 CAR-T 세포가 B-NHL 림프종 개체에 대한 항-종양 활성을 갖는다는 최초 전임상 생체 내 증거를 제공한다.

도 14: 상이한 표적 세포주를 갖는 CAR-형질 전환된 인간 T 세포의 공동-배양은 별개의 CXCR5+ B-NHL 및 대조군 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 보여준다. 기능적 시험관내 공동 배양(cocultivation) 및 IFN-감마(상단 패널), IL-2(중간 패널) 및 TNF-알파(하단 패널) ELISA를 수행하였다. 방출된 IFN-감마, IL-2 및 TNF-알파의 수준은 T 세포 활성화 및 T 세포 기능성을 나타낸다. 형질 도입되지 않은(UT, 오픈 바), CXCR5-CD28 CAR(H28, 적색 바), CXCR5-41BB(HBB1; 청색 바), CXCR5-CD28/41BB(H28BB, 녹색 바) 발현 T 세포 및 SP6 T 세포(SP6, 회색 막대)를 표적 세포주 JeKo-1, DOHH-2, SU-DHL4, OCI-Ly7, REH 및 NCI-H929 세포와 공동-배양하였다. DOHH-2, SU-DHL4, OCI-Ly7 및 JeKo-1 표적 세포는 본 발명의 CXCR5 CAR-T 세포로의 처리에 반응하여 특이적 IFN-감마, IL-2 및 TNF-알파 방출을 나타낸다.

도 15: 표적으로서 상이한 인간 조직의 CXCR5-음성 1차 세포와 CAR-형질 전환된 인간 T 세포의 공동 배양물은 표적 외(off-target) T 세포 활성화를 나타내지 않으며, 반면에, CXCR5-발현 B-NHL 세포주 JeKo-1은 특이적 T 세포 활성화를 매개하고 양성 대조군으로서 작용한다. 기능적 시험관내 공동 배양 및 IFN-감마 ELISA를 수행하였다. 형질 도입되지 않은(UT, 오픈 바), T 세포를 발현하는 CXCR5-CD28 CAR(H28, 적색 바) 및 SP6 CAR T 세포(SP6, 회색 바)를 1차 세포 *?HUECs, HUAECs, HAs, HNs, HPNCs, HCoEpiCs와 함께; T-ALL 세포주 Jurkat, 및 B-NHL 세포주 JeKo-1와 함께 배양하였다. IFN-감마 방출의 부족은 CXCR5-음성 1차 세포 *?및 CXCR5-음성 T-ALL 세포주 Jurkat의 존재하에 특이적 T 세포 활성화가 없음을 나타낸다. 본 발명의 CXCR5-CD28 CAR-T 세포는 CXCR5-발현 JeKo-1 표적 세포와의 공동 배양에 반응하여 특이적인 IFN-감마 방출을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0166] 키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptors):
- [0167] 본 발명에 따르면, 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 표적 항원(target antigen), 막횡단 도메인 및 세포 내 도메인에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인을 포함한다. CAR은 항체로부터 유래된 세포외 엑토도메인(extracellular ectodomain)(항원-결합 도메인) 및 T 세포 신호 전달 단백질로부터 유래된 신호 전달 모듈을 포함하는 엔도도메인(endodomain)으로 구성된다.
- [0168] 바람직하게는 상기 엑토도메인은 단일-쇄 가변 단편(scFv)으로 구성된 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄로부터의 가변 영역을 포함한다. scFv는 유연성(flexibility)을 제공하고 고정 막횡단 모이어티(anchoring transmembrane moiety)를 통해 세포 내 신호 전달 도메인으로 신호를 전달하는 힌지 영역에 부착되는 것이 바람직하다. 막횡단 도메인은 바람직하게는 CD8 α 또는 CD28로부터 유래한다. CAR의 1세대에서 신호 도메인은 TCR 복합체의 제타쇄(zeta chain)로 구성된다. "세대(generation)"란 용어는 세포 내 신호 전달 도메인의 구조를 의미한다. 2세대 CAR은 CD28 또는 4-1BB로부터 유래된 단일 공동 자극 도메인을 포함하고 있다. 3세대 CAR은 이미 2개의 공동자극(costimulatory) 도메인, 예를 들어 CD28, 4-1BB, ICOS 또는 OX40, CD3 제타를 포함한다. 본 발명은 바람직하게는 제2 또는 제3세대 CAR에 관한 것이다.
- [0169] 다양일 실시 예에서, B 세포를 향한 면역 이펙터 세포(effector cell)의 세포 독성을 재지향(redirect)하는 유전 공학 수용체가 제공된다. 이들 유전 공학 수용체는 본원에서 키메라 항원 수용체(CAR)로 지칭된다. CAR은 특정 항-CXCR5세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하기 위하여 원하는 항원(예를 들어 CXCR5)에 대한 항체-기반특이성(specificity)을 T 세포 수용체-활성화 세포 내 도메인과 결합시키는 분자이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "키메라"는 상이한 기원의 상이한 단백질 또는 DNA의 부분으로 구성되는 것을 기술한다.
- [0170] 본원에서 고려되는 CAR은 CXCR5에 결합하는 세포 외 도메인(결합 도메인 또는 항원-결합 도메인으로도 지칭됨), 막횡단 도메인, 및 세포 내 도메인, 또는 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다. 표적 세포의 표면상의 CXCR5와 표적 세포의 표면에서 상기 CAR의 항-CXCR5 항원 결합 도메인의 결합은 CAR의 클러스터링을 초래하고 CAR-함유 세포에 활성화 자극을 전달한다. CAR의 주요 특징은 면역 효과 세포 특이성을 재지향(redirect)하는 능력으로, 따라서 증식, 사이토카인 생산, 식세포 작용 또는 주요 조직적합성(MHC)에 독립적인 방식으로 표적 항원 발현 세포의 세포 사멸을 중재할 수 있는 분자의 생산을 촉진하고, 단일클론 항체, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공동 수용체(coreceptor)의 세포 특이적 표적화 능력을 이용한다.
- [0171] 다양일 실시 예에서, CAR은 인간화된 CXCR5-특이적 결합 도메인을 포함하는 세포 외 결합 도메인; 막횡단 도메인; 하나 이상의 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시 예에서, CAR은 인간화된 항-CXCR5 항원 결합 단편을 포함하는 세포 외 결합 도메인; 하나 이상의 스페이서 도메인; 막횡단 도메인; 하나 이상의 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0172] "세포 외 항원-결합 도메인" 또는 "세포 외 결합 도메인"은 상호 교환 가능하게 사용되며, 관심 표적 항원인 CXCR5에 특이적으로 결합하는 능력을 CAR에 제공한다. 상기 결합 도메인은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합원으로부터 유래할 수 있다. ScFv 도메인이 선호된다.
- [0173] "특이적 결합(Specific binding)"은 당업자를 통해 이해되며, 이에 의해 통상의 기술자는 결합 및 결합 특이성을 시험하는데 사용될 수 있는 다양한 실험 절차를 명확하게 알고 있다. 평형 결합(equilibrium association) 또는 평형 해리 상수를 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일부 교차-반응 또는 배경 결합(background binding)은 많은 단백질-단백질 상호 작용에서 불가피할 수 있다; 이것은 CAR과 에피토프 사이의 결합의 "특이성"을 손상시키지 않는다. "특이적 결합"은 배경 결합보다 큰 결합 친화도에서 CXCR5에 항-CXCR5 항체 또는 그의 항원 결합 단편(또는 이를 포함하는 CAR)의 결합을 기술한다. "~대해 유도된(directed against)"이라는 용어는 항체와 에피토프 간의 상호 작용을 이해하는데 "특이성"이라는 용어를 고려할 때도 적용 가능하다.
- [0174] "항원(Ag)"은 동물에서 항체 또는 T 세포 반응의 생성을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 물질을 의미한다. 특정 실시 예에서, 상기 표적 항원은 CXCR5 폴리펩티드의 에피토프이다. "에피토프"는 결합체가 결합하는 항원의 영역을 나타낸다. 에피토프는 인접한 아미노산 또는 단백질의 3차 접힘에 의해 병치된(juxtaposed) 인접하지 않은 아미노산 둘 모두로부터 형성될 수 있다.
- [0175] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드쇄 및 임의의 배향(예를 들어, VL-VH 또는 VH-VL)으로 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 VH 및 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. 바람직일 실시 예에서, 본원에서 고려된 CAR은 scFv인 항원 특이적 결합 도메인을 포함하고, 쥐, 인간 또는 인간화

된 scFv일 수 있다. 단일 사슬 항체는 원하는 표적에 특이적인 하이브리도마의 V 영역 유전자로부터 클로닝 될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 인간 CXCR5 폴리펩티드를 결합하는 인간화된 scFv인 항원 특이적 결합 도메인. 본 원에서 고려되는 항-CXCR5 CAR을 구성하는데 적합한 가변 중쇄의 예로는, 서열 번호. 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 본원에서 고려되는 항-CXCR5 CAR을 구성하는데 적합한 가변 경쇄의 예시는 서열 번호. 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0176] 항체 및 항체 단편(Antibodies and antibody fragments):

[0177] 상기 CAR은 CXCR5 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 이들이 본원에 기재된 CAR의 유사한 결합 특성을 보유하는 폴리클로날, 모노클로날, 이중 특이성, 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 단일 사슬 단편(single chain fragments, scFv), 단일 가변 단편(single variable fragments, ssFv), 단일 도메인 항체(나노 바디로부터의 VHH 단편과 같은), Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타입 항체 및 상기 항체의 에피토프-결합 단편 또는 이들의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 본원에 기재된 상응하는 CDR, 또는 VH 및 VL 영역을 포함한다. 또한, 미니-항체 및 디아바디(diabodies), 트리아바디(triobody), 4가 항체 및 펩티드와 같은 다가 항체가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 면역 글로불린 분자는 면역 글로불린 분자의 임의의 클래스(즉, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA) 또는 서브 클래스일 수 있다. 따라서, 항체라는 용어는 또한 전체 항체의 변형에 의해 생성되거나 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새롭게 합성된 본 발명의 CAR에 포함되는 항체 및 항체 단편을 포함한다.

[0178] 본원에 사용된 바와 같이, "항체"는 일반적으로 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자의 단편에 의해 실질적으로 코딩되는 하나 이상의 폴리펩티드로 구성된 단백질을 지칭한다. 용어 "항체"가 사용되는 경우, 또한 "항체 단편"이라는 용어가 언급된 것으로 간주될 수 있다. 인식된 면역글로불린 유전자는 무수한 면역글로불린 가변 영역 유전자뿐만 아니라 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되며, 차례로 면역 글로불린 클래스인 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 각각 정의한다. 기본 면역 글로불린(항체) 구조 단위는 사합체(tetramer) 또는 이합체(dimer)를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각각의 사합체는 2개의 동일한 폴리펩티드 사슬 쌍으로 구성되며, 각 사슬은 하나의 "경"(L)(약 25kD) 및 하나의 "중"(H) 쇄(약 50-70kD)을 갖는다. 각 사슬의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 한정한다. "가변 경쇄" 및 "가변 중쇄"라는 용어는 각각 경쇄 및 중쇄의 이들 가변 영역을 지칭한다. 선택적으로 항체 또는 항체의 면역학적 부분은 다른 단백질과의 융합 단백질과 화학적으로 접합되거나 발현될 수 있다.

[0179] 본 발명의 CAR은 포유동물, 특히 인간의 단백질 표적에 대해 결합하기 위한 것이다. 단백질 이름의 사용은 마우스 또는 인간 버전의 단백질에 해당할 수 있다.

[0180] 본 발명에 따른 결합 도메인 폴리펩티드 및 CAR 단백질의 친화도는 통상적인 기술, 예를 들어 경쟁적 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 또는 결합 회합(binding association), 또는 표지된 리간드를 사용하는 변위 분석(displacement assay), 또는 Biacore와 같은 표면 플라즈몬 공명 장치를 사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0181] 본 발명의 항체의 하나 이상의 CDR 또는 상기 항체로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 포함하는 인간화 항체는 당 업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체를 인간화하기 위해 4개의 일반적 단계가 사용될 수 있다. 이것은: (1) 출발 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 및 예측된 아미노산 서열을 결정하는 단계 (2) 인간화 항체를 디자인하는 것, 즉 인간화 과정 중에 어느 항체 프레임워크 부위를 사용할 것인가를 결정하는 것 (3) 실제 방법론/기술 인간화 및 (4) 인간화 항체의 형질 감염 및 발현이다. 예를 들어 U.S. Pat. Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; 6,180,370; 5,225,539; 6,548,640.를 참조하라.

[0182] 인간화 항체라는 용어는 면역 글로불린의 프레임 워크 영역의 적어도 일부 및 선택적으로 CDR 영역의 일부 또는 결합에 관여하는 다른 영역이 인간 면역 글로불린 서열로부터 유도되거나 조절됨을 의미한다. 마우스 모노클로날 항체의 인간화된, 키메라화된 또는 부분적으로 인간화된 버전은 예를 들어, H 및 L 쇄를 코딩하는 마우스 및/또는 인간 게놈 DNA 서열로부터 출발하는 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 인간 항체의 인간화된 형태는 재조합 DNA 기술에 의해 비-인간 항체의 CDR 영역을 인간 불변 영역에 연결시킴으로써 생성될 수 있다(Queen et al., 1989; WO 90/07861). 대안적으로, 본 발명의 방법에서 사용되는 모노클로날 항체는 인간 모노클로날 항체일 수 있다. 인간 항체는 예를 들어, 파지-디스플레이 방법을 사용하여 수득할 수 있다(WO 91/17271; WO

92/01047).

- [0183] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 인간화된 항체는 또한 비-인간 면역 글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 포함하는 특정 키메라 면역 글로불린, 면역 글로불린쇄 또는 이의 단편(예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 서브 서열)인 비-인간(예: 쥐 고양이, 낙타, 라마, 상어) 항체의 형태를 지칭한다.
- [0184] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 인간 또는 인간화 항체 또는 항체 단편은 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미하고 및/또는 당업계에서 공지되거나 본원에 개시된 인간 항체 제조 기술 중 임의의 것을 사용하여 제조된다. 인간 항체 또는 그의 단편은 특정 마우스 항체와 동일한 에피토프 특이성을 가지도록 경쟁적 결합 실험에 의해 또는 다른 방법으로 선택될 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 놀랍게도 마우스 항체의 유용한 기능적 특성을 크게 공유한다. 인간 폴리클로날 항체는 또한 면역원성 물질로 면역화된 인간의 혈청 형태로 제공될 수 있다. 선택적으로, 이러한 폴리클로날 항체는 친화성 시약으로서 아밀로이드 섬유소 및/또는 비-섬유소 폴리펩티드 또는 이의 단편을 사용하는 친화성 정제(affinity purification)에 의해 농축될 수 있다. 모노클로날 항체는 WO 99/60846에 기술된 기술에 따라 혈청으로부터 수득할 수 있다.
- [0185] 가변 영역 및 CDR(Variable Regions and CDRs)
- [0186] 항체의 가변 영역은 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 단독으로 또는 조합하여 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 초가변 영역(hypervariable region)으로 알려진 3개의 상보성 결정 영역(CDRs)에 의해 연결된 4개의 프레임 워크 영역(FR)으로 구성된다. 각 쇄내의 CDR은 FR에 의해 근접하여 함께 유지되고, 다른 쇄의 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다.
- [0187] 교차 종(cross-species) 서열 다양성에 기반한 접근법(예를 들어, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 항원-항체 복합체의 결정 학적 연구에 기초한 접근법(Ali-lazikani 등 (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)과 같이 CDR을 결정하는 데 사용할 수 있는 여러 기술이 있다. 다른 방법으로는 IMGT 국제 ImmunoGeneTics 정보 시스템(Marie-Paule Lefranc)이 있다. Kabat 정의는 서열 다양성에 기반하며 가장 보편적으로 사용되는 방법이다. Chothia 정의는 구조 루프 영역의 위치를 기반으로 하며, AbM 정의는 Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어(www.bioinf.org.uk:Dr. Andrew C.R. Martin 's Group)가 사용하는 두 가지 기능의 절충안이다. 본원에서 사용된 바와 같이, CDR은 하나 이상의 접근법 또는 이들 접근법의 조합에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다.
- [0188] 일부 실시 예에서, 본 발명은 CAR에 혼입된 항체 또는 그의 단편을 제공하며, 상기 항체 또는 이의 단편은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 CDR, 적어도 두 개, 적어도 세 개 또는 그 이상의 CDR과 실질적으로 동일한 적어도 하나의 CDR, 적어도 두 개, 적어도 세 개 또는 그 이상의 CDR을 포함한다. 다른 실시 예는 본 발명의 항체의 또는 본 발명의 항체로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR과 실질적으로 동일한 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR을 포함하는 항체를 포함한다. 일부 실시 예에서, 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR은 본 발명의 항체의 적어도 1개, 2개 또는 3개의 CDR과 적어도 약 70%, 75%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 본 발명의 목적상, 결합 특이성 및/또는 전체 활성이 일반적으로 유지되지만, 활성의 정도는 상기 항체와 비교하여 다를 수 있음이 이해된다(크거나 작을 수 있음).
- [0189] CAR의 추가 구성요소(Additional components of the CAR)
- [0190] 특정 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR은 결과적으로 폴리펩티드는 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 표적 분자에 대한 특이적 결합 친화력을 보유할 수 있도록 분자의 적절한 간격 및 형태를 위해 첨가된 다양한 도메인 사이의 링커, 예를 들어 VH 및 VL 도메인을 연결하고 2개의 서브-결합 도메인의 상호 작용과 양립 가능한 스페이서 기능을 제공하는 아미노산 서열을 포함하는 링커를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 CAR은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이상의 링커를 포함할 수 있다. 특정 실시 예에서, 상기 링커의 길이는 약 1 내지 약 25개의 아미노산, 약 5 내지 약 20개의 아미노산, 또는 약 10 내지 약 20개의 아미노산, 또는 임의의 중간 길이의 아미노산이다.
- [0191] 링커의 예는 글리신 중합체; 글리신-세린 중합체; 글리신-알라닌 중합체; 알라닌-세린 중합체; 및 Whitlow 링커와 같은 당업계에 공지된 다른 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 비교적 비구조적이며, 따라서 본원에 기재된 CAR과 같은 융합 단백질 도메인 사이의 중성 테더(tether) 역할을 할 수 있다.
- [0192] 특정 실시 예에서, 상기 CAR의 결합 도메인 다음에 하나 이상의 "스페이서" 또는 "스페이서 폴리펩티드"가 있으며, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하기 위해 항원 결합 영역을 이펙터 세포(effector cell) 표면으로부터 멀리 이동시키는 영역을 지칭한다. 특정 실시 예에서, 스페이서 도메인은 하나

이상의 중쇄 불변 영역, 예를 들어, CH2 및 CH3를 포함 하나, 이에 한정되지 않는 면역 글로불린의 일부이다. 스페이스 도메인은 자연 발생 면역 글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역 글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일 실시 예에서, 스페이스 도메인은 IgG1 또는 IgG4의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일 실시 예에서, 이러한 스페이스/힌지 영역의 Fc-결합 도메인은 대식세포 및 다른 선천적 면역 세포에서 발현된 Fc-수용체에 CAR의 결합을 방지하는 방식으로 돌연변이된다.

[0193] 일부 실시 예에서 상기 CAR의 결합 도메인은 하나 이상의 "힌지 도메인"이 뒤따를 수 있으며, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하기 위해 항원 결합 영역을 이펙터 세포(effector cell) 표면으로부터 멀리 위치시키는 역할을 한다. CAR은 결합 도메인과 막횡단 도메인(TM) 사이에 하나 이상의 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합 공급원으로부터 유도될 수 있다. 힌지 도메인은 자연 발생 면역 글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역 글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 CAR에서의 사용에 적합한 예시적인 힌지 도메인은 야생형 힌지 영역일 수 있는 CD8 알파, CD4, CD28, PD1, CD152 및 CD7과 같은 타입 1 막단백질의 세포 외 영역으로부터 유래된 힌지 영역을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 힌지 도메인은 PD1, CD 152 또는 CD8 알파 힌지 영역을 포함한다.

[0194] "막횡단 도메인(transmembrane domain)"은 세포 외 결합 부분과 세포 내 신호 전달 영역을 융합시키고 CAR을 면역 이펙터 세포의 원형질막에 고정시키는 CAR 부분이다. 상기 TM 도메인은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합원으로부터 유래될 수 있다. TM 도메인은 T-세포 수용체, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 알파, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD 137, CD 152, CD 154, 및 PD1의 알파, 베타 또는 제타 쇠로부터 유도될 수 있다. 일 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR은 CD8 알파 또는 CD28로부터 유도된 TM 도메인을 포함한다.

