(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0120362
(43) 공개일자 2023년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2887 (2013.01)
A61K 39/0005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0016838
(22) 출원일자 2022년02월09일
심사청구일자 2022년02월09일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김형수
서울특별시 강남구 선릉로 69길 20, 109동 206호(역삼동, 역삼e편한세상)
김정한
서울특별시 양천구 목동서로 70, 215동 604호(목동, 목동신시가지아파트2단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인본

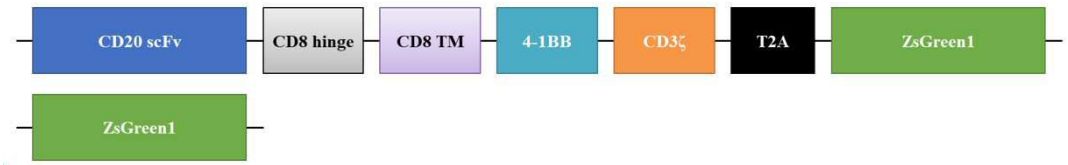
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **항-CD20을 포함하는 키메릭 항원 수용체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 항-CD20에 관한 것으로, 구체적으로는 항-CD20을 포함하는 키메릭 항원 수용체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)
C12N 2501/515 (2013.01)
(72) 발명자
박성택
서울특별시 서초구 신반포로16길 15-20, 102동 1103호(반포동, 반포힐스테이트)
정수영
서울특별시 성동구 무학봉길 35, 101동 704호(하왕십리동, 왕십리KCC스위첸)
이재준
강원도 춘천시 삭주로 77 본관 10층 병원장실
구본욱
서울특별시 구로구 오리로17길 63, b02호(궁동, 별장빌라2차)

명 세 서

청구범위

청구항 1

항-CD20을 포함하는 키메릭 항원 수용체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 키메릭 항원 수용체는 인간화된 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 3의 가변경쇄영역을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 5의 가변중쇄영역을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 6의 힌지영역을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 7의 막관통영역을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 8 및 서열번호 9로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

항-CD20을 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 면역 세포에 형질감염 시키는 단계; 및

상기 면역 세포와 CD20을 발현하는 세포를 공배양하는 단계;를 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 면역 세포는 CD3, CD28 및 IL-2를 포함하는 조성물에 의해 활성화된 것인, 제조 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

mFruits 및 luciferase를 발현하는 표적 세포주에 의해 상기 면역 세포의 세포독성을 확인하는 단계를 더 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 14

항-CD20를 세포표면에 발현하는 하이브리도마.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항-CD20을 포함하는 키메릭 항원 수용체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] B-림프구 항원 CD20은 33-37kDa의 분자량을 갖는 글리코실화되지 않은 인단백질(phosphoprotein)이고, pre-B 세포 단계에서 시작하여 B-세포의 표면에서 발현되며, 말단 분화 형질모세포 및 형질 세포에서 소실된다. B 세포 악성 종양에서 CD20 발현 정도는 매우 다양하며 일반적으로 CLL 환자에서 가장 낮은 CD20 발현이 관찰되고 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL) 및 털세포 백혈병에서 가장 높은 CD20 세포 표면 발현이 관찰되므로, 악성 B 세포에서 CD20의 발현은 매력적인 치료 표적이 된다.

[0003] CD20 양성 B세포 악성종양 환자의 예후는 1990년대에 재조합 키메라 쥐/인간 I형 항-CD20 단클론항체 리툭시맙(Rituximab)이 도입된 이후로 개선되었다. 리툭시맙은 보체 의존성 세포독성(CDC) 및 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 촉진한다. 리툭시맙 단독요법은 재발된 DLBCL에서 30-40%의 반응률을 보이나, CHOP 요법에 리툭시맙을 추가하면 DLBCL 환자의 예후가 유의하게 개선된다. 리툭시맙 요법이 B 세포 악성 종양 환자에게 훨씬 더

나은 결과를 가져왔지만 상당한 비율의 환자가 재발성 또는 불응성 질환을 경험한다. 리툭시맙 내성의 정확한 기전은 완전히 이해되지 않았지만 i) CDC 및 ADCC에 대한 내성, ii) 세포자멸사에 대한 내성, iii) CD20의 하향 조절, 돌연변이 또는 손실 등이 내성의 가능한 기전으로 제안되어 왔다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2020-0071079호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기한 실정을 고려하여, CD20을 표적으로 하고, 세포독성이 극대화된 CAR-T 세포 요법을 제공할 수 있다.

[0006] 본 발명은 한림대학교 의료원 산학협력단의 연구과제(과제고유번호 : HURF-2019-26)의 지원으로 완성되었다.

[0007] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 의하면, 항-CD20을 포함하는 키메릭 항원 수용체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0009] 또한 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 인간화된 것일 수 있다.

[0010] 또한 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 3의 가변경쇄영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0011] 또한 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 5의 가변중쇄영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 6의 힌지영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0013] 또한 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 7의 막관통영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 8 및 서열번호 9로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 항-CD20을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터에 관한 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 발현 벡터를 면역 세포에 형질감염 시키는 단계; 및 상기 면역 세포와 CD20을 발현하는 세포를 공배양하는 단계;를 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법에 관한 것일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명에서, 상기 면역 세포는 CD3, CD28 및 IL-2를 포함하는 조성물에 의해 활성화된 것일 수 있다.

