



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월03일

(11) 등록번호 10-2297918

(24) 등록일자 2021년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2866 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-7028939
 (22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
 심사청구일자 2019년03월14일
 (85) 번역문제출일자 2015년10월13일
 (65) 공개번호 10-2016-0012991
 (43) 공개일자 2016년02월03일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2014/029109
 (87) 국제공개번호 WO 2014/144622
 국제공개일자 2014년09월18일
 (30) 우선권주장
 13/844,048 2013년03월15일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 British J. Haematol., Vol. 161, pp.389-401
 (2013. 2. 25.)*
 Gene Therapy, Vol. 17, pp.1206-1213 (2010.)*
 J. Immunol. Methods, Vol. 306, pp.151-160
 (2005. 9. 22.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 시티 오브 호프
 미국 91010-3000 캘리포니아주 두아르테 이스트
 두아르테 로드 1500
 (72) 발명자
 포맨, 스티븐
 미국 91010 캘리포니아주 두아르테 이스트 두아르
 테 로드 1500
 마르디로스, 아멘
 미국 91202 캘리포니아주 글렌데일 노쓰 콜럼버스
 애비뉴 1112
 (74) 대리인
 양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 CD123-특이적 키메라 항원 수용체에 의해 재지정된 T 세포 및 이의 사용 방법

(57) 요약

CD123 상의 상이한 에피토프들을 표적화하도록 CD123 특이적 scFv를 함유하는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 패밀리가 개발되었다. 일부 실시양태에서, 이같은 CD123 키메라 항원 수용체 (CD123CAR) 유전자는 S228P 치환, L235E 치환, 및 임의적인 N297Q 치환을 포함하는 변형된 IgG4 힌지(hinge) 영역; 공동자극성 신호전달 도메인; 및 T 세포 수용체 (TCR) 제타쇄 신호전달 도메인에 인-프레임(in frame)으로 융합된 항-CD123 scFv 영역을 포함한다. 건강한 공여자 T 세포 (CD4/CD8)에서 발현되는 경우, CD123CAR은 T 세포 특이성을 재지정하고, CD123+ 세포주, 뿐만 아니라 원발성 AML 환자 샘플에서 강력한 이펙터 활성을 매개하였다. 또한, 활성 AML의 환자로부터 수득된 T 세포가 CD123CAR 유전자를 발현하도록 변형될 수 있고, 시험관 내에서 자가 AML 모세포를 용해할 수 있다. 마지막으로, 단일 용량의 5.0×10^6 개의 CAR123 T 세포가 마우스에서 유의하게 지연된 백혈병 진행을 초래한다. 이러한 결과들은 CD123CAR-형질도입 T 세포가 고위험 AML의 치료를 위한 면역요법으로서 사용될 수 있다는 것을 시사한다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항-CD123 scFv 영역; (i) 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환 및 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 또는 (ii) 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환, 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 및 위치 10의 S에서 P로의 아미노산 치환을 갖는 서열 13을 포함하는 IgG4 힌지 영역; 막횡단 도메인 및 T 세포 수용체 (TCR) 제타쇄 신호전달 도메인을 포함하는 CD123 키메라 항원 수용체 (CD123CAR) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 13을 포함하는 IgG4 힌지 영역이 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환, 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 및 위치 10의 S에서 P로의 아미노산 치환을 갖는 것인 핵산 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 항-CD123 scFv 영역이 인간화된 것인 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, CD123CAR 폴리펩티드가 CD27 공동자극성 신호전달 도메인, CD28 공동자극성 신호전달 도메인, 4-1BB 공동자극성 신호전달 도메인, OX40 공동자극성 신호전달 도메인, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 공동자극성 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 막횡단 도메인이 변형된 CD28 막횡단 도메인인 핵산 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, CD123CAR 폴리펩티드가 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 서열 3 및 서열 4로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 8

항-CD123 scFv 영역; (i) 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환 및 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 또는 (ii) 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환, 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 및 위치 10의 S에서 P로의 아미노산 치환을 갖는 서열 13을 포함하는 IgG4 힌지 영역; 및 T 세포 수용체 (TCR) 제타쇄 신호전달 도메인을 포함하는 CD123 키메라 항원 수용체 (CD123CAR) 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트.

청구항 9

제8항에 있어서, 말단절단 표피 성장 인자 수용체 (EGFRt), 말단절단 CD19 (CD19t) 또는 카스파제(caspase) 9로 이루어진 군으로부터 선택된 보조 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 발현 카세트.

청구항 10

항-CD123 scFv 영역; (i) 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환 및 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 또는 (ii) 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환, 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 및 위치 10의 S에서 P로의 아미노산 치환을 갖는 서열 13을 포함하는 IgG4 힌지 영역; 및 T 세포 수용체 (TCR) 제타쇄 신호전달 도메인을 포함하는 CD123 키메라 항원 수용체 (CD123CAR) 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 바이러스 벡터가 형질도입된 인간 T 세포의 집단.

청구항 11

항-CD123 scFv 영역; (i) 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환 및 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 또는 (ii) 위치 79의 N에서 Q로의 아미노산 치환, 위치 17의 L에서 E로의 아미노산 치환, 및 위치 10의 S에서 P로의 아미노산 치환을 갖는 서열 13을 포함하는 IgG4 힌지 영역; 및 T 세포 수용체 (TCR) 제타쇄 신호전달 도메인을 포함하는 CD123 키메라 항원 수용체 (CD123CAR) 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포의 집단을 포함하는, 대상체에서 AML을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, T 세포가 자가 T 세포인 제약 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

우선권 주장

[0002]

본 출원은 2013년 3월 15일에 출원된 미국 특허 출원 번호 13/844,048을 우선권 주장하고, 이는 도면을 포함하여 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003]

정부 관여

[0004]

본 발명은 NIH 보조 P50 CA107399, P01 CA030206, 및 M01 RR0004 하에 정부의 지지로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 일정한 권리가 있다.

배경 기술

[0005]

급성 골수성 백혈병 (AML)은 기능장애성 조혈을 초래하는 골수 내의 미성숙 골수 세포의 급속한 증식을 특징으

로 하는 질환이다 [1]. 급성 골수성 백혈병 (AML)에 대한 1선 치료는 거의 50년 동안 크게 변하지 않았고, AML은 여전히 예후가 불량한 질환이다. 표준 유도 화학요법이 완전한 완화를 유도할 수 있지만, 다수의 환자가 결국 재발되고, 질환에 굴복한다 [2]. 따라서, AML에 대한 신규 치료제의 개발이 매우 중요하다.

[0006] 동종이형 조혈 세포 이식이 선별된 환자에서 질환의 치유를 달성할 수 있고, 공여자-유래 면역요법에 대한 AML의 감수성을 강조한다. 추가적으로, 인터루킨 3 수용체 알파쇄 (CD123)가 잠재적인 면역요법 표적으로서 확인되었는데, 정상 조혈 줄기 세포에 비교하여 AML에서 과발현되기 때문이다.

[0007] AML 세포의 면역표현형결정(immunophenotyping)에서의 최근의 발전으로 추후의 요법에 대한 표적으로서 작용할 수 있는, AML과 연관된 여러 세포 표면 항원이 밝혀졌다 [3]. 실제로, AML의 치료를 위해 CD44, CD47, T 세포 면역글로불린 뮤신(mucin)-3 (TIM-3) 및 인터루킨 3 수용체 알파쇄 (IL-3R α ; CD123)를 표적화하는 항체를 사용하는 임상전 연구들이 기술되었고, 뮤린(murine) 모델에서 전도유망한 항-백혈병 활성을 실연하였다 [3, 4]. 급성 및 만성 골수성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, B-세포 계통 급성 림프모구성 백혈병, 및 모세포 형질세포양 수지상 세포 신생물을 포함하는 다양한 악성 종양에서 CD123이 발현된다. 추가적으로, CD123은 전형적으로 정상 조혈 줄기 세포 상에서 발현되지 않아서, CD123을 이상적인 면역요법 표적으로 만든다. 추가적으로, CD123-특이적 치료제에 대한 2개의 I상 시험이 완료되었고, 양쪽 모두의 약물이 양호한 안전성 프로파일을 나타냈다 (ClinicalTrials.gov ID: NCT00401739 및 NCT00397579). 불행하게도, 이러한 CD123 표적화 약물들은 효능이 제한되어, 항-백혈병 활성을 관찰하기 위해 CD123을 표적화하는 대안적이고 더욱 강력한 요법이 요구될 수 있다는 것을 시사하였다.

[0008] AML의 치료를 위한 가능한 더욱 강력한 대안적인 요법은 MHC-비의존적 방식으로 세포 표면의 종양 연관 항원 (TAA)을 향해 T 세포 특이성을 재지정하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 세포를 사용하는 것이다 [5]. 대부분의 경우에, CAR은 CD3 ζ 의 신호전달 도메인에 융합된 모노클로날 항체로부터의 단일쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하고, 공동자극성 엔도도메인(endodomain)을 함유할 수 있다 [5]. 여러 그룹이 B-세포 악성 종양의 치료를 위한 다양한 항원을 표적화하는 CAR을 개발하였고 [6-10], 다수가 I상 임상 시험에서 CAR 발현 T 세포를 평가하는 것으로 넘어갔다 [11-15]. 대조적으로, AML 치료를 위한 CAR 조작 T 세포는 여전히 부족하다 [16, 17].

[0009] AML에 대한 현재의 치료 체계가 선별된 환자에서 완전한 응답을 달성할 수 있지만, 다수가 결국은 재발될 것이고, 이는 더욱 지속적인 응답에 이를 수 있는 신규 치료제에 대한 요구를 강조한다. 항원 특이적 세포독성 T 림프구, 동종반응성(alloreactive) 천연 킬러(killer) 세포, 및 수지상 세포 백신을 포함하는 다양한 AML 표적화 면역요법이 현재 개발 중이다. 예를 들어, 오카(Oka) 및 동료들은 윌름 종양 1 펩티드 예방접종이 AML 환자에서 임상적 및 면역학적 응답에 이를 수 있다는 것을 실연하였다 [33]. 그러나, 이러한 표적화 요법은 HLA-의존적이다. 이를 위해, HLA-비의존적 방식으로 AML 세포를 선택적으로 표적화하도록 T 세포 특이성을 재지정할 수 있는 표적화된 치료제, 예컨대 CAR을 디자인하는 것이 바람직할 것이다.

발명의 내용

[0010] CD123 상의 상이한 에피토프들을 표적화하도록 CD123 특이적 scFv를 함유하는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 패밀리가 개발되었다. 일부 실시양태에서, 이같은 CD123 키메라 항원 수용체 (CD123CAR) 유전자는 Fc 수용체 결합을 제거할 IgG4 스페이스 영역의 변형을 포함하는 변형된 IgG4 힌지(hinge) 영역에 인-프레임(in frame)으로 융합된 항-CD123 scFv 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 변형된 IgG4 힌지 영역은 S228P 치환, L235E 치환, 및 임의적인 N297Q 치환을 포함한다. CD123CAR 유전자는 하나 이상의 공동자극성 신호전달 도메인; 및 T 세포 수용체 (TCR) 제타쇄 신호전달 도메인을 또한 포함한다. 일부 실시양태에서, CD123CAR 유전자는 서열 1, 서열 2, 서열 3, 또는 서열 4로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, CD123CAR 유전자는 서열 9; 서열 10, 서열 11, 또는 서열 12를 포함하는 아미노산 서열을 코딩한다.

[0011] 하기 기술된 실시양태들에 따르면, CD123CAR 유전자는 벡터 (예를 들어, 바이러스 벡터) 내에 삽입된 발현 카세트의 일부분일 수 있다. 따라서, 인간 T 세포의 집단에 이러한 벡터가 형질도입되어, T 세포에 의한 CD123CAR 유전자의 발현이 초래될 수 있다. 건강한 공여자 T 세포 (CD4/CD8)에서 발현되는 경우, CD123CAR은 T 세포 특이성을 재지정하고, CD123+ 세포주, 뿐만 아니라 원발성 AML 환자 샘플에서 강력한 이펙터 활성을 매개하였다. CD123CAR T 세포는 시험관 내에서 과립구/대식세포 및 적혈구 콜로니 형성을 유의하게 변경시키지 않았고, 이는 면역 세포와 대조적으로 AML 세포 상에서의 차별적인 효과를 시사한다.

[0012] 또한, 활성 AML의 환자로부터 수득된 T 세포가 CD123CAR 유전자를 발현하도록 변형될 수 있고, 시험관 내에서

자가 AML 모세포를 용해할 수 있다. 이러한 결과들은 CD123CAR-형질도입 T 세포가 고위험 AML의 치료를 위한 면역요법으로서 사용될 수 있다는 것을 시사한다. 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 제1 CD123CAR 유전자가 형질도입된 제1 T 세포 집단을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 AML을 치료하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 제1 CD123CAR 유전자가 형질도입된 제1 T 세포 집단을 제2 CD123CAR 유전자가 형질도입된 제2 T 세포 집단과 조합하여 대상체에게 투여하는 추가적인 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 CD123CAR 유전자는 서열 3 또는 서열 4로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 제2 CD123CAR 유전자 또한 서열 3 또는 서열 4로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있지만, 제2 CD123CAR 유전자의 뉴클레오티드 서열은 제1 CD123CAR 유전자에 대해 선택된 것과 동일하지 않을 수 있다. 이는 단일 CD123CAR-형질도입 T 세포 집단을 사용하는 것에 비교했을 때 상승작용성 효과를 야기할 수 있는, 2개 이상의 상이한 CD123CAR-형질도입 T 세포 집단을 사용하는 AML의 조합 치료를 초래한다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 CD123-특이적 CAR가 건강한 공여자 인간 T 세포에서 발현될 수 있다는 것을 나타낸다. (a) 변형된 IgG4 힌지, CD28의 변형된 막횡단 및 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 함유하는 CAR의 개략도. T2A 리보솜 스킵(skip) 서열 및 말단절단 EGFR (EGFRt) 형질도입 마커가 또한 지시된다. (b) 1개의 건강한 공여자로부터 유래된 모조 및 렌타-형질도입 T 세포의 대표적인 표현형. 면역자기(immunomagnetic) 선별 및 1 사이클의 확장 후, CAR-변형 T 세포를 비오틴화 항-Fc 또는 비오틴화 항-EGFR에 이어서 PE-접합 스트렙타비딘 및 항-TCR α/β , 항-CD4, 또는 항-CD8로 염색하고, 유동 세포측정법으로 분석하였다. 4분면 배치는 이소형(isotype) 대조군으로의 염색을 기초로 하고, 각각의 4분면에 속하는 세포의 백분율이 지시된다. (c) 면역자기 선별 및 1 사이클의 확장 후의 3개의 상이한 건강한 공여자 T 세포주로부터의 지시된 세포 표면 마커의 발현. 데이터는 평균값 \pm SEM을 나타낸다.

도 2는 CD123-특이적 CAR을 발현하는 T 세포가 CD123-발현 종양 세포주를 용해한다는 것을 나타낸다. (a) CD123 (상부, 흑색 선) 또는 CD19 (하부, 흑색 선)를 발현하도록 일시적으로 형질감염된 293T 세포의 유동 킬로메트릭(kilometric) 분석. 배경 발현 수준을 결정하기 위해 모조-형질도입 모 293T 세포를 항-CD123 또는 항-CD19 항체로 염색하였다 (회색으로 채워짐, 상부 및 하부). (b) 크롬 방출 검정법에 의한 CD123 (293T-CD123) 또는 CD19 (293T-CD19)를 발현하는 293T 세포에 대한 CD123-CAR 발현 T 세포 (26292 및 32716)의 특이적 세포독성. 데이터는 3중 웰의 평균값 + S.D를 나타낸다. (c) AML 세포주 KG1a, EBV-형질전환 LCL 세포주, 및 CML 세포주 K562 상에서의 CD123의 유동 킬로메트릭 분석. 이소형 대조군 (회색으로 채워짐)에 비해 CD123 염색에 대해 양성인 세포 (흑색 선)의 백분율이 각각의 히스토그램에서 지시된다. (d) 크롬 방출 검정법에 의한 CD19+ CD123+ LCL 세포주 및 CD19- CD123+ 세포주 KG1a에 대한 CD123-CAR T 세포 (26292 및 32716)의 특이적 세포독성. OKT3을 발현하는 LCL (LCL-OKT3) 및 CD19- CD123- K562 세포주가 각각 양성 및 음성 대조군 세포주로서 사용되었다. 데이터는 3중 웰의 평균값 + S.D를 나타낸다.

도 3은 CD123-특이적 T 세포가 INF- γ 및 TNF- α 를 방출하고 CD123 발현 표적 세포에 응답하여 증식한다는 것을 나타낸다. 3명의 건강한 공여자로부터의 CD123 CAR T 세포, 또는 쌍으로 매칭(matching)된 대조군 T 세포를 24 시간 동안 10:1의 E:T로 지시된 세포주와 함께 공동배양하고, INF- γ 및 TNF- α 의 방출을 루미넥스(Luminex) 다중 비드 기술에 의해 정량하였다. (b) 쌍으로 매칭된 CFSE-표지 CD19 또는 CD123 특이적 T 세포를 96시간 동안 2:1의 E:T로 지시된 자극물 세포주와 함께 공동배양하고, CFSE 회색에 대해 유동 세포측정법으로 분석하였다. 미자극 T 세포 (채워진 히스토그램)가 기준선 T 세포 증식 대조군으로서 사용되었다.

도 4는 원발성 AML 샘플과의 공동배양 후의 CD123 특이적 CAR에 의한 다중 CD4 및 CD8 이펙터 기능의 활성화를 나타낸다. 쌍으로 매칭된 CAR 조작 T 세포를 6시간 동안 3개의 상이한 원발성 AML 환자 샘플 (AML 179, 373, 및 605)과 함께 공동배양하고, 표면 CD107a 발현 및 세포내 INF- γ 또는 TNF- α 생산에 대해 분석하였다. (a, 막대 그래프) CD107a를 발현하는 DAPI-CD3+CD8+ EGFRt+ 세포의 백분율. 데이터는 평균값 + S.D.를 나타낸다 (a, 파이 차트). 탈과립화가 진행되고 INF- γ 및/또는 TNF- α 를 생산하는 CD3+CD8+ EGFRt+ 세포의 분율이 파이 차트에서 플롯팅된다. (b) a 및 b에서 기술된 것과 동일한 실험으로부터의 DAPI-CD3+CD4+EGFRt+ 집단 데이터. (c) 쌍으로 매칭된 CFSE 표지 CD19 또는 CD123-특이적 T 세포를 72시간 동안 2:1의 E:T로 지시된 자극물 세포와 함께 공동배양하고, DAPI-CD3+ EGFRt+ 집단에서의 CFSE 회색에 대해 유동 세포측정법으로 분석하였다. LCL 및 K562 세포주는 각각 양성 및 음성 27개 대조군으로서의 역할을 한다. 프리(Pre) B-ALL 802는 CD19 및 CD123에 대해 이중 양성인 1차 환자 샘플이다. 4분면 배치는 미자극 T 세포를 기초로 한다.

도 5는 CD123 특이적 T 세포가 원발성 AML 세포를 특이적으로 표적화한다는 것을 나타낸다. (a) 쌍으로 매칭된

CD19 또는 CD123-특이적 T 세포를 4시간 동안 25:1의 E:T로 51Cr 표지 CD34+ 원발성 AML 샘플과 함께 공동배양하였다. LCL 및 K562 세포주는 각각 양성 및 음성 대조군으로서의 역할을 한다. 프리 B-ALL 802는 CD19 및 CD123에 대해 이중 양성인 1차 환자 샘플이다. 데이터는 3중 웰의 평균값 + S.D를 나타낸다. (b) (a)에서의 3개의 원발성 AML 환자 샘플로부터의 AML 모세포의 특이적 용해. 데이터는 평균값 \pm SEM을 나타낸다. 26292 및 32716를 CD19R에 비교하는 쌍을 이루지 않은 스튜던트 t-테스트를 사용하여, *: $p < 0.05$ 및 **: $p < 0.0005$.

도 6은 시험관 내에서의 정상 및 백혈병 선조 세포에 대한 CD123 CAR 발현 T 세포의 효과를 나타낸다. (a 및 b) CD34+ 제대혈 (CB) 세포 ($n=3$)를 CD34 면역자기적으로 선별하고, 4시간 동안 25:1의 E:T로 CD19 또는 CD123-특이적인 쌍으로 매칭된 T 세포 또는 배지 단독 (미처리)과 함께 공동배양하였다. 그 후, 세포를 반고체 메틸셀룰로스 선조 배양물 내에 14-18일 동안 플레이팅하고, 과립구-대식세포 콜로니 형성 단위 (CFU-GM, A) 및 과열 형성 단위 적혈구 (BFU-E, B) 콜로니의 존재에 대해 채점하였다. CD19-특이적 T 세포 대조군에 대해 백분율이 표준화된다. 데이터는 3개의 상이한 CB 샘플에 대한 평균값 \pm SEM을 나타낸다. (c) CD34+ 원발성 AML 환자 샘플 (AML 493, 519, 또는 545)을 면역자기적으로 선별하고, 4시간 동안 25:1의 E:T로 CD19 또는 CD123-특이적인 쌍으로 매칭된 T 세포 또는 배지 단독 (미처리)과 함께 공동배양하였다. 그 후, 세포를 반고체 메틸셀룰로스 선조 배양물 내에 14-18일 동안 플레이팅하고, 백혈병 콜로니 형성 단위 (CFU-L)의 존재에 대해 채점하였다. CD19-특이적 T 세포 대조군에 대해 백분율이 표준화된다. 데이터는 3개의 상이한 원발성 AML 환자 샘플에 대한 평균값 \pm SEM을 나타낸다. 26292 및 32716를 CD19R에 비교하는 쌍을 이루지 않은 스튜던트 t-테스트를 사용하여, *: $p < 0.05$. (d) CD19R에 대해 표준화된, CD123 표적화 CAR 구축물 (26292 또는 32716)로 처리된 (a)로부터의 CB 또는 (c)로부터의 AML 세포의 조합된 콜로니 형성. 쌍을 이루지 않은 스튜던트 t-테스트를 사용하여, *: $p < 0.05$.

도 7은 CD123 CAR에 의해 재지정된, AML 환자로부터 유래된 T 세포가 시험관 내에서 자가 모세포를 특이적으로 용해한다는 것을 나타낸다. (a) CD19R, 26292, 또는 32716 CAR을 발현하도록 렌티바이러스가 3명의 AML 환자로부터의 T 세포에 형질도입되었다. 형질도입 19일 후의 AML 722로부터의 T 세포주가 제시된다. (b) 51Cr 방출 검정법에서 사용된 표적 세포 상에서의 CD123 발현. CD123+ 세포의 백분율 및 각각의 샘플의 상대적 형광 지수 (RFI)가 지시된다. (c) 3개의 AML 환자 샘플로부터 조작된 T 세포를 이펙터로서, 51Cr-표지 자가 CD34-강화 모세포를 표적 세포로서 사용한 4시간 자가 사망 검정법의 결과. 데이터는 3중 웰의 평균값 + S.D를 나타낸다.

도 8은 초파리 루시페라제(luciferase)를 발현하도록 변형된 AML 세포주 KG1a를 주사하고 나서 5일 후 (제5일)에 S228P+L235E 돌연변이 또는 S228P+L235E+N297Q 돌연변이를 함유하는 CD123CAR-형질도입 T 세포 (26292)로 처리된 NSG 마우스의 생물발광 영상화에 의해 제시된 바와 같은 종양 크기 변화를 나타낸다.

도 9는 일부 실시양태에 따른 항원-특이적 단일쇄 Fv, 힌지 영역, 공동자극성 신호전달 도메인, 및 T 세포 수용체 제타-쇄 신호전달 도메인이 있는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 개략도를 나타낸다. (문헌 [Urba WJ and Longo DL N Engl J Med 2011; 365:754-757]로부터의 영상).

도 10은 일부 실시양태에 따른 L235E 돌연변이 및 S228P 돌연변이가 있는 32716CAR 구축물 ("32716CAR(S228P+L235E)")의 개략도를 32716CAR(S228P+L235E) 구축물의 뉴클레오티드 서열 (서열 1 - 안티센스(antisense) 가닥 (상부의 번호가 매겨진 가닥); 서열 5 - 센스(sense) 가닥 (하부의 번호가 매겨진 가닥)), 및 32716CAR(S228P+L235E) 구축물의 아미노산 서열 (서열 9)과 함께 나타낸다. 돌연변이가 볼드체로 제시된다.

도 11은 일부 실시양태에 따른 L235E 돌연변이 및 S228P 돌연변이가 있는 26292CAR 구축물 ("26292CAR(S228P+L235E)")의 개략도를 26292CAR(S228P+L235E) 구축물의 뉴클레오티드 서열 (서열 2 - 안티센스 가닥 (상부의 번호가 매겨진 가닥); 서열 6 - 센스 가닥 (하부의 번호가 매겨진 가닥)) 및 26292CAR(S228P+L235E) 구축물의 아미노산 서열 (서열 10)과 함께 나타낸다. 돌연변이가 볼드체로 제시된다.

도 12는 일부 실시양태에 따른 L235E 돌연변이, S228P 돌연변이 및 N297Q 돌연변이가 있는 32716CAR 구축물 ("32716CAR(S228P+L235E+N297Q)")의 개략도를 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) 구축물의 뉴클레오티드 서열 (서열 3 - 안티센스 가닥 (상부의 번호가 매겨진 가닥); 서열 7 - 센스 가닥 (하부의 번호가 매겨진 가닥)) 및 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) 구축물의 아미노산 서열 (서열 11)과 함께 나타낸다. 돌연변이가 볼드체로 제시된다. IUPAC 염기 코드 R은 A 또는 G에 상응하고, IUPAC 염기 코드 Y는 T 또는 C에 상응한다.