[0195] 특정 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다. "세포 내 신호전달 도메인"은 이펙터 세포 기능, 예를 들어 세포 독성 인자의 CAR-결합된 표적 세포로의 방출 또는 세포 외 CAR 도메인에 항원 결합으로 유도된 다른 세포 반응을 포함하여 활성화, 사이토카인 생산, 증식 및 세포독성 활성을 유도하기 위해 면역 이펙터 세포의 내부로 인간 CXCR5 폴리펩티드에 효과적인 항-CXCR5 CAR 결합의 메시지를 전달하는데 관여하는 CAR의 부분을 의미한다. "이펙터 기능"이라는 용어는 면역 이펙터 세포의 특화된 기능을 가리킨다. 예를 들어, T 세포의 작용 인자 기능은 세포 용해 활성 또는 사이토카인 분비를 포함하는 도움 또는 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "세포 내 신호 전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포에 특화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질 부분을 지칭한다. 본원에서 고려되는 CAR은 CAR 수용체를 발현하는 T 세포의 효능, 확장 및/또는 기억 형성을 향상시키기 위한 하나 이상의 공동-자극 신호 도메인을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "공동-자극 신호 도메인"은 보조 자극 분자의 세포 내 신호 도메인을 의미한다. 공동-자극 분자는 항원 수용체 또는 Fc 수용체 이외의 세포 표면 분자로서 항원 결합시 T 림프구의 효율적인 활성화 및 기능에 필요한 제2신호를 제공한다.

[0196] 일 실시 예에서, 상기 CAR은 공동-자극 도메인 및 신호 전달(활성화) 도메인을 포함하는 세포 내 도메인을 포함한다. 상기 CAR 구조물은 따라서 천연 T 세포 수용체 복합체의 세포 내 신호 전달 도메인(CD3 제타) 및 완전한 T 세포 활성화를 자극하기 위한 제2신호를 제공하는 하나 이상의 공동-자극 도메인을 포함할 수 있다. 공동-자극 도메인은 CAR T 세포 사이토카인 생성을 증가시키고 T 세포 복제 및 T 세포 지속성(persistence)을 촉진하는 것으로 생각된다. 공동-자극 도메인은 또한 CAR T 세포 고갈을 잠재적으로 예방하고, T 세포 항종양 활성을 증가시키고, 환자에서 CAR T 세포의 생존을 향상시키는 것으로 나타났다. 비-제한적 예로서, 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함하는 CAR 구조물은 전임상 연구에서 T 세포 서브 세트 조성물(T cell subset composition)에서 점진적(gradual), 지속된 팽창(expansion) 및 이펙터 기능, 증가된 지속성 및 증가된(enriched) 중앙 기억 세포(TCM, central memory cells)와 관련 되었다. 4-1BB는 종양 괴사 인자(TNF, tumor necrosis factor) 수퍼 패밀리의 구성원이며, 그것은 항원-활성화된 CD4 및 CD8 T 세포에서 주로 발현되는 생체 내 유도성 당단백질 수용체이다. 비-제한적인 예로서, CD28은 면역 글로불린(Ig) 수퍼 패밀리의 구성원이다. 휴식 및 활성화된 CD4 및 CD8 T 세포에서 구성적으로 발현되고, PI3K-AKT 신호 전달 경로를 자극함으로써 T 세포 활성화에서 결정적인 역할을 한다. 일 실시 예에서, 상기 세포 내 도메인은 4-1BB 및 CD28 공동-자극 도메인 둘 다를 포함한다. 다른 공동-자극 도메인은 CD3 제타 신호 전달(활성화) 도메인과 조합될 수 있는 ICOS 및 OX40을 포함한다.

[0197] 폴리펩티드(Polypeptides)

[0198] "펩티드" "폴리펩티드", "폴리펩티드 단편" 및 "단백질"은 달리 명시되지 않는 한, 통상적인 의미, 즉 아미노산 서열로서 상호 교환적으로 사용된다. 폴리펩티드는 특정 길이로 제한되지 않고, 예를 들어, 이들은 전장(full

length) 단백질 서열 또는 전장 단백질 단편을 포함할 수 있으며, 폴리펩티드의 번역 후 변형, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등뿐만 아니라 당업계에 공지된 자연 발생 및 비-자연 발생의 다른 변형을 포함할 수 있다.

[0199] 다양일 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR 폴리펩티드는 단백질의 N-말단에 신호(또는 리더) 서열을 포함하고, 이 단백질은 동시 번역 또는 후-번역에 의한 전달을 지시한다. 폴리펩티드는 다양한 잘 알려진 재조합 및/또는 합성 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 본원에서 고려되는 폴리펩티드는 본원의 CAR, 또는 본원에 개시된 바와 같은 CAR의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가 및/또는 치환을 갖는 서열을 구체적으로 포함한다.

[0200] 본원에서 사용되는 "단리된 펩티드" 또는 "단리된 폴리펩티드" 등은 세포 환경으로부터 및 세포의 다른 성분과의 회합으로부터 펩티드 또는 폴리펩티드 분자의 시험관 내 단리, 합성 및/또는 정제를 지칭하고, 즉 이는 생체 내 물질과 현저하게 회합하지 않는다. 유사하게, "단리된 세포"는 생체 내 조직 또는 기관으로부터 얻어지며 실질적으로 세포 외 기질이 없는 세포를 말한다.

[0201] 핵산(Nucleic acids)

[0202] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산 분자"라는 용어는 messenger RNA(mRNA), RNA, genomic RNA(gRNA), 플러스 가닥 RNA(RNA(+)), 마이너스 가닥 RNA(RNA(-)), genomic DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA) 또는 재조합 DNA를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 및 이중 가닥 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리 뉴클레오티드는 본원에 기재된 임의의 참조 서열과 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 변이체를 포함하고, 전형적으로 상기 변이체는 상기 참조 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다. 다양한 예시적인 실시 예에서, 본 발명은 부분적으로 발현 벡터, 바이러스 벡터 및 전달 플라스미드를 포함하는 폴리 뉴클레오티드, 및 이를 포함하는 조성물 및 세포를 포함한다.

[0203] 폴리뉴클레오티드는 당해 기술분야에 공지되고 이용 가능한 임의의 다양한 잘 확립된 기술을 사용하여 제조, 조작 및/또는 발현시킬 수 있다. 원하는 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 적절한 벡터에 삽입할 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 자가 복제 서열 및 전이 요소(transposable elements)이다. 추가의 예시적 벡터는, 제한 없이, 플라스미드, 파게미드, 코스미드, 인공 염색체, 예를 들면, 효모 인공 염색체(YAC), 세균 인공 염색체(BAC), 또는 P1-유래된 인공 염색체(PAC), 박테리오파지, 예를 들면, 람다 파지 또는 M13 파지 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터로서 유용한 동물 바이러스 범주의 예는, 제한 없이, 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예: 헤르페스 심플렉스 바이러스), 폭스바이러스, 바쿨로바이러스, 파필로마바이러스 및 파코바바이러스(예: SV40)를 포함한다. 발현 벡터의 예는 포유동물 세포에서 발현시키기 위한 pCIneo 벡터(Promega); 포유동물 세포에서 렌티 바이러스-매개된 유전자 전이 및 발현을 위한 pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ 및 pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)를 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본원에 개시된 키메라 단백질의 코딩 서열은 포유동물 세포에서 키메라 단백질의 발현을 위해 이러한 발현 벡터에 결합될 수 있다. 발현 벡터에 존재하는 "조절 요소" 또는 "조절 서열"은, 전사 및 번역을 수행하기 위해 숙주 세포 단백질과 상호작용하는 벡터의 비-번역된 영역(복제 기원, 선별 카세트, 프로모터, 인핸서, 번역 개시 시그널(Shine Dalgarno 서열 또는 Kozak 서열) 인트론, 폴리아데닐화 서열, 5' 및 3' 비번역된 영역)이다. 이러한 요소는 이들의 강도 및 특이성이 상이할 수 있다. 사용된 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 편재성 프로모터 및 유도 가능한 프로모터를 포함하는 임의의 수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다.

[0204] 벡터(Vectors)

[0205] 특정 실시 예에서, 세포(예를 들어, T 세포와 같은 면역 이펙터 세포)는 CAR을 인코딩하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 렌티 바이러스 벡터로 형질 도입된다. 예를 들어, 면역 이펙터 세포는 트랜스 맴브레인 및 세포 내 신호 전달 영역을 갖는 CXCR5 폴리펩티드와 결합하는 인간화된 항-CXCR5 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 CAR을 인코딩하는 벡터로 형질 도입된다. 이러한 형질 도입된 세포는 CAR-매개 세포 독성 반응을 유도할 수 있다.

[0206] 레트로바이러스는 유전자 전달을 위한 일반적인 도구이다. 구체적인 실시 예에서, 레트로바이러스를 사용하여 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 세포로 전달한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "레트로바이러스"는 이의 게놈 RNA를 선형 이중 가닥 DNA 카피로 역전사 시킨 후 이의 게놈 DNA를 숙주 게놈으로 공유적으로 통합시키는 RNA 바이러스를 의미한다. 바이러스가 숙주 게놈에 통합되면, 이를 "프로바이러스

스"라고 한다. 프로바이러스는 RNA 중합효소 II에 대한 주형으로서 제공되어 새로운 바이러스 입자를 생성하는데 필요한 구조 단백질 및 효소를 코딩하는 RNA 분자의 발현을 지정한다.

[0207] 구체적 실시 예에서 사용을 위해 적합한 예시적인 레트로바이러스는 제한 없이, 모로니 컷과 동물 백혈병 바이러스(M-MuLV), 모로니 컷과 동물 육종 바이러스(MoMSV), 하비 컷과 동물 육종 바이러스(HaMuSV), 컷과 동물 유방 종양 바이러스(MuMTV), 기본 원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(FLV), 스푸마바이러스, 프리엔드 컷과 동물 백혈병 바이러스, 컷과 동물 줄기세포 바이러스(MSCV) 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 및 렌티 바이러스를 포함한다.

[0208] 본 명세서에서 사용시, 용어 "렌티 바이러스"는 복합 레트로바이러스의 군(또는 속)을 의미한다. 예시적인 렌티 바이러스는 제한 없이, HIV(인간 면역결핍 바이러스; 1형 HIV, 및 2형 HIV 포함); 비스나-매디 바이러스(VMV) 바이러스; 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV); 말 전염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역결핍 바이러스(BIV); 및 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함한다. 일 실시 예에서, HIV 기반 벡터 골격(즉, HIV 시스 작용성 서열 성분)이 바람직하다. 구체적 실시 예에서, 렌티 바이러스는 CAR을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 세포로 전달하는데 사용된다.

[0209] 용어 "벡터"는 다른 핵산 분자를 전달 또는 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미하고자 본 명세서에서 사용된다. 전달되는 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결되고, 예를 들어 삽입된다. 벡터는 세포에서 자체 복제를 지정하는 서열을 포함할 수 있거나, 또는 숙주 세포 DNA에 통합 가능하도록 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터는 예를 들어, 플라스미드(예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 트랜스포존, 코스미드, 박테리아 인공 염색체, 및 바이러스 벡터를 포함한다. 유용한 바이러스 벡터는 예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스 및 렌티 바이러스를 포함한다. 본 발명의 추가의 실시 예에서, CXCR5 CAR 인코딩 핵산의 CrispR/Cas 및 TALEN-매개 삽입이 사용될 수 있다. CrispR/Cas 및 TALEN-매개 삽입에 적합한 벡터는 당업자에게 공지되어 있다.

[0210] 당업자에게 명백한 바와 같이, 용어 "바이러스 벡터"는 전형적으로 핵산 분자의 전달 또는 세포의 계놈으로의 통합을 용이하게 하는 바이러스 유도된 핵산 분자를 포함하는 핵산 분자(예를 들어, 전달 플라스미드) 또는 핵산 전달을 매개하는 바이러스 입자를 의미하는데 광범위하게 사용된다. 바이러스 입자는 전형적으로 다양한 바이러스 성분을 포함하게 될 것이고 때때로, 또한 핵산(들)이외에도 숙주 세포 성분을 포함하게 될 것이다.

[0211] 용어 바이러스 벡터는 세포로 핵산을 전달할 수 있는 바이러스 또는 바이러스 입자이거나 또는 전달되는 핵산 그 자체를 의미할 수 있다. 바이러스 벡터 및 전달 플라스미드는 주로 바이러스로부터 유도된 구조적 및/또는 기능적 유전자 성분을 함유한다. 용어 "레트로바이러스 벡터"는 주로 레트로바이러스로부터 유도된, 구조적 및 기능적 유전자 성분을 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 의미한다.

[0212] 따라서, 바람직일 실시 예에서, 본 발명은 CAR을 인코딩하는 발현 벡터로 세포를 형질 감염시키는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 실시 예에서, 상기 벡터는 CAR의 발현을 촉진시키는 서열, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 폴리-A 신호 및/또는 하나 이상의 인트론과 같은 추가 서열을 포함한다. 바람직일 실시 예에서, CAR-인코딩 서열은 트랜스포존 서열의 옆에 위치하며, 트랜스포존의 존재는 인코딩 서열이 형질 전환된 세포의 계놈에 통합되는 것을 허용한다.

[0213] 일부 실시 예에서, 세포는 형질감염된 세포의 유전체 내로 CAR 코딩 서열의 통합을 용이하게 하는 트랜스포사제(transposase)로 추가로 형질감염된다. 일부 실시 예에서, 트랜스포사제는 DNA 발현 벡터로서 제공된다. 하지만, 바람직일 실시 예에서, 트랜스포사제는 트랜스포사제의 장기간 발현이 유전자도입 세포(transgenic cells)에서 발생하지 않도록 발현가능 RNA 또는 단백질로서 제공된다. 가령, 일부 실시 예에서, 트랜스포사제는 mRNA(가령, 캡 및 폴리-A 꼬리를 포함하는 mRNA)로서 제공된다. 임의의 트랜스포사제 시스템이 본 발명의 실시 예에 따라 이용될 수 있다. 하지만, 일부 실시 예에서, 상기 트랜스포사제는 연어과-유형 Tc1-유사 트랜스포사제(salmonid-type Tc1-like transposase)(SB)이다. 가령, 트랜스포사제는 이른바 "슬리핑 뷰티" 트랜스포사제일 수 있고, 예로서 본원에 참조로서 편입된 U.S. 특허 6,489,458을 참조한다. 일정일 실시 예에서, 트랜스포사제는 증가된 효소적 활성을 갖는 가공된 효소이다. 트랜스포사제의 일부 특정일 실시 예는 제한 없이, SB10, SB11 또는 SB100x 트랜스포사제를 포함한다(가령, 본원에 참조로서 편입된 Mates et al., 2009를 참조한다). 가령, 방법은 SB10, SB11 또는 SB100x 트랜스포사제를 인코딩하는 mRNA로 세포의 전기천공을 수반할 수 있다.

[0214] 서열 변이체(Sequence Variants):

[0215] 본 발명의 유사한 결합 특성을 유지하는, 청구된 핵산, 단백질, 항체, 항체 단편 및/또는 CAR의 서열 변이체,

예를 들어 % 서열 동일성으로 정의된 서열 변이체 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 제공된 특정 서열이 기능적 유사체로서 또는 기능적으로 유사하기 때문에, 이러한 변이체는 대체 서열을 나타내지만, 표적 특이성과 같은 본질적으로 동일한 결합 특성을 유지한다. 서열 동일성은 서열 정렬을 수행할 때 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 백분율과 관련된다.

[0216] 인용 "서열 동일성" 또는, 예를 들면, "와 50% 동일한 서열"은, 본원에 사용된 바와 같이, 서열이 비교 윈도우에 걸쳐 뉴클레오타이드 단위끼리 또는 아미노산 단위끼리 동일한 정도를 지칭한다. 따라서, "서열 동일성의 퍼센트"는, 비교 윈도우에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예: A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예: Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)이 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 측정하여 정합된 위치의 수를 수득하고, 정합된 위치의 수를 비교 윈도우(예: 윈도우 크기)에서 전체 위치 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 퍼센트를 수득함으로써 계산할 수 있다. 전형적으로, 폴리펩티드 변이체가 참조 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 경우, 본원에 기재된 임의의 참조 서열 중의 어느 하나에 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 및 폴리펩티드가 포함된다.

[0217] 유전자 암호의 축퇴성의 결과로서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 뉴클레오타이드 서열이 존재한다는 것은 당업자에게 이해될 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드 중 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 최소의 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다. 그럼에도, 코돈 사용의 차이로 인해 달라지는 폴리뉴클레오타이드는 본 발명에 의해 구체적으로 고려된다. 또한, 기술된 서열 동일성의 영향을 받는 서열의 결실, 치환 및 다른 변화는 본 발명에 포함된다.

[0218] 또한, 치환을 통해 발생할 수 있는 단백질 서열 변형은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 명세서에 정의된 바와 같은 치환은 단백질의 아미노산 서열에 대해 행해지는 변형으로, 하나 이상의 아미노산이 동일한 수의 (상이한) 아미노산으로 치환되어, 일차 단백질과 상이한 아미노산 서열을 함유하는 단백질을 생성하고, 바람직하게는 단백질의 기능을 현저히 변화시키지 않는 것이다. 추가와 마찬가지로 치환은 자연적이거나 인공적일 수 있다. 아미노산 치환이 단백질의 기능을 현저하게 변화시키지 않고 이루어질 수 있다는 것은 당업계에 공지되어있다. 이는 변형이 하나의 아미노산을 유사한 기능의 다른 아미노산으로 치환하는 "보존적인(conservative)" 아미노산 치환과 관련이 있는 경우 특히 그렇다. 이러한 "보존된" 아미노산은 크기, 전하, 극성 및 형태가 단백질의 구조 및 기능에 큰 영향을 미치지 않으면서 치환될 수 있는 천연 또는 합성 아미노산일 수 있다. 종종, 많은 아미노산은 단백질의 기능에 해로운 영향을 끼치지 않으면서 보존적 아미노산으로 치환될 수 있다.

[0219] 일반적으로, 비-극성 아미노산 Gly, Ala, Val, Ile 및 Leu; 비-극성 방향족 아미노산 Phe, Trp 및 Tyr; 중성 극성 아미노산 Ser, Thr, Cys, Gln, Asn 및 Met; 양전하를 띤 아미노산 Lys, Arg 및 His; 음전하를 띤 아미노산 Asp 및 Glu는 보존적 아미노산의 그룹을 나타낸다. 이 목록은 완전한 것이 아니다. 예를 들어, Ala, Gly, Ser 및 때때로 Cys는 상이한 그룹에 속하더라도 서로를 대체할 수 있다는 것이 잘 알려져 있다.

[0220] 치환 변이체는 항체 분자에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 및 그 자리에 삽입된 상이한 잔기를 갖는다. 치환 돌연변이 유발에 대한 가장 큰 목적 부위는 초가변 영역을 포함하나, FR 변형 또한 고려된다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 가져오는 경우, 바로 아래의 표에서 "예시적인 치환"으로 명명되거나, 아미노산 부류와 관련하여 하기에서 추가적으로 기술되는 바와 같이 보다 실질적인 변화를 도입하고 생성물을 스크리닝할 수 있다.

표 2

[0221] 잠재적인 아미노산 치환:

| 본래 잔기 | 바람직한 보존성 치환 | 예시적인 치환의 예 |
|---------|-------------|-------------------------|
| Ala (A) | Val | Val; Leu; Ile |
| Asp (D) | Lys | Lys; Gln; Asn |
| Asn (N) | Gln | Gln; His; Asp, Lys; Arg |
| Asp (D) | Glu | Glu; Asn |
| Cys (C) | Ser | Ser; Ala |
| Gln (Q) | Asn | Asn, Glu |
| Glu (E) | Asp | Asp; Gln |
| Gly (G) | Ala | Ala |

| | | |
|---------|-----|-------------------------------------|
| His (H) | Arg | Asn; Gln; Lys; Arg |
| Ile (I) | Leu | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine |
| Leu (L) | Ile | Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe |
| Lys (K) | Arg | Arg; Gln; Asn |
| Met (M) | Leu | Leu; Phe; Ile |
| Phe (F) | Tyr | Leu; Val; Ile; Ala; Tyr |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr | Tyr; Phe |
| Tyr (Y) | Phe | Trp; Phe; Thr; Ser |
| Val (V) | Leu | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine |

[0222] 항체의 생물학적 성질에 대한 실질적인 변형은 (a) 치환 영역에서 폴리펩티드 백본의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선형 형태 (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 다른 치환을 선택함으로써 달성된다. 보존적 아미노산 치환은 천연 아미노산에 한정되지 않고 합성 아미노산도 포함한다.

[0223] 일반적으로 사용되는 합성 아미노산은 다양한 쇠 길이의 오메가 아미노산과 중성 비-극성 유사체인 시클로헥실 알라닌; 중성 비-극성 유사체(analog)인 시트룰린 및 메티오닌 술폰시드, 방향족 중성 유사체인 페닐글리신; 음 전하를 띤 유사체인 시스테인 산 및 양전하를 띤 아미노산 유사체인 오르니틴이다. 자연적으로 발생하는 아미노산과 마찬가지로, 이 목록은 포괄적인 것이 아니라, 당업계에 공지된 치환의 예시일 뿐이다.