[0020] 또한 본 발명에서, mFruits 및 luciferase를 발현하는 표적 세포주에 의해 상기 면역 세포의 세포독성을 확인하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 항-CD20를 세포표면에 발현하는 하이브리도마에 관한 것일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 림프종 및 기타 CD20 양성 종양의 예방 또는 치료를 위해 제공될 수 있다.

[0023] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로

부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 실시예에 있어서, CAR-T 구축을 위한 도메인을 나타낸 이미지이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 있어서, 형질도입된 세포주에서 CAR 발현 여부를 확인하기 위하여, 유세포 분석을 수행한 것이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 있어서, CD20CAR-T 세포의 치료 효능을 평가하기 위하여, 시험관 내(in vitro)에서 항종양 효과를 확인한 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 있어서, CD20CAR-T 세포의 치료 효능을 평가하기 위하여, 시험관 내(in vitro)에서 항종양 효과를 확인한 것이다.

도 5는 본 발명의 실시예에 있어서, 사멸 분석에서 배양 상청액을 수집한 후 상청액에 분비된 사이토카인에 대하여 효소-잉크 면역흡착 분석(ELISA)을 통해 정량화한 것이다.

도 6은 본 발명의 실시예에 있어서, 세포용해 활성을 확인하기 위하여, T 세포의 과립 내부에서 발견되는 LAMP-1이라고도 알려진 탈과립 마커 CD107a를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0026] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0027] 본 발명에서, 상기 “암”은 변종 세포의 신속하고 제어되지 않은 성장을 특징으로 하는 질병으로서, 흑색종, 나팔관암, 뇌암, 소장암, 식도암, 임파선암, 담낭암, 혈액암, 갑상선암, 내분비선암, 구강암, 간암, 담도암, 대장암, 직장암, 자궁경부암, 난소암, 신장암, 위암, 십이지장암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 갑상선 미분화암, 자궁암, 결장암, 방광암, 요관암, 췌장암, 뼈/연부조직 육종, 피부암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 골수이형성증후군, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 고립성 골수종으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있다.

[0028] 본 발명에서, 상기 암은 CD20을 발현하는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 본 발명에 기재된 질환들의 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 상기 열거된 질환들의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명에서, "약학적 조성물"은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사

용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0033] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001mg/kg 내지 50mg/kg 또는 0.001mg/kg 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있고 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 “개체”란, 본 발명이 예방 또는 치료하고자 하는 질환에 대하여 예방 또는 치료가 필요한 개체로서, 포유동물 및 비-포유동물을 모두 포함할 수 있다. 여기서, 상기 포유동물의 예로는 인간, 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 또는 기니아 피그 등을 포함할 수 있으나, 본 발명의 목적 상 상기 개체는 인간, 개 또는 고양이일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 “투여”란, 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 유효성분을 도입하는 과정을 의미하는 것으로서, 본 발명의 상기 치료 방법에서 투여 방법은 피부를 통해 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0037] 본 발명의 목적상, 목적하는 개체에 대한 구체적인 약학적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 상기 유효성분을 포함하는 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 상기 유효성분을 포함하는 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명에서, 상기 조성물은 세포 치료제일 수 있고, 상기 세포 치료제란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식 또는 선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 이러한 세포 치료제는 크게 두 분야로 분류할 수 있으며 그 첫 번째는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 줄기세포 치료제이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 면역 세포 치료제로 분류할 수 있다.

[0039] 본 발명의 세포 치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여의 경우 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여 및 피내 투여에서 선택된 어느 하나 이상을 제한없이 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구현 예에 따르면,

[0041] 항-CD20을 포함하는 키메릭 항원 수용체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0042] 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 인간화된 것일 수 있다.

[0043] 본 발명에서, 상기 항원은 "단일 사슬 항체", "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv"는 링커에 의해 연결된 항체 중쇄 가변 도메인(또는 영역; VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(또는 영역; VL)을 포함하는 분자일 수 있다. 이러한 scFv 분자는 다음과 같은 일반 구조를 가질 수 있다: NH2-VL-링커-VH-COOH 또는 NH2-VH-링커-VL-COOH.

[0044] 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 하기 표 1과 같이 나타낼 수 있는 서열번호 2 내지 9의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

표 1

[0045]

서열번호	항목	아미노산 서열
1	CD20	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLL MIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILN IKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAG IVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEEETETNFP EPPQDQESSPIENDSSP
2	Leader	MALPVTALLLPLALLLHAARP
3	Light chain variable lesion	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
4	Linker	GGGGSGGGGSGGGGS
5	Heavy chain variable lesion	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA
6	Hinge	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
7	Transmembrane domain	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
8	41-BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
9	CD3z	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0046] 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 3의 가변경쇄영역을 포함하는 것일 수 있고, 상기 가변경쇄영역은 V_L로 나타낸 것일 수 있다.

[0047] 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 5의 가변중쇄영역을 포함하는 것일 수 있고, 상기 가변경쇄영역은 V_H로 나타낸 것일 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 6의 힌지영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 7의 막관통영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0050] 본 발명에서, 상기 키메릭 항원 수용체는 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 8 및 서열번호 9로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면,

[0052] 본 발명에 따른 항-CD20을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것일 수 있다.