도 13은 일부 실시양태에 따른 L235E 돌연변이, S228P 돌연변이 및 N297Q 돌연변이가 있는 26292CAR 구축물 ("26292CAR(S228P+L235E+N297Q)")의 개략도를 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) 구축물의 뉴클레오티드 서열 (서열 4 - 안티센스 가닥 (상부의 번호가 매겨진 가닥); 서열 8 - 센스 가닥 (하부의 번호가 매겨진 가닥)) 및

26292CAR(S228P+L235E+N297Q) 구축물의 아미노산 서열 (서열 12)과 함께 나타낸다. 돌연변이가 볼드체로 제시된다. IUPAC 염기 코드 R은 A 또는 G에 상응하고, IUPAC 염기 코드 Y는 T 또는 C에 상응한다.

도 14는 원발성 AML 샘플 및 제대혈 상에서의 CD123 발현을 나타낸다. (a) 원발성 AML 세포 상에서의 CD123 발현의 대표적인 예. 세포를 DAPI⁻계통⁻CD34⁺ 집단 상에서 게이팅(gating)하고, CD123 발현에 대해 평가하였다 (흑색 - 이소형 대조군, 적색 - 항-CD123). (b) DAPI⁻계통⁻CD34⁺ 집단에서 발현된 CD123 양성 세포의 백분율. 각각의 지점은 개별적인 샘플을 나타낸다. (c) DAPI⁻계통⁻CD34⁺ 집단에서의 CD123 상대적 형광 지수 (RFI). 항-CD123 세포의 중앙값을 이소형 대조군 염색 세포의 중앙값으로 나누는 것에 의해 RFI가 계산된다. (d) AML 605 (적색), AML 722 (청색), 및 제대혈 샘플 (회색) 상에서의 CD123 발현의 히스토그램 오버레이. 이소형 대조군은 흑색으로 제시된다.

도 15는 원발성 AML 환자 샘플과의 인큐베이션에 응답한 CD123-특이적 T 세포에 의한 다중 이펙터 기능의 활성화를 연구하는데 사용된 게이팅 전략을 도해한다. T 세포 이펙터 기능을 확인하기 위한 다색성 유동 세포측정법에 대한 게이팅 전략이 AML 373과의 공동배양 후의 CD123 CAR (26292-기반) T 세포에 대해 제시된다. (A) 초기 게이트가 CD3⁺ 세포 상에서 설정된다. (B) 형광 빼기 1 대조군을 사용하여 확립된 제2 게이트가 EGFRt⁺ 세포 상에서 설정된다. (C) 제3 게이트가 CD4⁺ 및 CD8⁺ 집단에 대해 설정된다. (D) 최종 게이트가 CD107a⁺ 세포 상에서 설정된다. (E) CD107a⁺ 집단 내의 IFN- γ 및 TNF- α 집단. 이소형 대조군 염색 샘플을 사용하여 4분면이 확립되었다. 각각의 4분면 내의 백분율이 표기된다.

도 16은 CAR-발현 T 세포의 CD4 및 CD8 집단 양쪽 모두에서 회색된 CFSE를 나타낸다. 도 5C에 제시된 세포의 CD4 (a) 및 CD8 (b) 하위집단이 여기에서 제시된다. DAPI⁻CD3⁺EGFRt⁺ 세포 상에서의 초기 게이트 후에, CD4 및 CD8 세포가 원발성 AML 환자 샘플과의 공동배양 후의 CFSE 회색에 대해 분석되었다. 4분면 배치는 미자극 T 세포를 기초로 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 구체적인 예, 서열 및 도면을 사용하여 본 발명의 특정 실시양태가 상세하게 기술된다. 열거된 실시양태들은 본 발명을 이러한 실시양태들에 한정하도록 의도되지 않는데, 본 발명은 청구항에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형, 및 등가물을 다루도록 의도되기 때문이다. 통상의 기술자는 본 발명의 실행에서 사용될 수 있는, 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 다수의 방법 및 물질을 인지할 것이다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 종양 표적화 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 유전자가 제공된다. 특정 실시양태에 따르면, 이러한 유전자는 CD123-특이적 CAR (CD123CAR)을 코딩한다. CD123CAR 유전자는 항-CD123 단일쇄 Fv (scFv) 영역, 및 하기 도메인들 중 하나 이상을 포함한다: 힌지 영역, 공동자극성 신호전달 도메인, 세포내 신호전달 도메인, 또는 이들의 조합물.
- [0016] 일부 실시양태에서, CD123CAR 유전자는 항-CD123 단일쇄 Fv (scFv) 영역, 힌지 영역, 임의적인 하나 이상의 공동자극성 신호전달 도메인, 및 임의적인 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0017] 특정 실시양태에서, CD123CAR 유전자는 항-CD123 단일쇄 Fv (scFv) 영역, 힌지 영역, 하나 이상의 공동자극성 신호전달 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다 (도 9).
- [0018] 항-CD123 scFv 영역은 발현되었을 때 CD123의 에피토프에 결합할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, scFv 항-CD123 scFv 영역은 재조합 면역독소 (RIT) 26292 및 32716의 VH 및 VL 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함한다 [18]. 26292를 표적으로 하는 CD123CAR 유전자 및 32716을 표적으로 하는 CD123CAR 유전자는 본원에서 각각 26292CAR 및 32716CAR로 또한 지칭된다. 특정 실시양태에서, 항-CD123 scFv 영역은 하기로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:
- [0019] 32716CAR에 대한 서열 1 또는 서열 3의 뉴클레오티드 82-814, 또는
- [0020] 26292CAR에 대한 서열 2 또는 서열 4의 뉴클레오티드 82-792.
- [0021] 상기 뉴클레오티드 서열은 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩한다:

- [0022] 32716CAR에서 사용되는 경우의 서열 9 또는 서열 11의 잔기 23-266; 또는
- [0023] 26292CAR에서 사용되는 경우의 서열 10 또는 서열 12의 잔기 23-259.
- [0024] 특정 실시양태에서, 결합을 강화하도록 또는 면역원성을 감소시키도록 항-CD123 scFv 영역이 변형될 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 항-CD123 scFv 영역은 인간화 항-CD123 scFv 영역일 수 있다.
- [0025] 힌지 영역은 CH2-CH3 도메인 사이에 놓이는 면역글로불린 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)의 적어도 일부분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 변형된 힌지이다. 변형된 힌지는 CD123CAR의 표적을 벗어나는 효과를 감소시키는데 기여함으로써 이의 특이성 및 효능을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환 또는 변형이 있을 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "아미노산 변형" 또는 "아미노산 치환" 또는 "치환"은 단백질 또는 펩티드 서열에서의 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "아미노산 치환" 또는 "치환"은 모 펩티드 또는 단백질 내의 특정 위치에서의 아미노산이 또 다른 아미노산으로 교체되는 것을 의미한다. 예를 들어, 치환 S228P는 위치 228의 세린이 프롤린으로 교체된 변이체 단백질 또는 펩티드를 지칭한다.
- [0026] 아미노산 치환은 단백질 또는 펩티드를 코딩하는 핵산 서열 내의 특정 코돈이 상이한 아미노산을 코딩하는 코돈으로 변화되도록 하는 돌연변이에 의해 이루어질 수 있다. 일반적으로 이같은 돌연변이는 가능한 최소의 뉴클레오타이드 변화를 일으킴으로써 이루어진다. 이러한 종류의 치환 돌연변이는 비-보존적 방식으로 (즉, 특정 크기 또는 특성이 있는 아미노산들의 군에 속하는 아미노산에서 또 다른 군에 속하는 아미노산으로 코돈을 변화시킴으로써) 또는 보존적 방식으로 (즉, 특정 크기 또는 특성이 있는 아미노산들의 군에 속하는 아미노산에서 동일한 군에 속하는 아미노산으로 코돈을 변화시킴으로써) 생성된 단백질 내의 아미노산을 변화시키도록 이루어질 수 있다. 일반적으로 이같은 보존적 변화는 생성된 단백질의 구조 및 기능에서의 더 적은 변화에 이른다.
- [0027] 하기는 다양한 아미노산 군의 예이다:
- [0028] · 비극성 R 기가 있는 아미노산: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌
- [0029] · 하전되지 않은 극성 R 기가 있는 아미노산: 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민
- [0030] · 하전된 극성 R 기가 있는 아미노산 (pH 6.0에서 음성으로 하전됨): 아스파르트산, 글루탐산
- [0031] · 염기성 아미노산 (pH 6.0에서 양성으로 하전됨): 리신, 아르기닌, 히스티딘 (pH 6.0에서)
- [0032] 또 다른 군은 페닐 기가 있는 아미노산이다: 페닐알라닌, 트립토판, 티로신.
- [0033] 또 다른 군은 하기 제시된 바와 같은 분자량 (즉, R 기의 크기)에 따른 것일 수 있다:
- | | |
|---------------|-----|
| 글리신 | 75 |
| 알라닌 | 89 |
| 세린 | 105 |
| 프롤린 | 115 |
| 발린 | 117 |
| 트레오닌 | 119 |
| 시스테인 | 121 |
| 류신 | 131 |
| 이소류신 | 131 |
| 아스파라긴 | 132 |
| 아스파르트산 | 133 |
| 글루타민 | 146 |
| 리신 | 146 |
| 글루탐산 | 147 |
| 메티오닌 | 149 |
| 히스티딘 (pH 6.0) | 155 |
| 페닐알라닌 | 165 |
| 아르기닌 | 174 |
| 티로신 | 181 |
| 트립토판 | 204 |
- [0034]
- [0035] 특정 실시양태에서, 변형된 힌지는 변형되지 않은 힌지 내에 존재하는 것과 상이한 아미노산 잔기로 치환된 하

나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터 유래된다. 하나 이상의 치환된 아미노산 잔기는 위치 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339, 또는 이들의 조합의 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0036] 일부 실시양태에서, 변형된 힌지는 하기의 아미노산 잔기 치환 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터 유래된다: C220S, C226S, S228P, C229S, P230S, E233P, V234A, L234V, L234F, L234A, L235A, L235E, G236A, G237A, P238S, S239D, F243L, P247I, S267E, H268Q, S280H, K290S, K290E, K290N, R292P, N297A, N297Q, S298A, S298G, S298D, S298V, T299A, Y300L, V305I, V309L, E318A, K326A, K326W, K326E, L328F, A330L, A330S, A331S, P331S, I332E, E333A, E333S, E333S, K334A, A339D, A339Q, P396L, 또는 이들의 조합 (50).

[0037] 일부 실시양태에서, 변형된 힌지는 하기의 아미노산 서열의 IgG4 힌지로부터 유래된다:

위치 219 ESKYGPPCPSP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY
 위치 279 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK
 위치 339 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
 위치 399 DSDGSEFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (서열 13)

[0038] 특정 실시양태에서, 변형된 힌지는 변형되지 않은 힌지 내에 존재하는 것과 상이한 아미노산 잔기로 치환된 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 IgG4로부터 유래된다. 하나 이상의 치환된 아미노산 잔기는 위치 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339, 또는 이들의 조합의 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 일부 실시양태에서, 변형된 힌지는 하기의 아미노산 잔기 치환 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는 IgG4로부터 유래된다: 220S, 226S, 228P, 229S, 230S, 233P, 234A, 234V, 234F, 234A, 235A, 235E, 236A, 237A, 238S, 239D, 243L, 247I, 267E, 268Q, 280H, 290S, 290E, 290N, 292P, 297A, 297Q, 298A, 298G, 298D, 298V, 299A, 300L, 305I, 309L, 318A, 326A, 326W, 326E, 328F, 330L, 330S, 331S, 331S, 332E, 333A, 333S, 333S, 334A, 339D, 339Q, 396L, 또는 이들의 조합 (이때, 변형되지 않은 힌지 내의 아미노산이 지시된 위치에서 상기에서 확인되는 아미노산으로 치환된다).

[0041] 일부 실시양태에서, 변형된 IgG4 힌지는 위치 228의 세린 (S)을 대신하는 프롤린 (P)의 치환 (S228P), 위치 235의 글루탐산 (E)을 대신하는 류신 (L)의 치환 (L235E), 위치 297의 글루타민 (Q)을 대신하는 아스파라긴 (N)의 치환 (N297Q)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 변형된 IgG4 힌지 영역은 하기로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

[0042] 32716CAR에 대한 서열 1 또는 서열 3의 뉴클레오티드 814-1500; 또는

[0043] 26292CAR에 대한 서열 2 또는 서열 4의 뉴클레오티드 793-1479.

[0044] 상기 뉴클레오티드 서열은 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩한다:

[0045] 32716CAR에서 사용되는 경우의 서열 1 또는 서열 3의 잔기 267-495; 또는

[0046] 26292CAR에서 사용되는 경우의 서열 2 또는 서열 4의 잔기 260-488.

[0047] 한 실시양태에서, 변형된 IgG4 힌지 영역은 S228P 치환 및 L235E 치환을 포함한다 ("S228P+L235E") (도 10 및 11 참조). 또 다른 실시양태에서, 변형된 IgG4 힌지 영역은 S228P 치환, L235E 치환, 및 N297Q 치환을 포함한다 ("S228P+L235E+N297Q") (도 12 및 13 참조).

[0048] 일부 실시양태에서, CD8a의 힌지 영역과 같이, C123CAR 내의 Fc 스페이서(spacer) 영역이 Fc 결합이 없는 스페이서로 치환되도록 힌지가 변형될 수 있다. 대안적으로, 힌지의 Fc 스페이서 영역이 결실될 수 있다. 이같은 치환은 Fc 결합을 감소시키거나 제거할 것이다.

[0049] 본원에서 사용된 바와 같은 "위치"라는 용어는 단백질 서열 내의 장소이다. 위치는 순차적으로 또는 확립된 양식, 예를 들어, 카바트(Kabat) 위치 또는 문헌 [Kabat]에서와 같은 EU 위치 또는 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨질 수 있다. 본원에서 논의된 모든 위치에 대해, 번호매김은 EU 인덱스 또는 EU 번호매김 체계를 따른다 (문헌 [Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public

Health Service, National Institutes of Health, Bethesda] (이에 의해 전문이 참고로 포함됨)). EU 인덱스 또는 문헌 [Kabat]에서와 같은 EU 인덱스 또는 EU 번호매김 체계는 EU 항체의 번호매김을 지칭한다 (문헌 [Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85] (이에 의해 전문이 참고로 포함됨)). 관련 기술 분야에 또한 주지된 카뱃 위치는 소정의 위치에 대해 EU 위치와 다를 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 S228P 및 L235E 치환은 EU 위치를 지칭한다. 그러나, 이러한 치환은 카뱃 위치 241 (S241P) 및 248 (L248E)에 상응할 수도 있다 [21].

[0050] 공동자극성 신호전달 도메인은 4-1BB 공동자극성 도메인, OX-40 공동자극성 도메인, CD27 공동자극성 도메인, 또는 CD28 공동자극성 도메인을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적절한 공동자극성 도메인을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 실시양태에 따르면, CD123CAR은 하나 이상의 공동자극성 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 한 측면에서, CD123CAR에 1개의 공동자극성 신호전달 도메인이 있거나, 또는 CD123CAR이 2개 이상의 상기 기술된 것들과 같은 공동자극성 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 측면에서, 공동자극성 도메인이 1개의 상기 기술된 것들과 같은 공동자극성 신호전달 도메인으로 구성될 수 있거나, 또는 대안적으로 2개 이상의 공동자극성 도메인의 2개 이상의 부분으로 구성될 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, CD123CAR은 공동자극성 신호전달 도메인을 포함하지 않는다.

[0051] 한 실시양태에서, CD123CAR은 CD28 공동자극성 도메인인 공동자극성 신호전달 도메인을 포함한다. CD28 신호전달 도메인은 변형된 CD28 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 이같은 변형된 CD28 막횡단 도메인은 서열 10 또는 서열 12의 아미노산 잔기 530-531 또는 서열 11 또는 서열 13의 잔기 523-524에서 류신-류신(LL)이 글리신-글리신(GG)으로 치환되는 것 (예를 들어, RLLH → RGGH [22])을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 아미노산 치환 또는 변형이 있다. 특정 실시양태에서, 변형된 공동자극성 신호전달 도메인 영역은 하기로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

[0052] 32716CAR에 대한 서열 1 또는 서열 3의 뉴클레오티드 1501-1707; 또는

[0053] 26292CAR에 대한 서열 2 또는 서열 4의 뉴클레오티드 1480-1686.

[0054] 상기 뉴클레오티드 서열은 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩한다:

[0055] 32716CAR에서 사용되는 경우의 서열 1 또는 서열 3의 잔기 498-564; 또는

[0056] 26292CAR에서 사용되는 경우의 서열 2 또는 서열 4의 잔기 489-557.

[0057] 세포내 신호전달 도메인은 임의의 적절한 T 세포 수용체 (TCR) 복합체, 이의 신호전달 도메인 부분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 TCR 제타-쇄 (ζ-쇄) 신호전달 도메인이다. 특정 실시양태에서, ζ-쇄 신호전달 도메인은 하기로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

[0058] 32716CAR에 대한 서열 1 또는 서열 3의 뉴클레오티드 1717-2052; 또는

[0059] 26292CAR에 대한 서열 2 또는 서열 4의 뉴클레오티드 1696-2031.

[0060] 상기 뉴클레오티드 서열은 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩한다:

[0061] 32716CAR에서 사용되는 경우의 서열 1 또는 서열 3의 잔기 568-679;

[0062] 26292CAR에서 사용되는 경우의 서열 2 또는 서열 4의 잔기 561-672.

[0063] 따라서, 상기 기술된 실시양태들에 따르면, CD123CAR 유전자는 서열 1, 서열 2, 서열 3 또는 서열 4로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, CD123CAR 유전자는 서열 9, 서열 10, 서열 11 또는 서열 12로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩할 수 있다. (도 10, 11, 12, 13).

[0064] **CD123CAR 유전자의 발현 및 T 세포의 형질도입**

[0065] 일부 실시양태에서, CD123CAR 유전자는 발현 카세트의 일부이다. 일부 실시양태에서, 발현 카세트는, CD123CAR 유전자에 더하여, 보조 유전자를 또한 포함한다. T 세포에 의해 발현되었을 때, 보조 유전자는 형질도입된 T 세포 선별 마커, 생체내 추적 마커, 또는 형질도입된 T 세포에 대한 자살 유전자로서의 역할을 할 수 있다.

[0066] 일부 실시양태에서, 보조 유전자는 말단절단 EGFR 유전자 (EGFRt)이다. EGFRt는 비-면역원성 선별 도구 (예를 들어, EGFRt-함유 구축물이 렌티바이러스에 의해 형질도입된 T 세포의 강화를 위한, 비오틴화 세톡시맵 (Cetuximab)을 항-비오틴 마이크로비드와 조합하여 사용하는 면역작기 선별), 추적 마커 (예를 들어, T 세포 생착을 추적하기 위한 유동 세포측정법 분석), 및 자살 유전자 (예를 들어, 세톡시맵/어비투스(Erbix)® 매개

항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 경로를 통합)로서 사용될 수 있다. 본원에 기술된 실시양태에 따라 사용될 수 있는 말단절단 EGFR (EGFRt) 유전자의 예가 국제 출원 번호 PCT/US2010/055329 (이에 의해 이의 내용은 본원에 완전하게 기재된 것과 같이 참고로 포함됨)에 기술되어 있다. 다른 실시양태에서, 보조 유전자는 말단절단 CD19 유전자 (CD19t)이다.

[0067] 또 다른 실시양태에서, 보조 유전자는 유도성 자살 유전자이다. 자살 유전자는 이러한 유전자가 발현되는 세포에 원하는 시점에 계획된 세포 사망 또는 항체 매개 소거를 일으킬 재조합 유전자이다. 한 실시양태에서, 보조 유전자로서 사용될 수 있는 유도성 자살 유전자는 유도성 카스파제(caspase) 9 유전자이다 (문헌 [Straathof et al. (2005) An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. Blood. June 1; 105(11): 4247-4254]를 참조하고, 이에 의해 이의 내용은 본원에 완전하게 기재된 것과 같이 참고로 포함된다).

[0068] 일부 실시양태에서, 상기 기술된 CD123CAR 유전자를 포함하는 발현 카세트가 형질도입 또는 형질감염을 통한 표적 세포의 전달을 위한 벡터 내로 삽입될 수 있다. 임의의 적절한 벡터, 예를 들어, 박테리아 벡터, 바이러스 벡터 또는 플라스미드가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 아데노-연관 바이러스 벡터로부터 선택된 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 건강한 T 세포의 집단에 벡터가 형질도입될 수 있다. 성공적으로 형질도입 또는 형질감염된 표적 세포는 발현 카세트의 일부인 하나 이상의 유전자를 발현한다.

[0069] 따라서, 하나 이상의 T 세포 집단에 CD123CAR 유전자가 형질도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD123CAR 유전자는 서열 1, 서열 2, 서열 3 또는 서열 4로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 형질도입된 T 세포는 서열 9, 서열 10, 서열 11 또는 서열 12로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 CD123CAR 유전자를 발현한다. (도 10, 11, 12, 13). 형질도입된 T 세포는 공여자로부터의 것일 수 있거나, 또는 AML 치료를 필요로 하는, AML에 걸린 대상체로부터의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 형질도입된 T 세포는 AML의 치료를 위한 입양 면역요법 치료에서 사용된다.

[0070] 추가로, 하나 이상의 T 세포 집단이 대상체에게 투여하기 위한 전달을 위한 제약상 허용되는 조성물의 일부일 수 있다. CD123CAR-형질도입 T 세포에 더하여, 이러한 제약상 효과적인 조성물은 하나 이상의 제약상 효과적인 담체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "제약상 허용되는 담체"는 신체의 하나의 조직, 장기 또는 일부분으로부터 신체의 또 다른 조직, 장기 또는 일부분으로 관심 치료를 운반하거나 전달하는데 수반되는 제약상 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭한다. 이같은 담체는, 예를 들어, 액체, 고체, 또는 반고체 충전제, 용매, 계면활성제, 희석제, 부형제, 애주번트(adjuvant), 결합제, 완충제, 용해 보조제, 용매, 캡슐화 물질, 격리제, 분산제, 방부제, 윤활제, 붕해제, 증점제, 유화제, 향미생물제, 향산화제, 안정화제, 착색제, 또는 이들의 일부 조합물을 포함할 수 있다.

[0071] 조성물의 다른 성분들과 상용성이어야 하고, 마주칠 수 있는 신체의 임의의 조직, 장기 또는 일부분과의 접촉에 적절하여야 한다는 점에서 (독성, 자극, 알러지 응답, 면역원성, 또는 이의 치료 이익보다 과도하게 우세한 임의의 기타 합병증의 위험을 지니지 않아야 한다는 것을 의미함), 담체의 각각의 성분은 "제약상 허용"된다.

[0072] 제약상 허용되는 담체로서의 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예는 (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스 및 이의 유도체, 예컨대 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말 트래거캔스; (5) 맥아; (6) 천연 중합체 예컨대 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브리노겐, 라미닌, 데코린, 히알루로난, 알기네이트 및 키토산; (7) 탈크; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12) 에스테르, 예컨대 트리메틸렌 카르보네이트, 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산 (또는 알기네이트); (16) 발열원이 없는 물; (17) 등장성 염수; (18) 링거 용액; (19) 알콜, 예컨대 에틸 알콜 및 프로판 알콜; (20) 포스페이트 완충제 용액; (21) 열가소성 물질, 예컨대 폴리락트산, 폴리글리콜산, (22) 폴리에스테르, 예컨대 폴리카프로락톤; (23) 자가-조립 펩티드; 및 (24) 제약 제형에서 사용되는 기타 비-독성 상용성 물질 예컨대 아세톤을 포함한다.

[0073] 제약 조성물은 생리학적 조건을 모사하는데 필요한 바와 같은 제약상 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조정 및 완충 작용제, 독성 조정제 등, 예를 들어, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨 등을 함유할 수 있다.

[0074] 한 실시양태에서, 제약상 허용되는 담체는 수성 담체, 예를 들어 완충 염수 등이다. 특정 실시양태에서, 제약

상 허용되는 담체는 극성 용매, 예를 들어 아세톤 및 알콜이다.

[0075] 이러한 제형들 내의 CD123CAR-형질도입 T 세포의 농도는 광범위하게 변할 수 있고, 선택된 특정 투여 방식 및 생물학적 시스템의 요구에 따라 주로 유체 부피, 점도, 장기 크기, 체중 등을 기초로 선택될 것이다.

[0076] 특정 실시양태에서, CD124CAR 유전자가 형질도입된 T 세포 (즉, CD124CAR-형질도입 T 세포)의 집단 예컨대 AML 세포를 표적화하고 이를 사망시키는 방법에서 사용된 본원에 기술된 것들이 세포 배양물에서 성장될 수 있다. 이러한 실시양태의 특정 측면에서, 이러한 방법은 AML의 병인에서의 CD123의 역할을 연구하기 위해 또는 새로운 CD123CAR 구축물의 표적화 능력을 평가하기 위해 시험관내 또는 연구 환경에서 사용될 수 있다.