[0224] 유전자 변형된 세포 및 면역 세포(Genetically modified cells and Immune cells)

[0225] 특정 실시 예에서, 본 발명은 B 세포와 관련된 상태의 치료에 사용을 위해, 본 명세서에서 고려되는 CAR을 발현 하도록 유전자 변형된 세포가 제공된다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "유전자 조작된" 또는 "유전자 변형된" 은 세포의 전체 유전자 물질에 DNA 또는 RNA 형태의 추가의 유전자 물질의 첨가를 의미한다. 용어 "유전자 변형 된 세포", "변형된 세포" 및 "재지정된 세포"는 상호교환적으로 사용된다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "유전 자 요법"은 치료적 폴리펩티드, 예를 들어 CAR을 발현시키는 목적을 위해, 또는 유전자의 발현을 복원, 교정, 또는 변형하는 세포 내 전체 유전자 물질에 DNA 또는 RNA 형태의 추가의 유전자 물질의 도입을 의미한다. 특정 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR은 관심 대상 표적 항원, 예를 들어 CXCR5 폴리펩티드에 그들의 특이성을 재지향(redirect)시키기 위해 면역 이펙터 세포에 도입되고 발현된다.

[0226] "면역 세포" 또는 "면역 효과기 세포"는 하나 이상의 이펙터 기능(예를 들어, 세포독성 세포 사멸 활성화, 사이토 카인의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는 면역계의 임의 세포이다. 면역 효과기 세포는 또한 iPSC(유도된 줄기세포)로부터 분화될 수 있다 면역 효과기 세포는 자기/자생적("자기") 또는 비자가("비자기", 예를 들어 동 종이계, 동계 또는 이종 발생)일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "자기(Autologous)"는 동일 대상체에서 유래된 세포를 의미하고, 본 발명의 바람직일 실시 예를 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 "동종이계(Allogeneic)"는 비 교시 세포와 유전적으로 상이한 동일종의 세포를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 "동계(Syngeneic)"는 비교시 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 "이종발생(Xenogeneic)"은 비교시 세포에 대해 상이한 종의 세포를 의미한다. 바람직일 실시 예에서, 본 발명의 세포는 자가 또는 동종이 계이다.

[0227] 본 명세서에서 고려되는 CAR과 사용되는 예시적인 면역 효과기 세포는 T 림프구를 포함한다. 용어 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 당업계에서 인식되며 흉선 세포, 미성숙 T 림프구, 성숙한 T 림프구, 휴지 T 림프구, 사이토 카인-유도 살인 세포(CIK 세포, cytokine-induced killer cells) 또는 활성화된 T 림프구를 포함하고자 한다. 사이토 카인-유도 살인 세포(CIK)는 전형적으로 CD3- 및 CD56- 양성, 비 주요 조직 적합성 복합체(MHC)-제한된 자연 살해(NK)-유사 T 림프구이다. T 세포는 T 헬퍼(Th) 세포, 예를 들어 T 헬퍼 1(Th1) 또는 T 헬퍼 2(Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 세포독성 T 세포(CTL; CD8+ T 세포), CD4+ CD8+ T 세포, CD4 CD8 T 세포, 또는 T 세 포의 임의의 다른 서브셋일 수 있다. 특정 실시 예에서 사용하기에 적합한 T 세포의 다른 예시적인 집단은 순수 한(naive) T 세포 및 기억 T 세포 및 줄기세포-유사 기억 세포(TSCM)을 포함한다.

[0228] 예를 들어, 자가 세포 이식 후 환자에게 다시 도입될 때, 본원에 기재된 본 발명의 CAR로 변형된 T 세포는 중앙 세포를 인식하고 죽일 수 있다. CIK 세포는 다른 T 세포와 비교하여 향상된 세포 독성 활성을 가질 수 있으며,

따라서 본 발명의 면역 세포의 바람직일 실시 예를 나타낸다.

- [0229] 당업자가 이해하는 바와 같이, 다른 세포가 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 CAR를 포함하는 면역 이펙터 세포로서 사용될 수 있다. 구체적으로, 면역 이펙터 세포는 또한 NK 세포, NKT 세포, 호중구, 및 마크로파지를 포함한다. 또한 면역 이펙터 세포는 이펙터 세포의 전구세포를 포함하고 이러한 전구 세포는 생체 내 또는 시험관 내에서 면역 이펙터 세포로 분화되도록 유도될 수 있다. 전구체는 한정된 배양 조건 하에서 면역 이펙터 세포가 되는 iPSC 일 수 있다.
- [0230] 발명은 본원에서 고려되는 CAR을 발현하는 면역 이펙터 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 일 실시 예에서, 상기 방법은 면역 이펙터 세포가 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CAR을 발현하도록 개체로부터 분리된 면역 이펙터 세포를 형질 감염시키거나 형질 도입하는 것을 포함한다. 특정 실시 예에서, 상기 면역 이펙터 세포는 개체로부터 분리되고 시험 관내에서 추가 조작 없이 유전적으로 변형된다. 상기 세포들은 그 개인에게 직접 재투여될 수 있다. 추가의 실시 예에서, 상기 면역 이펙터 세포는 먼저 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형되기 전에 시험관 내에서 증식하도록 활성화되고 자극된다. 이와 관련하여, 면역 이펙터 세포는 유전적으로 변형(즉, 본원에서 고려되는 CAR을 발현하도록 형질 도입되거나 형질 감염)되기 전 및/또는 후에 배양될 수 있다.
- [0231] 특정 실시 예에서, 본원에 기재된 면역 이펙터 세포의 시험 관내 조작 또는 유전적 변형 전에, 세포 공급원은 대상으로부터 수득된다. 특정 실시 예에서, CAR-변형 면역 이펙터 세포는 T 세포를 포함한다. T 세포는 제한 없이, 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위 유래 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직, 및 종양을 포함하는, 수많은 공급원으로부터 획득될 수 있다. 특정 실시 예에서, T 세포는 당업자에게 공지된 임의의 많은 기술, 즉 침강법, 예를 들어 FICOLL™ 분리법, MACS™ 분리법(Miltenyi)과 같은 항체-결합된 비드-기반 방법을 사용해서 대상체에서 채취된 혈액 단위로부터 획득될 수 있다. 일 실시 예에서, 개체의 순환 혈액 유래의 세포는 분리반출법(apheresis)에 의해 획득된다. 분리반출법 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈 세포, 적혈 세포, 및 혈소판을 포함한, 림프구를 함유한다. 일 실시 예에서, 분리반출법으로 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고 후속 과정을 위해 적절한 완충액 또는 배지에 세포를 위치시킬 수 있다. 세포는 PBS 또는 칼슘, 마그네슘, 및 전부는 아니지만, 대부분의 2가 양이온이 결여된 다른 적합한 용액으로 세척될 수 있다. 당업자가 이해하게 되는 바와 같이, 세척 단계는 당 분야에 공지된 방법, 예컨대 반자동 통과액 원심분리를 사용해서 수행될 수 있다. 예를 들어, 코브(Cobe) 2991 세포 프로세서, 백스터 사이토메이트(Baxter CytoMate) 등. 세척 후, 세포는 다양한 생물적합성 완충액 또는 완충액이 있거나 없는 다른 염수 용액에 재현탁될 수 있다. 특정 실시 예에서, 분리반출 샘플의 바람직하지 않은 성분은 세포 직접 재현탁시킨 배양 배지에서 제거될 수 있다.
- [0232] 특정 실시 예에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고 예를 들어 PERCOLL™ 구배를 통한 원심 분리로 단핵 세포를 고갈시킴으로써 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)로부터 분리된다. T 세포의 특정 계군(subpopulation)은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다. 본원에서 사용하기 위한 하나의 방법은 음성적으로(negatively) 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단일클론 항체의 콕테일을 사용하는 음성 자기 면역부착(negative magnetic immunoadherence) 또는 유세포 계측법을 통한 세포 선별 및/또는 선택이다.
- [0233] PBMC는 본원에서 고려된 방법을 사용하여 CAR을 발현하도록 직접 유전자 변형될 수 있다. 특정 실시 예에서, PBMC의 단리 후, T 림프구는 추가로 단리되고, 특정 실시 예에서, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구는 유전자 변형 및/또는 확장 전 또는 후에 천연, 기억 및 이펙터 T 세포 아집단으로 분류될 수 있다. CD8+ 세포는 표준 방법을 사용하여 수득할 수 있다. 일부 실시 예에서, CD8+ 세포는, 이들 유형의 CD8+ 세포 각각과 연관되는 세포 표면 항원을 동정함으로써 천연, 중앙 기억 및 이펙터 세포로 추가로 분류된다.
- [0234] 일부 실시 예에서, 본 발명의 면역 세포, 예를 들어 본원에 기재된 T 세포는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 iPSC(inducible pluripotent stem cells)로부터 수득될 수 있다.
- [0235] CAR T 세포를 생산하기 위한 허용된 접근법은 성숙한 순환 T-세포(mature circulating T-cells)의 유전자 변형 및 확장에 의존한다. 이러한 과정은 자가(autoologous) T 세포를 이용하고 내인성 TCR 발현을 통한 동종 이형 T 세포로부터의 이식편대숙주(GvHD) 질환의 위험을 감소시킬 뿐만 아니라 MHC 비호환성을 통한 거부를 감소시킨다. 대안으로서, 유도성 다능성 줄기세포와 같은 다능성 줄기세포로부터 조작된 T 세포의 직접 시험 관내 분화는 본 발명의 CAR을 발현하도록 유전자 변형될 수 있는 본질적으로 무제한의 세포 공급원을 제공한다. 일부 실시 양태에서, 균질한 세포 생성물을 일관되고 반복적으로 제조하기 위한 재생 가능한 공급원을 나타내는

소위 마스터 iPSC 세포주(master iPSC line)가 유지될 수 있다. 일부 실시 양태에서, CAR을 코딩하는 핵산을 사용한 마스터 iPSC 세포주의 형질 전환은 원하는 면역 세포, 바람직하게는 T 세포로의 팽창 및 분화 전에 고려된다. T 림프구는 예를 들어 iPSC로부터 생성될 수 있어서, iPSC는 CAR 인코딩 핵산으로 변형되고 이어서 환자에게 투여하기 위해 T 세포로 확장 및 분화될 수 있다. 적절한 면역 세포, 예컨대 T 세포로의 분화는 CAR 코딩 핵산으로의 형질 전환 및 투여 전의 확장 전에 iPSC로부터 수행될 수 있다. 투여를 위해 적합한 수의 세포를 제공하기 위한 iPSC 확장, 유전자 변형 및 확장의 모든 가능한 조합이 본 발명에서 고려된다.

[0236] T 세포 등의 면역 이펙터 세포는 공지된 방법을 사용한 단리 후에 유전적으로 변형될 수 있거나, 면역 이펙터 세포는 유전적으로 변형되기 전에 시험관 내에서 활성화 및 확장될 수 있다(또는 전구세포의 경우에 분화됨). 특정 실시 예에서, T 세포 등의 면역 이펙터 세포는 본원에서 고려되는 키메라 항원 수용체로 유전적으로 변형되고(예를 들면, MND 프로모터를 포함하는 바이러스 벡터 및 CAR을 코딩하는 핵산으로 형질도입됨), 이어서 시험관 내에서 활성화 및 확장된다. 다양한 실시 예에서, T 세포는, 예를 들어, 미국 특허 제6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 제6,867,041호; 및 미국 특허출원공보 제20060121005호에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 CAR을 발현하도록 유전자 변형 전 또는 후에 활성화 및 확장될 수 있다.

[0237] 추가의 실시형태에서, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 상이한 발현 벡터의 혼합물이 면역 이펙터 세포의 공여체 모집단을 유전적으로 변형시키는데 사용될 수 있고, 여기서 각각의 벡터는 본원에서 의도된 상이한 키메라 항원 수용체 단백질을 코딩한다. 수득되는 변형된 면역 이펙터 세포는 변형된 세포의 혼합된 모집단을 형성하고, 변형된 세포의 모집단은 하나 이상의 상이한 CAR 단백질을 발현한다.

[0238] 일 실시 예에서, 본 발명은, 세포가 해동시 생존 상태로 존재하도록 면역 이펙터 세포를 동결보존하는 것을 포함하는, CXCR5 단백질을 표적으로하는 면역 이펙터 세포를 발현하는 유전자 변형된 뮤린, 인간 또는 인간화 CAR 단백질을 저장하는 방법을 제공한다. CAR 단백질을 발현하는 면역 이펙터 세포의 분획은 B 세포 관련 질환을 앓고 있는 환자의 장래의 치료를 위한 이러한 세포의 영구적 공급원을 제공하기 위해 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해 동결 보존될 수 있다. 필요한 경우, 동결보존된 형질전환된 면역 이펙터 세포는 보다 많은 이러한 세포를 위해 해동, 성장 및 확장시킬 수 있다.

[0239] 조성물 및 제형(Compositions and Formulations)

[0240] 본원에서 의도된 조성물은, 본원에서 고려된 바와 같이, 하나 이상의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 벡터, 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포 등을 포함할 수 있다. 조성물은 약제학적 조성물을 포함하나 이에 제한되지 않는다. "약제학적 조성물"은, 단독으로 또는 하나 이상의 기타 양식의 요법과 조합하여, 세포 또는 동물에게 투여하기 위한 약제학적으로 허용되는 또는 생리학적으로 허용되는 용액에서 제형화된 조성물을 지칭한다. 또한, 필요한 경우, 본 발명의 조성물은 다른 제제, 예를 들면, 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 소분자, 화학요법제, 프로-드러그, 약물, 약물 항체 또는 기타 다양한 약제학적 활성제와 조합하여 투여할 수 있는 것으로 이해된다. 조성물에 또한 포함될 수 있는 다른 성분에는 실질적으로 제한이 없지만, 단 추가의 제제는 의도된 요법을 전달하는 조성물의 능력에 역으로 영향을 미치지 않아야 한다.

[0241] 문구 "약제학적으로 허용되는"은, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비에 비례하여, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 용량형을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0242] 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"는, 제한 없이, 인간 또는 가축 동물에서 사용하기 위해 허용되는 것으로 미국 식품의약청(United States Food and Drug Administration)에 의해 승인된 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활주제, 감미제, 보존제, 염료/착색제, 향미 증강제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장성제, 용매, 계면활성제 또는 유화제를 포함한다. 예시적 약제학적으로 허용되는 담체는, 이로 한정되는 것은 아니지만, 당, 예를 들어, 락토즈, 글루코즈 및 수크로즈; 전분, 예를 들어, 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로즈 및 이의 유도체, 예를 들어, 나트륨 카복실메틸 셀룰로즈, 에틸 셀룰로즈 및 셀룰로즈 아세테이트; 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터, 왁스, 동물 및 식물 지방, 파라핀, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 산화아연; 오일, 예를 들어, 땅콩유, 면실유, 해바라기유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예를 들어, 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레레이트 및 에틸 라우레이트; 아가; 완충제, 예를 들어, 수산화망간 및 수산화알루미늄; 알긴산; 피로젠-비함유 물; 등장성 식염수; 링거액; 에틸 알콜; 인산염 완충

용액; 및 약제학적 제형에 사용된 임의의 기타 호환성 물질을 포함한다.

- [0243] 특정 실시 예에서, 본 발명의 조성물은 본원에서 의도된 일정량의 CAR-발현 면역 이펙터 세포의 양을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "양"은 임상 결과를 포함하여 유리한 또는 목적하는 예방적 또는 치료적 결과를 달성하기 위한 유전적으로 변형된 세포 예를 들어, T 세포의 "효과적 양" 또는 "유효량"을 지칭한다.
- [0244] "예방적 유효량"은 목적하는 예방적 결과를 달성하기에 효과적인 유전적으로 변형된 치료 세포의 양을 지칭한다. 전형적으로, 그러나 반드시 필요한 것은 아니지만, 예방적 용량은 질환의 초기 단계 전에 또는 초기 단계에 대상체에서 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적다. 예방이라는 용어는 반드시 특정 의학적 장애의 완전한 금지 또는 예방을 의미하지는 않는다. 예방이라는 용어는 또한 특정 의학적 장애가 발생하거나 그 증상이 악화되는 위험을 줄이는 것을 의미한다.
- [0245] 유전적으로 변형된 치료 세포의 "치료학적 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유발하는 줄기세포 및 전구 세포의 능력 등의 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 또한 바이러스 또는 형질 도입된 치료 세포의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료학적으로 유리한 효과가 상회하는 것이다. 용어 "치료학적 유효량"은 대상체(예: 환자)를 "치료"하는데 효과적인 양을 포함한다. 치료적 유효량이 지시되는 경우, 투여되는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자(대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 대사 정도 및 상태를 고려하여 주치의에 의해 결정될 수 있다.
- [0246] 일반적으로, 본원에 기재된 T 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 체중(kg)당 10^2 내지 10^{10} 개의 세포 투여량, 적합하게는 체중당 10^5 내지 10^6 세포 투여량(이들 범위 내의 모든 정수 값을 포함함)으로 투여될 수 있는 것으로 언급될 수 있다. 세포 수는 조성물에 포함된 세포 유형으로 의도되는 궁극의 용도에 의존할 것이다. 본 명세서에 제공된 용도에 대해, 세포는 일반적으로 1리터 이하의 용적이며, 500ml 이하, 심지어 250ml 또는 100ml 이하일 수 있다. 따라서 원하는 세포의 밀도는 전형적으로 약 10^6 개의 세포/ml 초과이고, 일반적으로 약 10^7 개의 세포/ml 초과이며, 일반적으로 약 10^8 개의 세포/ml 이상이다. 임상적으로 적절한 수의 면역 세포는 약 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 또는 10^{12} 개의 세포와 점증적으로 동일하거나 또는 이를 초과하는 다회 주입으로 나누어질 수 있다. 본 발명의 몇몇 측면에서, 특히 모든 주입된 세포가 특정 표적 항원으로 재지향될 것이기 때문에, 보다 적은 수의 세포가 투여될 수 있다. CAR 발현 세포 조성물은 이러한 범위 내의 투여량으로 여러 번 투여될 수 있다. 세포는 치료를 받는 환자에 대해 동종이계, 동계, 이종 또는 자가일 수 있다.
- [0247] 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이 활성화 및 확장된 세포를 포함하는 조성물은 면역 저하된 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 사용할 수 있다. 특히, 본원에서 의도된 CAR-변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 B 세포 악성 종양의 치료에 사용된다. 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 단독으로, 또는 담체 희석제, 부형제 및/또는 IL-2 또는 기타 사이토카인 또는 세포 집단 등의 다른 성분과 조합하여 투여할 수 있다. 특정 실시 예에서, 본원에서 의도된 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 유전적으로 변형된 T 세포의 양을 포함한다.
- [0248] T 세포와 같은 CAR-발현 면역 이펙터 세포 집단을 포함하는 본 발명의 약제학적 조성물은 완충제, 예를 들어, 중성 완충된 식염수, 인산염 완충된 식염수 등; 탄수화물, 예를 들어, 글루코즈, 만노즈, 수크로즈 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예를 들어, 글리신; 항산화제; 킬레이트제, 예를 들어, EDTA 또는 글루타티온; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 비경구 투여, 예를 들면, 혈관내(정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여를 위해 제형화된다.
- [0249] 액체 약제학적 조성물은, 이들이 용액, 현탁액 또는 기타 유사 형태이든지, 하나 이상의 하기 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예를 들어, 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리학적 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 고정유, 예를 들면, 용매 또는 현탁 매질로서 사용될 수 있는 합성 모노 또는 디글리세라이드, 폴리 에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매; 항균제, 예를 들어, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예를 들어, 아스코르브산 또는 아황산나트륨; 킬레이트제, 예를 들어, 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예를 들어, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 등장성 조절제, 예를 들어, 염화나트륨 또는 텍스트로즈. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기, 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다중 용기 바이알에 봉입될 수 있다. 주사가 가능한 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균성이다.
- [0250] 특정 실시 예에서, 본원에서 의도된 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 치료제와 조합하여 유효량의 CAR-발현 면역 이펙터 세포를 포함한다. 따라서, CAR-발현 면역 이펙터 세포 조성물은 단독으로 또는 기타 공지된 암 치

료제, 예를 들면, 방사선 요법, 화학요법, 이식, 면역요법, 호르몬 요법, 광선역학 요법 등과 조합하여 투여할 수 있다. 조성물은 또한 항생제와 조합하여 투여할 수 있다. 이러한 치료제는 특정 암 등의 본원에 기재된 특정 질환 상태에 대한 표준 치료로서 당해 기술분야에서 허용될 수 있다. 의도되는 예시적 치료제는 사이토카인, 성장 인자, 스테로이드, NSAID, DMARD, 항-염증제, 화학요법, 방사선요법, 치료학적 항체 또는 기타 활성제 및 보조제를 포함한다.

[0251] 치료 방법(Therapeutic Methods)

[0252] 본원에서 고려되는 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포는 면역 조절 증상(immunoregulatory condition) 및 혈액학적 악성 종양을 포함하지만 이에 제한되지 않는 CXCR5를 발현하는 병원성 세포의 존재와 관련된 의학적 질환의 치료에 사용하기 위한 입양 면역요법(adoptive immunotherapy)의 개선된 방법을 제공한다.

[0253] 본원에서 사용되는 "CXCR5를 발현하는 병원성 세포의 존재와 관련된 의학적 질환"은 암 또는 자가 면역 질환과 같은 의학적 증상을 지칭하며, 여기서 상기 질환의 병리 생리학에 관여하는 세포는 세포 표면에서 CXCR5의 발현, 바람직하게는 CXCR5의 제시를 나타낸다. CXCR5의 발현은 예를 들어 환자로부터 세포를 단리하고 프라이머 지향 CXCR5 전사를 사용하는 PCR, 항-CXCR5 항체로 면역 염색하거나 유세포 분석에 의한 분석에 의해 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 병원성 세포는 전형적으로 병원성 성숙 B 세포 및/또는 기억 B 세포, 및/또는 병원성 T 세포 및/또는 T 폴리클라 헬퍼 세포일 수 있다.

