



등록특허 10-2497013



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월20일
(11) 등록번호 10-2497013
(24) 등록일자 2023년02월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61P 37/00 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7038249
- (22) 출원일자(국제) 2017년06월07일
심사청구일자 2020년06월04일
- (85) 번역문제출일자 2018년12월31일
- (65) 공개번호 10-2019-0015733
- (43) 공개일자 2019년02월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/063862
- (87) 국제공개번호 WO 2017/211900
국제공개일자 2017년12월14일
- (30) 우선권주장
16173401.7 2016년06월07일
유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문현

WO2015158671 A1*

WO2015166073 A1*

WO2016014565 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

전체 청구항 수 : 총 25 항

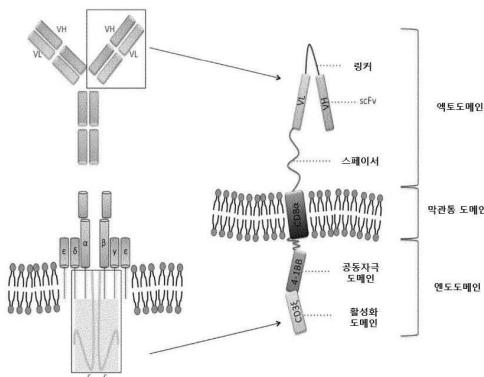
심사관 : 고일영

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

(57) 요약

본 발명은 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)에 관한 것으로, 상기 CAR은 B 세포 성숙 항원(BCMA) 폴리펩티드를 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인을 포함한다. 상기 CAR은 바람직하게는 인간 BCMA의 N-말단 잔기의 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프에 결합한다. 본 발명

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

은 또한 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산 분자, 본 발명의 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 면역 세포, 바람직하게는 T 세포 및 혈장 세포, 기억 B 세포 및/또는 성숙한 B 세포의 질병, 특히 다발성 골수종, 비-호지킨 림프종 또는 자가항체-의존성 자가 면역 질환과 같은 병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료에서의 상기 세포의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 37/00 (2018.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자

블루홀, 줄리아

독일 10247 베를린 허브너스트라서 4

어커르트, 울프강

독일 13125 베를린 스트라서 45 엔알. 28

키백, 엘리사

독일 10405 베를린 윈즈스트라. 61

마리노, 스테판

독일 10965 베를린 카츠바크스트라서 3

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드로, 상기 CAR은

- i. B 세포 성숙 항원(BCMA) 폴리펩티드를 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인,
- ii. 막 횡단 도메인, 및
- iii. 세포 내 도메인을 포함하고.

상기 항원-결합 도메인은 가변 중쇄(VH)를 포함하고, 상기 VH는

- SEQ ID NO. 34의 서열(RYW₁S)을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(H-CDR1), 여기서 X₁: I, F 또는 M임,
- SEQ ID NO. 53의 50-67번 아미노산 서열(EINPZ₂SSTINYAPSLKX₁₁X₁₂)을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(H-CDR2), 여기서 Z₂은 S, N, 또는 D이고; X₁₁은 D 또는 G이고; 및 X₁₂은 K 또는 R임, 및
- SEQ ID NO. 36의 서열(SLYX₄DYGDA₅DY₆)을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(H-CDR3), 여기서 X₄는 Y이고, 및 X₅는 Y 또는 M임,를 포함하고; 및

상기 항원-결합 도메인은 가변 경쇄(VL)를 포함하고, 상기 VL은

- SEQ ID NO. 37의 서열(KASQSVX₁X₂NVA)을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(L-CDR1), 여기서 X₁X₂은 ES 또는 DS임,
- SEQ ID NO. 29의 서열(SASLRFS)을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(L-CDR2) 및
- SEQ ID NO. 30의 서열(QQYNNYPLTFG)을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(L-CDR3)을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CAR은 SEQ ID NO. 32에 따른 인간 BCMA의 N-말단의 잔기 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프에 결합하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항원-결합 도메인은

- i. H-CDR1: RYWFS (SEQ ID NO. 25), RYWIS 또는 RYWMS,
- ii. H-CDR2: EINPSSSTINYAPSLKDK (SEQ ID NO. 26), EINPNSSTINYAPSLKDK 또는 EINPDSSSTINYAPSLKDK,
- iii. H-CDR3: SLYYDYGDAYDYW (SEQ ID NO. 27) 또는 SLYYDYGDAMDYW,
- iv. L-CDR1: KASQSVESNVA (SEQ ID NO. 28) 또는 KASQSVDSNVA,
- v. L-CDR2: SASLRFS (SEQ ID NO. 29) 및
- vi. L-CDR3: QQYNNYPLTFG (SEQ ID NO. 30)의 서열을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항원-결합 도메인은

SEQ ID NO. 11과 70% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인; 및

SEQ ID NO. 12와 70% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서,

SEQ ID NO. 11의 적어도 W33, E50, L99, Y100, Y101 및 A106 또는 적어도 SEQ ID NO. 25-27의 CDR 서열, 및

SEQ ID NO. 12의 적어도 S31, A34, F49 또는 Y49, S50, L53, F55, S67, Q89, Y91, Y94 및 L96 또는 적어도 SEQ ID NO. 28-30의 CDR 서열을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 6

제4항에 있어서,

각각 SEQ ID NO. 11 및 SEQ ID NO. 12에 따른 VH 및 VL 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 CAR이 유전적으로 변형된 면역 세포에서 발현되는 경우, 상기 면역 세포는 상기 CAR을 통해 비-호지킨 림프종(B-NHL)의 표면 상의 BCMA에 결합하고 활성화되고, 이에 의해 상기 B-NHL에 대한 세포독성(cytotoxic) 활성을 유도하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 B-NHL은 JeKo-1, DOHH-2, SU-DHL4, JVM-3 또는 MEC-1 세포주인, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 세포 외 항원 결합 도메인은 VH 및 VL 도메인 사이에 위치된 링커 폴리펩티드를 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 링커는 Whitlow 링커 또는 Gly-Ser 링커, 또는 SEQ ID NO. 13 또는 14와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 링커로부터 선택되는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 세포 외 항원-결합 도메인과 막 횡단 도메인 사이에 위치한 스페이서 폴리펩티드를 포함하며, 상기 스페이서는

- a. IgG1-CD28 스페이서 (SEQ ID NO. 15;
PAEPKSPDKTHTCPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPQREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKK)
- b. IgG1 Δ-4-1BB 스페이서 (SEQ ID NO. 16;
PAEPKSPDKTHTCPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPQREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGKK)
- c. IgG4 (Hi-CH2-CH3) 스페이서 (SEQ ID NO. 17;
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISAKGQPQREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK)
- d. IgG4 (Hi) 스페이서 (SEQ ID NO. 19; ESKYGPPCPPCP), 및
- f. SEQ ID NO. 15 내지 19 중 어느 하나와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 스페이서로 구성된 군으로부터 선택되는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 막 횡단 도메인은 CD8 α 막 횡단 도메인, CD28 막 횡단 도메인 및 SEQ ID NO. 20 또는 21과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 막 횡단 도메인으로 구성된 군으로부터 선택되는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 세포 내 도메인은 4-1BB 공동-자극 신호 도메인 또는 CD28 공동-자극 신호 도메인 및 SEQ ID NO. 22 또는 23과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 공동-자극 신호 도메인으로부터 선택된 공동-자극 신호 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 14

제1항에 있어서,

CD3zeta의 신호전달 도메인 또는 SEQ ID NO. 24와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 신호전달 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 15

제1항에 있어서,

탠덤(tandem) 공동-자극 신호 도메인을 포함하고, 4-1BB 및 CD28 공동-자극 도메인, 및 CD3제타 신호/활성 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 16

제1항에 따른 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 17

제16항에 따른 핵산 분자를 포함하고 제1항에 따른 CAR을 발현하는, 세포.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 세포는 상기 CAR의 BCMA 결합에 반응하여 세포 내 도메인에 의한 신호 전달을 통해 활성화되는, 세포.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 세포는 T 림프구 및 NK 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 T 림프구는 세포 독성 T 림프구인, 세포.

청구항 21

병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료를 위한 제17항에 따른 세포를 포함하는 약학적 조성물로, 상기 의학적 장애가 B 세포의 암인 약학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 의학적 장애는 다발성 골수종(multiple myeloma)인, 약학적 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서,

상기 의학적 장애는 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)인, 약학적 조성물.

청구항 24

병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료를 위한 제17항에 따른 세포를 포함하는 약학적 조성물로, 상기 의학적 장애는 자가항체-의존성 자가면역 질환(autoantibody-dependent autoimmune disease)인 약학적 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 의학적 장애는 전신홍반루프스(systemic lupus erythematosus, SLE) 또는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)인, 약학적 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)에 관한 것으로, 상기 CAR은 B 세포 성숙 항원(BCMA) 폴리펩티드를 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인을 포함한다. 상기 CAR은 바람직하게는 인간 BCMA의 N-말단 잔기의 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프에 결합한다. 본 발명은 또한 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산 분자, 본 발명의 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 면역 세포, 바람직하게는 T 세포 및 혈장 세포, 기억 B 세포 및/또는 성숙한 B 세포의 질병, 특히 다발성 골수종, 비-호지킨 림프종 또는 자가항체-의존성 자가 면역 질환과 같은 병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료에서의 상기 세포의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

암 면역 요법에서, 종양 특이적 또는 종양 관련 항원을 인식하기 위해 유전적으로 변형된 T 세포(ATT)의 입양 전이(adoptive transfer)는 종양 및 종양 줄기세포를 근절하기 위한 유망한 접근법이다. 따라서 전통적인 화학 요법, 방사선 요법 및 수술 요법과 달리 종양의 재발을 피할 수 있다. 또한, 신규한 경로-선별 약물은 종종 우수한 종양 조절을 가능하게 하며, 그러나 질환 과정은 일반적으로 명확한 종양 제거 없이 만성 단계로 전환된다.

[0003]

환자가 심하게 전 처리되었고 이전에 여러 라인의 화학 요법, 항체 요법 또는 자가/동종이계 골수 이식을 받았다는 사실에도 불구하고 CARs를 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포의 출현은 B 세포 림프종/백혈병 치료에서 엄청난 성공을 거두었다. 따라서 CAR-T 세포를 가진 ATT는 구제 요법(salvage therapy)으로 성공적으로 사용되었다.

[0004]

CAR은 MHC 독립적인 방식으로 표면 항원을 인식할 수 있는 합성, 조작된 면역 글로불린 유도 수용체이다. TCR과는 달리, CAR은 반드시 교차 반응성을 나타낼 필요없이 표적 항원과 결합할 수 있는 보다 광범위한 친화성을 갖는다. 표적 항원은 표면에 침착되어야 하며 종양-관련 단백질, 탄수화물 또는 심지어 당 지질을 포함할 수 있다. CAR-T 세포의 또 다른 장점은 자가 T 세포의 형질 도입에 의한 신속한 생성으로, 이는 CD4+ 또는 CD8+ 기

원이 될 수 있다. CAR은 "기성품"으로 생산될 수 있으며, CD19+ B 세포 백혈병 및 림프종의 경우와 같이 정의된 종양 개체에서 일반적으로 표적이 광범위하게(>90%) 발현된다. CAR T 세포는 단일 T 세포 주입 후에도 유지될 수 있는 "살아있는 약물"로 작용한다고 제안되어 왔다.

[0005] 본원에 기재된 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)-T 세포 제품에 대해 강한 의학적 요구가 존재한다. 첫째, 다발성 골수종은 악성 형질 전환된 플라스마 세포 클론으로부터 유래한 난치성 B 세포 비-호지킨 림프종(B cell non-Hodgkin lymphoma, B-NHL)이다. 특이하게 종양 세포는 주로 골수에 국한된다. 이 질환은 뼈 및 골수 중에서 가장 흔한 종양으로 강하게 치료받는 젊은 환자 중 10년 생존율이 50%이며 매년 암으로 인한 사망자의 2%를 차지한다. 발병률은 5/100.000이며, 진단시 평균 연령은 70세이며, 집중 및 장기간 지속하는 화학 요법을 배제한 많은 환자에서 공존질환(co-morbidities)이 존재함을 나타낸다. 치료 기준은 화학 요법으로 단독 또는 자가 줄기세포 이식, 면역조절 약물, 국부 조사, 프로테아좀 억제제와 병용 투여되며 소수의 환자에게 동종이계(allogeneic) 줄기세포 이식이 가능하다. 앞서 언급한 양식으로 집중 치료에도 불구하고, 상기 질병은 일반적으로 재발하고 여러 치료법 후에 2차 저항이 발생한다.

[0006] 둘째, 훨씬 더 큰 고전적인 B-NHL 그룹에는 DLBCL(diffuse large B cell lymphoma), FL(follicular lymphoma), 및 CLL(chronic lymphocytic leukemia)의 서브그룹과 같은 일반적으로 이차 림프 기관이 존재하는 B 림프구에서 유래한 종양의 다양한 개체가 포함되어 있다. 모든 NHL의 총 발병률은 약 10-12/100.000(>85% B 세포의 기원)이지만, 노인층에서 실질적으로 증가와 함께 대부분이 성인의 질병이다. 인구 통계학적 발전은 서구 사회의 고령화로 인해 총 숫자가 증가할 것으로 예측한다. 임상적으로, B-NHL은 이종(heterogenous)이며 공격적이고 무통성 경과(indolent course)로 구별될 수 있다. B-NHL의 치료에서 지난 15년 동안 상당한 진전이 있었지만, 치료 기준은 단독 또는 자가 줄기세포 이식, 면역 조절 약물, 방사선 조사, 프로테아좀 억제제, 신호 전달 억제제와 병용하는 항체/화학 요법을 병합하며 소수의 환자에게는 동종이계 줄기세포 이식이 적용된다. 많은 B-NHL 개체에서 진단 당시의 평균 연령은 55-60세 이상이므로, 강렬하고 확장된 화학 요법 또는 심지어 동종이계 골수 이식을 배제하는 공존질환이 존재한다.

[0007] 림프종 B 세포에서 광범위하게 발현되는 CD19 항원을 표적으로 하는 양성 CAR-T 세포 요법의 출현으로 이러한 한계를 극복할 수 있었고, B-NHL 및 B-ALL의 치료를 위해 약 20건의 CD19 CAR-T 세포 연구가 FDA에 등록되어 있다. 2011년 CLL과 2013년 B-ALL에 대한 임상 시험에서 주요한 돌파구가 이미 달성되었지만, 독일에서 동일한 CD19 CAR-제품을 사용하는 것에 대한 발명가의 최선의 지식에 대한 이해는 아주 최근에 생물의학 회사에 의해서만 부여되었다. 다른 EU국가(예: 오스트리아)에서는 CD19 CAR T 세포를 이용한 임상 시험도 진행 중이다. 더욱 중요한 것은, 항-CD19 항체 또는 CAR-T 세포 치료에서 B-NHL에 대한 저항성은 항원 소실로 인해 발생한다는 것이다. 치료 저항성은 여러 라인의 화학 요법/면역 요법 후에 관찰되기 때문에 다른 표적 구조가 시급히 보장된다.

[0008] 정후(indication) 다발성 골수종의 경우, 2가지 항 BCMA-CAR 제품이 이전에 기술되어 임상 1상 시험에 진입했다. 이 연구는 B-NHL에 대한 BCMA CAR의 적용 가능성을 입증하지 못했다. B-NHL에 관해서, 항-BCMA 표적 치료는 가능한 대안을 나타내며, 특히 항-CD19 CAR이 실패한 경우에 유용하다. 임상 시험에서 시험 되고 다발성 골수종을 대상으로 하는 기타 면역요법 전략은 항-CD19 CAR, NY-ES01 및 MAGE-A1-지시된, TCR-형질 전환 T 세포이다. 종양 표적과 같은 BCMA와는 대조적으로, 대상 환자의 빈도는 훨씬 낮다. 왜냐하면, 이들 표적 항원이 이 경우의 10% 미만으로 발현되기 때문이다. 다른 표적 치료에는 항-CD38 및 항-SLAMF7 항체를 포함하고, 이 치료법은 항체가 자립하지 않고 기억을 형성하지 않으며 우리의 지식에 따라 아직 충분한 종양 박멸을 중재하지 못하기 때문에 개념적으로 완전히 다른 것이다.

[0009] 또한, 특이적으로 형질 세포를 표적으로 하는 능력은 자가 면역 질환의 치료에 큰 도움이 될 것이다. 경증의 자가 면역 질환은 대개 NSAID(nonsteroidal anti-inflammatory drugs) 또는 DMARD(disease-modifying anti-rheumatic drugs)로 치료됩니다. 활동성 질환으로 인한 장기 기능 장애를 수반하는 SLE(Systemic Lupus Erythematosus)의 더 심한 형태는 사이클린 세포를 표적으로 하는 세포 독성 물질인 시클로포스파미드와 같은 강력한 면역 억제제와 함께 스테로이드로 치료된다.

[0010] 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. 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, 리툭시맙, 토실리주맙 등이 뒤를 이었다; 그

들은 염증과 과괴에 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).

[0011] 최근에만 CAR-T 세포가 자가 항체 매개 질환을 치료하기 위한 목표 접근법으로 논의되었다(Ellebrecht et al. (2016) *Science* 353 : 179-184). 골수에서 생존 틈새(survival niche)에 거주하는 수명이 길고 고착된 형질 세포는 기존의 면역 억제 및 세포 독성 약물뿐만 아니라 B 세포 및 그 활성화를 목표로 하는 치료법에 종종 내성이 있다. 특히, 리툭시맙은 표적 항원 CD20이 형질 세포에서 발현되지 않기 때문에 그러한 치료에는 적합하지 않은 것처럼 보인다. 이 치료 과제는 BCMA가 수명이 긴 형질 세포에서 발현됨에 따라 항-BCMA CAR-T 세포 구조물(구조물)을 사용함으로써 충족될 수 있다.

[0012] 현재, 다수의 다른 항-BCMA CAR 구조물이 당업계에 개시되어 있다. 2013년 James N. Kochenderfer 그룹은 *in vitro* 분석 및 마우스 테스트를 이용한 전임상 연구인 항-BCMA CAR로 형질 도입된 첫 번째 T 세포 접근법을 발표했다(Carpenter et al., 2013; *Clin Cancer Res*; 19 (8), 2048-2060). 2015년 6월, Bluebird Bio와 Celgene은 BCMA CAR-T 세포 치료법 개발에 집중하기로 하였다. 1단계 임상 시험 등록은 다발성 골수종 환자에게 2016년 1월에 시작되었다. 2016년 초, 펜실베이니아 대학의 Abramson Cancer Center는 다발성 골수종 환자의 치료에 항-BCMA CAR로 형질 도입된 T 세포를 사용하는 1단계 연구에 참가자 모집을 시작했다(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02546167). BCMA에 관한 CAR은 WO 2016/014789, WO 2016/014565 및 WO 2013/154760에 기재되어 있다. WO 2015/128653은 또한 BCMA에 결합하는 CAR 서열을 개시하는데, 여기서 에피토프 인식을 담당하는 CAR의 부분은 APRIL 리간드의 변이체이고, 이는 야생형 APRIL에 비해 BCMA에 대한 결합이 개선되었음을 보여준다. 대안적인 치료 전략은 항-CD38 CAR에 관한 것이다. BCMA-결합 항체는 WO 2015/166073 및 WO 2014/068079에 개시되어 있다.

[0013] 다수의 잠재적 대체 요법이 개발 중에 있지만, 병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애, 특히 다발성 골수종, 비-호지킨 림프종 또는 자가 항체-의존성 자가 면역 질환을 다루기 위한 효과적인 수단을 제공하는데 있어 상당한 필요성이 남아있다.

발명의 내용

[0014] 선행 기술에 비추어 본 발명의 기술적 문제는 병원성 B 세포와 관련된 질병을 치료하기에 적합한 약제를 제공하는 것이다.

[0015] 이 문제는 독립항의 특징에 의해 해결된다. 본 발명의 바람직한 실시 예는 종속 항에 의해 제공된다.

[0016] 따라서, 본 발명은 분리된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드로서, 상기 CAR은

[0017] i. B 세포 성숙 항원(BCMA) 폴리펩티드를 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 항원-결합 도메인,

[0018] ii. 막 횡단 도메인, 및

[0019] iii. 세포 내 도메인을 포함하고.

[0020] 상기 CAR은 인간 BCMA의 N-말단 잔기의 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0021] 따라서, 본 발명은 본 발명의 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 면역 세포, 바람직하게는 T 세포 및 병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료에서의 상기 세포의 용도에 관한 것이다.

[0022] 따라서, 본 발명은 성숙한 B-NHL 및 다발성 골수종의 별개의 단계를 치료하기 위한 항-BCMA CAR을 포함하는 이식에 적합한 바람직하게는 자가(autologous) T 세포를 제공한다. 본 발명의 면역 요법 접근의 바람직한 실시 예에서, 환자-유래 T 세포는 바람직하게는 레트로바이러스로 형질 도입되고, 세포 외 항체-유래 항원 인식 부분으로 구성되고, 막 횡단면에 융합되고, 세포 내 신호 전달 영역이 뒤따르는, 본원에 기술된 인공 면역 수용체를 발현시킨다. 본원에 기재된 구조물은 형질 전환된 T 세포에 항-종양 세포 용해 능력(cytolytic capacity)을 부여한다.

[0023] 다른 임상 CAR-T 세포 전달에 대해 나타낸 바와 같이, 본 발명은 본원에 기재된 CAR에 기초한 항-BCMA CAR-T 세포는 예측 가능하고, 견딜 수 있고 관리 가능한 부작용을 갖는 것을 특징으로 한다. 본원에 기재된 BCMA CAR-T 세포의 전임상 시험은 종양-관련 항원 BCMA에 대한 선택성을 나타낸다. 항-BCMA CAR을 포함하는 T 세포는 높은 친화도 및 결합력을 가지며, 정상적인 조혈 세포를 보존하면서 다발성 골수종 세포를 인식하고 파괴한다. 바람직한 실시 예에서, 자가 T 세포의 이식은 이식편대 숙주 질환의 가능성을 방지한다. 기억 CAR-T 세포 형성은 재

발 예방에 중요하며, 잠재적으로 발전할 수 있다.

- [0024] 본원에 기재된 항-BCMA CAR-T 세포의 높은 친화도 및 결합력 때문에, 낮은 BCMA-발현 성숙 B-NHL조차도 T 세포 활성화 및 종양 세포 사멸을 허용할 수 있다.
- [0025] 바람직한 실시 예에서, 이러한 성숙한 B-NHL 개체는 FL(소포성 림프종), DLBCL(광범위 큰 B-세포 림프종), 외투 세포 림프종(MCL) 및 CLL(만성 림프구성 백혈병)의 특정 단계를 포함한다.
- [0026] 본원에 기재된 CAR의 항원 인식 부분은 바람직하게는 WO/2015/166073에 기술된 인간화 항체에 기초한다. 본원에 기재된 항체를 사용하여 BCMA에 대한 높은 친화도 및 특이성을 유지하는 다수의 CAR 구조물을 제조하였다. 높은 친화도 및 특이성은 off-target 반응성의 감소를 가능하게 하여 다른 BCMA CAR 구조물에 비해 장점을 제공한다. 매우 낮은 양의 BCMA 항원을 발현하는 B 세포를 표적으로 하기 위해 본래의 항체의 높은 특이성 및 친화도가 CAR에서 유지될 수 있다는 놀라운 결과였다.
- [0027] 본 발명의 CAR은 바람직하게는 BCMA의 N-말단의 잔기 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프에 결합한다. 다른 실시 예에서, BCMA의 다른 에피토프, 특히 BCMA의 N-말단에 대한 결합이 또한 가능하다.
- [0028] 본 발명은 또한 다양한 신호전달 도메인을 포함한다. 신호 전달 도메인의 교환은 강력하고 빠른 이펙터 단계(CD28 공동-자극 영역) 또는 T 세포 메모리 접단(4-1BB 신호 영역)에 의해 확보된 오래 지속하는 재발 제어에 대한 요구를 충족시킨다. 본원에 설명된 바와 같이, 다양한 신호전달 도메인은 다수의 구성으로 교환될 수 있어 유리한 결합 특성의 손실없이 CAR 설계에 유연성을 제공한다.
- [0029] 본원에 기재된 항-BCMA CAR-T 세포 생성물은 독특한 특성을 특징으로 한다. CAR-T 세포 구조물의 세포 외 도메인의 낮은 나노몰 친화력으로 인해, 본원에 기재된 바와 같은 항-BCMA CAR은 타의 추종을 불허하는 높은 친화도를 가지며 T 세포에 매우 높은 특이성 및 결합력을 부여한다. 이러한 특성은 CAR-T 세포가 높은 및 놀랍게도 낮은 BCMA 표면 발명에 대해 i) 인식, ii) 활성화 및 iii) 종양 표적 세포를 죽일 수 있게 한다.
- [0030] 종양 세포 표면에서 발현되는 BCMA 항원의 수는 Quantibrite beads(Becton Dickinson)와 함께 형광 염료에 결합된 항 BCMA 항체를 사용하여 정량화할 수 있다. 종양 세포 표면에 발현되는 BCMA 항원을 정량하기 위해 적용되는 선호되는 방법은 "형광 활성 세포 선별/세포 분석"(FACS)이다. 비드의 형광 강도는 세포에 결합된 형광 항체의 수와 정확하게 관련이 있으며, 이는 세포 상의 BCMA 분자 수에 대한 척도이다. 골수종 세포-관련 형광 밀도는 일반적으로 저 형광 B-NHL 세포에 비해 적어도 2 ~ 3 \log_{10} 배 더 높으며 BCMA 항원 밀도는 최소 2 ~ 3 \log_{10} 배 범위에서 변화할 수 있음을 보여준다.
- [0031] 경쟁하는 항-BCMA CAR 중 어느 것도 다발성 골수종 세포 이외의 B-NHL 또는 아주 드문 경우인 베키트 림프종(Burkitt-lymphoma)에 대한 반응성을 입증하지 못했다. 따라서, 항-BCMA CAR은 전례 없는 B-NHL의 다양성에 대한 반응성을 나타낸다. 이러한 특성은 CAR-T 요법과 관련하여 예기치 못한 놀라운 효과를 나타낸다. 당업자의 통상적인 기대는 CAR-T 표적화를 가능하게 하기 위해 다수의 표적 항원을 발현해야 한다. 본 발명의 CAR을 사용하는 CAR-Ts는 표적 항원의 발현 수준이 낮은 B 세포에 대한 전례 없는 활성을 나타낸다.
- [0032] 바람직한 실시 예에서, MP71-벡터 및 감마-레트로바이러스 발현 시스템과 조합하여, 인간 T 세포에 대한 비정상적으로 높은 형질 도입율이 달성될 수 있다.
- [0033] CAR에 결합된 BCMA 에피토프에 관한 바람직한 실시 예
- [0034] 본 발명의 CAR은 바람직하게는 인간 BCMA의 N-말단 잔기의 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프에 관한 것이다. CD269의 잔기의 13 내지 32의 아미노산 서열을 SEQ ID NO. 33에 나타내었다. CD269의 N-말단 서열은 SEQ ID NO. 32에 제공된다. CD269의 세포 외 도메인은 SEQ ID NO. 31로 제공된다.
- [0035] SEQ ID NO. 31에 따른 CD269의 세포 외 도메인을 포함하는 항원을 본원 및 본 발명의 CAR 포맷에서 사용하기 위해 수정된 이전(WO2014/068079)에 기재된 마우스 및 키메라 항체의 결합 특이성을 생성하기 위한 백신 접종에 사용하였다. 항체 생성 동안 항원으로서 막 결합 도메인 또는 세포 내 도메인을 포함하는 전체 CD269 단백질 또는 그의 단편의 사용은 CD269의 은폐 또는 세포 내 도메인에 결합하는 항체를 생성할 수 있고, 따라서 상기 제제를 치료적 적용에 부적당하거나 불리하게 만든다. 따라서, 본 발명의 CAR은 CD269의 세포 외 부분에 결합함으로써 정의된다. 세포 외 도메인 내의 특정 에피토프는 또한 본 발명의 바람직한 신규하고 예기치 못한 특징을 나타낸다.
- [0036] 본 발명의 CAR로부터 유도된 마우스 또는 키메라 항체로부터 제조된 Fab 단편은 정제된 BCMA 세포 외 도메인과

복합체로 결정화되고 복합체 구조가 해결되었다. 상기 구조 분석은 본 발명의 항체/CAR의 결합 영역의 에피토프 및 그의 생물학적 관련성에 대한 상세한 정보를 나타내었다. 본 발명의 항체에 의한 세포 외 도메인의 BCMA의 잔기 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프의 결합은 그것의 높은 결합 특이성 및 세포 외 위치 때문에 유리한 성질이다. 발명자에 대한 지식으로, 이 영역을 결합하는 CAR는 이전에 기술되지 않았다.

[0037] 일 실시 예에서, 본 발명의 CAR은 상기 CAR이 CD269(BCMA)의 아미노산 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 또는 32 중 하나 이상을 포함하는 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 한다. 다른 실시 예에서, 본 발명의 CAR은 상기 항체가 CD269(BCMA)의 아미노산 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 및 32로 이루어진 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 한다. 이러한 잔기는 본원에 제공된 결정 구조 데이터에 의해 확인된 바와 같이, 본 발명의 항체와 직접 상호 작용하는 아미노산을 나타낸다. 이를 잔기의 번호는 인간 BCMA의 N-말단 서열을 제공하는 SEQ ID NO. 32에 대해 수행되었다.

[0038] 이전에 개시된 바와 같이, 본 발명의 CAR이 유도된 항체의 친화력을 놀랍게도 높고 종래 기술에서 시도된 유사한 접근법보다 비교적 우수하다. 따라서, 본 발명의 CAR은 다른 항-BCMA CAR 분자에서 볼 수 없는 높은 친화도에 의해 정의된다. pM 범위의 K_d (아래 참조)는 일반적인 관행에서 예상되지 않는 탁월한 친화성으로 일반적으로 받아 들여진다.

[0039] 다른 양태에서, 본 발명의 CAR이 유래한 인간화 항체 또는 항체 단편은 예를 들어 Biacore와 같은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정될 때, BCMA를 고친화성으로 결합시키며, 상기 항체는 100nM, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30nM 또는 이하, 또는 20nM 또는 이하의 친화도, 15nM의 친화도 또는 이하, 또는 5nM의 친화도 또는 이하, 또는 1000pM의 친화도 또는 이하, 또는 500pM의 친화도 또는 이하, 또는 100pM의 친화도 또는 이하, 또는 80pM 또는 이하, 또는 예를 들어 약 50pM의 친화도와 함께 인간 BCMA에 결합한다. 따라서, 본 발명의 CAR은 상응하는 친화도를 나타낸다.

[0040] 추가의 실시 예에서, Biacore와 같은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정될 때, 본 발명의 CAR이 유도된 항체는 약 1pM 내지 약 100nM 사이, 또는 약 100pM 내지 약 50nM 사이, 또는 약 200pM 내지 약 20nM 사이 및 약 20nM의 인간 CD269에 결합한다. 따라서, 본 발명의 CAR은 상응하는 친화도를 나타낸다.

[0041] 일 실시 예에서, 본 발명의 CAR 및/또는 CAR-T는 상기 CAR가 BCMA를 발현하는 세포에 결합하는 것을 특징으로 하고, 상기 BCMA는 세포 표면에서 검출 가능하고, BCMA는 다발성 골수종 세포와 비교하여, 바람직하게는 본원 실시 예에서 사용된 다중 골수종 세포주와 비교하여 세포 표면에 1-4 \log_{10} -배, 바람직하게는 2-3 \log_{10} -배 존재 한다. 그러한 세포의 예는 DOHH-2, SU-DHL4, JEKO-1, JVM-3 및/또는 MEC-1 세포주와 같은 비-호지킨 림프종(B-NHL) 세포이다.