[0053] 본 발명에서, 상기 "핵산 분자"는 DNA 분자와 RNA 분자를 지칭한다. 핵산 분자는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있으며, 바람직하게는 이중가닥 DNA이다. 핵산은 다른 핵산 서열과 작용적인 관계에 있을 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들면, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 줄 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0054] 본 발명에서, 나머지 생략된 것들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0055] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면,

[0056] 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터에 관한 것일 수 있다.

[0057] 본 발명에서, 발현 벡터는 외래 유전자를 세포로 전달하여 발현할 수 있는 수단으로, 본 발명의 상기 벡터는 플라스미드(plasmids), 코스미드(cosmids), 인공 염색체(artificial chromosomes), 리포솜(liposomes)과 같은 비바이러스성 벡터이거나, 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노-관련 바이러스(Adenovirus-associated virus; AAV)와 같은 바이러스성 벡터일 수 있으며, 바람직하게는 리포솜(liposomes)

또는 렌티바이러스일 수 있다.

[0058] 본 발명에서 상기 “플라스미드(plasmids)”는 염색체와 분리되어 있고 자신의 복제기점을 소유하여 독립적으로 증식 가능한 에피솜 DNA 분자이다. 상기 플라스미드는 제한효소에 의해 재조합된 후 숙주 세포에 전달되어 벡터의 기능을 할 수 있다.

[0059] 본 발명에서 상기 “코스미드(cosmids)”는 파이 파지의 점착성 말단(cohesive ends)인 cos 부위를 이용한 플라스미드로, 삽입할 수 있는 유전자의 크기가 커서 유전자 라이브러리를 만드는데 주로 사용된다.

[0060] 본 발명에서 상기 “인공 염색체(artificial chromosomes)”는 벡터로 사용하기 위하여 인위적으로 구조를 변화시킨 염색체로, 박테리아 인공염색체, 효모 인공염색체, 인간 인공염색체 등이 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 “리포솜(liposomes)”은 인위적으로 만든 1개 이상의 지질 2중층으로 되어 있는 소낭 구조물로, 세포막의 형태와 유사하고 다양한 물질을 혼입하는 능력 때문에 핵산뿐만 아니라 펩티드, 항체, 앱타머 등을 전달하는 약물 운반체 시스템이다. 상기 리포솜의 효능은 막과 성분의 특성에 따른 표적 전달 및 침투 능력에 달려 있다.

[0062] 본 발명에서 상기 “레트로바이러스(retrovirus)”는 역전사(reverse transcription)를 통한 DNA 중간체를 필수로 하는 단일가닥의 양성 센스(positive-sense) RNA를 게놈으로 가지는 바이러스로, 레트로바이러스 벡터는 숙주 세포의 염색체에 삽입되어 세포분열을 하여도 바이러스 벡터가 안정적으로 유지되므로 유전자 치료에 많이 사용된다.

[0063] 본 발명에서, 상기 “렌티바이러스(Lentivirus)”는 레트로바이러스의 일종으로, 숙주에 내인성인 바이러스(endogenous retrovirus; ERV)이다. 비리온 입자는 약간 다형성의 직경 80 내지 100nm 구형이고, 뉴클레오캡시드(코어)는 등척성이며, 뉴클레오티드는 동심 막대 형상 또는 원추 형상이다.

[0064] 본 발명에서 상기 “아데노바이러스(Adenovirus)”는 약 36kb DNA를 가지는 바이러스로, 50가지 이상의 유전자를 가지고 있어 몇 가지의 바이러스 유전자를 발현하려는 유전자로 치환하여 벡터를 생성할 수 있다.

[0065] 본 발명에서 상기 “아데노바이러스-관련 바이러스(Adenovirus-associated virus; AAV)”는 DNA 유전체가 매우 작고, 아데노바이러스가 필요한 인공위성바이러스(Satellite virus)로, 벡터로 사용할 경우 사람 염색체의 특정한 부위에 삽입되어 잠복감염(latent infection)을 일으킨다.

[0066] 본 명세서에서, “형질감염(transfection)” 내지 형질주입은 “형질도입(transduction)”과 혼용해서 사용될 수 있고, 세포에 핵산을 주입하는 것을 의미한다.

[0067] 본 발명에서, 상기 형질감염은 유전자총(gene gun), 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation) 또는 리포펙션(lipofection)의 방법에 의할 수 있다.

[0068] 본 발명에서 상기 “유전자총(gene gun, particle bombardment gun)”은 적당한 크기의 유전물질을 적정 속도로 가속시켜 살아 있는 세포 내로 생물학적인 물질을 도입하는 방법이다.

[0069] 본 발명에서 상기 “미세주입법(microinjection)”은 현미주입법 혹은 미량주입법이라고 하며 세포 또는 핵 등에 극미량의 유전물질, 단백질 또는 리포솜 등의 고분자 물질을 주입하는 방법이다.

[0070] 본 발명에서 상기 “전기천공법(electroporation)”은 세포를 DNA용액에 현탁한 후 직류고전압의 펄스를 통과시켜 세포 내에 DNA를 도입시키는 방법이다.

