



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0041152
(43) 공개일자 2018년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70596 (2013.01)
A61K 39/0011 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7006555
(22) 출원일자(국제) 2016년07월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년03월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/067800
(87) 국제공개번호 WO 2017/025323
국제공개일자 2017년02월16일
(30) 우선권주장
PA201570518 2015년08월11일 덴마크(DK)
PCT/EP2016/051467 2016년01월25일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
셀렉티스
프랑스, 에프-75013 파리, 튀 드 라 크로아 재리
8
(72) 발명자
두췌오, 마틸드
프랑스 매종-알포트 94700, 두메인 드 샤토 갈리
아드 19
(74) 대리인
특허법인 대아

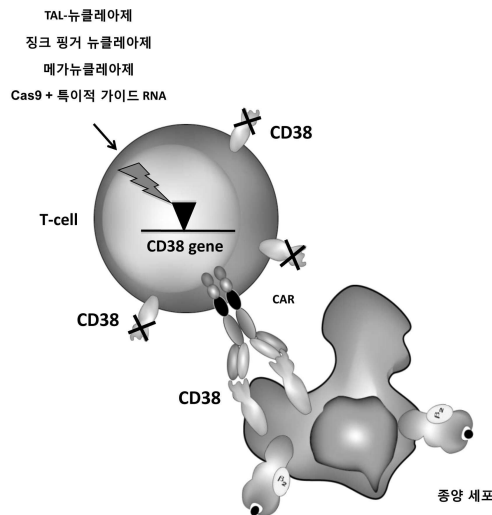
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 CD38 항원 타겟팅 및 CD38 유전자 불활성화를 위하여 조작된 면역치료용 세포들

(57) 요약

상기 마커들을 코딩하는 유전자들이 TALEN, Cas9 또는 아르코노트와 같은 회귀 절단 엔도뉴클레아제에 의하여 상기 면역 세포들에서 불활성화된다는 사실에 의하여 병적인 세포들 and 상기 CD38 면역 둘 다에 공통인 항원 마커를 타겟팅하는 키메라 항원 수용체들을 지닌 것으로 여겨질 수 있는 면역요법을 위한 유전적으로 조작된 면역 세포들을 개발하는 방법들.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 16/2896 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

A61K 2039/5158 (2013.01)

A61K 2039/55522 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/33 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

도 8에 나타난 대로, V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일 클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하며,

이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는,

항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 2

제 1항에 있어서,

막관통 도메인은 서열번호 79 (CD8 α TM)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11) 또는 서열번호 30 및 26 (16B5)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10) 또는 서열번호 62 및 58 (28F5)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 15-17 및 서열번호 11-13; 각각 서열번호 63-65 및 서열번호 59-62; 각각 서열번호 55-57 및 서열번호 51-53; 각각 서열번호 31-33 및 서열번호 27-29; 각각 서열번호 39-42 및 서열번호 35-37; 각각 서열번호 47-49 및 서열번호 43-45; 각각 서열번호 23-25 및 서열번호 19-22의 CDR들 서열들을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 82-84 (25A10), 서열번호 100-102 (28F5), 서열번호 97-99 (13F11), 서열번호 88-90 (16B5), 서열번호 91-93 (10F7), 서열번호 94-96 (27B6) and 서열번호 85-87(29B4)로부터 선택되는 하나에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 7

제 6항에 있어서,

서열번호 82-84 (25A10), 서열번호 100-102 (28F5), 서열번호 97-99 (13F11) 및 서열번호 88-90 (16B5)로부터 선택되는 하나에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 8

제 6항 또는 제 7항에 있어서,

서열번호 82-84 (25A10) and 서열번호 100-102 (28F5)로부터 선택되는 하나에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 9

제 6항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 82 (25A10-v1)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포의 결합 도메인은 적어도 하나의 mAb 특이적-에피토프를 더 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 11

제 10항에 있어서,

이때 상기 적어도 하나의 mAb 특이적-에피토프는 서열번호 114 내지 121로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 12

제 10항 또는 제 11항에 있어서,

이때 서열번호 114의 두 개의 CD20 미토포프들이 상기 세포의 리간드 결합-도메인에 삽입되는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 13

제 10항에 있어서,

이때 서열번호 114의 두 개의 CD20 미토포프들이 상기 세포의 리간드 결합-도메인의 힌지에 삽입되는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 14

제 10항에 있어서,

이때 서열번호 114의 세 개의 CD20 미토포프들 및 서열번호 122 또는 123의 하나의 CD34 에피토프가 상기 세포의 리간드 결합-도메인에 삽입되는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리클로날이든 서열번호 76 (Fc ϵ RIII α), 서열번호 77 (CD8 α) and 서열번호 78 (IgG1)로부터 선택되는 하나에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 힌지를 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리클로날이든 서열번호 77 (CD8 α)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 힌지를 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 17

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리클로날이든 서열번호 76 (Fc ϵ RIII α)으로부터 선택되는 하나에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 막관통 도메인을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR).

청구항 18

하기 단계를 포함하는 병적인 세포들에 대한 면역요법을 위한, 면역 세포들, 바람직하게는 T-세포들,을 제조하는 방법:

(a) CD38 항원 마커의 발현 또는 제시에 수반되는 면역 세포에서 CD38 유전자를 코딩하는 유전자를 유전적으로 불활성화시키거나 돌연변이시키는 단계로, 상기 CD38 항원 마커는 상기 면역 세포 및 병적인 세포의 표면 상 둘다에 존재하는 단계.

(b) 제 1항 내지 제 17항 중 어느 하나에 따른 상기 CD38 항원 마커에 대하여 항해지는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 이식 유전자를 상기 면역 세포 내에서 발현시키는 단계로, 상기 항원 마커는 상기 병적인 세포의 표면에 존재하는 단계.

청구항 19

제 18항 중 어느 한 항에 있어서,
이때 단계 a)는 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서,
이때 단계 a)는 TAL-뉴클레아제를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서,
상기 TAL-뉴클레아제는 서열번호 1, 4 또는 7의 서열을 타겟으로 하는 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서,
이때 상기 TAL-뉴클레아제는 서열번호 4의 서열을 타겟 (CD38-1 타겟) 으로 하는 방법.

청구항 23

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,
이때 CD38 항원의 상기 불활성화는 서열번호 2-3, 5-6 또는 8-9의 TALE-뉴클레아제들을 이용함으로써 수행되는 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서,
CD38 항원의 상기 불활성화는 서열번호 5-6의 TALE-뉴클레아제들을 이용함으로써 수행되는 방법.

청구항 25

제 18항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 방법은 면역 세포들을 활성화시키고 확장시키는 추가의 단계를 포함하는 방법.

청구항 26

제 18항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 방법은 상기 마커 항원을 그것들의 표면에서 제시하는 세포들을 배제함으로써 그 결과인 면역 세포들을 정제하는 추가의 단계를 포함하는 방법.

청구항 27

제 18항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 방법은 기증자로부터의 면역 세포들을 입수하는 이전 단계를 포함하는 방법.

청구항 28

제 18항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 방법은 상기 병적인 세포들의 발달에 영향을 받는 환자로부터 면역 세포들을 입수하는 이전 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

제 18항 내지 제 28항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 면역 세포는 일차(primary) 줄기 세포, iPS 또는 hES 세포로부터 유래되는 방법.

청구항 30

제 29항에 있어서,

이때 상기 면역 세포는 상기 병적인 세포들의 발달에 의하여 영향받는 상기 환자로부터 유래되는 iPS 세포로부터 유래되는 방법.

청구항 31

제 18항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 단계 a)는 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 32

제 31항에 있어서,

이때 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제는 Cas9인 방법.

청구항 33

제 32항에 있어서,

이때 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제는 적어도 2 폴리펩타이드들, RuvC를 포함하는 하나와 HNH를 포함하는 또다른 것으로 스플릿(split)되는 방법.

청구항 34

제 18항 내지 제 33항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 엔도뉴클레아제는 형질주입된 mRNA로부터 발현되는 방법.

청구항 35

제 18항 내지 제 34항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 방법은 T-세포 수용체 (TCR)의 요소를 코드하는 유전자를 불활성화시키는 추가의 단계를 포함하는 방법.

청구항 36

제 35항에 있어서,

이때 T-세포 수용체의 상기 요소는 TCR α 인 방법.

청구항 37

제 18항 내지 제 36항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 방법은 HLA의 요소를 코드하는 유전자를 불활성화시키는 추가의 단계를 포함하는 방법.

청구항 38

제 18항 내지 제 36항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 방법은 $\beta 2m$ 을 코드하는 유전자를 불활성화시키는 추가의 단계를 포함하는 방법.

청구항 39

제 18항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 방법은 CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, LAG3, HAVCR2, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 및 GUCY1B3로부터 선택되는 면역 체크포인트 단백질을 코드하는 유전자를 불활성화시키는 추가의 단계를 포함하는 방법.

청구항 40

제 39항에 있어서,

이때 상기 유전자 자리(locus)는 PD1 또는 CTLA-4 유전자들의 발현에 수반되는 방법.

청구항 41

제 18항 내지 제 40항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 방법은 화학요법 또는 면역억제 약물들에 대한 면역 세포들의 민감성을 부여하는 유전자를 불활성화시키는 추가의 단계를 포함하는 방법.

청구항 42

제 41항에 있어서,

이때 상기 추가의 유전자는 CD52를 코드하는 방법.

청구항 43

제 41항에 있어서,

이때 상기 추가의 유전자는 하이포크산틴(hypoxanthine)-구아닌(guanine) 포스포리보실트랜스페라제(phosphoribosyltransferase) (HPRT)인 방법.

청구항 44

제 41항에 있어서,

이때 상기 추가의 유전자는 글루코코르티코이드 수용체 (GR)를 코드하는 방법.

청구항 45

제 41항에 있어서,

이때 상기 추가의 유전자는 DCK 조절 경로에서, 특히 DCK 발현에, 수반되는 방법.

청구항 46

제 18항 내지 제 45항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 단계 a)에서 상기 면역 세포들은 염증성 T-림프구들, 세포독성 T-림프구들, 조절성 T-림프구들 또는 헬퍼 T-림프구들로부터 유래되는 방법.

청구항 47

제 46항에 있어서,

이때 상기 T-세포들은 CD4+ T-림프구들 및/또는 CD8+ T-림프구들로부터 유래되는 방법.

청구항 48

제 18항 내지 제 47항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 형질전환된 면역 세포들은 인 비트로에서 확장되는 방법.

청구항 49

제 18항 내지 제 47항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 형질전환된 면역 세포들은 인 비보에서 확장되는 방법.

청구항 50

제 18항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서,

이때 상기 병적인 세포들은 악성종양 세포들 또는 감염된 세포들로부터 선택되는 방법.

청구항 51

제 18항 내지 제 50항 중 어느 한 항에 있어서,
의약으로서 사용되는 면역 세포들의 제조를 위한 방법.

청구항 52

제 51항에 있어서,
암, 면역 질환 또는 그것을 필요로 하는 환자에게서의 감염을 치료하기 위한, 면역 세포들의 제조를 위한 방법.

청구항 53

제 52항에 있어서,
이때 상기 의약은 CD38+ 혈액의 악성종양의 치료를 위하여 사용되는 방법.

청구항 54

제 53항에 있어서,
이때 상기 의약은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL), 다발성 골수종 (MM), 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 림프아구성 백혈병 (B-세포 ALL) 및/또는 만성 림프성 백혈병 (CLL), 더욱 특히 다발성 골수종 (MM)의 치료를 위하여 사용되는 방법.

청구항 55

제 54항에 있어서,
이때 상기 의약은 다발성 골수종 (MM)의 치료를 위하여 사용되는 방법.

청구항 56

제 55항에 있어서,
이때 상기 의약은 난치성/재발성 다발성 골수종 (RRMM)인 MM 서브타입의 치료를 위하여 사용되는 방법.

청구항 57

제 54항에 있어서,
이때 상기 의약은 급성 림프아구성 백혈병 (ALL)의 치료를 위하여 사용되는 방법.

청구항 58

제 54항에 있어서,
이때 상기 의약은 맨틀 세포 백혈병 (MCL)과 같은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL) 환자들의 치료를 위하여 사용되는 방법.

청구항 59

제 18항 내지 제 53항 중 어느 한 항에 있어서,
이때 상기 병적인 세포들은 고휘 종양 세포들이나 방법.

청구항 60

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 따른 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)를 발현시키는 조작된 면역 세포 (바람직하게는 T 세포)로,
상기 면역 세포가 유전적으로 불활성화 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38 유전자를 가진, 조작된 면역 세포 (바람직하게는 T 세포).

청구항 61

제 60항에 있어서,
이때 상기 면역 세포는 유전적으로 불활성화 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38 및 TCR 유전자들을 갖는 조작된 면역 세포.

청구항 62

제 60항 또는 제 61항에 있어서,
이때 상기 면역 세포는 유전적으로 불활성화 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38, TCR 및 dCK 유전자들을 갖는 조작된 면역 세포.

청구항 63

제 60항 내지 제 62항 중 어느 한 항에 있어서,
이때 상기 CD38 유전자 및 추가적인 유전자(들)이 특정 회귀-절단 엔도뉴클레아제(들)을 이용하여 녹아웃 (knock-out) (KO)에 의하여 불활성화되는 조작된 면역 세포.

청구항 64

제 18항 내지 제 59항 중 어느 한 항의 방법에 따라 수득가능한 조작된 면역 세포.

청구항 65

제 60항에 있어서,
표현형 [CAR CD38]+[CD38]-을 야기하는 조작된 면역 세포.

청구항 66

제 60항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 따른 적어도 두 개의 조작된 면역 세포들을 포함하는 면역 세포들의 군집.

청구항 67

- (a) 면역 세포들과 공동으로 특이적 CD38-항원 마커들을 제시하는 병적인 세포들의 존재에 대하여 상기 환자를 진단하는 단계;
- (b) 제 18항 내지 제 59항 중 어느 한 항의 방법에 따라 또는 제 60항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 따른 조작된 면역 세포들의 군집을 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 병적인 세포들에 대하여 진단된 상기 환자에게 상기 조작된 면역 세포들을 투여하는 단계를 포함하는 환자의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 병적(pathological) 세포들 및 면역 세포들 둘 다에 공통인 CD38 항원 마커를 타겟팅하는 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체들(Receptors)을 지닌 것으로 여겨지는, 면역치료를 위한, 유전적으로 조작된, 바람직하게는 비(non)-동종반응성(alloreactive)인, 면역 세포들을 개발하는 방법들에 대한 것이다.
- [0002] 그 방법은 상기 항원 마커에 대항하여 향해지는 CAR를 발현시키는 단계 및 상기 면역 세포들의 표면 상에 상기 항원 마커의 제시에 기여하는 면역 세포들 내 유전자들을 불활성화시키는 단계를 포함한다. 이 불활성화는 RNA-가이드된(guided) 엔도뉴클레아제들(endonucleases) (예: Cas9/CRISPR), 메가뉴클레아제들(meganucleases, 징크(Zinc)-핑거(finger) 뉴클레아제들 또는 TAL 뉴클레아제들(nucleases)을 코딩하는 이식유전자들(transgenes)을 이용하여 보통 수행된다. 조작된 면역 세포들, 바람직하게는 T-세포들은 그것들의 상호 파괴, 자가-자극 또는 집합(aggregation)을 피하는 반면, 그것들의 면역 활성을 악성(malignant), 감염된 세포들 또는 결함이 있는 면역 세포들로 돌린다. 본 방법은 암, 감염 및 자가-면역 질환들을 치료하기 위한 면역 세포들을 이용하여 표준 그리고 입수가 가능한 입양(adoptive) 면역요법 전략들로의 길을 연다.

배경 기술

- [0003] 생체 외(ex vivo)에서 생기는 자가조직의(autologous) 항원-특이적 면역 세포들의 이동을 수반하는 입양 면역요법은 바이러스 감염 및 암을 치료하는 유망한 전략이다. 입양 면역요법에 사용되는 T 세포들은 예컨대, 유전자 조작을 통한 T 세포들의 방향 전환 또는 항원-특이적 T 세포들의 확장에 의하여 만들어질 수 있다(Park, Rosenberg et al. 2011).
- [0004] T 세포들에서 신규한 특이성들은 이식유전자를 가진 T 세포 수용체들 또는 키메라 항원 수용체들 (CARs)의 유전적 이동을 통하여 성공적으로 만들어져 왔다 (Jena, Dotti et al. 2010). CAR들은 단일 융합 분자에서 하나 이상의 신호전달(signaling) 도메인들과 관련된 타겟팅 모이어티로 구성된 합성 수용체들이다. 일반적으로 CAR의 결합 모이어티(moiety)는 단일(single)-체인(chain) 항체(antibody) (scFv)의 항원-결합 도메인으로 구성되는데, 이는 가요성(flexible) 링커(linker)에 의하여 연결된 단일클론 항체의 가벼운 그리고 가변인 단편들을 포함한다. 수용체 또는 리간드 도메인들에 기반한 결합 모이어티들은 또한 성공적으로 사용되어 왔다. 일 세대 CAR들을 위한 신호전달(signaling) 도메인들은 CD3제타(zeta) 또는 Fc 수용체 감마 체인들의 세포질 영역으로부터 유래된다. 일 세대 CAR들은 T 세포 세포독성을 성공적으로 방향전환하는 것으로 보여져 왔으나, 그것들은 인비보에서 연장된 확장 및 항-종양 활성을 제공하는데는 실패하였다. CD28, OX-40 (CD134), 및 4-1BB (CD137)을 포함하는 공(co)-자극(stimulatory) 분자들로부터의 신호전달 도메인들은 CAR 변형된 T 세포들의 증식을 증가시키고 생존을 증강시키기 위하여 (삼 세대) 조합하여 또는 단독으로 (이 세대) 첨가되어 왔다. CAR들은 T 세포들이 림프종 및 고형 종양들을 포함하는 여러가지 악성종양들로부터 종양 세포들의 표면에서 발현되는 항원들에 대항하여 방향전환되는 것을 성공적으로 가능하게 하였다 (Jena, Dotti et al. 2010).
- [0005] 입양 면역요법을 이용한 환자들의 치료를 위한 종래의 프로토콜은 자가조직의 세포 이동에 기반한다. 이 접근에서 T 림프구들이 환자들로부터 회수되고, 유전적으로 변형된, 또는 생체 외(ex vivo)에서 선택된, 만약 필요 시 세포들의 수를 증폭시키기 위하여 인 비트로(in vitro)에서 배양되고, 그리고 최종적으로 환자 내로 주입된다. 림프구 주입에 추가하여, 숙주는 T 세포들의 이식(engraftment) 또는 면역 반응, 예컨대 (방사선치료 또는 화학요법으로 하는) 프리(pre)-컨디셔닝(conditioning)에 그것들의 참여 및 (IL-2와 같은) 림프구 성장 인자들의 투여를 지지하는 다른 방법들에서 처리될 수 있다. 각 환자는 환자 자신의 림프구들 (즉 자가(autologous) 요법)

을 이용하여 개별적으로 가공된 치료를 받는다. 자가요법들은 실질적 적용까지는 상당한 기술적 그리고 논리적 장애물들을 직면하고 있는데, 그것들의 생산은 고가의 전용 설비 및 전문 인력을 요구하고, 그것들은 환자의 진단 후 빠른 시간 내에 만들어 생산되어야 하고, 많은 경우, 환자의 전처치가 저하된 면역 기능을 야기하여, 환자의 림프구들이 기능이 나쁘고 매우 적은 수로 존재할 수 있다. 이러한 장애물들 때문에, 각 환자의 자가 세포 제조는 효과적인 새로운 제품이고, 약효 및 안전성에 상당한 차이를 야기한다.

[0006] 이상적으로, 동종이계(allogeneic) 치료적 세포들이 미리-생산되고, 상세하게 특성화되고 그리고 환자들에게 즉시 투여가 가능할 수 있는 표준화된 치료를 사용하고 싶다. 동종이계에 의하여 세포들이 동일한 종에 속하나 유전적으로 같지 않은 개인들로부터 얻어진다는 것이 의미된다. 그러나 동종이계 세포들의 이용은 현재 많은 문제점들을 갖고 있다. 면역적격인(immune-competent) 숙주들에서 동종이계 세포들은 급히 거부되는데, 이는 숙주대 이식편 거부(host versus graft rejection) (HvG)로 칭하는 과정으로, 이것은 이동된 세포들의 약효를 상당히 제한한다. 면역적격인 숙주들에서 동종이계 세포들은 이식될 수 있으나, 그것들의 내생의 T-세포 수용체들(TCR) 특이성들은 숙주 조직을 외래의 것으로 인식할 수 있고, 이식편대숙주질환 (graft versus host disease) (GvHD)을 야기하는데, 이는 심각한 조직 손상 및 사망을 이끌 수 있다.

[0007] 동종이계 T-세포들을 제공하기 위하여, 본 발명자들은 T-세포들을 유전적으로 조작하는 방법을 전에 공개하였는데, 여기에서 다른 효과기(effector) 유전자들, 특히 T-세포 수용체들을 코드하는 것들은 TALEN™ (Cellestis, 8, rue de la Croix Jarry, 75013 PARIS) 상표로 더 잘 알려진 특이적 TAL-뉴클레아제들을 이용함으로써 불활성화되었다. 이 방법은 동종이계 T-세포들의 대량 생산을 가능하게 하는 플랫폼의 부분으로서 RNA 형질주입(transfection)을 이용하여 일차(primary) 세포들의 높은 효율을 증명하여 왔다 (WO 2013/176915).

[0008] 사이클릭(cyclic) ADP 리보스(ribose) 하이드롤라제(hydrolase)로도 알려진 CD38 ((분화(differentiation) 38의 클러스터(cluster))은 많은 면역 세포들(백혈구들), 특히 CD4+, CD8+, B 림프구들 및 자연살해 세포들을 포함하는, T-세포들의 표면에서 발견되는 당단백질이다. CD38은 또한 세포 부착, 신호 전달 및 칼슘 신호전달에도 작용한다. 이 단백질에 대한 구조적 정보는 참고 P28907 하 UniProtKB/Swiss-Prot 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 인간들에서, CD38 단백질은 염색체 4 상에 위치한 CD38 유전자에 의하여 코드된다. CD38은 NAD⁺부터 ADP-리보스까지 사이클릭 ADP-리보스의 합성 및 가수분해를 촉매화하는 다기능적인 외부효소(ectoenzyme)이다. 이들 반응 산물들은 세포내 Ca²⁺의 조절에 필수로 여겨진다. 또한 CD38 기능의 상실은 손상된 면역 반응들 및 물질대사 이상들과 관련되었다 (Malavasi F., et al. (2008). "Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology". Physiol. Rev. 88(3): 841-86).