[0077] **CD123CAR-형질도입 T 세포로의 AML 치료**

[0078] 일부 실시양태에 따르면, CD123CAR 유전자 및 CD123CAR 유전자가 형질도입된 T 세포의 집단 예컨대 상기 기술된 것들이 대상체에서 AML을 치료하는 방법에서 사용될 수 있다. 이같은 방법은 하나 이상의 CD123CAR 유전자 형질도입된 T 세포의 하나 이상의 집단을 치료 유효량으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 실시양태에서, CD123CAR-형질도입 T 세포의 집단은 하나 이상의 CD123CAR 유전자, 예컨대 상기 기술된 것들을 발현한다. 특정 실시양태에서, T 세포에 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) 유전자 구축물 (도 12) 또는 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) 유전자 구축물 (도 13)이 형질도입되고, T 세포가 이러한 구축물을 발현한다. 이같은 세포가 입양 면역요법 치료를 통해 투여되는 경우, 형질도입된 T 세포가 생체 내에서 CD123 발현 세포 (즉, AML 세포)를 표적화하여 용해시키고, 이에 의해 암 세포를 제거하는 이의 치료 효과를 전달한다. 하기 실시예에 기술된 바와 같이, 힌지 범위 내에 S228P 및 L235E 돌연변이가 있는 CD123CAR 유전자 구축물이 표적을 벗어난 효과로부터의 충분한 보호를 제공하여 시험관 내의 배양된 세포에서 충분한 응답을 생성시킨다. 그러나, 이러한 데이터가 생체 내에서의 이러한 구축물의 효과로 외삽되지 않아야 한다. 연구원들은 시험관내 데이터가 치료 효과를 생체내 데이터로 옮길 수 있는 것과 관련하여 종종 시험관내 데이터를 크게 존중한다. 때때로, 시험관내 데이터가 생체내 데이터와 일치한다. 그러나, 이러한 상관관계는 예측될 수 없는데, 시험관내에서 고도로 효과적인 항-종양 세포 효과를 나타낸 CD123CAR(S228P+L235E) 유전자 구축물 (도 10-11)이 생체 내에서는 동일한 효과가 없었다는 것을 도 8이 나타내기 때문이다. 결과적으로, 추가적인 돌연변이가 힌지 영역에서 만들어져서 (N297Q), CD123CAR(S228P+L235E+N297Q) 구축물이 생성되었다. CD123CAR(S228P+L235E) 유전자 구축물과 대조적으로, 이러한 구축물의 투여는 백혈병 부하의 유의한 감소를 초래하였다.

[0079] CD123CAR 유전자 또는 본원에서 기술된 방법에 따라 사용될 수 있는 유전자가 형질도입된 T 세포의 집단 또는 집단들은 임의의 적절한 투여 경로에 의해 단독으로 또는 제약 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 투여 경로는 두개내, 비경구 또는 경피를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 관련 기술 분야에 공지된 임의의 투여 경로를 지칭할 수 있다. "비경구"는 안와아래, 주입, 동맥내, 낭내, 심장내, 피내, 근육내, 복막내, 폐내, 척수강내, 흉골내, 경막내, 종양내, 자궁내, 정맥내, 지주막하, 피막하, 피하, 경점막, 또는 경기관을 포함하는, 일반적으로 주사와 연관된 투여 경로를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 형질도입된 T 세포는 정맥 내로 또는 경막 내로 투여된다.

[0080] 본원에서 사용된 바와 같은 "유효량"이라는 용어는 원하는 효과를 일으키는 작용제, 화합물, 치료 또는 요법의 양을 지칭한다. 예를 들어, 세포 집단을 유효량의 작용제, 화합물, 치료 또는 요법과 접촉시켜, 이의 시험관내에서의 효과를 연구하거나 (예를 들어, 세포 배양), 또는 생체 외 또는 시험관 내에서의 원하는 치료 효과를 일으킬 수 있다. 유효량의 작용제, 화합물, 치료 또는 요법이 표적 상태를 예방 또는 치료하는 것, 이러한 상태와 연관된 증상을 경감시키는 것, 또는 원하는 생리학적 효과를 일으키는 것과 같은 대상체에서의 치료 효과를 일으키는데 사용될 수 있다. 이같은 경우에, 화합물의 유효량은 "치료 유효량", "치료 유효 농도" 또는 "치료 유효 용량"이다. 정확한 유효량 또는 치료 유효량은 소정의 대상체 또는 세포 집단에서 치료 효능의 관점에서 가장 효과적인 결과를 산출할 조성물의 양이다. 이러한 양은 화합물의 특성 (활성, 약동학, 약역학 및 생체 이용률이 포함됨), 대상체의 생리학적 상태 (연령, 성별, 질환 유형 및 병기, 일반적인 건강 상태, 소정의 투여량에 대한 응답성, 및 투약 유형이 포함됨) 또는 세포의 생리학적 상태, 제형 내의 제약상 허용되는 담체 또는 담체들의 성질, 및 투여 경로를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 요인에 따라 변할 것이다. 또한, 유효량 또는 치료 유효량은 화합물이 단독으로 투여되는지 또는 또 다른 화합물, 약물, 요법 또는 기타 치료 방법 또는 양식과 조합되어 투여되는지 여부에 따라 변할 수 있다. 임상 및 약리학 분야의 기술자는 일상적인 실험을 통해, 즉 화합물 투여에 대한 세포 또는 대상체의 응답을 모니터링하고, 이에 따라 투여량을 조정하는 것에 의해 유효량 또는 치료 유효량을 결정할 수 있을 것이다. 추가적인 지침에 대해, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams

& Wilkins, Philadelphia, PA, 2005]를 참조하고, 이는 이에 의해 본원에 완전하게 기재된 것과 같이 참고로 포함된다. 본원에 기술된 실시양태에 따라 원하는 효과를 일으키도록 유효량 또는 치료 유효량으로 사용될 수 있는 작용제, 화합물, 치료 또는 요법은 CD123CAR 유전자, CD123CAR 유전자를 포함하는 발현 카세트, CD123CAR 유전자를 포함하는 발현 카세트를 표적 세포 예컨대 T 세포로 전달하는 벡터, 및 CD123CAR 유전자가 형질도입된 T 세포의 집단을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0081] 상태를 "치료하는" 또는 상태의 "치료"라는 용어는 상태를 예방하는 것, 상태의 발병 또는 발달 속도를 느리게 하는 것, 상태가 발달될 위험을 감소시키는 것, 상태와 연관된 증상의 발달을 예방하거나 지연시키는 것, 상태와 연관된 증상을 감소시키거나 종료시키는 것, 상태의 완전한 또는 부분적인 퇴행을 생성시키는 것, 또는 이들의 일부 조합을 지칭할 수 있다. 치료는 상태의 예방적 또는 방지성 치료를 의미할 수도 있다.

[0082] 본원에서 사용된 바와 같은 "대상체"라는 용어는 모든 포유동물 예컨대 영장류 (특히, 고등 영장류), 양, 개, 설치류 (예를 들어, 마우스 또는 래트), 기니 피그, 염소, 돼지, 고양이, 토끼 및 소를 포함하는, 인간 또는 동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0083] 특정 실시양태에서, AML을 치료하는 방법은 치료 유효량의 제1 CD123CAR 유전자가 형질도입된 제1 T 세포 집단을 치료 유효량의 제2 CD123CAR 유전자가 형질도입된 제2 T 세포 집단과 조합하여 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0084] 다른 실시양태에서, CD123CAR-형질도입 T 세포는 하나 이상의 추가적인 항암 요법과 조합되어 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "조합" 또는 "~와 조합"은 동일한 대상체에서 동일한 암을 치료하는 과정 중에 2가지 이상의 작용제, 약물, 치료제, 시술, 치료 체계, 치료 양식 또는 이들의 조합을 임의의 순서로 사용하는 것을 의미한다. 이는 동시 투여, 뿐만 아니라 수일까지 벌어진 시기적으로 간격이 있는 순서로 투여되는 것을 포함한다. 이같은 조합 치료는 작용제, 약물, 치료제, 시술, 치료 체계 및 치료 양식 중 임의의 하나 이상의 1회를 초과하는 투여를 포함할 수도 있다. 또한, 2가지 이상의 작용제, 약물, 치료제, 시술, 치료 체계, 치료 양식 또는 이들의 조합의 투여가 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로에 의한 것일 수 있다.

[0085] 본원에 기술된 방법에 따라 사용될 수 있는 추가적인 항암 요법은 하나 이상의 항암 시술, 치료 양식, 항암 치료제 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, CD123CAR-형질도입 T 세포가 줄기 세포 이식 (예를 들어, 동종이형 줄기 세포, 자가 줄기 세포를 사용하는 골수 이식 또는 말초 혈액 줄기 세포 이식; 또는 비-골수계거식 이식), 방사선 조사 요법, 또는 수술에 의한 절제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 항암 시술 또는 치료 양식과 조합되어 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, CD123CAR-형질도입 T 세포가 화학요법제 및 기타 항암 약물, 면역요법제, 표적화된 치료제 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는, AML을 치료하는데 사용될 수 있는 하나 이상의 항암 치료제 또는 약물과 조합되어 투여될 수 있다.

[0086] 본원에 기술된 실시양태에 따라 CD123CAR-형질도입 T 세포와 조합되어 투여될 수 있는 화학요법제 및 기타 항암 약물은 올-트랜스(all-trans)-레티노산 (ATRA), 삼산화비소, 안트라사이클린 항생제 및 이의 제약상 허용되는 염 (예를 들어, 독소루비신 히드로클로라이드, 다우노루비신 히드로클로라이드, 이다루비신, 미톡산트론), 알킬 화제 (예를 들어, 시클로포스파미드, 라로무스틴), 항대사물질 유사체 (시타라빈, 6-티오구아닌, 6-메르캅토피린, 메토트렉세이트), 탈메틸화제 (예를 들어, 데시타빈, 5-아자사이티딘), 핵산 합성 억제제 (예를 들어, 히드록시우레아), 토포이소머라제(topoisomerase) 억제제 (예를 들어, 에토포시드), 빈카 알칼로이드 (예를 들어, 빈크리스틴 술페이트), 또는 이들의 조합물 (예를 들어, 시타라빈 (Ara-C), 다우노루비신 히드로클로라이드 및 에토포시드의 조합물을 포함하는 조합 요법인 "ADE")을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0087] 본원에 기술된 실시양태에 따라 CD123CAR-형질도입 T 세포와 조합되어 투여될 수 있는 면역요법제는 면역 조정 시약 (예를 들어, STAT3 억제제, 레날리도미드(Lenalidomide)) 및 치료 모노클로날 항체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 치료 모노클로날 항체는 (i) CD33 (예를 들어, 겔투주맵(gemtuzumab), 린투주맵(lintuzumab)), MUC1 (예를 들어, 칸투주맵 라브탄신(cantuzumab ravtansine), 클리바투주맵 테트락세탄(clivatuzumab tetraxetan), 펌토모맵(pemtumomab))을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 AML 항원; (ii) B 세포 항원 (예를 들어, 리툽시맵(rituximab), 오파투주맵(ofatumumab)); 또는 혈관구조 조절인자 예컨대 VEGF 또는 VEGFR (예를 들어, 알라시주맵 페골(alacizumab pegol), 베바시주맵(bevacizumab), 이크로쿠맵(icrucumab), 라무시루맵(ramucirumab), 라니비주맵(ranibizumab))을 표적화하도록 디자인될 수 있다.

[0088] 본원에 기술된 실시양태에 따라 CD123CAR-형질도입 T 세포와 조합되어 투여될 수 있는 표적화된 치료제는 티로신 키나제(kinase) 억제제 (이마티닙(imatinib), 다사티닙(dasatinib), 닐로티닙(nilotinib), 수니티닙

(sunitinib)), 파르네실 트랜스퍼라제(transferase) 억제제 (예를 들어, 티피파르닙(tipifarnib)), FLT 억제제, 및 c-Kit (또는 CD117) 억제제 (이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0089] 실시예 1: CD123CAR-형질도입 T 세포가 시험관 내에서 AML에 대한 강력한 세포용해성 활성 및 다중 이펙터 기능을 나타낸다

[0090] 물질 및 방법

[0091] 세포주. 달리 언급되지 않는 한, 모든 세포주가 2 mM L-글루타민, 25 mM HEPES, 및 10% 열-불활성화 FCS (하이클론(Hyclone))이 보충된 RPMI 1640 (어바인 사이언티픽(Irvine Scientific)) (이하 완전 배지 (CM)로 지칭됨)에서 유지되었다. 이전에 기술된 바와 같이 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)가 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스로 형질전환되어 림프모구양 세포주 (LCL)가 생성되었다 [19]. LCL-OKT3 세포는 막에 결합된 OKT3를 발현하고, 0.4 mg/ml 히그로마이신이 보충된 CM에서 성장되었다 [20]. K562 세포는 ATCC로부터 획득되었고, 권장된 바와 같이 배양되었다. KG1a 세포 (라비 바티아(Ravi Bhatia) 박사가 친절하게 제공함)는 IMDM (어바인 사이언티픽) + 25 mM HEPES, 4 mM L-글루타민 (어바인 사이언티픽), 및 20% FCS에서 유지되었다. 293T 세포 (시티 오브 호프(City of Hope)의 생물학 및 유전학 센터(Center for Biomedicine and Genetics)로부터의 친절한 선물)는 DMEM + 10% 열-불활성화 FCS에서 유지되었다.

[0092] 원발성 AML 샘플. 원발성 AML 샘플을 환자의 말초 혈액으로부터 획득하였다 (본원에서 AML 샘플 ID 번호 179, 373, 493, 519, 545, 559, 605, 722 및 813으로 지칭됨). 샘플의 특성이 하기 표 1에서 요약된다.

[0093] [표 1]

[0094] 원발성 AML 샘플의 특성

AML 샘플 ID	연령/성별	세포유전학	Flt3 돌연변이 상태	임상 상태	샘플 유형	CD123 (RFI) ^a	CD123 % 양성
179	74/M	중등도-위험 t(1;7), t(14;15)	ND	재발	PB	428.32	99.22
373	47/M	불량-위험 3개의 세포주에서의 복합 이상	ND	재발	PB	1052.83	99.66
493	46/F	중등도-위험 8번 삼염색체성	ND	재발	PB	23.98	76.80
519	44/F	del(17p), dic(11;7), TP53/17p13.1의 클론성 상실	ND	재발	PB	63.18	97.40
545	58/M	중등도-위험 t(3;6), del(7)	ND	유도 실패	PB	52.73	99.32
559	59/M	복합 이상, 대규모 파이버수체증	음성	재발	성분채집술	9.30	45.0
605	55/M	정상	음성	지속적	PB	58.48	99.91
722	22/M	중등도 위험 t(14;21), del(9q)	음성	미치료	PB	33.53	92.74
813	48/F	복합 이상, 8번 삼염색체성, 21번 삼염색체성, 부가 (17)	ND	미치료	PB	37.19	90.93

[0095]

[0096] ^a 상대적 형광 지수 (RFI)는 CD34⁺ 집단에서의 이소형 매칭 대조군 염색에 대한 9F5-염색 신호의 중앙값의 비이다.

- [0097] ^b CD34⁺ 집단에서 게이팅됨
- [0098] ND - 결정되지 않음
- [0099] PB - 말초 혈액
- [0100] **유동 세포측정법.** BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences)로부터 형광색소가 접합된 이소형 대조군, 항-CD4, 항-CD8, 항-T-세포 수용체- $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$), 항-CD123 (9F5), 항-CD34 (8G12), 및 항-CD38 (HIT2)을 구입하였다. 잭슨 면역노리서치 래버러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories)로부터 비오틴화 항-Fc를 구입하였다. 비오틴화 세특시맵 (어비투스)은 COH 파마시(COH pharmacy)로부터 구입하였고, 이전에 기술되었다 [20]. 이바 이오사이언스(eBioscience)로부터 비오틴화 항-CD2, 항-CD3, 항-CD7, 항-CD10, 항-CD11b, 항-CD19, 항-CD33, 및 항-CD235A를 구입하였다. FACSCalibur, LSRII (BD 바이오사이언시즈), 또는 MACSQuant 분석기 (밀테니 바 이오텍(Miltenyi Biotec)) 상에서 데이터를 획득하였고, FCS 익스프레스(FCS Express), 버전 3 (디 노보 소프트 웨어(De Novo Software))을 사용하여 분석하였다.
- [0101] **CD123으로의 293T 세포의 형질감염.** 중합효소 연쇄 반응 및 프라이머 (CD123-F: 5'-ATAAGGCCTGCCGCCACCATGGTCCTCCTTTGGCTCAG-3' 및 CD123-R 5'-ATAGCTAGCTCAAGTTTCTGCACGACCTGTACTTC-3')를 사용하여 CD123 cDNA를 CD123-pMD18-T (시노 바이올로지컬 인크(Sino Biological Inc.))로부터 증폭시켰다. PCR 생성물을 StuI 및 NheI 제한 부위를 사용하여 pMGPac 내로 클로닝하였다. 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 제조사의 설명에 따라 사용하여 293T 세포를 형질감염시켰다. 형 질감염 24시간 후에, CD123의 발현을 유동 세포측정법으로 확인하였다.
- [0102] **렌티바이러스 벡터의 생성.** 이러한 연구에서 사용된 CAR 구축물을 생성시키기 위해, VH 및 VL쇄, 변형된 IgG4 힌지 및 변형된 CD28 막횡단 도메인 (RLH → RGGH [22])을 코딩하는 코돈-최적화 DNA 서열을 합성하고 (진아트 (GENEART)), CD19RCAR를 교체하도록 NheI 및 RsrII 부위를 사용하여 CD19RCAR-T2AEGFRt_epHIV7 [20] 내로 클로 닝하였다. CalPhos™ 포유동물 세포 형질감염 키트 (클론테크(Clontech))를 사용하여 렌티바이러스 벡터 및 패 키징(packaging) 벡터 pCMV-Rev2, pCHGP-2, 및 pCMV-G로 293T 세포를 형질감염시킴으로써 렌티바이러스가 생산 되었다. 이러한 26292 및 32716 CAR 구축물은 본원에서 26292CAR(S228P+L235E) 또는 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) (도 11 및 13) 및 32716CAR(S228P+L235E) 또는 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) (도 10 및 12)로 또한 지칭된다. 형질감염 24, 48, 및 72시간 후에 렌티바이러스 상청액을 수집하고, 초원심분 리로 농축하였다.
- [0103] **건강한 공여자 및 AML 환자 PBMC의 형질도입.** 비식별화 PBMC를 동의한 건강한 공여자 및 환자로부터 임상시험 심사 위원회가 승인한 프로토콜 하에 수득하였다. 건강한 공여자의 경우, 1주일에 3회 25 U/ml IL-2 및 0.5 ng/ml IL-15가 보충된 CM (본원에서 T 세포 배지로 지칭됨) 내의 OKT3 (30 ng/ml)을 사용하여 T 세포를 활성화 시켰다. 활성화 72시간 후, 30분 동안 800g 및 32℃에서 원심분리함으로써, T 세포에 MOI=3으로 렌티바이러스 를 스피노쿨레이팅(spinoctating)하였다. 렌티바이러스 형질도입 12-14일 후에 CAR 발현을 유동 세포측정법으 로 분석하였다. 기존에 기술된 바와 같이 EGFRt 발현 T 세포를 강화하였다 [20]. 급속 확장 방법으로 T 세포 배지에서 T 세포를 확장시켰다 [23].
- [0104] AML 환자로부터의 T 세포의 유전 변형을 위해, 해동된 말초 혈액 또는 성분채집술 생성물을 T 세포 배지에서 3:1 비드:CD3+ 세포 비로 다이나비즈® 휴먼 T-익스팬더(Dynabeads® Human T-Expander) CD3/CD28 (라이프 테 크놀로지스)를 사용하여 자극하였다. 비드 자극 72시간 후, 세포에 MOI = 3으로 렌티바이러스를 스피노쿨레이 텅하였다. 최초의 자극 9-14일 후에 다이나마그(DynaMag)™-50 자석 (라이프 테크놀로지스)을 사용하여 비드를 제거하고, T 세포를 T 세포 배지에서 유지시켰다. 사망 검정법에서 사용하기 전에 CAR-발현 AML 환자-유래 T 세포주를 면역자기적으로 선별하지 않았다.
- [0105] **CFSE 증식 검정법.** T 세포를 0.5 μ M 카르복시플루오로세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE; 몰레큘러 프로브즈 (Molecular Probes))로 제조사의 설명에 따라 표지하였다. 표지된 T 세포를 10 U/ml IL-2가 보충된 CM에서 2:1의 E:T 비로 자극물 세포와 함께 또는 자극물 세포 없이 공동배양하였다. 72-96 시간 후, 세포를 수확하고, 비오틴화 세특시맵, 뿐만 아니라 요오드화프로피듐 또는 DAPI로 염색하여, 죽은 세포를 분석에서 제거시켰다. 유동 세포측정법으로 세포를 측정하여, CFSE 회석에 의해 살아 있는 EGFRt-양성 세포의 증식을 평가하였다.
- [0106] **크롬-방출 검정법 및 시토카인 분비 검정법.** 표적 세포를 1시간 동안 51Cr (퍼킨엘머(PerkinElmer))로 표지하 고, 5회 세정하고, 다양한 이펙터 대 표적 (E:T) 비의 이펙터 세포와 함께 5×10^3 개의 세포/웰로 삼중으로 분취

하였다. 4시간 공동배양 후, 상청액을 수확하고, 감마 카운터 또는 탑카운트(Topcount) (퍼킨엘머)를 사용하여 방사성을 측정하였다. 기존에 기술된 바와 같이 특이적 용해 백분율을 계산하였다 [24]. 10:1 E:T 비에서의 24시간 공동 배양 후의 시토카인 생산을 기존에 기술된 바와 같이 측정하였다 [25].

[0107] CD107a 탈과립화 및 세포내 시토카인 생산. 골지스톱(GolgiStop)TM (BD 바이오사이언시즈) 및 항-CD107a 클론 H4A3 또는 이소형 매칭 대조군 항체의 존재 하에 37°C에서 6시간 동안 2:1의 E:T로 T 세포를 표적 세포와 함께 공동배양하였다. 6시간 인큐베이션의 완료 후, 세포를 수확하고, 세정하고, 항-CD3, CD4, CD8, 및 비오틴화 세 특시약으로 염색한 후, PE-접합 스트렙타비딘을 사용하여 2차 염색하였다. 그 후, 세포를 제조사의 설명서에 따라 고정하여 투과성 있게 만들고 (사이토폭스/사이토펜(Cytofix/Cytoperm)TM, BD 바이오사이언시즈), 항-IFN- γ (BD 바이오사이언시즈 클론 B27) 및 항-TNF- α (BD 바이오사이언시즈 클론 Mab11)로 염색하였다. MACSQuant 분석기 (밀테니 바이오텍)를 사용하여 데이터를 획득하였고, FCS 익스프레스 버전 3 (디 노보 소프트웨어)을 사용하여 분석하였다.

[0108] 콜로니 형성 세포 검정법. 제대혈 (CB) 단핵 세포 또는 원발성 AML 샘플로부터의 CD34+ 세포를 면역자기 칼럼 분리 (밀테니 바이오텍)를 사용하여 선별하였다. 10^3 개의 CD34+ CB 세포를 25×10^3 개의 이펙터 세포와 함께 4시간 동안 공동배양한 후, 이중 웰 내의 반고체 메틸셀룰로스 선조 배양물 내에 플레이팅하였다 [26]. 14 내지 18 일 후, 콜로니 형성 단위 과립구-대식세포 (CFU-GM) 및 과열 형성 단위 적혈구 (BFUE) 콜로니를 계수하였다. AML 샘플의 경우, 5×10^3 개의 CD34+ AML 세포를 125×10^3 개의 이펙터 세포와 함께 4시간 동안 공동배양한 후, 이중 웰 내의 반고체 메틸셀룰로스 선조 배양물 내에 플레이팅하였다.

[0109] 통계 분석. 그래프패드 프리즘(Graphpad Prism) v5.04을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 쌍을 이루지 않은 스튜던트 t-테스트를 사용하여 처리군 간의 유의한 차이를 확인하였다.

[0110] 결과

[0111] CD123 CAR 발현 T 세포의 생성

[0112] T 세포 특이성을 재지정하기 위해, CD123 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터가 개발되었다. 각각의 CAR은 2개의 CD123-특이적 scFv인 26292 및 32716 [18] 중 하나를 코딩하는 코돈-최적화 서열을 각각 포함한다. scFv가 인-프레임으로 인간 IgG4 Fc 영역, CD28 공동자극성 도메인, 및 CD3 ζ 신호전달 도메인에 융합된다. CAR 서열의 바로 하류에 T2A 리보솜 스킵 서열 및 말단절단 인간 EGFR (EGFRt) 형질도입 마커가 있다 (도 1a). 건강한 공여자로부터의 OKT3-자극 PBMC가 렌티-형질도입되었고, CAR 발현 T 세포가 비오틴화-어비투스 항체를 사용하는 면역자기 선별에 이어지는 항-비오틴 자기 비드로의 2차 염색에 의해 단리되었다. 1회의 REM 사이클 후, 단리된 세포를 CAR 표면 발현 및 T-세포 표현형에 대해 유동 세포측정법으로 분석하였다. 생성된 3명의 건강한 공여자로부터의 T 세포주에서 Fc 및 EGFRt 발현 양쪽 모두가 90%를 초과하였고, 최종 T 세포 생성물은 CD4 및 CD8 양성 T 세포의 혼합물로 이루어졌다 (도 1b, 1c).