CAR 서열에 관한 바람직한 실시 예:

[0043] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 항원-결합 도메인이 가변 중쇄(VH)를 포함하고, 상기 VH는

[0044] - SEQ ID NO. 1 (GFTFSRYW)과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (H-CDR1),

[0045] - SEQ ID NO. 2 (INPSSSTI)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (H-CDR2), 및

[0046] - SEQ ID NO. 3 (ASLYYDYGDAYDY)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (H-CDR3)를 포함하고, 및

[0047] 가변 경쇄(VL)를 포함하고, 상기 VL은

[0048] - SEQ ID NO. 4 (QSVESN)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (L-CDR1),

[0049] - SEQ ID NO. 5 (SAS)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (L-CDR2) 및

[0050] - SEQ ID NO. 6 (QQYNNYPLT)과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (L-CDR3)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0051] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 항원-결합 도메인이 가변 중쇄(VH)를 포함하고, 상기 VH는

[0052] - SEQ ID NO. 25 (RYWFS)과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (H-CDR1),

- [0053] - SEQ ID NO. 26 (EINPSSSTINYAPSLKDK)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (H-CDR2), 및
- [0054] - SEQ ID NO. 27 (SLYYDYGDAYDYW)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (H-CDR3)를 포함하고, 및
- [0055] 가변 경쇄(VL)를 포함하고, 상기 VL은
- [0056] - SEQ ID NO. 28 (KASQSVESNVA)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (L-CDR1),
- [0057] - SEQ ID NO. 29 (SASLRFS)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (L-CDR2) 및
- [0058] - SEQ ID NO. 30 (QQYNNYPLTFG)과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (L-CDR3)을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0059] SEQ ID NO. 25-30에 상기 열거된 CDR 서열은 CDR 영역을 한정하기 위한 대안적인 매개 변수를 사용하여 수득된 실시 예를 나타내며, 예를 들어 SEQ ID NO. 1-6과 비교하여 추가적인 인접 아미노산을 포함한다.
- [0060] SEQ ID NO. 1-6 및 25-30의 CDR 서열은 또한 폴리펩티드 서열이 나열된 상기 특정 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 본 발명에 포함되도록 정의될 수 있다.
- [0061] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는
- [0062] - GFTFSRYW (H-CDR1; SEQ ID NO. 1);
- [0063] - INP₂X₃STI (H-CDR2; SEQ ID NO. 7), 여기서 X₂X₃: SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE; 및
- [0064] - ASLYX₄DYGDA₅DY (H-CDR3; SEQ ID NO. 8), 여기서 X₄: Y, L, A, V, F, I, W, 및/또는 X₅: Y, L, F, I, V, A, C의 CDR 서열을 포함하는 VH 도메인,
- [0065] 및
- [0066] - QSVX₁X₂N (L-CDR1; SEQ ID NO. 9), 여기서 X₁X₂: ES, SS, TS, QS, HS, DH;
- [0067] - SAS (L-CDR2; SEQ ID NO. 5); 및
- [0068] - QQYNNYPLTFG (L-CDR3; SEQ ID NO. 10)의 CDR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0069] 대안적인 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는
- [0070] - RYWX₁S (H-CDR1; SEQ ID NO. 34), 여기서 X₁: I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T);
- [0071] - EINP₂X₃STINYAPSLKDK (H-CDR2; SEQ ID NO. 35), 여기서 X₂X₃: SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE; 및
- [0072] - SLYX₄DYGDA₅DY (H-CDR3; SEQ ID NO. 36), 여기서 X₄: Y, L, A, V, F, I, W, 및/또는 X₅: Y, L, F, I, V, A, C의 CDR 서열을 포함하는 VH 도메인,
- [0073] 및
- [0074] - KASQSVX₁X₂NVA (L-CDR1; SEQ ID NO. 37), 여기서 X₁X₂: ES, SS, TS, QS, HS, DH;
- [0075] - SASLRFS (L-CDR2; SEQ ID NO. 29); 및
- [0076] - QQYNNYPLTFG (L-CDR3; SEQ ID NO. 30)의 CDR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0077] SEQ ID NO. 34-37에 상기 열거된 CDR 서열은 CDR 영역을 한정하기 위한 대안적인 매개 변수를 사용하여 수득된 실시 예를 나타내며, 예를 들어 SEQ ID NO. 1-6과 비교하여 추가적인 인접 아미노산을 포함한다.
- [0078] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 하기의 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [0079] - H-CDR1 : GFTFSRYW (SEQ ID NO. 1),
- [0080] - H-CDR2 : INPSSSTI (SEQ ID NO. 2),

- [0081] - H-CDR3 : ASYYYDYGDAYDY (SEQ ID NO. 3),
- [0082] - L-CDR1 : QSVESN (SEQ ID NO. 4),
- [0083] - L-CDR2 : SAS (SEQ ID NO. 5) 및
- [0084] - L-CDR3 : QQVNNYPLT (SEQ ID NO. 6).
- [0085] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는
- [0086] - H-CDR1: RYWFS (SEQ ID NO. 25),
- [0087] - H-CDR2: EINPSSSTINYAPSLKDK (SEQ ID NO. 26),
- [0088] - H-CDR3: SLYYDYGDAYDYW (SEQ ID NO. 27),
- [0089] - L-CDR1: KASQSVESNVA (SEQ ID NO. 28),
- [0090] - L-CDR2: SASLRFS (SEQ ID NO. 29), 및
- [0091] - L-CDR3: QQVNNYPLTFG (SEQ ID NO. 30)의 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0092] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 SEQ ID NO. 11(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYDYGDAYDYWGQGTLVTVSS)과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인; 및
- [0093] SEQ ID NO. 12(EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAVYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQVNNYPLTFAGTKLELK)와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0094] SEQ ID NO. 11 및 12는 바람직한 CAR의 "전장" VH 및 VL 도메인을 나타낸다. 특히 그러한 서열 변이체가 원하는 BCMA 결합 특이성(기능적으로 유사/동등)을 나타낼 때, SEQ ID NO. 11 및 12와 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열이 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0095] 일 실시 예에서, SEQ ID NO. 11 및 12의 VH 및 VL 서열, 또는 SEQ ID NO. 11 및 12와 80% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 SEQ ID NO. 11의 W36, E50, L99, Y100, Y101 및 A106을 포함하고, SEQ ID NO. 12의 S31, A34, S50, L53, Q89, Y91, Y94 및 L96을 적어도 포함한다.
- [0096] 상기 열거된 아미노산 잔기는 표적 BCMA 에피토프와 직접 상호 작용하는 것으로 알려진 것들을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO. 11 및 12와 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성 내에서 VH 및 VL에서의 서열 변이가 일어나고, 상기 VH 및 VL 도메인은 표적 에피토프와 상호 작용하는 것으로 알려진 잔기를 적어도 포함한다.
- [0097] 일 실시 예에서, SEQ ID NO. 11 및 12의 VH 및 VL 서열, 또는 SEQ ID NO. 11 및 12와 80% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 본원에 기재된 SEQ ID NO. 1, 7, 8, 9, 5 및 10의 CDR 서열, 바람직하게는 SEQ ID NO. 1 내지 6의 CDR 서열을 포함한다.
- [0098] 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO. 11 및 12와 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성 내에서 VH 및 VL에서의 서열 변이가 일어나고, 상기 VH 및 VL 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 CDR 서열을 적어도 포함한다. 상기 CDR은 본원에서 CDR로 명명된 임의의 서열, 특히 SEQ ID NO. 1-6 또는 SEQ ID NO. 25-30의 서열을 나타낼 수 있다.
- [0099] 바람직한 실시 예에서, 상기 분리된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드는 상기 CAR이 유전적으로 변형된 면역 세포, 바람직하게는 T 림프구에서 발현되는 경우, 상기 면역 세포는 상기 CAR을 통해 비-호지킨 림프종(B-NHL)의 표면상의 BCMA에 결합하고 활성화되고, 이에 의해 상기 B-NHL에 대한 세포독성(cytotoxic) 활성을 유도하는 것을 특징으로 한다.
- [0100] 바람직한 실시 예에서, 상기 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 상기 B 세포 림프종이 DOHH-2, SU-DHL4, JEKO-1, JVM-3 및/또는 MEC-1 세포주와 같은 비-호지킨 림프종(B-NHL) 세포인 것을 특징으로 한다.
- [0101] 본 발명의 CAR은 세포 표면상의 매우 낮은 수준의 BCMA조차도 CAR 결합, T 세포 활성화 및 결합된 세포에 대한 세포 독성을 유도할 수 있다는 놀라운 특성을 특징으로 한다. 이는 일반적으로 설명된 CAR에 비해 상당한 장점

을 나타낸다. 전형적으로, CAR은 CAR 및 그 후의 세포 독성 활성화를 가능하게 하기 위해 다수의 표면 항원을 필요로 한다. 따라서, 본 발명의 CAR은 당업계에 공지된 CAR에 비추어 예상하지 못한 장점과 관련된다.

[0102] 본원에 기술된 바와 같은 CAR을 생성하기 위해, 앞서 기술된 마우스, 키메라 및/또는 인간 항체의 유도체화는 몇몇 실시 예에서 이러한 장점을 제공할 수 있다. 일부 실시 예에서, 상기 BCMA 에피토프의 특징은 바람직하게는 이러한 장점을 유도한다. 다른 실시 예에서, 본원에 기술된 VH 및 VL 단편의 고친화도 및 특이성은 본 CAR의 민감성을 가능하게 한다. 그러나 이러한 특성이 항체의 더 이른 묘사에서 CAR와 조합하여 생길 것이라는 것은 의외이었다. 본원에서 제공된 특정 서열, 바람직하게는 결합에 관여하는 VL 및 VH 영역의 CDR 영역이 최소한의 BCMA 발현으로 세포에 대한 CAR-T 세포의 활성화를 가능하게 하기에 충분한 특이적 및 강한 결합을 나타내는 것은 매우 놀랍다.

[0103] 본원에 기술된 VH 및 VL 단편이 CAR에서 다중 배열로 배열될 수 있고 여전히 표적 에피토프에 대한 높은 특이성 및 높은 친화도를 유지한다는 것은 의외였다. 아래 및 도 3에서 볼 수 있듯이, 상기 CAR은 VH-VL 또는 VL-VH 배열로 링커, 헌지, 막 횡단 도메인, 공동-자극 도메인 및/또는 활성화 도메인에서의 변형과 함께 구성될 수 있고, 그 효능을 여전히 유지할 수 있다. 본 발명의 놀라운 특징은 BCMA에 대해 재지향된 CAR의 설계에서 보다 큰 융통성을 가능하게 하며, 더 이상의 개발이 필요하거나 필요하다면, 본원에 기재된 VH 및 VL 도메인에 기초하여 CAR 구조의 추가 변형 및/또는 최적화를 가능하게 한다.

인간화된 VH 및 VL 도메인에 관한 바람직한 실시 예

[0105] 본원 및 이전(WO/2015/166073)에 상세히 개시된 바와 같이, 항체 J22.9-xi의 서열은 인간 피험자에 투여를 위해 보다 양립 가능한 시약을 제공하기 위해 인간화되었다. J22.9-xi의 다양한 인간화된 서열 변이체가 생성되고 인간 및 사이노몰구스(cynomolgus) BCMA에 대한 이들의 결합 친화도 및 특이성을 시험하였다. 바람직한 실시 예에서, 본 발명의 CAR은 이들 인간화된 서열을 포함한다. 상응하는 항체로 수행된 결합 시험으로부터의 결과는 인간화된 서열이 키메라 시약 J22.9-xi의 원하는 결합 특성을 유지함을 입증한다. 하기 서열에서, 밑줄친 영역은 CDR 결정에 사용된 방법에 따른 CDR 또는 추정(putative) CDR을 나타낸다.

인간화된 VH 변이체에 관한 바람직한 실시 예

[0107] 추가 정보는 바람직하게는 본 발명의 CAR에 통합되는 인간화된 VH 및 VL 서열에 대해 아래에 제공된다.

키메라 서열:

[0109] 마우스 HC (SEQ ID NO. 38):

[0110] QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYSWMSWVRAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYDYGDAMDYWGQGTLTVSS

[0111] 마우스 HC 서열은 CD269(BCMA)의 세포 외 도메인의 에피토프에 결합할 수 있는 마우스 항체로부터 수득된 VL 및 VH 도메인을 포함하는 키메라 항체 J22.9-xi에 대해 원래 개발된 중쇄(VH)의 가변 영역을 나타내고, VL 및 VH 도메인은 각각 인간 CL 및 CH 도메인에 융합된다. 일부 실시 예에서, CAR은 HC 마우스 서열 또는 그의 CDR을 포함할 수 있다.

부분적으로 인간화된 서열:

[0113] 부분적으로 인간화된 HC (SEQ ID NO. 39):

[0114] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQAPGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAMDYWGQGTLTVSS

[0115] 부분적으로 인간화된 HC 서열은 본원에 개시된 키메라 항체와 비교하여 (아미노산 치환을 통해) 변형된 아미노산 서열을 나타내고, 그에 의해 VL 및 VH 결합 영역이 인간에 투여를 위해 보다 적합하게 되도록 그의 서열에 대하여 변형되었다.

인간화된 VH 서열:

[0117] hHC01 (SEQ ID NO. 40)

[0118] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYSWMSWVRQAPGKGLVWVGEINPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAMDYWGQGTLTVSS

[0119] 번역 후 변형 모티프의 제거로 인간화된 VH 서열:

[0120] hHC02 (SEQ ID NO. 41)

[0121] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWX₁WVVRQAPGKGLVWVGEINPX₂X₃STINYAPSLKD~~KFT~~ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYL₄X₅DYGDX₆MDYWGQGTLVTVSS

[0122] 여기서:

[0123] X₁: I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, 바람직하게는 I or F;

[0124] X₂X₃: SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, 바람직하게는 SS;

[0125] X₄: Y, L, A, V, F, I, W, 바람직하게는 Y; 및/또는

[0126] X₅: Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게는 Y;

[0127] "hHC01" 및 "hHC02" 인간화 서열은 본원에 기술된 원래의 키메라 서열 및 부분적으로 인간화된 서열 모두와 비교하여 서열 변화를 포함하는 본 CAR에 바람직한 아미노산 서열을 나타낸다.

[0128] PTM 돌연변이는 유익한 결합 특성을 유지하면서 상기 단백질로부터 잠재적으로 해로운 번역 후 변형 모티프를 제거하기 위한 것이다. hHC01 및 hHC02의 위치 1, 5, 6, 19, 27, 28, 34, 39, 46, 48, 54, 69, 84, 85, 86, 88, 93, 107 및/또는 115는 바람직하게는 원래의 키메라 서열과 비교하여 돌연변이(치환)된다. 치환의 중요성은 주로 본래 아미노산이 아니라 결과물인 아미노산과 관련이 있다. 따라서, 상기 변화는 또한 원래의 키메라 아미노산 또는 부분적으로 인간화된 서열과 같은 다른 변이체의 상응하는 아미노산으로부터 수행될 수 있다.

[0129] 하기 치환이 일부 실시 예에서 바람직하고, 키메라 서열(SEQ ID NO. 38)과 비교하여 상이하다:

[0130] - HC (VH) 서열의 아미노산 M34는 임의의 아미노산, 바람직하게는 I, L, F, V, Y, C, G, A, S, T로 치환되고;

[0131] - HC (VH) 서열의 아미노산 E46이 V로 치환되고;

[0132] - HC (VH) 서열의 아미노산 D54 및 S55는 임의의 아미노산 조합, 바람직하게는 SS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE으로 치환되고;

[0133] - HC (VH) 서열의 아미노산 Y101은 임의의 아미노산, 바람직하게는 L, A, V, F, I, W로 치환되고; 및/또는

[0134] - HC (VH) 서열의 아미노산 M107은 임의의 아미노산, 바람직하게는 L, Y, F, I, V, A, C로 치환된다.

[0135] BCMA와의 직접 상호 작용에 필요한 잔기에서 변형될 수 있는 서열:

[0136] hHC03 - BCMA와의 상호 작용에 관여하는 변형된 아미노산 (SEQ ID NO. 42):

[0137] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWX₁MX₂WVVRQAPGKGLVX₃VGX₄INPD~~S~~STINYAPSLKD~~KFT~~ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASYL₅X₆X₇DYGDX₈MDYWGQGTLVTVSS

[0138] 여기서 바람직한 아미노산은:

[0139] X₁: W, F, Y, 바람직하게 W;

[0140] X₂: S, T, N, Q, D, E, 바람직하게 S;

[0141] X₃: W, F, Y, 바람직하게 W;

[0142] X₄: E, Q, 바람직하게 E;

[0143] X₅: L, I, V, G, A, 바람직하게 L;

[0144] X₆: Y, X, 바람직하게 Y;

[0145] X₇: Y, F, L, I, V, M, 바람직하게 Y; 및/또는

[0146] X₈: A, G, V, 바람직하게 A이다.

[0147] "hHC03" 인간화된 서열은 원래의 키메라 서열 및 부분적으로 인간화된 서열 모두와 비교하여 아미노산 서열 변화를 포함하는 바람직한 아미노산 서열을 나타낸다. 이러한 서열 변화는 BCMA 표적에 결합하는 아미노산의 잠재적인 변화를 반영하기 위한 것이며, 이는 유리한 결합 특성을 유지하면서 치환될 수 있다. 치환의 중요성은 주로 본래(originating) 아미노산이 아니라 결과물인 아미노산과 관련이 있다. 따라서, 상기 변화는 또한 원래의 키메라 아미노산 또는 다른 변이체의 상응하는 아미노산으로부터 수행될 수 있다.

[0148] 예를 들어:

[0149] - HC (VH) 서열의 아미노산 W33은 W, F, Y이고;

[0150] - HC (VH) 서열의 아미노산 S35는 S, T, N, Q, D, E이고;

[0151] - HC (VH) 서열의 아미노산 W47은 W, F, Y이고;

[0152] - HC (VH) 서열의 아미노산 E50은 E, Q;

[0153] - HC (VH) 서열의 아미노산 L99는 L, I, V, G, A이고;

[0154] - HC (VH) 서열의 아미노산 Y100은 Y, X이고;

[0155] - HC (VH) 서열의 아미노산 Y101은 Y, F, L, I, V, M이고; 및/또는

[0156] - HC (VH) 서열의 아미노산 A106은 A, G, V이다.

[0157] 일반적으로, 전체적으로 프레임 워크 서열과는 독립적으로 고려될 때 인간화 동안 만들어진 CDR 영역에 대한 임의의 변화는 CDR 서열의 특징으로 간주될 수 있다. 그러한 변형된 CDR 서열은 본원에 기술된 전체 프레임 워크 영역에서 그의 컨텍스트 내에서 또는 그 컨텍스트와 독립적으로 본 발명의 특징을 정의하는 것으로 간주될 수 있다. 예를 들어, hHC01 내지 hHC03에서 밑줄로 식별된 CDR 서열은 주변 가변 영역 서열과 독립적으로 본 발명의 정의된 특징으로 간주될 수 있다.

[0158] 인간화된 HC (VH) 서열의 구체적인 예:

[0159] hHC04 (SEQ ID NO. 43):

[0160] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGEINPNSSTINYAPSLDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAYDYWGQGTLTVSS

[0161] hHC05 (SEQ ID NO. 44):

[0162] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPNSSTINYAPSLDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAYDYWGQGTLTVSS

[0163] hHC06 (SEQ ID NO. 45):

[0164] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAYDYWGQGTLTVSS

[0165] hHC07 (SEQ ID NO. 46):

[0166] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAYDYWGQGTLTVSS

[0167] 인간화된 J22.9에서 잠재적인 번역 후 변형 부위를 제거하기 위해, 중쇄 CDR2의 잔기 D54를 아스파라긴(N)으로 돌연변이시켜 N-연결된 글리코실화(예를 들어, hHC04, 05)를 위한 새로운 잠재적 변형 부위를 만들었다. N54를 포함하는 변이된 중쇄는 글리코실화될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 대응하는 IgG, J22.9-FNY는 FACS 및 ELISA에서 BCMA와 결합하고, BCMA와 복합체로 결정화되었다. 이러한 측쇄의 큰 확장이 BCMA에 대한 결합을 방해하지 않는다는 것을 놀랍고, 이러한 관찰로부터 이 위치에서 다중 및 다양한 아미노산 치환의 허용될 것이며, 잠재적으로 당 이외의 유도체화가 또한 기대될 수 있다.

[0168] 정렬(Alignments):

[0169] HC 서열 내의 다양한 치환 위치의 CLUSTAL W(1.83) 다중 서열 정렬은 도 13에서 적절한 서열 비교를 제공한다.

"일반 서열"은 HC 서열을 나타내며, 각 X는 주어진 아미노산에 대한 잠재적인 아미노산 변화를 나타낸다. 바람직한 아미노산 치환은 잠재적으로 돌연변이된 위치 각각에 대해 상술한 바와 같이 기재된 것이다.

[0170] 인간화 VL 변이체에 관한 바람직한 실시 예

[0171] 키메라 서열:

[0172] 마우스 LC (SEQ ID NO. 47):

DIVMTQSQRM**T**SVGDRVS**T**CKASQSVD**S**NVAWYQQKPRQSPKAL**I**FSASLRFSGVPARFTGSGSG**T**DFTLT**I**SNL**Q**SED**L**A**E**YFC**Q**QQYNNYPL**T**FGAGT
KLELKR

[0174] 마우스 LC 서열은 CD269(BCMA)의 세포 외 도메인의 에피토프에 결합할 수 있는 마우스 항체로부터 수득된 VL 및 VH 도메인을 포함하는 키메라 항체 J22.9-xi에 대해 원래 개발된 경쇄(VL)의 가변 영역을 나타낸다. 일부 실시 예에서, 마우스 VL 도메인 또는 이의 CDR은 본 발명의 CAR에서 사용될 수 있다.

[0175] 부분적으로 인간화된 서열:

[0176] 부분적으로 인간화된 LC (SEQ ID NO. 48):

DIVMTQSPATLSVG**D**EVTL**T**CKASQSVD**S**NVAWYQQKPG**Q**AP**K**LL**I**Y**S**DDLRFSGVPARFSGSG**T**DFTLT**I**SSL**Q**SED**F**AVYY**C**QQYNNYPL**T**FGAGT
KLELKR

[0178] 부분적으로 인간화된 LC 서열은 본원에 개시된 키메라 항체와 비교하여 (아미노산 치환을 통해) 변형된 아미노산 서열을 나타내고, 그에 의해 VL 및 VH 결합 영역이 인간에 투여를 위해 보다 적합하게 되도록 그의 서열에 대하여 변형되었다.

[0179] 인간화된 VL 서열:

[0180] hLC01 (SEQ ID NO. 49):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVD**S**NVAWYQQKPG**Q**AP**R**AL**I**Y**S**ASLRFSG**I**PARF**S**SGSG**T**EFTLT**I**SSL**Q**SED**F**AVYY**C**QQYNNYPL**T**FGAGT
KLELKR

[0182] 번역 후 변형 모티프의 제거로 인간화된 VL 서열:

[0183] hLC02 (SEQ ID NO. 50):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQS**V****X****X**NVAWYQQKPG**Q**AP**R**AL**I**Y**S**ASLRFSG**I**PARF**S**SGSG**T**EFTLT**I**SSL**Q**SED**F**AVYY**C**QQYNNYPL**T**FGAG
TKLELKR

[0185] 여기서:

[0186] X₁X₂: ES, SS, TS, QS, HS, DH, 바람직하게는 ES.

[0187] "hHC01" 및 "hHC02" 인간화 서열은 본원에 기술된 원래의 키메라 서열 및 부분적으로 인간화된 서열 모두와 비교하여 서열 변화를 포함하는 본 CAR에 바람직한 아미노산 서열을 나타낸다.

[0188] PTM 돌연변이는 유익한 결합 특성을 유지하면서 상기 단백질로부터 잠재적으로 해로운 번역 후 변형 모티프를 제거하기 위한 것이다. hHC01 및 hHC02의 위치 1, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 30, 41, 43, 45, 49, 58, 63, 70, 77, 83, 85 및/또는 87는 바람직하게는 원래의 키메라 서열과 비교하여 돌연변이(치환)된다. 치환의 중요성은 주로 본래 아미노산이 아니라 결과물인 아미노산과 관련이 있다. 따라서, 상기 변화는 또한 원래의 키메라 아미노산 또는 부분적으로 인간화된 서열과 같은 다른 변이체의 상응하는 아미노산으로부터 수행될 수 있다.

[0189] 하기 치환이 바람직하며 키메라 서열 및 부분적으로 인간화된 서열과 상이하다:

[0190] - LC (VL) 서열의 아미노산 D1이 E로 치환되고;

[0191] - LC (VL) 서열의 아미노산 V15가 P로 치환되고;

[0192] - LC (VL) 서열의 아미노산 D17이 E로 치환되고;

[0193] - LC (VL) 서열의 아미노산 V19가 A로 치환되고;

- [0194] - LC (VL) 서열의 아미노산 T22는 S로 치환되고;
- [0195] - LC (VL) 서열의 아미노산 D30 및 S31은 임의의 아미노산 조합, 바람직하게는 ES, SS, TS, QS, HS, DH로 치환되고;
- [0196] - LC (VL) 서열의 아미노산 V58은 I로 치환되고; 및/또는
- [0197] - LC (VL) 서열의 아미노산 D70이 E로 치환된다.
- [0198] BCMA와의 상호 작용에 필요한 잠기에서 CDR 결합 영역을 변형시킬 수 있는 서열:
- [0199] hLC03 - BCMA와의 상호 작용에 관여하는 변형된 아미노산 (SEQ ID NO. 51):
- [0200] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDX₁X₂VX₃WX₄QQKPGQAPRALIX₅X₆AX₇X₈RX₉SGIPARFSGSX₁₀X₁₁GTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCX₁₂QX₁₃NNX₁₄PX₁₅TFGAGTKLELKR
- [0201] 여기서 바람직한 아미노산은:
- [0202] X₁: S, H, T, N, D, Q;
- [0203] X₂: N, E, Q;
- [0204] X₃: A, G, V, S, T, L, I;
- [0205] X₄: Y, F, L, I, V, A, G;
- [0206] X₅: Y, F, L;
- [0207] X₆: S, T;
- [0208] X₇: S, T, D, N, H, E, Q;
- [0209] X₈: L, V, I, M;
- [0210] X₉: F, L, I, V, Y, M;
- [0211] X₁₀: G, X;
- [0212] X₁₁: S, X;
- [0213] X₁₂: Q, V, L, I, M;
- [0214] X₁₃: Y, F, L, I, Q;
- [0215] X₁₄: Y, F, R, Q, K; 및/또는
- [0216] X₁₅: L, I, V, F이다.
- [0217] "hHC03 인간화된 서열"은 원래의 키메라 서열 및 부분적으로 인간화된 서열 모두와 비교하여 아미노산 서열 변화를 포함하는 바람직한 아미노산 서열을 나타낸다. 이러한 서열 변화는 BCMA 표적에 결합하는 아미노산의 잠재적인 변화를 반영하기 위한 것이며, 이는 유리한 결합 특성을 유지하면서 치환될 수 있다. 치환의 중요성은 주로 본래 아미노산이 아니라 결과물인 아미노산과 관련이 있다. 따라서, 상기 변화는 또한 원래의 키메라 아미노산 또는 다른 변이체의 상응하는 아미노산으로부터 수행될 수 있다.
- [0218] 예를 들어:
- [0219] - LC (VL) 서열의 아미노산 S31은 S, H, T, N, D, Q이고;
- [0220] - LC (VL) 서열의 아미노산 N32는 N, E, Q이고;
- [0221] - LC (VL) 서열의 아미노산 A34는 A, G, V, S, T, L, I이고;

[0222] - LC (VL) 서열의 아미노산 Y36은 Y, F, L, I, V, A, G이고;

[0223] - LC (VL) 서열의 아미노산 Y49는 Y, F, L이고;

[0224] - LC (VL) 서열의 아미노산 S50은 S, T이고;

[0225] - LC (VL) 서열의 아미노산 S52는 S, T, D, N, H, E, Q이고;

[0226] - LC (VL) 서열의 아미노산 L53은 L, V, I, M이고;

[0227] - LC (VL) 서열의 아미노산 F55는 F, L, I, V, Y, M이고;

[0228] - LC (VL) 서열의 아미노산 G66은 G, X이고;

[0229] - LC (VL) 서열의 아미노산 S67은 S, X이고;

[0230] - LC (VL) 서열의 아미노산 Q89는 Q, V, L, I, M이고;

[0231] - LC (VL) 서열의 아미노산 Y91은 Y, F, L, I, Q이고;

[0232] - LC (VL) 서열의 아미노산 Y94는 Y, F, R, Q, K이고; 및 / 또는

[0233] - LC (VL) 서열의 아미노산 L96은 L, I, V, F이다.

[0234] 일반적으로, 전체적으로 프레임 워크 서열과는 독립적으로 고려될 때 인간화 동안 만들어진 CDR 영역에 대한 임의의 변화는 CDR 서열의 특징으로 간주될 수 있다. 그러한 변형된 CDR 서열은 본원에 기술된 전체 프레임 워크 영역에서 그의 컨텍스트 내에서 또는 그 컨텍스트와 독립적으로 본 발명의 특징을 정의하는 것으로 간주될 수 있다. 예를 들어, hHC01 내지 hHC03에서 밑줄로 식별된 CDR 서열은 주변 가변 영역 서열과 독립적으로 본 발명의 정의된 특징으로 간주될 수 있다.

[0235] 인간화된 LC 서열의 구체적인 예:

[0236] hLC04 (SEQ ID NO. 52):

[0237] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQQYNNYPLTFGAGTKLELKR

[0238] 정렬(Alignments):

[0239] LC 서열 내의 다양한 치환 위치의 CLUSTAL W(1.83) 다중 서열 정렬은 도 14에서 적절한 서열 비교를 제공한다. "일반 서열"은 LC 서열을 나타내며, 각 X는 주어진 아미노산에 대한 잠재적인 아미노산 변화를 나타낸다. 바람직한 아미노산 치환은 잠재적으로 돌연변이된 위치 각각에 대해 상술한 바와 같이 기재된 것이다.

[0240] 따라서, 본 발명은 hHC01, hHC02, hHC03, hHC04, hHC05, hHC06, hHC07, hLC01, hLC02, hLC03 및/또는 hLC04, 또는 이들의 임의 조합에 따른 인간화 서열에 관한 것이다.

[0241] 본원에서 제안된 잠재적 변이 잔기("일반" 서열에서 X로 식별됨)에 대한 잠재적 변이의 가능한 모든 조합이 본 발명에 포함된다. 이를 다양한 치환 중 하나 이상을 조합함으로써, 본래 개발되고 본원에서 입증된 키메라 항체의 목적하는 결합 특성을 나타내는 인간화된 변이체가 생성될 수 있다. 본원에 기술된 항체 또는 그의 부분은 또한 명시적으로 개시되거나 서열 공식을 통해 개시된 인간화된 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 90%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0242] 본 발명은 또한 VH 도메인을 포함하는 본원에 기재된 CAR에 관한 것으로, 상기 VH 도메인은 X₁VQLX₂X₃SGGGLVQPGGSLX₄LSCAAASGX₅X₆FX₇X₈YWZ₁SWVRX₉APGKGLEWX₁₀GEINPZ₂SSTINYAPSLKX₁₁X₁₂FX₁₃ISRDNAKNTLYLQMX₁₄X₁₅X₁₆RX₁₇EDTAX₁₈YYCASLYYDYGDAZ₃DYWGQQGTX₁₉VTVSS(SEQ ID NO. 53)에 따른 서열을 포함하고, 여기서 X₁: Q, E; X₂: Q, V; X₃: Q, E; X₄: K, R; X₅: I, F; X₆: D, T; X₇: S, D; X₈: R, D; X₉: R, Q; X₁₀: I, V; X₁₁: D, G; X₁₂: K, R; X₁₃: I, T; X₁₄: S, N; X₁₅: K, S; X₁₆: V, L; X₁₇: S, A; X₁₈: L, V; X₁₉: S, L; 및 여기서 Z₁: I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, 바람직하게는 I 또는 F; Z₂: S, N, T, G, K, R, D, 바람직하게는 S 및/또는 Z₃: Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게는 Y의 적어도 하나이며; 및 상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포 외 도메인의 에피토프와 특이적으로 결합한다.

[0243] 이 실시 예는 본 발명의 CAR에 대한 다양한 인간화 서열, 특히 그의 VH 서열, 본원에 기재된 바와 같은 CDR에서

수행되는 유리한 인간화에 의해 정의된 모든 변이체를 포함한다.

- [0244] 본 발명은 또한 VL 도메인을 포함하는 본원에 기재된 CAR에 관한 것으로, 상기 VL 도메인은 DIVMTQSX₁X₂X₃X₄X₅X₆SVGDX₇VX₈X₉TCKASQSVESNAWYQQKPKX₁₀X₁₁PKX₁₂LIX₁₃SX₁₄X₁₅LRFSGVPARFX₁₆GSGSGTDFTLTISX₁₇LQSEDIX₁₈AX₁₉YX₂₀CQQYNNYPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO. 54)에 따른 서열을 포함하고, 여기서 X1: Q, P; X2: R, A; X3: F, T; X4: M, L; X5: T, S; X6: T, V; X7: R, E; X8: S, T; X9: V, L; X10: R, G; X11: S, A; X12: A, L; X13: F, Y; X14: A, D; X15: S, D; X16: T, S; X17: N, S; X18: L, F; X19: E, V; X20: F, Y;이며; 및 상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포 외 도메인의 에피토프와 특이적으로 결합한다.
- [0245] 이 실시 예는 본 발명의 CAR에 대한 다양한 인간화 서열, 특히 그의 VL 서열, 본원에 기재된 바와 같은 CDR에서 수행되는 유리한 인간화에 의해 정의된 모든 변이체를 포함한다.
- [0246] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 세포 외 항원-결합 도메인이 VH 및 VL 도메인 사이에 위치된 링커 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게 상기 링커는 Whitlow (SEQ ID NO. 13, GSTSGSGKPGSSEGSTKG) 또는 Gly-Ser (SEQ ID NO. 14; SSGGGGSGGGGGSGGGGS) 링커, 또는 SEQ ID NO. 13 또는 14와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 링커로부터 선택된다.
- [0247] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 세포 외 항원-결합 도메인과 막 횡단 도메인 사이에 위치한 스페이서 폴리펩티드를 포함하며, 바람직하게 상기 스페이서는
- [0248] - CD28-IgG1의 스페이서 (SEQ ID NO. 15;
PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKK)
- [0249] - IgG1△ - 4-1BB 스페이서 (SEQ ID NO. 16;
PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGKK)
- [0250] - IgG4는 (Hi-CH2-CH3), 스페이서 (SEQ ID NO. 17;
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK)
- [0251] - IgG4 (Hi-CH3) 스페이서 (SEQ ID NO. 18;
ESKYGPPCPPCPGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK),
- [0252] - IgG4 (Hi) 스페이서 (SEQ ID NO. 19; ESKYGPPCPPCP), 또는
- [0253] - SEQ ID NO. 15 내지 19 중 어느 하나와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 스페이서;로부터 선택된다.
- [0254] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 바람직하게 막 횡단 도메인이 CD8 α 도메인 (SEQ ID NO. 20; IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC) 또는 CD28 도메인 (SEQ ID NO. 21; FWLVVVGGVLACYSLLVAFIIFWV) 또는 SEQ ID NO. 20 또는 21과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 막 횡단 도메인 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0255] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 바람직하게 세포 내 도메인이 4-1BB 공동-자극(co-stimulatory) 도메인 (SEQ ID NO. 22; KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRFPEEEEGGCEL) 또는 CD28 공동-자극 도메인 (SEQ ID NO. 23; RSKRSRLLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS), 또는 SEQ ID NO. 22 또는 23과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 공동-자극 도메인으로부터 선택된 공동-자극 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다; 및/또는
- [0256] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체 폴리펩티드(CAR)는 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게 상기 신호전달 도메인은 CD3zeta(CD28 또는 4-1BB) 신호전달 도메인 (SEQ ID NO. 24; LRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPMEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE1GMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR) 또는 SEQ ID NO. 24와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 신호전달 도메인으로부터 선택된다.