[0254] 특정 실시 양태에서, 본원에서 고려되는 CAR-변형 T 세포를 포함하는 조성물은 백혈병 종양 세포 파종(dissemination)이 있거나 또는 없는 B 세포 악성 종양, 예를 들어 B 세포 NHL 또는 T 세포 비-호지킨 림프종과 같은 비-호지킨 림프종(NHL)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 혈액암(hematologic malignancies)의 치료에 사용된다.

[0255] 비-호지킨 림프종은 림프구(백혈구 세포)의 거대 그룹의 암을 포함한다. 비-호지킨 림프종은 모든 연령에서 발생할 수 있고, 종종 정상보다 큰 림프절, 발열 및 체중 감소로 나타난다. 비-호지킨 림프종은 또한 중추 신경계, 폐, 장, 결장 및 내장을 비롯한 점막 조직과 같은 절외(extranodal) 부위에도 존재할 수 있다. 다수의 상이한 유형의 비-호지킨 림프종이 있다. 예를 들면, 비-호지킨 림프종은 적극적(신속-성장) 및 무통성(느린-성장) 유형으로 나눌 수 있다.

[0256] 비-호지킨 림프종은 B-세포 및 T-세포로부터 유래할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비-호지킨 림프종"은 "B 세포" 및 "T-세포 비-호지킨 림프종" 둘 모두를 포함한다. B-세포 비-호지킨 림프종(NHL)은 버킷림프종(Burkitt lymphoma), 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 광범위 큰 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 소포성 림프종(follicular lymphoma), 면역아세포성 대세포 림프종(immunoblastic large cell lymphoma), 전구체 B-림프구성 림프종(precursor B-lymphoblastic lymphoma), 및 외투 세포 림프종(mantle cell lymphoma)을 포함한다. 골수 또는 줄기세포 이식 후에 발생하는 림프종은 통상 B-세포 비-호지킨 림프종이다.

[0257] T-세포 림프종(T-cell lymphomas)은 미국의 모든 NHL의 약 15%를 차지한다. 혈액 또는 림프관 면역 모세포(lymph vessel immunoblasts)의 성숙 T-세포 림프종인 혈관 면역 모구 T-세포 림프종(AITL, angioimmunoblastic T-cell lymphoma)과 같은 다양한 형태의 T-세포 림프종이 있다. 추가의 형태의 T 세포 림프종은 백혈병 파종(dissemination)을 갖는 피부 T 세포 림프종 및 T 세포 림프종에 관한 것이다.

[0258] 만성 림프구성 백혈병(CLL)은 또한 본 CAR로 치료될 수 있으며, B 림프구로 불리우는 미성숙 백혈구 세포 또는 B 세포에서 느린 증가를 유발하는 완만한(느린-성장) 암이다. 암세포는 혈액 및 골수를 통해 확산하고, 또한 림프절 또는 간 및 비장 등의 다른 기관에 영향을 미칠 수 있다. CLL은 결국 골수의 파괴(fail)를 유발한다. 종종, 질환의 후기 단계에서, 상기 질환은 소림프구성 림프종으로 불리우며 주로 2차 림프 기관, 예를 들어 림프절 및 비장에 국한된다.

[0259] 본 발명의 일 실시 예에서, 상기 CAR을 발현하는 CAR 또는 면역 세포는 자가 면역 질환, 바람직하게는 자가 항체-의존성 자가 면역 질환, 바람직하게는 염증 성분을 갖는 자가 면역 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0260] 비조절된 CXCR5-발현 폴리클라 T-헬퍼(Tfh) 세포는 자가 면역 질환 동안 악화된 체액성 면역 반응 및 자가 항체 생성에 기여하는 중요한 메커니즘을 나타낸다. 따라서, CXCR5-발현 Tfh 세포는 자가 면역의 맥락에서 실현 가능한 표적을 나타낸다.

[0261] 상기 치료될 자가면역 질환은 바람직하게 다카야수 동맥염(Takayasu arteritis), 거대세포 동맥염(giant-cell

arteritis), 가족성 지중해열(Familial Mediterranean fever), 가와사키병(Kawasaki disease), 결절성 다발성 동맥염(polyarteritis nodosa), 피부 결절성 다발성 동맥염(cutaneous Polyarteritis nodosa), 간염-관련 동맥염(Hepatitis-associated arteritis), 베체트 증후군(Behcet's syndrome), 베게너 육아 종증(Wegener's granulomatosis), ANCA-혈관염(ANCA-vasculitides), 척 슈트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 미세 다발성 혈관염(microscopic polyangiitis), 결합 조직 질환 혈관염(Vasculitis of connective tissue diseases), 헤노흐-쾨라인 자반병(Henrich-Schönlein purpura), 저온글로불린 혈관염(Cryoglobulinemic vasculitis), 피부 백혈구 파괴 혈관염(Cutaneous leukocytoclastic angiitis), 열대성 대동맥염(Tropical aortitis), 유육종증(Sarcoidosis), 코간 증후군(Cogan's syndrome), 비스코트-올드리치 증후군(Wiskott-Aldrich Syndrome), 나중성 동맥염(Lepromatous arteritis), CNS의 일차 맥관염(Primary angiitis of the CNS), 폐색전 혈전 혈관염(Thromboangiitis obliterans), 방종양성 동맥염(Paraneoplastic arteritis), 두드러기(Urticaria), Dego 질병(Dego's disease), 골수이형성 증후군(Myelodysplastic syndrome), 장기 융기성 홍반(Erythema elevatum diutinum), 고면역글로불린 D(Hyperimmunoglobulin D), 알레르기성 비염(Allergic Rhinitis), 천식(Asthma bronchiale), 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 치주염(periodontitis), 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 죽상 동맥 경화증(atherosclerosis), 아밀로이드증(Amyloidosis), 모르부스 크론(Morbus Chron), 궤양성 직장염(Colitis ulcerosa), 자가 면역 근염(Autoimmune Myositis), 당뇨병(Diabetes mellitus), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre Syndrome), 조직구증(histiocytosis), 골관절염(Osteoarthritis), 아토피 피부염(atopic dermatitis), 치주염(periodontitis), 만성 부비동염(chronic rhinosinusitis), 건선(Psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 미세 장염(Microscopic colitis), 폐섬유증(Pulmonary fibrosis), 사구체신염(glomerulonephritis), 휘플씨병(Whipple's disease), 스틸병(Still's disease), 결절성홍반(erythema nodosum), 이염(otitis), 저온글로불린혈증(cryoglobulinemia), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 홍반성 낭창(Lupus erythematosus), , 바람직하게는 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 재생불량성빈혈(aplastic anemia), 골수섬유증(Osteomyelofibrosis), 만성염증성 탈수성다발성신경증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 기무라병(Kimura's disease), 전신 경화증(systemic sclerosis), 만성 대동맥주위염(chronic periaortitis), 만성 전립선염(chronic prostatitis), 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 만성육아종병(chronic granulomatous disease), 특발성 이완불능증(Idiopathic achalasia), 블레오마이신-유발 폐염증(bleomycin-induced lung inflammation), 사이타라빈-유발 폐염증(cytarabine-induced lung inflammation), 자가 면역성 혈소판 감소증(Autoimmunthrombocytopenia), 자가 면역성 호중구 감소증(Autoimmunneutropenia), 자가 면역성 용혈성 빈혈(Autoimmunhemolytic anemia), 자가 면역성 림프구 감소증(Autoimmunlymphocytopenia), 샤가스 병(Chagas' disease), 만성 자가면역성 갑상선염(chronic autoimmune thyroiditis), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis), 하시모토병(Hashimoto's Thyroiditis), 위축성 갑상선염(atrophic thyroiditis), 그레이브스병(Graves disease), 다선성자가면역증후군(Autoimmune polyglandular syndrome), 자가 면역성 애디슨 증후군(Autoimmune Addison Syndrome), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 낙엽성 천포창(Pemphigus foliaceus), 포진형 피부염(Dermatitis herpetiformis), 자가 면역성 탈모증(Autoimmune alopecia), 백반증(Vitiligo), 항인지질 증후군(Antiphospholipid syndrome), 중증근무력증(Myasthenia gravis), 강직인간 증후군(Stiff-man syndrome), 굿파스처증후군(Goodpasture's syndrome), 교감성안염(Sympathetic ophthalmia), 모낭염(Folliculitis), 샤프 증후군(Sharp syndrome) 및/또는 에반스 증후군(Evans syndrome), 특히 고초열(hayfever), 치주염(periodontitis), 죽상동맥경화증(therosclerosis), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 가장 바람직하게 SLE으로부터 선택된다.

[0262] 루푸스라고도 알려진 전신 홍반 루푸스(Systemic lupus erythematosus, SLE)는 신체 면역계가 신체의 여러 부분에서 건강한 조직을 공격하는 자가 면역 질환이다. 증상은 사람마다 다르며 경증부터 중증까지 나타날 수 있다. 일반적인 증상으로는 아프고 부어 오른 관절, 발열, 가슴 통증, 탈모, 구강 궤양, 림프절 부종, 피로감, 얼굴에 가장 흔한 붉은 발진이 있다.

[0263] 폴리클라 T-헬퍼 세포(Tfh, Follicular T-helper cell) 세포는 최근 CD4+ T 헬퍼 세포 중 인간 면역 결핍 바이러스(HIV)의 주요 세포 저장소로서 발견되었으며(Leong et al. 2017, Immunology의 Frontiers, 8:622), 본 발명의 CAR을 발현하는 CAR 면역 세포는 HIV-생성 T 헬퍼 세포의 폴리클라 저장소를 표적으로 할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 CAR은 HIV의 치료에서 HIV-생성 T 헬퍼 세포의 저장소(reservoir of HIV-producing T helper cell)를 제거 또는 억제하는데 사용될 수 있다. 일 실시 예에서, 상기 HIV-생성 T 헬퍼 세포의 저장소는 따라서 CXCR5를 발현하는 병원성 세포, 특히 병원성 T 세포의 그룹으로 간주된다.

[0264] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "개체" 및 "대상체"는 종종 상호 교대로 사용되며, 유전자 치료 벡터, 세포-

기반 치료제 및 본원의 다른 곳에 개시된 방법에 의해 치료될 수 있는 질병, 장애 또는 상태의 증상을 나타내는 모든 동물을 지칭한다. 바람직일 실시 예에서, 대상체는 본원에 개시된 세포-기반 치료제 및 방법으로 치료될 수 있는 조혈계(hematopoietic system)의 질병, 장애 또는 증상, 예를 들어 B 세포 악성 종양(B cell malignancy)을 나타내는 임의의 동물을 포함한다. 적합한 대상체(예: 환자)는 실험실 동물(예: 마우스, 랫트, 래빗 또는 기니피그), 농장 동물 및 가축 또는 애완동물(예: 고양이 또는 개)을 포함한다. 비-인간 영장류 및, 바람직하게는, 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체는, B 세포 악성 종양을 갖거나, B 세포 악성 종양으로 진단되거나, B 세포 악성 종양을 가질 위험에 있는 인간 환자를 포함한다.

[0265] 본원에 사용된 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 병리학적 상태의 증상 또는 병리학에 대한 모든 유익하거나 바람직한 효과를 포함하며, 치료될 질환 또는 상태의 하나 이상의 측정 가능한 마커의 최소 감소도 포함할 수 있다. 치료는 임의로, 질환 또는 상태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 질환 또는 상태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. "치료"는 질환 또는 상태, 또는 이의 연관된 증상을 반드시 완전히 근절하거나 치유하는 것을 나타내는 것은 아니다.

[0266] 본원에서 사용된 바와 같이, "예방하다", 및 "예방된", "예방하는" 등의 유사한 단어들은 질환 또는 상태의 발병 또는 재발의 가능성을 방지, 억제 또는 감소시키는 접근법을 나타낸다. 또한, 이는 질환 또는 상태의 발병 또는 재발을 지연시키거나, 질환 또는 상태의 증상의 발병 또는 재발을 지연시키는 것을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, "예방" 및 유사한 단어들은 또한 질환 또는 상태의 발병 또는 재발 전에 질환 또는 상태의 강도, 영향, 증상 및/또는 부담을 감소시키는 것을 포함한다.

[0267] 일 실시 예에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 B 세포 관련 질환을 치료하는 방법은 본원에서 의도된 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포를 포함하는 유효량, 예를 들면, 치료학적 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 투여량 및 빈도는, 적절한 용량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있지만, 환자의 상태 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0268] 본원에서 의도된 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 경구섭취, 수액, 주입 또는 이식을 포함하는 임의의 통상의 방법으로 수행할 수 있다. 바람직일 실시 예에서, 조성물은 비경구 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같은 문구 "비경구 투여" 및 "비경구 투여된"은 통상 주사에 의한, 장용 및 국소 투여를 제외한 투여 방식을 지칭하고, 제한 없이, 혈관내, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 낭내, 안와내, 종양내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 관절내, 피막내, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 일 실시 예에서, 본원에서 의도된 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위 내로 직접 주사에 의해 대상체에게 투여된다.

[0269] 실시 예

[0270] 본 발명은하기 개시된 실시 예에 의해 설명된다. 실시 예는 본 발명의 잠재적으로 바람직한 비-제한적 실시 예에 대한 기술 지원 및 보다 상세한 설명을 제공한다. 본원에 기술된 CAR의 기능성 및 유리한 특성을 입증하기 위해, 하기 실시 예가 고려되어야 한다:

[0271] - 상이한 표적 세포주를 갖는 CAR-형질전환 인간 T 세포의 공동 배양은 별개의 CXCR5+ 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 나타낸다; 판독은 T 세포로부터 이펙터 사이토카인으로서 IFN-감마의 방출이었다;

[0272] - 세포 독성 분석은 CXCR5+ 세포주의 선택적 사멸을 나타낸다; 본질적으로 CXCR5-음성 세포주, 예를 들어 Nalm6 및 NCI-H929에서는 본질적으로 사멸이 보이지 않았다. .

[0273] - 생체 내 실험은 i) 기능성, ii) 오프-타겟 반응성, iii) T 세포 기억 및 iv) B-NHL 세포주에 대해 이식된 CAR-T 세포의 생체 안전성에 대한 데이터를 생성하기 위해 이중 이식된 NSG 마우스 모델을 사용하는 것과 관련된다. B-NHL의 경우, 항-BCMA CAR-T 세포의 세포 용해능(cytolytic capacity)을 기존의 항-CD19 CAR-T세포 생성물과 비교하였다.

[0274] 실시 예 1: 클로닝 및 플라스미드 제조(Cloning and plasmid preparation):

[0275] CAR scFv 서열은 GeneArt 제(Gene Synthesis Service)를 사용하여 합성되었다. GeneArt 플라스미드로부터 scFv 삽입물을 방출하기 위해 NotI 및 CsiI을 사용하여 합성된 서열의 제한 분해를 수행하였다(도 7). 추가 CAR 서열을 포함하는 레트로 바이러스 벡터 MP71을 NotI 및 CsiI로 분해하여 벡터에서 CAR 구조물 내로 단리된 scFv 삽입물의 후속 라이게이션을 가능하게 한다. 이어서 분해된 벡터를 탈인산화시켰다. 겔 전기영동을 사용하여 단편을 분리하고 정제하였다(도 8).

[0276] 전술한 바와 같이 생성된 CAR scFv 서열을 추가 CAR 서열(50ng)을 포함하는 정제된 벡터에 3:1의 비율로 라이게

이전시켰다. 라이게이션 혼합물을 MACH-1로 형질 전환시켰다. 대조군 다이제스트(digest)를 수행하고 Mini-preparation를 시퀀싱하였다. 이어서, 구조물을 MACH-1로 재전환시켰다(re-transformed). MP71-CXCR5-CAR 플라스미드의 maxi-preparation가 생성되었다.

[0277] MP71은 단일 (+)가닥-RNA- 바이러스이다. Reverse-Transcriptase는 레트로바이러스 RNA-게놈을 DNA 사본으로 변환한다. DNA는 표적 게놈으로 임의의 위치에 프로바이러스로 통합된다. 세포 분열을 통해 바이러스는 프로바이러스(provirus)로 안정적으로 변식한다.

[0278] MP71은 다음과 같은 조절 시스 인자(regulatory cis-element)로 구성된다:

[0279] LTRs(=긴 말단 반복, long terminal repeats)은 프로모터를 함유하는 무린 골수 증식 육종 바이러스(MPSV, murine myeloproliferative sarcoma virus)에서 유래한다. 상기 백터의 리더 서열은 무린 배아 줄기세포 바이러스로부터 유래된다. PRE(=전사 후 조절 요소, posttranscriptional regulatory element)는 원래 우드척 간염 (woodchuck hepatitis) 바이러스에서 비롯된다.

[0280] 레트로 바이러스 유전자가 누락되어 더는 복제 능력이 없기 때문에 MP71이 비활성화되었다. 구조 유전자는 이전에 패키징 세포주에서 2개의 헬퍼 플라스미드에 개별적으로 도입되었다. 형질 감염에는 gag, pol 및 env 유전자 프로덕트가 필요하다. 감염성 바이러스 입자는 세포 배양 상청액으로 방출되어 PBL을 형질 도입(transduce)하는데 사용될 수 있다. 인간 PBL에서 높은 발현 속도를 갖는 높은 형질 도입 속도가 달성될 수 있다.

[0281] **실시 예 2: 형질 감염 및 형질 도입(Transfection and transduction):**

[0282] 0일: 6-웰 플레이트에서 바이러스 생산을 위한 HEK-T(293T) 또는 GalV 세포 접종

[0283] 1일: 레트로 바이러스 생산을 위한 일시적인 3-플라스미드 형질 감염(칼슘 포스페이트 형질 감염). 웰 당, 표준 프로토콜에 따라 250 μ M CaCl_2 , 150 μ l H_2O 에서 18 μ g의 DNA를 사용하였다. 세포를 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션하고, 배지를 교환하고, 37°C에서 48시간 동안 추가로 인큐베이션을 수행한다.

[0284] 항-huCD3 항체 및 항-huCD28 항체로 24-웰 비-조직 배양 플레이트 코팅:

[0285] 웰 당 0.5mL PBS(5 μ g/mL 항-CD3, 1 μ g/mL 항-CD28)에 항-CD3/항-CD28 항체 솔루션을 준비한다. 37°C에서 2시간 동안 0.5 mL 항체 솔루션을 포함한 각 웰을 인큐베이션하고, 멸균 2% BSA-솔루션(물)으로 교체한다, 인큐베이션: 30분(37°C). BSA 솔루션을 제거하고 2 mL PBS로 웰을 세척한다.

[0286] 40ml 혈액에서 PBMCs의 정제($\sim 2.5 \times 10^7$ PBMCs):

[0287] 2x50 ml Falcon-Tube에 12.5ml Ficoll-Gradient 배지를 준비하고, RPMI(+100IU/ml 페니실린, 스트렙토마이신)로 혈액을 45ml까지 희석하고, 22.5ml의 Blood-Medium-mixture로 혼합하고 코팅한 다음, 원심 분리기(20분, 20°C, 1800 rpm, RZB*648, G 17.9)한다. 15ml 상층을 버린다. white-milky PBMC 함유 중간상을 포함하는 상층의 나머지를 새로운 50 ml Falcon-Tube에 옮기고, RPMI(+100IU/ml 페니실린, 스트렙토마이신)으로 45ml까지 채우고 원심분리한다. 45 mL RPMI(+100 IU/ML 페니실린, 스트렙토마이신)에서 펠렛을 재현탁시키고, 원심 분리기하고, 10-20 mL T 세포 배지에 펠렛을 결합하고, 트립판 블루로 한 샘플을 염색하고, 세포를 카운트하고 항-CD3, 항-CD28 코팅된 웰에 $1-1.5 \times 10^6$ 세포/ml(400U/ml clinic-IL2에 해당 T 세포 배지(+100 IU/ml IL-2))의 농도로 세포를 추가한다. PBMCs의 나머지를 원심 분리기에 옮기고 -80°C에서 Cryo tube에 저장하고 동결 보관한다.

[0288] 3일: PBL의 형질 도입(Transduction of PBLs)

[0289] HEK-T- 또는 GalV-세포에서 바이러스 상청액을 제거하고 여과한다(0.45 μ m 필터). 1.0 ml 바이러스 상청액으로 자극된 PBMC를 처리한다. CD3-/CD28-코팅된 웰에서 1ml 바이러스 상청액 및 원심 분리기로 자극된 PBL을 처리하였다(90분, 32°C, 800xg). 100 IU/ml IL2 또는 10 ng/ml IL7 및 10 ng/ml IL15의 최종 농도, 및 추가로 4 μ g/ml(8 μ l) 프로타민 설페이트.