[0071] 본 발명에서 상기 “리포펙션(Lipofection)”은 리포솜 형질주입(liposome transfection)이라고도 하며, 리포솜을 통해 세포에 유전자 물질을 주입하는 데 사용되는 기술로, 약간의 열 충격으로 세포를 처리하여 효율을 높일 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명에서는 상기 벡터에 삽입된 유전자의 정제를 용이하게 하기 위하여 태그 서열을 상기 벡터 상에 삽입하여 융합시킬 수 있다. 상기 태그로는 헥사-히스티딘 태그, 헤마글루티닌 태그, myc 태그 또는 flag 태그를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니며 당업자에게 알려진 정제를 용이하게 하는 태그는 모두 본 발명에서 이용 가능하다.

[0073] 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주 세포로 하여 구축될 수 있고, 상기 숙주 세포는 면역세포인 것일 수 있다.

[0074] 본 발명에서, 나머지 생략된 것들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0075] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면,

[0076] 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것일 수 있다.

[0077] 본 발명에서, 나머지 생략된 것들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0078] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면,

[0079] 발현 벡터를 면역 세포에 형질감염 시키는 단계; 및 상기 면역 세포와 CD20을 발현하는 세포를 공배양하는 단계;를 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법에 관한 것일 수 있다.

[0080] 본 발명에서, 상기 면역 세포는 CD3, CD28 및 IL-2를 포함하는 조성물에 의해 활성화된 것일 수 있다.

[0081] 본 발명에서, 상기 제조 방법은 mFruits 및 luciferase를 발현하는 표적 세포주에 의해 상기 면역 세포의 세포 독성을 확인하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 mFruits은 mCherry일 수 있고, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한 상기 luciferase는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

표 2

[0082]

서열 번호	항목	아미노산 서열
10	mCherry	MVSKGEEDNM AIIKEFMRFK VHMEGSVNGH EFEIEGEGEG RPYEGTQTAK LKVTKGGPLP FAWDILSPQF MYGSKAYVKH PADIPDYLKL SFPEGFKWER VMNFEDGGVV TVTQDSSLQD GEFIYKVKLR GTNFPSDGPV MQKKTMGWEA SSERMYPEDG ALKGEIKQRL KLKDGGHYDA EVKTTYKAKK PVQLPGAYNV NIKLDITSHN EDYTIVEQYE RAEGRHSTGG MDELYK
11	luciferase	MTSKVYDPEL RKRMITGPQW WARCKQMNVL DSFINYYDSE KHAENAVIFL HGNAASSYLW RHVVPHVEPV ARCIIPDLIG MGKSGKSGNG SYRLLDHYKY LTEWFKHLNL PKKIIFVGHD WGACLAFHYC YEHQDRIKAV VHAESVVDVI ESWDEWPDIE EDIALIKSEE GEKMVLENNF FVETMLPSKI MRKLEPEEFA AYLEPFKEKG EVRRPTLSWP REIPLVKGGK PDVVEIVRNY NAYLRASHDL PKMFIESDPG FFSNAIVEGA KKFPNTEFVK VKGLHFSQED APDEMGNYIKSFVERVLKNE Q

[0083] 본 발명에서, 나머지 생략된 것들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0084] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면,

[0085] 항-CD20를 세포표면에 발현하는 하이브리도마에 관한 것일 수 있다. 상기 하이브리도마를 제조하는 공지된 방법에 의할 수 있다.

[0086] 본 발명에서, 나머지 생략된 것들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0087] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0088] **1. 실시예**

[0089] 1.1. 재조합 렌티바이러스 벡터의 구축

[0090] 도 1의 도메인 구조를 가지는 CAR-T 구축을 위하여, 재조합 렌티바이러스 벡터를 구축하였다. CD20-CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터 플라스미드는 CD20에 특이적인 단일클론 항체(rituximab)의 단일 사슬 가변 단편과 41-BB 및 CD3ζ 사슬의 세포내 신호전달 도메인, 녹색 형광 단백질(GFP)로 구성되었다. 테사 아시그나 바이러스

2A(*Thosea asigna* virus 2A; T2A) 펩타이드에 대한 서열로 분리된 루시퍼라제 및 적색 형광 단백질(mCherry)을 발현하도록 설계된 렌티바이러스 벡터 플라스미드를 작제하였다.

[0091] 1.2. 293T 세포를 이용한 렌티바이러스 생산

[0092] 렌티바이러스는 형질감염된 HEK-293T 세포에서 생산되었으며, 상기 형질감염은 렌티바이러스 벡터 플라스미드, pMDLg/pRRE, pRSV-Rev 및 pMD2.G 패킹 플라스미드(Addgene)을 폴리에틸렌이민(PEI, Sigma-Aldrich, St Louis, MO)을 사용하여 2:1:1:1 비율로 혼합되어 수행되었다. 상기 형질감염 48시간 및 72시간 후에 바이러스 상청액을 수거하고 0.45μm PES 필터를 통해 여과하였다. 바이러스를 4℃에서 90분 동안 75,000 x g에서 초원심분리하여 농축하고 -80℃에서 보관하였다. 상기 과정을 통하여 CD20-CAR 또는 luciferase-mCherry를 암호화하는 렌티바이러스가 생산되었다.