- [0257] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체(CAR)는 상기 CAR이 텐덤(tandem) 공동-자극 도메인을 포함하고, 4-1BB 공동-자극 도메인(SEQ ID NO. 22) 및 CD28 공동-자극 도메인 (SEQ ID NO. 23) 및 CD3제타 신호/활성 도메인 (SEQ ID NO. 24)을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0258] 일 실시 예에서, 본 발명의 분리된 키메라 항원 수용체(CAR)는 상기 CAR이 리더(leader) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하고, 바람직하게 상기 리더 서열은 IgK 리더 (SEQ ID NO. 55, MDFQVQIFSFLISASVIMSR) 또는 GMCSF 리더 (SEQ ID NO. 56; MLLLVTSLLLCELPHAFLLI), 또는 SEQ ID NO. 55 또는 56과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 리더 서열로부터 선택된다.
- [0259] 본 발명의 추가 양태는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 분리된 핵산 분자에 관한 것이다:
- [0260] a) - 선행하는 청구항에 따른 분리된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 코딩하는, 및/또는
- [0261] - SEQ ID NO. 66 및/또는 67, 또는 SEQ ID NO. 86 내지 94에 따른 서열을 포함하는, 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자;
- [0262] b) a)에 따른 뉴클레오티드 서열에 상보적인 핵산 분자;
- [0263] c) a) 또는 b)에 따른 뉴클레오티드 서열과 기능적으로 유사/동등하도록 충분한 서열 동일성을 갖는, 바람직하게는 a) 또는 b)에 따른 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 포함하는 핵산 분자;
- [0264] d) 유전자 코드의 결과로서 a) 내지 c)에 따른 뉴클레오티드 서열로 변성되는 핵산 분자; 및
- [0265] e) 결실, 부가, 치환, 전좌, 역전 및/또는 삽입에 의해 변형되고 a) 내지 d)에 따른 뉴클레오티드 서열과 기능적으로 유사/동등한 a) 내지 d)의 뉴클레오티드 서열에 따른 핵산 분자.
- [0266] 본 발명의 바람직한 아미노산 서열:

표 1

서열번호(SEQ ID NO.)	서열	설명
1	GFTFSRYW	H-CDR1
2	INPSSSTI	H-CDR2
3	ASLYYYDYGDAYDY	H-CDR3
4	QSVEVN	L-CDR1
5	SASX여기서, X는 임의의 아미노산, 바람직하게는 L이며, 또는 상기 서열은 위치 X가 정의되지 않은 SAS이다.	L-CDR2
6	QQYNNYPLT	L-CDR3
7	INPX ₂ X ₃ STI여기서 X ₂ X ₃ : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE	H-CDR2
8	ASLYX ₄ DYGDAX ₅ DY여기서 X ₄ : Y, L, A, V, F, I, W, 및/또는 X ₅ : Y, L, F, I, V, A, C	H-CDR3
9	QSVX ₁ X ₂ N여기서 X ₁ X ₂ : ES, SS, TS, QS, HS, DH	L-CDR1
10	QQYNNYPLTGF	L-CDR3
11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSVVRQAPGKGLVWVGEINPS SSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYD YWGQGTLVTVSS	VH 도메인
12	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNAVYQQKPGQAPRALIYSASLR FSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQNNYPLTFGAGTKLEK	VL 도메인
13	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Whitlow 링커
14	SSGGGGSGGGGSGGGGS	Gly-Ser 링커
15	PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISAKGQPQREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSSLSPGKK	IgG1-CD28 스페이서
16	PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISAKGQPQREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSSLSPGKK	IgG1△ - 4-1BB 스페이서

17	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNALKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISAKGQPQREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IgG4 (Hi-CH2-CH3) 스페이서
18	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IgG4 (Hi-CH3) 스페이서
19	ESKYGPPCPPCP	IgG4 (Hi) 스페이서
20	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC	CD8 α 도메인
21	FWVLVVGGVLACYSLLTVAFIIFWV	CD28 도메인
22	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEEDGCSRFPEEEAGCEL	4-1BB 공동-자극 도메인
23	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRGPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 공동-자극 도메인
24	LRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3zeta (CD28 or 4-1BB) 신호전달 도메인
25	RYWFS	H-CDR1
26	EINPSSSTINYAPSLKDK	H-CDR2
27	SLYYDYGDAYDYW	H-CDR3
28	KASQSVESNVA	L-CDR1
29	SASLRFS	L-CDR2
30	QQYNNYPLTFG	L-CDR3
31	MAGQCSQNEYFDPLLACIPCQLRCSSNTPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALE	BCMA 세포 외 도메인
32	MLQMAGQCSQNEYFDPLLACIPCQLRCSSNTPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALE	BCMA N-말단 서열
33	YFDPLLACIPCQLRCSSNT	BCMA 항체 에피토프 - BCMA의 아미노산 13 내지 32
34	RYW ₁ X ₁ S여기서: X ₁ : I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, 바람직하게 I 또는 F	H-CDR1
35	EINP ₂ X ₃ STINYAPSLKDK여기서: X ₂ X ₃ : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, 바람직하게 SS	H-CDR2
36	SLY ₄ DYGDA ₅ DYW여기서: X ₄ : Y, L, A, V, F, I, W, 바람직하게 Y; 및/또는 X ₅ : Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게 Y	H-CDR3
37	KASQSV ₁ X ₂ NVA여기서: X ₁ X ₂ : ES, SS, TS, QS, HS, DH, 바람직하게 ES	L-CDR1
38	QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGEINPD SSTINYAPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYYDGDAMD YWGQGTLTVSS	마우스 HC (VH)
39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQAPGKGLEWVGEINPD SSTINYAPSLKGRFTIISRDNAKNTLYLQMSNLRaedTAVYYCASLYYDGDAMD YWGQGTLTVSS	부분적으로 인간화된 HC
40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLVWVGEINPD SSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMSNLRaedTAVYYCASLYYDGDAMD YWGQGTLTVSS	hHC01
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW ₁ X ₁ S ₂ WVVRQAPGKGLVWVGEINP <u>X₂X₃STINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMSNLRaedTAVYYCASLYX₄DYGD</u> <u>A₅DYWQGTLTVSS여기서</u> X ₁ : I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, 바람직하게 I or F; X ₂ X ₃ : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, 바람직하게 SS; X ₄ : Y, L, A, V, F, I, W, 바람직하게 Y; 및/또는 X ₅ : Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게 Y	hHC02

42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY <u>X₁</u> <u>MX₂</u> WVRQAPGKGLV <u>X₃</u> VG <u>X₄</u> I NPDSSSTINYAPSL <u>KDKFT</u> ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS <u>X₅</u> <u>X₆</u> <u>X₇</u> DY <u>GDX₈</u> <u>MDYWGQGTL</u> TVSS여기서 X ₁ : W, F, Y, 바람직하게 W; X ₂ : S, T, N, Q, D, E, 바람직하게 S; X ₃ : W, F, Y, 바람직하게 W; X ₄ : E, Q, 바람직하게 E; X ₅ : L, I, V, G, A, 바람직하게 L; X ₆ : Y, X, 바람직하게 Y; X ₇ : Y, F, L, I, V, M, 바람직하게 Y; 및/또는 X ₈ : A, G, V, 바람직하게 A	hHC03
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW <u>I</u> <u>S</u> WVRQAPGKGLVWVGEINPN SSTINYAPSL <u>KDKFT</u> ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS <u>L</u> <u>Y</u> <u>D</u> YGDAYD YWGQGTLTVSS	hHC04
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW <u>F</u> <u>S</u> WVRQAPGKGLVWVGEINPN SSTINYAPSL <u>KDKFT</u> ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS <u>L</u> <u>Y</u> <u>D</u> YGDAYD YWGQGTLTVSS	hHC05
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW <u>I</u> <u>S</u> WVRQAPGKGLVWVGEINPS SSTINYAPSL <u>KDKFT</u> ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS <u>L</u> <u>Y</u> <u>D</u> YGDAYD YWGQGTLTVSS	hHC06
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW <u>F</u> <u>S</u> WVRQAPGKGLVWVGEINPS SSTINYAPSL <u>KDKFT</u> ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS <u>L</u> <u>Y</u> <u>D</u> YGDAYD YWGQGTLTVSS	hHC07
47	DIVMTQSQRMTTSVGDRSVTCK <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>R</u>	마우스 LC (VL)
48	DIVMTQSPATLSVGDEVTL <u>T</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>R</u>	부분적으로 인간화된 LC
49	EIVMTQSPATLSVSPGERATL <u>S</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>R</u> 여기서:	hLC01
50	EIVMTQSPATLSVSPGERATL <u>S</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>X₁</u> <u>X₂</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>R</u> 여기서: X ₁ X ₂ : ES, SS, TS, QS, HS, DH, 바람직하게 ES.	hLC02

51	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDX₁X₂VX₃WX₄QQKPGQAPRALIX₅X₆ <u>AX₇X₈RX₉</u>SGIPARFSGSX₁₀X₁₁GTEFTLTISSLQSEDFAVYYCX₁₂QX₁₃NNX₁₄PX₁₅TFGAGTKLELKR</p> <p>여기서:</p> <p>X₁: S, H, T, N, D, Q;</p> <p>X₂: N, E, Q;</p> <p>X₃: A, G, V, S, T, L, I;</p> <p>X₄: Y, F, L, I, V, A, G;</p> <p>X₅: Y, F, L;</p> <p>X₆: S, T;</p> <p>X₇: S, T, D, N, H, E, Q;</p> <p>X₈: L, V, I, M;</p> <p>X₉: F, L, I, V, Y, M;</p> <p>X₁₀: G, X;</p> <p>X₁₁: S, X;</p> <p>X₁₂: Q, V, L, I, M;</p> <p>X₁₃: Y, F, L, I, Q;</p> <p>X₁₄: Y, F, R, Q, K; 및/또는</p> <p>X₁₅: L, I, V, F</p>	hLC03
52	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAVYQQKPGQAPRALIYSASLR <u>FSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQQNNYPLTFGAGTKLELKR</u>	hLC04
53	<p>X₁VQLX₂X₃SGGGLVQPGGLSLX₄LSCAAAGX₅X₆FX₇X₈YWZ₁SWVRX₉APGKGLEWX₁₀ ₁₁GEINPZ₂SSTINYAPSLKX₁₁X₁₂FX₁₃ISRDNAKNTLYLQMX₁₄X₁₅X₁₆RX₁₇EDT AX₁₈YYCASLYYDYGDAZ₃DYWGQQGTX₁₉VTVSS</p> <p>여기서 X₁: Q, E; X₂: Q, V; X₃: Q, E; X₄: K, R; X₅: I, F; X₆: D, T; X₇: S, D; X₈: R, D; X₉: R, Q; X₁₀: I, V; X₁₁: D, G; X₁₂: K, R; X₁₃: I, T; X₁₄: S, N; X₁₅: K, S; X₁₆: V, L; X₁₇: S, A; X₁₈: L, V; X₁₉: S, L;</p> <p>및 여기서 Z₁: I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, 바람직하게 I or F; Z₂: S, N, T, G, K, R, D, 바람직하게 S 및/또는 Z₃: Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게 Y의 적어도 하나;</p>	VH hum Gen
54	<p>DIVMTQSX₁X₂X₃X₄X₅X₆SVGDX₇VX₈X₉TCKASQSVESNVAVYQQKPKX₁₀QX₁₁PKX₁₂ LIX₁₃SX₁₄X₁₅LRFSGVPARFX₁₆GSGSGTDFLTISX₁₇LQSEDX₁₈AX₁₉YX₂₀CQ₂₁ QYNNYPLTFGAGTKLELKR여기서 X₁: Q, P; X₂: R, A; X₃: F, T; X₄: M, L; X₅: T, S; X₆: T, V; X₇: R, E; X₈: S, T; X₉: V, L; X₁₀: R, G; X₁₁: S, A; X₁₂: A, L; X₁₃: F, Y; X₁₄: A, D; X₁₅: S, D; X₁₆: T, S; X₁₇: N, S; X₁₈: L, F; X₁₉: E, V; X₂₀: F, Y;</p>	VL hum Gen
55	MDFQVQIFSLLISASVIMSR	IgK 리더
56	MLLLVTSLLCELPHPAFLLI	GMCSF 리더
57	<p>MDFQVQIFSLLISASVIMSRREVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWF₁ FSWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMN₂SLR₃ AEDTAVYYCASLYYDYGDAYDYWGQGTLTVSSG₄STSGSGKPGSGEG₅STKGEIV₆ MTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAVYQQKPGQAPRALIYSASLR₇FSG₈IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQQNNYPLTFGAGTKLELKAEP₉ KSPDKTHTCP₁₀CPAPPVAGPSVFLFPPKPKD₁₁TL₁₂ARTPEVTCVVVDVSHEDPE₁₃ VKFNWYV₁₄DVGVEVHN₁₅AKTP₁₆KP₁₇REEQYN₁₈NTYR₁₉V₂₀V₂₁SL₂₂TV₂₃L₂₄HQDW₂₅LNG₂₆KEY₂₇K₂₈C₂₉V₃₀S₃₁N₃₂K₃₃ALP₃₄APIEKT₃₅TSKAKGQ₃₆PREPQ₃₇V₃₈Y₃₉TL₄₀PP₄₁SR₄₂DEL₄₃TK₄₄NQV₄₅S₄₆T₄₇CL₄₈V₄₉K₅₀G₅₁F₅₂Y₅₃P₅₄S₅₅D₅₆I₅₇AVE₅₈ WESNGQ₅₉PENNYK₆₀TT₆₁PP₆₂V₆₃LD₆₄SDG₆₅SS₆₆FL₆₇Y₆₈SK₆₉L₇₀TV₇₁DK₇₂SR₇₃W₇₄QQGN₇₅V₇₆F₇₇C₇₈S₇₉V₈₀M₈₁HEALHN₈₂ HYTQK₈₃SL₈₄SPG₈₅KKD₈₆PK₈₇FW₈₈V₈₉V₉₀GG₉₁V₉₂L₉₃AC₉₄Y₉₅SL₉₆TV₉₇F₉₈V₉₉A₁₀₀F₁₀₁W₁₀₂R₁₀₃S₁₀₄R₁₀₅LL₁₀₆H₁₀₇S₁₀₈ DYM₁₀₉NMT₁₁₀PR₁₁₁RP₁₁₂GP₁₁₃TR₁₁₄K₁₁₅HY₁₁₆Q₁₁₇P₁₁₈Y₁₁₉APP₁₂₀R₁₂₁D₁₂₂F₁₂₃A₁₂₄Y₁₂₅R₁₂₆L₁₂₇R₁₂₈V₁₂₉K₁₃₀F₁₃₁R₁₃₂S₁₃₃A₁₃₄D₁₃₅A₁₃₆P₁₃₇AY₁₃₈Q₁₃₉Q₁₄₀N₁₄₁Q₁₄₂LY₁₄₃N₁₄₄E₁₄₅L₁₄₆Q₁₄₇K₁₄₈D₁₄₉K₁₅₀M₁₅₁A₁₅₂E₁₅₃Y₁₅₄S₁₅₅E₁₅₆I₁₅₇G₁₅₈R₁₅₉R₁₆₀E₁₆₁Y₁₆₂D₁₆₃V₁₆₄L₁₆₅D₁₆₆K₁₆₇R₁₆₈R₁₆₉G₁₇₀D₁₇₁P₁₇₂R₁₇₃PE₁₇₄M₁₇₅GG₁₇₆K₁₇₇P₁₇₈R₁₇₉K₁₈₀N₁₈₁P₁₈₂Q₁₈₃E₁₈₄G₁₈₅Y₁₈₆N₁₈₇E₁₈₈L₁₈₉Q₁₉₀K₁₉₁D₁₉₂K₁₉₃M₁₉₄A₁₉₅E₁₉₆Y₁₉₇S₁₉₈I₁₉₉G₂₀₀R₂₀₁R₂₀₂E₂₀₃Y₂₀₄D₂₀₅V₂₀₆L₂₀₇D₂₀₈A₂₀₉L₂₁₀H₂₁₁M₂₁₂Q₂₁₃A₂₁₄L₂₁₅P₂₁₆PR₂₁₇PP₂₁₈R₂₁₉Y₂₂₀G₂₂₁L₂₂₂Q₂₂₃G₂₂₄H₂₂₅D₂₂₆G₂₂₇L₂₂₈Y₂₂₉Q₂₃₀G₂₃₁L₂₃₂STAT₂₃₃K₂₃₄D₂₃₅T₂₃₆Y₂₃₇D₂₃₈A₂₃₉L₂₄₀H₂₄₁M₂₄₂Q₂₄₃A₂₄₄L₂₄₅P₂₄₆PR₂₄₇PP₂₄₈R₂₄₉Y₂₅₀G₂₅₁L₂₅₂Q₂₅₃G₂₅₄H₂₅₅D₂₅₆G₂₅₇L₂₅₈Y₂₅₉Q₂₆₀G₂₆₁L₂₆₂STAT₂₆₃K₂₆₄D₂₆₅T₂₆₆Y₂₆₇D₂₆₈A₂₆₉L₂₇₀H₂₇₁M₂₇₂Q₂₇₃A₂₇₄L₂₇₅P₂₇₆PR₂₇₇PP₂₇₈R₂₇₉Y₂₈₀G₂₈₁L₂₈₂Q₂₈₃G₂₈₄H₂₈₅D₂₈₆G₂₈₇L₂₈₈Y₂₈₉Q₂₉₀G₂₉₁L₂₉₂STAT₂₉₃K₂₉₄D₂₉₅T₂₉₆Y₂₉₇D₂₉₈A₂₉₉L₃₀₀H₃₀₁M₃₀₂Q₃₀₃A₃₀₄L₃₀₅P₃₀₆PR₃₀₇PP₃₀₈R₃₀₉Y₃₁₀G₃₁₁L₃₁₂Q₃₁₃G₃₁₄H₃₁₅D₃₁₆G₃₁₇L₃₁₈Y₃₁₉Q₃₂₀G₃₂₁L₃₂₂STAT₃₂₃K₃₂₄D₃₂₅T₃₂₆Y₃₂₇D₃₂₈A₃₂₉L₃₃₀H₃₃₁M₃₃₂Q₃₃₃A₃₃₄L₃₃₅P₃₃₆PR₃₃₇PP₃₃₈R₃₃₉Y₃₄₀G₃₄₁L₃₄₂Q₃₄₃G₃₄₄H₃₄₅D₃₄₆G₃₄₇L₃₄₈Y₃₄₉Q₃₅₀G₃₅₁L₃₅₂STAT₃₅₃K₃₅₄D₃₅₅T₃₅₆Y₃₅₇D₃₅₈A₃₅₉L₃₆₀H₃₆₁M₃₆₂Q₃₆₃A₃₆₄L₃₆₅P₃₆₆PR₃₆₇PP₃₆₈R₃₆₉Y₃₇₀G₃₇₁L₃₇₂Q₃₇₃G₃₇₄H₃₇₅D₃₇₆G₃₇₇L₃₇₈Y₃₇₉Q₃₈₀G₃₈₁L₃₈₂STAT₃₈₃K₃₈₄D₃₈₅T₃₈₆Y₃₈₇D₃₈₈A₃₈₉L₃₉₀H₃₉₁M₃₉₂Q₃₉₃A₃₉₄L₃₉₅P₃₉₆PR₃₉₇PP₃₉₈R₃₉₉Y₄₀₀G₄₀₁L₄₀₂Q₄₀₃G₄₀₄H₄₀₅D₄₀₆G₄₀₇L₄₀₈Y₄₀₉Q₄₁₀G₄₁₁L₄₁₂STAT₄₁₃K₄₁₄D₄₁₅T₄₁₆Y₄₁₇D₄₁₈A₄₁₉L₄₂₀H₄₂₁M₄₂₂Q₄₂₃A₄₂₄L₄₂₅P₄₂₆PR₄₂₇PP₄₂₈R₄₂₉Y₄₃₀G₄₃₁L₄₃₂Q₄₃₃G₄₃₄H₄₃₅D₄₃₆G₄₃₇L₄₃₈Y₄₃₉Q₄₄₀G₄₄₁L₄₄₂STAT₄₄₃K₄₄₄D₄₄₅T₄₄₆Y₄₄₇D₄₄₈A₄₄₉L₄₅₀H₄₅₁M₄₅₂Q₄₅₃A₄₅₄L₄₅₅P₄₅₆PR₄₅₇PP₄₅₈R₄₅₉Y₄₆₀G₄₆₁L₄₆₂Q₄₆₃G₄₆₄H₄₆₅D₄₆₆G₄₆₇L₄₆₈Y₄₆₉Q₄₇₀G₄₇₁L₄₇₂STAT₄₇₃K₄₇₄D₄₇₅T₄₇₆Y₄₇₇D₄₇₈A₄₇₉L₄₈₀H₄₈₁M₄₈₂Q₄₈₃A₄₈₄L₄₈₅P₄₈₆PR₄₈₇PP₄₈₈R₄₈₉Y₄₉₀G₄₉₁L₄₉₂Q₄₉₃G₄₉₄H₄₉₅D₄₉₆G₄₉₇L₄₉₈Y₄₉₉Q₅₀₀G₅₀₁L₅₀₂STAT₅₀₃K₅₀₄D₅₀₅T₅₀₆Y₅₀₇D₅₀₈A₅₀₉L₅₁₀H₅₁₁M₅₁₂Q₅₁₃A₅₁₄L₅₁₅P₅₁₆PR₅₁₇PP₅₁₈R₅₁₉Y₅₂₀G₅₂₁L₅₂₂Q₅₂₃G₅₂₄H₅₂₅D₅₂₆G₅₂₇L₅₂₈Y₅₂₉Q₅₃₀G₅₃₁L₅₃₂STAT₅₃₃K₅₃₄D₅₃₅T₅₃₆Y₅₃₇D₅₃₈A₅₃₉L₅₄₀H₅₄₁M₅₄₂Q₅₄₃A₅₄₄L₅₄₅P₅₄₆PR₅₄₇PP₅₄₈R₅₄₉Y₅₅₀G₅₅₁L₅₅₂Q₅₅₃G₅₅₄H₅₅₅D₅₅₆G₅₅₇L₅₅₈Y₅₅₉Q₅₆₀G₅₆₁L₅₆₂STAT₅₆₃K₅₆₄D₅₆₅T₅₆₆Y₅₆₇D₅₆₈A₅₆₉L₅₇₀H₅₇₁M₅₇₂Q₅₇₃A₅₇₄L₅₇₅P₅₇₆PR₅₇₇PP₅₇₈R₅₇₉Y₅₈₀G₅₈₁L₅₈₂Q₅₈₃G₅₈₄H₅₈₅D₅₈₆G₅₈₇L₅₈₈Y₅₈₉Q₅₉₀G₅₉₁L₅₉₂STAT₅₉₃K₅₉₄D₅₉₅T₅₉₆Y₅₉₇D₅₉₈A₅₉₉L₆₀₀H₆₀₁M₆₀₂Q₆₀₃A₆₀₄L₆₀₅P₆₀₆PR₆₀₇PP₆₀₈R₆₀₉Y₆₁₀G₆₁₁L₆₁₂Q₆₁₃G₆₁₄H₆₁₅D₆₁₆G₆₁₇L₆₁₈Y₆₁₉Q₆₂₀G₆₂₁L₆₂₂STAT₆₂₃K₆₂₄D₆₂₅T₆₂₆Y₆₂₇D₆₂₈A₆₂₉L₆₃₀H₆₃₁M₆₃₂Q₆₃₃A₆₃₄L₆₃₅P₆₃₆PR₆₃₇PP₆₃₈R₆₃₉Y₆₄₀G₆₄₁L₆₄₂Q₆₄₃G₆₄₄H₆₄₅D₆₄₆G₆₄₇L₆₄₈Y₆₄₉Q₆₅₀G₆₅₁L₆₅₂STAT₆₅₃K₆₅₄D₆₅₅T₆₅₆Y₆₅₇D₆₅₈A₆₅₉L₆₆₀H₆₆₁M₆₆₂Q₆₆₃A₆₆₄L₆₆₅P₆₆₆PR₆₆₇PP₆₆₈R₆₆₉Y₆₇₀G₆₇₁L₆₇₂Q₆₇₃G₆₇₄H₆₇₅D₆₇₆G₆₇₇L₆₇₈Y₆₇₉Q₆₈₀G₆₈₁L₆₈₂STAT₆₈₃K₆₈₄D₆₈₅T₆₈₆Y₆₈₇D₆₈₈A₆₈₉L₆₉₀H₆₉₁M₆₉₂Q₆₉₃A₆₉₄L₆₉₅P₆₉₆PR₆₉₇PP₆₉₈R₆₉₉Y₇₀₀G₇₀₁L₇₀₂Q₇₀₃G₇₀₄H₇₀₅D₇₀₆G₇₀₇L₇₀₈Y₇₀₉Q₇₁₀G₇₁₁L₇₁₂STAT₇₁₃K₇₁₄D₇₁₅T₇₁₆Y₇₁₇D₇₁₈A₇₁₉L₇₂₀H₇₂₁M₇₂₂Q₇₂₃A₇₂₄L₇₂₅P₇₂₆PR₇₂₇PP₇₂₈R₇₂₉Y₇₃₀G₇₃₁L₇₃₂Q₇₃₃G₇₃₄H₇₃₅D₇₃₆G₇₃₇L₇₃₈Y₇₃₉Q₇₄₀G₇₄₁L₇₄₂STAT₇₄₃K₇₄₄D₇₄₅T₇₄₆Y₇₄₇D₇₄₈A₇₄₉L₇₅₀H₇₅₁M₇₅₂Q₇₅₃A₇₅₄L₇₅₅P₇₅₆PR₇₅₇PP₇₅₈R₇₅₉Y₇₆₀G₇₆₁L₇₆₂Q₇₆₃G₇₆₄H₇₆₅D₇₆₆G₇₆₇L₇₆₈Y₇₆₉Q₇₇₀G₇₇₁L₇₇₂STAT₇₇₃K₇₇₄D₇₇₅T₇₇₆Y₇₇₇D₇₇₈A₇₇₉L₇₈₀H₇₈₁M₇₈₂Q₇₈₃A₇₈₄L₇₈₅P₇₈₆PR₇₈₇PP₇₈₈R₇₈₉Y₇₉₀G₇₉₁L₇₉₂Q₇₉₃G₇₉₄H₇₉₅D₇₉₆G₇₉₇L₇₉₈Y₇₉₉Q₈₀₀G₈₀₁L₈₀₂STAT₈₀₃K₈₀₄D₈₀₅T₈₀₆Y₈₀₇D₈₀₈A₈₀₉L₈₁₀H₈₁₁M₈₁₂Q₈₁₃A₈₁₄L₈₁₅P₈₁₆PR₈₁₇PP₈₁₈R₈₁₉Y₈₂₀G₈₂₁L₈₂₂Q₈₂₃G₈₂₄H₈₂₅D₈₂₆G₈₂₇L₈₂₈Y₈₂₉Q₈₃₀G₈₃₁L₈₃₂STAT₈₃₃K₈₃₄D₈₃₅T₈₃₆Y₈₃₇D₈₃₈A₈₃₉L₈₄₀H₈₄₁M₈₄₂Q₈₄₃A₈₄₄L₈₄₅P₈₄₆PR₈₄₇PP₈₄₈R₈₄₉Y₈₅₀G₈₅₁L₈₅₂Q₈₅₃G₈₅₄H₈₅₅D₈₅₆G₈₅₇L₈₅₈Y₈₅₉Q₈₆₀G₈₆₁L₈₆₂STAT₈₆₃K₈₆₄D₈₆₅T₈₆₆Y₈₆₇D₈₆₈A₈₆₉L₈₇₀H₈₇₁M₈₇₂Q₈₇₃A₈₇₄L₈₇₅P₈₇₆PR₈₇₇PP₈₇₈R₈₇₉Y₈₈₀G₈₈₁L₈₈₂Q₈₈₃G₈₈₄H₈₈₅D₈₈₆G₈₈₇L₈₈₈Y₈₈₉Q₈₉₀G₈₉₁L₈₉₂STAT₈₉₃K₈₉₄D₈₉₅T₈₉₆Y₈₉₇D₈₉₈A₈₉₉L₉₀₀H₉₀₁M₉₀₂Q₉₀₃A₉₀₄L₉₀₅P₉₀₆PR₉₀₇PP<sub</p>	

58	MDFQVQIFSLLISASVIMSREI VMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNV AWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYY CQQYNNYPLTFGAGTKLELKGSSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVVVGEINPSSSTINYAPSLKDFTI SRDANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDWGQGTLTVTSSPAEP KSPDKTHTCPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDFTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVGDGEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGQNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKDPKFVWLVVVGGVLACYSLLTVAFI IFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYPQYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR 구조물 X_X_MP71-hBCMA- VL-WL- VH_IgG1_CD28_CD3z
59	MDFQVQIFSLLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW FSWVRQAPGKGLVVVGEINPSSSTINYAPSLKDFTI SRDANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDWGQGTLTVTSSGSTSCKASQSVESNV AWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKPAEP KSPDKTHTCPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDFTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVGDGEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGQNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKDPKFVWLVVVGGVLACYSLLTVAFI IFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYPQYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR 구조물 XIXI_MP71-hBCMA-VH-WL- VL_IgG1_CD28_CD3z_no_op
60	MDFQVQIFSLLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW FSWVRQAPGKGLVVVGEINPSSSTINYAPSLKDFTI SRDANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDWGQGTLTVTSSGSTSCKASQSVESNV AWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKESKY GPPCPCPAPPEFEGGSPVFLFPPKPKDFTLMI SRTPEVTCVVVDVQSDEPEVQFN WYVDGEVHNAKTPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESN QOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKFVWLVVVGGVLACYSLLTVAFI IFWVRSKRSRLLHSDMNMTPR RGPTRKHYPQYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLKRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR 구조물 XIXI_new_cuts_MP71-hBCMA-VH-WL- VL_IgG4_CD28_CD3z
61	MDFQVQIFSLLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW FSWVRQAPGKGLVVVGEINPSSSTINYAPSLKDFTI SRDANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDWGQGTLTVTSSGSTSCKASQSVESNV AWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKESKY GPPCPCPQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKFVWLVVVGGVLACYSLLTVAFI IFWVRSKRSRLLHSDMNMTPRR GPTRKHYPQYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLKRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR 구조물 X IIII_new_cuts_MP71-hBCMA-VH-WL- VL_IgG4_HI_CH3_CD28_CD3z
62	MDFQVQIFSLLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW FSWVRQAPGKGLVVVGEINPSSSTINYAPSLKDFTI SRDANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDWGQGTLTVTSSGSTSCKASQSVESNV AWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKESKY GPPCPCPFWLVVVGGVLACYSLLTVAFI IFWVRSKRSRLLHSDMNMTPRR PGTRKHYPQYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLKRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR 구조물 XIXIIV_new_cuts_MP71-hBCMA-VH-WL- VL_IgG4_HI_CD28_CD3z

63	MDFQVQIFSFLI SAVIMSREVQLVESGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSRYW FSWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLDKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCASLYYDGDAYDWGQGTLTVTSSGSGKPGSGEGSTKGEIV MTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSG IPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKPAEP KSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYDGVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDI AVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGQNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSSLSPGKKIYIWAPLAGTCGVLLLSSLVITLYCRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEEDGCSRFPEEEQEGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNL GRREEYDVLDRGRDPMEGGKPRRNPKQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	구조물 XVXV_MP71- hBCMA-VH-WL- VL_IgGdelta_CD8_ 4-1BB_CD3z
64	MDFQVQIFSFLI SAVIMSREIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNV AWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYY CQQYNNYPLTFGAGTKLELKGSSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLDKDKFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDGDAYDWGQGTLTVTSSPAEP KSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYDGVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDI AVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGQNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSSLSPGKKIYIWAPLAGTCGVLLLSSLVITLYCRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEEDGCSRFPEEEQEGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNL GRREEYDVLDRGRDPMEGGKPRRNPKQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	구조물 XVIIXVI_MP71- hBCMA-VL-WL- VH_IgGdelta_CD8_ 4-1BB_CD3z
65	MDFQVQIFSFLI SAVIMSREVQLVESGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSRYW FSWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLDKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCASLYYDGDAYDWGQGTLTVTSSGSGKPGSGEGSTKGEIV MTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSG IPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKPAEP KSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYDGVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDI AVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGQNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSSLSPGKKIYIWAPLAGTCGVLLLSSLVITLYCRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEEDGCSRFPEEEQEGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNL GRREEYDVLDRGRDPMEGGKPRRNPKQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	구조물 XVIIIXVII_MP71- hBCMA-VH-WL- VL_IgGdelta_CD8_4- 1BB_CD3z_no_opt

[0268] 바람직한 뉴클레오티드 서열:

표 2

[0269]	66	gaggtgcagctggtaatctggcgaggactggtgccgcctggcggtctctgg agactgtttgtgcgcgcagcggttccacccctcagccgtactggtttagctgg gtgcgcgcaggccctggcaaggactcggtgtgggtggagagatcaaccccgac agcagcaccatcaactacgccccagctgaaggacaaggtaaccatcagcaga gacaacgccaagaacacccctgtacctgcagatgaacagcctgcggccgaggac accgcgtgtactatgtgccgcctgtactacgactacggcgcacgcctacgat tactggggcaggcacactggtgactgttagctcc	VH 최적화된 코돈
	67	Gagatcgatgacacagagccctgcacccctgagctgtcccccaggcgaaaga gctaccctgagctgcaaggccagccagagcgctggaaagcaacgtggctggat cagcagaagccggacagggctctggccctgatctacagcgccagcctgaga ttcagcggcatccccccggatgggtttagcgctctggcagcggcaccggatcc ctgacaatcagcgcctgcagcggaggacttgcgtgtattactgcgcagcag tacaacaactacccctgacccctcgagccggcaccacactgggagctgaag actgggacaaggcacactggtgactgttagctcc	VL 최적화된 코돈
	68	gaagtgcagctggcgaatctggaggaggctggttcagcctggcgcgcct aggctctttgtgcgcctctggcttaccccttcacggttatggttcagctgg gtgagacaggtccaggaaaggctgggtggtagggagataaaccccgac agcagcaccatcaactatgctcggtcactgaaagacaaggtaaccatcc gataatgccaagaacactctacttgcagatgaattccctcgagccgaggat acagcgtgtactactgcgcagctgtactacgactatgggacgcatacgac tattggggacaaggcacactggtgactgttagctcc	코돈 최적화 되지 않은 VH - mAb scFv

87	atggattccaggtcagatcttcagttctgtatctccgcgcgtgat atgagccgcgagatcgtagatcagacagagccctgcacccctgagcgttccccca ggcggaaagagactaccctgagctgcaagggcagccagagcgtggaaagcaacgtg gcctggatcagcagaagccggacaggcttcctcgccctgtatcagcgcc agcctgagattcagcggatccccggcagggtttagcggctctggcagcggcacc gagttcacccatcagcgcctgcagagcggacttgcgttattac tgccagcgtacaacaactaccctgacccctcgagccggcacaagctggag ctgaagggcagcaccagcggctccggcaagcgtggctctggcagggcagcaca aaggagaggtgcagctggtaatctggcggaggactgggtgcagctggcggc tctctgagactgttgcgcgcggcttcacccatcagccgtactggtt agctgggtgcgcgcaggccctggcaagggactcggtggggggagatcaac cccagcagcagcaccatcaactacgccccccgcctgaaggacaagttcaccatc agcagagacaacgccaagaacaccctgtacttgcagatgaacagcgcgcgc gaggacaccgcgtgtactattgtgcgcagectgtactacgactacggcgc tacgattacttggccaggccggcacaactggtagcttgcgcgcgcct aagagccgcacaagacccacacctgtccccctgtctgcgcgcctcagtggt ggccctagcgttctgttccccccaaagccaaaggataccctgtatcgcc cggccccccgaaagtcatcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgag gtcaagtcaactgttgcggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag ccggggaggaggcgtacaacacgcacgtaccgtgtggcagctccgc ctgcaccaggactggctgaatggcaaggactacaagtgcaggttccaaacaa gcctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccg gaaccacagggttacaccctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc gtcagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc tggagagcaatggccggagaacaactacaagaccacgcgcgcgc gactccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc tggcagcaggaaacgttctcatgtccgtgtatgcattggcgc cactacacgcagaagacgcgcgcgcgcgcgcgc ccctatgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc agcaggaggcgcgcgcgcgcgcgcgc gagctaatctaggcgaagagaggactacgttttgcgcgc cgggaccctggatggggaaagccgagaaggaaccctcaggaggc tacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagt aaaggcggcggcggaggggcaagggcagatggccttaccagg acagccaccaaggacacccatcagcgcgcgcgcgc tga	구조물 X X_MP71-hBCMA- VL-WL- VH_IgG1_CD28_CD3z
----	--	--

88	atggattccaggtcagatcttcagttctgtatctccgcgcgtgat atgagccgcgaaagtgcagctggtaatctggaggaggctggttcagcctgtt ggcagccttaggctcttgcagcctcgcttaccttcacggattgg ttcagctgggtgagacaggctccaggaaaggctgggtgtggtagggagata aaccggcagcgcacgtcaactatgtccgtcaactgaaagacaatgtcacc atttccgcgataatgccaagaacactctacttgcagatgaatcccttcga gccgaggatcagcggttactactgcgccgtctgtactacgactatggggac gcatacgaatattgggacaaggcacactgtgactttagctccgcagcacc agcggctccgcaaggctggcttggcgaggcagcacaaggagatcgta atgaccaggctccgtctaccctgagcgttctccggtaaaggccacactc agctgcaaggcttcaagcggtggagacaatgtcgcttgcgtatcagcagaaa cctggccaagctcgagagactgtatccgcgtatgcgtttccggc ataccgcacggtttagtggctcagggagtggactgatctactgtacgatt agctcccttcagttagggatctccgcgttactactgtcagcgtacaacaac tatcccttcacattcggacttggaaactgtggacttgcggagcc aagagccccgacaaggccacactgtccccctgtctggccctcagtggt ggcccttgcgttctgtcccccaaggataccctgatgtcgcc cggcccccaagtcatgtggcttggacttgcgttgcgttgcgttgcgt gtcaagtcaatgttgcgttgcggacttggatgcatatgccaagacaag ccggggaggaggactacaacacgttgcgttgcgttgcgttgcgt ctgcaccaggactggctgaatggcaaggactacaatgtcaaggcttcaacaaa gccctccagccccatcgagaaaaccatcttcaaggccaaaggccagccccga gaaccacagggttacaccctgccttgcgttgcgttgcgttgcgt gtcagcctgacccctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt tggagagactggcggagaacaactacaaggaccgcctccgtgct gactccgcggcttcttcctacagcaagcttgcgttgcgttgcgt tggcagcaggaaacttgcgttgcgttgcgttgcgt caactacacgcagaaggccctccctgttccggtaaaaaagatccaaattt tgggtgttgggtgttgggtgttgcgttgcgttgcgttgcgt gttggccttatttatttctgggttgggttgcgttgcgttgcgt gactacatgacatgactccccccggccaccgcgttgcgttgcgt ccctatgcccaccacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt agcaggaggcgcagacgcccccggttaccacgcggccagaaccagcttataac gagctaatcttaggacgaagagaggactacgtttttggacaagagacgtggc cgggacccttggatggggaaagccgagaaggaaaccctcaggaaaggcc tacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggccatcagtgatggat aaaggcgagcgcggaggggcaaggccatcagtgcccttaccagggtctcag acagccaccaaggacacactacgcgccttcatgcaggccctgcggcc tga	구조물 XIXI_MP71- hBCMA-VH-WL- VL_IgG1_CD28_CD3z_no_o pt
----	---	--