[0009] 반면, CD38 단백질은 몇몇 다른 유전적으로 결정되는 질병들과 더불어, HIV 감염, 백혈병들, 골수종들, 고형 종양들, 타입 II 당뇨병 및 뼈 신진대사의 마커이다. 특히 그것은 백혈병에서 예후 마커로 사용되어 왔다 (Ibrahim, S. et al. (2001) CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell 만성 림프성 백혈병. Blood 98:181-186).

[0010] Mihara et al (2009)은 TBH-7 scFv에 기초한 항-CD38 키메라 항원 수용체를 기재하고 있다. 이들 조작된 T-세포들은 임의의 다른 유전적 변형을 포함하지 않는다. 독자생존 가능한(viable) 세포들의 회수가 매우 낮다는 것이 이 공개에서 강조된다.

[0011] 비록 CD38을 발현시키는 세포들이 CAR들에 대한 매력적인 타겟으로 간주될 수 있었음에도 불구하고, 이러한 항원 마커들이 또한 대부분의 T-세포들의 표면에서 발현된다는 사실은 면역요법을 수행하기 위한 이들 마커들의 선택을 중요하게 방해하여 왔다.

[0012] 본 발명자들은 여기에서 T-세포들의 표면에 또한 존재하는 CD38 특이적 항원 마커를 발현시키는 병적인 세포들을 수반하는 면역요법을 위한 전략들을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1: 항원 마커 CD38를 지닌 악성종양 세포를 타겟팅하는 (단일-체인 CAR로 대표되는) 키메라 항원 수용체를 지닌 것으로 여겨지고 CD38에 대하여 방해되는 본 발명에 따른 조작된 T-세포의 도해 표현이다.

도 2: A: 제한 효소 소화를 이용하여 각 TALE-뉴클레아제 구조체의 서브클로닝에 사용되는 (삽입: SfaNI-BbvI 및 벡터: BsmBI), T7 프로모터의 통제 하 포유류 발현 벡터 (pCSL10794)의 도해 표현이다. B: 제한 효소 소화를 이용한 각 CAR 구조체들의 서브클로닝에 사용되는 (AscI et HindIII), T7 프로모터의 통제 하 포유류 발현

벡터 (pCLS9632)의 도해 표현이다.

도 3: T 세포들에서 CD38의 표현: 갓(freshly) 분리된 T 세포들이 항-CD3-CD28 코팅된 마이크로비드들 (Dynabeads, life technologies) + 20ng/ml 인간 IL2 (Miltenyi)과 배양되었다. A: 활성화 후 6일에 T 세포들에 의한 CD38 발현. B: 활성화 후 3 주 동안 T 세포들에 의한 CD38 발현.

도 4: 본 발명에서 수행된 3 번의 실험들에 대한 기간: A: T 세포들에서 내생의 CD38의 Talen-불활성화; B: 야생형 T 세포들에서 CAR를 코딩하는 mRNA의 형질주입; C: 정제된 CD38 결핍(deficient) T 세포들에서 T 세포 활성화 후 CAR를 코딩하는 mRNA의 형질주입

도 5: TALEN에 의한 CD38 KO에 대하여 테스트된 3개의 타겟들의 그리고 CD38 항원의 엑손 1의 서열들; 3 개의 타겟들 CD38-1, CD38-2 및 CD38ex1-T2은 연속적으로 프레임된 부분들에 대응한다.

도 6: TALEN mRNA 형질주입 7일 후 CD38 음성 T 세포들의 퍼센트; TALEN CD38ex1-T2, CD38-1의 3 쌍들.

도 7: A: TALEN mRNA 형질주입 후 IL-2과 배양 17일 동안 CD38 음성 T 세포들의 퍼센트. B: -T 세포들 활성화 후 10일에 그리고 T 세포들 전기천공 후 6일에- CD38 음성 T 세포들 정제 후 IL-2의 존재 하 배양 11일 동안 T 세포 성장 (즉 증식의 인자) [범례: 빈 원: TALEN 없음; 채워진 원: TALEN CD38-1 및 삼각형: 정제된 음성 CD38 (TALEN CD38-1); N 은 각 케이스에 대하여 수행된 테스트들의 수를 나타낸다]

도 8: 사용된 힌지에 의존하는 설계되고 테스트된 항-CD38 CAR들의 3 개 버전들 (V1, V2 및 V3)의 표시.

도 9: 그것들의 각 scFvs의 Kd (nM)와 항-CD38 CAR들의 서브클로닝을 위한 구조체 플라스미드들.

도 10: Kifikit 방법 (Dako)을 이용한 CD38 항원의 양적인 발현을 위한 5 개 세포주들 (MOLP8, Daudi, U266 CD38+, U266 CD38- 및 K562)의 테스트. A: FAC 분석 ; B: 세포 당 CD38 항원들에 대한 수 및 CD38 발현의 퍼센트.

도 11: 갓 분리된 T 세포들 5일 후 CAR들을 코딩하는 mRNA들의 형질주입 후 24 개의 다른 CAR들 (scFvs X 3 버전들 V1, V2 및 V3의 8 쌍들) 모두의 스크리닝. 단백질 L, 항-Fab 또는 CD38-Fc을 이용한 유동세포분석법에 의한 CAR 발현 분석 (N=1).

도 12: 갓 분리된 T 세포들의 활성화 5일 후 CAR들을 코딩하는 mRNA들의 형질주입 후 24 개의 다른 CAR들 (scFvs X 3 버전들 V1, V2 및 V3의 8 쌍들) 모두의 스크리닝. 타겟 세포주들과 배양 후 (5시간) T 세포들의 원형질 막에성 CD107a 발현 (N=1)

도 13: 야생형, CD38-결핍, 정제된 CD38-결핍 항-CD38 CAR T 세포들의 비교. A: LUNA 세포 계측기에 의하여 평가되는 T 세포들 생존능력. B: D38-Fc 융합 단백질을 이용한 mRNA 형질주입 후 1일 및 2일에 CAR 발현 (N=1).

도 14: 야생형, CD38-결핍, 정제된 CD38-결핍 항-CD38 CAR T 세포들의 비교. A: 타겟 세포들과 T 세포들 배양 후 CD107a+ CD8 T 세포들의 퍼센트. B: K562 세포용해 및 CAR가 아닌 T 세포들 상 정규화된 타겟 세포들 용해 (N=1).

도 15: CD38-Fc 융합 단백질을 이용한 mRNA 형질주입 후 정제된 CD38-결핍 항-CD38 CAR T 세포들에서 1일 및 2일에 CAR 발현 (N=3).

도 16: 자가조직 T 세포들에 대항한 탈과립화를 제외한 (N=1 또는 2) 타겟 세포들과 T 세포들 배양 후 CD107a+ CD8 T 세포들의 퍼센트 (N=3).

도 17: K562 세포용해 및 CAR가 아닌(no-CAR) T 세포들 상 정규화된 타겟 세포 용해 (N=3, LT 자가조직 N=1 또는 2에 대항한 세포독성 제외).

도 18: 본 발명에 따른 멀티-체인 CAR 아키텍처가 유래되는 FcεRI의 도해 표현.

도 19: 본 발명에 따른 CD38 멀티-체인 CAR를 코딩하는 폴리시스트론 구조체의 일반 구조.

도 20: 본 발명에 따른 CD38 특이적 멀티-체인 CAR의 다른 아키텍처들. 왼쪽부터 오른쪽으로: (CD3제타의 ITAM에 융합된) 폴리펩타이드 감마, (ScFv에 융합된) 폴리펩타이드 알파, (CD28 또는 41BB로부터의 공-자극 도메인에 융합된) 폴리펩타이드 베타. A 및 B: 폴리펩타이드 베타는 반대 순서로 41BB, VL 및 VH 단편들로부터의 공-자극 도메인에 융합된다. C 및 D: 폴리펩타이드 베타는 반대 순서로 CD28, VL 및 VH 단편들로부터의 공-자극 도메인에 융합된다.

도 21A 및 도 21B: CAR 양성 세포들 주사와 관련된 가능한 부작용들을 경감시키기 위하여 설계된, T 세포 고갈을 태깅하는 다른 mAb-에피토프(epitope), 특히 CD20 미모토프(mimotope)(들)을 수반하는 본 발명에 따른 예시적 항-CD38 특이적 CAR들의 도해 표현.

(A) 세포들을 분류 또는 격감시키기 위한 에피토프 태깅(tagging) 서열을 수반하지 않는 본 발명에 따른 항-CD38 특이적 CAR 프로토타입(prototype): V1 및 v2은 항체 결합 CD38의 VH 또는 VL 체인 각각을 나타낸다, TM: 막관통(transmembrane) 도메인, L: 링커, TM: 막관통 도메인 (바람직하게는 CD8 α 막관통 도메인), 4-1BB: 세포내 공-자극 도메인, CD3 ITAM: 활성화 도메인.

(B) CAR의 세포외(extracellular) 리간드 결합 도메인에 삽입되는 적어도 하나의 에피토프를 더 포함하는 본 발명에 따른 항-CD38 특이적 CAR 아키텍처들, 이때 상기 에피토프는 VH 및 VL 체인들 사이에 삽입되고 다른 링커들에 의하여 가장자리를 이룬다.;

(C): 본 발명에 따른 항-CD38 특이적 CAR 아키텍처들로, 이때 두 개의 에피토프들이 CAR의 세포외 리간드 결합 도메인에 삽입되고, 하나는 VH 체인 및 CAR의 N-말단 말단 사이에 삽입되고, 상기 에피토프는 적어도 하나 또는 두 개의 링커들에 의하여 가장자리를 이루고; 두 번째 에피토프는 VH 및 VL 체인들 사이에 삽입되고, 상기 두 번째 에피토프 또한 적어도 하나 또는 두 개의 링커들에 의하여 2 가장자리를 이룬다. 여기에 나타내어진 아키텍처들은 2 번째 에피토프의 가장자리를 이루는데 사용되는 링커들에 따라 다르다.

(D): 본 발명에 따른 항-CD38 특이적 CAR 아키텍처들로, 이때 두 개의 에피토프들이 CAR의 세포외 리간드 결합 도메인에 삽입되고, 하나는 VH 및 VL 체인들 사이에 삽입되고; 다른 에피토프는 VL 체인 및 힌지 사이에 삽입되고, 각 상기 에피토프는 또한 적어도 하나 또는 두 개의 링커들에 의하여 가장자리를 이룬다. 여기에 나타낸 아키텍처들은 첫 번째 에피토프의 가장자리를 이루는데 사용된 링커들에 따라 다르다.

(E): 본 발명에 따른 항-CD38 특이적 CAR 아키텍처로, 이때 두 개의 에피토프들이 CAR의 세포외 도메인에 삽입되고, 하나는 VH 체인 및 CAR의 N-말단 말단 사이에 삽입되고, 상기 에피토프는 적어도 하나 또는 두 개의 링커들에 의하여 가장자리를 이루고; 두 번째 에피토프는 VL 체인 및 힌지 사이에 삽입되고, 상기 두 번째 에피토프는 이러한 링커들에 의하여 가장자리를 이룬다.

(F): 본 발명에 따른 항-CD38 특이적 CAR 아키텍처들로, 이때 세 개의 에피토프들이 CAR의 세포외 도메인에 삽입되고, 하나는 VH 체인 및 CAR의 N-말단 말단 사이에 삽입되고, 상기 에피토프는 적어도 하나 또는 두 개의 링커들에 의하여 가장자리를 이루고; 두 번째 에피토프는 VH 및 VL 체인들 사이에 삽입되고, 상기 에피토프는 이러한 링커들에 의하여 또한 가장자리를 이루고, 세 번째 에피토프는 VL 체인 및 힌지 사이에 삽입된다. 이들 두 개의 아키텍처들은 2 번째 에피토프의 가장자리를 이루는데 사용되는 링커들에 따라 다르다.

(G): 본 발명에 따른 항-CD38 특이적 CAR 아키텍처들, 이때 적어도 두 개의 에피토프들 (바람직하게는 CD20 에피토프들)이 항-CD38 VH 및 VL 체인들 및 힌지 사이의 세포외 리간드 결합 도메인에 삽입된다. 세 번째 예시적 아키텍처에서, 하나의 CD34 에피토프가 두 개의 CD20 에피토프들 사이에 포함된다. 추가의 아키텍처들이 고려될 수 있고, 이때 CD34가 임의의 다른 전의 CD20 에피토프들을 대체한다.

(H): 본 발명에 따른 항-CD38 특이적 CAR 아키텍처들로, 이때 적어도 두 개의 에피토프들이 세포외 리간드 결합 도메인의 맨끝에 삽입된다.

도 22: 항 CD19 CAR를 지닌 것으로 여겨지고 CD38 넘아웃을 가진 T 세포들 (CAR CD38-/- CAR-CD19 T 세포들)의 생체내(in vivo) 항-종양 활성의 평가; A) 실험의 기간; B) 생물발광 이미지가 마우스들의 4개 그룹들에서 7일, 14일 및 21일에 평가되었다: T 세포가 투여되지 않았다, RQR8 (CD38-/- RQR8)를 발현시키고 KO CD38와 T 세포들의 투여, RQR8 및 CD19 CAR를 공-발현시키고 KO CD38와 T 세포들의 투여, 및 RQR8 및 CD19 CAR를 공-발현시키고 야생형 CD38 T 세포들의 투여. 14일 및 21일에 손실된 마우스들은 특성 연구(characterization) 목적들로 희생된 것들이다; C) 마우스들의 상기 4개 그룹들에서 7일, 14일 및 21일에 생물발광 이미지에 의한 종양 진행의 평가; D) 마우스들의 상기 4개 그룹들에서 시간의 함수로 나타낸 생존 퍼센트의 평가.

도 23: 두 개의 독립적인 실험들에서 CD38-KO 약효의 평가. 그래프는 전기천공 5일 후 CD38 음성 세포들의 %를 나타낸다 (TpT: 버퍼 T= 음성 대조군).

도 24: KO 효율 A) 및 T 세포 증식 속도 B) 상 CD38 TALEN mRNA의 양의 효과의 평가. 그래프에서 mRNA의 양은 전체 사용된 mRNA에 대응한다 (각 TALEN에 대하여 10 μ g, 5 μ g 및 2.5 μ g이 10⁶ 세포들 당 mRNA의 2 μ g, 1 μ g 및 0.5

μg과 동등하다).

도 25: 형질도입 3일 후 CD38-fc 또는 RQR8 염색에 의하여 평가된 형질도입 효율의 평가. 항-CD38 CAR들 (25A10-V1 및 V2, 및 28F5 V1 및 V2)를 코딩하는 4 개의 다른 rLV에 대하여 세 개의 MOI들 (5, 10 및 15)이 시험되었다.

도 26: CD38 / TRAC 이중 KO 및 항-CD38 CAR 형질도입을 겪은 T 세포들의 스크리닝 과정에 대한 시간 척도.

도 27: 배양 공정의 마지막에 CAR 및 RQR8 공-발현의, 그리고 T 세포들에서 TALEN mRNA 전기천공에 의한 CD38/TRAC KO의 효율의 평가. A) RQR8 및 CD38 Fc에 의한 - 항-CD38 CAR의 그리고 CD38 항원에 대응하는 세 시리즈의 FAC들; 이들 분석들은 CD38/TRAC 이중 KO (DKO)를 겪은 4 개의 항-CD38 CAR들 (25A10-V1 및 V2, 및 28F5 V1 및 V2) 각각에서 수행되었다. B) CD38/TRAC 이중 KO (DKO)를 성공적으로 겪은 생존가능한(viable) T 세포들의 퍼센트의 평가. C) RQR8 and CD38 Fc에 기초한 항-CD38 CAR 발현의 상기 4 개 CAR들에 대한 평가. NTD: 형질도입되지 않음(non transduced).

도 28: 항-CD38 CAR를 발현시키고 이중 CD38/TRAC KO를 성공적으로 겪은 T 세포들의 표현형의 특성 연구. A) 상기 4 개의 항-CD38 CAR들 중 각각에 대하여 RQR8을 발현시키는 T 세포들에서 CD4/CD8의 비율의 결정. B) T 세포들 서브셋들(subsets)의 비율의 결정: 상기 4 개의 항-CD38 CAR들 중 각각에 대하여, T 세포 (Teff), 기억(memory) 효과기 T 세포 (Tem), 중앙(central) 기열 T 세포들 (Tcm), 줄기 세포 기억 T 세포들 (Tscm), 기억 T 세포들의 또다른 카테고리 (Temra) 및 원래(naive) T 세포들 (Tn),

도 29: 4 개의 항-CD38 CAR들 (25A10-V1 및 V2, 및 28F5 V1 및 V2)에 대한 활성의 평가 A) MM 세포주들에 대한 그것들의 탈과립화의 평가: 자가조직 T 세포들에 대항한 MOLP8, (CD38 항원을 발현시키거나 그렇지 않은) U266 및 K562, 그리고 양성 대조군으로서 세포주가 사용되지 않은 경우 (LT alone): B) MM CD38를 발현시키는 세포주들에 대항한 그것들의 세포독성의 평가, MM을 발현시키는 CD38 세포주인 U266에 대한 값들은 U266를 발현시키지 않는 CD38 세포주의 그것으로 정규화된다. 이들 2 개 그래프들에 대하여: 위에서 밑으로 그것들 옆의 범례들은 왼쪽부터 오른쪽으로 막대들에 대응한다.

도 30: 두 개의 M 세포주들 (U266 CD38- 및 MOLP8)의, 그리고 세 개의 T 급성 림프아구성 백혈병 (T-ALL) 세포주들 (MOLT4, Loucy 및 CCRF-CEM)의 세포 표면에서 CD38 발현의 평가.

도 31: 정제 전후 CCRF-CEM (T-ALL) 세포주에서 CD38 음성 T 세포들의 퍼센트의 결정에 의한 KO CD38의 정착 (establishment) 평가.

도 32: 25A10-V1을 위한 항-CD38 CAR 활성의 평가.

A) T ALL 세포주들에 대항한 그것들의 탈과립화의 평가: CCRF-CEM 원래(original) 세포 및 하나의 KO CD38, Loucy 및 MOLT4, CD38를 발현시키는 MM1S MM 세포주, 및 양성 대조군으로서 세포주가 사용되지 않은 경우 (LT alone): B) 상기 T ALL CD38을 발현시키는 세포주들에 대항한 그것들의 세포독성의 평가 (CCRF-CEM에 대한 값은 CD38를 발현시키지 않는 세포주에 대응하여 정규화되었다). 이들 2 개 그래프들에 대하여: 위에서 아래로 그것들 옆의 범례들은 왼쪽에서 오른쪽으로 막대들에 대응한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

발명의 개요

[0015]

본 발명은 병적인 세포들을 타겟으로 하도록 의도된 T-세포들을 조작하는 방법들을 개시하는데, 반면, T-세포들의 표면에 또한 존재하는 CD38 마커를 발현시킨다. 항원 마커에 의하여 그것의 면역-반응성 단편의 전체 단백질이 의미된다.

[0016]

더욱 특히, 본 발명의 조작된 면역 세포들은 도 8에 나타난 대로 버전들 V1, V2 및 V3의 특이적 아키텍처들 (architectures)을 가진 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체들 (항-CD38 CARs)에 대한 것이다; 세포질 도메인으로서 CD3 제타 신호전달(signaling) 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 갖고, 25A10, 28F5, 13F11, 16B5, 10F7, 27B6 또는 29B4 단일클론 항체들로부터 유래한 VH 및 VL 사슬들을 갖는 이 항-CD38 CAR.

[0017]

본 발명에 따라, T-세포들은 바람직하게는 이러한 CD38 항원 마커를 코딩하는 유전자의 발현을 불활성화시키기 위하여 조작된다. 이 불활성화는 바람직하게는 게놈 변형, 더욱 특이적으로 T-세포의 표면에서 상기 CD38 항원 마커의 제시 또는 생산에 직접적 또는 간접적으로 수반되는 유전적 위치(locus)를 타겟으로 할 수 있는 특이적 희귀(rare)-절단(cutting) 엔도뉴클레아제의 T-세포에서 발현을 통하여 수행된다. 메가뉴클레아제들, TAL-뉴클

레아제들, 징크-핑거 뉴클레아제들 (ZFN), 또는 아르고노트(argonaute) (Ago) 또는 Cas9/CRISPR와 같은 RNA/DNA 가이드된(guided) 엔도뉴클레아제들과 같은 다른 타입들의 회귀-절단 엔도뉴클레아제들이 사용될 수 있다. 여기에서 TALEN들의 이용은 CD38 유전자를 불활성화시키는데 특히 적합한 것으로 발견되었다. 도식 표현은 도 1에 제시된다.

[0018] 선호되는 예에 따라, 본 발명의 면역 세포들은 CD38 표면 항원을 코딩하는 CD38 유전자를 불활성화시키고 특이적 항-CD38 CAR를 부여할 수 있도록 조작되는데, 이 이중 유전적 변형은 암 CD38-발현 세포들을 특이적으로 타겟팅하는 것을 목적으로 하는 한편, 서로 죽이는 이들 항-CD38 CAR 면역 세포들의 위험을 감소시킨다.

[0019] 선호되는 예에 따라, 상기 이중-유전적으로 조작된 항-CD38 CAR 세포들은 도 8에 제시된 대로 V1, V2 또는 V3의 CAR 구조체를 갖는데, 이 항-CD38 CAR는 4-1BB로부터의 공-자극 도메인 및 세포질 도메인로서 CD3 제타 신호전달 도메인, 그리고 25A10, 28F5, 13F11, 16B5, 10F7, 27B6 또는 29B4 단일클론 항체들로부터 유래하는 VH 및 VL 체인들을 갖는다.

[0020] 또다른 예에 따라, T-세포들은, 특히 예컨대, T-세포 수용체들 (TCR) 또는 HLA 복합체의 요소를 코딩하는 것들과 같은, 자가-인식에 수반되는 유전자들을 결실시킴으로써 그것들을 동종이계로 만들도록 더 조작될 수 있다.

[0021] 또다른 예에 따라, T-세포들은 필요한 경우 이렇게 조작된 T-세포들을 생체내에서 격감시키기 위하여 키메라 항원 수용체의 세포외 결합 도메인에서 적어도 하나의 에피토프 또는 미모토프(mimotope)를 통합하도록 더 조작될 수 있다.

[0022] 본 발명은 상기 T-세포들을 조작하기에 유용한 임의의 단백질들, 폴리펩타이드들 또는 벡터들과 더불어, 상세한 설명에 개시된 유전적 변형들, 예들 및 도면들을 포함하는 분리된 세포들 또는 세포주들을 포함한다.

[0023] 본 발명의 결과로서, 조작된 T-세포들은 암, 감염들 또는 자가-면역 질환들의 치료 또는 예방을 위한 방법들에 사용, 치료적 제품들로, 이상적으로는 "기성품(off the shelf)"인 제품으로서 사용될 수 있다. 특히 그것들은 다발성(multiple) 골수종(myeloma) (MM) 또는 급성(acute) 림프모구(lymphoblastic) 림프종(lymphoma) (ALL)의 치료에 가장 적합하다.