[0093] 1.3. CD20CAR-T 세포의 생성

[0094] 건강한 기증자의 전혈에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 Ficoll-Paque(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하고, TexMACS 배지(Miltenyi Biotec, Auburn, USA)에서 배양했다. PBMC는 T Cell TransAct™Biotec, Auburn, USA) 및 20 IU/mL IL-2(Human IL-2 IS 프리미엄 등급, Miltenyi Biotec, Auburn, USA)로 3일 동안 활성화되었다. 활성화된 T 세포를 10 μg/mL 황산프로타민(Sigma-Aldrich) 및 100 IU/mL IL-2의 존재 하에 37℃에서 4시간 동안 50 μL 농축된 CD20-CAR-인코딩 렌티바이러스 또는 모의 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입은 24시간 후에 반복하였다. 2-4주 확장 후, 세포를 수집하고 PE 항-인간 CD3(BioLegend), PerCP 항-인간 CD4(BioLegend) 및 APC 항-인간 CD8α(BioLegend)로 염색하였다. 이후 cytoFLEX(Beckmann)를 사용하여 유세포 분석을 수행했다.

[0095] 1.4. 표적 세포주

[0096] B-세포 림프종 세포주(daudi 및 ramos)를 10% 우태아혈청(FBS) 및 피루브산(pyruvate)이 보충된 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 벡터 패키징 세포주 HEK-293T는 10% FBS가 보충된 Dulbecco의 Modified Eagle Medium(DMEM)에서 배양되었다. Daudi 및 ramos 세포주는 lentiviral vector를 사용하여 luciferase와 mCherry를 발현하도록 변형되었다.

[0097] 1.5. 인터페론-γ, IL-2 및 TNF-α ELISA

[0098] CD20CAR-T 세포 및 GFP-T 세포(2.5×10^5)를 20:1 비율로 표적 세포와 밤새 공동 배양했다. 상등액을 수집하고 ELISA 키트(DuoSet®R&D system)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 IFN-γ IL-2 및 TNF-α의 농도를 측정하기 위해 ELISA를 수행하였다.

[0099] 1.6. 체외 세포 사멸 분석에서 생물 발광 루시퍼라제 리포터

[0100] 또한 루시퍼라제를 발현하도록 변형된 표적 세포(Daudi 및 Ramos)를 72시간 동안 CD20CAR-T 세포 또는 GFP-T 세포와 공동 배양하였다. 형질도입된 T 세포와 표적 세포(1×10^4)를 1:1, 2:1, 4:1 또는 8:1의 비율로 96웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 생존 가능한 표적 세포로부터의 루시퍼라제 발현은 제조사의 지침에 따라 One-Glo Luciferase Assay System(Promega) 및 발광측정기(Wallac Victor 2 Multi-label Counter, Perkin Elmer, Waltham, MA)를 사용하여 분석되었다. T 세포에 노출되지 않은 표적 세포의 루시퍼라제 활성을 100% 세포 생존율로 설정하였다.

[0101] 1.7. T 세포 증식 분석

[0102] CD20CAR-T 세포 및 GFP-T 세포를 PBS 중 5uM의 Cell Trace Far Red(Invitrogen)로 37℃에서 20분 동안 표지하

였다. T 세포를 세척하고, 1 x 10^5 세포를 동일한 양의 표적 세포(Daudi)와 공동 배양하였다. 1일째에 저용량 IL-2(10IU/mL)를 배지에 첨가하였다. 표지된 세포를 수확하고, 5일째에 각 세포 분열에 따른 염료 희석을 검출하기 위해 유세포 분석을 수행하였다.

[0103] 1.8. 유세포 분석 기반 CD107a 탈과립 분석

[0104] CD20-CAR-T 세포 및 Mock T 세포(2.5 x 10^5)를 16시간 동안 96웰 플레이트에서 25:1 비율로 표적 세포와 공동 배양하였다. CD107a+의 백분율을 측정하기 위해, T 세포를 APC-접합 항-CD107a 항체 및 PE-접합 항-CD3 항체로 염색한 후 유세포 분석으로 분석하였다.

[0105] **2. 평가예**

[0106] 2.1. CD20CAR-T 세포의 생성 확인

[0107] 도 1로 나타낼 수 있는 CD20CAR-T 세포 및 GFP-T 세포의 개별 CAR 단위를 참고하여, 키메라 항-인간 CD20 항체, CD3ζ 세포내 도메인 및 4-1BB 공동자극 도메인에서 유래된 단일 사슬 가변 단편(scFv)으로 구성된 2세대 CAR를 구축하였다. 대조군으로는 ZsGreen1 형광 단백질(GFP)만으로 형질감염된 T 세포가 사용되었다. 형질도입된 세포의 세포 표면에서 효율적으로 CAR 분자를 발현시키기 위하여, CD8α 신호 펩타이드(MALPVTALLLLPLALLLHAARP, 서열번호 2)의 리더 서열을 삽입하였다. scFv 서열은 더 나은 유연성을 허용하기 위해 CD8의 힌지를 통해 막횡단 도메인에 연결되었다.

[0108] 건강한 기증자로부터 분리된 PBMC는 TransAct 및 재조합 IL-2(20IU/mL)로 활성화되었다. CD20-CAR-인코딩 렌티바이러스 또는 GFP 렌티바이러스를 사용한 형질도입은 세포 활성화 3일째에 수행되었다. 형질도입 후, T-세포는 IL-2(50IU/mL)의 존재하에 확장되었다. 상기 형질도입된 세포주에서 CAR 발현 여부를 확인하기 위하여, 형질도입 48시간 후 유세포 분석을 수행한 결과, 도 2에서와 같이 GFP-양성 비율에 따라 렌티바이러스가 검출된 바, 형질도입 및 상당한 수준의 CD20CAR이 발현된 것을 확인할 수 있었다.