89	atggatttccaggtgcagatcttcagttcctgtctgtatccggccagcggtgatc atgagccgcgagggtgcagctgggtggaaatctggcgaggactgggtgcagcctggc ggctctctgagactgtttgtgcgcgcagcggttacacccatcagccgtactgg tttagctgggtgcgcgcaggccctggcaaggggactcgtgtgggtgggagagatc aaccggcagcgcacccatcaactacgccccccagcctgaaggacaaggatcacc atcagcagagacaacgcagaacacccctgtacctgcagatgaacagcctgcgg ggcgaggacacccgcgtactatgtgcgcgcgtactacgactacggcgcac gcctacgatactggggcaggcactactgggtactgttagctccggcagcacc agcggtccggcaagcctggcttgcgcgaggcggcggcggcggcggcgg atgacacagagccctggccaccctgagcgtgtcccgaggcggaaagagatcaccctg agctgcgaaggccagccagcgtggaaagcaacgtggctggatcagcagaag ccggacaggcttcggccctgatctacgcgcgcgcgcgcgc tggctgaacggcggaaagatacaagtgcacgggtgtccaaacaaaggccctgc agcatcggaaagaccatcagcaaggccaaaggccgcgcgcgc tacccctgcctccctccaggaaagatgaccaagaaccagggtgtccctgacc tgcctgggtgaagggttctacccctgcgcgcgcgcgcgc ggccagcgtgagaacaactacaagaccaccctcccggtgtggacagcgc agcttcttcctgcccccttgcctggccgcgcgcgcgc gtgaagggttctacccctgcgcgcgcgcgcgc cctgagaacaactacaagaccaccctcccggtgtggacagcgc ttccctcatacgccggctgaccgtggacaagagccgggtggcaggaaaggc tttagctgcgcgcgtgtgcacgcggccctgcacaaccactacacc ctgaggcgttccctggcaagttttgggtgtgggtgtggatc gttgcgtatagctgttagtacactggcccttatttttctgggt aggaggcggcgttgcgcgcgcgcgcgc ggggccaccctggcaaggcattaccgcctatgcccaccacgc tacgcctccctggcaagtttgcgcgcgcgcgc caggccagaaccaggctataacgcgcgc gatgtttggacaagagacgtggccggccctggatggggggaaagccgaga agaagaaccctcaggaaggcgttacaatgaactgcagaaagat gaggcctacagttagatgggatgaaaggcgagcgcggagggcaagggc gatggccttaccagggttgcgttagtacagccaccaaggacac tacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc 구조물 XIXII_new_cuts_MP71- hBCMA-VH-WL- VL_IgG4_HI_CH3_CD28_CD 3z
90	atggatttccaggtgcagatcttcagttcctgtctgtatccggccagcggtgatc atgagccgcgagggtgcagctgggtggaaatctggcgaggactgggtgcagcctggc ggctctctgagactgtttgtgcgcgcagcggttacacccatcagccgtactgg tttagctgggtgcgcgcaggccctggcaaggggactcgtgtgggtgggagagatc aaccggcagcgcacccatcaactacgccccccagcctgaaggacaaggatcacc atcagcagagacaacgcagaacacccctgtacctgcagatgaacagcctgcgg ggcgaggacacccgcgtactatgtgcgcgcgtactacgactacggcgcac gcctacgatactggggcaggcactactgggtactgttagctccggcagcacc agcggtccggcaagcctggcttgcgcgaggcggcggcggcggcgg atgacacagagccctggccaccctgagcgtgtcccgaggcggaaagagatcaccctg agctgcgaaggccagccagcgtggaaagcaacgtggctggatcagcagaag ccggacaggcttcggccctgatctacgcgcgcgcgcgc atccccggcagggtttccggatctggcagcggcaccggatcacccctgacaatc agcagcctgcagagcggaggacttgcgttagtactgcgcgc tacccctgaccttcggagccggcacaactggagctgaaggagagcaagttac ggccctccctgcccccttgcctggccgcgcgcgc ctgcctccctccaggaaagatgaccaagaaccagggtgtccctgacccctgc gtgaagggttctacccctgcgcgcgcgcgc cctgagaacaactacaagaccaccctcccggtgtggacagcgc ttccctcatacgccggctgaccgtggacaagagccgggtggcaggaaaggc tttagctgcgcgcgtgtgcacgcggccctgcacaaccactacacc ctgaggcgttccctggcaagttttgggtgtgggtgtggatc gttgcgtatagctgttagtacactggcccttatttttctgggt aggaggcggcgttgcgcgcgcgcgc ggggccaccctggcaaggcattaccgcctatgcccaccacgc tacgcctccctggcaagtttgcgcgcgcgc caggccagaaccaggctataacgcgc gatgtttggacaagagacgtggccggccctggatggggggaaagccgaga agaagaaccctcaggaaggcgttacaatgaactgcagaaagat gaggcctacagttagatgggatgaaaggcgagcgcggagggcaagggc gatggccttaccagggttgcgttagtacagccaccaaggacac tacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc 구조물 XIII_new_cuts_MP71- hBCMA-VH-WL- VL_IgG4_HI_CH3_CD28_CD 3z

93	atggattccaggtcagatcttcagttctgtatctccgcgcgtgat atgagccgcgagatcgtagatcgacagacgcgcgcaccctgagcgtgtcccc ggcggaaagagactaccctgagctgcaaggccgcaggcagagcgtggaaagcaacgt gcctggatcagcagaagccggacaggctctcgccccgtatcagcgc agcctgagattcagcggatccccccgcagggtttagcggctctggcagcggcacc gagttcacccgtacaatacgcgcctcgcagcgcaggacttgcgttattac tgccagcgtacaacaactaccctgcacccgcggcaccacgcgtggag ctgaagggcagcaccagcgcgtccggcaagcgcgtggctcggcaggcagcaca aaggagaggtgcagctggtaatctggcggaggactggcgcagctggcgc tctctgagactgttgtgcgcgcgcgcgttccacccgcggtaactggtt agctgggtgcgcgcaggccctggcaaggactcggtggggggagatcaac cccagcgcgcaccatcaactacgcgcgcgcgcgcgtgaaggcacaagttccatc agcagagacaacgcgaagaacaccctgtacttgcgcgcgcgcgc gaggacaccgcgtgtactattgtgcgcgcgcgcgcgc tacgattacttgcgcgcaggcgcactgtgtactttgcgcgcgcgc aagagccgcacaagacccacactgtccccctgtgtccgcgcgc ggccctagcgttctgttccccccaaagcccaaggataccctgtatcgcc cggccccccgcgatcacatcggtggcgtggcgcgcgcgc gtcaagtcaactgtgtacttgcgcgcgcgcgcgcgc ccgcggaggcgcgtacaacacgcgcgcgcgcgc ctgcaccaggactggctgaatggcaggactacaatgtcaaggctccaaacaaa gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc gaaccacagggtgtacaccctgcgcgcgcgcgcgc gtgtccctgacccgcgcgcgcgcgcgc tggcggaggcgcgcgcgcgcgcgc gacaggcgcgcgcgcgcgcgcgc tggcaggcgcgcgcgcgcgcgc cactacacccagaatccctgagcgcgcgcgcgc tggccctctggccgcacccgcgcgcgc ctgtactgcaagcggggcagaagaagactgtgtacatccatcaagcgcgc atgcggccgcgcgcgcgcgc gaggaagaagaaggcgcgcgcgcgc gacgcgcgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgcgcgcgc atggcggcgcgcgcgcgc cagaaagacaagatggccgcgcgc agaagaggcgcgcgcgcgc gacacatgacccgcgcgc 	구조물 XVIIXI_MP71- hBCMA-VL-WL- VH_IgGdelta_CD8_ 4-1BB_CD3z
----	---	--

94	atggatttccaggtcagatcttcagttctgtatctccgcgcgtgatc atgagccgcgaagtgcagctggtaatctggaggaggctggttcagcctgtt ggcagccttaggctcttgcagcctcgcttaccttcacggatattgg ttcagctgggtgagacaggctccaggaaaggctgggtgtggtagggagata aaccggcagcagcagcatcaactatgtccgtcaactgaaagacaatgtcacc atccccgcgataatgccaagaacactctacttgcagatgaaatccccgt gcccggatcagcggttactactgcggcgtctgtactacgactatggggac gcatacgaatattgggacaaggcacactgtgacttttagctccggcagcacc agcggctccggcaaggctggcttggcgaggcagcacaaggagatcgat atgaccaggctccgtctaccctgagcttctccggtaaaaggccacactc agctgcaaggcttcaagcggtggagacaatgtcgccgtatcagcagaaa cctggccaagctccgagagactgtatccgcgtatgcgtttccggc ataccgcacggtttagtggctcagggagtggactgatctactgtacgatt agctcccttcagttagggatctccgttactactgtcagcgtacaacaac tatcccttcacattcggacttggaaaccactgtggacttgcggagcc aagggccgacaaggccacactgtccccctgtctggcccttcagtggt ggcccttgcgttctgtccccccaaaggataccctgatgcgc cggaccggcaagtcatgcgttgggtggacttgcgttgcgttgcgttgcgt gtcaagtcaactgttgcgttggacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt ccggggaggaggactacaacacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt ctgcaccaggactggctgaatggcaaggactacaatgttgcgttgcgttgcgt gccccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaaggccaaaggccagcccc gaaccacagggttacaccctgcggatggacttgcgttgcgttgcgttgcgt gtgtccctgacccctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt tgggagagcaatggccggccgagaacaactacaaggaccacccctgtgctg gacagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt tggcagcggcaacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt cactacacccagaatgtccctgacccctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt tggccctctggccggccctgtggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt ctgtactgcaagcggggcagaaagaagctgttgcgttgcgttgcgttgcgt atgcggccctgtcagaccacccaggaaaggaggacggcttgcgttgcgt gaggaagaagaaggccgtcgagctgtcgccgtgaagtttctagaagcgcc gacccctgcctaccaggccagaaccagactgttacaaccgagcttgcgttgcgt ggcagacggaaaggactacgactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt atggcggcaaggctagaagaaaggcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt cagaaagacaagatggccggccatcagcgagatcgaaatgaagggcgagcgg agaagaggcaaggccacatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt gacacatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 	구조물 XVII_XVII_MP71- hBCMA-VH-WL- VL_IgGdelta_CD8_4- 1BB_CD3z_no_opt
----	--	--

[0270] 본 발명의 추가 양태는 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자, 바람직하게는 바이러스 벡터, 보다 바람직하게는 감마 레트로바이러스 벡터를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0271] 본 발명의 추가 양태는 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 면역 세포에 관한 것으로, 상기 면역 세포는 T 림프구 또는 NK 세포, 보다 바람직하게는 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0272] 바람직한 실시예에서 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하는 상기 유전적으로 변형된 면역세포는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포, 바람직하게는 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 혼합물인 것을 특징으로 한다. 이러한 T 세포 집단 및 바람직하게는 CD4+ 및 CD8+ 형질 전환 세포를 모두 포함하는 조성물은 다중 골수종 및 B-NHL과 같은 다양한 악성 B 세포에 대해, 바람직하게는 본원에 기재된 그러한 세포 및/또는 관련된 의학적 증상에 대해 특히 효과적인 세포 용해 활성을 나타낸다.

[0273] 본 발명의 추가 양태는 형질 세포, 기억 B 세포 및/또는 성숙 B 세포, 특히 다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프 종과 같은, 병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료에서의 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 면역 세포에 관한 것이다.

[0274] 일 실시 예에서, 상기 면역 세포의 의학적 용도는 치료될 의학적 장애가 다발성 골수종인 것을 특징으로 한다.

[0275] 일 실시 예에서, 상기 면역 세포의 의학적 용도는 치료될 의학적 장애가 비-호지킨 림프종인 것을 특징으로 한다.

[0276] 실시 예에서, 상기 면역 세포의 의학적 용도는 치료될 의학적 장애가 병원성 성숙한 B 세포와 관련되어 있는 것

을 특징으로 한다. 발명자의 지식에 따라, 본원에 기술된 바와 같이, 당업계에서 그러한 성숙한 B 세포가 BCMA CAR-T에 의해 효과적으로 표적화될 수 있음을 개시하는 것은 명백하게 없다. 아래의 실시 예에서 입증된 일부 테스트된 종양 세포주는 성숙한 B 세포와 관련이 있으며 반드시 기억 유형이 아니다. 이에 비해 미성숙 B 세포는 급성 림프성 백혈병을 일으키는 세포이다. 따라서, 본 발명은 치료를 필요로하는 대상에게 본 발명의 CAR을 포함하는 치료적 유효량의 CAR 또는 치료제를 투여하는 것을 포함하여, 본원에 개시된 의학적 장애에 대한 치료 방법을 포함한다.

[0277] 본 발명의 추가의 양태는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 CAR 또는 본원에 기재된 CAR을 포함하는 치료제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0278] 본 발명은 본 명세서에 개시된 실시예 및 도면에 의해 실시예로서 설명된다. 본 명세서에 제공된 도면은 본 발명의 특정 실시예를 나타내며 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 도면들은 하나 이상의 비 한정적인 실시예들의 기술적인 지지를 향상시키는 가능한 및 잠재적으로 가능한 실시예들의 추가 설명을 제공하는 것으로 간주되어야한다.

도 1: 바람직한 CAR 구조의 개략도.

도 2: 바람직한 CAR 구조체 IX, X; XI, XV, XVI, XVII의 개략도.

도 3: 본원에 설명된 상기 CAR의 다양한 구조 요소의 바람직한 구성 및 잠재 조합 목록.

도 4: mAb 결합 영역과 본 발명의 CAR에서 사용된 바람직한 인간화 서열 사이의 서열 비교.

도 5: BCMA-CAR 서열을 갖는 GeneArtTM 플라스미드.

도 6: 제한(restriction) 후 구조 및 벡터의 젤 전기 영동.

도 7: 레트로바이러스 형질 도입 후의 인간 T 세포상의 BCMA CAR-발현 확인: CAR 발현, 구조물 IX-XII, CD19, SP6.

도 8: 상이한 표적 세포주를 갖는 CAR-형질 감염된 인간 T 세포의 공생-배양은 별개의 BCMA⁺ 다발성 골수종(MM) 및 B-NHL 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 나타낸다. 기능적 시험관 공생-배양 및 IFN-감마 ELISA.

도 9: 다발성 골수종 세포와 함께 공생-배양된 CAR-T 세포의 CD107a(LAMP1) 염색: 유동 세포 계측법에 의한 항원 특이적(BCMA) 자극시 활성화된 탈과립 CD8⁺ T 세포의 검출. FACS에 의해 결정된, 기능적 시험 관내 공생-배양 및 LAMP1 검출.

도 10: 세포 독성 분석은 BCMA-선행 세포주의 선택적 사멸을 나타낸다; 본질적으로 BCMA-음성 세포주에서는 사멸이 관찰되지 않았다. 기능적인 시험관 공생-배양 및 51Cr 방출 분석.

도 11: 기능적 분석(functional assay)에서 평가된 세포 유형에 대한 BCMA 및 CD19 발현. 항-BCMA 및 항-CD19 염색과 함께 PBMCs로부터의 MACS-기반 B- 세포 단리 결과가 또한 제시된다.

도 12: CAR의 scFV와 BCMA 에피토프 간의 결합 상호 작용의 개략도.

도 13: J22.9-xi와 비교된 HC의 바람직한 인간화된 서열의 서열 정렬.

도 14: J22.9-xi와 비교된 LC의 바람직한 인간화된 서열의 서열 정렬.

도 15: BCMA 재지향된 CAR-T 세포는 이종 이식된(xenografted) NSG 마우스 모델에서 MM 종양에 대해 효과적이다. (A) 이종 이식된 NSG 마우스 모델에서 MM 종양의 생작(Engraftment). 마우스는 MM.1S 세포의 i.v. 이식에 의하여 도전되었다. 종양 접종 후 8일째 종양 세포 성장을 IVIS 영상으로 시각화 하였다. 종양 부담(tumor burden)을 측정하기 위해 영상을 300초(day -1)로 연장했다. (B) 치료 효능을 지켜보고 더 나은 설명을 위한 생물 발광 강도를 줄이기 위해 (A)에서와 같은 마우스를 다시 day -1에서 30초 동안 이미지화했다. CAR-T 세포 전달, 대조군 SP6 CAR-T 세포(n = 4) 및 BCMA CAR-T 세포(n = 6) 이후의 후속 IVIS 노출은 day -1과 가장 높은 강도를 갖는 day 17 사이의 더 나은 비교를 가능하게하기 위해 30초동안 수행되었다. 화이트 크로스, 동물은 선진 질병 및 동물 보호법 때문에 희생되었다. (C) 각 마우스의 전체 몸을 포함하는 관심 영역으로부터 얻어

진 생물 발광 신호 강도의 평균값이 각각의 시점에서 각 그룹에 대해 플롯된다.

도 16: BCMA 재지향된 CAR-T 세포는 이종 이식된 NSG 마우스 모델에서 B-NHL 종양에 대해 효과적이다. (A) 이종 이식된 NSG 마우스 모델에서 맨틀 세포 림프종의 생착. 마우스는 6×10^5 JeKo-1 세포의 i.v. 이식에 의해 도전되었다. 종양 접종 후 7일째에 종양 세포 성장을 IVIS 영상화로 시각화 하였다. IVIS 노출, 120초. (B) 치료 효능 지켜보고 더 나은 설명을 위한 생물발광(bioluminescence) 세기를 스케일 다운하기 위해, (A)에서와 같은 마우스를 다시 0일째에 30초 동안 이미지화하였다. CAR-T 세포 전달, 대조군 SP6 CAR-T 세포($n = 7$) 및 BCMA CAR-T 세포($n = 7$) 이후의 후속 IVIS 노출을 day 0 및 가장 높은 강도를 갖는 day 16 사이의 더 나은 비교를 가능하게 하기 위해 30초동안 수행하였다. (C) 각 마우스의 전체 몸을 포함하는 관심 영역으로부터 얻어진 생물 발광 신호 강도의 평균값이 각각의 시점에서 각 그룹에 대해 플롯된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0279]

형질세포종(plasmacytoma)이라고도 불리는 다발성 골수종(multiple myeloma)은 악성(malignantly) 형질전환 플라스마 세포 클론으로부터 유래된 현재는 치료가 불가능한 B 세포 림프종이다. 이 질환은 뼈와 골수의 가장 빈번한 종양을 구성하고 평균 기대 수명이 7년이며 암으로 인한 연간 사망의 2%를 담당한다. 악성 형질전환은 B 세포가 VDJ-재배열 및 이소타입 스위칭을 완료한 발달 단계에서 2차 림프 기관의 배중심(germinal center)에서 발생하는 것으로 여겨진다. 진단시 평균 연령은 70세이며 많은 환자에서 접종 및 장기간의 화학- 또는 방사선 치료를 배제하는 공존질환(co-morbidities)이 존재함을 나타낸다. 또한, 동종(allogeneic) 골수 이식은 대개 이 환자 접단에서 제외된다. 이 질환은 골용해 병변(osteolytic lesion), 고칼슘혈증(Hypercalcemia), 조혈 기능 부전(hematopoietic insufficiency), 아밀로이드 침착(amyloid deposition), 신부전(renal failure), 과도한 항체 중쇄 및/또는 경쇄 생산, 고점도(hyperviscosity), 감염, 출혈 질환으로 특징지어진다. 치료 기준은 단독 또는 자가 줄기세포 이식과 조합된 화학 요법, IMIDs(immunomodulatory drugs), 국부 조사(local irradiation), 프로테아좀 억제제(proteasome inhibitor)와 같은 면역 조절제, 및 몇몇 환자에게 동종이계 줄기세포 이식이 있다. 앞서 언급한 양식으로 접종 치료에도 불구하고, 상기 질병은 일반적으로 재발하고 치료법의 다중 라인(multiple line) 이후에 1차 및 2차 저항이 발생한다.

[0280]

B 세포 성숙화 항원(BCMA)을 표적으로 하는 본원에서 기술된 입양(adoptive) 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포 치료법은 다발성 골수종에서 이러한 한계를 극복할 수 있다. 왜냐하면, BCMA는 다발성 골수종 종양 세포에서 높게 발현되지만 정상 B 세포 또는 전구체 B 세포에서는 그렇지 않기 때문이다. 두 번째로 항-CD19 항체 또는 항-CD19 CAR-T 세포 치료법은 B 세포 비-호지킨 림프종(B cell non-Hodgkin lymphoma, B-NHL)에 대한 저항성이 항원 소실로 인해 발생한다. 치료 저항성은 이러한 B-NHL에서 다중 라인의 화학-/면역 요법 후에 발생하기 때문에 대체 표적 구조가 보장된다. 성숙한 B-NHL의 경우, BCMA가 적절한 표적이며 따라서 높은 친화도를 갖는 항-BCMA CAR-T 세포는 하기에 명시된 바와 같이 B-NHL에서도 치료학적으로 사용될 수 있다.

[0281]

BCMA CAR-T 세포 전달은 종양 관련 항원 BCMA에 대해 선택적이며, 고령자 및 다중약물 내성이 나타난 후에도 적용 가능하고 효과적이다. 그들은 예측 가능하고, 용납될 수 있고 다루기 쉬운 부작용을 갖는다. 항-BCMA CAR을 포함하는 자가(Autologous) T 세포는 높은 친화도 및 결합력을 가지며 T 세포, B 세포 및 골수 전구체와 같은 정상적인 조혈 세포를 보존하면서 다발성 골수종 세포를 인식하고 파괴한다; 모든 골수성 세포(myeloid cell) 및 NK 세포는 마찬가지로 절약된다. T 세포의 자가 전달로 인해 이식 편대 숙주 질환이 발생할 수 없다. 재발 예방에 중요한 기억 T 세포가 형성될 수 있다. 항-BCMA CAR-T 세포의 높은 친화도 및 결합력으로 인해, 심지어 낮은 BCMA-발현 성숙 B 세포 NHL이 인지될 수 있고, T 세포 활성화 및 종양 세포 사멸을 허용할 수 있다. 그러한 성숙한 B-NHL 개체(entities)는 소포성 림프종(follicular lymphoma), 광범위 큰 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 외투 세포 림프종(Mantle cell lymphoma) 및 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)의 특정 단계를 포함한다.

[0282]

본원에 기재된 항-BCMA CAR-T 세포는 일부 실시 양태에서 다른 치료법에 적합하지 않은 다발성 골수종 및 B-NHL 환자에게 적용 가능하다. 더 구체적으로: i) 다중약물 저항성 환자, ii) 동종이계(allogeneic) 줄기세포 이식에 적합하지 않은 환자, iii) 추가 화학 요법을 배제하는 공존질환(co-morbidities)이 있는 환자, iv) 화학 요법을 견디지 못하는 노인 환자, v) 상기 CAR은 진행성 질환과 기타 표준 치료 요법의 다중 라인이 실패한 후에도 구제 요법으로 적용 가능하며, vi) 항체가 실패할 수 있는 표적 종양 세포에서 매우 낮은 항원 밀도에서도 적용 가능하며, vii) 거의 원자 해상(near atomic resolution) BCMA와 복합된 기원 항체(source antibody)의 구조가 다른 항-BCMA CAR-T 세포에는 나타나지 않는 정교한 특수성(exquisite specificity), 생물 안전성 특징을 겸종

하고 및/또는 vii) 항체의 경우가 아닌 단일 요법으로 적용 가능하다.

[0283] 당해 기술 분야에 기재된 다른 항-BCMA CAR-T 세포에 대하여, 이들의 반응성은 다중 골수종 세포 및 환자에게만 나타났다; 대조적으로, 우리의 항-BCMA CAR는 낮은 BCMA 발현 B-NHL 세포주에 대해 조차도 예기치 않게 높은 민감도(sensitivity)를 갖는다. 우리의 항-BCMA CAR는 항종양 효능에 필요한 T 세포에 매우 높은 결합력을 부여한다. 성숙한 B-NHL, 소포성 림프종(follicular lymphoma), 광범위 큰 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 외투 세포 림프종(Mantle cell lymphoma) 및 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)의 정의된 단계에 대해 반응하는 다른 항-BCMA CAR은 보고된 바 없다. 본 발명은 우리의 항-BCMA CAR이 생리학적 B 세포, T 세포, NK 세포, 내피세포, 모든 골수 세포 계통 및 이들의 전구체에 대해 T 세포-반응성을 부여하지 않음을 입증한다. 따라서, 본 발명은 다른 조혈 조직에 대한 전례 없는 낮은 오프-타겟 반응성(low off-target reactivity)을 갖는다. 항-CD38 CAR-T 세포와 달리 우리의 항-BCMA CAR는 골수 세포 전구체에 대한 원치 않는 반응성을 가지고 있지 않는다.

[0284] WO/2015/166073 및 WO/2014/068079에서 이전에 기술된 바와 같은 scFV 단편의 아미노산 서열은 i) 트랜스 멤브레인 수용체 구조와 관련하여 폴딩 및 발현을 가능하게 하기 위하여 변형되었다; ii) 경쇄 및 중쇄 단편의 순서가 역전되고, iii) 중쇄와 경쇄 사이의 링커 서열이 길어졌다. 변형은 T 세포에 충분한 표면 발현을 가능하게 하고 적절한 항원 결합을 유지한다.

[0285] CAR-T 세포 구조물의 scFv 부분에 대한 항체 주형인 원래 FSY IgG의 낮은 나노 몰 친화력으로 인해, 본 발명은 바람직한 실시 양태에서 특이적으로 높은 친화성을 가지며 T 세포에 매우 높은 특이성 및 결합력을 부여한다는 점에 특징이 있다. 높은 친화도 및 높은 결합력으로 인해 CAR-T 세포가 i) 인식, ii) 활성화될 수 있으며, iii) BCMA 표면 발현이 높은 중간, 낮은 중양 표적 세포를 죽일 수 있다. 선행 기술의 전술한 항-BCMA CAR 중 어느 것도 다발성 골수종 세포 이외의 B-NHL에 대한 반응성이 입증되지 않았다. 따라서, 본 발명의 항-BCMA CAR은 낮은 수준/수의 BCMA 분자를 갖는 B-NHL의 전례 없는 다양성에 대항하는 특이적이며 매우 활성인 시약이다.

[0286] 레트로바이러스 백터, 바람직하게는 MP71-백터 및 감마-레트로바이러스 발현 시스템과 조합하여, 인간 T 세포에 대한 비정상적으로 높은 형질 도입률이 달성될 수 있다.

[0287] 본 발명의 또 다른 뛰렷한 이점은 CAR의 scFv 단편에 의해 인식되는 BCMA 에피토프에 대한 상세한 지식이다. 지금까지 BCMA 에피토프를 확인한 다른 항체 기반의 발명이나 공개는 없었다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 항-BCMA CAR은 생체 내 및 시험관 내에서 실질적으로 보다 높은 바이오 안전성 프로파일을 나타내고 및 공지된 오프-타겟 반응성을 나타내지 않는다.

[0288] 또한, 본 발명자는 임상적으로 적용 가능한 항-BCMA CAR의 모듈 조성물(modular composition)을 허용하는 쉬운 3단계 클로닝에서 CAR 구조체의 신호전달 구성요소(signaling component)를 교환하였다.

[0289] 시험관 내 공동 배양 시스템에서, 본 발명의 항-BCMA CAR-T 세포는 BCMA-발현 인간 B-NHL 및 다발성 골수종 종양 세포주에 노출시 활성화된다. 이 T 세포는 세포 독성 활성을 예측하는 표현형인 IFN-감마를 높은 수준으로 분비하는 이펙터 표현형(effectector phenotype)을 생성한다.

[0290] 전임상 평가는 i) 환자의 적절한 B-NHL 세포주 및 1차 골수종 세포(primary myeloma cell)에 대한 시험관 내 세포 독성 시험, ii) 이종이식된(xenotransplanted) B-NHL 및 다발성 골수종 세포주에 대한 항-BCMA CAR 활성의 생체 내 시험을 포함한다.

[0291] 생체 내에서의 인간 환경에서, 다음의 특징을 갖는 골수종 환자는 임상 1상 시험을 통해 평가된다: i) 다중약물 저항성 환자, ii) 동종이계(allogeneic) 줄기세포 이식에 적합하지 않은 환자, iii) 추가 화학 요법을 배제하는 공존질환(co-morbidities)이 있는 환자, iv) 화학 요법을 견디지 못하는 노인 환자, v) 진행성 질환(progressive disease)이 나타난 후 구제 요법을 위한 환자, vi) 기타 치료 요법의 다중 라인이 실패한 환자, vii) 자가 줄기세포 이식 후 진행성 질환이 있는 환자, viii) 동종이계 줄기세포 이식 후 진행성 질환이 있는 환자, ix) 동종이계 줄기세포 이식 전에 교락 요법(bridging therapy)으로서.

[0292] 또한, 인간의 환경에서 다음과 같은 특징을 가진 소포성 림프종(follicular lymphoma), 광범위 큰 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 외투 세포 림프종(Mantle cell lymphoma) 및 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia) B-NHL 환자는 임상 1상 연구에서 평가된다; i) 다중약물 저항성 환자, ii) 동종이계(allogeneic) 줄기세포 이식에 적합하지 않은 환자, iii) 추가 화학 요법을 배제하는 공존질환(co-morbidities)이 있는 환자, iv) 화학 요법을 견디지 못하는 노인 환자, v) 진행성 질환이 나타나고 여러 표준 치료 요법이 실패한 후 구제 요법을 위한 환자, vi) 자가 줄기세포 이식 후 진행성 질환이 있는 환자, vii) 동

종이계 줄기세포 이식 후 진행성 질환이 있는 환자, viii) 동종이계 줄기세포 이식 전에 교락 요법(bridging therapy)으로서, ix) 종양 세포에서 CD19 및/또는 CD20의 회피 변이체(escape variant) 또는 돌연변이체를 나타내는 환자, 현재의 항체 요법(항 CD20, 리툭시맙, 항 CD19, 올레투주맙(Oletuzumab), BITE CD19/CD3, 블리마투모맙(Blimatumomab)) 또는 항 CD19 CAR 치료법은 그들의 표적 구조를 상실/하향 조절하여 효과적이지 않게 한다.

[0293] 본 발명의 또 다른 놀라운 측면은 본원에 개시된 CAR의 개선된 안정성이다. CAR 폴리펩티드는 결합 친화도의 손실 없이 적절한 조건하에서 장시간 동안 쉽게 저장될 수 있다.

키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptors):

CAR은 항체로부터 유래된 세포외 엑토도메인(extracellular ectodomain) 및 T 세포 신호 전달 단백질로부터 유도된 신호 전달 모듈을 포함하는 엔도도메인(endodomain)으로 구성된다. 바람직한 실시 예에서, 엑토도메인은 바람직하게는 단일-쇄 가변 단편(scFv)으로 구성된 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄로부터의 가변 영역을 포함한다. scFv는 유연성(flexibility)을 제공하고 고정 막 횡단 모이어티(anchoring transmembrane moiety)를 통해 세포 내 신호 전달 도메인으로 신호를 전달하는 헌지 영역에 부착되는 것이 바람직하다. 막 횡단 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 보조 자극 도메인을 장착하고 있다. 3세대 CAR은 이미 2개의 보조자극(costimulatory) 도메인, 예를 들어 CD28, 4-1BB, ICOS 또는 OX40, CD3 제타를 포함한다. 본 발명은 바람직하게는 제2 또는 제3세대 CAR에 관한 것이다.

[0296] 다양한 실시 예에서, B 세포를 향한 면역 이펙터 세포(effectector cell)의 세포 독성을 재지향(redirect)하는 유전 공학 수용체가 제공된다. 유전 공학 수용체는 본원에서 키메라 항원 수용체(CAR)로 지칭된다. CAR은 특정 항-BCMA 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하기 위하여 원하는 항원(예: BCMA)에 대한 항체-기반 특이성(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.

[0297] 본원에서 고려되는 CAR은 BCMA에 결합하는 세포 외 도메인(결합 도메인 또는 항원-결합 도메인으로도 지칭 됨), 막 횡단 도메인, 및 세포 내 도메인, 또는 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다. 표적 세포의 표면상의 BCMA와 상기 CAR의 항-BCMA 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 증재할 수 있는 분자의 생산을 촉진하고, 단일클론 항체, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공동 수용체(co-receptor)의 세포 특이적 표적화 능력을 이용한다.

[0298] 다양한 실시 예에서, CAR은 인간화된 BCMA-특이적 결합 도메인을 포함하는 세포 외 결합 도메인; 막 횡단 도메인; 하나 이상의 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시 예에서, CAR은 인간화된 항-BCMA 항원 결합 단편을 포함하는 세포 외 결합 도메인; 하나 이상의 스페이서 도메인; 막 횡단 도메인; 하나 이상의 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0299] "세포 외 항원-결합 도메인" 또는 "세포 외 결합 도메인"은 상호 교환 가능하게 사용되며, 관심 표적 항원인 BCMA에 특이적으로 결합하는 능력을 CAR에 제공한다. 결합 도메인은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합원으로부터 유래할 수 있다. ScFV 도메인이 선호된다.

[0300] "특이적 결합"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 BCMA에 항-BCMA 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.

[0301] "항원(Ag)"은 동물에서 항체 또는 T 세포 반응의 생성을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 물질을 의미한다. 특정 실시 예에서, 상기 표적 항원은 BCMA 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.

[0302] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 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. 바람직한 실시 예에서, 본원에서 고려된 CAR은 scFv인 항원 특이적 결합 도메인을 포함하고, 쥐, 인간 또는 인간화된 scFv일 수 있다. 단일 사슬 항체는 원하는 표적에 특이적인 하이브리도마의 V 영역 유전자로부터 클로닝 될 수 있다. 특정 실시 예에서, 인간 BCMA 폴리펩티드를 결합하는 인간화된 scFv인 항원 특이적 결합 도메인. 본원에서 고려되는 항-BCMA CAR을 구성하는데 적합한 가변 중쇄의 예로는, SEQ ID NO. 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 본원에서 고려되는 항-BCMA CAR을 구성하는데 적합한 가변 경쇄의 예시는 SEQ ID NO. 12에 기재된 아미노산 서열을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0303] 항체 및 항체 단편(Antibodies and antibody fragments):

[0304] 상기 CAR은 B 세포 성숙화 항원(BCMA) 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, 모노클론날, 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(triabody), 4가 항체 및 웨პ티드와 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.

[0305] 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)를 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 접합 되거나 발현될 수 있다.

[0306] 본 발명의 CAR은 포유동물, 특히 인간의 단백질 표적에 대해 결합하기 위한 것이다. 단백질 이름의 사용은 마우스 또는 인간 버전의 단백질에 해당할 수 있다.

[0307] 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 플라스몬 공명 장치를 사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0308] 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 뉴클레오티드 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.

[0309] 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 불면 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, 과자-디스플레이 방법을 사용하여 수득할 수 있다(WO 91/17271; WO 92/01047).

[0310] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 인간화된 항체는 또한 비-인간 면역 글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 포함하는 특정 키메라 면역 글로불린, 면역 글로불린 쇄 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.

[0311] 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 당 업계에 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.

가변 영역 및 CDR(Variable Regions and CDRs)

[0313] 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 사슬 내의 CDR은 FR에 의해 근접하여 함께 유지되고, 다른 쇄의 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다.