[0024] 본 발명에 따른 선호되는 면역 세포들은 표현형 [CAR CD38]+[CD38]-, 바람직하게는 치료적 제품들로서 그것들의 사용을 위하여 [TCR] 음성으로, 바람직하게는 동종이계인 것으로, 야기하는 것이다.

[0025] 본 발명의 상세한 설명

[0026] 여기에서 특별히 정의되지 않는 한, 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 유전자 치료, 생화학, 유전학 및 분자생물학의 영역에서 당업자에 의하여 보통 이해되는 것과 동일한 의미들을 갖는다.

[0027] 여기에 기재된 것들과 유사하거나 또는 동등한 모든 방법들 및 물질들은 여기에 기재된 적합한 방법들 및 물질들과 함께, 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 여기에서 언급된 모든 공개문헌들, 특허 출원들, 특허들 및 다른 참고문헌들은 그것들 전체가 참고로서 포함된다. 상충되는 경우, 정의들을 포함하는 본 명세서가 이길 것이다. 나아가, 물질들, 방법들 및 예들은 설명적인 것일 뿐이며, 다르게 특정되지 않는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0028] 본 발명의 실시는, 다르게 표시되지 않는 한, 통상의 지식 내인, 세포생물학, 세포 배양, 분자생물학, 유전자이식(transgenic) 생물학(biology), 미생물학, 재조합 DNA, 및 면역학의 현재 기술들을 포함할 것이다. 이러한 기술들은 문헌에서 완전히 설명된다. 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. Ausubel, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), specifically, Vols.154 and 155 (Wu et al. eds.) and Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes

I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); and Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986) 참조.

- [0029] 본 발명은 더욱 특히 도 8에 나타난 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체들 (항-CD38 CARs)에 대한 것으로, 상기 구조체는 세포의 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지(hinge), a 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0030] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성(identity)을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0031] 병적인 세포들에 대항하여 키메라 항원 수용체들을 발현시키는 조작된 T-세포들
- [0032] 본 발명에 따른 T-세포들 내로 도입된 키메라 항원 수용체들은 단일-체인 또는 멀티(multi)-체인 CAR들과 같은 다른 디자인들을 취할 수 있다. 이들 다른 디자인들은 타겟인 병적인 세포들로의 결합 효율 및 특이성을 개선하기 위한 여러가지 전략들을 가능하게 한다. 이러한 전략들 중 일부는 본 출원의 도면에 기재되어 있다. 단일-체인 CAR들은 분야에서 가장 고전적인 버전이다. 멀티-체인 CAR 아키텍처들이 출원인에 의하여 개발되었고, 이는 특이성 및 강도의 면에서 T-세포들의 활성 조절을 가능하게 하였다. 여러 서브유닛들이 추가적인 공-자극 도메인들을 도울 수 있거나 또는 다른 타입들의 수용체들과 더불어 이러한 도메인들을 멀리 유지시킬 수 있는 반면, 전통적인 단일 체인 아키텍처는 가끔 다중특이적 상호작용들에 너무 민감하고 덜 허용적(permissive)인 것으로 간주될 수 있다.
- [0033] 단일-체인 CAR
- [0034] 생체 외에서 만들어지는 자가조직의 항원-특이적 T 세포들의 이동을 수반하는 입양 면역요법은 바이러스 감염 및 암을 치료하는 유망한 전략이다. 입양 면역요법에 사용되는 T 세포들은 유전적 조작을 통한 T 세포들의 방향 전환 또는 항원-특이적 T 세포들의 확장에 의하여 만들어질 수 있다 (Park, Rosenberg et al. 2011). 바이러스 항원 특이적 T 세포들의 이동은 이식 관련된 바이러스 감염 및 회귀한 바이러스-관련 악성 종양들의 치료에 이용되는 잘-확립된 절차이다. 유사하게 종양 특이적 T 세포들의 분리 및 이동은 흑색종의 치료에 성공적인 것으로 보여져 왔다.
- [0035] T 세포들에서 신규한 특이성들은 이식유전자를 가진(transgenic) T 세포 수용체들 또는 키메라 항원 수용체들 (CARs)의 유전적 이동을 통하여 성공적으로 만들어져왔다 (Jena, Dotti et al. 2010). CAR들은 단일 융합 분자에서 하나 이상의 신호전달 도메인들과 관련된 타겟팅 모이어티(moiety)로 구성되는 합성 수용체들이다. 일반적으로, CAR의 결합 모이어티는 가요성 링커에 의하여 연결된 단일클론 항체의 가벼운 그리고 가벼인 단편들을 포함하는, 단일-체인 항체 (scFv)의 항원-결합 도메인으로 구성된다. 수용체 또는 리간드 도메인들에 기반한 결합 모이어티를 또한 성공적으로 이용되어왔다. 일 세대 CAR들을 위한 신호전달 도메인들은 CD3제타(zeta) 또는 Fc 수용체 감마 체인들의 세포질 영역으로부터 유래된다. 일 세대 CAR들은 T 세포 세포독성을 성공적으로 방향전환하는 것으로 보여져왔다. 그러나 그것들은 생체내(in vivo)에서 연장된 확대 및 항-종양 활성을 제공하는데 실패하였다. CD28, OX-40 (CD134), 및 4-1BB (CD137)를 포함하는 공-자극 분자들로부터의 신호전달 도메인들이 CAR 변형된 T 세포들의 증식을 증가시키고 생존을 증강시키기 위하여 (삼 세대) 조합하여 또는 단독으로 (이 세대) 첨가되어 왔다. CAR들은 T 세포들이 림프종들 및 고형 종양들을 포함하는 여러가지 악성종양들로부터 종양 세포들의 표면에서 발현되는 항원들에 대항하여 방향전환되는 것을 성공적으로 가능하게 하였다 (Jena, Dotti et al. 2010).
- [0036] 한 예에 따라, 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0037] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

- [0038] 선호되는 예에 따라, 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0039] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10) 및 서열번호 62 및 58 (28F5)와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0040] 더 선호되는 예에 따라, 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1 및 V2로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0041] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10) and, 서열번호 62 및 58 (28F5)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0042] 선호되는 예에 따라, 상기 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)의 상기 막관통 도메인은 서열번호 79 (CD8 α TM)와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0043] 선호되는 예에 따라, 상기 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)의 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10) 또는 서열번호 62 및 58 (28F5)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0044] 선호되는 예에 따라, 상기 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)의 상기 VH 및 VL에 포함되는 CDR들(CDRs) 서열들은 각각 서열번호 15-17 및 서열번호 11-13; 각각 서열번호 63-65 및 서열번호 59-62; 각각 서열번호 55-57 및 서열번호 51-53; 각각 서열번호 31-33 및 서열번호 27-29; 각각 서열번호 39-42 및 서열번호 35-37; 각각 서열번호 47-49 및 서열번호 43-45; 각각 서열번호 23-25 및 서열번호 19-22이다.
- [0045] 선호되는 예에 따라, 상기 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)의 상기 힌지는 서열번호 76 (Fc ϵ RIII α), 서열번호 77 (CD8 α) 및 서열번호 78 (IgG1)로부터 선택된 하나와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 서열을 포함한다.
- [0046] 더 선호되는 예에 따라, 상기 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)의 상기 힌지는 서열번호 77 (CD8 α)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 서열을 포함한다.
- [0047] 선호되는 예에 따라, 상기 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)의 상기 힌지는 서열번호 76 (Fc ϵ RIII α)로부터 선택되는 하나와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 서열을 포함한다.
- [0048] 한 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 서열번호 82-84 (25A10), 서열번호 100-102 (28F5), 서열번호 97-99 (13F11), 서열번호 88-90 (16B5), 서열번호 91-93 (10F7), 서열번호 94-96 (27B6) 및 서열번호 85-87 (29B4)로부터 선택되는 하나와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 서열을 포함한다.
- [0049] 본 발명의 범위 내에 포함되는 항-CD38 CAR들의 상기 모든 서열들은 하기 표 1에 제시된다 (비교를 위한 도구 CAR로서 사용되는 GMB005 CAR들 제외). 그것들의 아키텍처들을 위하여 사용되는 요소들의 개시된 서열들 또한 그러하다 (도 8에 따른 V1, V2 및 V3 버전들).
- [0050] 표 1: 도 8의 V1, V2 및 V3 버전들에 기초한 항-CD38 CAR들의 폴리펩타이드 서열들, 및 그것들을 만드는데 사용된 그것들의 대응하는 요소들

표 1

CAR 의 명칭	서열번호	폴리펩타이드 서열
CD8α-신호 펩타이드 (SP)	74	MALPVTALLPLALLHAARP
FcεRI γ- 신호 펩타이드 (SP)	106	MIPAVVLLLLLVEQAAA
FcεRI - 신호 펩타이드 (SP)	110	MAPAMESPTLLCVALLFFAPDGVLA
GS 링커	75	GGGGSGGGSGGGGS
FCRIIIα 힌지	76	GLAVSTISSFFPPGYQ
CD8α 힌지	77	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
IgG1 힌지	78	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHY TQKSLSLSPGK
CD8α TM 도메인	79	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
4-1 BB 공-자극 도메인	80	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
CD28 공-자극 도메인 (CD28- IC)	113	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
CD3ζ 활성화 도메인	81	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
IgE 에 대한 Fc 수용체,알파 체인 , 막관통 및 세포간 도메인 (FcεRI-TM-IC)	111	FFIPLLVLVILFAVDTGFLFISTQQQVTFLLKIKRTRKGFRLNPHPKPNPKNN
IgE 에 대한 Fc 수용체, 감마 체인, ITAM 없음) (FcεRI γ - ITAM)	107	LGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRKIQVRKAAITSYEKS

[0051]

IgE 에 대한 수용체, 베타 체인, ITAM 없음 (FcεR1γ- ΔITAM)	112	MDTESNRRANLALPQEPSSVPAFEVLEISPQEVSSGRLLKSASSPPLHTWLTVLKKE QEFLGVTQILTAMICLCFGTVVCSVLDISHIEGDISSFKAGYPFWGAIFFSISGMLSI ISERRNATYLVRGSLGANTASSIAGGTGITILIIINLKKSLAYIIHSCQKFFETKCFMAS FSTEIVVMMLFLTILGLGSVSLTICGAGEELKGNKVPE
GSG-P2A 리보솜 스킵 펩타이드 (GSG-P2A)	108	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
GSG-T2A 리보솜 스킵 펩타이드 (GSG-T2A)	109	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
25A10-V1 CAR	82	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLIH WVKQRPEQGLEWIGWIDPEDDKTKYAPKFQDKATLTADTSSNTAYLQLSTLTSED TAIYYCVSRINYFYAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLHSGNQNRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDP RFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYDYPYTFGGGTKEIKGLAVSTISSFF PPGYQIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
25A10-V2 CAR	83	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLIH WVKQRPEQGLEWIGWIDPEDDKTKYAPKFQDKATLTADTSSNTAYLQLSTLTSED TAIYYCVSRINYFYAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLHSGNQNRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDP RFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYDYPYTFGGGTKEIKTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
25A10-V3 CAR	84	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLIH WVKQRPEQGLEWIGWIDPEDDKTKYAPKFQDKATLTADTSSNTAYLQLSTLTSED TAIYYCVSRINYFYAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLHSGNQNRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDP RFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYDYPYTFGGGTKEIKEPKSPDKTHT CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK IYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR

[0052]

29B4-V1 CAR	85	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTFSDFMY WVRQTPEKRLEWVAIISDGGIYTYPPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSED AMYYCARDGRDDYDGWYFDVWAGTTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIVMT QSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHAGV PDRFTGSGSGTDYALTISVQAEDLALYCCQHYSTPRTFGGGTKLEIKGLAVSTISS FFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
29B4-V2 CAR	86	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTFSDFMY WVRQTPEKRLEWVAIISDGGIYTYPPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSED AMYYCARDGRDDYDGWYFDVWAGTTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIVMT QSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHAGV PDRFTGSGSGTDYALTISVQAEDLALYCCQHYSTPRTFGGGTKLEIKTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVI TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
29B4-V3 CAR	87	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTFSDFMY WVRQTPEKRLEWVAIISDGGIYTYPPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSED AMYYCARDGRDDYDGWYFDVWAGTTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIVMT QSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHAGV PDRFTGSGSGTDYALTISVQAEDLALYCCQHYSTPRTFGGGTKLEIKEPKSPDKT HTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
16B5-V1 CAR	88	MALPVTALLPLALLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNLH WVKQTPGQGLEWIGYIYPGNNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSED SAVYFCARGGIYYGSSLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGSGGGSNIVLTQSP ASLAVSLGQRATISCRASESDNYGTTFMYYWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPA RFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDAATYCCQNKEDPWTFGGGTKEIKGLAVSTISS FFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
16B5-V2 CAR	89	MALPVTALLPLALLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNLH WVKQTPGQGLEWIGYIYPGNNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSED SAVYFCARGGIYYGSSLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGSGGGSNIVLTQSP ASLAVSLGQRATISCRASESDNYGTTFMYYWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPA RFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDAATYCCQNKEDPWTFGGGTKEIKTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDK KMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0053]

16B5-V3 CAR	90	MALPVTALLPLALLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNLH WVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSED SAVYFCARGGIYYGSSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSNIVLTQSP ASLAVSLGQRATISCRASESDNYGTTFMYYWYQQKPGQPPKLLIYASNLESVPA RFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDAATYYCQNKEDPWTFGGGTKLEIKEPKSPDKT HTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGFSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
10F7-V1 CAR	91	MALPVTALLPLALLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKDKATLTADTSSSTAYMQISSLTSE DSAVYFCARGGQLGRPWFAYWGQGTTLTVSAGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQ SPASLAASPGQRATISCRASESDSYGNTFMYYWYQQKPGQPPKLLIYASNLESV PVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQNNEDPWTFGGGTKVEIKGLAVSTI SSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSRCFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10F7-V2 CAR	92	MALPVTALLPLALLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKDKATLTADTSSSTAYMQISSLTSE DSAVYFCARGGQLGRPWFAYWGQGTTLTVSAGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQ SPASLAASPGQRATISCRASESDSYGNTFMYYWYQQKPGQPPKLLIYASNLESV PVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQNNEDPWTFGGGTKVEIKTTTPAP RPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10F7-V3 CAR	93	MALPVTALLPLALLHAARPQAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYNQKFKDKATLTADTSSSTAYMQISSLTSE DSAVYFCARGGQLGRPWFAYWGQGTTLTVSAGGGGSGGGGSGGGGSNIVLTQ SPASLAASPGQRATISCRASESDSYGNTFMYYWYQQKPGQPPKLLIYASNLESV PVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQNNEDPWTFGGGTKVEIKEPKSPD KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGFSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR

[0054]

27B6-V1 CAR	94	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYNIDW VRQSPGKGLEWLGVIWWSGGSTDYNAAFISRLKISKDDSKSQVFFKMNSLQSDDTA IYYCARHSPLVSTPDWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSP AIMSASPGEKVTMTCTSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTINNMEAEDAATYSCQWSSYPPTFGGGTKLEIKGLAVSTISSFFPP GYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQALPPR
27B6-V2 CAR	95	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYNIDW VRQSPGKGLEWLGVIWWSGGSTDYNAAFISRLKISKDDSKSQVFFKMNSLQSDDTA IYYCARHSPLVSTPDWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSP AIMSASPGEKVTMTCTSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTINNMEAEDAATYSCQWSSYPPTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDITYDALHMQALPPR
27B6-V3 CAR	96	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYNIDW VRQSPGKGLEWLGVIWWSGGSTDYNAAFISRLKISKDDSKSQVFFKMNSLQSDDTA IYYCARHSPLVSTPDWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSP AIMSASPGEKVTMTCTSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS GSGSGTSYSLTINNMEAEDAATYSCQWSSYPPTFGGGTKLEIKEPKSPDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPKPKDLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKIYI WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDITY DALHMQALPPR
13F11-V1 CAR	97	MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEEFKGRFAFLETSASTAYLQINNKNKNE DTATYFCARWYWGSTPSSYTMIDYWGQTSVTVSSGGGGSGGGSGGGGSETTV TQSPASLSVATGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPKVLISEGNTLRPGVPS RFSSSGYGTDFVFTIENTLSEVDADYYCLQSNMMPYTFGGGKLEIKGLAVSTISSFF PPGYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLS TATKDITYDALHMQALPPR
13F11-V2 CAR	98	MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEEFKGRFAFLETSASTAYLQINNKNKNE DTATYFCARWYWGSTPSSYTMIDYWGQTSVTVSSGGGGSGGGSGGGGSETTV TQSPASLSVATGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPKVLISEGNTLRPGVPS RFSSSGYGTDFVFTIENTLSEVDADYYCLQSNMMPYTFGGGKLEIKTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDITYDALHMQALPPR

[0055]

13F11-V3 CAR	99	MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEFEKGRFAFSLETSASTAYLQINNKN DTATYFCARWYGYSTPSSYTMIDYWGQGSTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSETTV TQSPASLSVATGEKVITRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPKVLISEGNTLRPGVPS RFSSSGYGTDFVFTIENTLSEADVADYYCLQSNMMPYTFGGGKLEIKEPKSPDKTHT CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
28F5-V1 CAR	100	MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQTPGKGLKWMGWINTNSGEPTYAEFEKGRFAFSLETSASTAYLQINNKN DTATYFCARGAYRYDGEVSYAMDYWGQGSTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG QIILTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSLSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSLAS GVPARFSGGGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHLSPTYFGGGKLEIKGLAVST ISSFFPPGQYIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGSCSRFEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
28F5-V2 CAR	101	MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQTPGKGLKWMGWINTNSGEPTYAEFEKGRFAFSLETSASTAYLQINNKN DTATYFCARGAYRYDGEVSYAMDYWGQGSTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG QIILTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSLSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSLAS GVPARFSGGGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHLSPTYFGGGKLEIKTTTPAP RPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
28F5-V3 CAR	102	MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMN WVKQTPGKGLKWMGWINTNSGEPTYAEFEKGRFAFSLETSASTAYLQINNKN DTATYFCARGAYRYDGEVSYAMDYWGQGSTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG QIILTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSLSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSLAS GVPARFSGGGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHLSPTYFGGGKLEIKEPKSPD KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRD PEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR

[0056]

GMB005-V1 CAR	103	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYFCAKDILWFGPEVFDYWGGTLTVSSASGGGGSGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSELEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIKGLAVSTISSF FPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
GMB005-V2 CAR	104	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYFCAKDILWFGPEVFDYWGGTLTVSSASGGGGSGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSELEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIKTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
GMB005-V3 CAR	105	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYFCAKDILWFGPEVFDYWGGTLTVSSASGGGGSGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSELEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIKEPKSPDKTH TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR

[0057]

[0058]

선호되는 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 서열번호 82-84 (25A10), 서열번호 100-102 (28F5), 서열번호 97-99 (13F11) 및 서열번호 88-90 (16B5)로부터 선택되는 하나와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0059]

더 선호되는 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 서열번호 82-84 (25A10) and 서열번호 100-102 (28F5)로부터 선택되는 하나와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0060]

더 선호되는 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 서열번호 82-84 (25A10)와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0061]

더욱 더 선호되는 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 서열번호 82 (25A10-v1)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0062]

더 선호되는 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 번호 100-102 (28F5)와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0063]

더 선호되는 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 서열번호 97-99 (13F11)로부터 선택되는 하나와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0064]

본 발명은 더욱 특히 본 출원에 기재된 그것들과 일부 동일성을 제시하는 CAR가 부여되고 상기 CAR에 의하여 타겟팅되는 세포 마커를 코드하는 유전자에 회귀-절단 엔도뉴클레아제 유도된 돌연변이들을 지니는 면역 세포들에 대한 것이다 (즉 CAR는 상기 불활성화된 유전자의 산물과 친화도를 보인다). 동일성에 의하여 GCG 서열 분석 패키지 (부분으로서 이용가능한 FASTA, 또는 BLAST와 같은 소프트웨어 (University of Wisconsin, Madison, Wis.)에 의하여 결정되는 대로 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90% 그리고 더욱 더 바람직하게는 95% 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 동일성이 의미된다. BLASTP "동일성들"은 동일한 높은 지수 서열 쌍들에서 총 잔기들의 부분 및 수를 보여준다. 여기에 개시된 아미노산 서열들과 유사도 (similarity)의 동일성의 임의의 중간 정도 또는 유사도 또는 동일성의 이들 정도를 갖는 아미노산 서열들이 이

공개에 의하여 포함되고 고려된다. 동일한 것이 BLASTN을 이용하여 폴리뉴클레오타이드 서열들과 관련해 적용된다.