[0109] 2.2. 암세포주에서 CD20 발현 여부 확인

[0110] 표적 세포(Daudi and Ramos)의 표면에서 CD20 발현을 확인하기 위하여, 유세포 분석을 수행하였다. 그 결과 이들 세포의 표면에서 CD20의 발현이 검출되었다. CD20의 mRNA 발현은 또한 PCR에 의해 확인되었다. 따라서, 이러한 데이터는 CD20가 CAR-T 세포 요법을 위한 잠재적인 신규 표적임을 확인할 수 있었다.

[0111] 2.3. 암세포주에 대한 CD20CAR-T의 세포독성 확인

[0112] CD20CAR-T 세포의 치료 효능을 평가하기 위하여, 시험관 내(*in vitro*)에서 항종양 효과를 확인하였다. 보다 섬세하고 민감한 방식으로 형질도입된 T 세포의 세포독성을 결정하기 위해 우리는 mCherry 및 luciferase를 발현하도록 2개의 표적 세포주인 Daudi 및 Ramos를 유전자 변형하여, 세포 생존율은 루시퍼라제 리포터 시스템과 발광계에 의해 결정될 수 있도록 하였다. 그런 다음 CD20CAR-T 세포 및/또는 GFP-T 세포를 표적 종양 세포주와 함께 1:1, 2:1, 4:1 및 8:1의 효과기-표적(E:T) 비율로 배양했다. 그 결과 도 3 및 도 4에 나타난 것처럼, CD20CAR-T 세포가 72시간 동안 인큐베이션한 후 GFP-T 세포보다 더 강력한 세포독성을 나타냈다는 것을 보여주었다.

[0113] 표적 종양 세포에 대한 반응으로 CD20CAR-T 세포의 사이토카인 분비 프로파일을 추가로 조사하기 위해, 우리는 사멸 분석에서 배양 상층액을 수집하고 분비된 사이토카인을 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA)을 통해 정량화했다. 그 결과 도 5에서와 같이, 일반적으로 활성화된 T 세포에 의해 분비되는 IFN-γ IL-2 및 TNF-α를 포함한 사이토카인이 확인된 바, CD20CAR-T 세포가 대조군 GFP-T 세포보다 훨씬 더 기능적인 사이토카인을 생산한다는 것이 분명했다.

[0114] 또한, CD20CAR-T의 증식 능력을 평가했다. 이들 세포를 5-(및 6)-카르복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미

딜 에스테르(CFSE)로 표지하고 Daudi 표적 세포와 함께 5일 동안 배양하였다. 그 결과 도 6에서 나타난 것처럼, 표적 세포를 제시하는 CD20으로 자극한 후 CD20CAR-T 세포의 효율적이고 특이적 증식이 일어나는 것을 확인하였다. 특히 데이터는 CD20CAR-T 세포가 동족 항원과 접촉 시 효율적으로 증식할 수 있음을 보여주었다. T 세포의 과립 내부에서 일반적으로 발견되는 LAMP-1이라고도 하는 탈과립 마커 CD107a의 표면 위치는 T 세포가 표적 세포를 죽이기 위해 과립에서 퍼포린 및 그랜자임을 방출함에 따른 세포용해 활성의 표시이다. CD107a의 특이적이고 유의한 상향 조절은 표적 세포에 노출된 후 CD20CAR-T 세포에서 관찰되었다.

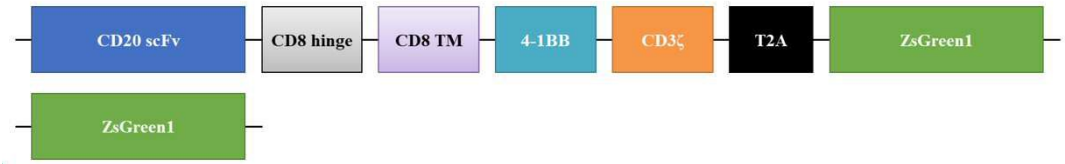
[0115] 종합적으로, 이러한 실험은 CD20을 표적으로 하는 CAR-T 세포가 CD20 항원을 발현하는 표적 세포를 만난 후 T 세포 세포독성과 관련된 전통적인 사이토카인을 생성함으로써 완전히 활성화되고 강력한 세포독성을 나타냄을 입증하였다.