[0314] 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(Al-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 이를 접근법의 조합에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다.

[0315] 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).

CAR의 추가 구성요소(Additional components of the CAR)

[0317] 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 추가된 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 길

이는 약 1 내지 약 25개의 아미노산, 약 5 내지 약 20개의 아미노산, 또는 약 10 내지 약 20개의 아미노산, 또는 임의의 중간 길이의 아미노산이다.

[0318] 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.

[0319] 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. 스페이서 도메인은 자연 발생 면역 글로불린 헌지 영역 또는 변경된 면역 글로불린 헌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일 실시 예에서, 스페이서 도메인은 IgG1 또는 IgG4의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0320] 일부 실시 예에서 상기 CAR의 결합 도메인은 하나 이상의 "헌지 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 막 횡단 도메인(TM) 사이에 하나 이상의 헌지 도메인을 포함할 수 있다. 헌지 도메인은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합 공급원으로부터 유도될 수 있다. 헌지 도메인은 자연 발생 면역 글로불린 헌지 영역 또는 변경된 면역 글로불린 헌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 CAR에서의 사용에 적합한 예시적인 헌지 도메인은 야생형 헌지 영역일 수 있는 CD8 알파, CD4, CD28, PD1, CD152 및 CD7과 같은 타입 1 막단백질의 세포 외 영역으로부터 유래된 헌지 영역을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 헌지 도메인은 PD1, CD 152 또는 CD8 알파 헌지 영역을 포함한다.

[0321] "막 횡단 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 재조합 원으로부터 유래될 수 있다. TM 도메인은 T- 세포 수용체, CD3 ε, CD3 ζ, CD4, CD5, CD8 alpha, 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 쇄로부터 유도될 수 있다. 일 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR은 CD8 알파 또는 CD28로부터 유도된 TM 도메인을 포함한다.

[0322] 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 BCMA 폴리펩티드에 효과적인 항-BCMA CAR 결합의 메시지를 전달하는 데 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.

[0323] 본원에서 고려되는 CAR은 CAR 수용체를 발현하는 T 세포의 효능, 확장 및/또는 기억 형성을 향상시키기 위한 하나 이상의 보조-자극 신호 도메인을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "보조-자극 신호 도메인"은 보조 자극 분자의 세포 내 신호 도메인을 의미한다. 보조-자극 분자는 항원 수용체 또는 Fc 수용체 이외의 세포 표면 분자로서 항원 결합시 T 림프구의 효율적인 활성화 및 기능에 필요한 제2신호를 제공한다.

폴리펩티드(Polypeptides)

[0324] "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 변역 후 변형, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등뿐만 아니라 당업계에 공지된 자연 발생 및 비-자연 발생의 다른 변형을 포함할 수 있다.

[0326] 다양한 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR 폴리펩티드는 단백질의 N-말단에 신호(또는 리더) 서열을 포함하고, 이 단백질은 동시 변역 또는 후-변역에 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.

[0327] 본원에서 사용되는 "분리된 펩티드" 또는 "분리된 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, "분리된 세포"는 생체 내 조직 또는 기관으로부터 얻어지며 실질적으로 세포 외 기질이 없는 세포를 말한다.

핵산(Nucleic acids)

[0329] 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.

[0330] 폴리뉴클레오티드는 당해 기술분야에 공지되고 이용가능한 임의의 다양한 잘 확립된 기술을 사용하여 제조, 조작 및/또는 발현시킬 수 있다. 원하는 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 적절한 벡터에 삽입할 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 자가 복제 서열 및 전이 요소이다. 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(렌티 바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예: 헤르페스 심플렉스 바이러스), 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 파필로마바이러스 및 파보바바이러스(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. 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 임의 수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다.

벡터(Vectors)

[0332] 특정 실시 예에서, 세포(예를 들어, T 세포와 같은 면역 이팩터 세포)는 CAR을 인코딩하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 렌티 바이러스 벡터로 형질 도입된다. 예를 들어, 면역 이팩터 세포는 트랜스 멤브레인 및 세포 내 신호 전달 영역을 갖는 BCMA 폴리펩티드와 결합하는 인간화된 항-BCMA 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 CAR을 인코딩하는 벡터로 형질 도입된다. 이러한 형질 도입된 세포는 CAR-매개 세포 독성 반응을 유도할 수 있다.

[0333] 레트로바이러스는 유전자 전달을 위한 일반적인 도구이다. 구체적인 실시 예에서, 레트로바이러스를 사용하여 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 세포로 전달한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "레트로바이러스"는 이의 계놈 RNA를 선형 이중 가닥 DNA 카피로 역전사 시킨 후 이의 계놈 DNA를 숙주 계놈으로 공유적으로 통합시키는 RNA 바이러스를 의미한다. 바이러스가 숙주 계놈에 통합되면, 이를 "프로바이러스"라고 한다. 프로바이러스는 RNA 중합효소 II에 대한 주형으로서 제공되어 새로운 바이러스 입자를 생성하는데 필요한 구조 단백질 및 효소를 코딩하는 RNA 분자의 발현을 지정한다.

[0334] 구체적인 실시형태에서 사용을 위해 적합한 예시적인 레트로바이러스는 제한 없이, 몰로니 쥐과 동물 백혈병 바이러스(M-MuLV), 몰로니 쥐과 동물 육종 바이러스(MoMSV), 하비 쥐과 동물 육종 바이러스(HaMuSV), 쥐과 동물 유방 종양 바이러스(MuMTV), 기본 원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(FLV), 스푸마바이러스, 프리엔드 쥐과 동물 백혈병 바이러스, 쥐과 동물 줄기세포 바이러스(MSCV) 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 및 렌티 바이러스를 포함한다.

[0335] 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. 구체적인 실시 예에서, 렌티 바이러스는 CAR을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 세포로 전달하는데 사용된다.

[0336] 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 자정하는 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 결합 레트로바이러스 및 렌티 바이러스를 포함한다.

[0337] 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. 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.

[0338] 따라서, 바람직한 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. 바람직한 실시 예에서, CAR-인코딩 서열은 트랜스포존 서열의 옆에 위치하며, 트랜스포존의 존재는 인코딩 서열이 형질 전환된 세포의 계놈에 통합되는 것을 허용한다.

[0339] 일부 실시 예에서, 세포는 형질감염된 세포의 유전체 내로 CAR 코딩 서열의 통합을 용이하게 하는 유전자전위효소(transposase)로 추가로 형질감염된다. 일부 실시 예에서, 유전자전위효소는 DNA 발현 벡터로서 제공된다. 하지만, 바람직한 실시 예에서, 유전자전위효소는 유전자전위효소의 장기간 발현이 유전자도입 세포에서 발생하지 않도록 발현가능 RNA 또는 단백질로서 제공된다. 가령, 일부 실시 예에서, 유전자전위효소는 mRNA(가령, 캡 및 폴리-A 꼬리를 포함하는 mRNA)로서 제공된다. 임의의 유전자전위효소 시스템이 구체예에 따라 이용될 수 있다. 하지만, 일부 실시 예에서, 유전자전위효소는 연어파-유형 Tc1-유사 유전자전위효소(SB)이다. 가령, 유전자전위효소는 이른바 "잠자는 미녀" 유전자전위효소일 수 있고, 예로서 본원에 참조로서 편입된 U.S. 특허 6,489,458을 참조한다. 일정한 실시 예에서, 유전자전위효소는 증가된 효소적 활성을 갖는 가공된 효소이다. 유전자전위효소의 일부 특정한 실시 예는 제한 없이, SB10, SB11 또는 SB100x 유전자전위효소를 포함한다(가령, 본원에 참조로서 편입된 Mates et al., 2009를 참조한다). 가령, 방법은 SB10, SB11 또는 SB100x 유전자전위효소를 인코딩하는 mRNA로 세포의 전기친공을 수반할 수 있다.

서열 변이체(Sequence Variants):

[0341] 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 뉴클레오티드 또는 아미노산의 백분율과 관련된다.

[0342] 인용 "서열 동일성" 또는, 예를 들면, "와 50% 동일한 서열"은, 본원에 사용된 바와 같이, 서열이 비교 원도우에 걸쳐 뉴클레오티드 단위끼리 또는 아미노산 단위끼리 동일한 정도를 지칭한다. 따라서, "서열 동일성의 퍼센트"는, 비교 원도우에 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 원도우(예: 원도우 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 뉴클레오티드 및 폴리펩티드가 포함된다.

[0343]

유전자 암호의 축퇴성의 결과로서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 뉴클레오티드 서열이 존재한다는 것은 당업자에게 이해될 것이다. 이를 폴리뉴클레오티드 중 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오티드 서열과 최소의 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다. 그럼에도 불구하고 코돈 사용의 차이로 인해 달라지는 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 의해 구체적으로 고려된다. 또한, 기술된 서열 동일성의 영향을 받는 서열의 결실, 치환 및 다른 변화는 본 발명에 포함된다. 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 공지되어 있다. 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.

[0344]

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.

[0345]

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 3

[0346]

본래 잔기	바람직한 보존성 치환	예시적인 치환의 예
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Asg (R)	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

[0347]

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 효과

가 현저하게 다른 치환을 선택함으로써 달성된다.

[0348] 보존적 아미노산 치환은 천연 아미노산에 한정되지 않고 합성 아미노산도 포함한다. 일반적으로 사용되는 합성 아미노산은 다양한 쇄 길이의 오메가 아미노산과 중성 비-극성 유사체인 시클로헥실 알라닌; 중성 비-극성 유사체(analog)인 시트룰린 및 메티오닌 슬록시드, 방향족 중성 유사체인 페닐글리신; 음전하를 띤 유사체인 시스테인 산 및 양전하를 띤 아미노산 유사체인 오르니틴이다. 자연적으로 발생하는 아미노산과 마찬가지로, 이 목록은 포괄적인 것이 아니라, 당업계에 공지된 치환의 예시일 뿐이다.

[0349] 유전자 변형된 세포 및 면역 세포(*Genetically modified cells and Immune cells*)

[0350] 특정 실시 예에서, 본 발명은 B 세포와 관련된 상태의 치료에 사용을 위해, 본 명세서에서 고려되는 CAR을 발현하도록 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 변형된 세포", "변형된 세포" 및 "재지정된 세포"는 상호교환적으로 사용된다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "유전자 요법"은 치료적 폴리펩티드, 예를 들어 CAR을 발현시키는 목적을 위해, 또는 유전자의 발현을 복원, 교정, 또는 변형하는 세포내 전체 유전자 물질에 DNA 또는 RNA 형태의 추가의 유전자 물질의 도입을 의미한다. 특정 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR은 관심 대상 표적 항원, 예를 들어 BCMA 폴리펩티드에 그들의 특이성을 재지향(redirect)시키기 위해 면역 이펙터 세포에 도입되고 발현된다. "면역 세포" 또는 "면역 효과기 세포"는 하나 이상의 이펙터 기능(예를 들어, 세포독성 세포 사멸 활성, 사이토카인의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는 면역계의 임의 세포이다.

[0351] 면역 효과기 세포는 자기/자생적("자기") 또는 비자가("비자기", 예를 들어 동종이계, 동계 또는 이종 발생)일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "자기(Autologous)"는 동일 대상체에서 유래된 세포를 의미하고, 본 발명의 바람직한 실시 예를 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 "동종이계(Allogeneic)"는 비교시 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. 바람직한 실시 예에서, 본 발명의 세포는 자가 또는 동종이계이다.

[0352] 본 명세서에서 고려되는 CAR과 사용되는 예시적인 면역 효과기 세포는 T 림프구를 포함한다. 용어 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 당업계에서 인식되며 흉선세포, 미성숙 T 림프구, 성숙한 T 림프구, 휴지 T 림프구, 또는 활성화된 T 림프구를 포함하고자 한다. T 세포는 T 헬퍼(Th) 세포, 예를 들어 T 헬퍼 1(Th1) 또는 T 헬퍼 2(Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 헬퍼 T 세포(HTL; CD4+ T 세포) CD4+ T 세포, 세포독성 T 세포(CTL; CD8+ T 세포), CD4+ CD8+ T 세포, CD4- CD8- T 세포, 또는 T 세포의 임의의 다른 서브셋일 수 있다. 구체적인 실시 예에서 사용하기 적합한 T 세포의 다른 예시적인 개체군은 나이브 T 세포 및 기억 T 세포를 포함한다. 예를 들어, 자가 세포 이식 후 환자에게 다시 도입될 때, 본원에 기재된 본 발명의 CAR로 변형된 T 세포는 종양 세포를 인식하고 죽일 수 있다. CIK 세포는 다른 T 세포와 비교하여 향상된 세포 독성 활성을 가질 수 있으며, 따라서 본 발명의 면역 세포의 바람직한 구체 예를 나타낸다.

[0353] 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 시험관내에서 면역 이펙터 세포로 분화되도록 유도될 수 있다.

[0354] 본 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.

[0355] 특정 실시 예에서, 본원에 기재된 면역 이펙터 세포의 시험 관내 조작 또는 유전 적 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 당업자에

계 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 절절한 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 당분야에 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.

[0356] 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 칙테일을 사용하는 음성 자기 면역부착(negative magnetic immunoadherence) 또는 유세포 계측법을 통한 세포 선별 및/또는 선택이다.

[0357] 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, 이를 유형의 CD8+ 세포 각각과 연관되는 세포 표면 항원을 동정함으로써 천연, 중앙 기억 및 이펙터 세포로 추가로 분류된다.

[0358] 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. 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.

[0359] 일 실시 예에서, 본 발명은, 세포가 해동시 생존 상태로 존재하도록 면역 이펙터 세포를 동결보존하는 것을 포함하는, BCMA 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 동결보존될 수 있다. 필요한 경우, 동결보존된 형질전환된 면역 이펙터 세포는 보다 많은 이러한 세포를 위해 해동, 성장 및 확장시킬 수 있다.조성물 및 제형(Compositions and Formulations)

[0360] 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 제제

는 의도된 요법을 전달하는 조성물의 능력에 역으로 영향을 미치지 않아야 한다.

[0361] 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.

[0362] 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"는, 제한 없이, 인간 또는 가축 동물에서 사용하기 위해 허용되는 것으로 미국 식품의약청에 의해 승인된 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활주제, 감미제, 보존제, 염료/착색제, 향미 증강제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 혼탁제, 안정화제, 등장성제, 용매, 계면활성제 또는 유화제를 포함한다. 예시적 약제학적으로 허용되는 담체는, 이로써 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, 실리산, 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 올레이트 및 에틸 라우레이트; 아가; 완충제, 예를 들어, 수산화망간 및 수산화알루미늄; 알긴산; 피로겐-비함유 물; 등장성 식염수; 링거액; 에틸 알콜; 인산염 완충 용액; 및 약제학적 제형에 사용된 임의의 기타 호환성 물질을 포함한다.

[0363] 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.

[0364] "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.

[0365] 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 형질도입된 치료 세포의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료학적으로 유리한 효과가 상회하는 것이다. 용어 "치료학적 유효량"은 대상체(예: 환자)를 "치료"하는데 효과적인 양을 포함한다. 치료적 유효량이 지시되는 경우, 투여되는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자(대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 대사 정도 및 상태를 고려하여 주치의에 의해 결정될 수 있다. 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.

[0366] 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.

[0367] 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; 퀼레이트제, 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.

[0368] 액체 약제학적 조성물은, 이들이 용액, 혼탁액 또는 기타 유사 형태이든지, 하나 이상의 하기 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예를 들어, 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리학적 식염수, 렇거액, 등장성 염화나트륨, 고정유, 예를 들면, 용매 또는 혼탁 매질로서 사용될 수 있는 합성 모노 또는 디글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매; 항균제, 예를 들어, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예를 들어, 아스코르브산 또는 아황산나트륨; 퀼레이트제, 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. 주사 가능한 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균성이다.

[0369] 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 치료제, 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.

치료 방법(Therapeutic Methods)

[0370] 본원에서 고려되는 유전적으로 변형된 면역 이펙터 세포는 면역 조절 증상(immunoregulatory condition) 및 혈액학적 악성 종양을 포함하지만 이에 제한되지 않는 B 세포 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 입양 면역요법(adoptive immunotherapy)의 개선된 방법을 제공한다. 특정 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR을 포함하는 면역 이펙터 세포를 포함하는 조성물은 비정상적인 B 세포 활성과 관련된 증상(또는 "병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애"로 언급됨)의 치료에 사용된다.

[0371] 본원에서 사용된 바와 같이, "병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애" 또는 "B 세포 악성 종양"은 B 세포에서 형성되는 암과 같은 의학적 증상을 의미한다. 특정 실시 예에서, 본원에서 고려되는 CAR-변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 예를 들어 다발성 골수종(MM) 및 비-호지킨 림프종(NHL)과 같은 B 세포 악성 종양을 포함하지만 이에 한정되지 않는 혈액학적 악성 종양의 치료에 사용된다.

[0372] 본 발명의 다른 실시 양태에서, 다발성 골수종(MM), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비-분비성 다발성 골수종, 불투수 다발성 골수종, 불명확한 단일 클론성 간질병증(MGUS), 고형 세포질 종양(Bone, Extramedullar), 림프성 전흉성 림프종(LPL), 밸렌스트룀 거대글로불린혈증, 형질세포 백혈병, 원발아밀로이드증(AL), 중쇄 질환, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), POEMS 증후군/골경화성 골수종, I 형 및 II 형 저온글로불린혈증, 경쇄 증식성 질환, 굿파스처 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반병(ITP), 급성 사구체 신염, 천포창 및 유천포창 질환 및 수포성 표피박리증; 또는 임의의 비-호지킨 림프종 B-세포 백혈병 또는 BCMA가 발현되는 비-호지킨 림프종(HL) 또는 환자가 재조합 단백질 대체 요법에 대한 중화 항체를 발생시키는 임의의 질환으로부터 선택된 B 세포 매개 또는 혈장 세포 매개 질환 또는 항체 매개 질환 또는 장애의 치료를 위한 용도로 본 명세서에 개시된 본 발명에 따른 CAR 및 CAR-T를 제공하며, 상기 방법은 상기 환자에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 CAR 또는 CAR-T를 투여하는 단계를 포함한다.

[0373] 다발성 골수종은 이들 세포 유형의 단일 클론의 종양성 형질전환을 특징으로 하는 성숙 형질 세포 형태의 B-세포 악성종양이다. 이들 형질 세포는 BM에서 증식하고, 인접한 골 및 종종 혈액으로 침입한다. 변이체 형태의 다발성 골수종은 명백한 다발성 골수종, 무증상 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 비-분비성 골수종, IgD 골수종, 골경화성 골수종, 골의 고립성 형질세포종 및 수질외 형질세포종을 포함한다.

[0374] 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. 비호지킨 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-성

장) 유형으로 나뉠 수 있다. 비-호지킨 림프종은 B-세포 및 T-세포로부터 유래할 수 있고, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비-호지킨 림프종" 및 "B-세포 비-호지킨 림프종"은 상호 교대로 사용된다. B-세포 비-호지킨 림프종(NHL)은 버킷 림프종(Burkitt lymphoma), 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(PLL/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.

[0376] 만성 림프구성 백혈병(PLL)은, B 림프구로 불리우는 미성숙 백혈구 세포 또는 B 세포에서 느린 증가를 유발하는 완만한(느린-성장) 암이다. 암 세포는 혈액 및 골수를 통해 확산하고, 또한 림프절 또는 간 및 비장 등의 다른 기관에 영향을 미칠 수 있다. PLL은 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.

[0377] 본 발명의 일 실시 예에서, CAR 또는 상기 CAR을 발현하는 면역 세포는 자가 면역 질환, 바람직하게는 자가-항체-의존성 자가 면역 질환, 바람직하게는 염증 성분을 갖는 자가 면역 질환의 치료에 사용하기 위한 것이며, 상기 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-쇤라인 자반병(Henoch-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), 나종성 동맥염(Lepromatous arteritis), CNS의 일차 맥관염(Primary angiitis of the CNS), 폐색전 혈전 혈관염(Thromboangiitis obliterans), 방종양성 동맥염(Paraneoplastic ateritis), 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), 글관절염(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(Autoimmunethrombocytopenia), 자가 면역성 호중구 감소증 (Autoimmunneutropenia), 자가 면역성 용혈성 빈혈(Autoimmunhemolytic anemia), 자가 면역성 림프구 감소증(Autoimmunlymphocytopenia), 사가스 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(hay fever), 치주염(periodontitis), 죽상동맥경화증(therosclerosis), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 가장 바람직하게 SLE으로부터 선택된다.

[0378] 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.

[0379] 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. 바람직한 실시 예에서, 대상체는 유전자 치료 벡터, 세포-기반 치료제 및 본원의 다른 곳에서 개시된 방법으로 치료될 수 있는 B 세포 악성 종양과 같은 조혈계(hematopoietic system)의 질환, 장애 또는 증상의 증상을 나타내는 임의의 동물을 포함한다. 적합한 대상체(예: 환자)는 실험실 동물(예: 마우스, 랫트, 래빗 또는 기니아 피그), 농장 동물 및 가축 또는 애완동물(예: 고양이 또는 개)을 포함한다. 비-인간 영장류 및, 바람직하게는, 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체는, B 세포 악성 종양을 갖거나, B 세포 악성 종양으로 진단되거나, B 세포 악성 종양을 가질 위험에 있는 인간 환자를 포함한다.

[0380] 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 측정가능한 마커의 최소 감소도 포함할 수 있다. 치료는 임의로, 질환 또는 상태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 질환 또는 상태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. "치료"는 질환 또는 상태, 또는 이의 연관된 증상을 반드시 완전히 근절하거나 치유하는 것을 나타내는 것은 아니다.

[0381] 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 발명 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.

[0382] 일 실시 예에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 B 세포 관련 질환을 치료하는 방법은 본원에서 의도된 유전적으로 변형된 면역 이팩터 세포를 포함하는 유효량, 예를 들면, 치료학적 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 투여 양 및 빈도는, 적절한 용량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있지만, 환자의 상태 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0383] 본원에서 의도된 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 경구접취, 수액, 주입 또는 이식을 포함하는 임의의 통상의 방법으로 수행할 수 있다. 바람직한 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.

실시예

[0385] 본 발명은 본원에 개시된 실시 예에 의해 입증된다. 실시 예는 잠재적으로 바람직한, 본 발명의 비제한적인 실시 예에 대한 기술 지원 및 보다 상세한 설명을 제공한다. 본원에 기재된 CAR의 기능을 입증하기 위해, 본 발명자는 하기 실험을 수행하였다:

[0386] - 서로 다른 표적 세포주에서 CAR로 형질감염된 인간 T 세포의 공생-배양은 별개의 BCMA+ MM 및 NHL 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 나타낸다; 판독은 T 세포로부터 이팩터 사이토kin으로서의 IFN- γ 의 방출이다;

[0387] - 세포 독성 분석은 BCMA+ 세포주의 선택적 살생을 나타낸다; 본질적으로 BCMA-음성 세포주 또는 일차 세포(primary cell)에서 살상은 관찰되지 않았다.

[0388] 예를 들어, HUVECs(내피 기원), HEK293(신장), 말초 혈액 B 세포, 말초 혈액 총 백혈구, T- 및 B-모두, 대장암.

[0389] - 다발성 골수종 세포와 함께 공생-배양된 CAR-T 세포의 CD107a 염색, 유동 세포 계측법에 의한 항원 특이적

(BCMA) 자극시 CD8+ T 세포의 탈파립화(degranulating) 검출.

[0390] - 생체 내 실험은 i) 기능성, ii) 오프-타겟 반응성, iii) T 세포 기억 및 iv) B-NHL 및 클수종 세포주에 대해 이식된 CAR-T 세포의 생체 안전성에 대한 데이터를 생성하기 위해 이종 이식된 NSG 마우스 모델을 사용하는 것과 관련된다. B-NHL의 경우, 항-BCMA CAR-T 세포의 세포 용해능(cytolytic capacity)을 기준의 항-CD19 CAR-T 세포 생성물과 비교 하였다.

[0391] **실시예 1: 클로닝 및 플라스미드 제조(Cloning and plasmid preparation)**

[0392] CAR 서열은 GeneArtTM (Gene Synthesis Service)를 사용하여 합성하였다. CAR 구조의 제한 효소는 Not I 및 EcoRI를 사용하여 수행되었다(도 5). 레트로바이러스 백터 MP71은 또한 Not I 및 EcoRI로 절단한 후 탈인산화시켰다.

[0393] 겔 전기 영동을 이용하여 CAR과 백터를 분리하고(도 6), 단편을 정제하였다. CAR 구조는 이어서 3:1의 비율로 백터(50ng)에 연결시켰다. MACH-1 로의 라이제이션 혼합물의 형질전환이 수행되었다(도 3). 대조군 절단(digest)을 수행하고 Mini-Preparation의 서열을 결정하였다. 구조물은 MACH-1으로 재-형질전환 되었다. MP71-BCMA-CAR 플라스미드의 maxi-Preparation를 제조 하였다.

[0394] MP71은 단일 (+)-가닥 RNA 바이러스이다. Reverse-Transcriptase는 레트로바이러스 RNA-개놈을 DNA 사본으로 변환한다. DNA는 표적 개놈으로 임의의 위치에 프로바이러스로 통합된다. 세포 분열을 통해 바이러스는 프로바이러스(provirus)로 안정적으로 번식한다.

[0395] **실시예 2: 형질 감염 및 형질 도입(Transfection and transduction)**

[0396] 0일: 6-웰 플레이트에서 바이러스 생산을 위한 HeKT(293T)- 또는 GaIV-세포 접종

[0397] 1일: 레트로바이러스 생산을 위한 일시적인 3-플라스미드 형질감염(인산 칼슘 형질감염). 웰 당, 표준 프로토콜에 따라 250mM CaCl₂, 150μl H₂O에서 18 μg의 DNA를 사용했다. 세포를 37°C에서 6시간 동안 배양하고, 배지를 교환하고, 37°C에서 48시간 동안 추가 배양한다.

[0398] 항-huCD3 항체 및 항-huCD28 항체로 24-웰 비-조직 배양 플레이트 코팅:

[0399] 웰 당 0.5mL PBS(5 μg/mL 항-CD3, 1 μg/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)로 교체한다, 인큐베이션: 30분(37°C). BSA 솔루션을 제거하고 2 mL PBS로 웰을 세척한다.

[0400] 40mL 혈액에서 PBMCs의 정제(~2.5x10⁷ PBMCs):

[0401] 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 1-1.5x10⁶ 세포/mL(4000U/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.

[0402] 3일: PBL의 형질 도입

[0403] Hekt- 또는 GaIV-세포에서 바이러스 상등액을 제거하고 여과(0.45 μm 필터). 1.5 mL 바이러스 상등액으로 자극 PBMCs를 처리.

[0404] 4일: PBL의 형질 도입

[0405] Hekt- 또는 GaIV-세포(0.45 μm)로부터 남은 바이러스 상등액(4°C) 및 두 번째 상등액을 여과. PBL에서 1 mL에서 1.5 mL의 상등액을 회수. CD3-/CD28-코팅 웰(90분, 32°C, 2000 RPM)에서 1 mL에서 1.5 mL 바이러스 상등액으로 자극 PBMCs처리 및 원심분리. 최종 농도 100 IU/mL IL2(1ul von 400U/μl) 또는 10 ng/μl IL7 및 10 ng/μl IL15 및 추가로 4 μg/mL(8 μl)의 프로타민 황산염. 90분 2000 rpm 32°C에서 원심 분리.

[0406] 7일 ~ 13일 : PBL배양, T 세포 배지를 신선한 IL2 또는 IL7/IL15로 처리.

[0407] 13일 : T 세포 자극 종료.

[0408] 세포 배양 플라스크에서 PBL-배지를 세척, 원심 분리, T 세포 배지(+10 IU/mL IL2)에서 펠렛을 재현탁.

[0409] 15일째: 기능적 분석.

[0410] **실시예 3: 항-BCMA CAR T 세포의 기능적 *in vitro* 시험**

[0411] I. 레트로바이러스 형질 도입 후 인간 T 세포에서 BCMA CAR 발현 확인.

[0412] 인간 T 세포와 관련하여 CAR 수용체의 접힘 및 운반에 대한 증거가 얻어졌다. 레트로바이러스 형질 도입 프로토콜의 기능이 평가되었다.

[0413] 인간 말초 혈액 백혈구를 Ficoll 구배를 통해 정제하였다. 상기 기술한 바와 같이 세포를 배양하고, 자극시키고, 레트로바이러스로 형질 감염시켰다. 형질 도입 후, 세포를 BCMA-CAR 발현 분석 전에 IL-2 또는 IL-7/IL-15 함유 배지에서 배양하였다.

[0414] 형질 도입 비율(rate) 및 생존력은 유동 세포 계측법(FACS) 분석에 의해 평가되었다. BCMA-CAR 발현을 검출하기 위해, CAR 구조체의 스페이서 영역에서 인간 IgG1 또는 IgG4 절편을 선택적으로 인식하는 항-인간 Ig 항체로 세포를 염색하였다. CD3/CD8/CD4 T 세포에 대한 공동 염색을 수행하였다. 결과는 도 7을 참조한다.

[0415] II. 상이한 표적 세포주를 갖는 CAR-형질 감염 인간 T 세포의 공생-배양은 별개의 BCMA⁺ 다발성 골수종(MM) 및 B-NHL 세포주에 의한 특이적 T 세포 활성화를 나타낸다.

[0416] 관독은 T 세포로부터 이펙터(effecter) 사이토카인으로서의 IFN-γ의 방출이다.

[0417] 전에 설명한대로 레트로바이러스-형질도입된 인간 T 세포를 생성한다; 모든 BCMA CAR 수용체 변이체(IX-XVII), SP6-음성 대조군 CAR, CD19 CAR, UT=비형질도입된 T 세포. 다음과 같은 인간 세포주를 공동 배양의 표적 세포로 사용한다:

표 4

세포주	기원	BCMA-양성
NCI-H929	다발성 골수종(MM)	yes
MM.1S	MM	yes
OPM-2	MM	yes
RPMI 8226	MM	yes
REH	B 급성 림프구성 백혈병(B-ALL)	no
REH-BCMA	BCMA로 안정적으로 형질전환된 REH	yes
DOHH-2	소포성 중심모세포/중심세포 림프종 (follicular centroblastic/centrocytic lymphoma, FL)에서 진행된 면역모세포 (immunoblastic) B 세포 림프종	yes, 약함
JVM-3	B 세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL)	yes, 약함
SU-DHL4	광범위 큰 B 세포 림프종(DLBCL), germinal center 형	yes, 약함
NALM-6	B 급성 림프구성 백혈병(B-ALL)	no
RS4	B-ALL	no
Jurkat	T 세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL)	no
정상 말초 B 세포	건강한 기증자	no
MEC-1	B-CLL	yes, 약함
JEKO-1	외투 세포 림프종(MCL), B-NHL	yes, 약함
HUVEC	인간 제대 정맥 내피세포, 건강한 기증자	no
SW620	결장암(colon carcinoma)	no
HT116	결장암(colon carcinoma)	no
HEK293	인간 배아 신장 상피 세포	no
PBMC	인간 말초 혈액 단핵 세포, 건강한 기증자	no

- [0419] 나열된 세포주 또는 일차 세포가 1:1의 비율로 존재할 때 레트로바이러스-형질도입된(retrovirally transduced) T 세포를 18-20 시간 동안 공생-배양한다. 그 후, 세포-free 배양 상등액을 취한다; 최대. 방출은 이펙터 T 세포의 PMA/ionomycin 자극에 의해 유도된다; 최소 방출은 T 세포뿐이다. ELISA로 상층액에서 IFN-감마선을 측정한다. 결과는 도 8을 참조한다.
- [0420] III. 다발성 골수종 세포와 함께 공생-배양된 CAR-T 세포의 CD107a(LAMP1) 염색: 유동 세포 계측법에 의한 항원 특이적(BCMA) 자극시 활성화된 탈과립 CD8⁺ T 세포의 검출.
- [0421] 상기와 같이 레트로바이러스로 형질-도입된 인간 T 세포를 생성한다; BCMA CAR-수용체 변이체(IX-XI), SP6-음성 대조군 CAR을 사용한다.
- [0422] 나열된 세포주의 존재하에 레트로바이러스로 형질-도입된 T 세포를 18시간 동안 1:1의 비율로 공생-배양한다.
- [0423] 세포 배지에 밤새 배양 항 CD107a(LAMP1) 항체를 첨가; 항체는 분비하는 리소좀이 원형질막과 융합할 때 T 세포에 지속적으로 결합하고 그 베지를의 효소적 함량을 방출한다. 이러한 베지를는 그랜자임(granzymes) 및 퍼포린(perforin)과 같은 세포 용해 매개체를 포함한다. 다음날 T 세포는 항 CD8 및/또는 CD3로 동시에 염색된다.
- [0424] 유동 세포 계측법에 의한 분석: 평균 형광 강도(MFI)로 표현되는 CD107a 반응성이 높으면 상한 T 세포의 활성화를 나타낸다. T 세포의 항원 의존성 활성화가 확인될 수 있다. 결과는 도 9를 참조한다.
- [0425] IV. 세포 독성 분석은 BCMA-선행 세포주의 선택적 사멸을 나타낸다; 본질적으로 BCMA-음성 세포주에서는 사멸이 관찰되지 않았다.
- [0426] 세포 독성 T 림프구 활동의 정량을 위해 ⁵¹Cr-방출 분석을 사용한다. 측정 대상 세포의 세포 용해한다.
- [0427] 전에 설명한대로 레트로바이러스-형질도입된 인간 T 세포를 생성한다. BCMA CAR-수용체 변이체(IX-XI), SP6-음성 대조군 CAR; 대조군으로서의 CD19 CAR를 준비한다.
- [0428] 표적 세포를 ⁵¹Cr로 표지한다. CAR-T 세포와 표지된 표적 세포를 4시간 동안 공생-배양 하였다. 목표 비율로 이펙터를 적정한다.
- [0429] E:T
- [0430] 80:1
- [0431] 40:1
- [0432] 20:1
- [0433] 10:1
- [0434] 5:1
- [0435] 2.5:1
- [0436] 세포-free 세포 배양 상등액을 수집한다. 상등액을 LUMA-scintillation 플레이트로 옮기면 감마-scintillation 카운터에서 ⁵¹Cr가 방출된다. 맥스. 방출; Triton X-100 투과성으로 표적 세포를 용해시킴. Min. 방출: 표적 세포만. 결과는 도 10을 참조한다.
- [0437] 또한, 도 11은 세포 독성에 대해 평가된 각 세포 유형의 표면상에 발현되는 BCMA 및 CD19의 양을 보여주는 결과를 제공한다. 도 12는 CAR의 scFV 결합 영역과 BCMA 에피토프 간의 상호 작용을 개략적으로 나타낸 것이다.
- [0438] **실시예 4: 이종 이식된 NSG 마우스 모델을 사용하여 B-NHL 및 골수종 세포주에 대해 입양 전이된(adoptively transferred) CAR-T 세포를 평가하는 생체 내 실험**
- [0439] **NSG 마우스에 이종 이식을 사용한 생체 내 실험:**
- [0440] 1) 다양한 항 BCMA-변이체를 갖춘 CAR T 세포가 동일 조건에서 이펙터 활성을 갖는다는 것을 입증하기 위해, 상이한 BCMA 항원 밀도를 갖는 다발성 골수종 세포를 i.v. 루트를 통하여 NSG-마우스(NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1} ^{Wj1}/SzJ)에 이식하였다. 사용할 수 있는 다발성 골수종 세포주는 다음과 같다: RPMI-8226, 낮은 BCMA; MM1S, 중

간 BCMA 밀도; NCI-H229, 높은 BCMA 밀도.