[0113] CD123 CAR T 세포가 CD123 발현 종양 세포주를 특이적으로 표적화한다

[0114] CD123 CAR T 세포의 특이성을 확인하기 위해, CD123을 발현하도록 일시적으로 형질감염된 293T 세포를 용해하는 유전자 변형 T 세포의 능력을 시험하였다 (293T-CD123; 도 2a). 생성된 CD123 CAR T 세포 양쪽 모두가 293T-CD123을 효율적으로 용해시켰지만, CD19를 발현하도록 일시적으로 형질감염된 293T 세포는 용해시키지 않았고, 이는 CD123의 특이적 인식을 실연한다 (도 2b). 다음으로, CD123을 내인성으로 발현하는 종양 세포주에 대해 CD123-특이적 T 세포의 시험관내 세포용해능을 연구하였다. 세포주 LCL 및 KG1a에서의 CD123의 발현을 유동 세포측정법으로 확인하였다 (도 2c). CD123-특이적 T 세포주 양쪽 모두가 LCL 및 KG1a 표적 세포주를 효율적으로 용해하였지만, CD123- K562 세포주는 용해하지 않았다 (도 2c). 쌍으로 매칭된 CD19-특이적 T 세포들은 CD19+ LCL 표적을 효과적으로 용해하였지만, CD19- KG1a 또는 K562 표적은 용해하지 않았다 (도 2d). 모조-형질도입 모 세포는 양성 대조군 LCL-OKT3 세포주만 용해하였다 (도 2d).

[0115] CD123-양성 표적 세포와 함께 공동배양되었을 때 CD123 CAR T 세포가 다중 이펙터 기능을 활성화시킨다

[0116] CD123-특이적 T 세포의 이펙터 기능을 시험하기 위해, 다양한 종양 세포주와의 공동배양 후에 IFN- γ 및 TNF- α 분비를 측정하였다. CD123 CAR을 발현하는 T 세포 생성물은 CD123+ 표적 세포와 함께 공동배양되었을 때 IFN- γ 및 TNF- α 양쪽 모두를 생산하였지만, 쌍으로 매칭된 CD19-특이적 T 세포는 CD19+ LCL 또는 LCL-OKT3 세포주와 함께 공동배양되었을 때에만 이러한 시토카인을 분비하였다 (도 3a). 추가적으로, CD123-특이적 T 세포주 양쪽 모두 CD123+ 세포주인 LCL, LCL-OKT3, 또는 KG1a 중 하나와 공동배양되었을 때 증식하였지만, CD123-

K562 세포주와는 그렇지 않았다 (도 3b). 대조적으로, 쌍으로 매칭된 CD19 CAR-발현 T 세포는 LCL 또는 LCL-OKT3와 공동배양되었을 때만 증식하였다 (도 3b).

[0117] 원발성 AML 샘플과 함께 공동배양되었을 때 CD123 CAR T 세포가 다중 이펙터 기능을 활성화시킨다

[0118] 원발성 AML 샘플 상에서의 CD123의 과발현이 충분히 문서화되어 있고 [27-29], 이러한 연구에서 확인되었다 (도 14). 다면성 T 세포 응답이 감염 및 백신에 대한 강건한 면역 응답에 중요하고, CAR-제지정 T 세포의 항-종양 활성화에서 역할을 할수도 있다 [30]. 원발성 AML 샘플에 대한 다중 이펙터 경로를 활성화시키는 CD123 CAR T 세포의 능력을 연구하기 위해, 조작된 T 세포를 3개의 상이한 AML 환자 샘플 (179, 373, 및 605)과 함께 6시간 동안 공동배양하고, CD107a의 상향조절 및 IFN- γ 및 TNF- α 생산에 대해 다색성 유동 세포측정법 (도 15에 제시된 게이팅 전략)을 사용하여 평가하였다. CD107a의 세포 표면 동원이 CD123-특이적 T 세포의 CD4 및 CD8 구획 양쪽 모두에서 관찰된 한편, 쌍으로 매칭된 CD19R T 세포는 원발성 AML 샘플에 대한 감지할 수 있는 탈과립화가 없었다 (도 4a, 막대 그래프). 또한, CD107a+ CD123 CAR T 세포의 하위집단도 IFN- γ , TNF- α , 또는 양쪽 시토카인을 생산하였다 (도 4a, 파이 차트). 이러한 다기능 응답이 CD4 및 CD8 집단 양쪽 모두에 대해 관찰되었다 (도 4a 및 4b). 추가적으로, 원발성 AML 샘플과의 공동배양에 응답하여 증식하는 CAR 조작 T 세포의 능력을 시험하였다. CD123-특이적 T 세포주 양쪽 모두가 AML 813 또는 프리 B-ALL 802 샘플과의 공동배양 후 증식할 수 있었다 (도 4c). CD4 및 CD8 집단 양쪽 모두에서 증식이 관찰되었다 (도 16). 쌍으로 매칭된 CD19-특이적 T 세포는 CD19+ 프리 B-ALL 802와 함께 공동배양되었을 때 증식하였지만, AML 813과 공동배양되었을 때는 그렇지 않았다.

[0119] CD123 CAR을 발현하는 T 세포가 시험관 내에서 원발성 AML 세포를 표적화한다

[0120] CD123-특이적 T 세포가 시험관 내에서 제대혈 세포에 의한 콜로니 형성을 제거하지 않는다

[0121] CD123이 통상적인 골수 선조 (CMP)에서 발현된다는 것을 고려하여 [31], CD34-강화 정상 제대혈 (CB) 샘플의 콜로니 형성 능력에 대한 조작된 T 세포의 효과를 연구하였다. 쌍으로 매칭된 CD19R CAR T 세포와 비교하여 25:1의 E:T로 CD123-CAR 발현 T 세포와 4시간 동안 공동배양한 후에 CB 샘플에 의한 골수 및 적혈구 콜로니 형성이 유의하게 감소되지 않았다 (도 6 a&b). 다음으로, 1차 클론원성 AML 세포의 성장을 억제하는 CD123-특이적 T 세포의 능력을 시험관 내에서 시험하였다. CD123 CAR T 세포주 양쪽 모두가 쌍으로 매칭된 CD19R T 세포와 비교하여 백혈병 콜로니의 형성을 유의하게 감소시켰다 (도 6c). 명백하게, CD123-특이적 T 세포가 백혈병 콜로니 형성에 정상적인 골수 콜로니 형성과 비교하여 더 큰 영향을 미쳤다 (도 6d, 각각 69% 감소 대 31% 감소).

[0122] AML 환자로부터의 T 세포가 CD123 CAR를 발현하도록 유전자 변형될 수 있고, 자가 종양 세포를 특이적으로 표적화한다

[0123] AML 환자-유래 T 세포는 액틴을 불량하게 재분극시키고 자가 모세포와 결손성 면역 시냅스를 형성하는 것으로 공지되어 있다 [32]. 추가적으로, 본 발명가들이 아는 한, AML 환자로부터 유래된 CAR 발현 T 세포는 아직 기술되지 않았다. 따라서, AML 환자로부터의 T 세포가 CD123 CAR을 발현하도록 유전자 변형될 수 있는지 여부가 결정되었다. 냉동보존된 PBMC (AML 605 및 AML 722) 또는 성분채집술 생성물 (AML 559)을 CD3/CD28 비드로 자극하고, CD123 CAR 중 하나 또는 CD19R 대조군 CAR을 발현하도록 렌티바이러스를 형질도입하였다. 3개 모두의 환자 샘플- 유래 T 세포가 26292 CAR (40-65% 형질도입 효율), 32716 CAR (46-70% 형질도입 효율) 및 CD19R CAR (을 발현하였다. 원발성 AML 세포를 사멸시키는 CD123-특이적 T 세포의 능력을 평가하기 위해, 쌍으로 매칭된 CD19R CAR 또는 CD123 CAR 발현 T 세포를 4시간 ⁵¹Cr 방출 검정법에서 1차 CD34-강화 AML 환자 샘플과 함께 공동배양하였다. 쌍으로 매칭된 CD19R T 세포와 대조적으로, CD123 CAR T 세포 세포주 양쪽 모두 테스트된 모든 원발성 AML 환자 샘플을 강건하게 용해하였다 (도 5a). 추가적으로, CD123 CAR 발현 T 세포의 세포용해능 사이에 통계적 차이가 언급되지 않은 반면, CD123-특이적 T 세포주 양쪽 모두가 쌍으로 매칭된 CD19R-CAR T 세포와 비교했을 때 유의하게 강화된 세포독성을 나타냈다 (도 5b).

[0124] 23-37% 형질도입 효율). AML 환자-유래 CAR T 세포의 표현형의 대표적인 예가 도 7a에서 제시된다. 다음으로, 자가 CD34-강화 표적 세포에 대한 AML 환자-유래 CAR T 세포의 세포용해 잠재력을 4시간 ⁵¹Cr 방출 검정법에서 시험하였다. 모든 자가 CD34-강화 세포가 비록 다양한 백분율 및 강도이긴 하지만 CD123을 발현하였다 (도 7b). AML 605 및 722로부터 유래된 T 세포는 자가 모세포를 효율적으로 용해한 한편, AML 559로부터 유래된 T 세포는 낮은 수준의 자가 모세포 용해를 나타냈고, 이는 AML 559 모세포 상에서의 CD123의 낮은 이종성 발현으로 인해서일 것이다 (도 7c).

[0125] 논의

[0126] 본원에 기술된 실시양태들은 제조합 면역독소 (RIT) 26292 및 32716으로부터의 scFv를 사용하는 2개의 신규 CD123 표적화 CAR을 포함하고, 이들은 별개의 에피토프에 결합하고, CD123에 대한 결합 친화력이 유사하다 [18]. T 세포 집단에 의해 발현되었을 때, 이러한 CD123 표적화 CAR들은 CD123 발현 세포에 대해 T 세포 특이성을 재지정한다. 표준 4시간 크로뮴-51 (51Cr) 방출 검정법을 사용하여, CD123 CAR을 발현하도록 조작된 건강한 공여자의 T 세포는 CD123+ 세포주 및 원발성 AML 환자 샘플을 효율적으로 용해하였다. 추가적으로, CD123 CAR T 세포 양쪽 모두가 CD123+ 세포주 및 원발성 AML 환자 샘플과의 공동배양 후 다중 이펙터 기능을 활성화시켰다. 또한, CD123-표적화 T 세포는 CD19 CAR T 세포와 비교했을 때 체대혈 (CB)로부터 콜로니-형성 단위 과립구-대식세포 (CFU-GM) 또는 과열-형성 단위 적혈구 (BFU-E) 콜로니의 수를 유의하게 감소시키지 않았다. 명백하게, CD19-특이적 T 세포는 원발성 AML 샘플의 백혈병 콜로니 형성에 영향이 거의 없었지만, CD123-표적화 T 세포는 시험관 내에서 백혈병 콜로니 형성을 유의하게 감소시켰다. AML 환자-유래 T 세포가 CD123 CAR을 발현할 수 있고 시험관 내에서 자가 모세포를 용해시킬 수 있는 것으로 또한 나타났다.

[0127] 2개의 CD123-특이적 CAR 중 하나를 발현하는 T 세포가 특이적으로 CD123 발현 세포주 및 원발성 AML 환자 샘플을 용해시킬 수 있고, 시험관 내에서 항원 특이적 방식으로 다중 이펙터 기능을 활성화시킬 수 있으며, 이는 양쪽 모두의 에피토프가 잠재적인 치료 표적이라는 것을 실현한다. CD123+ 세포와 공동배양되었을 때의 표적 세포 사망, 시토킨 분비 또는 증식과 관련하여 CD123 CAR-조작 T 세포주들 사이에 주요한 차이가 관찰되지 않았다. 이에 대한 한가지 가능한 설명은 CD123-CAR에서 사용된 CD123-특이적 scFv의 결합 친화력이 나노몰 범위이고, 3배 미만만큼 상이하며, 따라서 표적 항원 결합에서의 유의한 장점이 어느 한쪽 scFv에 의해 부여되지 않는다는 것이다 [18].

[0128] AML 세포 상에서의 다중 세포 표면 항원의 발현이 충분히 문서화되어 있다 [4, 27, 34]. CAR-발현 T 세포를 통해 이러한 항원들 중 일부를 표적화하는 것이 실현가능하지 않을 수 있다. 예를 들어, AML-연관 항원 TIM-3이 고갈된 T 세포의 부분집합에서 발현되고 [35, 36], CAR-조작 T 세포를 사용하여 TIM-3을 표적화하는 것이 유전자 변형 세포의 자가용해를 초래할 수 있다. 추가적으로, CD47이 편재성으로 발현되고 [37], 따라서 CAR-조작 T 세포에 의해 표적화될 수 있지 않을 것이다. CD33 분화 항원이 골수 세포에서 우세하게 발현되고, CD33을 표적화하는 면역요법 예컨대 겐투즈마프 오조가마이신 (Gemtuzumab ozogamicin), CD33/CD3 이중특이적 T 세포 인계 이징 (engaging) 항체, 및 CD33 CAR이 임상 및 임상-전 환경에서 현재 사용된다 [17, 38, 39]. TIM-3과 같이, CD33은 T 세포의 부분집합 상에서 발현되어, 이를 CAR 기반 요법에 대한 이상적이지 않은 표적으로 만든다 [40]. 추가적으로, 아마도 장기 자가-재생 정상 조혈 줄기 세포 (HSC) 상에서의 CD33 발현의 결과로서 [41], CD33-표적화 요법의 항-백혈병 활성화에 느린 조혈 및 혈구감소증이 종종 동반되었다. 추가로, 간독성이 CD33-표적화 치료의 통상적인 부작용이고, 이는 가능하게는 CD33+ 쿠퍼 (Kupffer) 세포의 의도되지 않은 표적화에 기인한다 [42].

[0129] CD123의 발현은 T 세포 상에서 부재하고, 주로 골수 계통의 세포에 제한되며 [43], HSC 상에서 대부분 부재한다 [27]. 종합하여, 이러한 관찰들은 CD123을 CAR 매개 T 세포 요법의 매력적인 표적으로 만들었다. CD123에 대해 특이적인 치료제가 I상 시험에서 유리한 안전성 프로파일을 나타냈다 (ClinicalTrials.gov ID: NCT00401739 및 NCT00397579). 불행하게도, 이러한 요법들은 대부분의 치료된 환자에서 응답을 유도하지 못했다. 본원에서 생성된 CD123-CAR 발현 T 세포는 시험관 내에서 CD123+ 세포주 및 원발성 AML 샘플에 대해 강력한 세포용해능을 나타냈다. 하기 기술된 연구들은 불량-위험 AML의 환자로부터의 1차 샘플이 CD123 CAR T 세포 매개 세포독성에 대해 감수성이었음을 나타낸다. 총괄적으로, 단기 세포독성 검정법에 사용된 1차 샘플들의 소형 코호트에서, 고-위험 특색 및/또는 화학요법 저항성을 나타낸 AML 환자 샘플들이 CD123+ 세포주를 사용한 실험에서 관찰된 것과 유사하게 CD123 CAR 사망에 대해 민감성이었다. 이러한 결과가 더 큰 샘플 코호트에 대해 유효할 것임을 확증하기 위해 추가 분석이 행해질 필요가 있을 것이다.

[0130] 다기능성 T 세포 응답이 바이러스 감염의 제어와 상호관련되고, 항-종양 CAR T 세포 응답에서 중요할 수 있다 [44]. 실제로, CD19 CAR T 세포 요법에 대해 응답성인 환자는 생체 외에서 CD19+ 표적에 응답하여 요법 후의 검출가능한 T 세포 응답 (즉, 탈과립화, 시토킨 분비 또는 증식)이 있다 [11, 12, 14]. 하기 실시예들에서, CD123+ 세포주 및 원발성 AML 샘플 양쪽 모두에 응답한 CD107a의 상향조절, 염증성 시토킨의 생산 및 CD123-특이적 T 세포의 증식을 분석함으로써 CD123-CAR 발현 T 세포의 기능성이 실연되었다. 추가로, CD4+ 및 CD8+ 구획 양쪽 모두에서 다기능성이 관찰되었고, 이는 종양 미세환경에서 지속적인 항-백혈병 활성을 촉진할 수 있고 항-백혈병 활성을 증진시킬 수 있다 [45, 46]. 기타 공동자극성 도메인 예컨대 4-1BB을 포함하는 것, 및 "더 어린" 덜 분화된 T 세포를 사용하는 것이 CD123 CAR 응답을 더 증대시킬 수 있고, 활발한 연구 분야이다 [9,

47].

[0131] 추가로, CD123-특이적 T 세포는, 심지어 25:1의 E:T에서도, 정상적인 선조 콜로니 형성을 억제하지 않는다. 계통-CD34+CD38- 세포에서의 CD123의 발현은 통상적인 골수 선조 세포의 홀마크이고, 따라서 CD123 CAR T 세포의 가능한 표적이다 [31]. CB 세포가 CD123-특이적 T 세포와 함께 인큐베이션되었을 때 골수-유래 콜로니의 상대적 백분율의 감소가 관찰되었지만, 이러한 감소는 쌍으로 매칭된 CD19R CAR T 세포보다 유의하게 적지 않았다. 제한된 샘플 크기가 이러한 결과에 기여하는 것이 가능하고, 추가적인 실험에서 CD123 CAR T 세포로 처리된 제대혈 샘플에서의 CFU-GM 형성의 유의한 감소가 밝혀질 수 있다. 추가적으로, 플레이팅 전의 T 세포 및 CB 세포의 4시간 공동배양이 정상 골수 선조 콜로니 형성에 대한 효과를 관찰하는데 충분히 긴 기간이지 않을 수 있고, 더 긴 인큐베이션 시간이 관찰된 골수 유래 콜로니의 수를 감소시킬 수 있다. 그러나, CB 세포에 사용된 것과 동일한 방법을 사용하여, 1차 CD34-강화 AML 환자 샘플이 CD123 CAR T 세포와 함께 인큐베이션되었을 때, 형성된 백혈병 콜로니의 수의 실질적인 감소가 관찰되었고, 이는 4시간 인큐베이션 시간이 백혈병 콜로니 형성과 정상 콜로니 형성 사이의 효과를 관찰하는데 충분하다는 것을 시사한다. 대안적으로, AML 세포와 비교하여 CB 세포 상에서의 CD123의 더 낮은 상대적 발현이 CD123 CAR T 세포가 시험관 내에서 골수 유래 콜로니 형성을 변경시키지 못하는 것을 부분적으로 초래할 수 있다. CD123이 작은 비율의 계통-CD34+CD38- HSC에서만 발현된다는 것이 실연되었고, CD123을 표적화하는 작용제를 사용하는 2개의 I상 시험에서 장기 골수억제가 밝혀지지 않았지만, 조혈에 대한 CD123 CAR T 세포 요법의 효과를 평가하기 위해 추가 연구가 요구된다. 표적을 벗어나는 원치 않는 독성을 제어하기 위해, CAR 발현 T 세포의 제거를 허용하도록 EGFRt가 렌티바이러스 구축물에 포함되었다. CD123을 발현하는 정상 세포의 사망에 대한 가능성을 고려하여, CAR T 세포 활성을 조정하기 위한 기타 전략 예컨대 유도성 카스파제 9 세포자멸사 스위치 [48] 또는 CAR mRNA의 전기천공 [49]이 또한 고도로 흥미롭다.

[0132] 추가로, 활성 질환에 걸린 AML 환자로부터의 냉동보존된 PBMC가 CD123 CAR을 발현하도록 유전자 변형될 수 있고, 샘플의 2/3에서 자가 백혈병 모세포에 대해 강력한 세포용해 활성을 나타낸다는 것이 실연되었다. AML 559로부터의 CD123 CAR-발현 T 세포는 낮은 수준의 CD123을 발현한 자가 모세포를 용해하지 못했지만, 이러한 CAR T 세포는 CD123+ LCL 및 KG1a 세포주를 용해하였고 (데이터는 제시되지 않음), 이는 생성된 T 세포가 CD123-발현 표적 세포를 표적화하는 잠재력이 있다는 것을 시사한다. 본 발명가들이 아는 바로는, 이는 AML 환자-유래 T 세포가 CAR을 발현하도록 조작될 수 있고 자가 모세포에 대해 재지정된 항원 특이적 세포독성을 나타낸다는 것을 최초로 실연한다.

[0133] 총괄적으로, 하기 실시예들에 기술된 연구의 결과는 CD123 CAR T 세포가 CD123+ 세포와 CD123- 세포를 구별할 수 있고, 불량-위험 원발성 AML 환자 샘플들의 패널에 대해 다중 T 세포 이펙터 기능을 활성화시킬 수 있다는 것을 실연한다. 명확하게, 시험관 내에서 CD123-특이적 T 세포는 정상 선조 콜로니 형성을 유의하게 변경시키지 않았지만, 클론원성 골수 백혈병 선조의 성장을 상당히 감소시켰다. AML 환자로부터 유래된 T 세포가 CD123-특이적 CAR을 발현하도록 유전자 변형될 수 있고, 시험관 내에서 자가 모세포를 용해할 수 있다는 것이 또한 실연되었다. 따라서, CD123 CAR T 세포는 AML의 면역요법을 위한 전도유망한 후보이다.

[0134] **실시예 2: CD123CAR-형질도입 T 세포가 생체 내에서 백혈병 진행을 지연시킨다.**

[0135] *CD123CAR* 구축물. 26292CAR(S228P+L235E) 및 32716CAR(S228P+L235E) 구축물이 상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 생성되었다. 각각의 scFv에 대해 위치 297에서의 IgG4 힌지 내의 추가적인 돌연변이 (N297Q)를 포함한 2개의 추가적인 CD123CAR 구축물 ("26292CAR(S228P+L235E+N297Q)" 및 "32716CAR(S228P+L235E+N297Q)")가 또한 생성되었다 (도 12 및 13, 돌연변이: 밑줄친 볼드체).

[0136] NSG 마우스에 AML 종양 세포를 이식하고 (제0일), 제5일에 5.0×10^6 개의 26292CAR(S228P+L235E) 또는 26292CAR(S228P+L235E+N297Q)를 발현하는 CAR+ T 세포로 처리하고, 생체발광 영상화에 의해 백혈병 진행을 모니터링하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, 26292CAR(S228P+L235E)가 형질도입된 T 세포로 처리된 마우스에서 처리일과 비교하여 제8일에 백혈병 부하가 진행되었고, 이는 위치 S228P 및 L235E에서의 힌지 영역 돌연변이가 있는 CD123CAR 구축물이 형질도입된 세포가 생체 내에서 효과가 없었음을 가리킨다. 대조적으로, 26292CAR(S228P+L235E+N297Q)가 형질도입된 T 세포로 처리된 마우스는 처리일과 비교하여 종양 크기 감소를 나타냈고, 이는 위치 297에서의 힌지 영역 돌연변이 (N297Q)의 부가가 생체 내에서 백혈병 진행을 지연시킬 수 있는 CD123CAR 구축물을 초래한다는 것을 가리킨다.

[0137] **참고문헌**

[0138] 하기 열거된 참고문헌, 특허, 공개된 특허 출원, 및 상기 명세서에서 언급된 모든 참고문헌은 이에 의해 본원에

완전하게 기재된 것과 같이 전문이 참고로 포함된다.

1. Eaves, C.J. and R.K. Humphries, Acute myeloid leukemia and the Wnt pathway. *N Engl J Med*, 2010. 362(24): p. 2326-7.
2. Dohner, H., et al., Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2010. 115(3): p. 453-74.
3. Majeti, R., Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene*, 2011. 30(9): p. 1009-19.
4. Kikushige, Y., et al., TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(6): p. 708-17.
5. Jena, B., G. Dotti, and L.J. Cooper, Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010. 116(7): p. 1035-44.
6. Cooper, L.J., et al., T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1637-44.
7. Hudecek, M., et al., The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010. 116(22): p. 4532-41.
8. Kochenderfer, J.N., et al., Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother*, 2009. 32(7): p. 689-702.
9. Milone, M.C., et al., Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther*, 2009. 17(8): p. 1453-64.
10. Brentjens, R.J., et al., Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 2003. 9(3): p. 279-86.

[0139]

11. Brentjens, R.J., et al., Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory Bcell leukemias. *Blood*, 2011. 118(18): p. 4817-28.
12. Kochenderfer, J.N., et al., B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 2011.
13. Savoldo, B., et al., CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*, 2011. 121(5): p. 1822-6.
14. Kalos, M., et al., T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced Leukemia. *Sci Transl Med*, 2011. 3(95): p. 95ra73.
15. Till, B.G., et al., CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*, 2012.
16. Peinert, S., et al., Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. *Gene Ther*, 2010. 17(5): p. 678-86.
17. Dutour, A., et al., In Vitro and In Vivo Antitumor Effect of Anti-CD33 Chimeric Receptor-Expressing EBV-CTL against CD33 Acute Myeloid Leukemia. *Adv Hematol*, 2012. 2012: p. 683065.
18. Du, X., M. Ho, and I. Pastan, New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J Immunother*, 2007. 30(6): p. 607-13.
19. Pelloquin, F., J.P. Lamelin, and G.M. Lenoir, Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1986. 22(12): p. 689-94.
20. Wang, X., et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*, 2011. 118(5): p. 1255-63.
21. Reddy, M.P., et al., Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol*, 2000. 164(4): p. 1925-33.
22. Nguyen, P., I. Moisini, and T.L. Geiger, Identification of a murine CD28 dileucine motif that suppresses single-chain chimeric T-cell receptor expression and function. *Blood*, 2003. 102(13): p. 4320-5.