- [0065] 본 발명은 또한 앞서 기재된 것과 같이 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)를 발현시키는 조작된 면역 세포 (바람직하게는 T 세포)에 대한 것으로, 상기 면역 세포는 유전적으로 불활성화되거나 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38 유전자를 갖고, 상기 CD38 항원은 상기 면역 세포 및 병적인 세포의 표면 상 둘 다에 제시된다.
- [0066] 선호되는 예에서, 상기 조작된 면역 세포는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)을 발현시키고, 상기 면역 세포는 유전적으로 불활성화되거나 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38 및 TCR 유전자들을 갖는다.
- [0067] 한 예에서, 상기 조작된 면역 세포는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)을 발현시키고, 상기 면역 세포는 유전적으로 불활성화되거나 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38, TCR 및 dCK 유전자들을 갖는다.
- [0068] 선호되는 예에서, 상기 조작된 면역 세포는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)를 발현시키고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0069] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고,
- [0070] 상기 면역 세포 (바람직하게는 T 세포)는 유전적으로 불활성화되거나 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38 유전자를 갖고, 상기 CD38 항원은 상기 면역 세포 및 병적인 세포의 표면 상 둘 다에서 제시된다.
- [0071] 더 선호되는 예에서, 상기 조작된 면역 세포는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)을 발현시키고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0072] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고,
- [0073] 상기 면역 세포 (바람직하게는 T 세포)는 유전적으로 불활성화되거나 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38 및 TCR 유전자들을 갖고, 상기 CD38 항원은 상기 면역 세포 및 병적인 세포의 표면 상 둘 다에서 제시된다.
- [0074] 상기 예들에서, 상기 유전적 불활성화 또는 돌연변이는 바람직하게는 본 발명에 기재된 것과 같은 특정 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 사용에 의하여 수행된다.
- [0075] 본 발명은 또한 전술한 바와 같은 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)를 발현시키는 적어도 두 개의 조작된 면역 세포들 (바람직하게는 T 세포들)을 포함하는 군집(population)에 대한 것으로, 상기 면역 세포는 유전적으로 불활성화되거나 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38 유전자를 갖고, 상기 CD38 항원은 상기 면역 세포 및 병적인 세포의 표면 상 둘 다에 제시된다.
- [0076] 선호되는 예에서, 상기 군집(population)은 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)을 발현시키는 두 개의 조작된 면역 세포들을 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0077] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고,

- [0078] 상기 면역 세포들 (바람직하게는 T 세포들)은 유전적으로 불활성화되거나 또는 돌연변이된 그것의 내생의 CD38 유전자를 갖고, 상기 CD38 항원은 상기 면역 세포 및 병적인 세포의 표면 상 둘 다에 제시된다.
- [0079] 세포외 돌메인
- [0080] 여기에서 사용되는 용어 "세포외 리간드-결합 도메인"은 리간드에 결합하는 것이 가능한 올리고- 또는 폴리펩타이드로서 정의된다. 바람직하게는 상기 도메인은 세포 표면 분자와의 상호작용을 가능하게 할 것이다. 예컨대, 세포외 리간드-결합 도메인은 특정 질병 상태와 관련된 타겟 세포들 상에서 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하기 위하여 선택될 수 있다.
- [0081] 단일(single)-체인 가변(variable) 항체들 (scFvs)
- [0082] 본 발명의 항-CD38 CAR들의 항원 결합 도메인은 단일클론 항체, 재조합 항체, 인간 항체, 인간화된(humanized) 항체, 및 그것의 기능적 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않는 조직에서 먼(off-tissue) 항원에 결합하는 임의의 도메인일 수 있다.
- [0083] 여기에서 사용된 용어 "재조합 항체"에 의하여, 예컨대, 박테리오파지, 효모 발현 시스템 또는 포유동물 세포 발현 시스템, 그리고 더욱 특히 항체의 CDR 영역들을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입된(transduced) T 세포에 의하여 발현되는 항체 또는 항체 단편과 같은 재조합 DNA 기술을 이용하여 만들어지는 항체 또는 항체 단편이 의미된다. 그 용어는 또한 항체 또는 항체 단편을 특정하는 아미노산 서열 또는 항체 또는 항체 단편 단백질을 발현하는 DNA 분자 또는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의하여 만들어지는 항체 또는 항체 단편을 의미하는 것으로 이해되고, 이때 DNA 또는 아미노산 서열은 당업계에 잘 알려져 있고 이용가능한 재조합 또는 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 이용하여 수득된다.
- [0084] 인간화된 항체는 CDR-이식(grafting) (예컨대, 그 각각이 그 전체가 참고로서 여기에 포함되는 European Patent No. EP 239,400; International PublicationNo. WO 91/09967; and U.S. Pat. Nos. 5,225,539, 5,530,101, and 5,585,089 참조), 베니어링(veneering) 또는 재포장 (resurfacing) (예컨대, 각각이 그 전체가 참조로서 여기에 포함되는 European Patent Nos. EP 592,106 and EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; and Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973 참조), 체인 셔플링(shuffling) (예컨대, 그 전체가 참조로서 여기에 포함되는 U.S. Pat. No. 5,565,332 참조), 및 예컨대, 그 각각이 그 전체가 참조로서 여기에 포함되는 U.S. Patent Application Publication No. US2005/0042664, U.S. Patent Application Publication No. US2005/0048617, U.S. Pat. No. 6,407,213, U.S. Pat. No. 5,766,886, International Publication No. WO 9317105, Tan et al., J. Immunol., 169: 1119-25 (2002), Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16): 10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55(8): 1717-22 (1995), Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994), and Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959- 73 (1994)에 개시된 기술들을 포함하나 이에 제한되지 않는 업계에 알려진 여러가지 기술들을 이용하여 생산될 수 있다. 프레임워크(framework) 영역들에서 프레임워크 잔기들은 항원 결합을 바꾸기 위하여, 예컨대 개선하기 위하여 자주 CDR 기증자 항체로부터의 대응하는 잔기로 치환될 것이다. 이들 프레임워크 치환들은 예컨대 특정 위치들에서 일반적이지 않은 프레임워크 잔기들을 확인하기 위한 서열 비교 및 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기들을 확인하기 위한 프레임워크 잔기들 및 CDR의 상호작용들의 모델링에 의하여, 당업계에 잘 알려진 방법들에 의하여 확인된다. (예컨대, 그 전체가 참고로서 여기에 포함되는 Queen et al., U.S. Pat. No. 5,585,089; and Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323 참조).
- [0085] 보존적 아미노산 치환들은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄들을 갖는 아미노산 잔기들의 패밀리들은 업계에 정의되어 왔다. 이들 패밀리들은 염기성 측쇄들 (예컨대 lysine, arginine, histidine), 산성 측쇄들 (예컨대 아스파르트산(aspartic acid), 글루탐산(glutamic acid)), 전하를 띠지 않는(uncharged) 극성 측쇄들 (예컨대 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성(nonpolar) 측쇄들 (예컨대 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-가지달린(branched) 측쇄들 (예컨대 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족(aromatic) 측쇄들 (예컨대 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 가진 아미노산들을 포함한다. 그러므로, 본 발명의 CAR를 가진 하나 이상의 아미노산 잔기들은 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기들로 대체될 수 있고, 변환된 CAR는 여기에 기재된 기능적 분석을 이용하여 GD3에 결합하는 능력이 시험될 수 있다.

[0086] 한 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 폴리펩타이드 서열이 각각 서열 번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 VH 및 VL 가변 체인을 포함한다.

[0087] 항-CD38VH 및 VL 체인들 및 그것들의 각각의 대응되는 CDR들의 상기 서열들은 하기 표 2에 제시된다.

[0088] 표 2: scFv 항-CD38 항체들 및 그것들 각각의 CDR의 8 커플들의 VH 및 VL 체인들의 서열들.

표 2

명칭	VH 또는 VL 체인	서열번호	폴리펩타이드 또는 핵산 서열
25A10	VL	10	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLHSGNQARNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTL TISSVQAEDLAVYYCQNDYDYPYTFGGGKLEIK
	CDR1	11	QSLHSGNQARNY
	CDR2	12	WAS
	CDR3	13	QNDYDYPYT
	VH	14	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLIHWVKQR PEQGLEWIGWIDPEDDKTKYAPKFQDKATLTADTSSNTA YLQLSTLTSEDTAIYYCVSRINYYFAYWGQGTTTLTVSS
	CDR1	15	GFNIKDSL
	CDR2	16	IDPEDDKT
	CDR3	17	VSRYINYYFAY
29B4	VL	18	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVNTAVAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRHAGVPDRFTGSGSGTDYALTIS VQAEDLALYYCQHHYSTPRTFGGGKLEIK
	CDR1	19	QDVNTA
	CDR2	20	WAS
	CDR3	21	QQHYSTPRT
	VH	22	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYFMYWVRQ TPEKRLEWVAIISDGGIYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNNLYL QMSSLSKSEDTAMYYCARDGRDDYDGWYFDVWGAGTTV TVSS
	CDR1	23	GFTFSDYF
	CDR2	24	ISDGGIYT
	CDR3	25	ARDGRDDYDGWYFDV

[0089]

16B5	VL	26	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGTTFMWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDTLTIDP VEADDAATYYCQNKEDPWTFGGGTKLEIK
	CDR1	27	ESVDNYGTTF
	CDR2	28	LAS
	CDR3	29	QQNKEDPWT
	VH	30	QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNLHWVK QTPGGGLEWIGIYIPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSS TAYMQISSLTSEDSAVYFCARGGIYYGSSLDYWGQGTTL TVSS
	CDR1	31	GYTFTSYN
	CDR2	32	IYPGNGGT
	CDR3	33	ARGGIYYGSSLDY
10F7	VL	34	NIVLTQSPASLAASPGQRATISCRASESVDSYGNTFMWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPVRFSGSGSRTDTLTIDP VEADDAATYYCQQNNEDPWTFGGGTKVEIK
	CDR1	35	ESVDSYGNTF
	CDR2	36	LAS
	CDR3	37	QQNNEDPWT
	VH	38	QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGGGLEWIGIYIPGNGGTNYNQKFKDKATLTADTSSS TAYMQISSLTSEDSAVYFCARGGQLGRPWFAYWGQGTL VTVSA
	CDR1	39	GYTFTSYN
	CDR2	40	IYPGNGGT
	CDR3	41	ARGGQLGRPWFAY
27B6	VL	42	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCTSSSVSYMHWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTINNMEA EDAATYSCQQWSSYPPTFGGGTKLEIK
	CDR1	43	SSVS
	CDR2	44	DTS
	CDR3	45	QQWSSYPPT
	VH	46	QVQLKQSGPGLVQPQSLSITCTVSGFSLTSYNIDWVRQS PGKGLEWLGVIWGGSTDYNAAFISRLKISKDDSKSQVFF KMNSLQSDDTAIYYCARHSPLVSTPDWYFDVWGAGTTV TVSS
	CDR1	47	GFSLSYN
	CDR2	48	IWSGGST
	CDR3	49	ARHSPLVSTPDWYFDV

[0090]

13F11	VL	50	ETTVTQSPASLSVATGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKP GEPPKVLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDFVFTIENTLSED VADYYCLQSNMMPYTFGGGKLEIK
	CDR1	51	TDIDDD
	CDR2	52	EGN
	CDR3	53	LQSNMMPYT
	VH	54	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMNWVKQ APGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLIKNETATYFCARWYWGSTPSSYTMDYWGQG TSVTVSS
	CDR1	55	GYTFKKYG
	CDR2	56	INTNTGEP
28F5	CDR3	57	ARWYWGSTPSSYTMDY
	VL	58	QIILTQSPAIMASLSGERVTMTCTATSSSLSSYLHWYQQKP GSSPKLWIYSTSHLASGVPARFSGGGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCHQYHLSPTYFGGKLEIK
	CDR1	59	SSLSSSY
	CDR2	60	STS
	CDR3	61	HQYHLSPTY
	VH	62	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFKKYGMNWVKQ TPGKGLKWMGWINTNSGEPTYAEFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLIKNETATYFCARGAYRYDGEVSYAMDYWG QGTSTVTVSS
	CDR1	63	GYTFKKYG
GMB005	CDR2	64	INTNSGEP
	CDR3	65	ARGAYRYDGEVSYAMDY
	VL	66	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCQQRSNWPPTFGGKLEIK
	CDR1	67	QSVSSY
	CDR2	68	DAS
	CDR3	69	QQRSNWPPT
	VH	70	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGFTFNSFAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRSEDATVYFCAKDILWFGEVDFDYWGQGT LTVSSAS
	CDR1	71	GFTFNSFA
	CDR2	72	ISGSGGGT
	CDR3	73	AKDKILWFGEVDFDY

[0091]

[0092]

선호되는 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 폴리펩타이드 서열이 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11) 또는 서열번호 30 및 26 (16B5)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 VH 및 VL 가변 체인을 포함한다.

[0093]

더 선호되는 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 폴리펩타이드 서열이 각각 서열번호 14 및 10 (25A10) 또는 서열번호 62 및 58 (28F5)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 VH 및 VL 가변 체인을 포함한다.

[0094]

한 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 각각 서열번호 15-17 및 서열번호 11-13; 각각 서열번호 63-65 및 서열번호 59-62; 각각 서열번호 55-57 및 서열번호 51-53; 각각 서열번호 31-33 및 서열번호 27-29; 각각 서열번호 39-42 및 서열번호 35-37; 각각 서열번호 47-49 및 서열번호 43-45 또는 각각 서열번호 23-25 및 서열번호 19-22의 CDR들 서열들을 포함하는 VH 및 VL 가변 영역들을 포함한다.

[0095]

선호되는 예에서, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 각각 서열번호 15-17 및 서열번호 11-13; 각각 서열번호 63-65 및 서열번호 59-62; 각각 서열번호 55-57 및 서열번호 51-53 또는 각각 서열번호 31-33의 CDR들 서열들을 포함하는 VH 및 VL 가변 영역들을 포함한다.

[0096]

더 선호되는 예에서, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 각각 서열번호 15-17 및 서열번호 11-13 또는 각각 서열번호 63-65 및 서열번호 59-62의 CDR들 서열들을 포함하는 VH 및 VL 가변 영역들을 포함한다.

[0097]

CD38과 같이 병적인 세포들 및 T-세포들에 공통되는, 항원 마커를 타겟팅하는 CAR에 추가하여, 반드시 T-세포들에 의하여 발현되는 것은 아닌 다른 항원 마커들로 향해지는 추가의 CAR들을 발현시키고, 그렇게 해서 T-세포

들 특이성을 증강시키는 것이 예상된다.

- [0098] 또다른 예에서, 본 발명은 각각이 다른 세포의 리간드 결합 도메인들을 포함하는 CAR들의 군집에 대한 것이다. 특히, 본 발명은 면역 세포를 제공하는 단계 및 그 각각이 다른 세포의 리간드 결합 도메인들을 포함하는 CAR의 군집을 상기 세포의 표면에서 발현시키는 단계를 포함하는 면역 세포들의 조작 방법에 대한 것이다.
- [0099] 다중-특이적 세포들을 만들기 위하여 T-세포들에 의하여 더 발현될 수 있는 키메라 항원 수용체는 TNFRSF17 (UNIPROT Q02223), SLAMF7 (UNIPROT Q9NQ25), GPRC5D (UNIPROT Q9NZD1), FKBPI1 (UNIPROT Q9NYL4), KAMP3, ITGA8 (UNIPROT P53708), 및 FCRL5 (UNIPROT Q68SN8)와 같은 다발성 골수종 또는 림프모구(lymphoblastic) 백혈병(leukemia) 항원 마커들에 대항하여 항해지는 항원 수용체들이다.
- [0100] CD38과 동시에 또다른 특이성을 부여하기 위한 추가의 예들로서, 타겟의 항원은 분화 분자들의 임의의 클러스터 (예컨대 CD16, CD64, CD78, CD96, CLL1, CD116, CD117, CD71, CD45, CD71, CD123 및 CD138), 종양-관련 표면 항원, such as ErbB2 (HER2/neu), 암배아(carcinoembryonic) 항원 (CEA), 상피 세포 부착(adhesion) 분자 (EpCAM), 상피(epidermal) 성장인자(growth factor) 수용체 (EGFR), EGFR 변종(variant) III (EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, 디시알로강글리오사이드(disialoganglioside) GD2, 관(ductal)-상피(epithelial) 뮤신(mucine), gp36, TAG-72, 글리코스핑고리피드들(glycosphingolipids), 글리오마(glioma)-관련 항원, β -인간 융모막(chorionic) 고나도트로핀(gonadotropin), 알파페토프로틴(alphafetoprotein) (AFP), 렉틴-반응성 AFP, 티로글로불린(thyroglobulin), RAGE-1, MN-CA IX, 인간 텔로메라제 역전사효소, RU1, RU2 (AS), 장(intestinal) 카르복실 에스테라제, 무트(mut) hsp70-2, M-CSF, 프로스타제, 프로스타제(prostase) 특이적 (specific) 항원 (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-1a, p53, 프로스테인(prostein), PSMA, 생존(surviving) 및 텔로메라제(telomerase), 프로스테이트(prostate)-암종(carcinoma) 종양(tumor) 항원-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, 호중성(neutrophil) 엘라스타제(elastase), 에프린(ephlin) B2, CD22, 인슐린 성장인자(growth factor) (IGF1)-I, IGF-II, IGF1 수용체, 메소텔린(mesothelin), 종양-특이적 펩타이드 에피토프를 제시하는 주요(major) 조직 적합성(histocompatibility) 복합체(complex) (MHC) 분자, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, 종양 기질(stromal) 항원들, 파이브로넥틴(fibronectin)의 엑스트라(extra) 도메인 A (EDA) 및 엑스트라 도메인 B (EDB) 및 섬유아세포(fibroblast) 관련(associated) 단백질 (fap) 및 네타신(tenascin-C) (TnC A1)의 A1 도메인; CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)과 같은 계통(lineage)-특이적 또는 조직 특이적 항원, GM-CSF, 사이토카인 수용체들, 엔도글린(endoglin), 주요(major) 조직적합성(histocompatibility) 복합체(complex) (MHC) 분자, BCMA (CD269, TNFRSF 17), 또는 (HIV gp120와 같은) HIV-특이적 항원 ; EBV-특이적 항원, CMV-특이적 항원, HPV-특이적 항원, 라세(Lasse) 바이러스-특이적 항원, 인플루엔자 바이러스-특이적 항원과 같은 바이러스-특이적 표면 항원과 더불어 임의의 유도체 또는 이들 표면 마커들의 변종으로부터일 수 있다. 항원들은 반드시 표면 마커 항원들은 아니나, 또한 세포들의 표면에서 HLA 클래스 I에 의하여 제시되는 내생의 작은 항원들일 수 있다.
- [0101] 타겟 항원들의 하향조절 또는 돌연변이는 암 세포들에서 공통적으로 관찰되는데, 이는 항원-상실 탈출(escape) 변종들을 만들어낸다. 그러므로 종양 탈출을 상쇄하고 면역 세포를 타겟에 더 특이적으로 만들기 위하여, 본 발명에 따른 CD38 특이적 CAR는 타겟에서 다른 요소들에 동시에 결합하기 위하여 또다른 세포의 리간드-결합 도메인들을 포함할 수 있고, 이로써 면역 세포 활성화 및 기능을 증대시킨다.
- [0102] 한 예에서, 세포의 리간드-결합 도메인들은 동일한 막관통 폴리펩타이드 상에 나란히 위치될 수 있으며, 선택적으로 링커에 의하여 분리될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 다른 세포의 리간드-결합 도메인들은 CAR를 포함하는 다른 막관통 폴리펩타이드들 상에 위치할 수 있다.
- [0103] **CD38에 대한 더 낮은 친화도를 가진 CAR들**
- [0104] 또다른 예에 따라, 본 발명의 항-CD38는 CD38 항원에 대한 더 낮은 친화도를 가진 scFvs를 포함할 수 있다.
- [0105] 이러한 CAR들은 이러한 조작된 면역 세포들의 생체내 이용에 연결된 독성의 가능한 위험을 방지하기 위하여 설계된다.
- [0106] "친화도"에 의하여 항체 및 단순한 헵텐(hapten) 또는 항원 결정요인 사이의 결합 강도의 측정이 의미된다. 이론에 결합되지 않고, 친화도는 항체 조합 부위들 및 항원 결정요인들 사이의 입체화학적 어울림의 근사, 그것들 간의 접촉의 영역의 크기, 및 전하를 띠고 소수성인 그룹들의 분포에 의존한다. 친화도는 또한 되돌릴 수 있는 복합체들의 형성 후 항원-항체 결합의 강도를 가리키는 용어 "항원항체결합력(avidity)"을 포함한다. 항원에 대한 항체의 친화도의 계산 방법은 친화도를 계산하기 위한 결합 실험들의 사용을 포함하며, 당업계에 알려져 있

다. 항원 (Ag)에 결합하는 항체 (Ab)의 경우에, (도치된 해리 상수로 표현되는) 친화 상수가 사용된다. $Ab \ Ag = AbAg \ K_a = [AbAca = 1 \ [Ab]] \ [Ag] \ K$, 항체 결합의 화학적 평형은 또한 온-레이트(on-rate) ($k_{forward}$) 및 오프-레이트(off-rate) (k_{back}) 상수의 비율이다. 두 항체들은 동일한 친화도를 가질 수 있으나, 하나는 둘다 높은 온- 및 오프-레이트 상수를 가질 수 있고, 반면 다른 것은 둘다 낮은 온- 및 오프-레이트 상수를 가질 수 있다. $= k_{forward} = \text{온-레이트}$ k_{back} 오프-레이트 (예컨대 세포 용해 분석인) 기능 분석들의 항체 활성은 또한 항체 친화도를 반영한다. 본 발명의 여러가지 예들에서, 수용체를 인식하는 항원은 낮은 친화도를 갖는다. 낮은 친화도는 마이크로몰(micromolar) 및 나노몰(nanomolar) 친화도들 (예컨대 10^{-5} , 5×10^{-6} , 10^{-6} , 5×10^{-7} , 10^{-7} , 5×10^{-8} , 10^{-8} , 5×10^{-9} , 10^{-9} M)을 포함한다. 항체 및 친화도들은 (예컨대 세포 용해 분석인) 기능 분석을 이용하여 비교되고 표현형적으로 특징화될 수 있다.