[0116] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

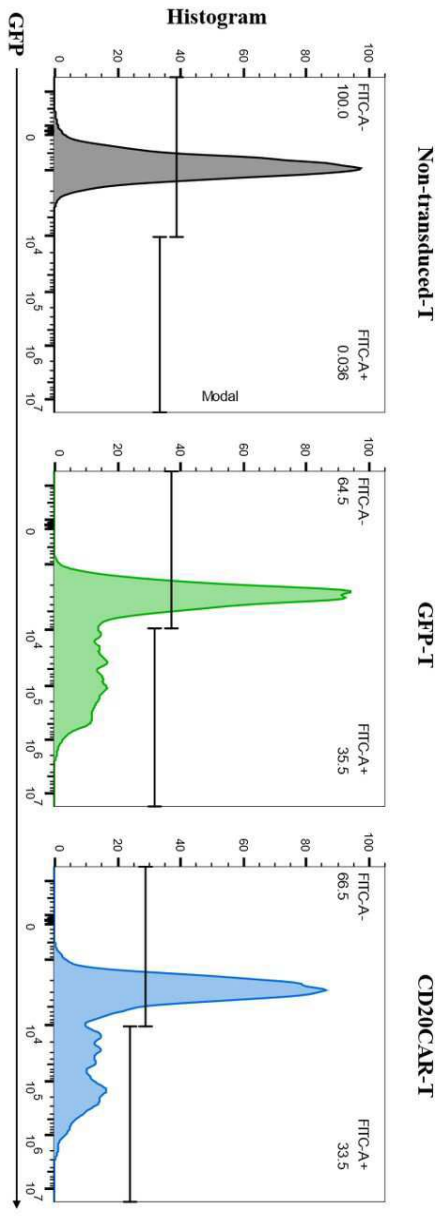
[0117] 본 발명의 범위는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

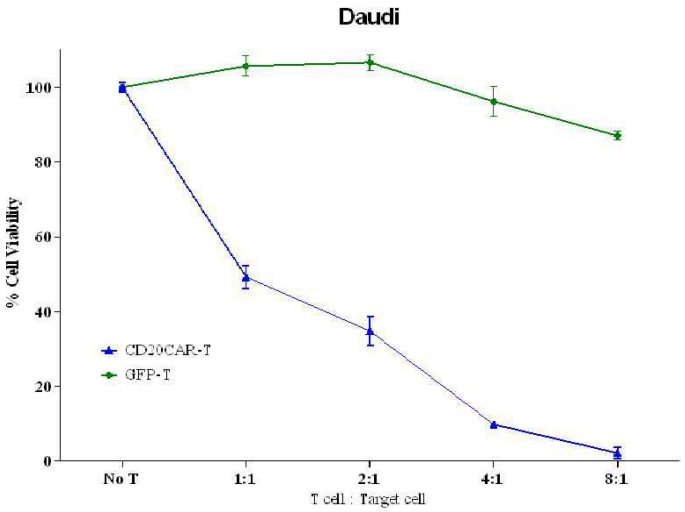
도면1



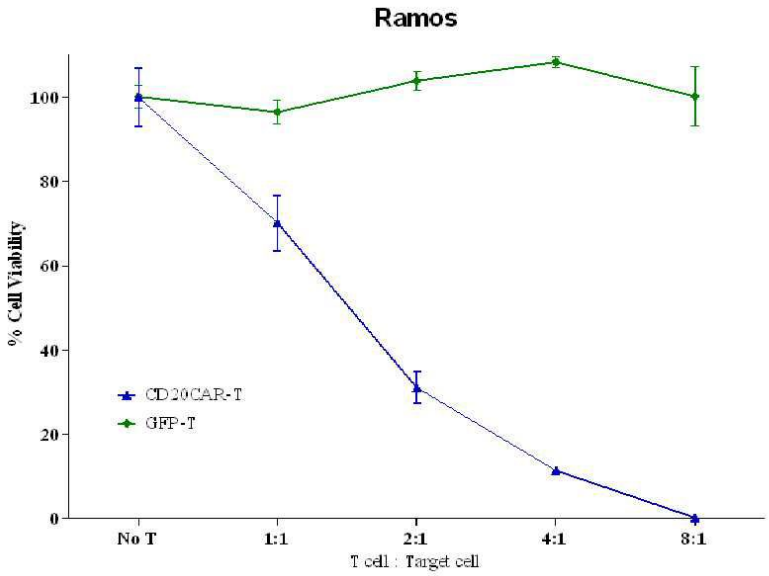
도면2


Histogram
GFP
Non-transduced-T
GFP-T
CD20CAR-T
FITC-A-
100.0
FITC-A+
0.036
Modal
FITC-A-
64.5
FITC-A+
35.5
FITC-A-
66.5
FITC-A+
33.5