[0140]

23. Jensen, M.C., et al., Human T lymphocyte genetic modification with naked DNA. *Mol Ther*, 2000. 1(1): p. 49-55.
24. Riddell, S.R. and P.D. Greenberg, The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*, 1990. 128(2): p. 189-201.
25. Brown, C.E., et al., Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer Res*, 2009. 69(23): p. 8886-93.
26. Bhatia, R., et al., Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood*, 1995. 85(12): p. 3636-45.
27. Jordan, C.T., et al., The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, 2000. 14(10): p. 1777-84.
28. Jin, L., et al., Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(1): p. 31-42.
29. Munoz, L., et al., Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*, 2001. 86(12): p. 1261-9.
30. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(4): p. 247-58.
31. Manz, M.G., et al., Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(18): p. 11872-7.
32. Le Dieu, R., et al., Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*, 2009. 114(18): p. 3909-16.
33. Oka, Y., et al., Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(38): p. 13885-90.
34. Majeti, R., et al., CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 2009. 138(2): p. 286-99.
35. Golden-Mason, L., et al., Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol*, 2009. 83(18): p. 9122-30.

[0141]

36. Jin, H.T., et al., Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(33): p. 14733-8.
37. Brown, E.J. and W.A. Frazier, Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(3): p. 130-5.
38. Walter, R.B., et al., Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*, 2012. 119(26): p. 6198-208.
39. Aigner, M., et al., T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE((R)) antibody construct. *Leukemia*, 2012.
40. Hernandez-Caselles, T., et al., A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol*, 2006. 79(1): p. 46-58.
41. Sievers, E.L., et al., Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*, 2001. 19(13): p. 3244-54.
42. Tsimberidou, A.M., et al., The role of gemtuzumab ozogamicin in acute leukaemia therapy. *Br J Haematol*, 2006. 132(4): p. 398-409.
43. Sato, N., et al., Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood*, 1993. 82(3): p. 752-61.
44. Appay, V., D.C. Douek, and D.A. Price, CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*, 2008. 14(6): p. 623-8.
45. Moeller, M., et al., Sustained antigen-specific antitumor recall response mediated by gene-modified CD4+ T helper-1 and CD8+ T cells. *Cancer Res*, 2007. 67(23): p. 11428-37.
46. Schietinger, A., et al., Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *J Exp Med*, 2010. 207(11): p. 2469-77.
47. Gattinoni, L., et al., A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 2011. 17(10): p. 1290-7.
48. Straathof, K.C., et al., An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4247-54.
49. Yoon, S.H., et al., Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune

receptor in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Ther*, 2009. 16(6): p. 489-97.

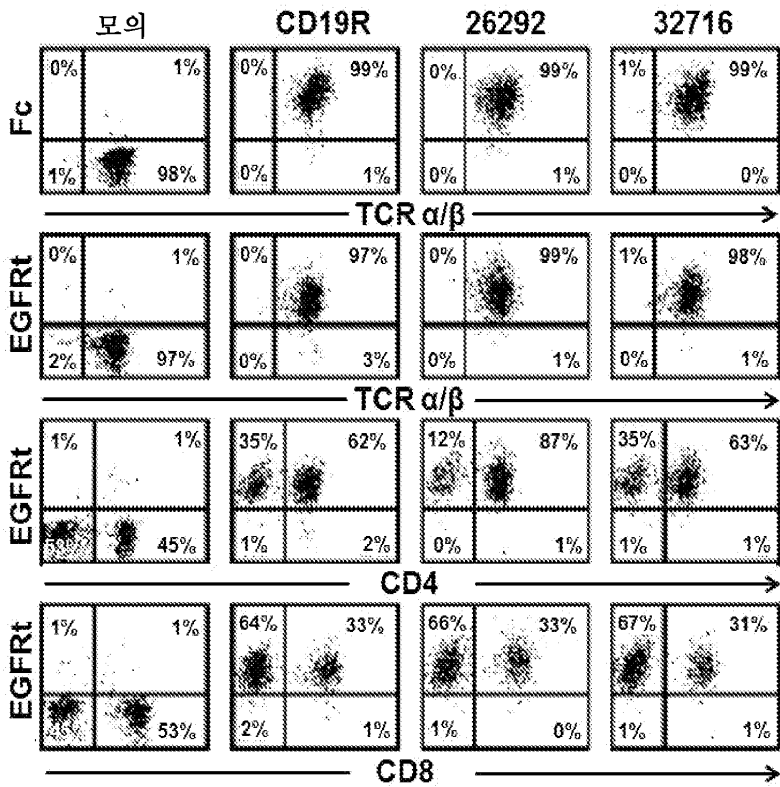
50. Strohl, W.R., Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Op Biotech*. 2009. 20:685-691.

도면

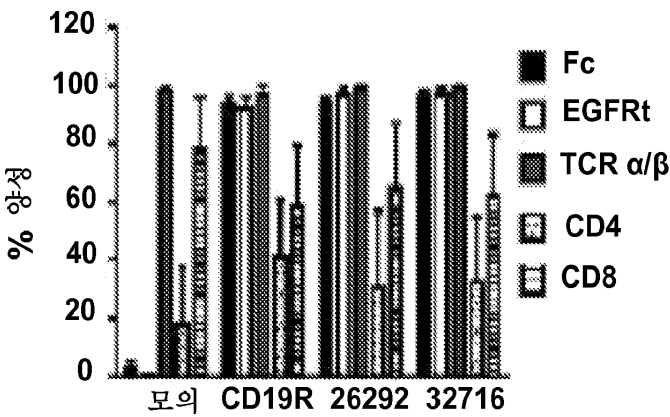
도면1a



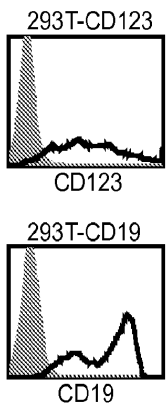
도면1b



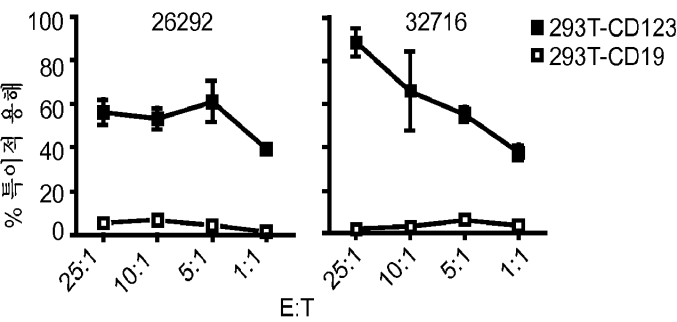
도면1c



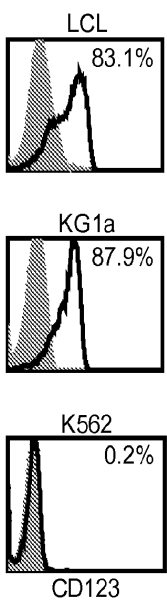
도면2a



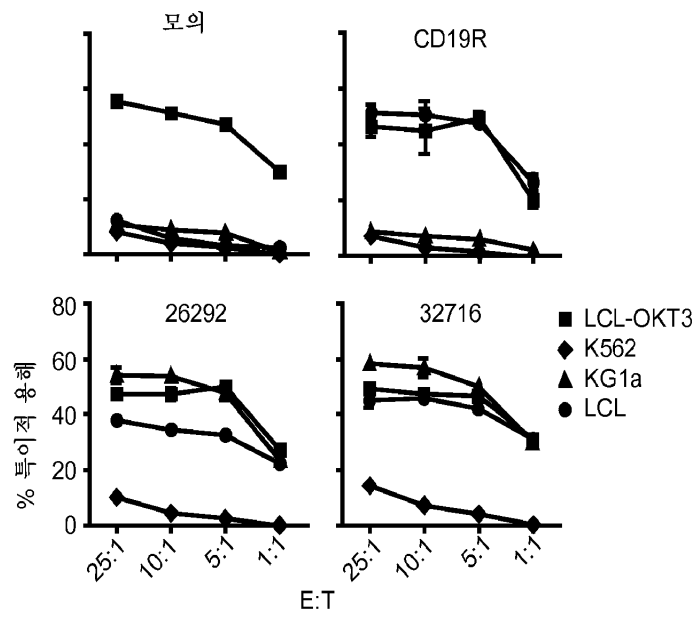
도면2b



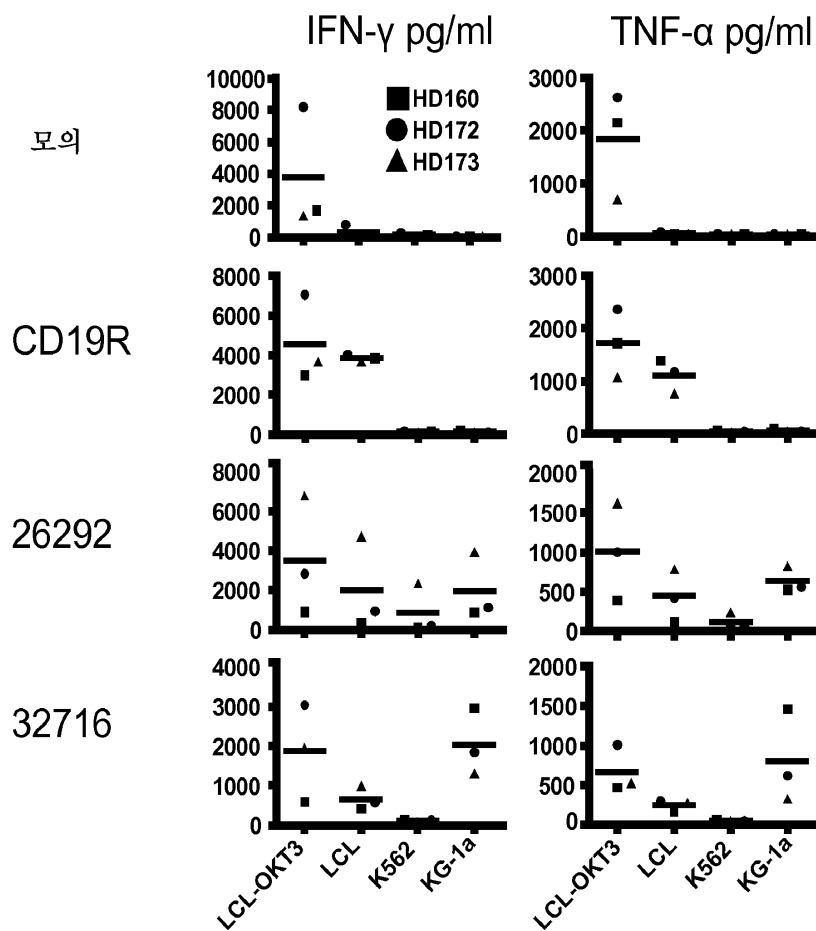
도면2c



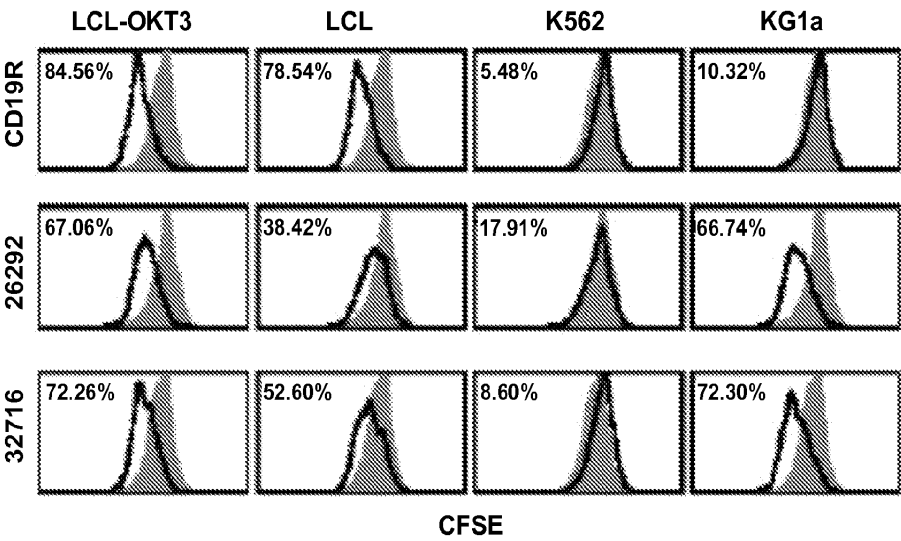
도면2d



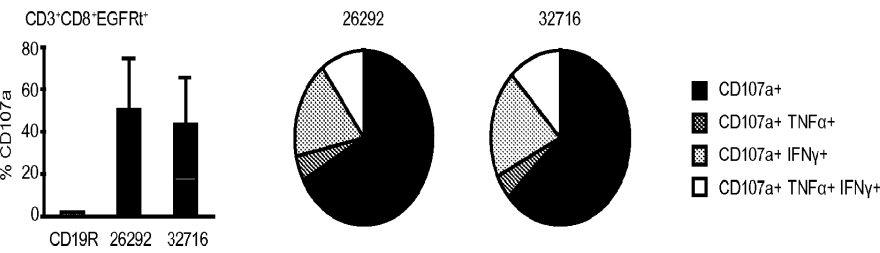
도면3a



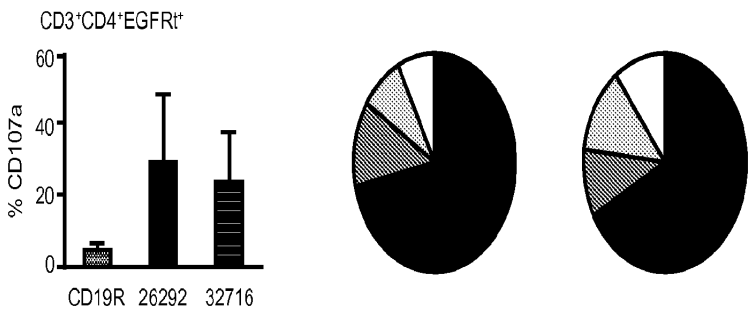
도면3b



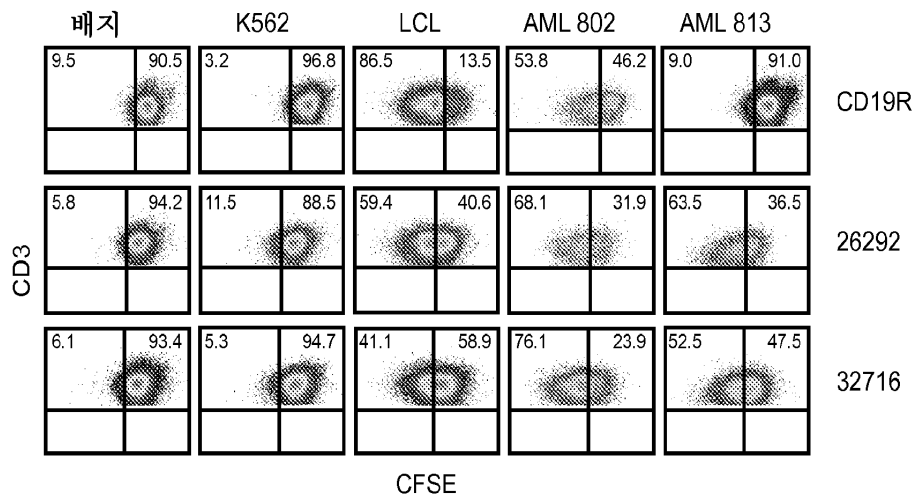
도면4a



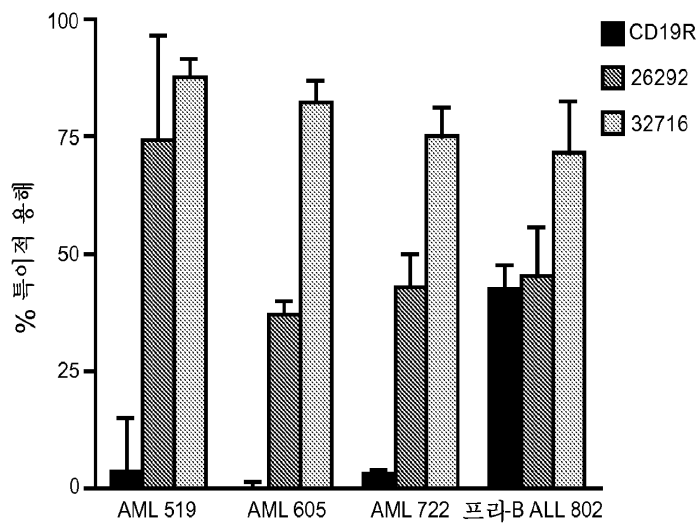
도면4b



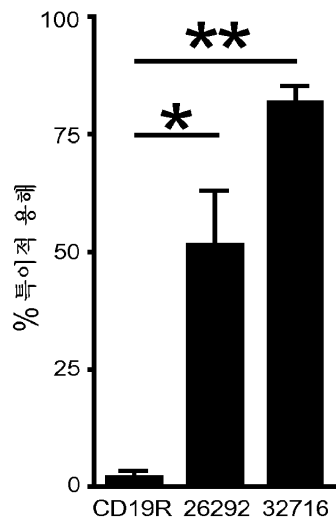
도면4c



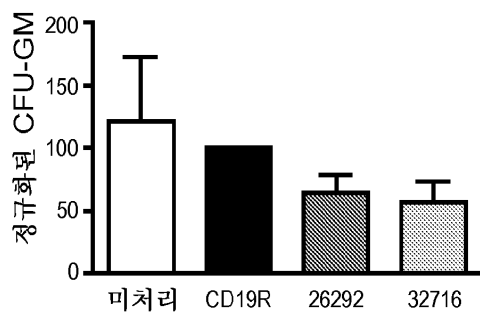
도면5a



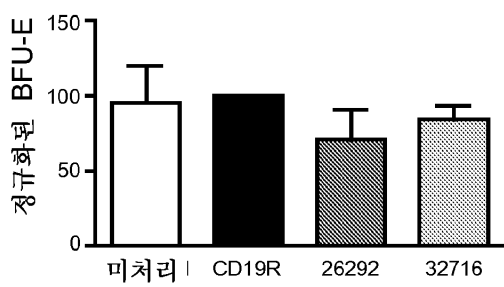
도면5b



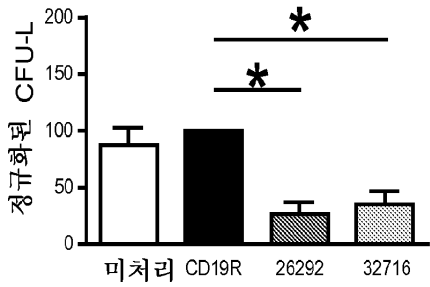
도면6a



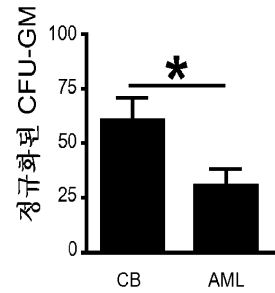
도면6b



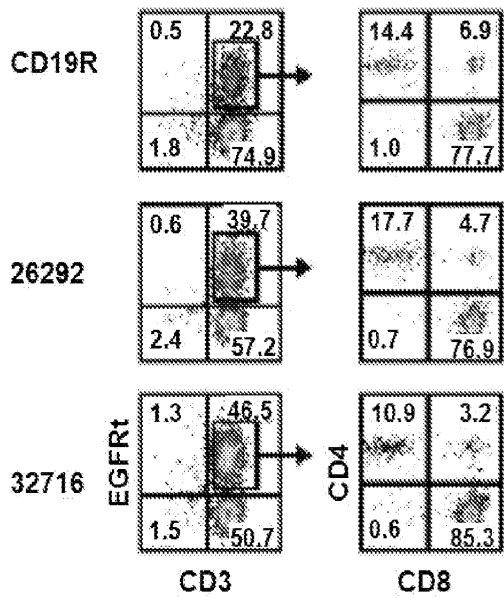
도면6c



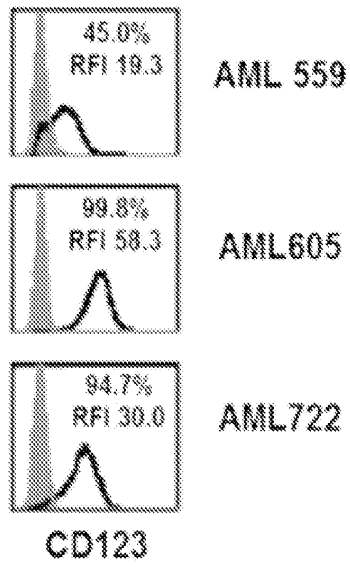
도면6d



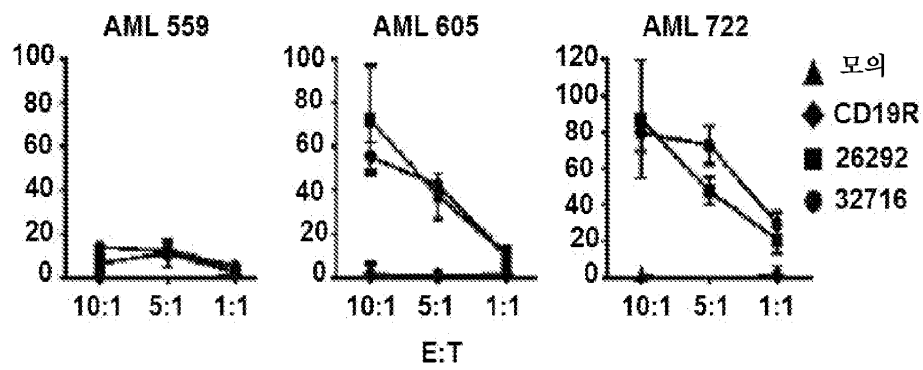
도면7a



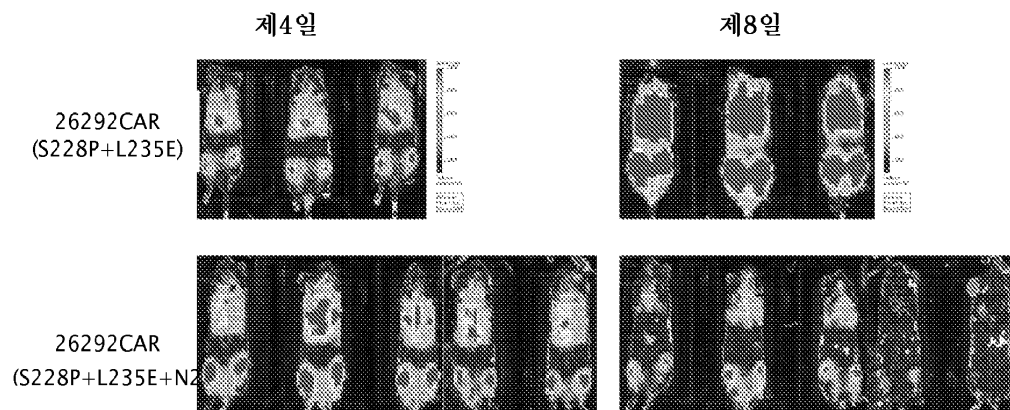
도면7b



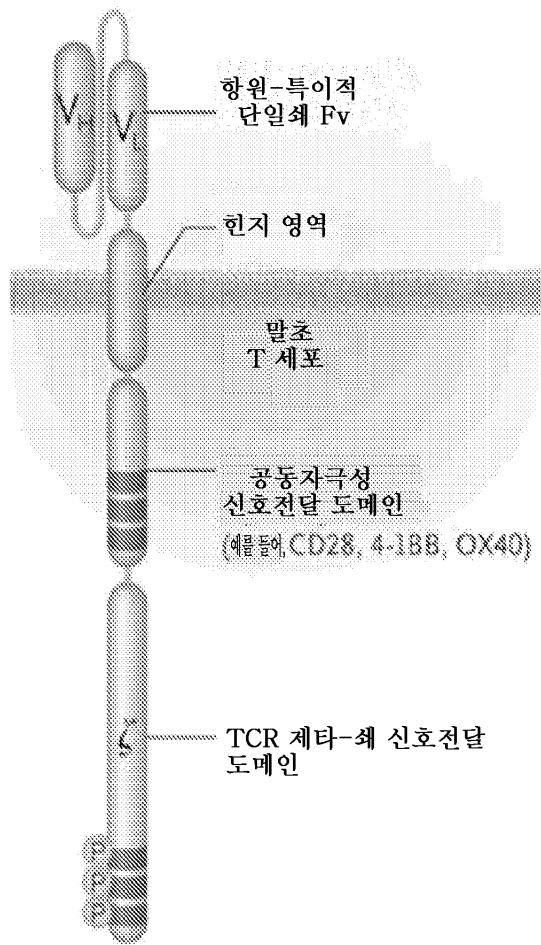
도면7c



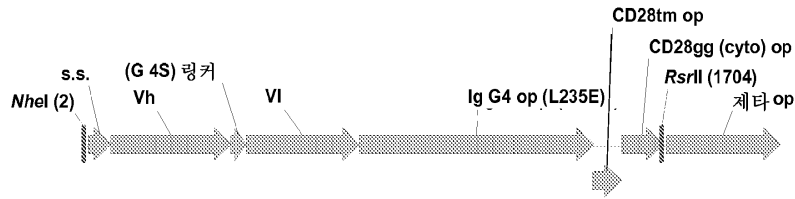
도면8



도면9



도면10i



IL3scfv-IgG4(L235E)-CD28gg-체타(32716)- CO 이전

2052 bp

NheI
↓~~~~~

GMCSFR 앞과 신호 서열 →
M L L L V T S L L L C E L P H

1 GCTAGCGCGC CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCCTGC TGCTGTGCGA GCTGCCCCAC
CGATCGCGGC GGTGGTACGA CGACGACAC TGGTCGGACG ACGACACGCT CGACGGGGTG