- [0107] 본 발명은 또한 단일클론 2C2, 5G9, 9E2, 28B9, 26D8, 15D1, 및 23F2 항체들에 대응하는 그것들의 scFvs에 VH 및 VL 체인들을 포함하는 것들과 같은, CD38 항원에 대한 낮은 친화도를 갖는 항-CD38 CAR들을 포함한다.
- [0108] 하나의 선호되는 예에 따라, CD38 항원에 대한 낮은 친화도를 갖는 항-CD38 CAR들은 (m2C2 및 m5G9으로도 불리 는) 단일클론 2C2 또는 5G9 항체들에 대응하는 그것들의 scFvs에 VH 및 VL 체인들을 포함한다.
- [0109] 한 예에 따라, CD38 항원에 대하여 더 낮은 친화도를 보이는 상기 scFvs의 VH 및 VL은 서열번호 132 (EVKLVESGGGLVQPGGSLKSLCATSGFTFDYMFVWRQTPEKRLWVAYISNGDNTYYPDTLKGRTISRDNANNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARSISRYFDVWGAGTTVTVSS) 및 서열번호 133 (DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYVSQSIGIPSRFSGSGSGDFTLSINSVEPEDVGVYVCQNAHSFPSTFGGGTKLEIK)의 m2C2 항체의 각각 VH 및 VL 체인들에; 또는 서열번호 134 (EIHLLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNIIYVWKQSHGESLEWVGYPIDPYNGGAYYNQKFKAMATLTVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVVYCARKGVYGLAYWGQGLTVTVSS) 및 서열번호 135 (DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASESIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYASTHLADGVPSRFSGSGSGAQYSLKINSLQSEDFGSIYQCQHFHWGTPYTFGGG TKLEIK)의 m5G9 항체의 각각 VH 및 VL 체인들에 ;
- [0110] 또는 각각 VH 및 VL 체인들 of m9E2 항체 of 서열번호 142 (EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNVWKQSNKGSLWIGNIDPDYGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVVYCARGYRYGFVYWGQGLTVTVSA) 및 서열번호 143 (DIVMTQAASFNPVTLGTASASISCRSSKSLHLSNGITYLYWLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQNLPLWTFGGG TKLEIK)의 m9E2 항체의 각각 VH 및 VL 체인들에 ,
- [0111] 또는 서열번호 144 (EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYLHWMKQRPQGLEWIGRIDPANGNTKSDPKFQDKATIDADTSSNTAYLQLNSLTSEDTAVVYCAKGPWFYVWGQGLTVTVSA) 및 서열번호 145 (DIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAATSLADGVPSRFSGSGSGTKFSFKISLQAEDFVSYHCQQLYRTPLTFGGG TKLEIK)의 m28B9 항체의 각각 VH 및 VL 체인들에 ;
- [0112] 또는 서열번호 146 (QVQLQQPGAEMVRPGASVKLSCKASGYTFTDYWMHWVKQRPQGQLEWIGKIDPSDSETHYHQFKDKATLTVDKSSSTAYLQFKSLTSEDSAVHYCAREGIWLRVYAMDYWGQGSTVTVSS) 및 서열번호 147 (DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTINVAWYQQKPGQSPKALISASYSYRSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTVSSVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGG TKLEIK)의 m26D8 항체의 각각 VH 및 VL 체인들에 .
- [0113] 또는 서열번호 148 (EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYSITDYNMHWVKQSHGKSLWIGYIDPDNGATNNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCARSEG YQYYYAMDYWGQGSTVTVSS) 및 서열번호 149 (DIVMTQAASFNPVALGTASISCSKSLHLSNGITYLHWYLRPGQSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQMVERPWTFGGG TKLEIK)의 m15D1 항체의 각각 VH 및 VL 체인들에 ,
- [0114] 또는 서열번호 150 (QVQVQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINVWKQRPQGQLEWIGNIYPGSSSTNHNEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSDSAVYVCARRGSSPSYTM DYWGQGSTVTVSS) 및 서열번호 151 (DIVLTQSPASLAVALGQRATISCRASKSVSTFGYSYMHYQQKPGQAPKLLIYASNLESQVPRFSGSGSGTDFTLKIHPVEEEDAATYYCLHSRELPTWTFGGG TKLEIK)의 m23F2 항체의 각각 VH 및 VL 체인들에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%

동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

- [0115] 신호되는 예에 따라, CD38 항원에 대한 더 낮은 친화도를 보이는 상기 scFvs의 VH 및 VL은 각각 서열번호 132 (EVKLVESGGGLVQPGGSLKSLCATSGFTFSDYYMFVWRQTPEKRLWVAYISNGDGNTYYPDTLKGRFTISRDNANNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARSISRFDVWGAGTTTVSS) 및 서열번호 133 (DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYVSQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVIYCCQNAHSFPSTFGGGTKLEIK)의 m2C2 항체의 VH 및 VL 체인들; 및 각각 서열번호 134 (EIHLLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNIIYVWKQSHGESLEWVGYPYNGGAYYNQKFKAMATLTVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVYYCARKGVYGLAYWGQGLTVTVSS) 및 서열번호 135 (DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASESIYSLAWYQQKQKSPQLLVYASTHLADGVPSRFSGSGSGAQYSLKINSLSQSEDFGSIYCCQHFHWGTPYTFGGGTKLEIK)의 m5G9 항체의 VH 및 VL 체인들에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0116] 한 예에 따라, 본 발명의 CD38 항원에 대한 낮은 친화도를 갖는 항-CD38 CAR들은 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL, 힌지, 막관통 도메인, 신호전달 도메인 -바람직하게는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인, 및 -바람직하게는 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0117] 이때 상기 VH 및 VL 은 각각 서열번호 132 (EVKLVESGGGLVQPGGSLKSLCATSGFTFSDYYMFVWRQTPEKRLWVAYISNGDGNTYYPDTLKGRFTISRDNANNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARSISRFDVWGAGTTTVSS) 및 서열번호 133 (DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYVSQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVIYCCQNAHSFPSTFGGGTKLEIK)의 m2C2 항체의 VH 및 VL 체인들에 대하여; 그리고 각각 서열번호 134 (EIHLLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNIIYVWKQSHGESLEWVGYPYNGGAYYNQKFKAMATLTVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVYYCARKGVYGLAYWGQGLTVTVSS) 및 서열번호 135 (DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASESIYSLAWYQQKQKSPQLLVYASTHLADGVPSRFSGSGSGAQYSLKINSLSQSEDFGSIYCCQHFHWGTPYTFGGGTKLEIK)의 m5G9 항체의 VH 및 VL 체인들에 대하여 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0118] 특정 예에 따라, 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0119] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 132 (EVKLVESGGGLVQPGGSLKSLCATSGFTFSDYYMFVWRQTPEKRLWVAYISNGDGNTYYPDTLKGRFTISRDNANNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARSISRFDVWGAGTTTVSS) 및 서열번호 133 (DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQISDFLHWYQQKSHESPRLLIKYVSQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVIYCCQNAHSFPSTFGGGTKLEIK)의 m2C2 항체의 VH 및 VL 체인들에 대하여; 그리고 각각 서열번호 134 (EIHLLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNIIYVWKQSHGESLEWVGYPYNGGAYYNQKFKAMATLTVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVYYCARKGVYGLAYWGQGLTVTVSS) 및 서열번호 135 (DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASESIYSLAWYQQKQKSPQLLVYASTHLADGVPSRFSGSGSGAQYSLKINSLSQSEDFGSIYCCQHFHWGTPYTFGGGTKLEIK)의 m5G9 항체의 VH 및 VL 체인들에 대하여 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0120] 더 특정 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 (각각 m5G9 버전들 V1, V2 및 V3에 대응하는) 서열번호 136-138 에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0121] 또다른 더 특정 예에 따라, 본 발명의 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 (각각 m2C2 버전들 V1, V2 및 V3에 대응하는) 서열번호 139-141에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0122] 또다른 예에 따라, 본 발명의 면역 세포는 CD38 항원에 대한 낮은 친화도를 갖는 항-CD38 CAR를 발현시키기 위하여 조작된다.
- [0123] 또다른 예에 따라, CD38 항원에 대한 낮은 친화도를 갖는 항-CD38 CAR을 발현시키기 위하여 조작되는 면역 세포

는 녹아웃(knock-out)에 의하여, 바람직하게는 희귀 절단 엔도뉴클레아제를 이용함으로써 불활성화된 그것의 내생의 CD38 유전자를 갖도록 더 조작된다.

[0124] **막관통 도메인**

[0125] 본 발명에 따른 CAR는 세포 표면 막 상에 발현된다. 그러므로 이러한 CAR는 막관통 도메인을 더 포함한다. 적절한 막관통 도메인들의 구별되는 특징들은 바람직하게는 본 발명의, 세포, 면역 세포, 특히 림프구 세포들 또는 자연 살해(NK) 세포들,의 표면에서 발현되고, 그리고 미리정해진 타겟 세포에 대항하여 면역 세포의 세포 반응을 향하도록 서로 상호작용하는 능력을 포함한다. 막관통 도메인은 자연 또는 합성 소스로부터 유래될 수 있다. 막관통 도메인은 임의의 막-부착 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 제한되지 않는 예들로서, 막관통 폴리펩타이드는 α , β , γ 또는 ϵ 와 같은 T-세포 수용체의 서브유닛, CD3 복합체를 이루는 폴리펩타이드, IL2 수용체 p55 (α chain), p75 (β chain) 또는 γ 체인, Fc 수용체들, 특히 Fc γ 수용체 III의 서브유닛 체인 또는 CD 단백질일 수 있다. 대체하여 막관통 도메인은 합성일 수 있고 류신 및 발린과 같은 대부분 소수성 잔기들을 포함할 수 있다. 선호되는 예에서 상기 막관통 도메인은 인간 CD8 알파 체인 (예컨대 NP_001139345.1)으로부터 유래된다.

[0126] 본 발명에 따른 CAR는 CD8 α 및 4-1BB 그리고 더욱 특히 CD8 α 와 같은 막관통 도메인(TM)을 보통 더 포함하고, 이는 서열번호 79에 대하여 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보인다.

[0127] 막관통 도메인은 상기 세포의 리간드-결합 도메인 and 상기 막관통 도메인 사이의 힌지 영역을 더 포함할 수 있다.

[0128] 힌지

[0129] 여기에서 사용되는 용어 "힌지 영역"은 세포의 리간드-결합 도메인에 막관통 도메인을 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩타이드를 보통 의미한다. 특히 힌지 영역은 더 많은 가요성 및 세포의 리간드-결합 도메인에 대한 접근가능성을 제공하기 위하여 사용된다. 힌지 영역은 300 아미노산들까지, 바람직하게는 10 내지 100 아미노산들 그리고 가장 바람직하게는 25 내지 50 아미노산들을 포함할 수 있다. 힌지 영역은 CD8, CD4 또는 CD28의 세포의 영역의 전체 또는 부분, 또는 항체 불변 영역의 전체 또는 부분과 같은 자연적으로 발생하는 분자들의 전체 또는 부분으로부터 유래될 수 있다. 대체하여 힌지 영역은 자연적으로 발생하는 힌지 서열에 대응하는 합성 서열일 수 있고, 또는 완전한 합성 힌지 서열일 수 있다. 선호되는 예에서 상기 힌지 도메인은 각각 서열번호 77, 서열번호 76 및 서열번호 78로 이 명세서에서 언급되는 인간 CD8 알파 체인, Fc γ RIII α 수용체 또는 IgG1의 부분 또는 이들 폴리펩타이드들과 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 % 97 % 또는 99 % 서열 동일성을 보이는 힌지 폴리펩타이드들을 포함한다.

[0130] 세포내 도메인

[0131] 본 발명에 따른 CAR의 신호 전달(transducing) 도메인 또는 세포내 신호전달 도메인은 세포의 리간드 결합 도메인의 결합 후 세포내 신호전달의 원인이 되며, 면역 반응 및 면역 세포의 활성화를 야기한다. 다시 말해서, 신호 전달 도메인은 CAR가 발현되는 면역 세포의 정상적인 효과기 기능들 중 적어도 하나의 활성화의 원인이 된다. 예컨대, T 세포의 효과기 기능은 사이토카인들의 분비를 포함하는 헬퍼 활성 또는 세포용해 활성일 수 있다. 그러므로, 용어 "신호 전달 도메인"은 효과기 신호 기능에 신호를 전달하고 특별화된 기능을 수행하기 위하여 세포로 향하는 단백질의 부분을 가리킨다.

[0132] CAR에서의 사용을 위한 신호 전달 도메인의 바람직한 예들은 항원 수용체 조립 후 신호 전달을 시작하기 위하여 일제히 작용하는 공-수용체들 및 T 세포 수용체의 세포질 서열들, 더불어 이들 서열들의 임의의 유도체 또는 변종 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열일 수 있다. 신호 전달 도메인은 세포질 신호전달 서열의 두 개의 구별되는 종류들, 항원-독립적 일차 활성화를 시작하는 것들 및 이차 또는 공-자극 신호를 제공하기 위하여 항원-독립적 방식으로 작용하는 것들을 포함한다. 일차 세포질 신호전달 서열은 ITAM들의 면역수용체 티로신-기반의 활성화 모티프들로 알려진 신호전달 모티프들을 포함할 수 있다. ITAM들은 syk/zap70 클래스 티로신 키나제들에 대한 결합 부위들로 작용하는 여러가지 수용체들의 세포질내 꼬리에서 발견되는 잘 정의된 신호전달 모티프들이다. 본 발명에서 사용되는 ITAM의 예들은 TCR제타, FcR감마, FcR베타, FcR엡실론(epsilon), CD3감마, CD3델타, CD3엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래되는 것들을 제한되지 않는 예들로서 포함할 수 있다. 선호되는 예에서, CAR의 신호 전달 도메인은 서열번호: 81의 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 % 97 % 또는 99 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CD3제타 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

- [0133] 특정 예에서 본 발명의 CAR의 신호 전달 도메인은 공-자극 신호 분자를 포함한다. 공-자극 분자는 효과적인 면역 반응에 요구되는 항원 수용체 또는 그것들의 리간드들 외 세포 표면 분자이다. "공-자극 리간드"는 T-세포 상 동계(cognate) 공-자극 분자에 특이적으로 결합하여, 이로써 예컨대, TCR/CD3 복합체가 펩타이드가 로드(load)된 MHC 분자에 결합함으로써 제공되는 일차 신호에 추가하여, 증식 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공하는 세포 상 분자를 가리킨다. 공-자극 리간드는 CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성(inducible) 공자극 리간드 (ICOS-L), 세포간 부착 분자 (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, 림포톡신(lymphotoxin) 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, Toll 리간드 수용체에 결합하는 항체 또는 작용제 및 B7-H3에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 공-자극 리간드는 또한 그 중에서도 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능(function)-관련(associated) 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, CD83와 특이적으로 결합하는 리간드와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, T 세포 상 존재하는 공-자극 분자와 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.
- [0134] "공-자극 분자"는 공-자극 리간드와 특이적으로 결합하여, 이로써 증식을 포함하나 이에 제한되지 않는 공-자극 반응을 매개하는 T-세포 상 동계(cognate) 결합 파트너를 가리킨다. 공-자극 분자들은 MHC 클래스 I 분자, BTLA 및 Toll 리간드 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 공-자극 분자들의 예들은 CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능(function)-관련(associated) 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다.
- [0135] 선호되는 예에서, 본 발명의 CAR의 신호 전달 도메인은 4-1BB (GenBank: AAA53133.)의 단편 및 CD28 (NP_006130.1)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 공-자극 신호 분자의 부분을 포함한다. 특히 본 발명의 CAR의 신호 전달 도메인은 서열번호: 80으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 % 97 % 또는 99 % 서열 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0136] 멀티-서브유닛 CAR
- [0137] T-세포들에 도입되는 선행기술로부터의 키메라 항원 수용체들은 신호전달 도메인들의 일련의 첨부를 필요하게 만드는 단일 체인 폴리펩타이드들로 형성되어 왔다. 그러나, 그것들의 막인접(juxtamembrane) 위치로부터 신호 전달 도메인들을 옮김으로써 그것들의 기능을 방해한다. 이 문제점을 극복하기 위하여, 출원인은 모든 관련 신호 전달 도메인들의 정상적인 막인접 위치들을 가능하게 하기 위하여 Fc ϵ RI로부터 유래된 멀티-체인 CAR를 최근에 설계한다 (도 18). 이 새로운 아키텍처에서, Fc ϵ RI 알파 체인의 높은 친화도 IgE 결합 도메인은 세포 타겟들에 대항하여 T-세포 특이성을 방향전환하기 위하여 scFv와 같은 세포의 리간드-결합 도메인에 의하여 대체되고 Fc ϵ RI 베타 체인의 N 및/또는 C-말단들 꼬리들은 정상적인 막인접 위치들에서 공자극 신호들을 놓는데 사용된다. 멀티-체인 CAR (mcCAR) 구조체는 도 19에 도시된 것과 같이 폴리시스트론성(polycistronic) 구조체를 가질 수 있다.
- [0138] 따라서, 본 발명에 따른 조작된 T-세포에 의하여 발현되는 CAR는 특히 본 발명의 조작된 T-세포들의 생산 및 확장에 적응된 멀티-체인 키메라 항원 수용체 (CAR)일 수 있다. 이러한 멀티-체인 CAR들은 하기 구성요소들 중 적어도 둘을 포함한다:
- [0139] a) 세포의 리간드-결합 도메인 및 Fc ϵ RI 알파 체인의 막관통 도메인을 포함하는 하나의 폴리펩타이드,
- [0140] b) Fc ϵ RI 베타 체인의 막관통 도메인 및 N- and C- 말단 세포질 꼬리 의 부분을 포함하는 하나의 폴리펩타이드 및/또는
- [0141] c) Fc ϵ RI 감마 체인의 막관통 도메인 및 세포질내 꼬리의 부분을 각각 포함하여, 이로써 다른 폴리펩타이드들이 다이머, 트리머 또는 테트라머 CAR를 형성하도록 서로 동시에 다합체화하는 적어도 두 개의 폴리펩타이드들.
- [0142] 이러한 아키텍처들에 따라, 리간드들 결합 도메인들 및 신호전달 도메인들은 분리된 폴리펩타이드들과 관련된다. 다른 폴리펩타이드들은 인접하여 막 내로 앵커(anchor)되어, 서로 상호작용을 가능하게 한다. 이러한 아키텍처들에서, 신호전달 및 공-자극 도메인들은 공-자극 도메인들의 개선된 기능을 가능하게 하는 것으로 여겨지는 (즉 그것의 안쪽 상 세포막에 인접한) 막인접 위치들에 있을 수 있다. 멀티-서브유닛 아키텍처는 또한 더 큰 가요성 및 T-세포 활성화에 더 큰 통제를 갖고 CAR들을 설계하는 가능성을 제공한다. 예컨대, 멀티-특이적 CAR 아키텍처를 수득하기 위하여 다른 특이성을 갖는 몇몇 세포의 항원 인식 도메인들을 포함하는 것이 가능하다. 멀티-체인 CAR 내로 다른 서브유닛들 사이의 상대적 비율을 통제하는 것 또한 가능하다. 이 타입의 아키텍처

텍처는 PCT/US2013/058005 (W02014/039523)에 본 출원인에 의하여 최근 기재되었다.

- [0143] 예컨대, 신호전달 및 공-자극 도메인들로 융합되는 높은 친화도 수용체 for IgE (Fc ϵ RI) (Metzger, Alcaraz et al. 1986)의 다른 알파, 베타 및 감마 체인들을 이용함으로써 단일 멀티-체인 CAR의 부분으로서 다른 체인들의 조립이 가능하게 만들어진다. 감마 체인은 하나의 면역수용체 티로신-기반의 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 막관통 영역 및 세포질 꼬리를 포함한다 (Cambier 1995).
- [0144] 멀티-체인 CAR는 타겟의 다른 구성요소들에 동시에 결합하여 이로써 면역 세포 활성화 및 기능을 증강시키기 위하여 몇몇 세포의 리간드-결합 도메인들을 포함할 수 있다. 한 예에서 세포의 리간드-결합 도메인들은 막관통 폴리펩타이드 상에 나란히 위치될 수 있고 선택적으로 링커에 의하여 분리될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 다른 세포의 리간드-결합 도메인들은 멀티-체인 CAR를 포함하는 다른 막관통 폴리펩타이드들 상에 위치될 수 있다. 또다른 예에서, 본 발명은 각각 하나의 다른 세포의 리간드 결합 도메인들을 포함하는 멀티-체인 CAR들의 군집에 대한 것이다. 특히, 본 발명은 면역 세포를 제공하는 단계 및 각각이 다른 세포의 리간드 결합 도메인들을 포함하는 멀티-체인 CAR의 군집을 상기 세포의 표면에서 발현시키는 단계를 포함하는 면역 세포들의 조작 방법에 대한 것이다. 또다른 특정 예에서, 본 발명은 면역 세포를 제공하는 단계 및 각각이 다른 세포의 리간드 결합 도메인들을 포함하는 멀티-체인 CAR의 군집을 포함하는 폴리펩타이드들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드들을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 면역 세포들의 조작 방법에 대한 것이다. 특정 예에서 면역 세포의 조작 방법은 적어도 신호-전달 도메인에 융합되는 Fc ϵ RI 베타 및/또는 감마 체인의 부분 및 다른 세포의 리간드 결합 도메인들에 융합되는 Fc ϵ RI 알파 체인들의 몇몇 부분을 세포의 표면에서 발현시키는 단계를 포함한다. 더 특정 예에서, 상기 방법은 신호-전달 도메인에 융합되는 Fc ϵ RI 베타 및/또는 감마 체인의 부분 및 다른 세포의 리간드 결합 도메인들에 융합되는 몇몇 Fc ϵ RI 알파 체인들을 코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입시키는 단계를 포함한다. 멀티-체인 CAR들의 군집에 의하여, 각각이 다른 세포의 리간드 결합 도메인들을 포함하는 적어도 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯 또는 그보다 많은 멀티-체인 CAR들이 의미된다. 본 발명에 따른 다른 세포의 리간드 결합 도메인들은 바람직하게는 타겟 내 다른 구성요소들에 동시에 결합하여 이로써 면역 세포 활성화 및 기능을 증강시킨다.
- [0145] 본 발명은 또한 그 각각이 다른 세포의 리간드 결합 도메인들을 포함하는 멀티-체인 CAR들의 군집을 포함하는 분리된 면역 세포에 대한 것이다.
- [0146] 본 발명의 멀티-체인 CAR의 신호 전달 도메인 또는 세포내 신호전달 도메인은 세포의 리간드 결합 도메인이 타겟에 결합한 후 세포내 신호전달의 원인이 되며, 면역 반응 및 면역 세포의 활성화를 야기한다. 다시 말해서, 신호 전달 도메인은 그 안에서 멀티-체인 CAR가 발현되는 면역 세포의 정사적인 효과기 기능들 중 적어도 하나의 활성화의 원인이 된다. 예컨대, T 세포의 효과기 기능은 사이토카인들의 분비를 포함하는 헬퍼 활성화 또는 세포용해 활성화일 수 있다.
- [0147] 본 출원에서, 용어 "신호 전달 도메인"은 효과기 신호 기능 신호를 전달하고 세포가 특화된 기능을 수행하도록 향하는 단백질의 부분을 가리킨다.
- [0148]
- [0149] 단일 또는 멀티-체인 CAR에서의 사용을 위한 신호 전달 도메인의 선호되는 예들은 항원 수용체 조립 후 일체화 신호 전달을 시작하도록 작용하는 공-수용체들 및 T 세포 수용체 또는 Fc 수용체의 세포질 서열들, 그리고 이들 서열들의 임의의 유도체 또는 변종 및 동일한 기능적 가능성으로 작용하는 임의의 합성 서열일 수 있다. 신호 전달 도메인은 세포질 신호전달 서열의 두 개의 구분되는 종류들, 항원-의존적 일차 활성화를 시작하는 것들, 및 이차 또는 공-자극 신호를 제공하기 위하여 항원-독립적 방식으로 작용하는 것들을 포함한다. 일차 세포질 신호전달 서열은 ITAM들의 면역수용체 티로신-기반의 활성화 모티프들로 알려진 신호전달 모티프들을 포함할 수 있다. ITAM들은 syk/zap70 클래스 티로신 키나제들에 대한 결합 부위들로서 작용하는 여러가지 수용체들의 세포질내 꼬리에서 발견되는 신호전달 모티프들로 잘 정의된다. 본 발명에서 사용되는 ITAM의 예들은 TCR제타, FcR 감마, FcR베타, FcR엡실론, CD3감마, CD3델타, CD3엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래되는 것들을 제한되지 않는 예들로서 포함할 수 있다. 선호되는 예에서, 멀티-체인 CAR의 신호전달 전달 도메인은 CD3제타 신호전달 도메인, 또는 Fc ϵ RI 베타 또는 감마 체인들의 세포질내 도메인을 포함할 수 있다.
- [0150] 특정 예에서 본 발명의 멀티-체인 CAR의 신호 전달 도메인은 공-자극 신호 분자를 포함한다. 공-자극 분자는 효과적인 면역 반응에 요구되는 항원 수용체 또는 그것들의 리간드들 외 세포 표면 분자이다.
- [0151] 리간드 결합-도메인들은 문헌에서 언급된 단일-체인 CAR와 관련하여 언급된, 그리고 앞서 사용된 임의의 항원

수용체일 수 있다. WO 2014/4011988에 기재된 대로 이중특이적 또는 멀티-특이적 CAR들이 참고로서 포함된다.