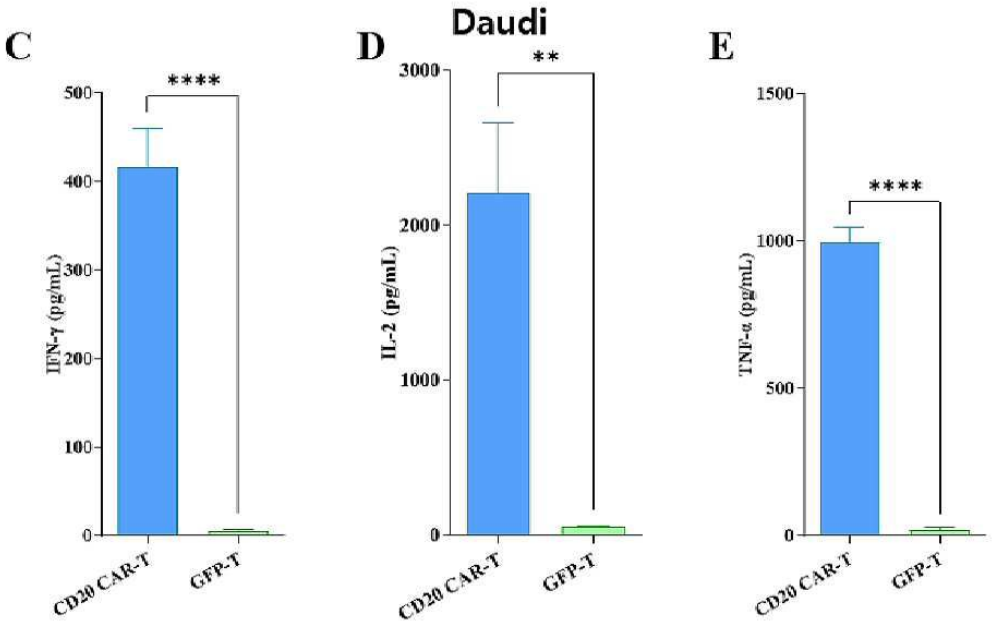
도면3


Daudi
% Cell Viability
100
80
60
40
20
0
CD20CAR-T
GFP-T
No T
1:1
2:1
4:1
8:1
T cell : Target cell

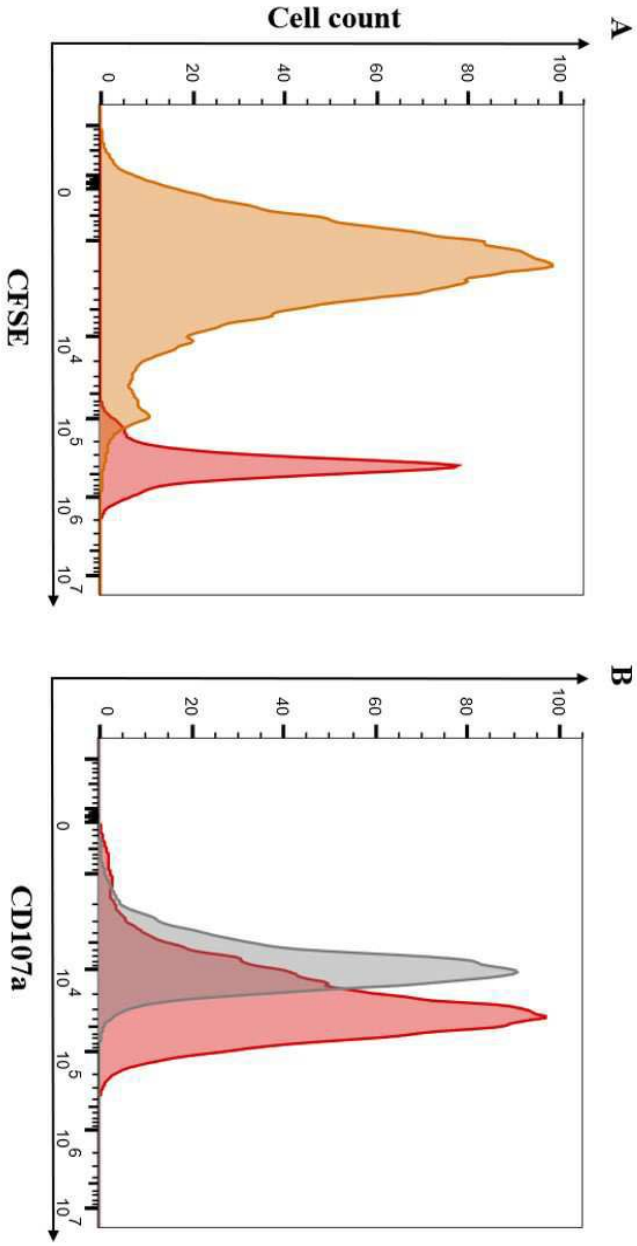
도면4


Ramos
% Cell Viability
100
80
60
40
20
0
CD20CAR-T
GFP-T
No T
1:1
2:1
4:1
8:1
T cell : Target cell

도면5


C
****
500
400
300
200
100
0
IFN-γ (pg/mL)
CD20 CAR-T
GFP-T
D
Daudi
**
3000
2000
1000
0
IL-2 (pg/mL)
CD20 CAR-T
GFP-T
E
****
1500
1000
500
0
TNF-α (pg/mL)
CD20 CAR-T
GFP-T

도면6



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University

<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating cancer comprising chimeric antigen receptor comprising anti-CD20 as an active ingredient, and method for preparing the same

<130> P214580

<160> 11

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile

85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu

260 265 270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser

275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro

290 295

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR

<400> 2

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR

<400> 3

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR

<400> 4

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

1 5 10 15

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 6

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR

<400> 6

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR

<400> 7

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

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR

<400> 8

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR

<400> 9

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 10

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCherry

<400> 10

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe

1 5 10 15

Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe

20 25 30

Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His

65 70 75 80

Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe

85 90 95

Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val

100 105 110

Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys

115 120 125

Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys

130 135 140

Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly

145 150 155 160

Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly

165 170 175

His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val

180 185 190

Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser

195 200 205

His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly

210 215 220

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

225 230 235

<210> 11

<211> 311

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> luciferase

<400> 11

Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Leu Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Val Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Glu Trp Phe Lys His Leu Asn Leu Pro Lys
100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His
115 120 125

Tyr Cys Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Val Val His Ala Glu
130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser His Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu

245 250 255

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

260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln

275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Asn Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu

290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln

305 310