[0290] 4일: PBL의 형질 도입

[0291] Hekt- 또는 GalV-세포(0.45 μ m)로부터 남은 바이러스 상청액(4°C) 및 두번째 상등액을 여과. PBL에서 1 ml에서 1.5 ml의 상등액을 회수. 사이토카인 농도를 100 IU/ml IL2 또는 10 ng/ml IL7 및 10 ng/ml IL15 및 4 μ g/ml(8 μ l) 프로타민 설페이트로 조정한다. 32°C에서 90분 800xg에서 원심 분리한다. 형질 도입 4시간 후, PBL을 24-웰 플레이트에서 T25 세포 배양 플라스크로 세척하였다. IL2 또는 IL7/IL15를 포함하는 새로운 배지가 첨가

된다.

[0292] 7일 ~ 13일:PBL배양, T 세포 배지를 신선한 IL2 또는 IL7/IL15로 처리.

[0293] 13일:T 세포 자극 종료.

[0294] 세포 배양 플라스크에서 PBL-배지를 세척, 원심 분리, T 세포 배지(+10 IU/mL IL2)에서 펠렛을 재현탁.

[0295] 15일째: 기능적 분석.

[0296] 실시 예 3: 항-CXCR5 CAR T 세포의 기능적 *in vitro* 시험

[0297] 레트로 바이러스 형질 도입 후 인간 T 세포에서 CXCR5 CAR-발현의 확인:

[0298] 인간 T 세포와 관련하여 CAR 수용체의 폴딩 및 운반에 대한 증거가 제공된다. 상기 레트로 바이러스 형질도입 (transduction) 프로토콜의 기능에 대해 설명한다.

[0299] 1) 인간 말초 혈액 백혈구를 Ficoll 구배를 통해 정제하였다.

[0300] 상기 기술한 바와 같이 세포를 배양하고, 자극시키고, 레트로바이러스로 형질 감염시켰다.

[0301] 형질 도입 후, 세포를 BCMA-CAR 발현 분석 전에 IL-2 또는 IL-7/IL-15 함유 배지에서 배양하였다.

[0302] 2) 형질 도입 비율(rate) 및 생존력은 유동 세포 계측법(FACS) 분석에 의해 평가되었다. CXCR5-CAR 발현을 검출 하기 위해, CAR 구조체의 스페이서 영역에서 인간 IgG1 또는 IgG4 절편을 선택적으로 인식하는 항-인간 Ig 항체 로 세포를 염색하였다. CD3/CD8/CD4 T 세포에 대한 공동 염색을 수행하였다. 결과는 도 9를 참조한다.

[0303] 상이한 표적 세포주를 갖는 CAR-형질도입 인간 T 세포의 공생-배양은 별개의 BCMA⁺ B-NHL 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 나타낸다.

[0304] CAR-T 세포 활성화에 사용된 판독은 T 세포로부터 이펙터(effector) 사이토카인으로서의 IFN-감마의 방출이다.

[0305] 1) 레트로 바이러스-형질도입된 인간 T 세포가 상기 상세히 기재된 바와 같이 생성되었다. 하기 T 세포가 사용 되었다: CXCR5-CD28 CAR-수용체 변이체(H28), CXCR5-4-1BB CAR-수용체 변이체(HBB1), CXCR5-CD28/4-1BB CAR 수 용체 변이체(H288BB), SP6- 음성 대조군 CAR, UT=형질 도입되지 않은 T 세포.

[0306] 2) 레트로 바이러스로 형질 도입된 T 세포를 열거된 세포주 또는 1차 세포의 존재하에 18-20시간 동안 공동 배 양 하였다; 비율 1:1.

표 3

[0307]

| 세포주 | 기원(Origin) | CXCR5-양성 |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| DOHH-2 | 소포성 중심모세포/중심세포 림프종(follicular centroblastic/centrocytic lymphoma, FL)에서 진행된 면역모세포 (immunoblastic) B 세포 림프종 | yes |
| OCI-Ly7 | 미만성 거대 B세포 림프종(DLBCL), 배 중심 타입(germinal center type) | yes |
| SU-DHL4 | 미만성 거대 B세포 림프종(DLBCL), 배 중심 타입(germinal center type) | yes |
| JeKo-1 | 외투 세포 림프종 (MCL), B-NHL | yes |
| SC-1 | B 소포성 림프종(B-NHL) | yes |
| JVM-3 | B 세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL) | yes |
| NALM-6 | B 급성 림프구성 백혈병 (B-ALL) | no |
| REH | B 급성 림프구성 백혈병 (B-ALL) | no |
| NCI-H929 | 다발성 골수종(MM) | no |
| Jurkat | T 세포 급성 림프구성 백혈병 (T-ALL) | no |
| SW-620 | 대장암 세포 | no |
| HEK293 | 배아 신장 세포 | no |
| HEK-CXCR5 | CXCR5로 형질감염된 배아 신장 세포 | yes |
| 1차 세포(Primary cells) | 기원(Origin) | CXCR5-양성 |
| MCL PDX | 환자-유래 맨틀 세포 림프종 이종 이식 | yes |

| | | |
|---------|-------------------------------|----|
| HUVEC | 인간 제대 정맥 내피 세포 | no |
| HUAEC | 인간 제대 동맥 내피 세포 | no |
| HA | 인간 성상 세포 | no |
| HPNC | 인간 신경주위 세포(Perineurial Cells) | no |
| HCoEpiC | 인간 결장 상피 세포 | no |
| HN | 인간 뉴런 | no |

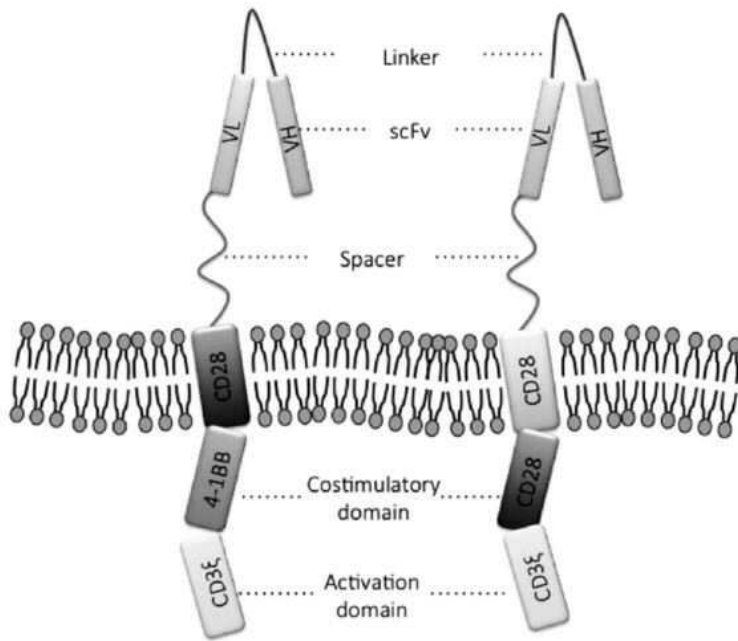
- [0308] 3) 공동-배양(co-cultivation) 후, 세포-프리 배양 상청액을 샘플링하고 IFN-감마의 대조군 수준을 측정하였다. 최대 방출 값은 이펙터 T 세포의 PMA/이오노마이신 자극에 의해 유도되었다; 최소 방출 값은 T 세포에 의해서만 유도되었다.
- [0309] 4) IFN-감마 방출을 ELISA에 의해 상청액에서 결정하였다.
- [0310] 결과는 도 11에 나와 있습니다.
- [0311] 세포 독성 분석은 CXCR5-양성 세포주의 선택적 사멸을 나타냄; CXCR5-음성 세포주에서 본질적으로 사멸은 보이지 않았다
- [0312] 세포 독성 T 림프구 활동의 정량을 위해 ^{51}Cr -방출 분석을 사용한다.
- [0313] 상기 분석은 표적 세포 세포분해의 측정을 가능하게 한다.
- [0314] 1) 레트로 바이러스-형질도입된 인간 T 세포를 상기 상세히 기재된 바와 같이 생성시켰다. SP6-음성 대조군 CAR 및 UT=형질 도입되지 않은 T 세포 이외에 CXCR5 CAR-수용체 변이체(H28)를 사용하였다.
- [0315] 2) 표적 세포는 ^{51}Cr 로 표지되었다
- [0316] 3) 이어서 CAR-T 세포 및 표지된 표적 세포를 4시간 동안 공동-배양하고 이펙터 세포 대 표적 세포 비를 적정하였다:
- [0317] **이펙터 대 타겟 비율(Effector to Target ratio):**
- [0318] 80:1
- [0319] 0:1
- [0320] 20:1
- [0321] 10:1
- [0322] 5:1
- [0323] 2.5:1
- [0324] 4) 세포-free 세포 배양 상등액을 수집한다.
- [0325] 5) 상등액을 LUMA-scintillation 플레이트로 옮기고 감마-scintillation 카운터에서 방출된 ^{51}Cr 를 측정하였다. 최대 방출 값은 LUMA 플레이트에의 적용에 의해 용해된 표적 세포에 의해 결정되었다; 최소 방출 값은 표적 세포만을 사용하여 결정되었다.
- [0326] 결과는 도 12에 나와 있다.
- [0327] **실시 예 4: 이중 이식된 NSG 마우스 모델을 사용하여 B-NHL 세포주에 대해 입양 전이된(adoptively**
- [0328] **transferred) CAR-T 세포를 평가하는 생체 내 실험**
- [0329] 본원에 기재된 다양한 항 CXCR5-CAR-변이체가 장착된 CAR-T 세포가 이펙터 활성을 갖는 것을 입증하기 위해, 또한 현장 조건하에서, CXCR5 + B-NHL 세포주는 i.v. 경로를 통해 NSG-마우스(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1} Wjl/SzJ)로 이식된다.
- [0330] 상기 CXCR5+ B-NHL 세포주는 다음과 같다:

- [0331] SU-DHL4 (DLBCL), JEKO-1 (mantle cell lymphoma), JVM3 (CLL), DOHH-2 (FL), OCI-Ly7 또는 SC-1.
- [0332] 음성 대조군 세포주, 즉 REH (ALL)가 포함되는데, 이는 시험관내에서 항 CXCR5 CAR T 세포에 의해 파괴되지 않지만, 항 CD19 CAR의 표적이다.
- [0333] 이들 마우스는 사이토카인 제공에 의한 인간 세포 성장을 지원하고 이식 거부를 위한 T, B 및 NK 세포가 없기 때문에 이종 이식(xenotransplantation)에 특히 적합하다. 상기 B-NHL 세포주는 루시페린을 적용함으로써 생체 내 종양 세포 검출을 가능하게 하는 firefly-luciferase 유전자로 안정적으로 형질 도입된다. 주입된 종양의 진행 및 분포는 IVIS-시스템을 이용한 생물 발광 영상화에 의해 모니터링된다.
- [0334] 다음, 종양 세포 접종 후 약 5-8 일에 루시페라제 발광 신호의 강도 증가에 의해 종양 세포 성장이 확인되는 경우, 인간 CAR T-세포는 i.v. 경로상에서 수용자(recipient) 당 5×10^5 내지 5×10^6 세포로 시작하여 적정 방식(titrated manner)으로 투여된다. 항-CXCR5 CAR T 세포는 항 CD19 CAR 및 2개의 적합한 음성 대조군, 예컨대 관련이 없는 SP6 대조군 및 형질 도입되지 않은 T 세포 대조군과 비교된다.
- [0335] 3-5일 간격으로 발광 강도를 측정하고 동물에서 종양 세포 관련 신호의 성장 지연/진행 및 소멸을 측정한다. 28 일의 관찰 간격이 사용된다. 종양 세포 관련 신호의 발광 강도 및 소멸의 감소는 CAR T 세포의 치료 효과를 나타낸다.
- [0336] 상기 실험은 NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1 Wjl}/SzJ (NSG) 마우스로 GFP와 함께 루시페라제 유전자로 형질 도입된 5×10^5 맨틀 세포 림프종 세포(MCL) JeKo-1을 마우스에 접종하여 수행되었다(도 13). 마우스는 이어서 3×10^6 항-CXCR5 CAR 형질 도입된 T 세포(n = 4)를 받고(received), 음성 대조군으로서 SP6-CAR 형질 도입된 T 세포(n = 3)를 사용하였다(0 일). 생물 발광 신호의 평균값은 각 마우스의 전신을 포함하는 관심 영역으로부터 획득되었다. 각 시점에서 각 그룹에 대한 데이터가 표시된다(도 13C). 본질적으로 모든 SP6 CAR 처리된 동물은 뒷다리, 흉부 및 복부 기관에서 골수를 통해 강한 발광 신호를 특징으로 하는 진행성 림프종(lymphoma) 질환을 가졌지만, 이는 CXCR5 CAR 처리 그룹의 경우에는 분명히 그렇지 않았다. 이것은 CXCR5 CAR-T 세포가 B-NHL 림프종 개체에 대한 항-종양 활성을 갖는다는 최초 전임상 생체 내 증거를 제공한다.
- [0337] 도 14는 (1) 공동-자극 성분으로서 4-1BB 또는 CD28 및 (2) 공동 자극 성분으로서 CD28 및 4-1BB를 포함하는 3 세대 CAR를 포함하는 대안적인 CAR 구성성분, 및 종양 세포주와 함께 CAR T 세포를 사용하는 공동 배양 실험에서의 그들의 기능적 효과를 나타낸다. CXCR5-함유 종양 세포에 의한 CAR-T 세포의 특이적 활성화는 IFN-감마, IL-2 및 TNF-알파의 방출에 의해 입증된다. 상기 CXCR5-CD28 (H28) CAR이 가장 효과적인 것으로 보이지만, 상기 CXCR5-4-1BB (HBB1) 및 CXCR5-CD28/4-1BB (H28BB)의 두 가지 대체 CAR도 뚜렷한 특정 활동을 나타낸다.
- [0338] 도 15는 CXCR5를 보유하지 않은 건강한 인간 조직으로부터의 1차 세포(도 10B의 데이터 참조)는 CXCR5-CD28 CAR-T 세포의 특이적 활성을 유도하지 않음을 보여준다.
- [0339] **실시 예 5: 특정 환자 집단의 임상 접근법**
- [0340] 생체 내 인간 환경에서, 본 발명은 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 소포 림프종(follicular lymphoma), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia) 및 맨틀 세포 림프종(mantle cell lymphoma)을 갖는 B-NHL 환자에서 효능을 나타내는 것으로 예상된다. 다음 특성을 가진 환자는 임상 I 상 연구에 등록해야 한다: i) 다중 약물 내성(multidrug resistance) 환자, ii) 동종이계(allogeneic) 줄기세포 이식에 부적합한 환자, iii) 추가 화학 요법을 배제하는 공존질환(co-morbidities) 환자, iv) 화학 요법을 견딜 수 없는 노인 환자, v) 진행성 질환이 나타난 후 구제 요법 환자가 다른 표준 치료 요법에서 여러 라인(multiple lines)이 실패한 경우, vi) 자가 줄기세포 이식 후 빠른 진행성 질환이 있는 환자, vii) 동종이계 줄기세포 이식 후 진행성 질환이 있는 환자, viii) 동종이계 줄기세포 이식 전에 가교 요법으로서 및 / 또는 ix) 종양 세포에서 CD19 및/또는 CD20의 탈출 변이체 또는 돌연변이체를 나타내는 환자, 현재의 항체 요법(항 CD20, 리툭시맵, 항 CD19, 올레투주맵, BITE CD19/CD3, 블리마투모맵) 또는 항-CD19 CAR 요법이 그들의 표적 구조를 상실/하향 조절하여 비효율적이 되도록 함.
- [0341] 생체 내 인간 환경에서, 본 발명은 혈관 면역성 T 세포 림프종(angioimmunoblastic T cell lymphoma)를 포함하는 T-NHL 환자 및 백혈병 전파(leukemic dissemination), 피부 국소화(skin localization) 또는 임의의 다른 기관 전파(dissemination)를 갖는 다양한 형태의 T-세포 림프종에서 효능을 나타낼 것으로 예상된다. 이들 환자의 경우, 일반화된 화학 요법을 제외하고는 선택적 치료가 존재하지 않는다. 따라서 다음 특성을 가진 환자는

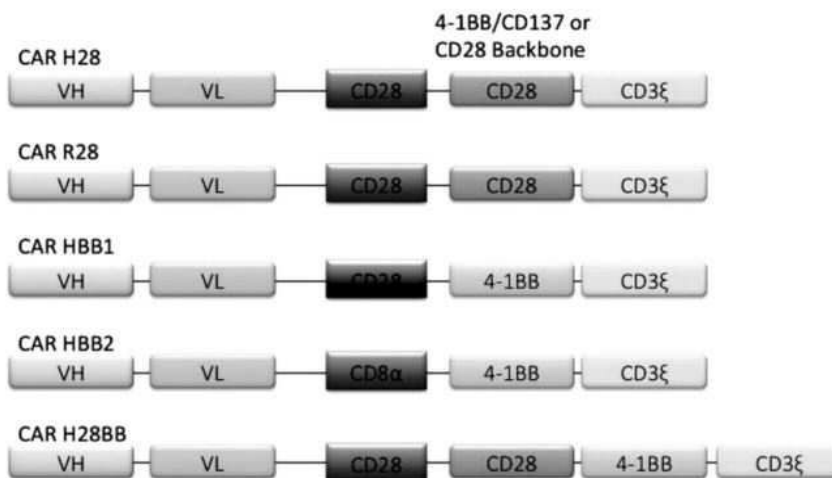
임상 I 상 연구에 등록해야 한다: i) 다중 약물 내성(multidrug resistance) 환자, ii) 동종이계(allogeneic) 줄기세포 이식에 부적합한 환자, iii) 추가 화학 요법을 배제하는 공존질환(co-morbidities) 환자, iv) 화학 요법을 견딜 수 없는 노인 환자, v) 진행성 질환이 나타난 후 구제 요법 환자가 다른 표준 치료 요법에서 여러 라인(multiple lines)이 실패한 경우, vi) 자가 줄기세포 이식 후 빠른 진행성 질환이 있는 환자, vii) 동종이계 줄기세포 이식 후 진행성 질환이 있는 환자, viii) 동종이계 줄기세포 이식 전에 가고 요법으로서 및/또는 ix) 표준 화학 요법의 한 라인(one line of standard chemotherapy)에 진행성 질환이 있는 환자를 위한 2차 요법으로서.