- [0152] 단일-체인 CAR들에 대하여 앞서 기재된 것과 유사하게, 본 발명은 CD38 세포 표면 마커를 특이적으로 타겟팅하는 멀티-체인 CAR들을 지닌 것으로 여겨지는 면역 세포들을 포함한다. 본 발명의 선호되는 예에 따라, 앞서 기재된 CAR들은 면역 세포들에서 발현되는 반면, 상기 표면 마커를 코딩하는 내생 유전자들의 불활성화는 희귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현에 의하여 유도된다.
- [0153] 선호되는 예에 따라, 본 발명의 멀티-체인 CAR (mcCAR)는 세포의 CD38 리간드 결합 도메인에 융합되는 높은-친화도 IgE 수용체 (Fc ϵ RI)의 알파 체인으로부터의 막관통 폴리펩타이드에서 포함한다.
- [0154] 더 선호되는 예에 따라, 상기 항-CD38 멀티-체인 CAR는 신호 전달 도메인에 융합되는 Fc ϵ RI의 감마 또는 베타 체인 으로부터의 두 번째 막관통 폴리펩타이드를 더 포함한다.
- [0155] 더욱 더 선호되는 예에 따라, 상기 항-CD38 멀티-체인 CAR은 공-자극 도메인을 포함하는 Fc ϵ RI의 감마 또는 베타 체인 으로부터의 세 번째 막관통 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0156] 선호되는 예에 따라, 이때 상기 알파 체인 of Fc ϵ RI에 융합되는 상기 항-CD38 mcCAR의 상기 CD38 리간드 결합 도메인은 CD38에 특이성을 부여하는 무거운 (VH) 그리고 가벼운 (VL) 체인들을 포함하는 단일-체인 가변 (variable) 단편(fragment) (scFv)이다.
- [0157] 더 선호되는 예에서, 상기 항-CD38 mcCAR의 상기 VH는 서열번호 14, 62, 54 및 30로부터 선택되는 하나와 적어도 90 % 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0158] 또다른 더 선호되는 예에서, 상기 항-CD38 mcCAR의 상기 VL은 서열번호 10, 58, 50 및 26로부터 선택되는 하나에 대하여 적어도 90 % 동일성을 보이는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0159] 한 예에서, 상기 항-CD38 mcCAR의 Fc ϵ RI의 상기 알파 체인은 CD8 α , IgG1 또는 FcRIII α 단백질들로부터의 힌지에 의하여 상기 세포의 리간드-결합 도메인에 융합된다.
- [0160] 한 예에서, 상기 항-CD38 mcCAR의 상기 신호 전달 도메인은 TCR 제타 체인, FC ϵ R β 체인, Fc ϵ RI γ 체인 으로부터의 Fc ϵ RI의 감마 또는 베타 체인에 융합되거나 또는 면역수용체 티로신-기반의 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다.
- [0161] 선호되는 예에서, 상기 항-CD38 mcCAR 의 상기 신호 전달 도메인은 CD3제타로부터이고, 그리고 바람직하게는 서열번호 81에 적어도 90 % 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0162] 한 예에서, 상기 항-CD38 mcCAR의 상기 두 번째 또는 세 번째 폴리펩타이드는 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능(function)-관련(associated) 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, CD8, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83에 특이적으로 결합하는 리간드, 및 그것의 임의의 조합 으로부터 선택되는 공자극 분자의 세포질 도메인 으로부터의 공-자극 도메인을 포함한다.
- [0163] 선호되는 예에서, 상기 공-자극 도메인은 4-1BB로부터이고 서열번호 80에 대하여 적어도 90 % 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0164] 본 발명에 따른 CD38 특이적 멀티-체인 CAR 의 다른 아키텍처들의 예들은 도 20에 나타난다.
- [0165] 세 개 폴리펩타이드 감마, 알파 및 베타를 포함하는 예시적 항-CD38 mcCAR의 구축들(Constructions)은 하기 표 3에 제시된다.
- [0166] 표 3: 항-CD38 멀티-체인 CAR들을 형성하는 예시적 폴리펩타이드들

표 3

멀티체인 CAR 지정	전구체 BCMA 멀티-체인 CAR 폴리펩타이드 구조체												
	감마 폴리펩타이드				알파 폴리펩타이드							베타 폴리펩타이드	
	FcεRI γ-SP	FcεRI γ-ΔITAM	CD3ζ-IC	P2A	FcεRI α-SP	CD8α hinge	VH	G4Sx3 Linker	VL	FcεRI α-TM-IC	T2A	FcεRIγΔITAM	공-자극 도메인
25A10 항-CD38mcCAR (4-1BB 공자극도메인)	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 10	서열번호 108	서열번호 110	서열번호 77	서열번호 14	서열번호 75	서열번호 10	서열번호 111	서열번호 109	서열번호 112	SEQ ID NO.80
28F5 항-CD38mcCAR (4-1BB 공자극도메인)	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 10	서열번호 108	서열번호 110	서열번호 77	서열번호 62	서열번호 75	서열번호 58	서열번호 111	서열번호 109	서열번호 112	SEQ ID NO.80
13F11 항-CD38mcCAR (4-1BB 공자극도메인)	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 10	서열번호 108	서열번호 110	서열번호 77	서열번호 54	서열번호 75	서열번호 50	서열번호 111	서열번호 109	서열번호 112	SEQ ID NO.80
16B6 항-CD38mcCAR (4-1BB 공자극도메인)	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 10	서열번호 108	서열번호 110	서열번호 77	서열번호 30	서열번호 75	서열번호 26	서열번호 111	서열번호 109	서열번호 112	SEQ ID NO.80
25A10 항-CD38mcCAR (CD28 공자극도메인)	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 10	서열번호 108	서열번호 110	서열번호 77	서열번호 14	서열번호 75	서열번호 10	서열번호 111	서열번호 109	서열번호 112	서열번호 113

28F5 항-CD38mcCAR (CD28 공자극도메인)	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 10	서열번호 108	서열번호 110	서열번호 77	서열번호 62	서열번호 75	서열번호 58	서열번호 111	서열번호 109	서열번호 112	서열번호 113
13F11 항-CD38mcCAR (CD28 공자극도메인)	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 10	서열번호 108	서열번호 110	서열번호 77	서열번호 54	서열번호 75	서열번호 50	서열번호 111	서열번호 109	서열번호 112	서열번호 113
16B6 항-CD38mcCAR (CD28 공자극도메인)	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 10	서열번호 108	서열번호 110	서열번호 77	서열번호 30	서열번호 75	서열번호 26	서열번호 111	서열번호 109	서열번호 112	서열번호 113

T 세포들의 활성화 및 확장

본 발명에 따른 방법은 일반적으로 T-세포들의 활성화 및/또는 확장의 추가 단계를 포함한다. 이것은 예컨대, U.S. Patents 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; and U.S. Patent Application PublicationNo. 20060121005에 기재된 바와 같은 방법들을 이용하여, T 세포들의 유전적 변형의 전 또는 후에 이루어질 수 있다. 이들 방법들에 따라, 본 발명의 T 세포들은 T 세포들의 표면 상에서 공-자극 분자를 자극하는 리간드 및 CD3 TCR 복합체 관련 신호를 자극하는 제제를 부착되는 표면과의 접촉에 의하여 확장될 수 있다.

특히, T 세포 군집들은 항-CD3 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 또는 표면에 고정된 항-CD2 항체와의 접촉에 의하여, 또는 칼슘 이노포어(ionophore)와 함께 단백질 키나제 C 활성화인자(activator) (예컨대 브리오스타틴(bryostatin))과의 접촉에 의하여와 같은 인 비트로(in viro)에서 자극될 수 있다. T 세포들의 표면 상 악세서리(accessory) 분자의 공-자극을 위하여 악세서리 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예컨대, T 세포들의 군집은 T 세포들의 증식을 자극하는데 적합한 조건 하, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4+ T 세포들 또는 CD8+ T 세포들의 증식을 자극하기 위하여, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체. 예컨대, 각 신호를 제공하는 제제가 표면에 커플링되어 또는 용액으로 있을 수 있다. 당업자가 쉽게 인식할 수 있기 때문에, 세포들에 대한 입자들의 비율은 타겟 세포에 상대적인 입자 크기에 의존할 것이다. 본 발명의 추가의 예에서, T 세포들과 같은 세포들은 제제-코팅된 비드들과 결합되고, 비드들 및 세포들은 그 다음에 분리되고, 그리고나서 세포들이 배양된다. 대체의 예에서, 배양 전, 제제-코팅된 비드들 및 세포들이 분리되지는 않으나 함께 배양되지는 않는다. 세포 표면 단백질들은 항-CD3 및 항-CD28가 결합하는 (3x28 비드들) 상자성 비드들이 T 세포들에 결합하는 것을 가능하게 함으로써 연결(ligate)될 수 있다. 한 예에서 세포들 (예컨대, 4 내지 10 T 세포들) 및 비드들 (예컨대, 1:1의 비율로 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드들)은 버퍼 바람직하게는 (칼슘 및 마그네슘과 같은 이가 양이온들이 없는) PBS에서 조합된다. 다시, 당업자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있다는 것을 쉽게 인식할 것이다. 혼합물은 몇 시간 (약 3 시간) 내지 약 14일 동안 또는 그 사이의 임의의 시간적인 정수값

으로 배양될 수 있다. 또다른 예에서, 혼합물은 21일 동안 배양될 수 있다. T 세포 배양에 적합한 조건들은 (예컨대 소태아 또는 인간 혈청인) 혈청, 인터루킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN-g , IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, - 2, IL-15, TGFp, 및 TNF- 또는 당업자에게 알려진 세포들의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제들을 포함하는, 증식 및 생존 능력에 필요한 인자들을 포함할 수 있는 적합한 배지 (예컨대 Minimal Essential Media 또는 RPMI Media 1640 또는, X-vivo 5, (Lonza)) 를 포함할 수 있다. 세포들의 성장을 위한 다른 첨가제들은 계면활성제, 플라스마네이트(plasmanate) 및 N-아세틸-시스테인(cysteine) 및 2-머캅토에탄올(mercaptoethanoi)과 같은 환원제들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 배지는 첨가된 아미노산들, 나트륨(sodium) 피루베이트(pyruvate) 및 비타민들, 적합한 양의 혈청(또는 혈장)이 보충되거나 무-혈청 또는 호르몬들의 정의된 세트 및 /또는 T 세포들의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토카인(들)과 함께 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1 , 및 X-Vivo 20, 옵티마이저(Optimizer)를 포함할 수 있다. 예컨대, 페니실린 및 스트렙토마이신과 같은 항생제들이 실험 배양에만 포함되고, 대상에 주입되는 세포들의 배양에는 포함되지 않는다. 타겟 세포들은 성장을 지지하는데 필요한 조건들, 예컨대, 적당한 온도 (예컨대 37 ℃) 및 대기 (예컨대, 공기 플러스 5% CO₂) 하 유지된다. 여러가지 자극 시간들에 노출되어 온 T 세포들은 다른 특성들을 보일 수 있다.

[0172] 또다른 특정 예에서, 상기 세포들은 조직 또는 세포들과 공-배양함으로써 확장될 수 있다. 상기 세포들은 또한 인 비보, 예를 들어 대상 내로 상기 세포를 투여한 후 대상의 혈액에서 확장될 수 있다.

[0173] 한 예에서, 본 발명의 상기 T 세포들은 활발한(robust) 인 비보에서 T 세포 확장을 겪을 수 있고, 연장된 시간 동안 계속할 수 있다.

[0174] 한 예에 따라, 본 발명의 T 세포들은 환자에게 투여 후 활발한(robust) 생체내(in vivo) T 세포 확장을 겪을 수 있고, 연장된 양의 시간, 바람직하게는 한 주, 더욱 바람직하게는 두 주 동안, 더욱 더 바람직하게는 적어도 한 달 동안 체액에서 계속될 수 있다. 본 발명에 따른 T-세포들이 이들 기간들 동안 계속될 것으로 예상되는데도 불구하고, 환자의 신체 내로의 그것들의 수명은 일년, 바람직하게는 6 달, 더욱 바람직하게는 2 달, 그리고 더욱 더 바람직하게는 한 달을 초과하지 않도록 의도된다.

[0175] 불활성화 of CD38 항원의 유전자 불활성화

[0176] 항원 마커 CD38은 이론적이 아니라, 특히 백혈병 병적인 세포들과 관련하여 잠시 동안 진단 방법들에서 특이적 마커들로서 사용되어 왔다. 정말, 이 마커가 매우 특이적 마커로서 당업계에서 확인되었음에도 불구하고, 이 마커에 대항하여 향해지는 항체들이 환자들의 T-세포들을 파괴하거나 또는 이것들을 방해하기 때문에 면역요법에 대한 타겟으로 사용될 수는 없었다.

[0177] 첫 번째 예에서, 본 발명의 방법은 하기 단계를 포함하는 면역요법을 위한 적절한 면역 세포들, 바람직하게는 T-세포들을 제조하는 방법에 대한 것이다:

[0178] (a) CD38 항원 마커가 발현 또는 제시에 관여되는, 면역 세포에서 CD38 유전자를 코드하는 유전자를 유전적으로 불활성화 또는 돌연변이시키는 단계로, 상기 CD38 항원 마커는 상기 면역 세포 및 병적인 세포 표면 상 둘다에 제시된다;

[0179] (b) 앞 섹션들에서 제시된 것과 같은 상기 CD38 항원 마커에 대항하여 향해지는 키메라 항원 수용체를 코드하는 이식유전자를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계로, 상기 항원 마커는 상기 병적인 세포의 표면에서 제시된다

[0180] 또다른 예에서, 면역요법을 위한 적당한 면역 세포들, 바람직하게는 T-세포들을 발현시키는 CD38 항원-불활성화된 그리고 CD38 CAR를 조작하는 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0181] (a) 또다른 유전자 또는 other 유전자들의 불활성화 또는 돌연변이와 조합하여, 본 발명에 기재된 대로 면역 세포에서 CD38 유전자를 코드하는 유전자를 유전적으로 불활성화시키거나 또는 돌연변이시키는 단계로; 상기 유전자(들)은 면역억제제에 대한 내성을 부여하거나 약물 내성을 부여하는데 있어, 면역 체크포인트들로서 동종이계 면역 세포들의 이식에 수반되는 유전자(들) 로 구성되는 군으로부터 선택된다;

[0182] (b) 청구항 1 및 다른 섹션들에 기재된 것과 같이 상기 CD38 항원 마커에 대항하여 향해지는 키메라 항원 수용체를 코드하는 이식유전자를 상기 면역 세포 내에서 발현시키는 단계.

[0183] 특정 예에서, 세포들을 조작하기 위하여 상기 방법은 하기 단계들 중 적어도 하나를 포함한다:

[0184] (a) 혈액 샘플로부터 면역 세포, 바람직하게는 T-세포를 제공하는 단계;

- [0185] (b) 각각 DNA 절단(cleavage)에 의하여, 바람직하게는 이중-가닥 손상에 의하여 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 상기 면역 세포 내로 도입하는 단계:
- [0186] - CD38 항원을 코딩하는 상기 유전자, 및
- [0187] - 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 또는 약물 내성을 부여하는, 면역 체크포인트들로서, 동종이계 면역 세포들의 이식에 수반되는 요소를 코딩하는 적어도 하나의 유전자.
- [0188] (c) 상기 세포들을 확장시키는 단계.
- [0189] 선호되는 예에서, 단계 a) 동안 불활성화되거나 돌연변이되는 상기 추가적인 유전자(들)은 TCR, 베타2M, PD-1, CTLA-4, dCK, DHFR, MGMT, IMPDH2, MDR1, CD52, GR로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0190] 또다른 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제, TALE-뉴클레아제, Casp9 뉴클레아제 또는 Cpf1 뉴클레아제일 수 있다. 선호되는 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제이다.
- [0191] 특정 예에서, 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 또는 약물 내성을 부여하는, 면역 체크포인트들로서, 동종이계 면역 세포들의 이식에 수반되는 유전자(들)의 그리고 CD38 항원의 불활성화는 적어도 TALE-뉴클레아제와 같은 특정 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 타겟팅되는 정확한 유전적 위치에서 이루어질 수 있고 이때 상기 특이적 엔도뉴클레아제는 절단을 촉매화하고 이때 외인성 핵산은 상동 재조합에 의하여 통합되는 상기 다른 유전자(들) 및 CD38 타겟된 유전자를 불활성화시키기 위하여 서열 및 상동성의 영역을 연속적으로 포함한다. 또다른 예에서, 몇몇 유전자들은, 연속적으로 또는 동시에, 몇몇 특정 회귀-절단 엔도뉴클레아제들 각각을 이용하여 그리고 특정 유전자 불활성화를 위하여, 하나의 정의된 유전자 및 몇몇 특정 폴리뉴클레오타이드들을 특이적으로 타겟팅함으로써, 불활성화될 수 있다.
- [0192] 선호되는 예에서, KO CD38 및 항-CD38 CAR 발현시키는 면역 세포들을 조작하는 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0193] (a) 면역 세포에서 CD38 유전자를 유전적으로 불활성화시키는 단계로, 상기 타겟 CD38은 서열번호 2-3, 서열번호 5-6, 및 서열번호 8-9의 각각 왼쪽 및 오른쪽 TALE 뉴클레아제를 이용하여 서열번호 1, 4 및 7로 구성되는 군으로부터 선택된다;
- [0194] (b) CD38 항원에 대항하여 항해지는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 이식유전자를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계로, 상기 특이적 항-CD38 CAR는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0195] 이때 상기 VH 및 VL는 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0196] 또다른 선호되는 예에서, KO CD38 및 CD38+ 발현시키는 면역 세포들을 조작하는 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0197] (a) 면역 세포에서 CD38 유전자를 유전적으로 불활성화시키는 단계로, 상기 타겟 CD38은 서열번호 2-3, 서열번호 5-6, 및 서열번호 8-9의 각각 왼쪽 및 오른쪽 TALE 뉴클레아제를 이용하여 서열번호 1, 4 및 7로 구성되는 군으로부터 선택된다;
- [0198] (b) 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)를 코딩하는 이식유전자를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계로, 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 15-17 및 서열번호 11-13; 각각 서열번호 63-65 및 서열번호 59-62; 각각 서열번호 55-57 및 서열번호 51-53; 각각 서열번호 31-33 및 서열번호 27-29, 각각 서열번호 39-41 및 서열번호 35-37, 각각 서열번호 47-49 및 서열번호 45-43, 각각 서열번호 55-57 및 서열번호 51-53, 각각 서열번호 63-65 및 서열번호 59-61, 각각 서열번호 71-73 및 서열번호 67-69의 CDR들 서열들을 포함한다.
- [0199] 더 선호되는 예에서, KO CD38 및 항-CD38 CAR 발현시키는 면역 세포들을 조작하는 상기 방법은 하기 단계를 포

함한다:

- [0200] (a) 서열번호 5-6의 각각 왼쪽 및 오른쪽 TALE 뉴클레아제를 이용하여 서열번호 4의 상기 타겟 CD38, 면역 세포에서 CD38 유전자를 유전적으로 불활성화시키는 단계;
- [0201] (b) 서열번호 82-84 (25A10), 서열번호 100-102 (28F5), 서열번호 97-99 (13F11) and 서열번호 88-90 (16B5)로부터 선택되는 하나에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)를 코딩하는 이식유전자를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계.
- [0202] 더욱 더 선호되는 예에서, KO CD38 및 항-CD38 CAR 발현시키는 면역 세포들을 조작하는 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0203] (a) 서열번호 5-6의 각각 왼쪽 및 오른쪽 TALE 뉴클레아제를 이용하여, 서열번호 4의 상기 타겟 CD38, 면역 세포에서 CD38 유전자를 유전적으로 불활성화시키는 단계;
- [0204] (b) 서열번호 82-84 (25A10) 및 서열번호 100-102 (28F5)로부터 선택되는 것과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)를 코딩하는 이식유전자를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계.
- [0205] 더 더욱 선호되는 예에서, KO CD38 및 항-CD38 CAR 발현시키는 면역 세포들을 조작하는 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0206] (a) 서열번호 5-6의 각각 왼쪽 및 오른쪽 TALE 뉴클레아제를 이용하여 서열번호 4의 상기 타겟 CD38, 면역 세포에서 CD38 유전자를 유전적으로 불활성화시키는 단계;
- [0207] (b) 서열번호 82 (25A10-v1 CAR)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항-CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)를 코딩하는 이식유전자를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계.
- [0208] 본 발명에 따른 면역 세포들은 상기 T 세포들의 표면에 존재하는 것으로 알려진, 또는 병적인 세포들 and 면역 세포들에 의하여 공통적으로 발현되는 CD38 항원 마커로 향해지는 항-CD38 키메라 항원 수용체를 지닌 것으로 여겨진다. 표현 "존재하는 것으로 알려진"은 항원 마커가 생체 내, 특히 혈액에서 자연적 상태에서 성장하는 면역 세포들의 표면에서 발견되나 그러나 그것들이 인 비트로에서 배양될 때 반드시 그러한 것은 아닌 것으로 보고된다는 것을 의미한다. 아무튼 본 발명의 방법은 면역 세포의 표면 상 CD38 항원 마커가 존재하지 않도록 야기하고, 이로써 키메라 항원 수용체를 조작된 T-세포 표면과 반응하지 않도록 방지한다. 이 관점에서, 그 방법은 그것들의 표면 상에 상기 마커 항원을 제시하는 세포들을 배제함으로써 그 결과인 T-세포들을 정제하는 추가의 단계를 포함할 수 있다.
- [0209] 유전자를 불활성화시킴으로써 관심있는 유전자가 기능적 단백질 형태로 발현되지 않는 것이 의도된다. 특정 예들에서, 방법의 유전적 변형은 조작하기 위하여 제공된 세포들에서, 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현에 의존하여, 동일한 것이 타겟인 하나의 유전자를 절단하게 되고, 이로써 상기 타겟인 유전자가 불활성화된다. 엔도뉴클레아제에 의한 핵산 가닥 손상들은 상동(homologous) 재조합(recombination) 또는 비상동(non-homologous) 말단(end)-결합(joining) (NHEJ)의 구별되는 메커니즘들을 통하여 보통 수선된다. 그러나, NHEJ는 절단 자리에서 DNA 서열에 변화를 자주 야기하는 완전하지 않은 수선 공정이다. 메커니즘들은 직접적인 재(re)-결합(ligation) (Critchlow and Jackson 1998)을 통하여 또는 소위 미세상동성(microhomology)-매개 말단(end) 결합(joining) (Betts, Brenchley et al. 2003; Ma, Kim et al. 2003)에 의하여 두 개의 DNA 말단들의 남은 것들의 재결합을 수반한다. 비상동(non-homologous) 말단(end)-결합(joining) (NHEJ)을 통한 수선은 작은 삽입들 또는 결실들을 야기하며, 특이적 유전자 녹아웃들(knockouts)의 창작에 사용될 수 있다. 상기 변형은 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 치환, 결실 또는 첨가될 수 있다. 절단-유도된 돌연변이생성(mutagenesis) 이벤트, 즉 NHEJ 이벤트에 연속적인 돌연변이생성 이벤트가 발생한 세포들은 당업계에서 잘 알려진 방법에 의하여 확인 및/또는 선택될 수 있다.
- [0210] 본 발명의 선호되는 예에 따라, 상기 방법의 단계 a)의 유전자 돌연변이 또는 불활성화는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 이용하여 수행된다.
- [0211] 용어 "회귀-절단 엔도뉴클레아제"는 DNA 또는 RNA 분자, 바람직하게는 DNA 분자 내 핵산들 사이의 결합의 가수분해 (절단)을 촉매화할 수 있는 야생형 또는 변종 효소를 가리킨다. 특히, 상기 뉴클레아제는 엔도뉴클레아제,

더욱 바람직하게는 10 부터 45 까지 염기 쌍들 (bp), 보통 10 부터 35 까지의 염기 쌍들 길이의 범위, 더욱 보통은 12 부터 20 까지의 염기 쌍들의 범위인 핵산 타겟 부위들을 인식하는, 매우 특이적인 회귀-절단 엔도뉴클레아제일 수 있다. 본 발명에 따른 엔도뉴클레아제는 "타겟 서열"로 추가로 칭해지는 특정 폴리뉴클레오타이드 서열들을 인식하며, 상기 엔도뉴클레아제의 분자 구조에 의존하는, 이들 타겟 서열들 내 또는 이것에 인접한 서열들 내 핵산을 절단한다. 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 특정 폴리뉴클레오타이드들 서열들에서 단일- 또는 이중-가닥 손상을 인식하고 만들어낼 수 있다.