Vh (32716)→

61 CCGGCTTTC TGCTGATCCC CCAGATTCAG CTGGTGCAGA GCGGCCCCGA ACTGAAAAA
GGGCGGAAG ACGACTAGGG GGTCTAAGTC GACCACTCT CTGGCGGCTT TGACTTTTTT
P G E T V K I S C K A S G Y I F T N Y G

121 CCGGGCGAAA CCGTGAATAA TAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATATTTTAC CACTATGCG
GGCGCGCTTT GGCACATTTA ATCGACGTTT CGCTGCGCA TATAAAAATG GTTGATACCG
M N W V K Q A P G K S F K W M G W I N T

181 ATGAATCGG TGAACAGAGC GCGGGCGAAA AGCTTTAAAT GGATGGGCTG GATTAACAC
EACTTGACCC ACTTTGTCGG CCGGCGGCTT TCGAAATTTA CCTACCCGAC CTAATTGTG
Y T G E S T Y S A D F K G R F A F S L E

241 TATACCGGG AAAGCACCTA TAGCGCGGAT TTAAAGGCC GCTTTGCGTT TAGCCTGGAA
ATATGGCGCG TTTGCTGGAT ATCGCGCTA AATTTTCGG CGAAACGCAA ATCGGACCTT
T S A S T A Y L H I N D L K N E D T A T

301 ACCAGCGCGA GCACCGGCTA TCTGCTATT AACGATCTA AAAACGAAGA TACCGCGACC
TGGTCGCGCT CGTGGCGCAT AGACGATATA TTGCTAGACT TTTTGCTTCT ATGGCGCTGG
Y F C A R S G G Y D P M D Y W G Q G T S

361 TATTTTTCGG CCGCGAGCGG CCGCTATGAT CCGATGGATT ATTGGGCGCA GGGCACCGAC
ATAAAAAGC GCGCGTCGCG GCGGATACAA GGCTAAGTAA TAACCCCGGT CCGGTGGTGC

G4S 링커 →

421 GTGACCGTGA GCAGCGGCGG CCGCGCGCAGC GCGCGCGCGG GCAGCGGCGG CCGCGCGCAGC
CACTGGCACT CGTCGCGCGC GCGCGCGCTG CCGCGCGCGC CGTCGCGCGC GCGCGCGCTG

Vl (32716)→

481 GATATTTGTC TACCCAGAG CCGCGCGCAGC CTGGCGGTGA GCTTGGGCA GCGCGCGCAGC
CATATACAGC ACTGGGCTCT GCGCGCGCTG GCGCGCGCACT CCGACCGGCT CCGCGCGCTG
I S C R A S E S V D N Y G N T F M H W Y

541 ATTAGCTGCC GCGCGAGGGA AAGCGTGGAT AACTATGGCA ACACCTTTAT GCATTGCTAT
TAATCGAGCG CCGCGCTGCT TTGCGCTA TTGATACCT TGTGAAATA CGTAACATA
Q Q K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S

601 CAGCAGAAAC CCGCGCAGCG GCGGAAACTG CTGATTTATC GCGCGAGCAA CCGGAAAGC
GTGCTCTTTC GCGCGCTGCG CCGCTTTGAC GACTAAATAG CCGCGCTGCT GGACCTTTTC
G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N

661 GCGATTCGCG CCGCGCTTTAG CCGCGAGCGG AGCGCGACCG ATTTTACGCT GACCTTTAAC
CCGTAAAGGC GCGCGAAATC CCGCTCGCGC TCGCGCTGCT TAAATGGGA CTGCTAATTG

도면10ii

P V E A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P P
721 CCGGTGGAG CGGATGATGT GGCGACCTAT TATTGCCAGC AGAGCAACGA AGATCCGCCG
GGCCACCTTC GCGTAGTACA CCGGTGGATA AFAACGGTGG TCTCTGTGCT TCTAGCGGGC

IgG4op(L235E)→

T F G A G T K L E L K E S K Y G P P C P
781 ACCTTEGGCG CGGATACCAA ACTGGAACTG AAAGAGAGCA AGTACGGCCC TCCCTGCCCC
TGGAAACCGC GCGGTGGGT TGAACCTTGC TTTCTCTCGT TCATGCCGGG AGGGACGGGG
P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P
841 CCTTGCCCTG CCCCCGAGTT CGAGGGCGGA CCCAGCGTGT TCCTGTTCCT CCCCAAGCCC
GGAACGGGAC GGGGCTCAA GCTCCCGCCT GGGTCGCACA AGGACAAGGG GGGGTTCGGG
K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
901 AAGGACACCC TGATGATCAG CCGGACCCCC GAGGTGACCT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC
TTCTGTGGG ACTACTAGTC GGCCTGGGGG CTCACCTGSA CGCACCACCA CTTGCACTCG
Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A
961 CAGGAAGATC CCGAGGTCCA GTTCAATTGG TACGTGGACG GCGTGGAGT GCACAACGCC
GTCTTCTAG GGTCCAGGT CAAGTTAACC ATGCACCTGC CGCACCTTCA CGTGTTGCGG
K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T
1021 AAGACCAAGC CCAGAGAGGA ACAGTTCAAC AGCACCCTACC GGGTGGTGTG TGTGCTGACC
TTCTGGTTCG GTCTCTCTCT TGTCAAGTTG TCGTGGATGG CCCACCACAG ACACGACTGG
V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G
1081 GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAA GAATACAAAT GCAAGGTGTC CAACAAGGGC
CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTCGCGTTT CTATGTGTCA CGTTCCACAG GTTGTTCCCG
L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q
1141 CTGCCCAGCA GCATCGAAAA GACCATCAGC AAGGCCAAGG GCCAGCCTCG CGAGCCCCAG
GACGGGTCTG CTAGCTTTT CTGCTAGTCG TTCCGCTTCC GCGTGGGAGC GCTCGGGGTC
V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C
1201 GTGTACACCC TGCCTCCCTC CCAGGAAGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGTC CCTGACCTGC
CACATGTGGG ACGAGGGGAG GGTCTCTCTC TACTGCTTCT TGGTCCACAG GGAAGTGGAG
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
1261 CTGGTGAAGG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA CGGCCAGCCT
GACCACTTCC CGAAGATGGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCTCTCGTT GCCGGTCGGA
E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y
1321 GAGAACAAC TACAAGACCAC CCTTCCCGTG CTGGACAGCG ACGGCAGCTT CTTCCTGTAC
CTCTTGTGTA TGTTCGTGGT GGGAGGGCAC GACCTGTCTG TCCCGTCGAA GAAGGACATG
S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V
1381 AGCCGGCTGA CCGTGGACAA GAGCCGGTGG CAGGAAGGCA ACGTCTTTAG CTGCAGCGTG
TCGGCCGACT GGCACCTGTT CTCGGCCACC GTCTTCCGT TGCAGAAATC GACGTGCGAC
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K
1441 ATGCACGAGG CCCTGCACAA CCACTACACC CAGAAGAGCC TGAGCCTGTC CCTGGGCAAG
TACGTGCTCC GGGACGTGTT GGTGATGTGG GTCTTCTCGG ACTCGGACAG GGACCCGTTT

CD28tm op→

M F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T
1501 ATGTTCTGAG TCTTGGTGGT GGTGGGCGGG GTGCTGGCCT GCTACAGCCT GCTGGTGACA
TACAAGACCC ACGACCAACA CCACCCGCCC CAGGACCGGA CGATGTGGA CAGCCACTGT

CD28gg(cyto) op→

V A F I I F W V R S K R S R G G H S D Y
1561 GTGGCCTTCA TCATCTTTTG GGTGCTGAGC AAGCCGAGCA GAGGTGAGCA CAGCGATTAC
CAGCGGAAGT AGTAGAATAA CCACGCTTCC TTGCTCTGCT CTCCGCGGCT GAGCTGTGTC
M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P
1621 ATGAACTAGC CCGCTAGAGC GCTGGGCCCC AAGCGGAGC ACTAGCAGCC CTACGCCCCA
EACCTTACT GGGGCTGTG CAGACCGGGG TGGGCTTGG TGAAGCTGG GATGCGGGCT

도면10iii

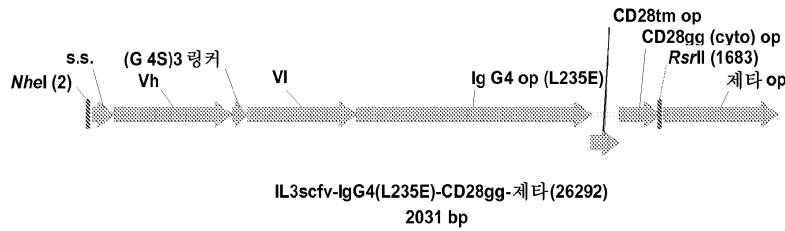
RsrII
~~~~~↓  
제타 op→

```

P R D F A A Y R S G G G R V K F S R S A
1681 CCGAGGAACT TTGCGCGCTA CCGGTUXGGC GGAGGGGSGG TGAAGTTCAG CAGAAGCGCC
GGGTCCTGA AAGGAGGAT GCGAGGCGG CCTCCCGCC ACTTCAAGTC GTCTTCGCGG
D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R
1741 GAGCGCCCTG CTTACACAGCA GGGCCAGAAT CAGCTGTACA ACGACCTGAA CTTGGGACAG
CTGCGGGGAC GATGCTGCT CCGGCTCTTA GTGACATGCT TGCCTGACTT GGACCGCTCT
R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K
1801 AGGGAAGACT ACGACCTCT GGTGAGCGG AGAGGCGGG ACCCTGAGAT GGGCGGCAAG
TCCCTTCTCA TCTGCGAGG CTTATTCGGG TCTCGCGCGG TGGACCTCA CCGCGGCTTC
P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A
1861 CCGCGGCGGA AGAAGCGGCA GGAAGGCTG TATAAGCAAC TGCAGAGAGA CAAGATGGCC
GGAGCGGCTT TCTTGGGGT CTTTCGGAC ATATTGCTTG AGTCTTTCT GTCTACCGG
E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G
1921 GAGGCTTACA GCGAGATCG CATGAGGCG GAGCGGAGG GGGGCAAGG CACCGAGCG
CTCGGATGT CCGCTAGGC GTACTTCCG CTGCGCTCC CCGGTTTCC GTGCTGCCG
L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A
1981 CTGTATCAGG GCTGTTCAC CGCCGCCAG GATACCTACG ACGGCTGCA CATGCGGCG
GACATAGTC CCGACAGGTG GCGTGGTTC CTGTGATGC TCGCGGAGT GTACCTCCG
L P P R
2041 CTGCGGCGAA GG
GACGGGGTT CC

```

도면11i



NheI  
↓~~~~~

**GMCSFR 앞과 신호 서열** →

M L L L V T S L L L C E L P H

1 GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCCTGC TGCTGTGCGA GCTGCCCCAC  
CGATCGCGGC GGTGGTACGA CGACGACCAC TGGTCGGACG ACGACACGCT CGACGGGGTG

**Vh (26292) →**

P A F L L I P Q V Q L Q Q P G A E L V R

61 CCGCGCTTTC TGCTGATCCC CAGGTGGGAG CTGCAGCAGC CGGCGCGGGA ACTGGTGGGC  
GGGCGGAAAG ACGACTAGGG GGTCCACGTC GACGTCGTGG GCCCGCGGCT TGAACACGCG  
P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W

121 CCGGCGCGGA GCGTGAAACT GAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATACCTTTAC CAGCTATTGG  
GGCCCGCGCT CCGACTTTGA CTCGACGTTT CGCTCGCCGA TATGGAATG GTCCGATAAC  
M N W V K Q R P D Q G L E W I G R I D P

181 ATGAACCTGG TGAACACGCG CCGGATCAG GGCTGGAAAT GGATGGCGG CATTGATCGG  
TACTTGACCC ACTTTGTGTC GGGCCTAGTC CCGGACCTTA CCTAACCGGC GTACCTAGGC  
Y D S E E T H Y N Q K F K D K A I L T V D

241 TATGATAGCG AAACCCATTA TAACGAGAA TTTAAAGATA AAGCATTTCT GACCGTGGAT  
ATCTATGCG TTTGGGTAAT ATTGGTCTTT AAAATTTCTAT TTCGCTAAGA CTGGCACTA  
K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V

301 AAAAGCGGGA GCACCGCGTA TATGACGCTG AGCAGCGTGA CCAGCGAAGA TAGCGCGGTG  
TTTTGCTCGT CGTGGCGCAT ATACGTCGAC TGTGCGGACT GGTGCGTTCT ATCGCGGCAC  
Y Y C A R G N W D D Y W G Q G T T L T V

361 TATTATTGCG CCGCGCGCAA CTGGGATGAT TATTGGGGCC AGGGCACAC CCGACCGTGG  
ATAATAACGC GCGCGCGGTT GACCCCTACTA ATAACCCCGG TCCCGTGGTG GGACTGGCAC

**G4S 링커 →** **V1**

(26292)→

S S G G G G S G G G G S G G G G S D V Q

421 AGCAGCGGCG GCGCGCGGAG CCGCGCGGCG GCGAGCGGCG GCGCGCGGAG CCGATGCGAG  
TCGTGCGCGC CCGCGCGGCT GCGCGCGGCG CCGTGGCGCG CCGCGCGGCT GCTACGCTG  
I T Q S P S Y L A A S P G E T I T I N C

481 ATTACCCAGA GCGCGAGCTA TCTGGGCGAG AGCCCGGCGG AAACCATTAAC CATTACGTC  
TAATGGGCGT CCGGCTGAT AGACCGCGCG TCGGCGCGCG TTTGATATG GTAAATGAGC  
R A S K S I S K D L A W Y Q E K P G K T

541 CCGCGCGGCA AAGCATTAAG CAAAGATCTG GCTGGGATC AGGAAAAAC GGCAGAAAC  
GCGCGCTGCT TTTCTGATC GTTCTAGAC CGCAACATAG TCTTTTGGG CCGGTTTGG  
N K L L I Y S G S T L Q S G I P S R F S

601 AACCACTGCT TGATTTATAG CCGCAGCACC CTGCAAGAGG GATTCGCGG CCGCTTTAGC  
TTGTTTGGC ACTAAATATC GCGGTCGTGG GACGTCCTGC CCGAAGGCTC GCGCAATCG  
G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F

661 GCGAGCGGCA GCGCGACGGA TTTTACCTG ACCATTAGCA GCTGGAACG GGAAGATTTT  
CGGTGCGGCT GCGCGTGGCT AAAATGGGAC TGGTAATCGT CCGACCTTGG CCTTCTAATA  
A M Y Y C Q Q H N K Y P Y T F G G G T K

721 GCGAGTATTT ATTGCGAGCA GCATTAACAA TATCGGTATG CTTTGGCGG CCGCACCAAA  
CGCTACATAA TAACGGTCGT CATTATGTTT ATAGGCATAT GGAACCGCC GCGGTGGTTT



도면11ii

**IgG4op (L235E) →**

```

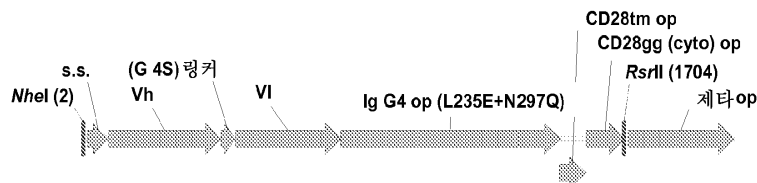
781  L E I K E S K Y G P P C P P C P A P E F
      CTGGAAATTA AAGAGAGCAA GTACGKKCT CCGTGGTGGC GTTCCCTGCG CCGCGAGTTC
      GACCTTETAT TPCUUXUUT CATCGCGGAA GGUAXLGGG GAGGAGUAG CCGGCTCAA
      E G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
841  GAGGGCGGAC CTAGGCTGUT COTGTTTCCC CCGTAGCTCG AGGATACGUT GATGATAGC
      CTCTCGGUTS GGTGCGAATA GGACAGGUGG GGGTTCGGT TCGTGTGGA CTACAGTCC
      R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q
901  GGGACCCCGG AGGTGACCTG CCGGCTGCTG GAGGTGAGCC AGGAGATTC CAGGCTCCAG
      GCTGGGGGTC TCCAGTGGAC GACGACGAC CCGCATCGG TCCCTGAGG GCTCCAGGTC
      F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
961  TCCATTTTAT ACGTGGAGCG CTTGGAAGTG CACAGCTGCA AGACCAAGC CAGAGAGGAA
      AAGTAACTG TCGACTTGTG CACCTTCCG CTGTTCCGG TCGGTTTGG GTCCTGCTT
      Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
1021  CAGTCAAGC GAGCTAGGCG GATGCTGCTG TCGCTGAGG TCGTGAAGG GAGCTGCTG
      GTGAGTGTCT CTTGATGCTG CACGCTGCTG CAGCTGCTG AGGAGCTGCT CTTGCTGCTG
      N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K
1081  AAGTGGCAAG AATGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG TCGCTGCTG CAGTGAAGG
      TCGCTGCTG TCGCTGCTG CTTGCTGCTG TCGCTGCTG AGGCTGCTG CTTGCTGCTG
      T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
1141  ACGTCAAGC AGGCTGAGG CAGGCTGCTG GAGGCTGCTG TCGCTGCTG CCGTGGCTG
      TCGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
      Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
1201  CAGTCAAGC TCGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG
      CCGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
      S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
1261  AAGTCAAGC CAGGCTGCTG GAGGCTGCTG GAGGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG
      TCGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
      P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K
1321  CAGTCAAGC TCGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG
      GAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
      S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N
1381  ACGTCAAGC AGGCTGAGG CAGGCTGCTG TCGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG
      TCGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
      CD28tm op→
      H Y T Q K S L S L S L G K M F W V L V V
1441  CAGTCAAGC AGGCTGAGG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG
      TCGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
      V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W
1501  GAGGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG TCGCTGCTG CAGGCTGCTG
      CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
      CD28gg (cyto) op→
      V R S K R S R G G H S D Y M N M T P R R
1561  GTGCGGAGCA AGCGGAGGAG AGGCGGCCAC AGCGACTACA TGAACATGAC CCCCAGACGG
      CAGGCTGCTG TCGCTGCTG TCGCTGCTG TCGCTGCTG ACTTGTACTG GGGGTCTGCC
      P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y
1621  CCTGGCCCCA CCGGAGAGCA CTACAGGCCC TACGCCCCAC CCAGGGACTT TCGCGCCTAC
      GGACCGGGGT GGGCCTTCGT GATGCTCGGG ATGCGGGGGT GGTCCCTGAA ACGGCGGATG
      RsrII
      ~~~~~↓
 제타 op→
 R S G G G R V K F S R S A D A P A Y Q Q
1681 GGTGCCGGCG GAGGGCGGGT GAGGTTGAGC AGAAGCGCGG AGGCTGCTG CTACAGGAG
 GCGAGGCGCG CTCCCGCCCA CTTCAGTCTG TCTTGGCGGC TCGCGGGAGC GATGGTCTGT

```

도면11iii

G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L  
 1741 GGCCAGAATC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGAAGAGTA CGAAGTCTG  
 CCGGCTCTAG TCGACATGTT GCTCGACTTG GACCCGCTCTT CCCTTCTCAT GCTGCAGGAC  
 D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q  
 1801 GATAAGCGGA GAGGCGGGGA CCTGAGATG GCGGCAAGC CTGAGCGGAA GAACCCCCAG  
 CTATTGCGCT CTCCGGCCCT GGGACTCTAC CCGCCTTTC GAGCCGCTT CTGGGGGTC  
 E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G  
 1861 GAAGGCTCTG ATAACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG CGAGATCGGC  
 CTTCGCGACA TATTGCTTGA CGTCTTTCTG TTCTACCGGC TCCGGATGTC GCTCTAGCCG  
 M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T  
 1921 ATGAAGGCGG AGCGGAGGCG GGGCAAGGCG CACGACGGCG TGTATCAGGG CCGTCCACC  
 TACTTCCGCG TCGCCTCCCG CCGCTTCCCG GTGCTGCCCG ACATAGTCCC GGACAGGTGG  
 A T K D T Y D A L H M Q A L P P R  
 1981 GCCACCAAGG ATACCTACGA CGCCCTGCAC ATGCAGGCCC TGCCCCAAG G  
 CCGTGGTTCC TATGGATGCT GCGGGACGTG TACGTCGGG ACGGGGGTTC C

도면12i



IL3scfv-IgG4(L235E+N297Q)-CD28gg-제타(32716)- CO 이전

2052 bp  
 NheI  
 ↓~~~~~  
 GCMCSFR 알파 신호 서열 →  
 M L L L V T S L L L C E L P H  
 1 GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCCTGC TGTCTGTGGA GCTGCCCCAC  
 CGATCGCGCG GGTGGTACGA CGACGACCAC TGGTCGGAAG ACGACACGCT CGACGGGGTG  
 Vh (32716) →  
 P A F L L I P Q I Q L V Q S G P E L K K  
 61 CCGGCCCTTC TGCTGATCCC CCAGATTCAG CTGGTSCAGA GCGGCGCGGA ACTGAAAAA  
 GGGCGGAAG ACGACTAGGG GGTCTAAGTC GACCACTGCT CCGCGGGCCT TGACTTTTTT  
 P G E T V K I S C K A S G Y I F T N Y G  
 121 CCGGGCGAAA CCGTGAAAAA TAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATATTTTTC CAACTATGGC  
 GGGCCGCTTT GGCATTTTAA ATCGACGTTT CGCTCGCCGA TATAAAAATG GTTGATACCG  
 M N W V K Q A P G K S F K W M G W I N T  
 181 ATGAAGTGGG TGAACACGGC GCGGGGCAAA AGCTTTAAAT GGATGGGCTG GATTACACC  
 TACTTGACCC ACTTTGTCCG CGGCGCGTTT TCGAAATTAA CCTACCCGAC CTAATTGTGG  
 Y T G E S T Y S A D F K G R F A F S L E  
 241 TATACCGGCG AAAGCACTTA TAGCGGGGAT TTTAAAGGCC GCTTTGCGTT TAGCTCGGAA  
 AATAGGCGCG TTTGCTGGAT ATCGCGCTTA AATTTTCCGG CGAAACGCAA ATCGGACCTT  
 T S A S T A Y L H I N D L K N E D T A T  
 301 ACCAGGCGGA GCACCGCGTA TGTGCATATT AAGCATCTGA AAAACGAAGA TACCGCGACC  
 TGGTCGCGCT CGTGGGCGAT AGACGTATAA TTGCTAGACT TTTTCTTTCT ATGGCGCTGG  
 Y F C A R S G G Y D P M D Y W G Q G T S  
 361 TATTTTTCGG GCGGACGCGG CGGCTATGAT CGGATGGATT ATTGGGGCCA GGGCACCGAG  
 ATAAAAACGC GCGCGTCGCG GCGGATACCTA GGCTACCTAA TAACCCCGGT CCGCTGCTCG  
 G4S 링커 →  
 V T V S S G G G G S G G G S G G S  
 421 GTGACCGTGA GCACCGCGCG GGGGCGGCG GCGGCGGCG GCGGCGGCG GCGGCGGCG  
 CACTGGGACT CGTGGGCGCG GCGGCGGCG GCGGCGGCG GCGGCGGCG GCGGCGGCG  
 V1 (32716) →  
 D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T  
 481 GATATTTCTG TGAACCAAG CCGGCGGAGC CTGGCGGCG GCTTGGGCG GCGGCGGAGC  
 CTATAACAG ACTGGGCTC GGGCGGCTCG GACCGGCTC CCGGCGGCT GCGGCGGCTG  
 I S C R A S E S V D N Y G N T F M H W Y  
 541 ATTAGCTGCC GCGGCGGCGA AAGCGTGGAT AACTATGGCA ACACCTTTAT GCATTTGCTT  
 TAAATGAGCG CGGCGGCTCG TTTGACCTTA TTGATACCTT TGTGGAAATA GTTAACCTTA  
 Q Q K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S  
 601 CAGCGAAGAC CCGGCGGCGC GCGGAACTG CTGATTTATC GCGGCGGCGA CCGGAAAGC  
 GTGCTTTG GCGGCGGCGC GCGGCTTAC GACTAATAG CCGGCTGCTT GCGGCTTTG  
 G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N  
 661 GCGATTCGCG CCGGCTTTAG CCGGCGGCGC AGCGGCGCG ATTTTACCTT GACCTATAC  
 CCGTAAGGCC GCGGCGAATC GCGGCGGCGC TCGGCTGGC TAAATGGGA CTGGATATG

도면12ii

P V E A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P P  
721 CCGGTGGAGG CGGATGATGT GCGGACCTAT TATTGCCAGC AGAGCAACGA AGATCCGGCG  
GGCAACCTTC GCCACACAGA CCGGTGGATA AFAACGGTGG TCTGCTGGCT TGTAGCGGGC  
IgG4op (L235E+MJ297Q)→  
T F G A G T K L E L K E S K Y G P P C P  
781 ACCTTGGGG CGGACACAA ACTGGAACTG AAAGAGAGCA AGTACGGCCC TCCCTGCCCC  
TGGAAACCGG GCCCGGGGT TGAACCTTGA TTTCTCTCGT TCATGCCGGG AGGGACGGGG  
P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P  
841 CCTTGTCCCTG CCCCCGAGTT CGAGGGCGGA CCCAGCGTGT TCCTGTTCCTC CCCCAGCCCC  
GGAACGGGAC GGGGGCTCAA GCTCCCGCCT GGGTCGCACA AGGACAAGGG GGGGTTCGGG  
K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
901 AAGGACACCC TGATGATCAG CCGGACCCCC GAGGTGACCT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC  
TTCTGTGGG ACTACTAGTC GGGCTGGGGG CTCCACTGGA CGCACCAACA CTTGCACTCG  
Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A  
961 CAGGAAGATC CCGAGGTCCA GTTCAATTGG TACGTGGACG GCGTGGAAAT GCACAACGCC  
GTCTTCTTAG GGTCCAGGT CAAGTTAACC ATGCACCTGC CGCACCTTCA CGTGTTCGGG  
K T K P R E E Q F Q S T Y R V V S V L T  
1021 AAGACCAAGC CCAGAGAGGA ACAGTTCCAG AGCACTTACC GGTGGTGTGC TGTGCTGACC  
TTCTGGTTGG GGTCTCTCCT TGTCAAGGTG TCGTGGATGG CCCACCAAG ACACGACTGG  
V L H Q L M I S R T P E Y K C K V S N K G  
1081 GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAA GAATACAAGT GCAAGGTGTC CAACAAGGGC  
CAGGACCTGG TCCAGACCGA CTTCGGCTTT CTATATGTCA CGTTCACAG GTTGTTCCTG  
L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
1141 CTGCCACGCA GCATCGAAAA GACCATCAGC AAGGCCAAGG GCCAGCCTCG CGAGCCCCAG  
GACGGGTCTG CGTAGCTTTT CTGGTAGTCG TTCGGCTTCC CGGTCCGAGC GCTCGGGGTC  
V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C  
1201 GTGTACACCC TGCTCCCTC CCAGGAAGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGTC CTTGACCTGC  
CACATGTGG ACAGAGGGAG GGTCTTCTCT TACTGGTTC TGTCCACAG GGACTGGAGC  
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
1261 CTGGTGAAGG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA CGGCCAGCCT  
GACCACTTCC CGAAGATGGG GTCCGTGTAG CGGCACCTCA CCTCTCGTT GCCGTCGGGA  
E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y  
1321 GAGAACAAC ACAGACCCAC CCTCCCGTGG CTGGACAGCG ACGGCAGCTT CTTCTGTGAC  
CTCTTGTGA TGTTCGGTG GGGAGGGCAC GACCTGTGCG TGCCGTCGAA GAAGGACATG  
S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V  
1381 AGCCGGGCTGA CCGTGAGCAA GAGCCGGTGG CAGGAAGGCA ACGTCTTTCG CTGCAGCGTG  
TCGGCCGACT GGCACCTGTT CTCGGCCACC GTCTTCCGT TGCAGAAATC GACGTGCGAC  
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K  
1441 ATGCACGAGG CCTGCACAAA CCACTACACC CAGAAGAGCC TGAGCCTGTC CCTGGGCAAG  
TACGTGCTCC GGGACGTGTT GGTGATGTGG GTCTTCTCGG ACTCGGACAG GGACCCGCTC  
CD28tm op→  
M F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T  
1501 ATGCTCTGGG TCGTGGTGGT GGTGGGCGGG GTGCTGGCCT GCTACAGCCT GCTGGTACCA  
TACAAGACCC ACAGACACCA CCACCCGCCC CAGACCGGGA CGATGTGGA CAACCACTGT  
CD28gg (cyto) op→  
V A F I I F W V R S K R S R G G H S D Y  
1561 GTGGCTTCA TCACTTTTG GGTGGGAGC AAAGGAGCA GAGTACGCA CAGCTGCTAC  
CAGCGGAGCT AGTAGAAAC CCAGGCTTGG TTTCTCTCGT CTGCGCGGAT GTGCTGCTAC  
M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P  
1621 ATGACACAG CCGGACAGG GGTGGGCCC AAGCGGAGC ACTACAGAG CAGCTGCTAC  
TACTGCTTAT GGGGCTGTC CCGACCGGG TGGGCTTCTG TATGCTGAG CATGCGGGCT

도면12iii

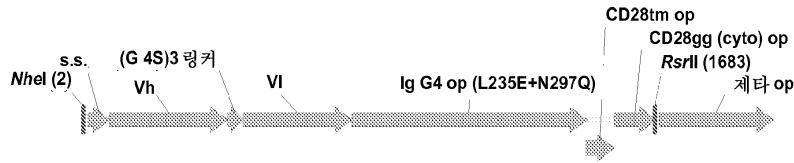
RsrII  
~~~~~↓  
제타 op→

```

P R D F A A Y R S G G G R V K F S R S A
1681 CCGAGGAGCT TCGCCGCTTA CCGGTCCGGC GGAGGGGSSG TGAAGTTGAG CAGAAGCGCC
GGGTCCCTGA AACGAGGAT GCGCGGACCG CCTCCCGCCC ACTTCAAGTC GTCTTCGCGG
D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R
1741 GACGCCCCCG CCTACCGACA GGGCGGAAT CAGCTGTACA ACGAGCTGAA CCTGGGCGAA
CTGCGGGGAC GGATGGTGGT CCGGTCTCTA GTGACATGT TGGTGGACTT GGACCCCTCT
R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K
1801 AGGGAGAGCT ACGAGCTCT GGTGAGCGG AGAGGCGGG ACCCTGAGAT GGGCGGCAAG
TCCCTTCTCA TCGTCCGCA CTTATTCGCC TCTCGGCGC TGGGACTCTA CCGGCGCTTC
P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A
1861 CCGCGCGGGA AGAAGCCCA GGAAGCCCTG TATACGAAC TGCAGGAGA CAGATGGCC
GGAGCCGCGT TCTTGGGGT CCTTCGGAC ATATTGCTTG ACGTCTTCT GTTCTACGG
E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G
1921 GAGGCTTACA GCGAGATCGG CATGAGGGC GAGCGGAGG GGGGCAAGG CCAAGAGGG
CTCGGATGT CGCTGTAGC GTACTTCCG CTCGCTCCG CCGCGTTCC GGTGCTGCC
L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A
1981 CTGTATCAGG GCGGTTCAC CGCCACCAAG GATACCTAC AGGCGCTGCA CAGGAGGCC
GACATAGTCC CGGACAGGTG CCGGTGGTTC CATGGATGC TCGGGGAGT GTACCTCCG
L P P R
2041 CTGCCCCCAA GG
GACGGGGGT CC