도면

도면1



도면2



도면3

| | Leader | scFv | Order | Linker | Spacer | Trans-membrane domain | Co-stimulatory domain | Activation domain |
|-------|--------|-----------|-------|---------|--------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| H28 | Igx | humanized | VH-VL | Whitlow | IgG1 | CD28 | CD28 | CD3ξ |
| R28 | Igx | rat | VH-VL | Whitlow | IgG1 | CD28 | CD28 | CD3ξ |
| HBB1 | Igx | humanized | VH-VL | Whitlow | IgG1 | CD28 | 4-1BB | CD3ξ |
| HBB2 | Igx | humanized | VH-VL | Whitlow | IgG1Δ | CD8α | 4-1BB | CD3ξ |
| H28BB | Igx | humanized | VH-VL | Whitlow | IgG1 | CD28 | CD28 4-1BB | CD3ξ |

도면4

Protein alignment of hHC and hLC

rat vs. human

89% homology between humanized and rat sequence (hHC)

93% homology between humanized and rat sequence (hLC)

VH

Sequence ID: Query_228957 Length: 113 Number of Matches: 1

| Range 1: 1 to 113 Graphics | | | | ▼ Next Match ▲ Previous Match | |
|--------------------------------------------|--------|------------------------------|--------------|-------------------------------|-----------|
| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps |
| 214 bits(546) | 4e-79 | Compositional matrix adjust. | 101/113(89%) | 112/113(99%) | 0/113(0%) |

| | | | |
|-------|----|-------------------------------------------------------------|-----|
| Rat | 1 | EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSASGFTFTSGMHWFRQAPGKGLDWVAYISSSSGFVYA | 60 |
| Human | 1 | EVQLVESGGGLVQPG SL+LSC+ASGFTFTSGM+WFRQAPGKGL+WV+YISSSSGFVYA | 60 |
| | | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSGMHWFRQAPGKGLWVSYISSSSGFVYA | 60 |
| Rat | 61 | DAVKGRFTISRDNQNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARSEAAFWGQGLVTVSS | 113 |
| Human | 61 | D+VKGRFTISRDNQNTLYLQ+NSL++EDTA+YYCARSEAAFWGQGLVTVSS | 113 |
| | | DSVKGRFTISRDNQNSLYLQMNSLRADTAIVYYCARSEAAFWGQGLVTVSS | 113 |

VL

Sequence ID: Query_74585 Length: 112 Number of Matches: 1

| Range 1: 1 to 112 Graphics | | | | ▼ Next Match ▲ Previous Match | |
|--------------------------------------------|--------|------------------------------|--------------|-------------------------------|-----------|
| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps |
| 213 bits(542) | 1e-78 | Compositional matrix adjust. | 104/112(93%) | 108/112(96%) | 0/112(0%) |

| | | | |
|-------|----|--------------------------------------------------------------|-----|
| Rat | 1 | DIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSRSLSRMGITPLNWLQKPGKSPQLLIYRMSNLA | 60 |
| Human | 1 | DIVLTQ+PRS+ VTPGE ASISCRS+KSRLSRMGITPLNWLQKPG+SPQLLIYRMSN A | 60 |
| | | DIVLTQSPRSLPVTTPGEPASISCRSSKSRSLSRMGITPLNWLQKPGSPQLLIYRMSNRA | 60 |
| Rat | 61 | SGVPDRFSGSGSETDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPTTFSGGSKLEIK | 112 |
| Human | 61 | SGVPDRFSGSGS TDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPTTFSGGSKLEIK | 112 |
| | | SGVPDRFSGSGGTDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPTTFSGGSKLEIK | 112 |

도면5

hHC Alterations

Sequence was codon optimized for *homo sapiens*

90% homology to original sequence after codon optimization (CO)

VH

Sequence ID: Query_122263 Length: 339 Number of Matches: 1

| Range 1: 1 to 333 Graphics | | | | | Next Match Previous Match | |
|--------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------------------------------------------------------|--|
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | |
| 433 bits(234) | 4e-126 | 301/334(90%) | 2/334(0%) | Plus/Plus | | |
| Original | 1 | GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGC~GGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCT | | 59 | | |
| CO | 1 | GAGGTGCAGCTGGTGGGA~ATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACT | | 59 | | |
| Original | 60 | GAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTCAGGCAGGC | | 119 | | |
| CO | 60 | GTCTTGTCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTCAGACAGGC | | 119 | | |
| Original | 120 | CCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCTACATCAGCAGCAGCAGCGGCTTCGTGTACGC | | 179 | | |
| CO | 120 | CCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCAGCAGCAGCTCCGGCTTCGTGTACGC | | 179 | | |
| Original | 180 | CGACAGCGTGAAGGGCAGGTTCAACCATCAGCAGGACAACGCCAGAACAGCCTGTACCT | | 239 | | |
| CO | 180 | CGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGACAACGCCAGAACAGCCTGTACCT | | 239 | | |
| Original | 240 | GCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCGAGGC | | 299 | | |
| CO | 240 | GCAGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCGAGGC | | 299 | | |
| Original | 300 | CGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTG | 333 | | | |
| CO | 300 | CGCCTTTTGGGGCCAGGGAACTCGTGACAGTG | 333 | | | |

도면6

hLC Alterations

Sequence was codon optimized for *homo sapiens*

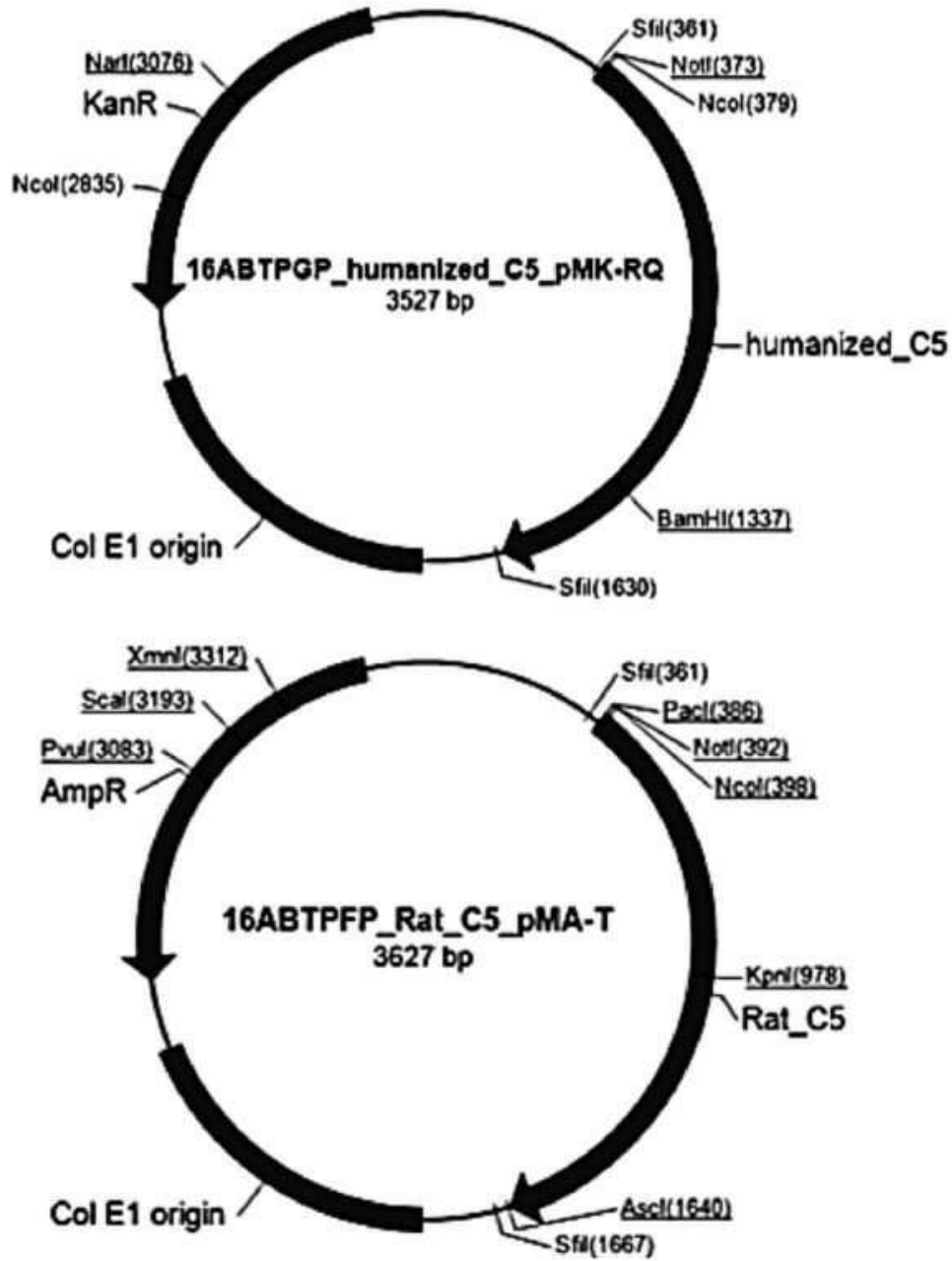
89% homology to original sequence after codon optimization (CO)

VL

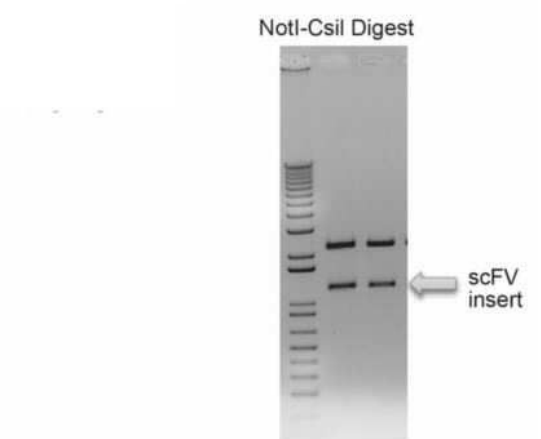
Sequence ID: Query_71369 Length: 336 Number of Matches: 1

| Range 1: 1 to 336 Graphics | | | | | Next Match Previous Match | |
|--------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------------------------------------------------------|--|
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | |
| 411 bits(222) | 2e-119 | 298/336(89%) | 0/336(0%) | Plus/Plus | | |
| Original | 1 | GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCCGCAGCCTGCCCGTGACCCCGGCGAGCCGCCAGC | | 60 | | |
| CO | 1 | GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTGCCAGC | | 60 | | |
| Original | 61 | ATCAGCTGCAGGTCTCCAAGTCCAGGCTGAGCAGGATGGGCATCACCCCTGAACTGG | | 120 | | |
| CO | 61 | ATCAGCTGCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCCTGAACTGG | | 120 | | |
| Original | 121 | TACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACAGGATGAGCAACAGGGCC | | 180 | | |
| CO | 121 | TATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCC | | 180 | | |
| Original | 181 | AGCGGCGTGCCCGACAGGTTCAAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGAAGATC | | 240 | | |
| CO | 181 | AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCTGAAGATC | | 240 | | |
| Original | 241 | AGCAAGGTGGAGACCGAGGACGTGGGCGTGACTACTGCGCCAGTTCTGGAGTACCCC | | 300 | | |
| CO | 241 | AGCAAGGTGGAAACCGAGGACGTGGGCGTGACTATTGCGCCAGTTCTGGAAATACCCC | | 300 | | |
| Original | 301 | CCCACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG | 336 | | | |
| CO | 301 | CCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAATCAAG | 336 | | | |

도면7

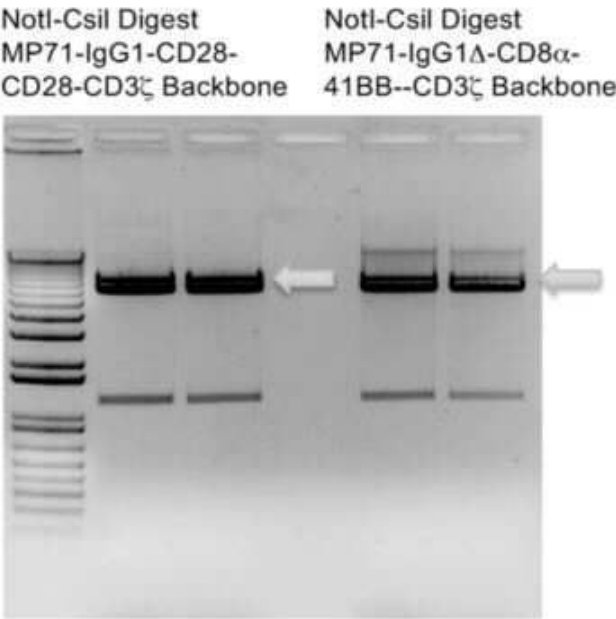


도면7con

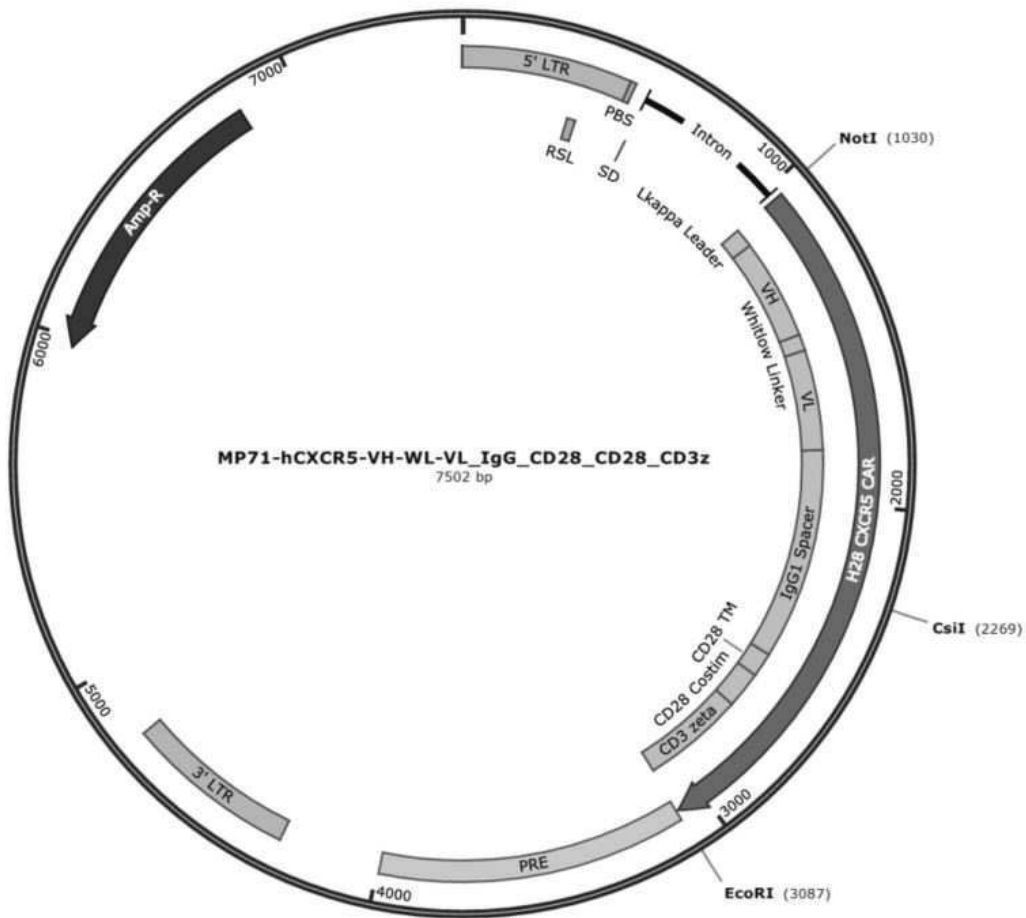


GeneArt plasmids: humanized (left) and Rat (right)