[0212]

[0213] 특정 예에서, 본 발명에 따른 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 Cas9/CRISPR 복합체와 같은 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제이다. RNA 가이드된 엔도뉴클레아제들은 엔도뉴클레아제가 RNA 분자와 연관되는 게놈 조작 도구의 새로운 세대를 이룬다. 이 시스템에서, RNA 분자 뉴클레오타이드 서열은 타겟 특이성을 결정하고 엔도뉴클레아제를 활성화시킨다 (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013).

[0214]

TAL-뉴클레아제들

[0215]

선호되는 예에서, 앞서 제시된 방법의 단계 a)에서 CD38 유전자의 불활성화는 TAL-뉴클레아제의 이용에 의하여 수행된다.

[0216]

더 선호되는 예에서, 상기 TAL-뉴클레아제는 서열번호 1, 4 또는 7의 CD38 유전자 서열을 타겟으로 한다.

[0217]

더욱 더 선호되는 예에 따라, CD38 항원의 상기 불활성화는 서열번호 2-3, 5-6 또는 8-9의 TALE-뉴클레아제들을 이용하여 수행된다.

[0218]

CD38 타겟들의 상기 서열들 및 그것들의 대응하는 왼쪽 및 오른쪽 TALE 뉴클레아제가 하기 표 4에 제시된다.

[0219]

표 4: 두 개의 다른 CD38 타겟들의 서열들 및 그것들의 불활성화를 위한 대응하는 TALEN들

표 4

명칭	서열 번호	핵산 서열 및 반복들 서열
CD38ex1- T2 타겟	1	TGAGGTGGGTTGGCGACTaaggcgaccggTGGGCACTGCGGGGACA
CD38ex1- T2 Left TALEN	2	<p>MGDPKKKRKVIDYPYDVPDYAIDIADLRTLGYSSQQQKEKIKPKVRSTVAQHHEALV GHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARAL EALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIARKGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNN GGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAH GLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL ETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLL PVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAH HGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASNIGGKQAL ETVQALLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVA LVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKSELRHKLKYPHEYIELIEIA RNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKA YSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSVTEFKFLFVSGHF KGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFAA D</p> <p>Repeat sequence TALEN: NN-NI-NN-NN-NG-NN-NN-NN-NG-NG-NN-NN- HD-NN-NI-NG</p>
CD38ex1- T2 Right TALEN	3	<p>MGDPKKKRKVIDKETAAKFERQHMSIDIADLRTLGYSSQQQKEKIKPKVRSTVA QHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQ WSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIARKGGVTAVEAVHAWRNALTGA PLNLTQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPE QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRL LPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAH HGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL ETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLL PVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGL ALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKSELRHKLKYPHE YIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGV IVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSVTEFKFLF VSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNG EINFAAD</p> <p>Repeat sequence TALEN : NN-NG-HD-HD-HD-NN-HD-NI-NN-NG-NN- HD-HD-HD-NG</p>

[0220]

CD38-1	4	TGCGAGTTGACCGGCGtgcggggacaacccTGCCGGCTCTCTA
타켓		
CD38-1 Left TALEN	5	<p>MGDPKKKKRVIDYPYDVPDYAIDIALDRLTLGYSQQQKEIKPKVRSTVAQHHEALV GHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARAL EALLTVAGELRGPPQLDGTGQLLKIARGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQALL PVLCAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCAH GLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL ETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQ VVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNIGGKQALETVQRLL PVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCA HGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASNNGGKQA LETVQALLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQ VVAIASNNGGGRPALESIVAQLSRDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLG DPISRSQLVKSELEEKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKV YGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVE ENQTRNKHINPNEWWKVYPPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGA VLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFAAD</p> <p>Repeat sequence TALEN: NG-NN-HD-NN-NI-NN-NG-NG-HD-NI-NN-HD- HD-HD-NN-NN-NG</p>
CD38- 1_Right TALEN	6	<p>MGDPKKKKRVIDKETAAAKFERQHMDSIDIALDRLTLGYSQQQKEIKPKVRSTVA QHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQ WSGARALEALLTVAGELRGPPQLDGTGQLLKIARGGVTAVEAVHAWRNALTGA PLNLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPE QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIAS HDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCA AHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQALLPVLCAHGLTPQQVVAIASHDGGKQ ALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQ QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPEQVVAIAS NNGGKQALETVQRLLPVLCAHGLTPQQVVAIASNIGGRPALESIVAQLSRDPAL AALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKSELRHKLKYVP HEYIELIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDY GVIDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPPSSVTEFKF LFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNN GEINFAAD</p> <p>Repeat sequence TALEN: NG-NN-HD-NG-NN-HD-HD-NN-NN-HD-NG-HD- NG-HD-NG-NI</p>

CD38-2_타겟	7	<p>TGATCCTCGTCGTGGTgctcggtggtgctccCGAGGTGGCCAGCA</p>
CD38-2 Left TALEN	8	<p>MGDPKKKRKVIDYPYDVPDYAIDIDLRLTGYSSQQQKEIKPKVRSTVAQHHEALV GHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARAL EALLTVAGELRGPPQLDGTQLLKIARKGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQALL PVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNG GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NNGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQA LETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQ HLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKSELRHKLKYPHEYLIEI ARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVVDTK AYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWVKVYPSVTEFKFLFVSGH FKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFA AD</p> <p>Repeat sequence TALEN: NG-NN-NI-NG-HD-HD-NG-HD-NN-NG-HD-NN-NG-NN-NN-NG</p>
CD38-2 Right TALEN	9	<p>MGDPKKKRKVIDKETAAAKFERQHMDSIDIDLRLTGYSSQQQKEIKPKVRSTVA QHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQ WSGARALEALLTVAGELRGPPQLDGTQLLKIARKGGVTAVEAVHAWRNALTGA PLNLTQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQA LETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQ VVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQLVKSELEEKSELRHKLKYPHEYI ELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGV VDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWVKVYPSVTEFKFLF VSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNN EINFAAD</p> <p>Repeat sequence TALEN: HD-NN-NI-NN-NN-NG-NN-NN-HD-NN-HD-HD-NI-NN-HD-NI</p>

[0222]

[0223] "TALE-뉴클레아제" 또는 "MBBBD-뉴클레아제"는 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 촉매적 도메인과, 전사 (Transcription) 활성인자(Activator) 유사(Like) 효과기(Effector) 단백질들 (TALE) 또는 모듈식(modular) 염기 당 염기(base-per-base) 결합(binding) 특성들(properties) (MBBBD)으로부터 보통 유래된 DNA 결합 도메인의 융합으로부터 야기되는 조작된 단백질들을 가리킨다. 이러한 촉매적 도메인은 보통 예컨대 I-TevI, ColE7, NucA 및 Fok-I와 같은 효소들로부터 온다. TALE-뉴클레아제는 선택된 촉매적 도메인에 따라 모노머 또는 다이머 형태들로 형성될 수 있다 (WO2012138927). 이러한 TALE-뉴클레아제들은 상표 TALENTM (Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France) 하 상업적으로 이용가능하다.

[0224]

본 발명의 선호되는 예에 따라, NA 결합 도메인은 전사 활성인자 유사 효과기 (TALE)로부터 유래하고, 이때 제한되지 않는 예들로서 잔토모나스(Xanthomonas) 또는 랄스토니아(Ralstonia) 박테리아 단백질들 AvrBs3, PthXo1, AvrHah1, PthA, Tal1c로부터 유래하는 33-35 아미노산들 반복들의 시리즈에 의하여 이끌어진다.

[0225]

이들 반복들은 염기 쌍과의 상호작용을 특정하는 두 개의 아미노산들 위치들에 의하여 본질적으로 다르다 (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009). DNA 타겟 내 각 염기 쌍은 반복의 두 개의 변종 아미노산들로부터 야기되는 특이성과, 단일 반복에 의하여 접촉된다 (소위 반복(repeat) 가변성(variable) 디펩타이드(dipeptide), RVD). TALE 결합 도메인들은 핵(nuclear) 위치화(localization) 신호들(signals) (NLS)을 포함하는 C-말단 도메인 및 타겟인 서열의 첫 번째 티민 염기 (T0)의 요구에 원인이 되는 N-말단 자리옮김(translocation) 도메인을 더 포함할 수 있다. TALE 핵산 결합 도메인은 보통 다수의 TALE 반복 서열들을 포함

하는 조작된 코어 TALE 스캐폴드에 대응하고, 각 반복은 TALE 인식 부위의 각 뉴클레오타이드들 염기에 특이적인 RVD를 포함한다. 본 발명에서 상기 코어 스캐폴드의 TALE 반복 서열은 30 내지 42 아미노산들, 더욱 바람직하게는 33 또는 34로 만들어지며, 이때 위치들 12 및 13에 위치하는 두 개의 결정적인 아미노산들 (소위 반복 가변성 디펩타이드, RVD)이 상기 TALE 결합 부위 서열의 하나의 뉴클레오타이드의 인식을 매개한다; 등가인 두 개의 결정적인 아미노산들은 특히 33 또는 34 아미노산들 길이보다 더 긴 TALE 반복 서열에서 12 및 13 외의 위치들에 위치될 수 있다. 바람직하게는 다른 뉴클레오타이드들의 인식과 관련된 RVD들은 C를 인식하기 위한 HD, T를 인식하기 위한 NG, A를 인식하기 위한 NI, G 또는 A를 인식하기 위한 NN이다. 또다른 예에서, 결정적 아미노산들 12 및 13은 뉴클레오타이드들 A, T, C and G 을 향한 그것들의 특이성을 조절하기 위하여, 특히 이 특이성을 증강시키기 위하여, 다른 아미노산 잔기들을 향하여 돌연변이될 수 있다. TALE 핵산 결합 도메인은 보통 8 및 30 TALE 반복 서열들 사이를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 상기 코어 스캐폴드는 8 및 20 TALE 반복 서열들 사이; 다시 더욱 바람직하게는 15 TALE 반복 서열들을 포함한다. 그것은 또한 TALE 반복 서열들의 상기 세트의 C-말단, 즉, 추가적인 C-말단 반(half)- TALE 반복 서열에 위치하는 20 아미노산들로 이루어진 추가적인 단일의 짧아진(truncated) TALE 반복 서열을 포함할 수 있다.

[0226] 다른 조작된 DNA 결합 도메인들은 WO 2014/018601에 기재된 대로 소위 모듈식 염기 당 염기 특이적 핵산 결합 도메인들 (MBBBD)을 형성하기 위하여 대체의 서열들로 이용될 수 있다. 상기 MBBBD는 새로 확인된 단백질들, 즉 생공생생물 진균인 부르콜데리아(*Burkholderia*) 리조시니카(*Rhizoxinica*)의 최근 시퀀싱된 게놈으로부터의 EAV36_BURRH, E5AW43_BURRH, E5AW45_BURRH and E5AW46_BURRH 단백질들로부터 조작될 수 있다 (Lackner, Moebius et al. 2011). 이들 핵산 결합 폴리펩타이드들은 염기 특이적인 약 31 내지 33 아미노산들의 모듈들을 포함한다. 이들 모듈들은 잔토모나스 TALE 공통 반복들과 40 % 미만의 서열 동일성을 보이고 더 많은 폴리펩타이드들 서열 가변성을 제시한다. 부르콜데리아 및 잔토모나스로부터의 상기 단백질들로부터의 다른 도메인들 (모듈들, N 및 C-말단들)은 특정 핵산 서열들에 대한 결합 특성들을 갖는 새로운 단백질들 또는 스캐폴드들을 조작하는데 유용하며, 키메라 TALE-MBBBD 단백질들을 형성하기 위하여 조합될 수 있다.

[0227] 본 발명은 특정 TALE-뉴클레아제들을 이용하여 CD38 항원 마커를 코드하는 유전자들의 발현을 불활성화시키기 위하여 조작된 T-세포들에 대한 방법을 포함한다.

[0228] 특히 본 발명의 실시화에 적합한 것은 CD38 유전자에 대하여 서열번호: 2-3; 5-6; 8-9의 하나와 같은 TALE-뉴클레아제들이다. 이들 특정 TALE-뉴클레아제들, 이들의 서열 타겟 및 사용되는 프로토콜은 하기 실시예 1에 더 완전히 제시된다.

[0229] Cas 9

[0230] 또다른 예에서, 앞서 제시된 방법의 단계 a)의 CD38의 유전자 불활성화는 Cas 9 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제를 이용하여 수행된다.

[0231] 또다른 예에서, 상기 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제는 적어도 2 폴리펩타이드들, RuvC을 포함하는 하나와 HNH를 포함하는 나머지로 나누어진다.

[0232] Csn1 (COG3513)으로도 명명되는 Cas9는 crRNA 생합성 및 침입하는(invading) DNA의 파괴에 참여하는 큰 단백질이다. Cas9은 *S. 서모필스(thermophiles)*, *리스테리아(Listeria)* 인노쿠아(*innocua*) (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012) 및 *S. 피오케네스(Pyogenes)* (Deltcheva, Chylinski et al. 2011)와 같은 다른 박테리아 종들에 기재되어 있다. 큰 Cas9 단백질 (>1200 아미노산들)은 두 개의 예상되는 뉴클레아제 도메인들, 즉 단백질의 중앙에 위치되는 HNH (McrA-like) 뉴클레아제 도메인 및 나누어진(split) RuvC-유사 뉴클레아제 도메인 (RNase H fold) (Makarova, Grishin et al. (2006)을 포함한다.

[0233] "Cas9"에 의하여 타겟 핵산 서열을 가공할 수 있는 Cas9의 상동체 또는 조작된 엔도뉴클레아제가 의미된다. 특정 예에서, Cas9은 이중-가닥의 손상 또는 a 단일-가닥의 손상에 대응할 수 있는 핵산 타겟 서열 내 절단을 유도할 수 있다. Cas9 변종은 무작위 돌연변이 유발 또는 단백질 조작에 의하여 얻어지고 자연에 자연적으로 존재하지 않는 Cas9 엔도뉴클레아제이다. 본 발명에 대응하는 Cas9 변종들은 예컨대 돌연변이들 즉 *S. 피오케네스(pyogenes)* Cas9 엔도뉴클레아제 (COG3513)의 아미노산 서열에서 적어도 하나 잔기의 결실들, 삽입들 또는 치환들에 의하여 수득될 수 있다. 본 발명의 프레임 측면에서, 이러한 Cas9 변종들은 기능적으로 남는데, 즉, 그것들은 타겟 핵산 서열의 가공 능력을 보유한다. Cas9 변종은 또한 *S. 피오케네스 Cas9*의 아미노산 서열 내 적어도 하나 잔기의 결실들, 삽입들 또는 치환들을 포함할 수 있는 *S. 피오케네스 Cas9*의 상동체들일 수 있다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합은 최종 구조체가 원하는 활성, 특히 가이드 RNA 또는 핵산 타겟 서열의 결합

능력을 가지면, 최종 구조체에 도달하도록 만들어질 수 있다.

- [0234] RuvC/RNaseH모티프는 RNA and DNA 둘 다에 작용하는 뉴클레오타이드 기능들의 넓은 스펙트럼들을 보여주는 단백질들을 포함한다 (RNaseH, RuvC, DNA 트랜스포사제들(transposases) 및 레트로바이러스 인테그라제들(integrases) 및 아르코노트(Argonaut) 단백질들의 PIWI 도메인). 본 발명에서 Cas9 단백질의 RuvC 촉매적 도메인은 서열 모티프: D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A에 의하여 특징화 되고, 이때 X는 자연적인 20 개 아미노산들 중 임의의 하나를 나타내고, [I/L]은 이소류신 또는 류신을 나타낸다. 다시 말해서, 본 발명은 적어도 D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A 서열을 포함하는 Cas9 변종에 대한 것으로, 이때 X는 자연적인 20 개 아미노산들을 나타내고, [I/L]은 이소류신 또는 류신을 나타낸다.
- [0235] HNH 모티프는 콜리친들(colicins), 제한 효소들 및 호밍(homing) 엔도뉴클레아제들을 포함하는 이중-가닥의 DNA 상에 작용하는 많은 뉴클레아제들의 특징이다. 도메인 HNH (SMART ID: SM00507, SCOP 명명:HNH 패밀리)은 여러 가지 결합 및 절단 기능들을 수행하는 DNA 결합 단백질들이 부가되어 관련된다. 알려진 기능을 가진 것은 박테리아 독성, 그룹들 I and II 인트론들 및 인테인들(inteins)의 호밍 기능들, 재조합, 발달적으로 통제된 DNA 재배열, 파아지 포장 및 제한 엔도뉴클레아제 활성을 포함하는 세포 공정의 범위 내에 수반된다. (Dalgaard, Klar et al. 1997). 이들 단백질들은 바이러스들, 고세균(archaebacteria), 진정세균(eubacteria), 및 진핵생물들에서 발견된다. 흥미롭게도, LAGLI-DADG 및 GIY-YIG 모티프들과 함께로서, HNH 모티프는 인테인들, 그룹 I 및 그룹 II 인트론들과 같은 자가-중식 요소들의 엔도뉴클레아제 도메인들과 자주 관련된다 (Dalgaard, Klar et al. 1997). HNH 도메인은 일정 거리에서 보존된 His (아미노-말단) 및 His/Asp/Glu (카르복시-말단)에 의하여 측면에 있는(flanked) 보존된 Asp/His 잔기의 존재에 의하여 특징될 수 있다. 이들 단백질을 중 상당수가 또한 중앙 Asp/His 잔기의 측면 상에 CX2C 모티프를 가질 수 있다. 구조적으로, HNH 모티프는 α 헬릭스에 의하여 각 측면에 있는(flanked) 꼬인 β -가닥들의 중앙 헤어핀으로서 나타난다 (Kleanthous, Kuhlmann et al. 1999). Cas9의 큰 HNH 도메인은 서열번호 5에 의하여 나타내어 진다. 본 발명에서, HNH 모티프는 서열 모티프: Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-S에 의하여 특징될 수 있으며, 이때 X는 자연적인 20 개 아미노산들 중 임의의 하나를 나타낸다. 본 발명은 적어도 Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-S 서열을 포함하는 Cas9 변종에 대한 것으로, 이때 X는 자연적인 20 개 아미노산들 중 임의의 하나를 나타낸다.
- [0236] 본 발명은 타겟팅된 다중(multiplex) 유전자 변형들을 쉽게 하기 위하여 그리고 Cas9 세포들로 가이드 RNA의 도입에 의하여 유도성 뉴클레아제 시스템을 만들기 위하여 특히 관심 있을 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 본 발명자들은 Cas9 단백질이 두 개의 분리된, 가이드 RNA와 함께 또는 분리하여 타겟 핵산 서열을 가공할 수 있는 Cas9 RuvC 및 HNH 도메인들로 나눌 수 있다는 것을 확립하여 왔다.
- [0237] 또한 다른 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제들 또는 Cas 상동체들로부터의 RuvC 및 HNH 도메인들은 뉴클레아제 효율 또는 특이성을 개선하기 위하여 조립될 수 있다. 다른 종들로부터의 도메인들은 변종 Cas 단백질을 형성하기 위하여 서로 융합되거나 두 개의 단백질들로 나눌(split) 수 있다. Cas9 스플릿(split) 시스템은 세포 내 Cas9 과발현의 잠재적 독성 효과를 피하기 위하여 그리고 게놈 타겟팅을 위한 유도성 방법에 특히 적합한 것으로 여겨진다. 정말로, 첫 번째 스플릿(split) Cas9 도메인은 바람직하게는 상기 스플릿 도메인을 코딩하는 이식유전자로 상기 세포를 안정적으로 형질전환(transform)시킴으로써 세포 내로 도입될 수 있다. 그러므로, Cas9의 상보적인 스플릿 부분은 세포 내로 도입되어 두 개의 스플릿 부분들이 원하는 시간에 기능적 Cas9 단백질을 재구축하기 위하여 세포 내로 재조립될 수 있다.
- [0238] 야생형 Cas9 에 비하여 스플릿 Cas9의 크기의 감소는 예컨대, 세포 침투(penetrating) 펩타이드들을 이용함으로써 세포 내로의 전달 및 벡터화를 수월하게 한다. 다른 Cas 단백질들로부터의 재-배열 도메인들은 예컨대, S. 피오게네스 Cas9과 약간 다른 PAM 모티프들을 타겟팅함으로써 특이성 및 뉴클레아제 활성을 조절하는 것을 가능하게 한다.
- [0239] 스플릿 Cas9 시스템
- [0240] RuvCand HNH 도메인들의 이전의 특성화는 스플릿 Cas9 단백질을 만들기 위하여 Cas9 단백질을 조작하기 위해 본 발명자들에 의하여 촉발되었다. 놀랍게도, 본 발명자들은 이들 두 개의 스플릿 Cas9가 함께 또는 분리하여 핵산 타겟을 가공할 수 있다는 것을 보였다. 이 관찰은 스플릿 Cas9 단백질을 이용하여 새로운 Cas9 시스템을 개발하는 것을 가능하게 하였다. 각 스플릿 Cas9 도메인들은 제조될 수 있고 분리하여 사용될 수 있다. 이와 같이, 이 스플릿 시스템은 T-세포들에서 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제의 전달 및 벡터화에 몇몇 이점을 보이고, 이는 더 짧은 그리고/또는 불활성 단백질의 전달을 가능하게 하고, 특히 원하는 시간에 T-세포들에서 게놈 조작을 하기 에 적합하며, 이와 같이 통합된 Cas9 뉴클레아제의 잠재적 독성을 제한한다.