[0441] 2) 생체(*in situ*)에서 B-NHL 세포주에 대한 항 BCMA CAR T 세포 반응성을 확인하기 위해, NSG 마우스에 루시페라제-형질전환된 세포주, 예를 들어 SU-DHL4(DLBCL), JEKO-1(mantle cell lymphoma), JVM3(CL), MEC1(CL), DOHH-2(FL)를 i.v. 주입하였다,

[0442] **BCMA CAR-T 세포는 다발성 골수종(MM) 및 B-세포 비호지킨 림프종(B-NHL) 마우스 모델에서 생체 내 항종양 활성을 증재한다:**

[0443] BCMA CAR로 변형된 T 세포의 강한 시험관 내 활성이 생체 내 효율적인 항 종양 활성으로 전환된다는 개념 증명을 제공하기 위해, 우리는 NOD.Cg-Prkdc^{scid} 112rg^{tm1 Wjl}/SzJ(NSG) 마우스 집단에 인간 MM.1S 세포주(도 15) 또는 GFP와 함께 루시페라제 유전자로 형질도입된 B-NHL 세포주 JeKO-1(mantle cell lymphoma)(도 16)를 i.v. 접종하였다. NSG 마우스는 T, B 및 NK 세포를 생성하지 않으므로 이종 이식된 인간 세포의 내성과 성장에 적합하다. 여기에 제시된 실험 시간 내에 "이식 편대 숙주"(GvHD) 반응(이종 반응)은 관찰되지 않았다(데이터는 표시되지 않음). 종양의 성장은 IVIS 영상과 루시페린(luciferin) 주입으로 7-8일 후에 관찰되었다. 종양 성장 확인 후, CAR-T 세포는 하루 후(= 0일)에 i.v. 주사되었다. 기능적 생체 내 실험에서 CAR 구조물 IX(B IX)를 사용하였다. 총 수치는 $6\sim7\times10^6$ /동물 CAR-T 세포를 초과하지 않았으며, 이 집단에서 T 세포의 평균 변환율은 40~60%였다. 기증자당, SP6 및 BCMA 변환율은 +/- 10%의 범위 내에서 일치하였다. 도시된 두 실험에 대해, 3×10^6 형질도입된 CAR-T 세포의 유효량이 사용되었다. 대조군 마우스는 SP6 CAR-T 세포를 투여받았다.

[0444] MM1.S 실험(도 15)에서, 형질 전환된 CAR-T 세포 3×10^6 (상기와 같이, 총 $6\sim7\times10^6$)를 이식하고 관찰 간격을 17일로 연장시켰다. 본질적으로 모든 SP6 CAR 치료 동물은 척추, 골반 및 뒷다리에 강한 발광 신호가 특징인 진행성 MM 질환이 있거나 (베를린 주) 동물 보호법에 따라 질병 진행으로 인해 희생되었지만, BCMA CAR 치료군의 경우는 그렇지 않았다. 우리는 이 비교적 낮은 CAR-T 세포 수에서 BCMA CAR-T 세포가 이미 항-골수종 활성을 가지고 있다고 결론 내린다(도 15A-C).

[0445] 항-BCMA CAR-T 세포의 높은 친화도 및 결합력으로 인해, 낮은 BCMA-발현 성숙화 B 세포 NHL조차도 인식되어 T 세포 활성화 및 종양 세포 사멸을 가능하게 한다. 그러한 성숙화 B-NHL 개체는 소포성 림프종(follicular lymphoma), 광범위 큰 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 외투 세포 림프종(Mantle cell lymphoma) 및 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)의 특정 단계를 포함한다(도 11, 10, 9, 8 참조). B-NHL 개체의 표적 구조로서 BCMA의 적합성을 증명하기 위해, 맨틀 세포(Mantle cell) 림프종 세포주 JeKO-1으로 도전된 NSG 마우스에 형질 전환된 CAR-T 세포(총 $6\sim7\times10^6$)를 이식하였다. 본질적으로 모든 SP6 CAR 치료 동물은 간, 흉부 기관, 뒷다리의 골수 및 비장에 강한 형광 신호를 특징으로 하는 진행성 림프종 질환이 진행되었으나, BCMA CAR 치료군의 경우는 그렇지 않았다. 이를 통해 우리는 BCMA CAR-T 세포가 다발성 골수종을 넘어 B-NHL 림프종 개체(도 16A-C)까지 항 종양 활성을 가지고 있다는 것을 전임상으로 증명했다.

실시예 5: BCMA 분자의 표면 밀도 결정

[0447] 항-BCMA CAR-T 세포의 높은 친화도 및 결합력을 낮은 BCMA-발현 성숙화 B 세포 NHL 개체의 인식을 허용하여 T 세포 활성화 및 종양 세포 사멸을 초래한다. 그러한 성숙화 B-NHL 개체는 소포성 림프종(follicular lymphoma), 광범위 큰 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 외투 세포 림프종(Mantle cell lymphoma) 및 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)의 특정 단계를 포함한다.

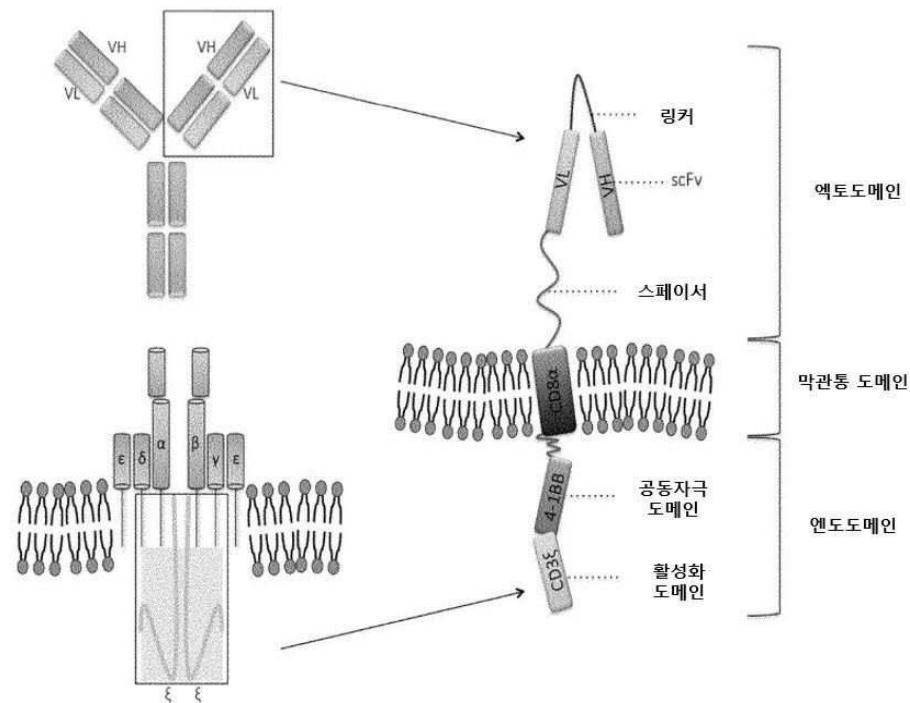
[0448] BCMA 분자의 표면 밀도를 정량화하기 위해, 우리는 BD Phycoerythrin Fluorescence Detection Kit(BD Quantibrite 분석법(BD Bioscience)이라고도 함)를 적용했다. 세포 당 PE 분자의 수는 세포 당 항원으로 변환될 수 있으며 이는 세포 당 항원 수의 정량적인 추정치이다. 유세포 분석법이 적용되었다.

[0449] 이 방법을 사용하여 다발성 골수종 세포주인 NCI-H929의 상대 표면 BCAM 항원 밀도는 12555이고, 다발성 골수종 세포주 OPM-2는 3443 BCMA 분자를 가지며, 다발성 골수종 세포주 MM.1S는 3181의 상대적 값을 가진다.

[0450] 언급된 B-NHL 세포주에 대한 BCMA 항원 밀도는 NCI-H929에 비해 다음과 같다: DOHH-2: 1/20, JEKO-1: 1/250, MEC-1: 1/34

도면

도면1



도면2



도면3

리더	scFv	순서	링커	힌지	막-관통 도메인	공동자극 도메인	활성화 도메인
IX	Igκ	humanized	VH - VL	Whitlow	IgG1	CD28	CD28
X	Igκ	humanized	VL - VH	Whitlow	IgG1	CD28	CD3ζ
XI	Igκ	Humanized (w/o codon opt.)	VH - VL	Whitlow	IgG1	CD28	CD28
XII	Igκ	humanized	VH - VL	Whitlow	IgG4 (Hi - CH2 - CH3)	CD28	CD28
XIII	Igκ	humanized	VH - VL	Whitlow	IgG4 (Hi - CH3)	CD28	CD3ζ
XIV	Igκ	humanized	VH - VL	Whitlow	IgG4 (Hi)	CD28	CD28
XV	Igκ	humanized	VL - VH	Whitlow	IgG1Δ	CD8α	4-1BB
XVI	Igκ	humanized	VL - VH	Whitlow	IgG1Δ	CD8α	4-1BB
XVII	Igκ	humanized	VL - VH	Whitlow	IgG1Δ	CD8α	CD3ζ

도면4

J22.9 hHC FSY 변경

서열은 호모 사피엔스에 대해 코돈 최적화 되었다.

코돈 최적화 후 원래 염기 서열과 81% 상동성

Score 338 bits(374)	Expect 2e-97	Identities 291/360(81%)	Gaps 0/360(0%)	Strand Plus/Plus
J22.9 1	GAAGCTGACGCTGGCTCGAAATCTGGAGGAGGCGCTGGGTTCAAGCTGGTGGCAGCCCTAGGCTC	60		
C.O. 1	GAAGCTGACGCTGGCTGGAAATCTGGCGAGGAGCTGGTGGCAGCCCTGGCGGCTCTCTGACACTG	60		
J22.9 61	TCTTGTCAGCCCTGCGCTTACCTCTCACGGTATGGTCACTCTGGCTGGAGACAGGGCT	120		
C.O. 61	TCTTGTCAGCCCTGCGCTTACCTCTCACGGTGGTACCTGGTGGCTGGCGGCTGGAGCC	120		
J22.9 121	CCAGGGAAAAGGCTGGTGGTGGTGGAGGAGATAAACCCGAGCAGCACGATCAACTAT	180		
C.O. 121	CCAGGGAAAGGACTCTGGTGGTGGAGGAGATAAACCCGAGCAGCACGACCAACTAC	180		
J22.9 181	GCTCCGTCAGTGAAGACAGCTTACCCATTCCCGCGATATGGCCAGAAACACTCTCTAC	240		
C.O. 181	GCCCCCAACCTGAGGAGACAGCTTACCCATCAGCAGAGACAGCCAGGAGACCACTCTAC	240		
J22.9 241	TTCCAGATGAATTCCCTTGGAGCCGGAGGATACACCGGCTGACTCTGCGGAGCTGTAC	300		
C.O. 241	CTCCAGATGAACAGACAGCTGGCGGGCCAGGAGACAGCCGCTGACTCTGCGGAGCTGTAC	300		
J22.9 301	TACGACTATGGGAGCCATACGACTATTGGGGAGAAAGCACAAGGTGACTGGTAGCTCC	360		
C.O. 301	TACGACTACGGGAGCCATACGATTACTGGGGAGGGAGACAGCTGGTAGCTCC	360		

J22.9 hLC E 변경

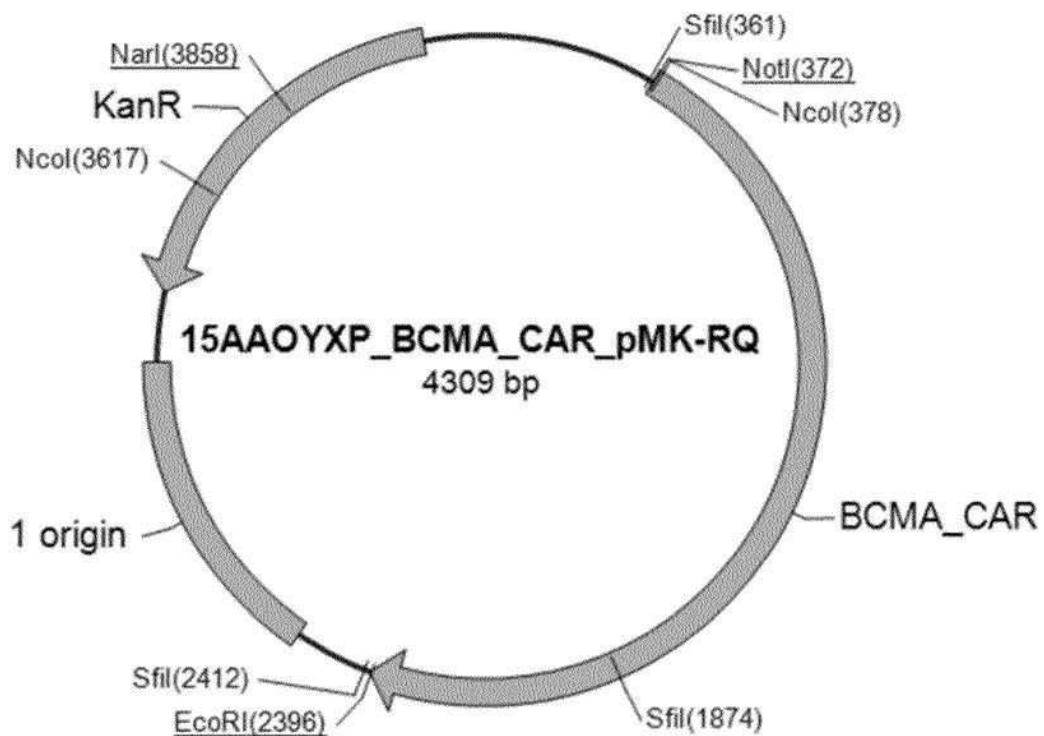
서열은 호모 사피엔스에 대해 코돈 최적화되었다.

코돈 최적화 후 원래 서열과 78 %의 상동성

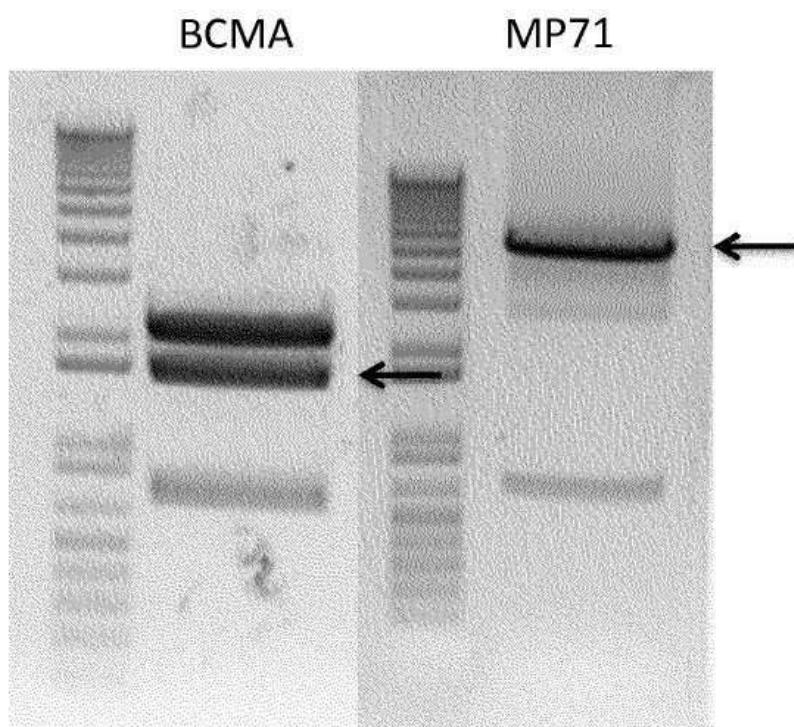
Score 262 bits(290)	Expect 2e-74	Identities 253/323(78%)	Gaps 4/323(1%)	Strand Plus/Plus
J22.9 68	GAGATCGATGAGACCCAGCTCCCTGCTACCTGACCGTTTCCCGGTGAAAGGGCCACA	127		
C.O. 1	GAGATCGATGAGACACAGAGCCCTGGCCACCCCTGADCGTGTCCCCAGCGAAAGAGCTACC	60		
J22.9 128	CTCACCTGAAAGCCTCTCAAAACCTGGCACAGCAATGTCGCCCTGGTATACACCAAGAACCT	187		
C.O. 61	CTCACCTGAAAGCCTGGCACAGACGCGGCTGGAAAGCAGCGTGGCCCTGGTATACACCAAGAGCC	120		
J22.9 188	GGCCAGGCTCCGAGAGCACTGATCTAATTCCGGGCTCA--TTGGCTTTCCGGCATACCAAG	245		
C.O. 121	GGACAGGGCTCCGAGGGCCCTGATCTA--CACCGGCAAGCTGAGATCAACGGCATCCCCG	178		
J22.9 248	CACGGTTTACGAGGAGTGGAGCTGGGACCTGAGCTCTGACGATTAAGCTCTTTCAGT	305		
C.O. 179	CCAGGGTTACGAGGAGTGGAGCTGGGACGGGACCGGAGCTCACCCCTGACCATCAGCGCCCTGGAGA	238		
J22.9 306	CAGAGGATTCGGCGGGTGTACTCTGATCAAGTACAAACAACTATCCCTCACATTCGGAG	365		
C.O. 239	CCGAGGAGCTGGCGGGTGTACTCTGACGAGTACAAACAACTATCCCTCACATTCGGAG	298		
J22.9 366	CTGGAAACCAAGCTGGAACTGAAC 388			
C.O. 299	CCGGCACACAACTGGAGCTGAAC 321			

(J22.9 = 최초 nAb; C.O. = 코돈 최적화)