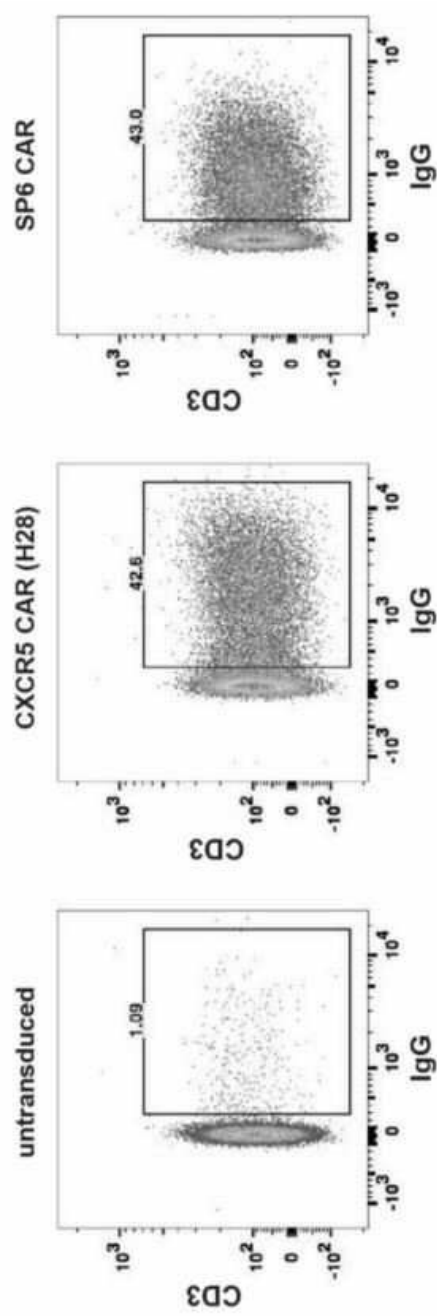
도면8



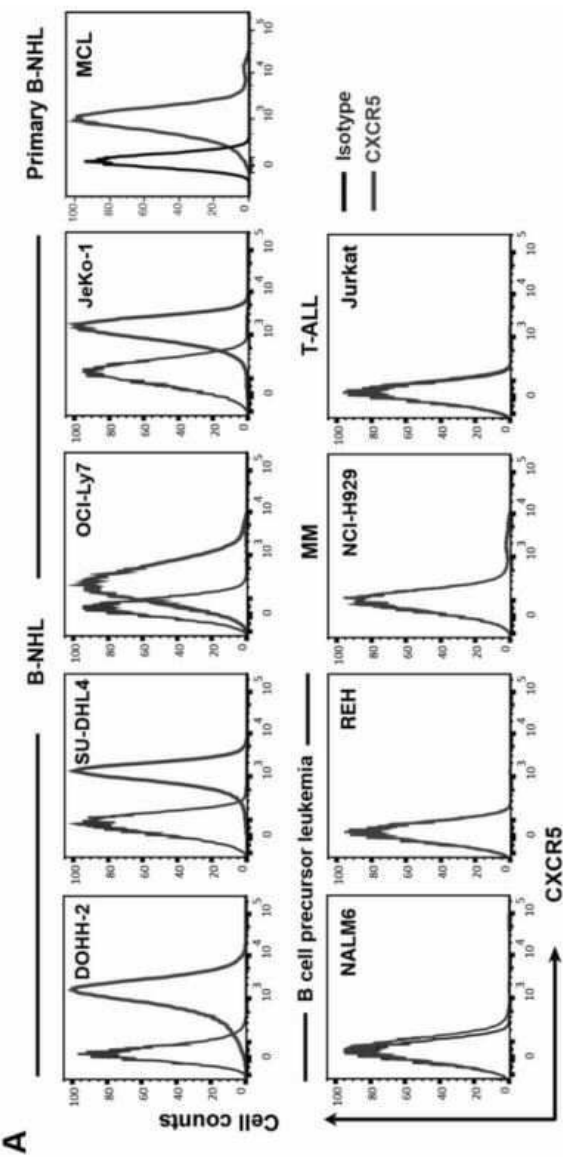
도면8con



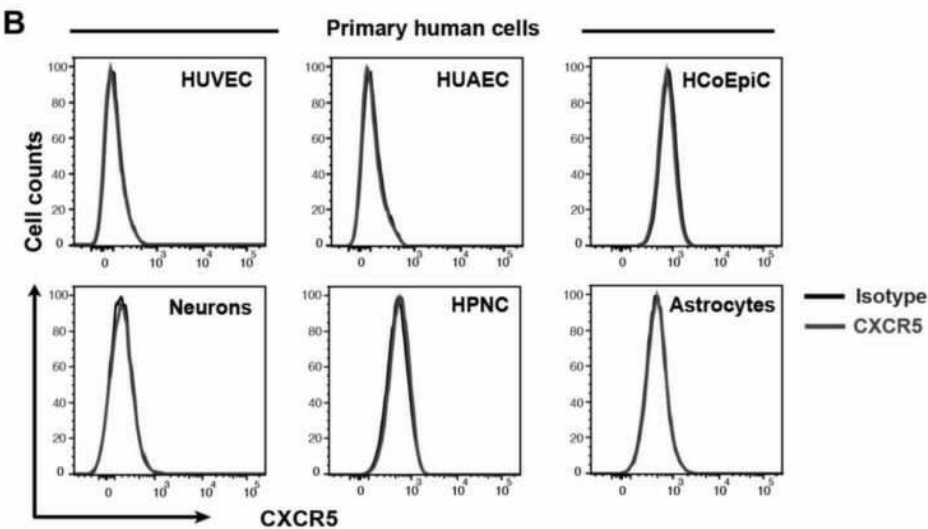
도면9



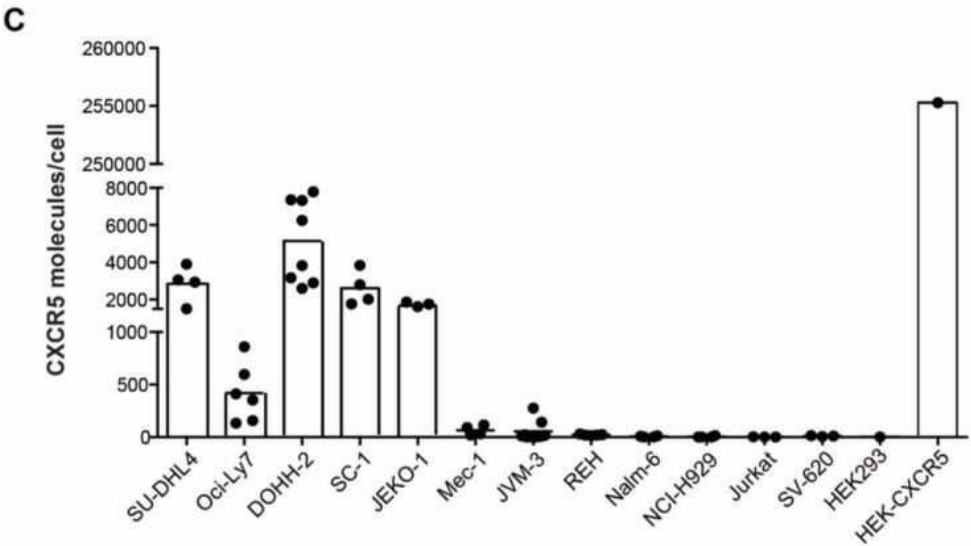
도면10a



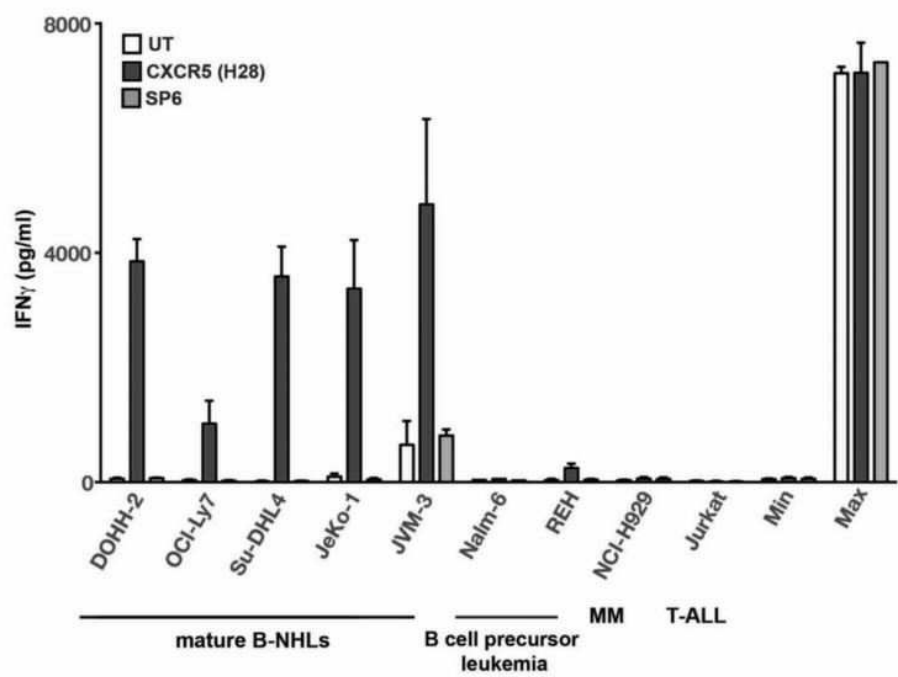
도면10b



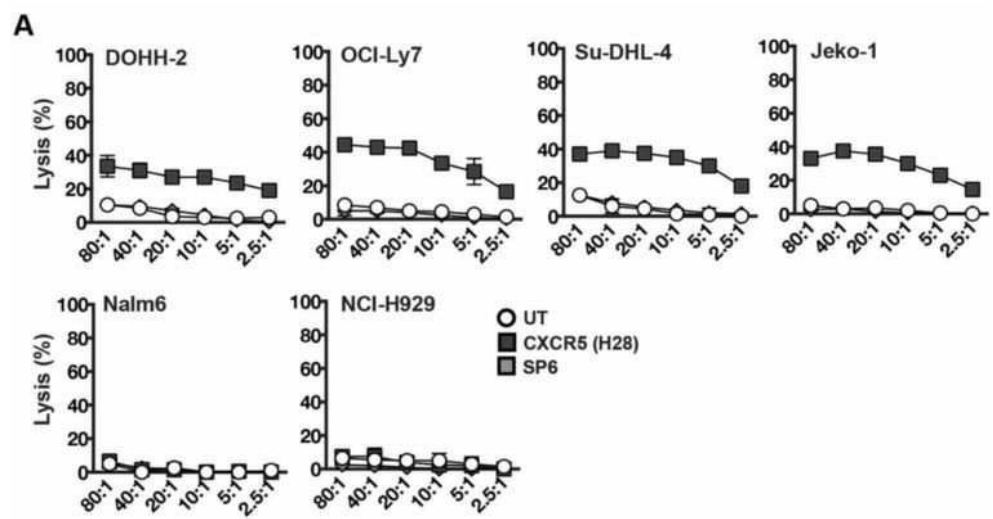
도면10c



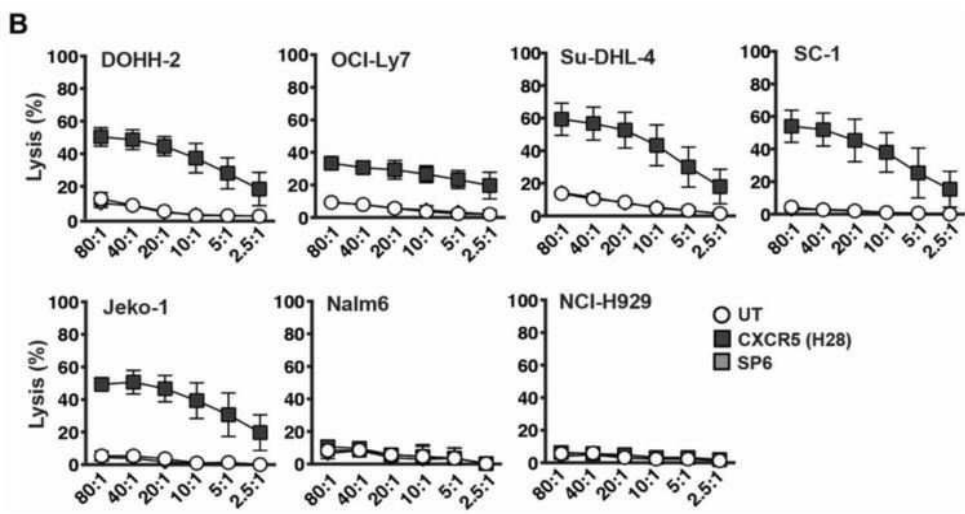
도면11



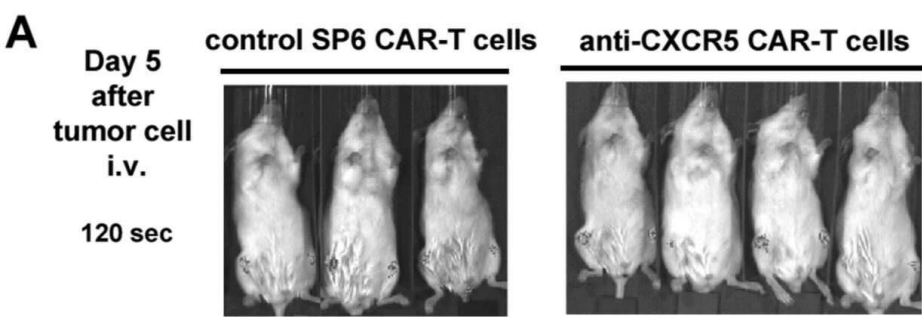
도면12a



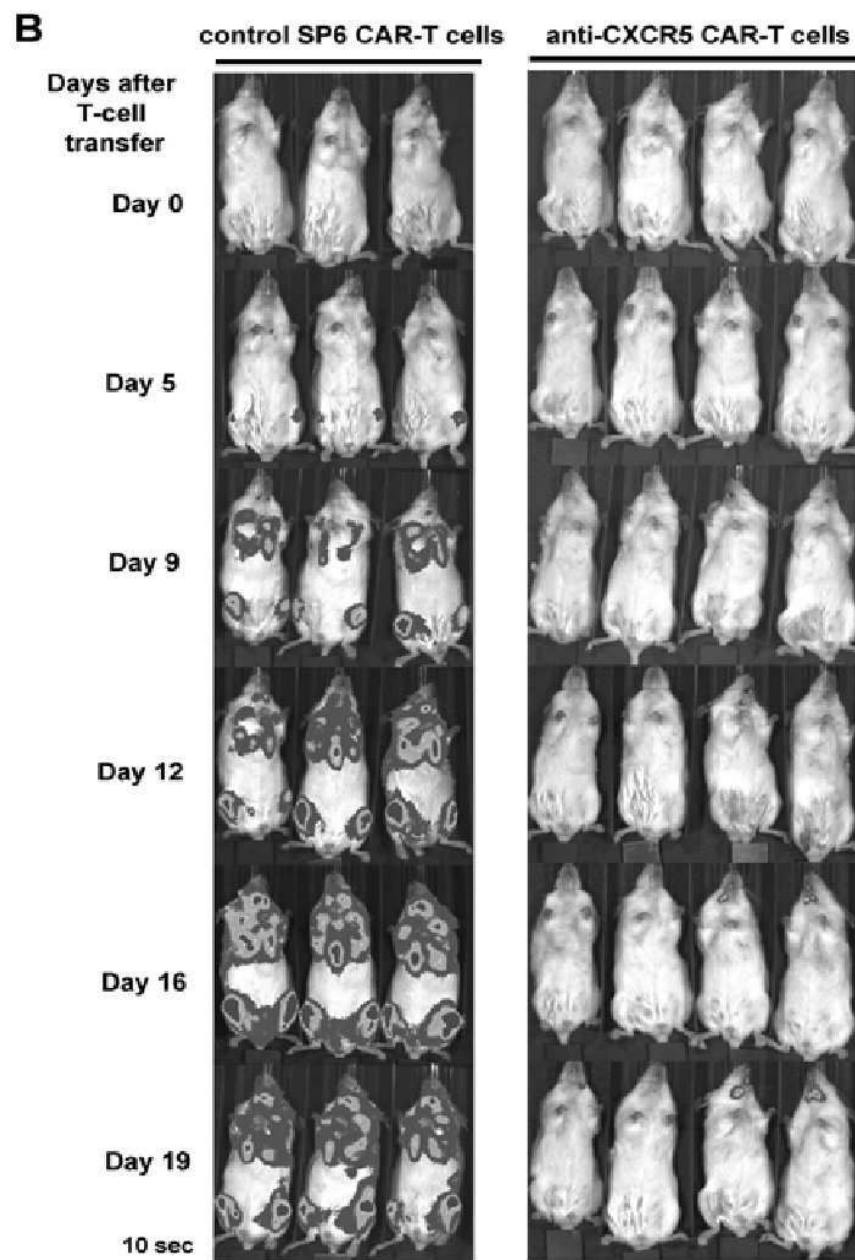
도면12b



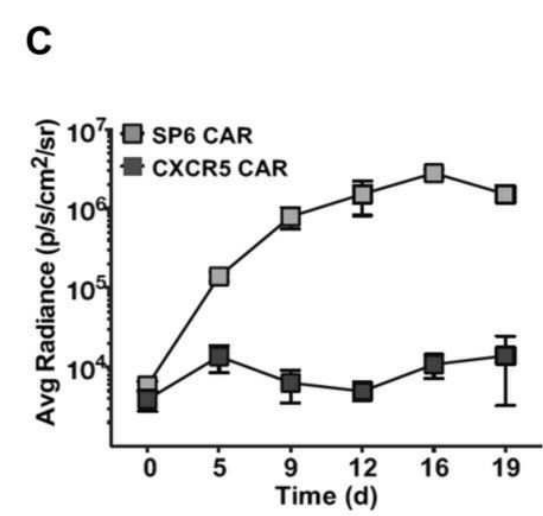
도면13a



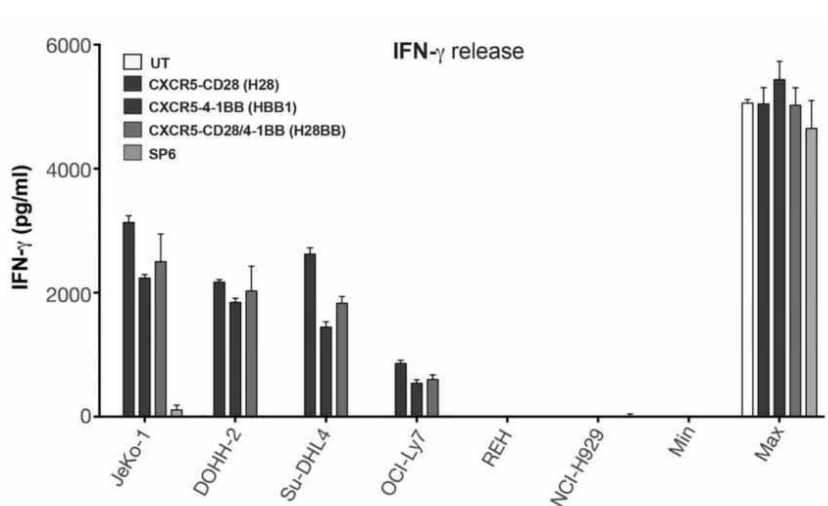
도면13b



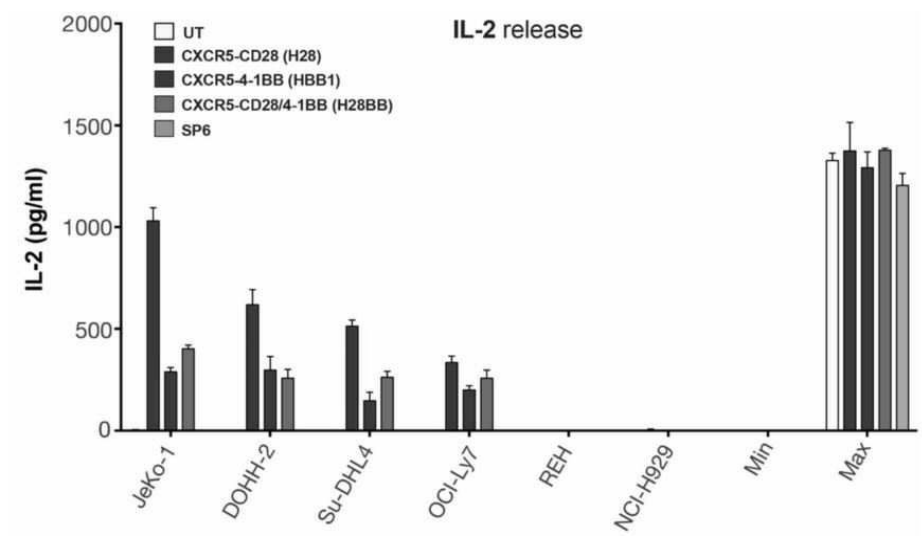
도면13c



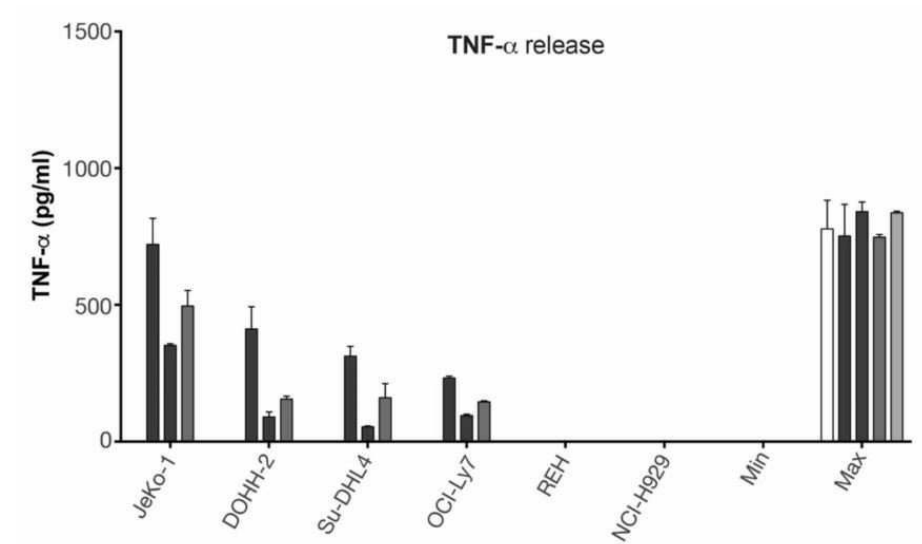
도면14a



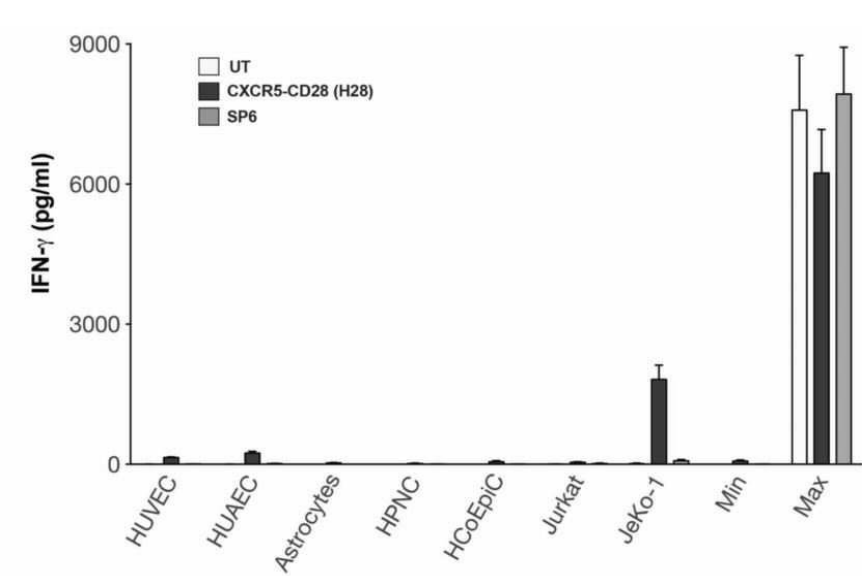
도면14b



도면14c



도면15



서 열 목 록

<110> MAX-DELBRUCK-CENTRUM FUR MOLEKULARE MEDIZIN IN DER HELMHOLTZ-GEMEINSCHAFT

<120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR AND CAR-T CELLS THAT BIND CXCR5

<130> 20HPEP044

<160> 54

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody sequence

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Gly

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody sequence

<400>

2

Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val

1 5
 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody sequence
 <400> 3

Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe

1 5
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody sequence
 <400> 4

Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro

1 5 10
 <210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> antibody sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 5

Arg Met Ser Xaa

1
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody sequence
 <400> 6

Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (46)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

><221> MISC_FEATURE

<222> (49)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (77)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (82)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (86)..(87)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<

220><221> MISC_FEATURE

<222> (92)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Leu Xaa Leu Ser Cys Xaa Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Xaa Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Trp Val

35 40 45

Xaa Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr Ala Asp Xaa Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Xaa Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Xaa Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

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

100 105 110

Ser

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (47)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (59)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (73)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Xaa Pro Arg Ser Xaa Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Xaa Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Xaa Lys Ser Arg Leu Ser Arg

20 25 30

Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Xaa Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Xaa Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe

85 90 95

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

100 105 110

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody sequence

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody sequence

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Gly Met His Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr Ala Asp Ala Val Lys
 50 55 60

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

<210> 11
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody sequence
 <400> 11

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

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

100 105 110

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody sequence

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ala Pro Arg Ser Val Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Arg Leu Ser Arg

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe

85 90 95

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

100 105 110

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 13

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser

<210> 15

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 spacer

<400> 15

Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

100 105 110

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

115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
 225 230 235

<210> 16

<211> 235

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 delta spacer

<400> 16

Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

195 200 205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys
225 230 235

<210> 17

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 (HI-CH2-CH3) spacer

<400> 17

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

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

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

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

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 (HI-CH3) spacer

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

115
 <210> 19

<211>

12
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 (HI) spacer

<400> 19

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> transmembrane domain CD8 alpha

<400> 20

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

<210> 21

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> transmembrane domain CD28

<400> 21

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 22

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Co-stimulatory domain 4-1BB

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 23

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Co-stimulatory domain CD28

<400> 23

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu

35 40

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Activation domain CD3 zeta (4-1BB) or (CD28)

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 25

<211> 682

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H28

<400> 25

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe

35 40 45

Thr Phe Ser Thr Ser Gly Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys

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

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

 180 185 190
 Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
 195 200 205
 Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val
 225 230 235 240
 Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
 245 250 255

 Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
 260 265 270
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 275 280 285
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala
 290 295 300
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

305 310 315 320
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

 325 330 335
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 340 345 350
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 355 360 365
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 370 375 380
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 385 390 395 400

 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 405 410 415
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 420 425 430
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 435 440 445
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 450 455 460
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

 465 470 475 480
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 485 490 495
 Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
 500 505 510
 Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 515 520 525
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 530 535 540

 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 545 550 555 560

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
565 570 575
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
580 585 590
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
595 600 605
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro

610 615 620
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
625 630 635 640
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
645 650 655
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
660 665 670
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680

<210> 26
<211> 682
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> R28
<400> 26

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

Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Arg Ser Val Ser Val Thr Pro Gly Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg
165 170 175

Ser Asn Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp
180 185 190

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
195 200 205

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220

Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val
225 230 235 240

Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala
290 295 300

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
305 310 315 320

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
325 330 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

340 345 350
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
355 360 365
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
370 375 380
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385 390 395 400
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
435 440 445
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

485 490 495
Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
500 505 510
Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
515 520 525
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
530 535 540
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
545 550 555 560

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
565 570 575
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn

580 585 590
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 595 600 605
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 610 615 620
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala

625 630 635 640
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 645 650 655
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 660 665 670

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 675 680

<210> 27

<211> 678

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBB1

<400> 27

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln
 85 90 95
 Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 | |
| Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Arg Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Ser Ser Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu | | | |

355 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 370 375 380
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 385 390 395 400
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 405 410 415
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 420 425 430
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 435 440 445
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 450 455 460
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 465 470 475 480
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Ser Leu Ser Pro
 485 490 495
 Gly Lys Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 500 505 510
 515 520 525
 Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 530 535 540
 Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
 545 550 555 560
 Gly Gly Cys Glu Leu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 565 570 575
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 580 585 590
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 595 600 605

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
610 615 620

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
625 630 635 640

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
645 650 655

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
660 665 670

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675

<210> 28

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBB2

<400> 28

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Thr Ser Gly Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln
85 90 95

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly
 130 135 140
 Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 165 170 175

 Ser Ser Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp
 180 185 190
 Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
 195 200 205
 Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val
 225 230 235 240
 Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
 245 250 255
 Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
 260 265 270
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 275 280 285
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala
 290 295 300
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 305 310 315 320

 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 325 330 335
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 340 345 350
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 355 360 365
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

465 470 475 480

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

485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Leu Arg Val Lys Phe Ser

565 570 575

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr

580 585 590

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

595 600 605

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn

610 615 620

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu

625 630 635 640
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 645 650 655
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 660 665 670
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

675 680
 <210> 29
 <211> 724
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H28BB
 <400> 29

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

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

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

145 150 155 160
 Arg Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 165 170 175
 Ser Ser Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp
 180 185 190

 Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
 195 200 205
 Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val
 225 230 235 240
 Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
 245 250 255
 Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp

 260 265 270
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 275 280 285
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala
 290 295 300
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 305 310 315 320
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 325 330 335

 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 340 345 350
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 355 360 365
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 370 375 380
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

465 470 475 480

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

485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu

500 505 510

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

515 520 525

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

530 535 540

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

545 550 555 560

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
660 665 670
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
675 680 685
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

690 695 700
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
705 710 715 720
Leu Pro Pro Arg