```

도면13i



IL3scfv-IgG4(L235E+N297Q)-CD28gg-제타(26292)- CO 이진

2031 bp

| NheI<br>↓~~~~~ |            | GMCSFR 앞과 신호 서열 → |            |            |            |            |            |            |             |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|----------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---|
|                |            | M                 | L          | L          | L          | V          | T          | S          | L           | L          | L          | C          | E          | L          | P          | H          |            |            |            |            |   |
| 1              | GCTAGCGCGC | CCACCATGCT        | GCTGCTGGTG | ACCAGCCTGC | TGCTGTGCGA | GCTGCCCCAC | CGATCGCGGC | GGTGGTACGA | CGACGACCAC  | TGGTCGGACG | ACGACACGCT | CGACGGGGTG |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | Vh (26292) →      |            |            |            |            |            |            |             |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | P                 | A          | F          | L          | L          | I          | P          | Q           | V          | Q          | L          | Q          | Q          | P          | G          | A          | E          | L          | V          | R |
| 61             | CCCGCCTTTC | TGCTGATCCC        | CCAGGTGCAG | CTGCAGCAGC | CGGCGCGGGA | ACTGGTGGGC | GGGCGGAAAG | ACGACTAGGG | GGTCCACGTC  | GACGCTGTCG | GCCCCGCGCT | TGAACACGCG |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | P                 | G          | A          | S          | V          | K          | L          | S           | C          | K          | A          | S          | G          | Y          | T          | F          | T          | S          | Y          | W |
| 121            | CCGGGCGCGA | GCGTGAAACT        | GAGCTGCAAA | GCGAGCGGCT | ATACCTTTAC | CAGCTATTGG | GGCCCCGCGT | CGCACTTTGA | CTCGACGTTT  | CGCTCGCCGA | TATGGAAATG | GTGATAAACC |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | M                 | N          | W          | V          | K          | Q          | R          | P           | D          | Q          | G          | L          | E          | W          | I          | G          | R          | I          | D          | P |
| 181            | ATGAACCTGG | TGAACACAGC        | CCCGGATCAG | GGCCTGGAAT | GGATTGGCCG | CATTGATCCG | TACTTGACCC | ACTTTGTCGC | GGGCTTAGTC  | CCGGACCTTA | CCTAACCGGC | GTAACCTAGG |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | Y                 | D          | S          | E          | T          | H          | Y          | N           | Q          | K          | F          | K          | D          | K          | A          | I          | L          | T          | V          | D |
| 241            | TATGATAGCG | AAACCCATTA        | TAACCAAGAA | TTTAAAGATA | AAGCGATTCT | GACCGTGGAT | ATACTATCGC | TTTGGGTAAT | ATTGGTCTTT  | AAATTTCTAT | TTCGCTAAGA | CTGGCACCTA |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | K                 | S          | S          | T          | A          | Y          | M          | Q           | L          | S          | S          | L          | T          | S          | E          | D          | S          | A          | V          |   |
| 301            | AAAAGCAGCA | GCACCCGCGT        | TATGCAGCTG | AGCAGCCTGA | CCAGCGAAGA | TAGCGCGGTG | TTTTCGTCGT | CGTGGCGCAT | ATACGTCGAC  | TCGTCGGACT | GGTCGCTTCT | ATCGCGCCAC |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | Y                 | Y          | C          | A          | R          | G          | N          | W           | D          | D          | Y          | W          | G          | Q          | G          | T          | T          | L          | T          | V |
| 361            | TATTATTGCG | CGCGCGGCAA        | CTGGGATGAT | TATTGGGGCC | AGGSCACCAC | CCTGACCGTG | ATAATAACGC | CGCGCGCGTT | GACCCCTACTA | ATAACCCCGG | TCCCGTGGTG | GGACTGGCAC |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | G4S 링커 →          |            |            |            |            |            |            |             |            |            |            |            |            |            |            |            | V1         |            |            |   |
| (26292)→       |            | S                 | S          | G          | G          | G          | S          | G          | G           | G          | S          | G          | S          | G          | G          | S          | D          | V          | Q          |            |   |
| 421            | AGCAGCAGCG | CCGCGCGGCG        | CGGCGCGGCG | GGCAGCAGCG | CGGCGCGGCG | CGATGTGCAG | TGCTCGCGCG | CGGCGCGGCG | GGGCGCGGCG  | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG | CGGCGCGGCG |   |
|                |            | I                 | T          | Q          | S          | P          | S          | Y          | L           | A          | A          | S          | P          | G          | E          | T          | I          | T          | I          | N          | C |
| 481            | ATTAACCCAG | CGGCGCGGCG        | TCTGGCGGCG | AGCCCGGCGG | AAACCATIAC | CATTAACTGC | TAATGGGCTC | CGGCGCGGCG | AGACCGCGCG  | TGGGCGCGCG | TTTGGTAAAG | GTAATTCAGC |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | R                 | A          | S          | K          | S          | I          | S          | K           | D          | L          | A          | W          | Y          | Q          | E          | K          | P          | G          | K          | T |
| 541            | CGGCGCGGCG | AAAGCATTAG        | CAAGATCTCG | CGGCGGATAC | AGGAAAAACC | GGGCAAAAAC | CGGCGCGGCG | TTTGGGATCG | GGGCGGATCG  | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG | GGGCGGATCG |   |
|                |            | N                 | K          | L          | L          | I          | Y          | S          | G           | S          | T          | L          | Q          | S          | G          | I          | P          | S          | R          | F          | S |
| 601            | AAACAACTGC | TGATTTATAG        | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | TTGTTTGGCG | ACTAAATATC | GGGCGGATCG  | GACGCTGTCG | CGTAAGGCTC | GGCGAATCG  |            |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | G                 | S          | G          | S          | G          | T          | D          | F           | T          | L          | T          | I          | S          | S          | L          | E          | P          | E          | D          | F |
| 661            | GGCAGCGGCG | CGGCGGATCG        | TTTTACCTCG | ACCATTAGCA | CGGCGGATCG | GGGAGATTCT | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | AAAAAGGAGC  | TGGTAATCGI | CGGACCTTGG | CCTTCGAAAA | CGGCGGATCG |            |            |            |            |            |            |            |   |
|                |            | A                 | M          | Y          | Y          | C          | Q          | Q          | H           | N          | K          | Y          | P          | Y          | T          | F          | G          | G          | G          | T          | K |
| 721            | CGGCGGATCG | TTTTACCTCG        | CGGCGGATCG | TATCGGATCG | CCTTTTGGCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | TAAACGGGCG | CGGCGGATCG  | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG | CGGCGGATCG |   |

도면13ii

**IgG4op (L235E) →**

```

781 L E I K E S K Y G P P C P P P C P A P E F
GAGGAAATTA AGAGAGGAAA GTAGGAGGCT CATTGAGGCTT CAGGAGGCTT
841 E G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CATTGAGGCTT CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
CTCAGGAGGCTT CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
901 R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
961 F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1021 Q F Q S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1081 N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1141 T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1201 Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1261 S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1321 P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1381 S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC

```

**CD28tm op →**

```

1441 H Y T Q K S L S L S L G K M F W V L V V
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1501 V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC

```

**CD28gg(cyto) op →**

```

1561 V R S K R S R G G H S D Y M N M T P R R
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1621 P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC

```

**계타 op →**

```

1681 R S G G G R V K F S R S A D A P A Y Q Q
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC

```

도면13iii

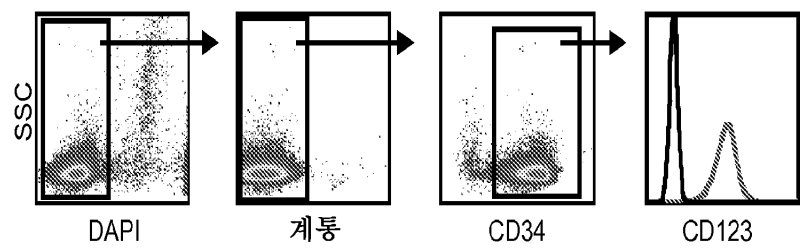
```

1741 G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1801 D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1861 E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1921 G A G G C C T G T A T T G C T T G A C G T C T T T C T G
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
1981 M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC
GAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC CAGGAGGAGC

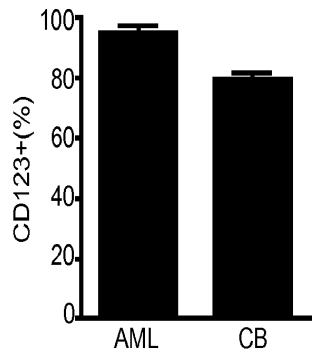
```



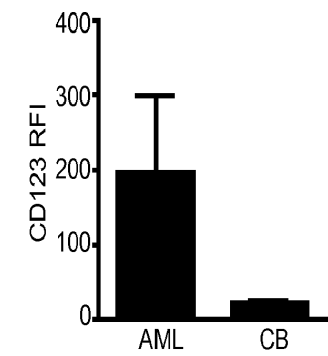
도면14a



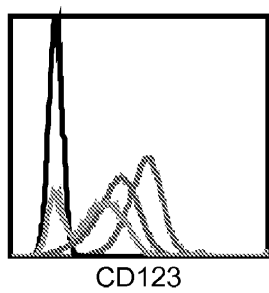
도면14b



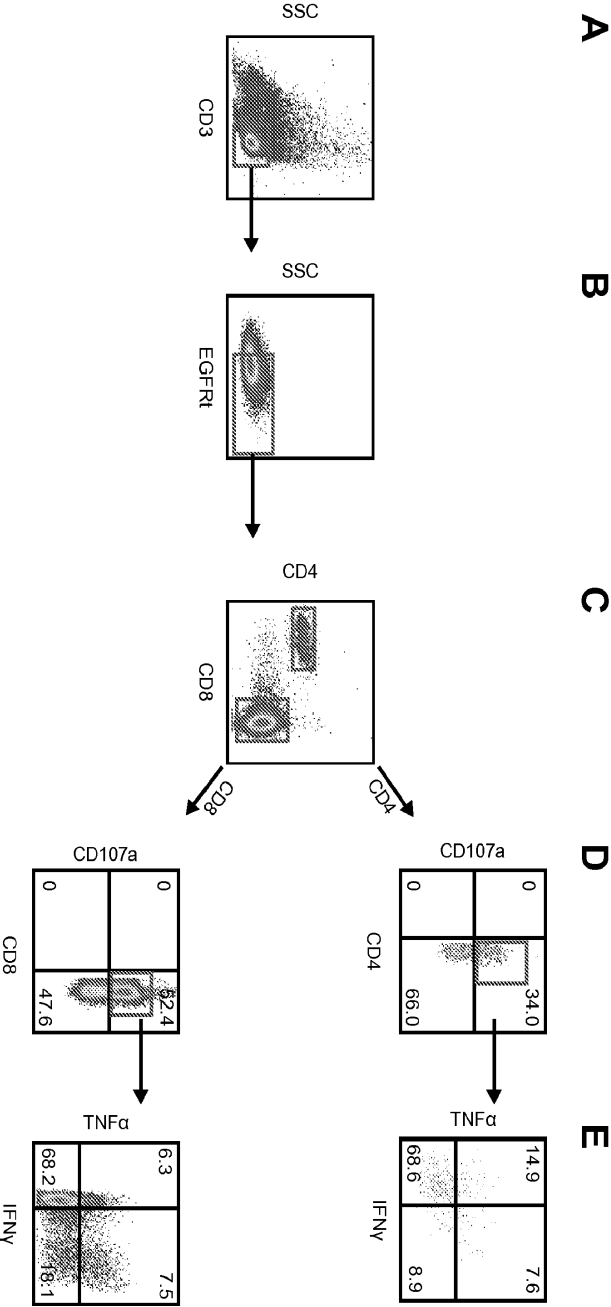
도면14c



도면14d

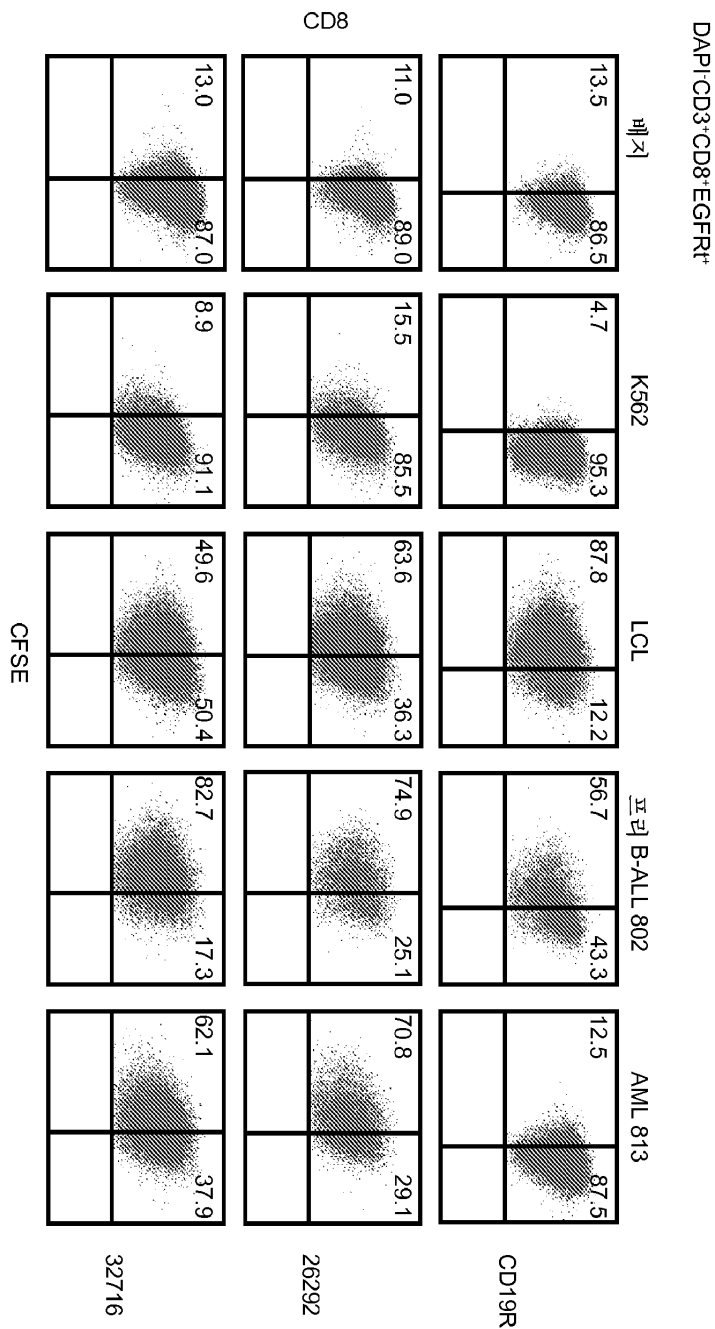


도면15





도면16b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CITY OF HOPE

FORMAN, Stephen

MARDIROS, Armen

<120> CD123-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR REDIRECTED T CELLS AND METHODS OF THEIR USE

<130> 54435.8127.W000  
 <150> US 13/844,048  
 <151> 2013-03-15  
 <160> 13  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 2052  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> antisense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E)  
 construct

<400> 1  
 gctagcgccg ccaccatgct gctgctgggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac 60  
  
 cccgcctttc tgctgatccc ccagattcag ctgggtgcaga gcggcccga actgaaaaaa 120  
 ccgggcgaaa ccgtgaaaat tagctgcaaa gcgagcggct atatttttac caactatggc 180  
 atgaactggg tgaacacggc gccgggcaaa agcttttaaat ggatgggctg gattaacacc 240  
 tataccggcg aaagcaccta tagcgcggat tttaaaggcc gctttgcgtt tagcctggaa 300  
 accagcgca gcaccgcgtg tctgcataat aacgatctga aaaacgaaga taccgcgacc 360  
 tatttttgcg cgcgcagcgg cggtctatgat ccgatggatt attggggcca gggcaccagc 420  
 gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc 480  
  
 gatattgtgc tgaccagag cccggcgagc ctggcggtga gcctgggcca gcgcgcgacc 540  
 attagctgcc gcgcgagcga aagcgtggat aactatggca acacctttat gcattggtat 600  
 cagcagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgattttatc gcgcgagcaa cctggaaagc 660  
 ggcatcccg cgcgcttttag cggcagcggc agccgcaccg attttacct gaccattaac 720  
 ccggtggaag cggatgatgt ggcgacctat tattgccagc agagcaacga agatccgccg 780  
 acctttggcg cgggcaccaa actggaactg aaagagagca agtacggccc tcctgcccc 840  
 ccttgccctg cccccagtt cgagggcgga ccagcgtgt tctgttccc cccaagccc 900  
  
 aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc 960  
 caggaagatc ccgaggtcca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 1020  
 aagaccaagc ccagagagga acagttcaac agcacctacc ggggtggtgtc tgtgctgacc 1080  
 gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gcaagggtgtc caacaagggc 1140  
 ctgcccagca gcatcgaata gaccatcagc aaggccaagg gccagcctcg cgagccccag 1200

gtgtacaccc tgcctccctc ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1260  
ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct 1320

gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac 1380  
agccggctga ccgtggacaa gagccggtgg caggaaggca acgtcttttag ctgcagcgtg 1440  
atgcacgagg ccctgcacaa ccaactacac cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag 1500  
atgttctggg tgctggtggt ggtgggcggg gtgctggcct gctacagcct gctggtgaca 1560  
gtggccttca tcatcttttg ggtgaggagc aagcggagca gaggcggcca cagcgactac 1620  
atgaacatga cccccagacg gcctggcccc acccggaagc actaccagcc ctacgcccc 1680  
cccagggact ttgccgccta ccggtccggc ggagggcggg tgaagttag cagaagcgcc 1740

gacgcccctg cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga 1800  
agggaagagt acgagctcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggaag 1860  
cctcgcgga agaaccacca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc 1920  
gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggaggc ggggcaagg ccacgacggc 1980  
ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcagccc 2040  
ctgccccca gg 2052

<210> 2  
<211> 2031  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E)  
construct

<400> 2

gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgca gctgccccac 60  
ccgcctttc tgctgatccc ccaggtgcag ctgcagcagc cgggcgcgga actggtgcgc 120  
ccgggcgcga gcgtgaaact gagctgcaaa gcgagcggct atacctttac cagctattgg 180  
atgaactggg tgaacagcg cccggatcag ggcttgaat ggattggccg cattgatccg 240  
tatgatagcg aaaccatta taaccagaaa tttaaagata aagcgattct gaccgtggat 300  
aaaagcagca gcaccgcgtat tatgcagctg agcagcctga ccagcgaaga tagcgcggtg 360

tattattgcg cgcgcgga ctgggatgat tattggggcc agggcaccac cctgaccgtg 420  
agcagcggcg gcggcgga cggcgggc ggagcggcg gcggcgga cgatgtgcag 480  
attaccaga gcccgagcta tctggcgcg agccggcg aaaccattac cattaactgc 540



cgcgcgagca aaagcattag caaagatctg gcgtgggtatc aggaaaaacc gggcaaaacc 600  
aacaactgc tgatttatag cggcagcacc ctgcagagcg gcattccgag ccgcttttagc 660  
ggcagcggca gcggcaccga ttttacctg accattagca gcctggaacc ggaagatttt 720  
gcgatgtatt attgccagca gcataacaaa tatccgtata cctttggcgg cggcacaaaa 780

ctggaaatta aagagagcaa gtacggccct cctgcccc cttgccctgc ccccgagttc 840  
gagggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 900  
cggacccccg aggtgacctg cgtgggtgtg gacgtgagcc aggaagatcc cgaggtccag 960  
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa 1020  
cagttcaaca gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgcctgacca ggactggctg 1080  
aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaag 1140  
accatcagca aggccaaggg ccagcctcgc gagccccagg tgtacaccct gcctccctcc 1200

caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tgggaagggt cttctacccc 1260  
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcctg agaacaacta caagaccacc 1320  
cctcccgtgc tggacacgca cggcagcttc ttccctgtaca gccggctgac cgtggacaag 1380  
agccggtggc aggaaggcaa cgtcttttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1440  
cactacacc agaagagcct gagcctgtcc ctgggcaaga tgttctgggt gctggtggtg 1500  
gtgggcgggg tcttgccctg ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat catcttttgg 1560  
gtgcggagca agcggagcag aggcggccac agcgactaca tgaacatgac cccagacgg 1620

cctggcccca cccggaagca ctaccagccc tacgccccac ccagggaactt tgccgcctac 1680  
cggtcgcggc gagggcgggt gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctaccagcag 1740  
ggccagaatc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagaa gggaagagta cgacgtcctg 1800  
gataagcgga gaggcgggga ccctgagatg ggcggcaagc ctgcggcgaa gaacccccag 1860  
gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc 1920  
atgaaggcg agcggagcg gggcaaggc cagcagggcc tgtatcaggc cctgtccacc 1980  
gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgcceccaag g 2031