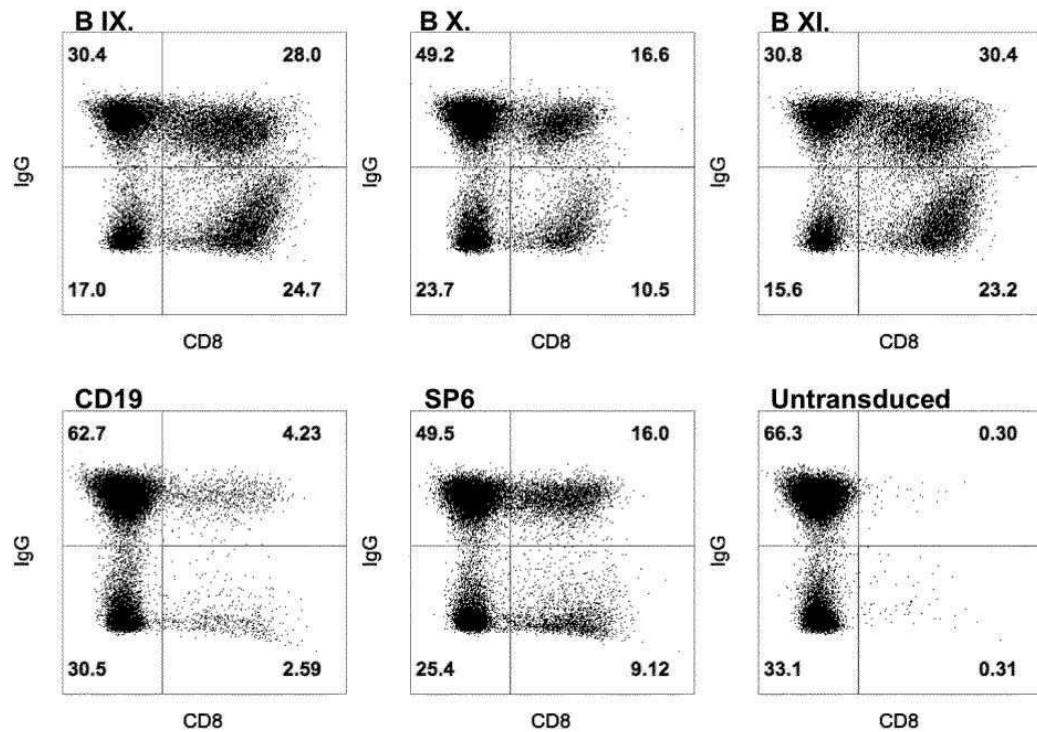
도면5



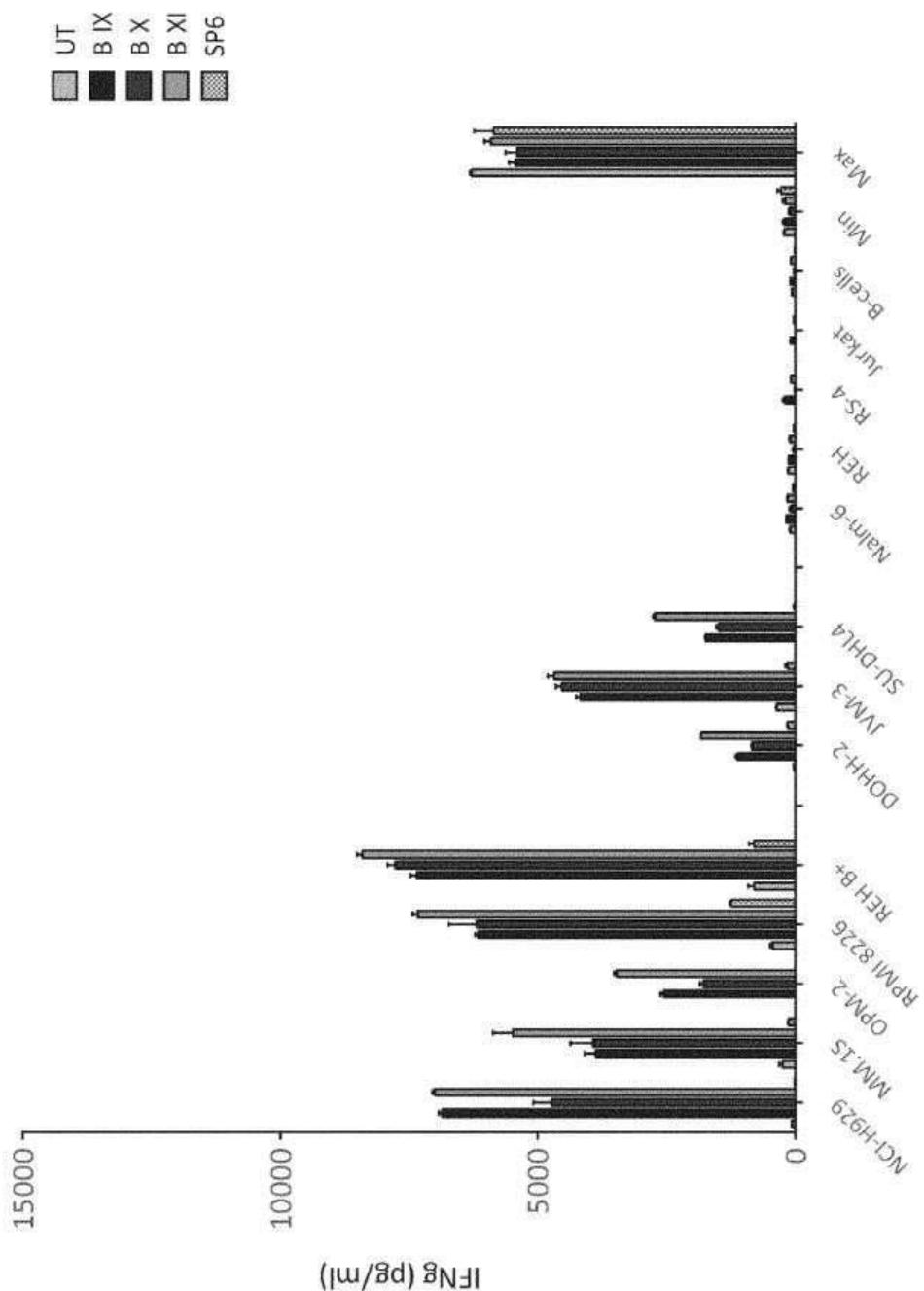
도면6



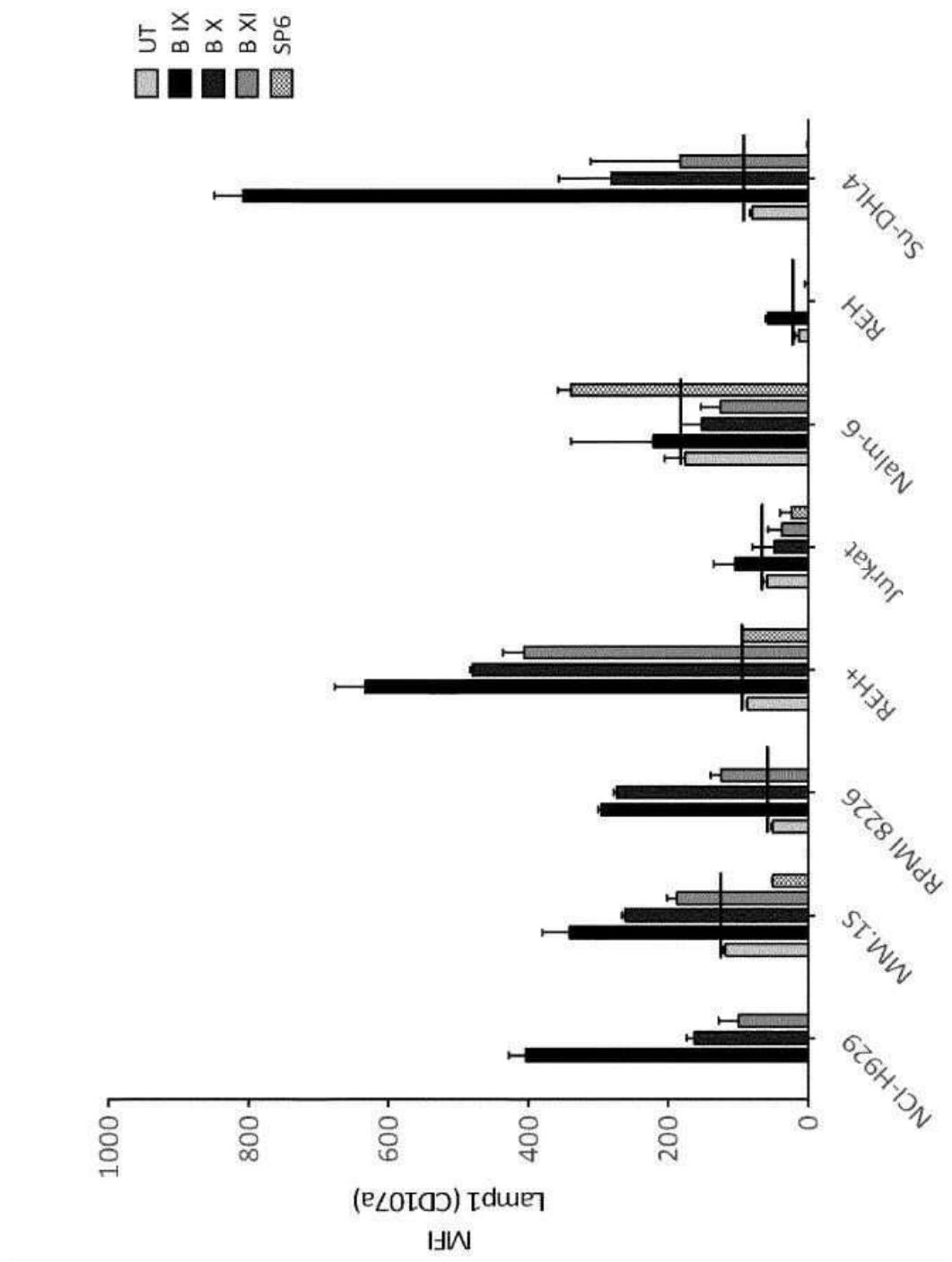
도면7



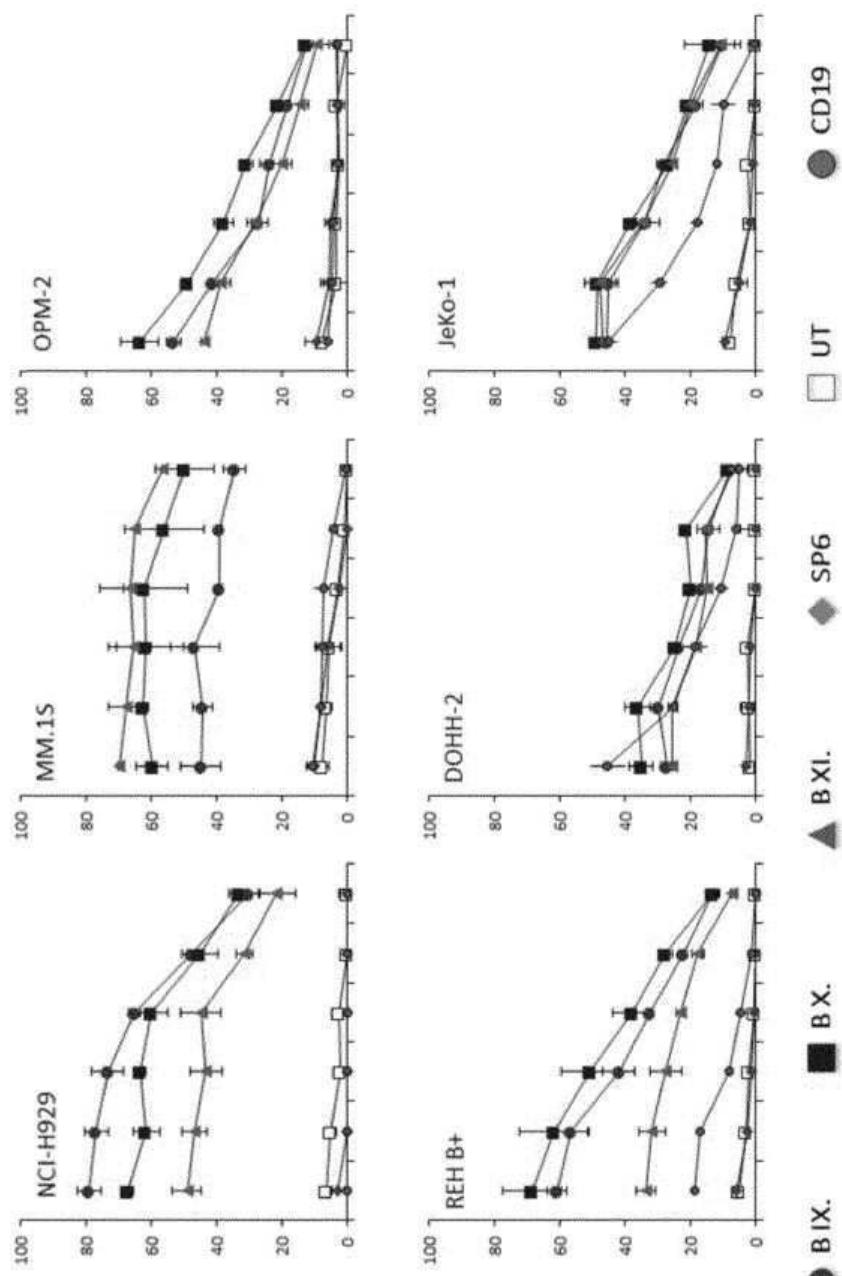
도면8



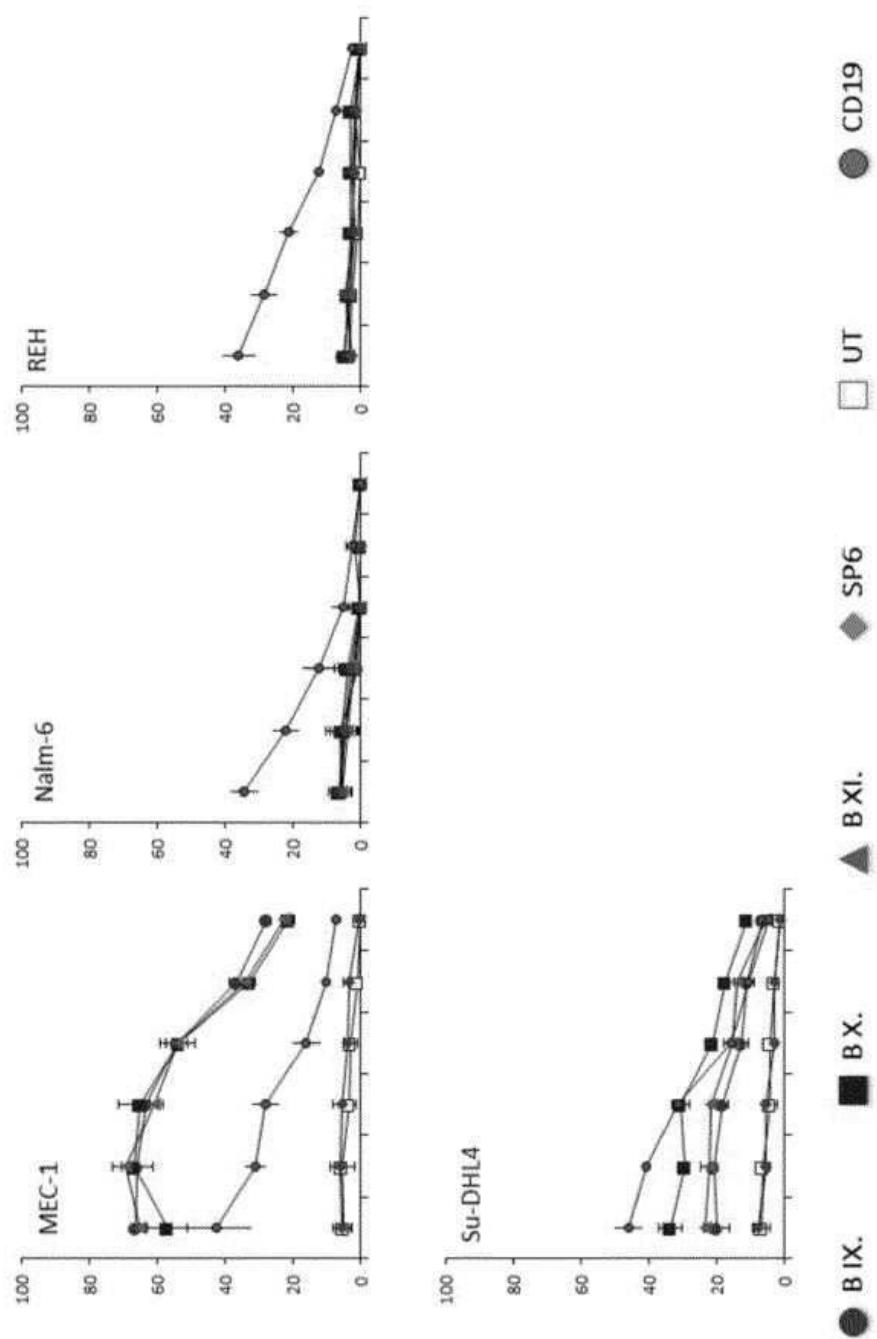
도면9



도면 10a

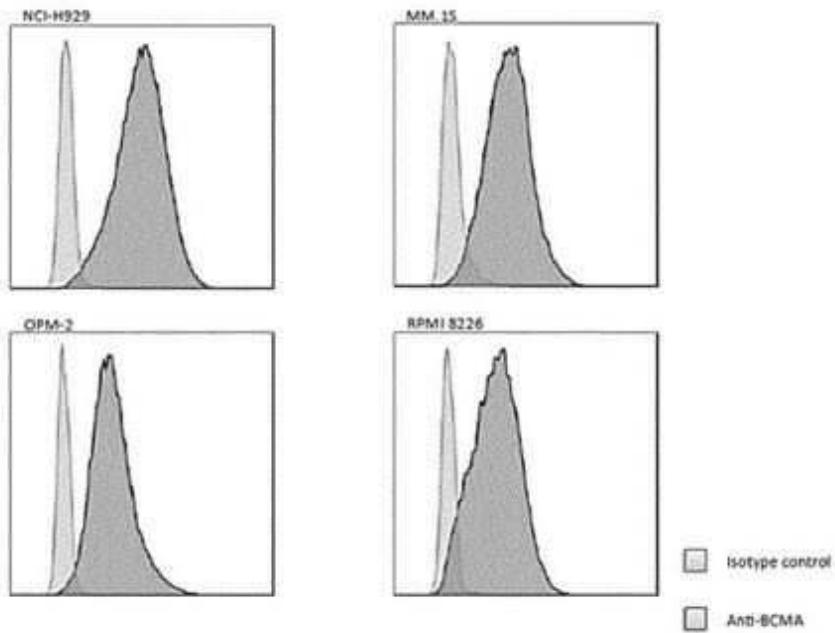


도면 10b

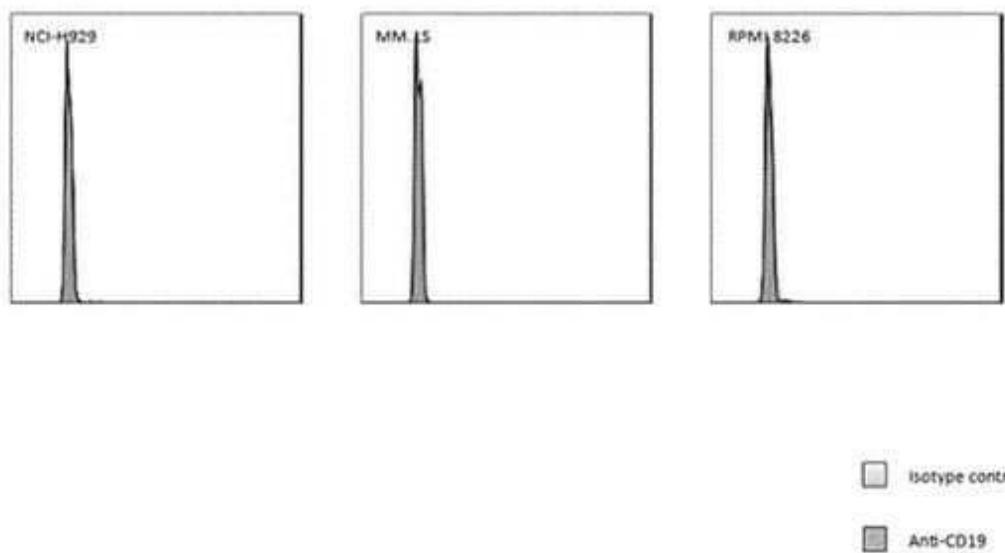


도면11a

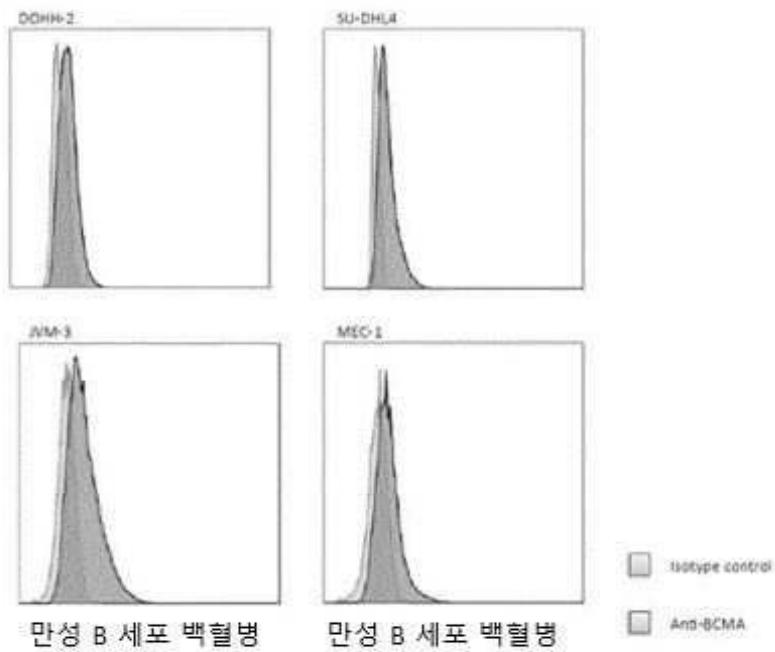
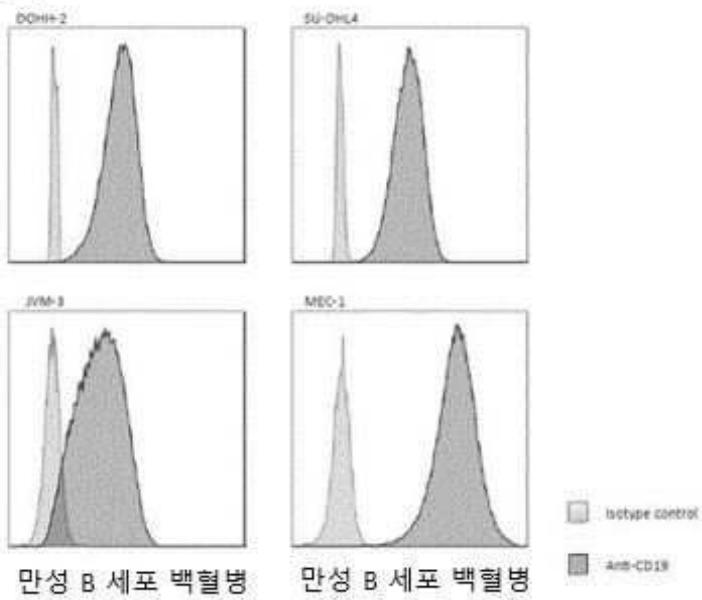
다발성 골수종 세포주
항-BCMA 염색



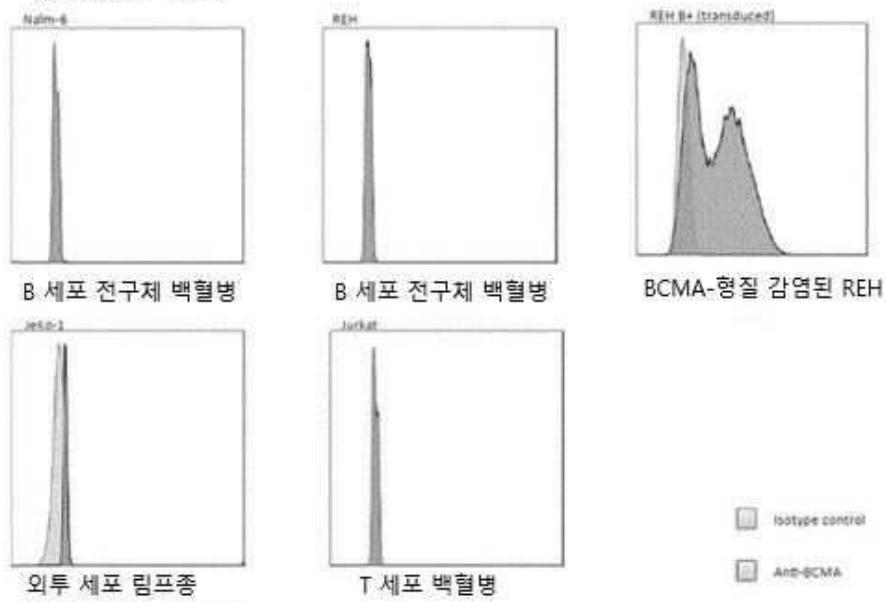
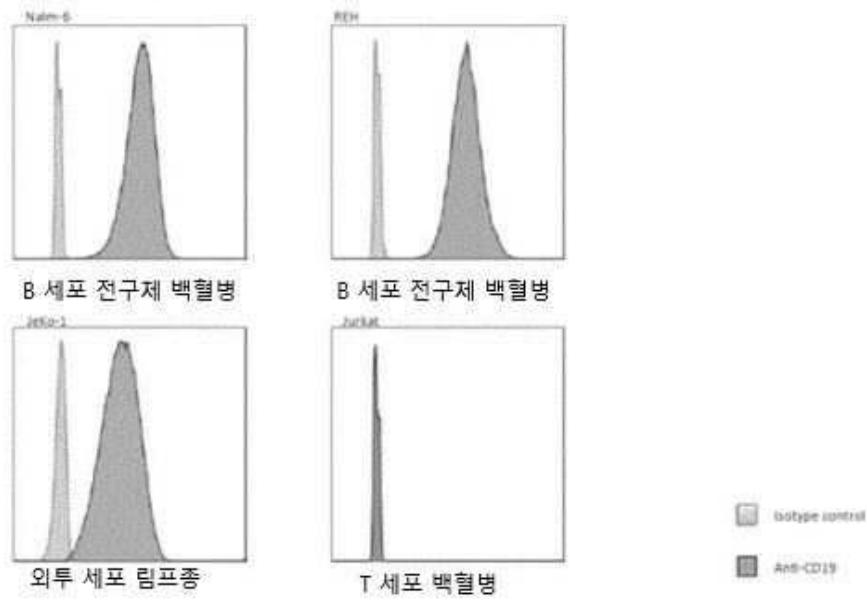
다발성 골수종 세포주
항-CD19 염색



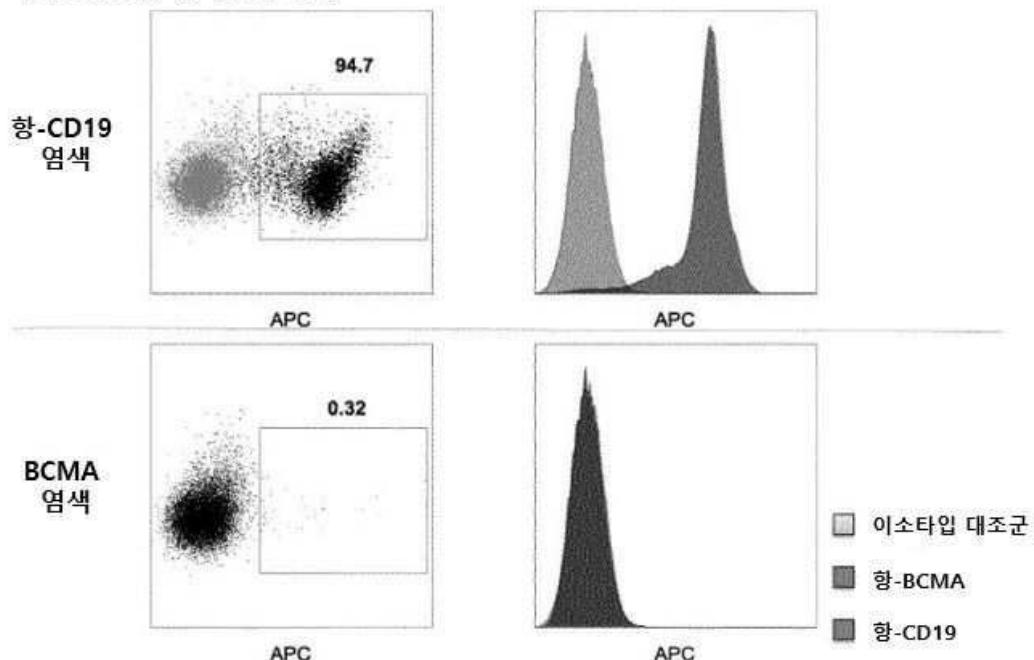
도면11b

B 세포 림프종 세포주
항-BCMA 염색**B 세포 림프종 세포주**
항-CD19 염색

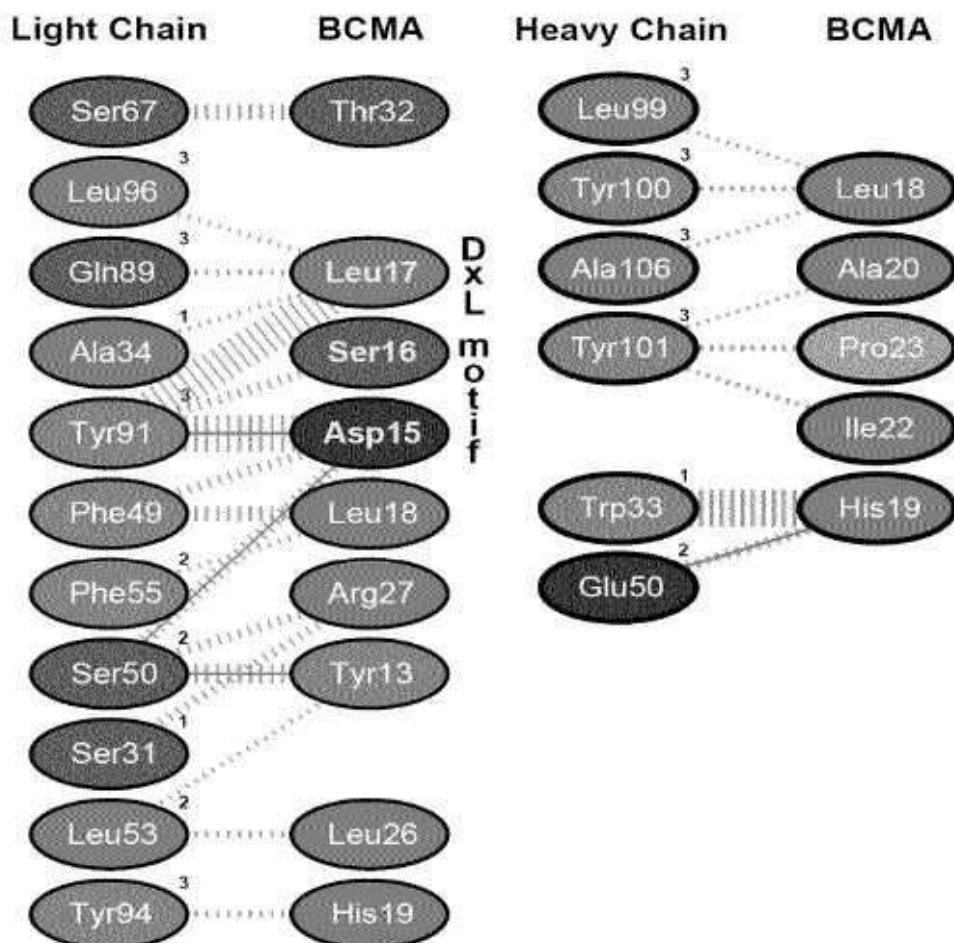
도면11c

기타 표적 세포주
항-BCMA 염색기타 표적 세포주
항-CD19 염색

도면11d

PBMC로부터 MACS-기반 B-세포 분리
항-BCMA 및 항-CD19 염색

도면12



도면13

HC

	1	10	20	30	40	50
HCg	XVQLXXSGGLVQPGGSXLSCAASGXXFXXYXXWVRXAPGKGLXXXGX					
HCm	QVQLQQSGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGE					
HCpH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQAPGKGLLEWVGE					
hHC01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLVVVGE					
hHC02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWXSWVRQAPGKGLVVVGE					
hHC03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYXMXWVRQAPGKGLVXVGX					
hHC04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVVVGE					
hHC05	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFWSWVRQAPGKGLVVVGE					
hHC06	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVVVGE					
hHC07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFWSWVRQAPGKGLVVVGE					
	51	60	70	80	90	100
HCg	INPXXSTINYAPSLKXXFXISRDNAKNTLYLQMXXXRSEDTAXYYCASXX					
HCm	INPDSSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLY					
HCpH	INPDSSTINYAPSLKGRFTIISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY					
hHC01	INPDSSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY					
hHC02	INPXXSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY					
hHC03	INPDSSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASXX					
hHC04	INPNSSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY					
hHC05	INPNSSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY					
hHC06	INPSSSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY					
hHC07	INPSSSTINYAPSLKDKFTIISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY					
	101	110				
HCg	XDYGDXDYWGQGTXTVSS					
HCm	YDYGDAMDYWGQGTTSVTVSS					
HCpH	YDYGDAMDYWGQGTIVTVSS					
hHC01	YDYGDAMDYWGQGTIVTVSS					
hHC02	XDYGDXMDYWGQGTIVTVSS					
hHC03	XDYGDXMDYWGQGTIVTVSS					
hHC04	YDYGDAYDYWGQGTIVTVSS					
hHC05	YDYGDAYDYWGQGTIVTVSS					
hHC06	YDYGDAYDYWGQGTIVTVSS					
hHC07	YDYGDAYDYWGQGTIVTVSS					

X : 인간화된 서열에 따른 가변 아미노산

HCg : 일반 중쇄 가변 서열

HCm : 마우스 중쇄 가변 서열

HCpH : 부분적으로 인간화된 중쇄 가변 서열

도면14

LC

	1	10	20	30	40	50
LCg	XIVMTQSXXXXXXXXGXXVXXCKASQSVXXXVWXQQKPxQXPXKLI					
LCm	DIVMTQSQRFMTTSVGDRVSVTCKASQSVDSNVAVYQQKPRQSPKALI					
LCpH	DIVMTQS P ATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAVYQQKPGQAPKLLI					
hLC01	EIVMTQS P ATLSVSPGERATLSCKASQSVDSNVAVYQQKPGQAPRALI					
hLC02	EIVMTQS P ATLSVSPGERATLSCKASQSVXXNVAVYQQKPGQAPRALI					
hLC03	EIVMTQS P ATLSVSPGERATLSCKASQSVDXVXWXQQKPGQAPRALI					
hLC04	EIVMTQS P ATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAVYQQKPGQAPRALI					
	51	60	70	80	90	100
LCg	XXXRXSGXPARFXGSXXGTXFTLTISXLQSEDXAXYXCXQXNNXPXTFGA					
LCm	ASLRFSGVPARFTGSGSGTDFTLTISNLQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGA					
LCpH	DDLRFSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC01	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC02	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC03	AXXRXSGIPARFSGSXGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQXNNXPXTFGA					
hLC04	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
	101					
LCg	GTKLELKR					
LCm	GTKLELKR					
LCpH	GTKLELKR					
hLC01	GTKLELKR					
hLC02	GTKLELKR					
hLC03	GTKLELKR					
hLC04	GTKLELKR					

X : 마우스 또는 인간화된 서열에 따른 가변 아미노산

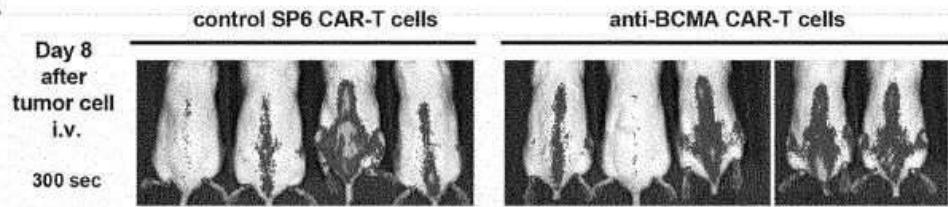
LCg : 일반 중쇄 가변 서열

LCm : 마우스 중쇄 가변 서열

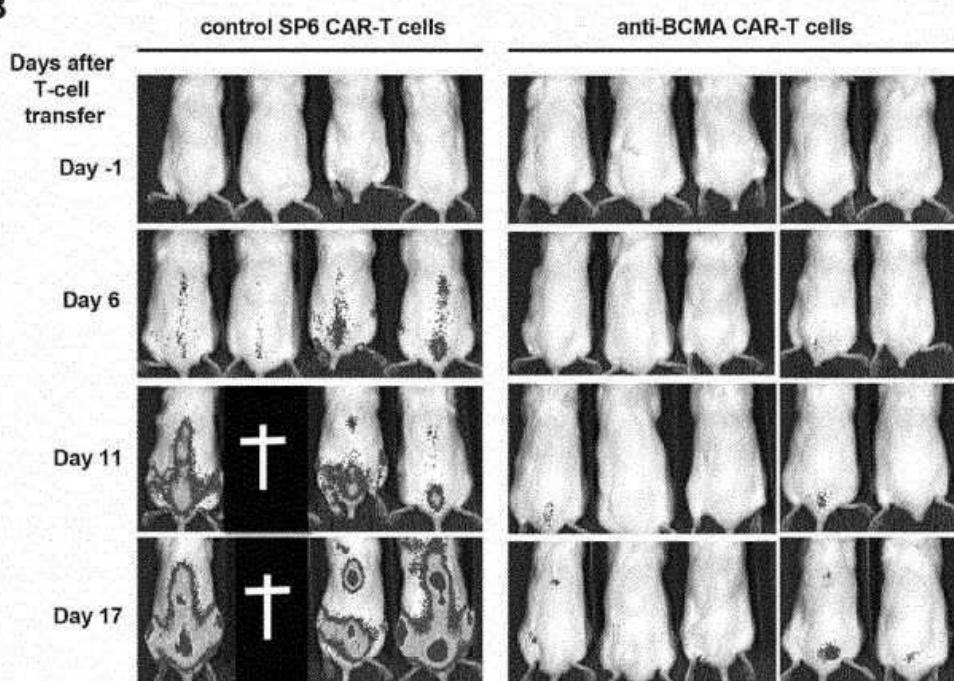
LCpH : 부분적으로 인간화된 중쇄 가변 서열

도면15

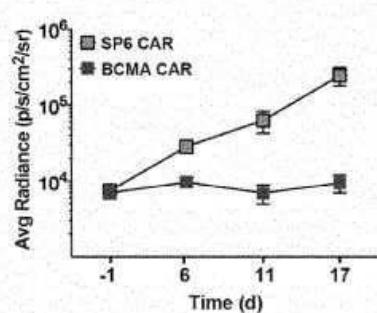
A



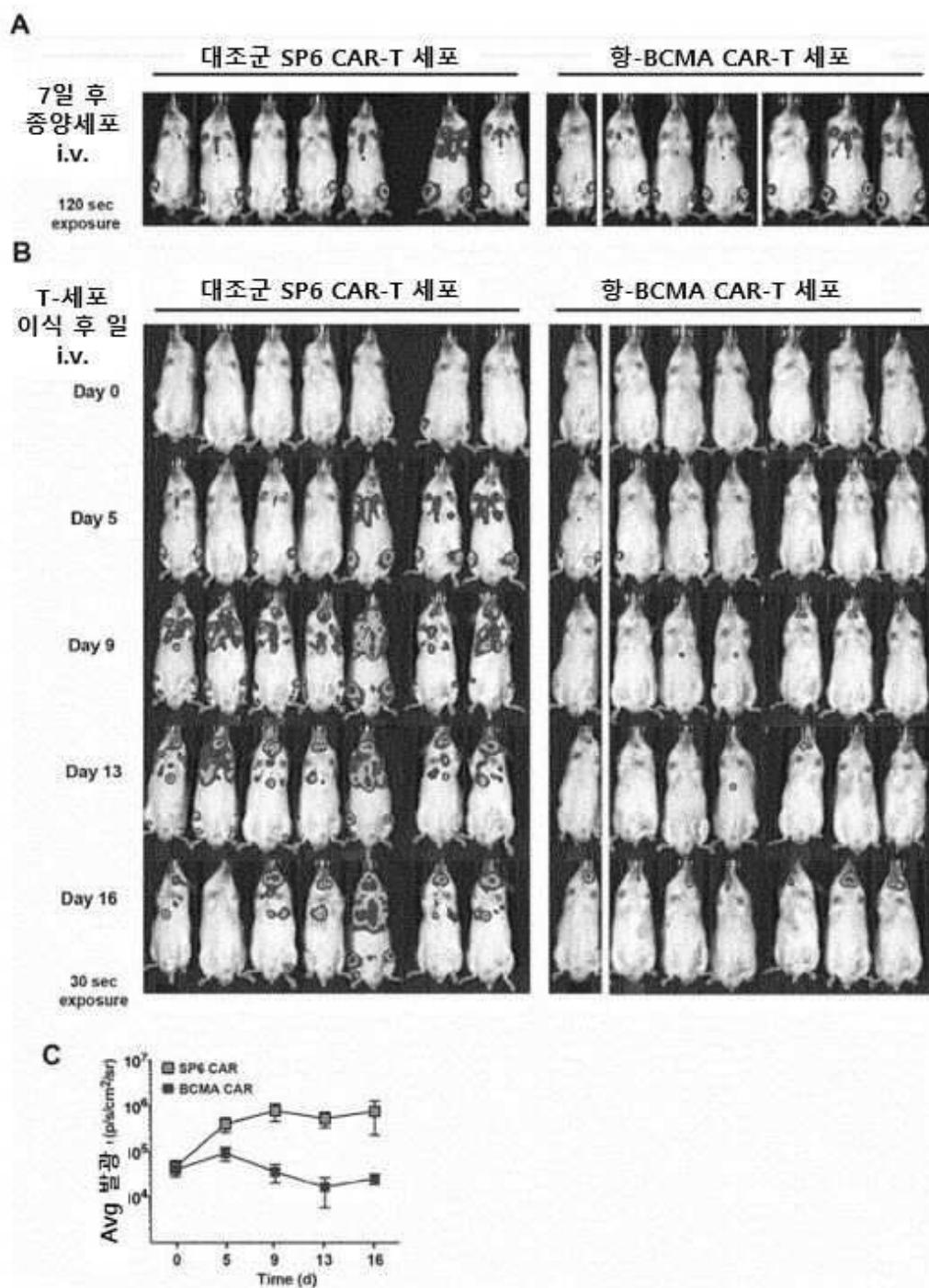
B



C



도면16



서 열 목록

- <110> MAX-DELBRUK-CENTRUM FUR MOLEKULARE MEDIZIN. HUM-BOLDT-UNIVERSITAT ZU BERLIN
- <120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR AND CAR-T CELLS THAT BIND BCMA
- <130> PCT/EP2017/063862
- <160> 94
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR1

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<400> 2

Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile

1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<400> 3

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR1

<400> 4

Gln Ser Val Glu Ser Asn

1 5

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR2

<220><221>

> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 5

Ser Ala Ser Xaa

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR3

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 7

Ile Asn Pro Xaa Xaa Ser Thr Ile

1 5

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 8

Ala Ser Leu Tyr Xaa Asp Tyr Gly Asp Ala Xaa Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 9

Gln Ser Val Xaa Xaa Asn

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR3

<400> 10

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH domain

<400> 11

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 Arg Tyr			
20	25	30	
Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val			
35	40	45	
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu			
50	55	60	
Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210>	12		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		

<220><223> VL domain			
<400> 12			
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn			
20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu			

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whitlow 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> Gly-Ser linker

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser

<210> 15

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1-CD28 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
 225 230
 <210> 16
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgG1 - 4-1BB 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> CD8a domain
 <400> 20

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val 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> CD28 domain

<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> 4-1BB co-stimulatory domain

<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 Cys Glu Leu

35 40

<210> 23

<211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD28 co-stimulatory domain
 <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

35 40
 <210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD3zeta (CD28 or 4-1BB) signaling domain
 <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> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR1

<400> 25

Arg Tyr Trp Phe Ser

1 5

<210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<400> 26

Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Asp Lys

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<400> 27

Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR1

<400> 28

Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn Val Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR2

<400> 29

Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR3

<400> 30

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly

1 5 10

<210> 31

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His

1 5 10 15

Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu

20 25 30

Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly

35 40 45

Thr Asn Ala Leu Glu

50

<210> 32

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Leu Glu

50 55

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys

1 5 10 15

Ser Ser Asn Thr

20

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 34

Arg Tyr Trp Xaa Ser

1 5

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 35

Glu Ile Asn Pro Xaa Xaa Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys

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

Asp Lys

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H-CDR3

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 36

Ser Leu Tyr Xaa Asp Tyr Gly Asp Ala Xaa Asp Tyr Trp

1	5	10
---	---	----

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 37

Lys Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Asn Val Ala

1 5 10

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC (VH) mouse

<400> 38

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC partially humanized

<400> 39

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 Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hHC01

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hHC02

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(55)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (101)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (107)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Arg Tyr

20 25 30

Trp Xaa Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Xaa Xaa Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Ser Leu Tyr Xaa Asp Tyr Gly Asp Ala Xaa Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 42			

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hHC03

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (33)

<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> (47)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(101)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (106)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 42

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	Arg	Tyr

20	25	30
Xaa Met Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Xaa Val		
35	40	45
Gly Xaa Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Ser Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Gly Asp Xaa Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 43		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> hHC04		
<400> 43		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr		
20	25	30
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val		
35	40	45
Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln		

100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 44		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> hHC05		
<400> 44		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr		
20	25	30
Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val		
35	40	45
Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 45		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> hHC06		
<400> 45		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Arg Tyr			
20	25	30	
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val			
35	40	45	
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu			
50	55	60	
Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			

115	120		
<210>	46		
<211>	120		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	hHC07		
<400>	46		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Arg Tyr			
20	25	30	
Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val			
35	40	45	

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

85	90	95
Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		

115	120
<210> 47	
<211> 108	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LC (VL) mouse	
<400> 47	

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

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

100	105	
<210> 48		
<211> 108		
<212> PRT		

<213> Artificial Sequence		
<220><223> LC partially humanized		
<400> 48		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Val Gly		

1	5	10	15
Asp Glu Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn			
20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ser Asp Asp Leu Arg Phe Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu			
85	90	95	
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg			
100	105		
<210>	49		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	hLC01		
<400>	49		

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

	100	105	
<210>	50		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	hLC02		
<220><221>	MISC_FEATURE		
<222>	(30)..(31)		
<223>	Xaa can be any naturally occurring amino acid		
<400>	50		

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Asn

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile

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

Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100	105
-----	-----

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hLC03

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(32)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (36)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(50)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (52)..(53)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (55)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (66)..(67)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (91)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (94)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (96)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 51

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Xaa Xaa

20

25

30

Val Xaa Trp Xaa Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile

35 40 45

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Arg Xaa Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Xaa Xaa Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Xaa Asn Asn Xaa Pro Xaa

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hLC04

<400> 52

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 53

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH hum Gen

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(6)

<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> (27)..(28)

<

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(31)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (39)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (48)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (66)..(67)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (69)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(86)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (88)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (93)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (115)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 53
 Xaa Val Gln Leu Xaa Xaa Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Xaa Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Tyr			
20	25	30	
Trp Glx Ser Trp Val Arg Xaa Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa			
35	40	45	
Gly Glu Ile Asn Pro Glx Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu			
50	55	60	
Lys Xaa Xaa Phe Xaa Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Glu Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Glx Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 54
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL hum Gen
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(13)

<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> (20)..(21)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (41)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (43)

<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> (51)..(52)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)

<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> (83)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (85)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (87)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 54

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Xaa Val Xaa Xaa Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Xaa Gln Xaa Pro Lys Xaa Leu Ile

35 40 45

Xaa Ser Xaa Xaa Leu Arg Phe Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Xaa Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Xaa Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Xaa Ala Xaa Tyr Xaa Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgK leader

<400> 55

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> 56

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GMCSF leader

<400> 56

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

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile

20

<210> 57

<211> 684

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct IX

<400> 57

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

50 55 60

Gly Leu Val Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr

130 135 140

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

145	150	155	160
Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu			
165	170	175	
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn Val			
180	185	190	
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile Tyr			
195	200	205	
Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser			
210	215	220	
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu			
225	230	235	240
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr			
245	250	255	
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser			
260	265	270	
Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala			
275	280	285	
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
290	295	300	
Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
305	310	315	320
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
325	330	335	
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
340	345	350	
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
355	360	365	
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
370	375	380	
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
385	390	395	400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680

<210> 58

<211> 684

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct X

<400> 58

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 Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165	170	175
Arg Tyr Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val		
180	185	190
Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro		
195	200	205
Ser Leu Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr		
210	215	220
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
225	230	235
Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp		
245	250	255
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Pro Ala Glu Pro Lys Ser		
260	265	270
Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala		
275	280	285
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
290	295	300
Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
305	310	315
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
325	330	335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
340	345	350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
355	360	365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
370	375	380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
385	390	395
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
405	410	415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro
 435 440 445
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 500 505 510
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 515 520 525
 Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
 530 535 540
 Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
 545 550 555 560
 Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe
 565 570 575
 Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 580 585 590
 Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 595 600 605
 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 610 615 620
 Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 625 630 635 640
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys
 645 650 655
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 660 665 670

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

675 680

<210> 59

<211> 684

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XI

<400> 59

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

50 55 60

Gly Leu Val Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu

165 170 175

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn Val

180 185 190

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile Tyr

195 200 205

Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

210 215 220

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu

225 230 235 240

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr

245 250 255

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser

260 265 270

Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala

275 280 285

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

290 295 300

Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

325 330 335

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

340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435	440	445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
450	455	460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
465	470	475
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
485	490	495
Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly		
500	505	510
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe		
515	520	525
Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn		
530	535	540
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr		
545	550	555
560		
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe		
565	570	575
Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
580	585	590
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
595	600	605
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
610	615	620
Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala		
625	630	635
640		
Glu Ala Tyr Ser Glu Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys		
645	650	655
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr		
660	665	670
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
675	680	
<210> 60		

<211> 676

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XII

<400> 60

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

50 55 60

Gly Leu Val Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu

165 170 175

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn Val

180 185 190

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile Tyr

195 200 205

Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

210	215	220
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu		
225	230	235
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr		
245	250	255
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
260	265	270
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val		
275	280	285
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
290	295	300
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
305	310	315
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
325	330	335
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
340	345	350
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys		
355	360	365
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
370	375	380
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
385	390	395
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
405	410	415
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
420	425	430
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
435	440	445
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
450	455	460

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 465 470 475 480
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe
 485 490 495
 Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
 500 505 510
 Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg
 515 520 525
 Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro
 530 535 540
 Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala
 545 550 555 560
 Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 565 570 575
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 580 585 590
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 595 600 605
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 610 615 620
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 625 630 635 640
 Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 645 650 655
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 660 665 670
 Leu Pro Pro Arg
 675
 <210> 61
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XIII

<400> 61

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

50 55 60

Gly Leu Val Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu

165 170 175

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn Val

180 185 190

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile Tyr

195 200 205

Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

210 215 220

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu

225 230 235 240

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255

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

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

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

 465 470 475 480
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

565

<210> 62

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XIV

<400> 62

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

50 55 60

Gly Leu Val Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr

115	120	125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr		
130	135	140
Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu		
145	150	155
Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu		
165	170	175
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn Val		
180	185	190
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile Tyr		
195	200	205
Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
210	215	220
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu		
225	230	235
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr		
245 250 255		
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
260	265	270
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val		
275	280	285
Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp		
290	295	300
Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met		
305	310	315
320		
Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala		
325	330	335
Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser		
340	345	350
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
355	360	365
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		

370	375	380	
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn			
385	390	395	400
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu			
405	410	415	
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly			
420	425	430	
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr			
435	440	445	
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
450	455		
<210> 63			
<211> 680			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Construct XV			
<400> 63			
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 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 Arg Tyr Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys			
50	55	60	
Gly Leu Val Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn			
65	70	75	80
Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala			
85	90	95	
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr			
100	105	110	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr			

115 120 125

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

195 200 205

Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu
 225 230 235 240
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser
 260 265 270

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

340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415

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

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

 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 565 570 575
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 580 585 590
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 595 600 605
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 610 615 620

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

625 630 635 640

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly

645 650 655

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

660 665 670

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

675 680

<210> 64

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XVI

<400> 64

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 Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Arg Tyr Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val

180 185 190

Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp

245 250 255

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

260 265 270

Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala

275 280 285

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

290 295 300

Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

325 330 335

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

340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

370 375 380

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

385	390	395	400
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
405	410	415	
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
420	425	430	
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
435	440	445	
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
450	455	460	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
465	470	475	480
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Ser Leu			
485	490	495	
Ser Pro Gly Lys Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys			
500	505	510	
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly			
515	520	525	
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val			
530	535	540	
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu			
545	550	555	560
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala			
565	570	575	
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu			
580	585	590	
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly			
595	600	605	
Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu			
610	615	620	
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser			
625	630	635	640
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly			