<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Lkappa Leader
<400> 30

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Met Ser Arg
20

<210>
31
<211> 2049
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> H28d
<400> 31

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc | 60 |
| cgcgagggtgc agctgggtgga atctggcgga ggactgggtgc agcctggcgg ctctctgaga | 120 |
| ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc agcaccagcg gcatgaactg gttcagacag | 180 |
| gccccctggca agggcctgga atgggtgtcc tacatcagca gcagctccgg cttcgtgtac | 240 |
| gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acgcccagaa cagcctgtac | 300 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcgag | 360 |
| | |
| gccgcctttt ggggccaggg aacactcgtg acagtgtcca gcggcagcac aagcggtctt | 420 |
| ggcaaacctg gatctggcga gggcagcacc aagggcgata tcgtgctgac ccagagcccc | 480 |
| agatccctgc ctgtgacacc tggcgagcct gccagcatca gctgcagaag cagcaagagc | 540 |
| cggctgagcc ggatgggcat cacccccctg aactggatc tgcagaaacc cggccagtc | 600 |
| ccccagctgc tgatctaccg gatgagcaac agagccagcg gcgtgcccga tagattttcc | 660 |
| ggctctggaa gcggcaccga cttcacccctg aagatcagca aggtggaaac cgaggacgtg | 720 |
| ggcgtgtact attgcgcccc gtctctggaa tccccccca cctttggcag cggcaccaag | 780 |
| | |
| ctggaaatca agcccgcga gcccaagagc cccgacaaga ccataacctg ccctccatgt | 840 |
| cctgcccctc cagtggtctgg ccctagcgtg ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc | 900 |
| ctgatgatcg cccggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacaggat | 960 |
| cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag | 1020 |
| cccagagagg aacagtacaa cagcacctac cgggtggtgt ctgtgctgac cgtgctgcat | 1080 |
| caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc | 1140 |
| cccatcgaga aaaccatctc caaggccaag ggacagcccc gcgagcccca ggtgtacaca | 1200 |
| | |
| ctgcctccaa gcagggacga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa | 1260 |
| ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac | 1320 |
| tacaagacca cgctccctg gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc | 1380 |
| accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag | 1440 |
| gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aaaagatccc | 1500 |
| aaattttggg tgcttggtgt ggttggtgga gtcttggtt gctatagctt gctagtaaca | 1560 |
| gtggccttta ttattttctg ggtgaggagt aagaggagca ggctcctgca cagtgactac | 1620 |
| | |
| atgaacatga ctccccgcg ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgcccc | 1680 |
| ccacgcgact tcgcagccta tcgtccctg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc | 1740 |
| cccgctacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag | 1800 |
| gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc cgggacctg agatgggggg aaagccgaga | 1860 |
| aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc | 1920 |
| tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac | 1980 |
| cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcatatgca ggccttgccc | 2040 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cctcgctga | 2049 |
| <210> 32 | |
| <211> 2049 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> R28d | |
| <400> 32 | |
| atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc | 60 |
| cgcgaggtag agctggtaga gtctggagga ggcttagtgc agcctggaaa gtccctgaaa | 120 |
| ctctcctgtt cagcctctgg attcacattc agtacctctg gcatgcaactg gtttcgccaa | 180 |
| gtccaggaa aggggctgga ttgggttgca tacattagta gtagcagcgg tttcgtctat | 240 |
| gcagacgtg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca atgcacagaa caccctgtac | 300 |
| ctgcaactca acagtctgaa gtctgaagac actgccatct attactgtgc aagaagcgag | 360 |
| gtgtctttct ggggccaaagg cactctggtc actgtctctt caggcagcac cagcggtctc | 420 |
| ggcaagcctg gctctggcga gggcagcaca aaggagata ttgtgttgac tcaagctcca | 480 |
| cgctctgtat ctgtcactcc tggagagtca gttccatct cctgcaggtc taataagagt | 540 |
| cgactgagta ggatgggcat cactcccttg aattgggtacc ttcagaagcc aggaaagtct | 600 |
| cctcagctcc tgatatatcg gatgtccaac ctgtccctcag gagttccaga caggtttagt | 660 |
| ggcagtgggt cagaaacaga ttttacctg aaaatcagta aggtggagac tgaggatgtt | 720 |
| ggcgtttatt actgtgcaca gtttctagaa tatcctccta cgttcggttc tgggaccaag | 780 |
| ctggagatca aacctgccga gcctaagagc cccgacaaga cccacacctg tcccccttgt | 840 |
| cctgccccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttctgttcc ccccaaagcc caaggatacc | 900 |
| ctgatgatcg cccggacccc cgaagtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac | 960 |
| cctgaggta agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag | 1020 |
| ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgttca gcgtcctcac cgtcctgcac | 1080 |
| caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc | 1140 |
| cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc | 1200 |
| ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa | 1260 |
| ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac | 1320 |
| tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctca cagcaagctc | 1380 |
| accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgtctcgt gatgcatgag | 1440 |
| gtctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aaaagatccc | 1500 |

aaattttggg tgctggtggt ggttgggtga gtcctggctt gctatagctt gctagtaaca 1560

giggccttta ttatcttctg ggtgaggagt aagaggagca ggctcctgca cagtgactac 1620

atgaacatga ctccccgcgc ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgcccc 1680

ccacgcgact tcgcagccta tcgtccctg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 1740

cccgctacc agcagggccca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 1800

gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1860

aggaagaacc ctacggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc 1920

tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 1980

cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc 2040

cctcgctga 2049

<210> 33

<211> 2037

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBB1d

<400> 33

atggatttc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc 60

cgcgagggtgc agctggtgga atctggcgga ggactggtgc agcctggcgg ctctctgaga 120

ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc agcaccagcg gcatgaactg gttcagacag 180

gccccctggca agggcctgga atgggtgtcc tacatcagca gcagctccgg cttcgtgtac 240

gccgacagcg tgaagggcgc gttcaccatc agcagagaca acgcccagaa cagcctgtac 300

ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcgag 360

gccgcctttt ggggccaggg aacactcgtg acagtgtcca gcggcagcac aagcggctct 420

ggcaaacctg gatctggcga gggcagcacc aagggcgata tcgtgctgac ccagagcccc 480

agatccctgc ctgtgacacc tggcgagcct gccagcatca gctgcagaag cagcaagagc 540

cggctgagcc ggatgggcat cccccctg aactggatc tgcagaaacc cggccagtcc 600

ccccagctgc tgatctaccg gatgagcaac agagccagcg gcgtgccga tagattttcc 660

ggctctggaa gcggcaccca cttcacctg aagatcagca aggtggaaac cgaggacgtg 720

ggcgtgtact attgcgcccc gttcctggaa tccccccca cctttggcag cggcaccaag 780

ctggaaatca agcccgccga gcccaagagc ccgcacaaga cccatacctg ccctccatgt 840

cctgccccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc 900

ctgatgatcg cccggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat 960
 cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag 1020
 cccagagagg aacagtacaa cagcacctac cgggtggtgt ctgtgctgac cgtgctgcat 1080

caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc 1140
 cccatcgaga aaaccatctc caaggccaag ggacagcccc gcgagcccca ggtgtacaca 1200
 ctgcctccaa gcagggacga gctgaccaag aaccaggtgt ccctgacctg cctcgtgaag 1260
 ggcttctacc cctccgatat cgccgtggaa tgggagagca atggccagcc cgagaacaac 1320
 tacaagacca cccccctgt gctggacagc gacggctcat tcttctgtga cagcaagctg 1380
 acagtggaca agagccggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag 1440
 gctctgcaca accactacac ccagaagtcc ctgagcagcc tgagcccagg caagaagatc 1500

tacatctggg cccctctggc cggcacctgt ggctgtctgc tgctgtctct cgtgatcaca 1560
 ctgtactgca agcggggcag aaagaagctg ctgtacatct tcaagcagcc cttcatgcgg 1620
 cccgtgcaga ccaccagga agaggacggc tgctcctgca gattccccga ggaagaagaa 1680
 ggcggtctcg agctgctgcg cgtgaagttt tctagaagcg ccgacgcccc tgcctaccag 1740
 cagggccaga accagctgta caacagctg aacctgggca gacgggaaga gtacgacgtg 1800
 ctggataagc ggagaggccg ggaccctgag atgggcggca agcctagaag aaagaacccc 1860
 caggaaggcc tgtataacga actgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta cagcgagatc 1920

ggaatgaagg gcgagcggag aagaggcaag ggccacgatg gactgtacca gggcctgagc 1980
 accgccacca aggacacctg tgacgccctg cacatgcagg ctctgcccc cagataa 2037

<210> 34
 <211> 2052
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HBB2d
 <400> 34

atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc 60
 cgcgaggtgc agctggtgga atctggcgga ggactggtgc agcctggcgg ctctctgaga 120
 ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc agcaccagcg gcatgaactg gttcagacag 180
 gcccctggca agggcctgga atgggtgtcc tacatcagca gcagctccgg cttcgtgtac 240

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acgcccagaa cagcctgtac 300
 ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcgag 360

gccgcctttt ggggccaggg aacactcgtg acagtgtcca gcggcagcac aagcggctct 420
 ggcaaacctg gatctggcga gggcagcacc aagggcgata tcgtgctgac ccagagcccc 480
 agatccctgc ctgtgacacc tggcgagcct gccagcatca gctgcagaag cagcaagagc 540
 cggtgagcc ggatgggcat caccctctg aactgggtatc tgcagaaacc cggccagtcc 600
 cccagctgc tgatctaccg gatgagcaac agagccagcg gcgtgcccg tagattttcc 660

 ggctctggaa gcggcaccca cttcacctg aagatcagca aggtggaaac cgaggacgtg 720
 ggctgtact attgcgcca gtctctggaa tccccccca cctttggcag cggcaccaag 780
 ctggaaatca agcccgcca gcccaagagc cccgacaaga cccatactg cctccatgt 840
 cctgcccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc 900
 ctgatgatcg cccggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacaggat 960
 cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag 1020
 cccagagagg aacagtacaa cagcacctac cgggtggtgt ctgtgctgac cgtgctgcat 1080

 caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaagc cctgcctgcc 1140
 cccatcgaga aaaccatctc caaggccaag ggacagcccc gcgagcccca ggtgtacaca 1200
 ctgcctccaa gcagggacga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 1260
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1320
 tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 1380
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1440
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aaaagatccc 1500

 aaattttggg tgctgggtgt ggttgggtga gtctggctt gctatagctt gctagtaaca 1560
 gtggccttta ttattttctg ggtgaagcgg gcagaaaaga agctgctgta catcttcaag 1620
 cagcccttca tgcggccgt gcagaccacc caggaagagg acggtgctc ctgcagattc 1680
 cccgaggaag aagaaggcgg ctgcgagctg ctgagagtga agttcagcag gagcgagac 1740
 gcccccgct accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agtcaatct aggacgaaga 1800
 gaggagtacg atgttttga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 1860
 agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 1920

 gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1980
 taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg ccttcacat gcaggccctg 2040
 cccctcgt ga 2052
 <210> 35
 <211> 2175

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H28BBd

<400> 35

| | |
|----------------------------------------------------------------------|------|
| atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc | 60 |
| cgcgagggtgc agctgggtgga atctggcgga ggactgggtgc agcctggcgg ctctctgaga | 120 |
| ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc agcaccagcg gcatgaactg gttcagacag | 180 |
| gccccctggca agggcctgga atgggtgtcc tacatcagca gcagctccgg ctctgtgtac | 240 |
| gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acgcccagaa cagcctgtac | 300 |
| ctgcagatga actccctcgc ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcgag | 360 |
| gccgcctttt ggggccaggg aacactcgtg acagtgtcca gcggcagcac aagcggtctt | 420 |
| ggcaaacctg gatctggcga gggcagcacc aaggcgata tcgtgctgac ccagagcccc | 480 |
| agatccctgc ctgtgacacc tggcgagcct gccagcatca gctgcagaag cagcaagagc | 540 |
| cggctgagcc ggatgggcat caccctctg aactgggtatc tgcagaaacc cggccagtcc | 600 |
| ccccagctgc tgatctaccg gatgagcaac agagccagcg gcgtgcccga tagattttcc | 660 |
| ggctctggaa gcggcaccga cttcacctg aagatcagca aggtggaaac cgaggacgtg | 720 |
| ggcgtgtact attgcgcca gtctctggaa tccccccca cctttggcag cggcaccaag | 780 |
| ctggaaatca agcccgcca gcccaagagc cccgacaaga ccataacctg cctccatgt | 840 |
| cctgccccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc | 900 |
| ctgatgatcg cccggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacaggat | 960 |
| cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag | 1020 |
| cccagagagg aacagtacaa cagcacctac cgggtggtgt ctgtgctgac cgtgctgcat | 1080 |
| caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaagggtg ccaacaaggc cctgcctgcc | 1140 |
| cccatcgaga aaaccatctc caaggccaag ggacagcccc gcgagcccca ggtgtacaca | 1200 |
| ctgcctccaa gcagggacga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa | 1260 |
| ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac | 1320 |
| tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc | 1380 |
| accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag | 1440 |
| gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aaaagatccc | 1500 |
| aaattttggg tgctgggtgt ggttgggtgga gtccctggctt gctatagctt gctagtaaca | 1560 |
| gtggccttta ttattttctg ggtgaggagt aagaggagca ggctcctgca cagtgactac | 1620 |

atgaacatga ctccccgccg ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgcccc 1680

ccacgcgact tcgcagccta tcgtccctg aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc 1740

ttcaagcagc ctttcatgcg gcccgtgcag accaccagg aagaggacgg ctgctcctgc 1800

agattccccg aggaagaaga aggcggctgc gagctgagag tgaagttag caggagcgca 1860

gacgcccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga 1920

agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag 1980

ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg 2040

gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaagg gcacgatggc 2100

ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc 2160

ctgccccctc gctga 2175

<210> 36

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lkappa Leader d

<400> 36

atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc 60

cgc 63

<210> 37

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized VHd

<400> 37

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggtc tctgagactg 60

tcttgtgccg ccagcggtt cacttcagc accagcggca tgaactggtt cagacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtgtcctac atcagcagca gctccggtt cgtgtacgcc 180

gacagcgtga agggccggtt caccatcagc agagacaacg cccagaacag cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aagcgaggcc 300

gccttttggg gccagggaac actcgtgaca gtgtccagc 339

<210> 38

<211> 339

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Rat VHD
 <400> 38
 gaggtacagc tgggtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaagtc cctgaaactc 60
 tcctgttcag cctctggatt cacattcagt acctctggca tgcactggtt tcgccaagct 120
 ccaggaaagg ggctggattg ggttgcatac attagtagta gcagcggttt cgtctatgca 180

 gacgctgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatg cacagaacac cctgtacctg 240
 caactcaaca gtctgaagtc tgaagacact gccatctatt actgtgcaag aagcgaggct 300
 gctttctggg gccaaaggcac tctggtcact gtctcttca 339
 <210> 39
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Humanized VLd
 <400> 39
 gatatcgtgc tgaccagag cccagatcc ctgcctgtga cacctggcga gcctgccagc 60
 atcagctgca gaagcagcaa gagccggctg agccggatgg gcatcacccc cctgaactgg 120

 tatctgcaga aaccggcca gtccccccag ctgctgatct accggatgag caacagagcc 180
 agcggcgtgc ccgatagatt ttccggctct ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agcaagtggt aaaccgagga cgtgggcgtg tactattgcg ccagttcct ggaatacccc 300
 cccacctttg gcagcggcac caagctggaa atcaag 336
 <210> 40
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Rat VLd
 <400> 40
 gatattgtgt tgactcaagc tccacgtctt gtatctgtca ctcttgaga gtcagcttcc 60
 atctcctgca ggtctaataa gattcgactg agtaggatgg gcatcactcc cttgaattgg 120

 taccttcaga agccaggaaa gtctcctcag ctctgatat atcggatgtc caaccttgcc 180
 tcaggagttc cagacaggtt tagtggcagt gggtcagaaa cagattttac actgaaaatc 240

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| agtaagggtgg agactgagga tgttggcggtt tattactgtg cacagtttct agaataatcct | 300 |
| cctacgtttcg gttctgggac caagctggag atcaaa | 336 |
| <210> 41 | |
| <211> 54 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Humanized Whitlow d | |
| <400> 41 | |
| ggcagcacaa gcggctctgg caaacctgga tctggcgagg gcagcaccaa gggc | 54 |
| <210> 42 | |
| <211> 54 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Rat Whitlow d | |
| <400> 42 | |
| ggcagcacca gcggctccgg caagcctggc tctggcgagg gcagcacaaa ggga | 54 |
| <210> 43 | |
| <211> 711 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Humanized IgG1 spacer d | |
| <400> 43 | |
| cccgcgagc ccaagagccc cgacaagacc catacctgcc ctccatgtcc tgccctcca | 60 |
| gtggctggcc ctacggtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcgcc | 120 |
| cggacccttg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggatcc cgaagtgaag | 180 |
| ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa | 240 |
| cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgctgcatca ggactggctg | 300 |
| aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgctgcccc catcgagaaa | 360 |
| accatctcca aggccaaggg acagccccgc gagccccagg tgtacacact gcctccaagc | 420 |
| agggacgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc | 480 |
| agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg | 540 |
| cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag | 600 |

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcattgagc tctgcacaac 660
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaaa aagatcccaa a 711
<210> 44
<211> 711
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rat IgG1 spacer d
<400> 44
cctgcccagc ctaagagccc cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgccccctca 60
gtggctggcc ctacgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggataccct gatgatcgcc 120
cggacccccg aagtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 180

ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag 240
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccg tcctgcacca ggactggctg 300
aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 360
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 420
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 480
agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat ggcagccgg agaacaacta caagaccacg 540
cctcccgctg tggactcca cggtctcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 600

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcattgagc tctgcacaac 660
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaaa aagatcccaa a 711
<210> 45
<211> 265
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Humanized IgG1 delta spacer d
<400> 45
ccaggtgtcc ctgacctgcc tctgaagggt cttctacccc tccgatatcg ccgtggaatg 60
ggagagcaat ggccagcccc agaacaacta caagaccacc cccctgtgc tggacagcga 120
cggctcattc ttctgtaca gcaagctgac agtggacaag agccggtggc agcagggcaa 180

cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgagc tctgcacaac cactacccc agaagtcct 240
gagcagcctg agcccaggca agaag 265
<210> 46

<211> 440
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Rat IgG1 delta spacer d
 <400> 46
 cctgcccagc ctaagagccc cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgccccctcca 60
 gtggctggcc ctagcgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggataccct gatgatcgcc 120
 cggacccccg aagtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 180

 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 240
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 300
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 360
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 420
 cgggatgagc tgaccaagaa 440
 <210> 47
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> transmembrane domain CD8 alpha d

 <400> 47
 atctacatct gggccccctct ggccggcacc tgtggcgtgc tgctgctgtc tctcgtgatc 60
 aactgtact gc 72
 <210> 48
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> transmembrane domain CD28 d
 <400> 48
 ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagt 60
 gcctttatta ttttctgggt g 81
 <210> 49
 <211> 126
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Co-stimulatory domain 4-1BB d

<400> 49

aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc ccttcacgag gcccggtgcag 60
accacccagg aagaggacgg ctgctcctgc agattccccg aggaagaaga aggcggctgc 120
gagctg 126

<210> 50

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Co-stimulatory domain CD28 d

<400> 50

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
gggccccacc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tccctg 126

<210> 51

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Activation domain CD3 zeta (4-1BB) d

<400> 51

ctgcgcgtga agttttctag aagcgccgac gccctgcct accagcaggg ccagaaccag 60
ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg gaagagtacg acgtgctgga taagcggaga 120
ggccgggacc ctgagatggg cggcaagcct agaagaaaga acccccagga aggcctgtat 180
aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggaat gaaggcgag 240

cggagaagag gcaagggcca cgatggactg taccagggcc tgagcaccgc caccaaggac 300

acctatgacg cctgcacat gcaggtctg cccccagat aa 342

<210> 52

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Activation domain CD3 zeta (CD28) d

<400> 52

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggccgaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctga 339

<210> 53

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hHC

<400> 53

gaggtgcagc tggtagagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgaggctg 60

agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc accagcggca tgaactggtt caggcaggcc 120

cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcagcagca gcagcggctt cgtgtacgcc 180

gacagcgtga agggcaggtt caccatcagc agggacaacg ccgagaacag cctgtacctg 240

cagatgaaca gcctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag gagcagggcc 300

gccttctggg gccagggcac cctggtgacc gtg 333

<210> 54

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hLC

<400> 54

gacatcgtgc tgaccagag ccccccagc ctgcccgtga ccccggcga gcccgccagc 60

atcagctgca ggtcctccaa gtccaggctg agcaggatgg gcatcacc cctgaactgg 120

tacctgcaga agcccgcca gagccccag ctgctgatct acaggatgag caacagggcc 180

agcggcgtgc ccgacaggtt cagcggcagc ggagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240

agcaaggtgg agaccgagga cgtgggcgtg tactactgcg ccagttcct ggagtacccc 300

cccaccttcg gcagcggcac caagctggag atcaag 336