<210> 3

<211> 2052

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E+N297Q)  
construct

<400> 3

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac | 60   |
| cccgcccttc tgctgatccc ccagattcag ctggtgcaga gcggcccga actgaaaaaa  | 120  |
| ccgggcgaaa ccgtgaaaa tagctgcaaa gcgagcggct atatttttac caactatggc  | 180  |
| atgaactggg tgaacacggc gccgggcaaa agctttaaat ggatgggctg gattaacacc | 240  |
| tataccggcg aaagcaccta tagcgcggat tttaaaggcc gctttgcgtt tagcctggaa | 300  |
|                                                                   |      |
| accagcgca gcaccgcgt tctgcataat aacgatctga aaaacgaaga taccgcgacc   | 360  |
| tatttttgcg cgcgagcgg cggtctatgat ccgatggatt attggggcca gggcaccagc | 420  |
| gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcgcgcgcg gcagcggcgg cggcggcagc | 480  |
| gatattgtgc tgaccagag cccggcgagc ctggcgggtga gcctgggcca gcgcgcgacc | 540  |
| attagctgcc gcgcgagca aagcgtggat aactatggca acacctttat gcattggtat  | 600  |
| cagcagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatttacc gcgcgagcaa cctggaaagc | 660  |
| ggcattccgg cgcgctttag cggcagcggc agccgcaccg attttaccct gaccattaac | 720  |
|                                                                   |      |
| ccggtggaag cggtatgagt ggcgacctat tattgccagc agagcaacga agatccgcgc | 780  |
| acctttggcg cgggcaccaa actggaactg aaagagagca agtacggccc tcctgcccc  | 840  |
| ccttgccctg cccccagtt cgagggcgga ccagcgtgt tcctgttccc ccccaagccc   | 900  |
| aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc  | 960  |
| caggaagatc ccaggtcca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc  | 1020 |
| aagaccaagc ccagagagga acagttccar agcacctacc gggtggtgtc tgtgctgacc | 1080 |
| tgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gcaagggtgc caacaagggc  | 1140 |
|                                                                   |      |
| ctgccagca gcatcgaata gaccatcagc aaggccaagg gccagcctcg cgagccccag  | 1200 |
| gtgtacacc tgctccctc ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc   | 1260 |
| ctggtgaagg gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct  | 1320 |
| gagaacaact acaagaccac cctcccgtg ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac  | 1380 |
| agccggctga ccgtggacaa gagccgggtg caggaaggca acgtctttag ctgcagcgtg | 1440 |
| atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag  | 1500 |
| atgttctggg tgctggtgt ggtgggcggg gtgctggcct gctacagcct gctggtgaca  | 1560 |
|                                                                   |      |
| gtggccttca tcattctttg ggtgcggagc aagcggagca gaggcggcca cagcgactac | 1620 |
| atgaacatga cccccagcg gcctggcccc acccggaagc actaccagcc ctacgcccc   | 1680 |
| cccagggact ttccgccta ccggtccggc ggagggcggg tgaagttag cagaagcgcc   | 1740 |
| gacgcccctg cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga | 1800 |

agggaagagt acgacgtcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggcaag 1860  
cctcggcgga agaaccacca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc 1920  
gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggaggc ggggcaaggg ccacgacggc 1980

ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcaggcc 2040  
ctgccccaa gg 2052

<210> 4  
<211> 2031  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> antisense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E+N297Q)  
construct

<400> 4

gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgca gctgccccac 60  
cccgcttttc tgctgatccc ccaggtgcag ctgcagcagc cgggcgcgga actggtgcgc 120  
ccgggcgcga gcgtgaaact gagctgcaaa gcgagcggct atacctttac cagctattgg 180

atgaactggg tgaacacgcg cccgatcag ggcttgaat ggattggccg cattgatccg 240  
tatgatagcg aaaccatta taaccagaaa tttaaagata aagcgattct gaccgtggat 300  
aaaagcagca gcaccgcgtat tatgcagctg agcagcctga ccagcgaaga tagcgcggtg 360  
tattattgcg cgcgcggcaa ctgggatgat tattggggcc agggcaccac cctgaccgtg 420  
agcagcggcg gcggcggcag cggcggcggc ggagcggcg gcggcggcag cgatgtgcag 480  
attaccaga gcccagcta tctggcggcg agcccggcg aaaccattac cattaactgc 540  
cgcgcgagca aaagcattag caaagatctg gcgtggtatc agggaaaacc gggcaaaacc 600

aacaaactgc tgatttatag cggcagcacc ctgcagagcg gcattccgag ccgctttagc 660  
ggcagcggca gcggcaccga ttttaccctg accattagca gcctggaacc ggaagatfff 720  
gcgatgtatt attgccagca gcataacaaa tatccgtata cctttggcgg cggcaccaaaa 780  
ctggaaatta aagagagcaa gtacggccct ccttgccccc cttgccctgc ccccagttc 840  
gagggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 900  
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagatcc cgaggccag 960  
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaaccca agaccaagcc cagagaggaa 1020

cagttcaara gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 1080  
aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaag 1140

accatcagca aggccaaagg ccagcctcgc gagccccagg tgtacaccct gcctccctcc 1200  
caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tggtaaggg cttctacccc 1260  
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcctg agaacaacta caagaccacc 1320  
cctcccgctgc tggacagcga cggcagcttc ttccctgtaca gccggctgac cgtggacaag 1380  
agccggtggc aggaaggcaa cgtcttttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1440

cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc ctgggcaaga tgttctgggt gctggtggtg 1500  
gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat catcttttgg 1560  
gtgcggagca agcggagcag aggcggccac agcgactaca tgaacatgac cccagacgg 1620  
cctggcccca cccggaagca ctaccagccc tacgcccac ccagggactt tgccgcctac 1680  
cggctcggcg gagggcgggt gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctaccagcag 1740  
ggccagaatc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagaa ggggaagagta cgacgtcctg 1800  
gataagcgga gaggcggga ccctgagatg ggccggcaagc ctggcgga gaacccccag 1860

gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc 1920  
atgaaggcg agcggaggcg gggcaaggcg cagcagggc tgtatcaggg cctgtccacc 1980  
gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgcccccaag g 2031

<210> 5

<211> 2052

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E) construct

<400> 5

cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacggggtg 60  
gggcggaaag acgactaggg ggtctaagtc gaccacgtct cgccgggcct tgactttttt 120

ggcccgtttt ggcactttta atcgacgttt cgctcgccga tataaaaatg gttgataccg 180  
tacttgacce actttgtccg cggcccgttt tcgaaattta cctaccgac ctaattgtgg 240  
atatggccgc ttctgtggat atcgcgcta aaatttccgg cgaaacgcaa atcggacctt 300  
tggtcgcgct cgtggcgcat agacgtataa ttgctagact ttttgccttct atggcgctgg 360  
ataaaaacgc gcgcgtcgcc gccgatacta ggctaccta taaccccggt cccgtggtcg 420  
cactggcact cgtcgccgcc gccgccgtcg ccgcccgcg cgtcgccgcc gccgccgtcg 480  
ctataacacg actgggtctc gggccgctcg gaccgccact cggacccggt cgcgcgctgg 540

taatcgacgg cgcgctcgct ttgcacctta ttgataccgt tgtggaaata cgtaaccata 600

gtcgtctttg gcccggtcgg cggctttgac gactaaatag cgcgctcgtt ggacctttcg 660  
ccgtaaggcc gcgcgaaatc gccgtcgccg tcggcgtggc taaaatggga ctggtaatg 720  
ggccaccttc gcctactaca ccgctggata ataacggtcg tctcgttgc tctaggcggc 780  
tggaaccgc gcccggtggt tgacctgac ttctctcgt tcatgccggg agggacgggg 840  
ggaacgggac gggggctcaa gctccgcct gggtcgcaca aggacaaggg ggggttcggg 900  
ttcctgtggg actactagtc ggctggggg ctccactgga cgcaccacca cctgcactcg 960

gtccttctag ggctccaggt caagtaacc atgcacctgc cgcaccttca cgtgttcgg 1020  
ttctggttcg ggtctctcct tgtcaagttg tcgtggatgg cccaccacag acacactgg 1080  
cacgactgg tctgaccga cttgccgttt cttatgttca cgttcacag gttgttccg 1140  
gacgggtcgt cgtagctttt ctggtagtcg ttccggttcc cggtcggagc gtcggggtc 1200  
cacatgtggg acggaggag ggctcttctc tactggttct tgggtccacag ggactggacg 1260  
gaccacttcc cgaagatggg gtcgtgtag cggcacctca cctctcgtt gccggtcgga 1320  
ctcttgttga tgttctggtg gggagggcac gacctgtcgc tgccgtcgaa gaaggacatg 1380

tcggccgact ggcacctgtt ctcggccacc gtcttccgt tgcagaaatc gacgtcgac 1440  
tacgtgctcc gggacgtgtt ggtgatgtgg gtcttctcgg actcggacag ggaccgttc 1500  
tacaagacc acgaccacca ccaccgccc cacgaccgga cgatgtcgga cgaccactgt 1560  
cacgggaagt agtagaaaac ccacgcctcg ttgcctcgt ctcgcccgt gtcgtgatg 1620  
tacttgtact gggggtctgc cggaccgggg tgggccttcg tgatggtcgg gatgcggggt 1680  
gggtccctga aacggcggat ggccaggccg cctccgccc acttcaagtc gtcttcgcg 1740  
ctgcggggac ggatggtcgt cccggtctta gtcgacatgt tgctcgactt ggaccgtct 1800

tcccttctca tgcgtcagga cctattgcc tctccgccc tgggactcta cccgccgttc 1860  
ggagccgct tcttgggggt cttccggac atattgcttg acgtctttct gttctaccg 1920  
ctccgatgt cgtctagcc gtacttccc ctcgcctccg cccggttccc ggtgctgccg 1980  
gacatagtc cggacaggtg gcggtggttc ctatggatgc tgcgggacgt gtacgtccg 2040  
gacgggggtt cc 2052

<210> 6

<211> 2031

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E) construct

<400> 6

cgatcgcggc gggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacggggtg 60  
gggcggaaag acgactaggg ggtccacgtc gacgtcgtcg gcccgcgct tgaccacgcg 120  
ggccccgcgt cgcactttga ctgcacgttt cgctcgccga tatggaaatg gtcgataacc 180  
tacttgacc acattgtcgc gggcctagtc ccggacctta cctaaccggc gtaactaggc 240  
atactatcgc tttgggtaat attggtcttt aaatttctat ttcgctaaga ctggcaccta 300  
ttttcgtcgt cgtggcgcat atacgtcgac tcgtcggact ggtcgcttct atcgcgccac 360  
ataataacgc gcgcgccgtt gacctacta ataaccccg tcccgtggtg ggactggcac 420

tcgtcgccgc cgccgccgtc gccgccgccg ccgtcgccgc cgccgccgtc gctacacgtc 480  
taatgggtct cgggctcgat agaccgccgc tcgggccgc tttggtaatg gtaattgacg 540  
gcgcgctcgt tttcgtaatc gtttctagac cgacccatag tcctttttgg cccgttttgg 600  
ttgtttgacg actaaatc gccgtcgtgg gacgtctcgc cgtaaggctc ggcgaaatcg 660  
ccgtcgccgt cgccgtggct aaaatgggac tggtaatcgt cggaccttgg ctttctaaaa 720  
cgctacataa taacggtcgt cgtattgttt ataggcatat ggaaaccgcc gccgtggttt 780  
gacctttaat ttctctcgtt catgccggga gggacggggg gaacgggacg ggggctcaag 840

ctccgcctg ggtcgcaaa ggacaagggg gggttcgggt tcctgtggga ctactagtcg 900  
gcctgggggc tcactggac gcaccaccac ctgcactcgg tccttctagg gtcacagtc 960  
aagttaacca tgcacctgcc gcaccttcac gtgttgccgt tctggttcgg gtctctctt 1020  
gtcaagtgt cgtggatggc ccaccacaga cagcactggc acgacgtggt cctgaccgac 1080  
ttgccgtttc ttatgttcac gtccacagg ttgttcccgg acgggtcgtc gtagcttttc 1140  
tggtagtcgt tccggttccc ggtcggagcg ctcggggtcc acatgtggga cggaggagg 1200  
gtccttctct actggttctt ggtccacagg gactggacgg accacttccc gaagatgggg 1260

tcgtgtagc ggcacctcac cctctcgttg ccggtcggac tcttgttgat gttctggtg 1320  
ggagggcacg acctgtcgt gccgtcgaag aaggacatgt cggccgactg gcacctgttc 1380  
tcggccaccg tccttcggt gcagaaatcg acgtcgact acgtgctccg ggacgtgtg 1440  
gtgatgtggg tcttctcgga ctggacagg gaccttctt acaagacca cgaccaccac 1500  
caccgcccc acgaccggac gatgtcggac gacctgtc accggaagta gtagaaaacc 1560  
cacgcctcgt tcgcctcgt tccgccgtg tcgtgatgt acttgactg ggggtctgcc 1620  
ggaccgggtt gggccttct gatggtcggg atcggggtg ggtccctgaa acggcggtg 1680

gccaggccgc ctccgccca cttcaagtcg tcttcgccc tgcggggacg gatggtcgtc 1740  
ccggtcttag tcgacatgt gtcgacttg gaccttctt ccttctcat gctgcaggac 1800  
ctattcgct ctccggcctt gggactctac ccgccgttc gagccgctt cttgggggtc 1860



cttccggaca tattgcttga cgtctttctg ttctaccggc tccggatgic gctctagccg 1920  
tacttcccgc tgcctccgc cccgttcccg gtgctgccgg acatagtccc ggacaggtgg 1980  
cgggtggttc tatggatgct gcgggacgtg tacgtccggg acgggggttc c 2031

<210> 7

<211> 2052

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E+N297Q)  
construct

<400> 7

cgatcgggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacggggtg 60  
ggcggaag acgactagg ggtctaagtc gaccacgtct cgccgggcct tgactttttt 120  
ggcccgttt ggcactttta atcgacgttt cgctcgccga tataaaaatg gttgataccg 180  
tacttgacc actttgtccg cgcccgttt tcgaaattta cctaccgac ctaattgtgg 240  
atatggccgc ttctgtgat atcgcgctta aaatttccgg cgaaacgaa atcgacatt 300  
tggtcgcgt cgtggcgcat agacgtataa ttgctagact ttttcttct atggcgtgg 360

ataaaaacgc gcgcgtgcc gccgatacta ggctacctaa taaccccggt cccgtggtcg 420  
cactggcact cgtcgccgc gccgcgtcg ccgccgcgc cgtcgccgc gccgcgtcg 480  
ctataacacg actgggtctc gggccgctcg gaccgccact cggaccgggt cgcgcgtgg 540  
taatcgacgg cgcgctcgt ttgcacctta ttgataccgt tgtggaaata cgtaaccata 600  
gtcgtctttt gcccgttcgg cggtttgac gactaaatag cgcgctcgtt ggacatttcg 660  
ccgtaaggcc gcgcgaaac gccgtcgccg tcggcgtggc taaaatggga ctggtaatg 720  
ggccaccttc gcctactaca ccgtggata ataacggtcg tctcgttct tctaggcggc 780

tggaaaccgc gcccggtgtt tgacctgac ttctctcgt tcatgccggg agggacgggg 840  
ggaacgggac gggggctcaa gctccgcct gggtcgaca aggacaagg ggggttcggg 900  
ttctgtggg actactagtc ggcctggggg ctccactgga cgcaccacca cctgcactcg 960  
gtcttctag ggtccagggt caagttaacc atgcacctgc cgcacctta cgtgttcgg 1020  
ttctggttcg ggtctctct tgtcaaggty tcgtggatgg cccaccacag acacactgg 1080  
cacgacgtgg tctgaccga cttgccgttt cttatgttca cgttcacag gttgttccc 1140  
gacgggtcgt ctagctttt ctggtagtcg ttccggttc cggtcggagc gtcggggtc 1200

cacatgtggg acggaggag ggtccttct tactggttct tggtcacag ggactggacg 1260

gaccacttcc cgaagatggg gtcgctgtag cggcacctca ccctctcggt gccggtcgga 1320  
ctcttgttga tgttctgggt gggaggggcac gacctgtcgc tgccgtcgaa gaaggacatg 1380  
tcggccgact ggcacctgtt ctggcccacc gtccttcctg tgcagaaatc gacgtcgcac 1440  
tacgtgctcc gggacgtgtt ggtgatgtgg gtcttctcgg actcggacag ggacccgttc 1500  
tacaagacc acgaccacca ccaccgccc caccgaccga cgatgtcgga cgaccactgt 1560  
cacggaagt agtagaaaac ccacgcctcg ttcgcctcgt ctccgccggt gtcgctgatg 1620

tacttgactt gggggtctgc cggaccgggg tgggccttcg tgatggtcgg gatgcggggt 1680  
gggtccctga aacggcggat ggccaggccg cctcccgccc atttcaagtc gtcttcgagg 1740  
ctgccccgac ggatggctgt cccggtctta gtcgacatgt tgctcgactt ggacccgtct 1800  
tcccttctca tgctgcagga cctattcgcc tctccggccc tgggactcta cccgccgttc 1860  
ggagccgctt tcttgggggt ccttcgggac atattgcttg acgtctttct gttctaccgg 1920  
ctccggatgt cgctctagcc gtacttcccg ctgcctccg ccccgttccc ggtgctgccg 1980  
gacatagtc cggacagggt gcggtgggtc ctatggatgc tgcgggacgt gtacgtccgg 2040

gacgggggtt cc 2052

<210> 8

<211> 2031

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E+N297Q)

construct

<400> 8

cgatcgccgc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacggggtg 60  
gggcggaaag acgactaggg ggtccacgtc gacgtcgtcg gcccgcgcct tgaccacgcg 120  
ggcccgcgct cgcactttga ctgacgttt cgctcgccga tatggaaatg gtcgataacc 180  
tacttgacct actttgtcgc gggcctagtc ccggacctta cctaaccggc gtaactaggc 240

atactatcgc ttgggtaat attggtcttt aaatttctat ttcgctaaga ctggcaccta 300  
ttttcgtcgt cgtggcgcat atacgtcgac tcgtcggact ggtcgcttct atcgccccac 360  
ataataacgc gcgcgccgtt gacctacta ataaccgccg tcccgtgggt ggactggcac 420  
tcgtcgccgc cggcccgctc gccgcccgcc ccgtcgccgc cggcccgctc gctacacgtc 480  
taatgggtct cgggctcgat agaccgccgc tcggggccgc ttgggtaatg gtaattgacg 540  
gcgcgctcgt ttctgtaatc gtttctagac cgcaccatag tcctttttgg cccgttttgg 600

ttgtttgacg actaaatata gccgtcgtgg gacgtctcgc cgtaaggctc ggcgaaatcg 660

ccgtcgcctg cgcctgggtt aaaatgggac tggtaatcgt cggaccttgg ccttctaaaa 720

cgctacataa taacggtcgt cgtattgttt ataggcatat ggaaaccgcc gccgtggttt 780

gacctttaat ttctctcgtt catgccggga gggacggggg gaacgggacg ggggctcaag 840

ctccgcctg ggtgcacaa ggacaagggg gggttcgggt tctgtggga ctactagtcg 900

gcctgggggc tcactggac gcaccaccac ctgcactcgg tcttctagg gctccaggtc 960

aagttaacca tgcacctgcc gcaccttcac gtgttcgggt tctggttcgg gtctctcctt 1020

gtcaagttyt cgtggatggc ccaccacaga cagcactggc acgacgtggt cctgaccgac 1080

ttgccgtttc ttatgttcac gtccacagg ttgttcccgg acgggtcgtc gtagcttttc 1140

tggtagtcgt tccggttccc ggtcggagcg ctcggggtcc acatgtggga cggaggagg 1200

gtcttctct actggttctt ggtccacagg gactggacgg accacttccc gaagatgggg 1260

tcgctgtagc ggacctcac cctctcgttg ccggtcggac tcttgtgat gttctggtgg 1320

ggagggcacg acctgtcgt gccgtcgaag aaggacatgt cggccgactg gcacctgttc 1380

tcggccaccg tcttccgtt gcagaaatcg acgtgcact acgtgctccg ggacgtgttg 1440

gtgatgtggg tcttctcgga ctggacagg gacccgttct acaagacca cgaccaccac 1500

cacccgccc acgaccggac gatgtcggac gaccactgtc accggaagta gtagaaaacc 1560

cacgcctcgt tcgcctcgtc tccgccgttg tcgctgatgt acttgtactg ggggtctgcc 1620

ggaccggggt ggccttctgt gatgtcggg atgcgggttg ggtccctgaa acggcggatg 1680

gccaggccgc ctccgccca cttaagtcg tcttcgggc tgcggggacg gatggtcgtc 1740

ccggtcttag tcgacatgtt gctcgacttg gacccgtctt cccttctcat gctgcaggac 1800

ctattgcct ctccggcctt gggactctac ccgccgttc gagccgcctt cttgggggtc 1860

cttccggaca tattgcttga cgtctttctg ttctaccggc tccgatgtc gctctagccg 1920

tacttcccgc tcgcctccgc cccgttccc gtgctgccg acatagtccc ggacaggtgg 1980

cggtaggttc tatggatgct gcgggacgtg tacgtccgg acgggggttc c 2031

<210> 9

<211> 679

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the 32716CAR(S228P+L235E) construct

<400> 9

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 Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| Lys Ser Phe Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro 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  
 305 310 315 320  
 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 Lys 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  
 385 390 395 400  
 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 Met  
 485 490 495  
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

500 505 510  
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser

515 520 525  
Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly  
530 535 540

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

Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp  
565 570 575

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn  
580 585 590

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg  
595 600 605

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

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

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

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

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
675

<210> 10

<211> 672

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the 26292CAR(S228P+L235E) construct

<400> 10

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 Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu

20                                      25                                      30  
 Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
  
 35                                      40                                      45  
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp  
 50                                      55                                      60  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr  
 65                                      70                                      75                                      80  
 His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys  
 85                                      90                                      95  
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
  
 100                                      105                                      110  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly  
 115                                      120                                      125  
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 130                                      135                                      140  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg  
  
 165                                      170                                      175  
 Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro  
 180                                      185                                      190  
 Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser  
 195                                      200                                      205  
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 210                                      215                                      220  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys  
  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Gln Gln His Asn Lys Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 245                                      250                                      255  
 Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 260                                      265                                      270

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
275 280 285

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
290 295 300

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
305 310 315 320

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
325 330 335

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
340 345 350

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
355 360 365

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
370 375 380

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr  
385 390 395 400

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
405 410 415

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
420 425 430

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
435 440 445

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe  
450 455 460

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
465 470 475 480

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val  
485 490 495

Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile  
500 505 510

Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr



515 520 525  
Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln

530 535 540  
Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly

545 550 555 560  
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

565 570 575  
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

580 585 590  
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

595 600 605  
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

610 615 620  
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

625 630 635 640  
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

645 650 655  
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

660 665 670

<210> 11

<211> 679

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) construct

<400> 11

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 Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu

20 25 30

Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly

50

55

60

Lys Ser Phe Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser

65

70

75

80

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr

85

90

95

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp

100

105

110

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp

115

120

125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

130

135

140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met

180

185

190

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

195

200

205

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

210

215

220

Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp

225

230

235

240

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro 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                      320  
 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 Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
                          340                      345                      350  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 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                      400  
 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 Met  
                          485                      490                      495  
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
  
 500                      505                      510  
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser  
                          515                      520                      525  
 Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly  
                          530                      535                      540

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala  
 545 550 555 560  
 Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp

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

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

<210> 12

<211> 672

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) construct

<400> 12

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Gln Gln His Asn Lys Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
305 310 315 320

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
325 330 335

Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
340 345 350

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
355 360 365

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
370 375 380

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr  
385 390 395 400

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
405 410 415

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
420 425 430

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
435 440 445

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe  
450 455 460

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
465 470 475 480

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val  
485 490 495

Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile  
500 505 510

Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr  
515 520 525

Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln  
530 535 540

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

545                      550                      555                      560  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
                          565                      570                      575  
  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                          580                      585                      590  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
                          595                      600                      605  
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
                          610                      615                      620  
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 625                      630                      635                      640  
  
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
                          645                      650                      655  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                          660                      665                      670  
  
 <210> 13  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
  
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1                      5                      10                      15  
 Leu 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                                                             |     |     |     |