645 650 655

Leu Tyr Gln G1y Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu

660 665 670

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

675 680

<210> 65

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XVII

<400> 65

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

50 55 60

Gly Leu Val Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu

165 170 175

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn Val

180 185 190

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala Leu Ile Tyr

195 200 205

Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

210 215 220

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu

225 230 235 240

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr

245 250 255

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser

260 265 270

Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala

275 280 285

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

290 295 300

Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

325 330 335

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

340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465 470 475 480

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

485 490 495

Ser Pro Gly Lys Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly

645 650 655

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

660 665 670

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

675	680	
<210>	66	
<211>	360	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Codon optimized VH	
<400>	66	
gagggtgcagc tggtggaatc tggcggagga ctgggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60	
tcttgtgcgg ccagcggctt caccttcagc cggtactggg ttagctgggt ggcgcaggcc	120	
cctggcaagg gactcgtgtg ggtgggaggag atcaacccca gcagcagcac catcaactac	180	
gccccccagcc tgaaggacaa gttcaccatc agcagagaca acgccaagaa caccctgtac	240	
ctgcagatga acagcctgctg ggcggaggac accggcggtt actattgtgc cagcctgtac	300	
 tacgactacg gcgacgccta cgattactgg ggccagggca cactggtgac tgtagctcc	360	
	360	
<210>	67	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Codon optimized VL	
<400>	67	
gagatcgtga tgacacagag ccctgccacc ctgagcgtgt ccccaggcga aagagctacc	60	
ctgagctgca aggccagcca gagcgtggaa agcaacgtgg cctggatca gcagaagccc	120	
ggacaggctc ctggggccct gatctacagc gccagctga gattcagcgg catcccccc	180	
 aggtagcg gctctggcag cggcacccgag ttcaccctga caatcagcag cctgcagagc	240	
gaggactttg ccgtgttata ctgccagcag tacaacaact accccctgac cttcgagcc	300	
ggcaccaagc tggagctgaa g	321	
<210>	68	
<211>	360	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	VH without Codon Optimization - mAb scFv	

<400> 68

gaagtgcagc tggcgaatc tggaggaggc ctggttcagc ctggtggcag ccttaggctc	60
tcttgtcag cctctggctt tacttctca cggtatttgt tcagctgggt gagacaggct	120

ccagggaaag gcttgtgtg ggtaggggag ataaacccca gcagcagcac gatcaactat	180
gctccgtcac tggaaagacaa gttcaccatt tcccgcgata atgccaagaa cactctcac	240
ttgcagatga attcccttcg agccgaggat acagcggtgt actactgcgc cagtcgtac	300
tacgactatg gggacgcata cgactattgg ggacaaggca cactggtgcac tgtagctcc	360
	360

<210> 69

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL without Codon Optimization - mAb scFv

<400> 69

gagatcgtga tgaccaggc tcctgctacc ctgagcggtt ctcccggtga aagggccaca	60
ctcagctgca aagcctctca aagcgtggag agcaatgtcg cctggatca gcagaaacct	120
ggccaagctc cgagagcact gatctattcc gcgtcattgc gctttccgg cataccagca	180
cggtttagtg gctcagggag tggactgag ttcaactctga cgattagctc cttcagtca	240
gaggatttcg ccgtgtacta ctgtcagcag tacaacaact atcccctcac attcggagct	300
ggaaccaagc tgaaactgaa g	321

<210> 70

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgK leader

<400> 70

atggattcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc	60
cgc	63

<210> 71

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GMCSF leader

<400> 71

atgcttc	tgggacaag	ccttctgctc	tgtgagttac	cacaccagc	attccctctg	60
atc						63

<210> 72

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whitlow Linker

<400> 72

ggcagcacca	gcccgtccgg	caaggctggc	tctggcgagg	gcagcacaaa	ggga	54
------------	------------	------------	------------	------------	------	----

<210> 73

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gly-Ser Linker

<400> 73

tctagcggcg	gaggcggatc	tggcggggga	ggatctgggg	gaggcggctc	t	51
------------	------------	------------	------------	------------	---	----

<210> 74

<211> 702

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 - CD28 Backbone spacer

<400> 74

cctggcggc	ctaagagccc	cgacaagacc	cacacctgtc	ccccttgc	tgccctcca	60
gtggctggcc	ctagcgtgtt	cctgttcccc	ccaaagccca	aggataccct	gatgatcgcc	120
cggacccccc	aagtccatg	cgtgggtgg	gacgtgagcc	acgaagaccc	tgaggtcaag	180
ttcaacttgt	acgtggacgg	cgtggagggt	cataatgcc	agacaaagcc	gcgggaggag	240
cagtacaaca	gcacgtaccg	tgtggtcagc	gtcctcaccg	tcctgcacca	ggactggctg	300
aatggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	aacaaagccc	tcccagcccc	catcgagaaa	360
accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	gaaccacagg	tgtacaccct	gccccatcc	420

cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacactgcc	tggtcaaagg	cttctatccc	480
------------	------------	------------	-------------	------------	------------	-----

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 540
 cctccgtgc tggactccga cggctccttc ttccctaca gcaagctcac cgtggacaag 600
 agcaggtggc agcagggaa cgtttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 660
 cactacacgc agaagacgcct ctccctgtct ccggtaaaa aa 702
 <210> 75
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgG1 - 4-1BB Backbone spacer

<400> 75
 cctggccgagc ctaagagccc cgacaagacc cacacctgtc ccccttgccc tgccccc 60
 gtggctggcc ctacgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggataccct gatgatgcc 120
 cggacccccc aagtacatg cgtgggtgt gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag 180
 ttcaacttgtt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaagcc gcgggaggag 240
 cagtacaaca gcacgttaccc tgggtcagc gtcctcaccc tcctgcacca ggactggctg 300
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccaagcccatc catcgagaaa 360
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 420

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgaccctgcc tcgtgaaggg ctttacccc 480
 tccgatatcg ccgtggatg ggagagcaat ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 540
 cccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttccgttaca gcaagctgac agtggacaag 600
 agccgggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc tctgcacaac 660
 cactacaccc agaagtccct gagcagcctg agcccaggca agaag 705

<210> 76
 <211> 687
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgG4 (Hi-CH2-CH3) spacer

<400>
 > 76
 gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgccctgccccc ccgagttcga gggcggacc 60
 agcgtgttcc tttcccccc caagcccaag gacaccctga tgcacgccc gacccccc 120
 gtgacctgca tgggtggta cgtgagccag gaagatcccg aggtccagtt caattggta 180
 gtggacggcg tggaaagtgc caacgccaag accaagccca gagaggaaca gttcaacagc 240

acctaccggg tggtgtctgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaagaa 300
 tacaagtgca aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgaaaagac catcagaag 360
 gccaagggcc agcctcgca gccccaggtg tacaccctgc ctccctccca ggaagagatg 420

accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaaggct tctacccag cgacatcgcc 480
 gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc tccctgctg 540
 gacagcgacg gcagcttctt cctctacagc cggctgaccg tggacaagag ccgggtggcag 600
 gaaggcaacg tcttagctg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 660
 aagagcctga gcctgtccct gggcaag 687

<210> 77

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 77

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgccctggcc agcctcgca gccccaggtg 60
 tacaccctgc ctccctccca ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 120
 gtgaaggct tctacccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag 180
 aacaactaca agaccacccc tccctgctg gacagcgacg gcagcttctt cctctacagc 240
 cggctgaccg tggacaagag ccgggtggcag gaaggcaacg tcttagctg cagcgtgatg 300
 cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag aagagcctga gcctgtccct gggcaag 357

<210> 78

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 (Hi) spacer

<400> 78

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgccct 36

<210> 79

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8a transmembrane domain

<400> 79

atctacatct gggccctct ggccggcacc tgtggcgtgc tgctgctgtc tctcgatc 60

acactgtact gc 72

<210> 80

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 transmembrane domain

<400> 80

ttttgggtgc tgggggtgtt tggtggagtc ctggcttgc atagcttgc agtaacagt 60

gcctttatta tttctgggt g 81

<210> 81

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 81

aagcggggca gaaaagaagct gctgtacatc ttcaaggcgc cttcatgcg gcccgtgc 60

accacccagg aagaggacgg ctgctcctgc agattcccg aggaagaaga aggccgctgc 120

gagctg 126

<210> 82

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 (constructs IX-XI) Co-stimulatory domain

<400> 82

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc cggccgcccc 60

gggccccacc gcaaggcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 83

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 (constructs XII-XIV) (additional cleavage site for SalI

added) Co-stimulatory domain

<400> 83

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc	60
ggcccccaccc gcaaggcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc	120
tcc	123

<210> 84

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3zeta (CD28) Signaling domain

<400> 84

ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag	60
ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgtttgga caagagacgt	120

ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggccctgtac	180
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattggat gaaaggcgcag	240
cgcggaggg gcaagggca ccatggcatt taccagggtc tcaatcagc caccaaggac	300
acctacgacg ccctcacat gcaggccctg cccctcgct ga	342

<210> 85

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3zeta (4-1BB) Signaling domain

<400> 85

ctgcgcgtga agtttctag aagcgccgac gccccgcct accagcaggg ccagaaccag	60
---	----

ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg gaagagtacg acgtgctgga taagcggaga	120
ggccgggacc ctgagatggg cggcaagcct agaagaaaga acccccagga aggccctgtat	180
aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcgaaat gaagggcgcag	240
cggagaagag gcaagggcca ccatggactg taccaggcc tggcaccgc caccaaggac	300
acctatgacg ccctcacat gcaggctctg ccccccaga	339

<210> 86

<211> 2055

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Construct IX
 <400> 86

atggattcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccggcagcgt gatcatgagc	60
cgcgagggtgc agctggtgga atctggcgga ggactgggtgc agcctggcggt ctctctgaga	120
ctgtcttggc cccgcaggccg cttcaccttc agccggtaact ggttttagctg ggtgcgcag	180
gcccctggca agggactcgt gtgggtggga gagatcaacc ccagcagcag caccatcaac	240
tacgccccca gcctgaagga caagttcacc atcagcagag acaacccaa gaacaccctg	300
tacctgcaga tgaacagcct gcgggcccggag gacaccgcgt tgtaactattg tgccagcctg	360
tactacgact acggcgacgc ctacgattac tggggccagg gcaacactggt gactgttagc	420
tccggcagca ccagcggctc cggcaaggct ggctctggcg agggcagcac aaagggagag	480
atcgtatga cacagagccc tgccacccctg agcgtgtccc cagggaaag agctaccctg	540
agctgcaagg ccagccagag cgtggaaagc aacgtggcct ggtatcagca gaagcccgaa	600
caggctctc gggccctgat ctacagcgcc agcctgagat tcagcggcat cccgcagg	660
tttagcggct ctggcagcgg caccgagttc accctgacaa tcagcggcct gcagagcgg	720
gactttggcg tgtattactg ccagcagtac aacaactacc ccctgacccctt cggagccggc	780
accaagctgg agctgaagcc tgccgagcct aagagcccg acaagaccca caccgtccc	840
ccttgcctg cccctccagt ggctggccct agcgtgttcc tttttttttt aaagcccaag	900
gataccctga tgatcgcccg gaccccccga gtcacatgctg tgggggtggc cgtgagccac	960
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtaac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag	1020
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggcagcgt cctcaccgtc	1080
ctgcaccagg actgttgaa tggcaaggag tacaagtgcg aggtctccaa caaagccctc	1140
ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaaggc acggccgaga accacaggtg	1200
tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc agtcagcct gacctgcctg	1260
gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag	1320
aacaactaca agaccacgcc tccctgtctg gactccgacg gtccttctt cctctacagc	1380
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tttctctatg ctccgtatg	1440
catgaggcgc tgcacaacca ctacacgcag aagacccctc ccctgtctcc gggtaaaaaaa	1500
gatccaaat ttgggtgct ggtgggtgtt ggtggagtcc tggcttgcta tagttgcta	1560
gtaacagtgg ctttattat ttctgggtg aggagtaaga ggacggcgt cctgcacagt	1620

gactacatga acatgactcc ccggccgcccc gggcccaccc gcaagcatttta ccagccctat	1680
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgcc tccctgagag tgaagttcag caggagcgca	1740
gacgcccccg cgttaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tcttaggacga	1800
agagaggagt acgtatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag	1860
ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaaga taagatggcg	1920
gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgcggga gggcaaggg gcacatggc	1980
ctttaccagg gtctcagttac agccaccaag gacacctacg acgccttca catgcaggcc	2040
ctgccccctc gctga	2055
<210> 87	
<211> 2055	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Construct X	
<400> 87	
atggatttcc aggtgcagat cttcagttc ctgctgatct ccggccagcgt gatcatgagc	60
cgcgagatcg tggatgacaca gagccctgcc accctgagcg tggcccccagg cgaaagagct	120
accctgagct gcaaggccag ccagagcgtg gaaagcaacg tggcctggta tcagcagaag	180
cccgacagg ctccctggc cctgatctac agcgccagcc tgagattcag cggcatcccc	240
gccaggttta gcccgtctgg cagcggcacc gagttcaccc tgacaatcag cagcctgcag	300
agcgaggact ttgcgtgtta ttactgccag cagttacaaca actacccctt gacccctggaa	360
gccggcacca agctggagct gaagggcagc accagcggtt ccggcaagcc tggctctggc	420
gagggcagca caaagggaga ggtgcagctg gtggaatctg gcgaggact ggtgcagcc	480
ggcgctctc tgagactgtc ttgtgccccc agcggttca cttcagccg gtactggttt	540
agctgggtgc gccaggcccc tggcaaggga ctcggtggg tgggagagat caaccccagc	600
agcagcacca tcaactacgc ccccagcgtg aaggacaagt tcaccatcag cagagacaac	660
gccaagaaca ccctgtacctt gcagatgaac agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac	720
tattgtgcca gcctgtacta cgactacggc gacgcctacg attactgggg ccagggcaca	780
ctgggtgactg ttatgtcccc ttggcggccctt aagagccccg acaagaccca cacctgtccc	840
ccttgcgtctc cccctccagt ggctggccctt agcggttcc ttgtcccccc aaagcccaag	900
gataccctga tgatgcggc gaccccgaa gtcacatgcg ttgtgggtgga cgtgagccac	960
gaagaccctg aggtcaagttt caactggtaac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag	1020

acaaggccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggcagcgt ctcaccgtc	1080
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgcg aggtctccaa caaagccctc	1140
ccagccccca tcgagaaaac catctccaa gccaaaggc agcccccaga accacagggtg	1200
tacaccctgc ccccatcccg ggtgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg	1260
gtcaaggct tctatcccg cgacatcgcc gtggagtgg agagcaatgg gcagccggag	1320
aacaactaca agaccacgcc tccctgtctg gactccgacg gtccttctt cctctacagc	1380
aagctcaccc tggacaagag caggtggcag cagggaaacg tcttctcatg ctccgtatg	1440
catgaggctc tgacacaacca ctacacgcag aagagctct cctgtctcc ggtaaaaaaa	1500
gatccaaat ttgggtgct ggtgggttt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgta	1560
gtaacagtgg ctttattat ttctgggtg aggagaaga ggaggcaggct cctgcacagt	1620
gactacatga acatgactcc ccggccccc gggcccaccc gcaagcattt ccagccctat	1680
ccccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccctgagag tgaagttcag caggagcga	1740
gacgcccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga	1800
agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat gggggaaag	1860
ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg	1920
gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgcggg gggcaagg gcacgatggc	1980
cttaccagg gtcctcgtac agccaccaag gacacctacg acgccctca catgcaggcc	2040
ctgccccctc gctga	2055
<210> 88	
<211> 2055	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Construct XI	
<400> 88	
atggattcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccggcagcgt gatcatgagc	60
cgcgaagtgc agctggtcga atctggagga ggcctgggtc agcctggtgg cagccttagg	120
ctctttgtg cagcctctgg ctttaccttc tcacggattt ggttcagctg ggtgagacag	180
gctccaggga aaggctctggt gtgggttaggg gagataaaacc ccagcagcag cacgatcaac	240
tatgctcgt cactgaaaga caagttcacc atttcccgat ataatccaa gaacactctc	300
tacttgcaga tgaattccct tcgagccgag gatacagcgg tgcactactg cgccagtcg	360
tactacgact atggggacgc atacgactat tggggacaag gcacactggt gactgttagc	420

tccggcagca ccagcggtc cgccaagect ggctctggcg agggcagcac aaagggagag	480
atcgtatga cccagtcctc tgctaccctg agcgttctc cgggtgaaag ggccacactc	540
agctgcaaag cctctcaaag cgtggagagc aatgtcgctt ggtatcagca gaaacctggc	600
caagctccga gggactgtat ctattcccg tcattgcgt tttccggcat accagcacgg	660
ttagtggtc cagggagtgg gactgagttc actctgacga ttagctccct tcagtcagag	720
gatttcggc tgtaactactg tcagcgtac aacaactatc ccctcacatt cggagctgga	780
accaagctgg aactgaagcc tgccgagcc aagagccccg acaagaccca cacctgtccc	840
ccttgcttg cccctccagt ggctggccct agcgtgttcc tggcccccc aaagcccaag	900
gataccctga tggatcgcccg gaccccccga gtcacatgctc tgggtggta cgtgagccac	960
gaagaccctg aggtcaagtt caactggta gttggacggcg tggaggtgca taatgccaag	1020
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc	1080
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgc aggtctccaa caaagccctc	1140
ccagccccca tcgagaaaac catctccaa gccaaaggc agccccgaga accacaggtg	1200
tacaccctgc ccccatcccg ggtatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg	1260
gtcaaaggct tctatcccg cgacatcgcc gtggagtgg agagcaatgg gcagccggag	1320
aacaactaca agaccacgccc tccctgtctg gactccgacg gtccttctt cctctacagc	1380
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtatg	1440
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagectct ccctgtctcc gggtaaaaaaa	1500
gatccaaat tttgggtgct ggtgggtgg tggggatcc tggcttgcta tagcttgcta	1560
gtaacagtgg ccttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt	1620
gactacatga acatgactcc ccggccccc gggcccaccc gcaaggcattt ccagccctat	1680
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgcc tccctgagag tgaagttcag caggagcga	1740
gacccccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga	1800
agagaggagt acatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat gggggaaag	1860
ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg	1920
gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgccgga gggcaagg gcacgatggc	1980
ctttaccagg gtctcgtac agccaccaag gacacctacg acgccttca catgcaggcc	2040
ctgccccctc ctgtca	2055
<210> 89	
<211> 2031	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XII

<400> 89

atggatttcc aggtgcagat cttagcttc ctgctgatct ccggccagcgt gatcatgagc 60

atcgatcgatgcacagagcccc	tgccaccctg	agcggtgtccc	caggcgaaag	agctaccctg	540	
agctgcaggcc	ccagccagag	cgtggaaagc	aacgtggcct	ggtatcagca	gaagcccgga	600
caggctcctc	gggcccgtat	ctacagcgcc	agcctgagat	tcagcggcat	ccccgccagg	660
ttttccggat	ctggcagcgg	caccgagttc	accctgacaa	tcagcggcct	gcagagcggag	720
gactttgcgc	tgttattactg	ccagcagttac	aacaactacc	ccctgaccct	cggagccggc	780
accaagctgg	agctgaagga	gagcaagttac	ggccctccct	cccccccttg	ccctgcccc	840
gagttcgagg	gcccccccgag	cgtttccctg	ttccccccca	agcccaagga	caccctgatg	900

atcagccgga ccccgaggt gacctgcgtg gtggtgacg tgagccagga agatcccgag 960
gtccagttca attggtagct ggacggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga 1020
gaggaacagt tcaacagcac ctaccgggtg gtgtctgtgc tgaccgtgct gcaccaggac 1080
tggctgaacg gcaaagaata caagtgcag gtgtccaaca agggcctgcc cagcagcatc 1140
gaaaagacca tcagcaaggc caagggccag cctcgcgagc cccaggtgta caccctgcct 1200
ccctcccgagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggta gaagggctc 1260
tacccccagcg acatcgccgt ggagtggag agcaacggcc agcctgagaa caactacaag 1320

accacccctc ccgtgctgga cagcgacggc agcttcttc tctacagccg gctgaccgtg	1380
gacaagagcc ggtggcagga aggcaacgtc tttagctgca gcgtgatgca cgagggccctg	1440
cacaaccact acacccagaa gagcctgagc ctgtccctgg gcaagtttg ggtgttgtg	1500
gtggtgtggg gagtcctggc ttgctatagc ttgctagtaa cagtggcctt tattatttc	1560
tgggtgagga gtaagaggag caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgt	1620
cgacccgggc ccacccgcaa gcattaccag ccctatgccc caccacgcga cttcgcagcc	1680

tatcgctccc tgagagtcaa gttcagcagg agcgcagacg ccccgcgta ccagcaggc	1740
cagaaccaggc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgtttggac	1800
aagagacgtg gccgggaccc ttagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa	1860
ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattggatg	1920
aaaggcgaggc gccggagggg caagggcac gatggcctt accaggtct cagtacagcc	1980
accaaggaca cttacgacgc cttcacatg caggccctgc cccctcgctg a	2031
<210> 90	
<211> 1701	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Construct XIII	
<400> 90	

atggattcc aggtgcagat cttcagttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc	60
cgcgagggtgc agctgggtgaa atctggcgaa ggactgggtc agcctggcgg ctctctgaga	120
ctgtcttgtc cggccagcgg cttcacatc agccggtaact ggtttagctg ggtgcggcag	180
gcccctggca agggactcgt gtgggtggaa gagatcaacc ccagcagcag caccatcaac	240
tacggcccca gcctgaagga caagttcacc atcagcagag acaacgcca aacaccctg	300
tacctgcaga tgaacagcct gcggggccgag gacaccgcg tgtaactattg tgccagcctg	360
tactacgact acggcgacgc ctacgattac tggggccagg gcacactggt gactgttagc	420

tccggcagca ccagcggctc cggcaagect ggctctggcg agggcagcac aaaggagag	480
atcggtatga cacagagccc tgccaccctg agcgtgtccc caggcgaag agctaccctg	540
agctgtcaagg ccagccagag cgtggaaagc aacgtggcct ggtatcagca gaagccggaa	600
caggctccctc gggccctgat ctacagcgc agcctgagat tcagcggcat ccccgccagg	660
ttttccggat ctggcagcgg caccgagttc accctgacaa tcagcggcct gcagagcgg	720
gactttcccg tgtaattactg ccagcagttac aacaactacc ccctgacccctt cggagccggc	780
accaagctgg agctgaagga gagcaagtac ggccctccctt gcccccttg ccctggccag	840

cctcgcgagc cccaggtgta caccctgcct ccctccagg aagagatgac caagaaccag	900
gtgtccctga ctgcctgggtt gaagggcttc taccggcggc acatcgccgt ggagtggag	960
agcaacggcc agcctgagaa caactacaag accaccctc ccgtgctgga cagcgcggc	1020
agcttcttc tctacagccg gctgaccgtg gacaagagcc ggtggcagga aggcaacgtc	1080
tttagctgca gcgtgtatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gagcctgagc	1140

ctgtccctgg gcaagtttg ggtgctggg gtgggtggg gagtcctggc ttgctatagc	1200
ttgctagtaa cagtggcctt tattatttc tgggtgagga gtaagaggag caggctctg	1260
cacagtgact acatgaacat gactccccgt cgaccgggc ccacccgcaa gcattaccag	1320
ccctatgccc caccacgcga cttcgaccc tatcgctcc tgagagtgaa gttcagcagg	1380
agcgcagacg ccccccgtta ccagcaggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta	1440
ggacgaagag aggagtacga tttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg	1500
ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa gccctgtaca atgaactgca gaaagataag	1560
atggcggagg cctacagtga gattggatg aaaggcgagc gccggagggg caagggcac	1620
gatggcctt accagggtct cagtagcacc accaaggaca cttacgacgc cttcacatg	1680
caggccctgc cccctcgctg a	1701
<210> 91	
<211> 1380	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Construct XIV	
<400> 91	
atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccggcagcgt gatcatgagc	60
cgcgaggtgc agctgggtga atctggcggg ggactgggtgc agcctggcgg ctctctgaga	120
ctgtcttggc ccggcagcgg cttcaccttc agccggtaact ggtagtgc ggtgcggccag	180
gcccctggca agggactcgt gtgggtggga gagatcaacc ccagcagcag caccatcaac	240
tacggcccca gcctgaagga caagttcacc atcagcagag acaacgcca aacaccctg	300
tacctgcaga tgaacagcct gcggggccgag gacaccgcg tgtactattg tgccagcctg	360
tactacgact acggcgacgc ctacgattac tggggccagg gcacactggt gactgttagc	420
tccggcagca ccagcggcct cggcaaggct ggctctggcg agggcagcac aaaggagag	480
atcgtgtga cacagagccc tgccaccctg agcgtgtccc cagggaaag agctaccctg	540
agctgcaagg ccagccagag cgtggaaagc aacgtggcct ggtatcagca gaagccggaa	600
caggctcctc gggccctgat ctacagcggcc agcctgagat tcagcggcat ccccgccagg	660
ttttccggat ctggcagcgg caccgagttc accctgacaa tcagcagcct gcagagcggag	720
gactttcccg ttttccggat ccagcagttc aacaaatacc ccctgacaa tcagcagcct gcagagcggag	780
accaagctgg agctgaagga gagcaagttc ggccctccct gcccccttg cccttttgg	840
gtgctgggtgg tgggtgggtgg agtccctggct tgctatagct tgctagtaac agtggcctt	900

attattttct gggtagggag taagaggagc aggctctgc acagtgacta catgaacatg	960
actccccgtc gacccgggcc caccgcgaag cattaccagc cctatcccc accacgcgac	1020
ttcgcagcct atcgctccct gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac	1080

cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtagcat	1140
gtttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatgggg gaaagccgag aaggaagaac	1200
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag	1260
attggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggcctta ccagggctc	1320
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgctga	1380
	1380

<210> 92

<211> 2040

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XV

<400> 92

atggatttc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgcgcgcgt gatcatgagc	60
cgcgagggtgc agctggtgga atctggcgga ggactgggtgc agcctggcggt ctctctgaga	120
ctgtcttgcg ccgcgcgcgt cttcacatcc agccgcgtact ggtagctg ggtgcgcgcag	180
gccccctggca agggactcgt gtgggtggga gagatcaacc ccagcgcgcg caccatcaac	240
tacgcgcgcgc gcctgaagga caagttcacc atcagcagag acaacgccaa gaacaccctg	300
tacctgcaga tgaacagcct gcggccgcg gacaccgcgc tgtagtattg tgccagcctg	360

tactacgact acggcgacgc ctacgattac tggggccagg gcacactgg gactgttagc	420
tccggcagca ccagcggtc cggcaagcct ggctctggcg agggcgcac aaagggagag	480
atcgtgtatca cacagagccc tgccaccctg agcgtgtccc caggcgaaag agctaccctg	540
agctgcaagg ccagccagag cgtggaaagc aacgtggcct ggtatcagca gaagcccgga	600
caggctccctc gggccctgat ctacagcgcc agcctgagat tcagcggcat cccgcgcagg	660
tttagcggct ctggcagcgg caccgagttc accctgacaa tcagcgcct gcagagcgcg	720
gactttgcgg tgtattactg ccagcgtac aacaactacc ccctgacccctt cggagccggc	780

accaagctgg agctgaagcc tgccgagcct aagagcccg acaagaccca cacctgtccc	840
ccttgcgtctg cccctccagt ggctggccct agcgtgttcc tggcccccc aaagcccaag	900
gataccctga tgatcgcccg gaccccccga gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac	960

gaagaccctg aggtcaagtt caactggta cgtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1020
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1080
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgc aaggctccaa caaagccctc 1140
 ccagccccca tcgagaaaac catctccaa gccaaaggc agcccgaga accacaggta 1200

tacaccctgc cccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctc 1260
 gtgaaggcgt tctaccctc cgatatcgcc gtggaatggg agagcaatgg ccagcccgag 1320
 aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg gacagcgcacg gctcattctt cctgtacagc 1380
 aagctgacag tggacaagag ccgggtggcag cagggcaacg tggtcagctg cagcgtgatg 1440
 cacgaggctc tgcacaacca ctacacccag aagtccctga gcagccctgag cccaggcaag 1500
 aagatctaca tctggggccc tctggccggc acctgtggcg tgctgctgct gtctctcg 1560
 atcacactgt actgcaagcg gggcagaaag aagctgctgt acatctcaa gcagccctc 1620

atgcggcccg tgcagaccac ccaggaagag gacggctgct cctgcagatt ccccgaggaa 1680
 gaagaaggcg gctgcgagct gctgcgcgtg aagtttcta gaagcggcga cgccctgcc 1740
 taccagcagg gccagaacca gctgtacaac gagctgaacc tggcagacg ggaagagttac 1800
 gacgtgtgg ataagcggag aggccgggac cctgagatgg gcccgaagcc tagaagaaag 1860
 aaccccccagg aaggcctgta taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggcctacagc 1920
 gagatcgaa tgaagggcga gcggagaaga ggcaaggccc acgatggact gtaccaggc 1980
 ctgagcaccg ccaccaagga cacctatgac gcccctgcaca tgcaggctct gccccccaga 2040

2040

<210> 93

<211> 2040

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XVI

<400> 93

atggattcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccggccagcgt gatcatgagc 60
 cgcgagatcg tggatgacaca gagccctgcc accctgagcg tggccctggta tcagcagaag 120
 accctgagct gcaaggccag ccagagcgtg gaaagcaacg tggccctggta tcagcagaag 180
 cccggacagg ctccctggc cctgatctac agcggccagcc tggatgcag cggcatcccc 240

gccaggtta gcccgtctgg cagcggcacc gagttcaccc tgacaatcag cagcctgcag 300
 agcggaggact ttggcgtgta ttactgccag cagtacaaca actacccct gaccttcgga 360

gccggcacca agctggagct gaagggcagc accagcgct ccggcaagcc tggctctggc	420
gagggcagca caaagggaga ggtgcagctg gtggaatctg gcggaggact ggtgcagcct	480
ggcggcttc tgagactgtc ttgtgccgcc agcggcttca cttcagccg gtactggtt	540
agctgggtgc gccaggcccc tggcaaggga ctctgtggg tggagagat caacccacg	600
agcagcacca tcaactacgc ccccagcctg aaggacaagt tcaccatcag cagagacaac	660
gccaagaaca ccctgtacct gcagatgaac agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac	720
tattgtgcca gcctgtacta cgactacggc gacgcctacg attactgggg ccagggcaca	780
ctggtgactg ttagctcccc tgccgagcct aagagccccg acaagaccca cacctgtccc	840
ccttgcctg cccctccagt ggctggccct agcgtgttcc tttcccccc aaagcccaag	900
gataccctga tgatcgcccc gaccccccga gtcacatgctg tgggtggta cgtgagccac	960
gaagaccctg aggtcaagtt caactggta gttggacggcg tggaggtgca taatgccaag	1020
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc	1080
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc	1140
ccagccccca tcgagaaaac catctccaa gccaaaggc agcccccaga accacaggtg	1200
tacaccctgc ccccatcccg ggtatgagctg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctc	1260
gtgaaggcgt tctaccctc cgatatcgcc gtggatggg agagcaatgg ccagcccgag	1320
aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg gacagcgacg gctattttt cctgtacagc	1380
aagctgacag tggacaagag ccgggtggcag caggcaacg ttttcagctg cagcgtgtatg	1440
cacgaggctc tgacacaacca ctacacccag aagtccctga gcagccgtg cccaggcaag	1500
aagatctaca tctggccccc tctggccggc acctgtggcg tgctgctgt gtctctcg	1560
atcacactgt actgcaagcg gggcagaaag aagctgctgt acatcttcaa gcagcccttc	1620
atgcggcccg tgcagaccac ccaggaagag gacggctgtc cctgcagatt ccccgaggaa	1680
gaagaaggcg gctgcgagct gctgcgcgtg aagtttttta gaagccgcga cccccctgcc	1740
taccagcagg gccagaacca gctgtacaac gagctgaacc tggcagacg ggaagagttac	1800
gacgtgctgg ataagcggag aggccgggac cctgagatgg gccggcaagcc tagaagaag	1860
aaccccccagg aaggcctgta taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggcctacagc	1920
gagatcgaa tgaagggcga gcggagaaga ggcaaggccc acgatggact gtaccaggc	1980
ctgagcaccg ccaccaagga cacctatgac gcccgtcaca tgcaggctt ccccccaga	2040
	2040

<210> 94

<211> 2040

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Construct XVII

<400> 94

atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc	60
cgcgaagtgc agctggtcga atctggagga ggcctgggtc agcctgggtgg cagccttagg	120
ctctcttgg cagcctctgg ctttaccttc tcacggatt ggttcagctg ggtgagacag	180
gctccaggga aaggctctgg gtgggttaggg gagataaacc ccagcagcag cacgatcaac	240
tatgctccgt cactgaaaga caagttcacc atttcccgat ataatccaa gaacactctc	300
tacttgcaga tgaattccct tcgagccag gatacagcgg tgtactactg cgccagtcg	360
tactacgact atggggacgc atacgactat tggggacaag gcacactggt gactgttagc	420
tccggcagca ccagcggctc cggcaagcct ggctctggcg agggcagcac aaagggagag	480
atcgtgtatca cccagtctcc tgctaccctg agcgtttctc ccgggtgaaag ggccacactc	540
agctgcaaaag cctctcaaag cgtggagagc aatgtgcct ggtatcagca gaaacctggc	600
caagctccga gaggactgat ctattcccgat tcattgcgt tttccggcat accagcacgg	660
tttagtggtc cagggagttgg gactgagttc actctgacga ttagctccct tcagttagag	720
gatttcggcg tgtactactg tcagcgtac aacaactatc ccctcacatt cggagctgga	780
accaagctgg aactgaagcc tgccgagcct aagagcccg acaagaccca caccgtccc	840
ccttgctctg cccctccagt ggctggccct agcgtgttcc tggccccc aaagcccaag	900
gataccctga tggatcgcccg gaccccgaa gtcacatgca tggtgggtgg cgtgagccac	960
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtagt gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag	1020
acaaaggccgc gggaggagca gtacaacagc acgttccgtg tggtagcgt cctcaccgtc	1080
ctgcaccagg acggctgaa tggcaaggag tacaagtgcg aggtctccaa caaaggccctc	1140
ccagccccc tcgagaaaac catctccaa gccaaaggcc agcccccggaa accacaggtg	1200
tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtgtccct gacccgtccc	1260
gtgaagggtc tctacccttc cgatatcgcc gtggatggg agagcaatgg ccagcccgag	1320
aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg gacagcgcacg gtcatttctt cctgtacagc	1380
aagctgacag tggacaagag ccgggtggcag caggcacaacg tggtagcgt cagcgtgatg	1440
cacgaggctc tgcacaaccca ctacaccccg aagtccctga gcagcctgag cccaggcaag	1500
aagatctaca tctggccccc tctggccggc acctgtggcg tgctgctgct gtctctcg	1560
atcacactgt actgcaagcg gggcagaaag aagctgctgt acatcttcaa gcagcccttc	1620

atgcggcccg tgcagaccac ccaggaagag gacggctgct cctgcagatt ccccgaggaa	1680
gaagaaggcg gctgcgagct gctgcgcgtg aagtttcta gaagcgccga cgccctgcc	1740
taccagcagg gccagaacca gctgtacaac gagctgaacc tggcagacg ggaagagtac	1800
gacgtgctgg ataagcggag aggccggac cctgagatgg gcggcaagcc tagaagaaag	1860
aaccccccagg aaggcctgta taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggcctacagc	1920
gagatcgaa tgaagggcga gcggagaaga ggcaagggcc acgatggact gtaccaggc	1980
ctgagcacccg ccaccaagga cacctatgac gccctgcaca tgcaggctct gccccccaga	2040
	2040