- [0241] "스플릿 Cas9"에 의하여 여기에서 RuvC 또는 HNH 도메인을 포함한, 이들 도메인들 둘 다를 포함하는 것은 아닌, Cas9 변종 또는 Cas9 단백질의 감소된 또는 짧아진(truncated) 형태가 의미된다. 이러한 "스플릿 Cas9"은 예컨대, RuvC도메인을 제공하는 하나의 스플릿 Cas9 및 HNH 도메인을 제공하는 또다른 것과 같은 상보적인 방식으로 또는 가이드 RNA와 독립적으로 사용될 수 있다. 다른 스플릿 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제들은 RuvC 및/또는 HNH 도메인들을 갖는 서로 이용될 수 있다.
- [0242] 각 Cas9 스플릿 도메인은 동일하거나 또는 다른 Cas9 상동체들로부터 유래될 수 있다. Cas9의 많은 상동체들이 게놈 데이터베이스들에서 확인되었다.
- [0243] 상기 Cas9 스플릿 도메인들(RuvC 및 HNH 도메인들)은 세포 내로 동시에 또는 연속적으로 도입되어 상기 스플릿 Cas9 도메인(들)이 세포에서 타겟 핵산 서열을 가공하도록 할 수 있다. 상기 Cas9 스플릿 도메인들 및 가이드 RNA는 세포 침투(penetrating) 펩타이드들 또는 다른 데 기재된 형질주입 방법들을 이용하여 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0244] 본 발명의 또다른 측면에서, 소형(compact) Cas9으로 명칭되는 하나의 스플릿 Cas9 도메인만이 상기 세포 내로 도입된다. 과연, 놀랍게도 본 발명자들은 상기 기재된 RuvC 모티프를 포함하는 스플릿 Cas9 도메인이 HNH 모티프를 포함하는 스플릿 도메인의 타겟 핵산 서열을 독립적으로 절단할 수 있다는 것을 보였다. 이와 같이, 그들은 가이드 RNA가 타겟 핵산 서열에 결합하기 위하여 HNH 도메인의 존재를 필요로 하지 않으며 RuvC 스플릿 도메인에 의하여 결합되기에 충분히 안정적이라는 것을 확립할 수 있었다. 선호되는 예에서, 상기 스플릿 Cas9 도메인 단독은 상기 타겟 핵산 서열을 자국낼(nicking) 수 있다.
- [0245] 각 스플릿 도메인은 N-말단 및/또는 C-말단 말단(end)에서 적어도 하나의 활성 도메인에 융합될 수 있으며, 상기 활성 도메인은 뉴클레아제(예컨대 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제), 폴리메라제, 키나제, 포스파타제, 메틸라제, 디메틸라제, 아세틸라제, 디아세틸라제(desacetylase), 토포이소메라제, 인테그라제, 트랜스포사제(transposase), 리가제, 헬리카제, 리컴비나제(recombinase), 전사 활성인자(예컨대 VP64, VP16), 전사 억제인자(예; KRAB), DNA 말단 가공 효소(예컨대 Trex2, Tdt), 리포터 분자(예컨대 형광 단백질들, lacZ, 루시페라제):로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0246] HNH 도메인은 타겟 이중-가닥의 DNA의 한 가닥을 자국내는데(nicking) 원인이 되며, RuvC-유사 RNaseH 폴드(fold) 도메인은 이중-가닥의 핵산 타겟의(PAM 모티프를 포함하는) 다른 가닥을 자국내는데(nicking) 수반된다.(Jinek, Chylinski et al. 2012). 그러나, 야생형 Cas9에서, 이들 두 도메인들은 PAM의 즉시 인접에서 동일한 타겟 서열(프로토(proto)-스페이스(spacer)) 내 침습성(invasive) DNA의 무딘(blunt) 절단을 야기한다(Jinek, Chylinski et al. 2012). . Cas 9은 나카아제(nickase)일 수 있고, 다른 타겟 서열들 내에 닉(nick) 이벤트를 유도한다.
- [0247] 제한되지 않는 예로서, Cas9 또는 스플릿 Cas9는 다른 타겟 서열들에서 닉 이벤트를 유도하기 위하여 HNH 또는 RuvC-유사도메인들의 촉매적 잔기들에서 돌연변이(들)을 포함할 수 있다. 제한되지 않는 예로서, Cas9 단백질의 촉매적 잔기들은 Cas 패밀리 멤버들의 상동체들 상에 CLUSTALW 방법을 이용하여, 아미노산들 D10, D31, H840, H868, N882 및 N891 또는 정렬된 위치에 대응하는 것들이다. 이들 잔기들 중 임의의 것은 임의의 다른 아미노산들, 바람직하게는 알려진 잔기에 의하여 대체될 수 있다. 촉매적 잔기들에서 돌연변이는 cas9의 촉매적 도메인의 적어도 하나의 불활성화를 유도하는 아미노산들의 결실 또는 첨가, 또는 또다른 아미노산들에 의한 치환을 의미한다. 또다른 특정 예에서, 스플릿 Cas9는 두 RuvC 및 HNH 촉매적 도메인들 중 하나만을 포함한다. 본 발명에서, 다른 종들로부터의 Cas9, Cas9 상동체들, 조작된 Cas9 및 그것의 기능적 변종이 사용될 수 있다. 본 발명은 관심있는 유전적 서열 내 핵산 절단을 형성하기 위하여 스플릿 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제들 변종들 또는 임의의 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제의 사용을 그린다.
- [0248] 메가뉴클레아제들
- [0249] 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 또한 메가뉴클레아제라는 명칭으로도 알려진 호밍 엔도뉴클레아제일 수 있다. 이러한 호밍 엔도뉴클레아제들은 당업계에 잘 알려져 있다(Stoddard 2005). 호밍 엔도뉴클레아제들은 매우 특이적이며, 12 부터 45까지의 염기 쌍들(bp) 길이의 범위인, 보통 14 부터 40 까지 bp 길이의 범위인 DNA 타겟 부위들을 인식한다. 본 발명에 따른 호밍 엔도뉴클레아제는 예컨대 LAGLIDADG 엔도뉴클레아제에, HNH 엔도뉴클레아제에, 또는 GIY-YIG 엔도뉴클레아제에 대응한다. 본 발명에 따른 선호되는 호밍 엔도뉴클레아제는 I-CreI 변종일 수 있다. "변종" 엔도뉴클레아제, 즉 자연적으로 존재하지 않고 유전적 가공에 의하여 또는 무작위 돌연변이 유발에 의하여 획득되는 엔도뉴클레아제는 야생형 엔도뉴클레아제들에 의하여 인식되는 것과 다른 DNA 서열들에

결합할 수 있다 (국제출원 W02006/097854 참조).

[0250] 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 모듈식 DNA 결합 뉴클레아제일 수 있다. 모듈식 DNA 결합 뉴클레아제에 의하여 엔도뉴클레아제의 적어도 하나 촉매적 도메인을 포함한 임의의 융합 단백질을 또는 적어도 하나의 DNA 결합 도메인 또는 핵산 타겟 서열을 특징하는 단백질이 의미된다. DNA 결합 도메인은 보통 이중- 또는 단일-가닥의 폴리뉴클레오타이드들을 인식하는 적어도 하나 모티프를 포함하는 단백질 도메인 또는 독립적으로 접히는 (folded) 폴리펩타이드에 의하여 형성되는 RNA 또는 DNA-결합 도메인이다. 많은 이러한 폴리펩타이드들이 특이적 핵산 서열들에 결합하는 능력을 갖고 당업계에서 기재되어 왔다. 이러한 결합 도메인들은 제한되지 않는 예들로서, 헬릭스-턴 헬릭스 도메인들, 류신 지퍼 도메인들, 날개달린(winged) 헬릭스 도메인들, 헬릭스-루프-헬릭스 도메인들, HMG-박스 도메인들, 이뮤노글로빈 도메인들, B3 도메인 또는 조작된 징크 핑거 도메인을 자주 포함한다.

[0251] 징크-핑거 뉴클레아제들

[0252] 인 비트로에서 DNA를 절단하기 위하여 처음에 개발된, "징크 핑거 뉴클레아제들" (ZFNs)은 3 이상의 2H2 징크 핑거 모티프들을 포함하는 DNA 인식 도메인과 타입 IIS 제한 효소, FokI의 절단 도메인 사이의 융합이다. 스페이싱(spacing) 및 정확한 기원인 두 개의 ZFN들의 DNA의 특정 위치에서의 헤테로다이머화는 DNA에서 이중-가닥 손상 (DSB)을 이끈다. 이러한 키메라 엔도뉴클레아제들의 이용은 Urnov et al. (Genome editing with engineered zinc finger nucleases (2010) Nature reviews Genetics 11:636-646)에 의하여 리뷰된 대로 당업계에 널리 보고되어 왔다.

[0253] 표준 ZFN들은 각 징크 핑거 도메인의 C-말단으로 절단 도메인을 융합한다. 두 개의 절단 도메인들이 DNA를 다이머화하고 절단하는 것을 가능하게 하기 위하여, 두 개의 ZFN들이 특정 거리로 떨어져 그것들의 C-말단들로 DNA의 반대 가닥들에 결합한다. 징크 핑거 도메인 및 절단 도메인 사이의 가장 흔하게 사용되는 링커 서열들은 5 내지 7 bp로 분리된 각 결합 부위의 5' 가장자리(edge)를 요구한다.

[0254] 새로운 징크-핑거 어레이들을 만들어내는 가장 간단한 방법은 알려진 특이성의 더 작은 징크-핑거 "모듈들"을 조합하는 것이다. 가장 흔한 모듈식 조립 공정은 9 염기 쌍 타겟 부위를 인식할 수 있는 3-핑거 어레이를 만들어내기 위하여 3 염기 쌍 DNA 서열을 각각 인식할 수 있는 세 개의 분리된 징크 핑거들을 조합하는 단계를 포함한다. 많은 선택 방법들이 원하는 서열들을 타겟팅할 수 있는 징크-핑거 어레이들을 만드는데 사용되어 왔다. 초기 선택 노력들은 부분적으로 무작위화된 징크-핑거 어레이들의 큰 풀(pool)로부터 정해진 DNA 타겟에 결합하는 단백질들을 선택하기 위하여 파아지 디스플레이를 이용하였다. 더 최근 노력들은 효모 하나의-하이브리드 시스템들, 박테리아 하나의-하이브리드 및 두 개의-하이브리드 시스템들, 및 포유동물 세포들을 이용하여 왔다.

[0255] 전달 방법들

[0256] 본 발명자들은 키메라 항원 수용체들과 더불어, 엔도뉴클레아제들을 발현시키는 폴리뉴클레오타이드들, (예컨대 as9 또는 Argonaute 뉴클레아제들과 관련된 가이드 RNA 또는 DNA인) 그것들의 가능한 공-효과기들을 세포들 내 또는 상기 세포들의 세포이하(subcellular) 구획들(compartments)로 전달하는 것을 가능하게 하는 것으로 당업계에 알려진 임의의 수단들을 고려하였다. 이들 수단들은 제한되지 않는 예들로서, 바이러스 형질도입, 전기천공 및 또한 리포솜(liposomal) 전달 수단들, 폴리머 담체들, 화학적 담체들, 리포플렉스들(lipoplexes), 폴리플렉스들(polyplexes), 덴드리머들(dendrimers), 나노입자들, 에멀전, 자연적 식균(endocytosis) 또는 파고사이토스(phagocytose) 경로를 포함한다.

[0257] 본 발명의 선호되는 예로서, 본 발명의 엔도뉴클레아제들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드들은 일시적 발현을 얻고 예컨대 전기천공에 의하여 외래 DNA의 염색체 통합을 피하기 위하여 mRNA 형태로 형질주입된다. 본 발명자들은 표 5에 보이는 T-세포에서의 mRNA 전기천공을 위한 다른 최적의 조건들을 결정하였다. 본 발명자들은 펄스된 (pulsed) 전기장들의 이용에 의하여, 세포들 내로 물질의 전달을 위하여 살아있는 세포들을 일시적으로 투과하는 것을 가능하게 하는 사이토피스(cytoPulse) 기술을 사용하였다. (미국 특허 6,010,613 및 WO 2004/083379). 펄스 기간(duration), 강도와 더불어 펄스들 간의 간격(interval)은 치사율(mortality)로 높은 형질주입 (transfection) 효율을 위한 최고의 조건들에 도달하기 위하여 변형될 수 있다. 기본적으로, 첫 번째 높은 전기장 펄스들은 포어(pore) 형성을 가능하게 하는 반면, 그 다음의 더 낮은 전기장 펄스들은 세포 내로 폴리뉴클레오타이드를 옮기는 것을 가능하게 한다. 본 발명의 한 측면에서 본 발명자는 T 세포들에서 단백질들의 다른 종류를 일시적으로 발현시키기 위하여 전기천공 프로토콜의 이용, 및 T 세포들에서 mRNA의 >95% 형질주입 효율의 달성을 이끈 단계들을 기재한다. 특히 본 발명은 T 세포를 형질전환하는 방법에 대한 것으로, 상기 방법은 상기

T 세포를 RNA와 접촉시키는 단계; 및

- [0258] (a) 단계 (a) 및 (b)의 전기적 펄스들 사이의 0.2 내지 10 ms의 펄스 간격 및 0.1 ms의 펄스 폭, 센티미터 당 2250 부터 3000 까지 V의 전압 범위를 갖는 하나의 전기적 펄스;
- [0259] (b) 단계 (c)의 첫 번째 전기적 펄스 및 단계 (b)의 전기적 펄스 사이의 100 ms의 펄스 간격 및 100 ms의 펄스 폭(width)을 가진 2250 부터 3000 까지 V의 전압 범위를 가진 하나의 전기적 펄스; 및
- [0260] (c) 4 전기적 펄스들의 각각의 사이의 2 ms의 펄스 간격 및 0.2 ms의 펄스 폭을 가진 325 V의 전압을 가진 4 전기적 펄스들
- [0261] 로 구성되는 아질(agile) 펄스 서열을 T 세포에 적용하는 단계를 포함한다.
- [0262] 특정 예에서, T 세포를 형질전환하는 방법은 상기 T 세포를 RNA와 접촉시키는 단계; 및
- [0263] (a) 단계 (a) 및 (b)의 전기적 펄스들 사이의 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 ms의 펄스 간격 및 0.1 ms의 펄스 폭, 센티미터 당 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 또는 3000V의 전압을 가진 하나의 전기적 펄스;
- [0264] (b) 단계 (c)의 첫 번째 전기적 펄스 및 단계 (b)의 전기적 펄스 사이의 100 ms의 펄스 간격 및 100 ms의 펄스 폭을 가진 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 또는 3000V의, 2250으로부터의, 전압 범위를 가진 하나의 전기적 펄스; 및
- [0265] (c) 4 전기적 펄스들의 각각의 사이의 2 ms의 펄스 간격 및 0.2 ms의 펄스 폭을 가진 325 V의 전압을 가진 4 전기적 펄스들
- [0266] 로 구성되는 아질(agile) 펄스 서열을 T 세포에 적용하는 단계를 포함한다.
- [0267] 상기 기재된 값 범위에 포함되는 임의의 값들이 본 출원에 개시된다. 전기천공 매체(medium)는 당업계에 알려진 임의의 적합한 매체(medium)일 수 있다. 바람직하게는 전기천공 매체(medium)는 0.01 내지 1.0 밀리시멘스(milliSiemens)에 걸치는 범위의 전도성을 가진다.
- [0268] 표 5: PBMC 유래된 T-세포들에서 전기천공에 요구되는 최소 전압을 결정하는데 사용되는 다른 사이토플스 프로그램들.

표 5

	그룹 1				그룹 2				그룹 3			
사이토-펄스 프로그램	펄스들	V	기간 (ms)	간격 (s)	펄스들	V	기간 (ms)	간격 (ms)	펄스들	V	기간 (s)	간격 (ms)
1	1	600	0.1	0.2	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2
2	1	900	0.1	0.2	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
3	1	1200	0.1	0.2	1	1200	0.1	100	4	130	0.2	2
4	1	1200	0.1	10	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
5	1	900	0.1	20	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2

- [0269]
- [0270] 바이러스 형질도입
- [0271] 본 발명에 따라, 레트로바이러스 벡터들, 더욱 바람직하게는 렌티바이러스 벡터들의 사용은 특히 T-세포들 내로 키메라 항원 수용체들을 발현시키는데 적합하다. 바이러스 형질도입 방법들은 당업계에 잘 알려져 있다. (Walther et al. (2000) Viral Vectors for Gene Transfer. Drugs. 60(2):249-271). 통합하는 바이러스 벡터들은 T-세포들 계층 내 안정적인 폴리뉴클레오타이드들의 통합 및 오랜 기간에 걸쳐 키메라 항원 수용체들을 발현시키는 것을 가능하게 한다.
- [0272] 또다른 예에 따라, 선택된 상기 CD38 CAR들은 EF1a와 같은 프로모터의 통제 하 인 자살 유전자 RQR8를 코드하는 렌티바이러스 벡터에 클로닝된다.
- [0273] 선호되는 예에 따라, CD38 CAR들은 CD38 결핍 T 세포들 상 T 세포들 상에 형질도입된다. CAR의 발현은 보통 유

동세포분석법에 의하여 분석되고 항-CD38 CAR T 세포들 표현형 및 기능이 테스트된다. 이는 뒤에 더 자세히 기재된다.

- [0274] 비 동종반응성 T 세포들
- [0275] 예컨대, CAR를 발현시키는 다른 유전적 서열들과 함께 특정 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 발현시키는 유전적 서열들을 포함할, 혈액 순환에서 T-세포들을 타겟팅하는 바이러스 벡터들을 이용함으로써 본 발명의 방법이 유전자 치료의 부분으로서 생체 내에서 수행될 수 있음에도 불구하고, 본 발명의 방법은 더욱 일반적으로 환자들 또는 기증자들로부터 수득가능한 배양된 T-세포들 상 생체 외(ex-vivo)에서 수행되도록 의도된다.
- [0276] 한 예에 따라, 본 발명에 제시된 바와 같이 조작되는 면역 세포는 일차(primary) 줄기 세포, iPS 또는 hES 세포로부터 유래된다.
- [0277] 또다른 예에서, 상기 면역 세포는 병적인 세포들의 발달에 의하여 영향받는 환자로부터 유래된다.
- [0278] 생체 외(ex-vivo)에서 조작되는 조작된 T-세포들은 자가조직 치료의 부분으로서, 또는 동종이계 치료의 부분으로서 사용되기 위하여, 그것들이 유래되는 곳으로부터 환자 내로 재-이식될 수 있다. 이 후자의 경우에, 세포들을 그것들의 적절한 이식을 보장하기 위하여 비-동종반응성으로 만들도록 더 조작하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 방법은 MHC 인식에 수반되는 그것들의 유전자들을 불활성화시키기 위하여, 또는 예컨대 in WO 2013/176915에 기재된 것과 같이 면역억제 약물들의 타겟인, 기증자로부터 T-세포들을 입수하는 추가적인 단계를 포함할 수 있다.
- [0279] T 세포 수용체들 (TCR)은 항원의 제시에 반응하여 T 세포들의 활성화에 참여하는 세포 표면 수용체들이다. TCR은 보통 헤테로다имер를 형성하기 위하여 조립되고, 세포 표면 상 존재하는 T-세포 수용체 복합체를 형성하기 위하여 CD3-형질도입하는 서브유닛들과 관련되는 알파 및 베타, 두 개 체인들로 만들어진 다. TCR의 각 알파 및 베타 체인은 면역글로불린-유사 N-말단 가변(variable) (V) 및 불변(constant) (C) 영역, 소수성 막관통 도메인, 및 짧은 세포질 영역으로 구성된다. 면역글로불린 분자들을 위한 것으로, 알파 및 베타 체인들의 가변 영역이 V(D)J 재조합에 의하여 만들어져, T 세포들의 군집 내 큰 다양성의 항원 특이성을 만든다. 그러나 온전한 항원을 인식하는 면역글로불린들과 대조적으로, T 세포들은 MHC 분자와 관련하여 가공된 펩타이드 단편들에 의하여 활성화되고, MHC 제한으로 알려진, T 세포들에 의한 항원 인식으로의 추가의 규모(dimension)를 도입한다. T 세포 수용체를 통한 기증자 및 받는 사람(recipient) 사이의 MHC 차이들의 인식은 T 세포 증식 및 GVHD의 잠재적 발달로 이끈다. TCR의 정상적인 표면 발현이 복합체의 모든 일곱 개 요소들의 조립 및 조직화된 합성에 의존한다는 것이 보여져 왔다 (Ashwell and Klusner 1990). TCR알파 또는 TCR베타의 불활성화는 동종항원(alloantigen)의 인식을 방지하는 T 세포들의 표면으로부터 TCR의 제거 및 이와 같이 GVHD를 야기한다.
- [0280] 이와 같이, 본 발명에 따라 T-세포들의 이식은 TCR 요소를 코드하는 적어도 하나 유전자를 불활성화시킴으로써 개선될 수 있다. TCR은 TCR 알파 유전자 및/또는 TCR 베타 유전자(들)을 불활성화시킴으로써 세포들에서 기능적이지 않게 만들어진다.
- [0281] Cas9/CRISPR 시스템의 이용과 관련하여, 본 발명자들은 TCR을 코드하는 3 엑손들 내 적절한 타겟 서열들을 결정하여, 살아있는 세포들에서 독성의 상당한 감소를 가능하게 하는 반면, 절단 효율을 유지하였다. 선회되는 타겟 서열들은 출원 WO2014/191128의 표 2에 나타나 있다.
- [0282] MHC 항원들은 또한 이식(transplantation) 반응들에서 주요 역할을 하는 단백질들이다. 거부는 이식되는 조직들의 표면 상 조직적합성 항원들에 반응하는 T 세포들에 의하여 매개되고, 이들 항원들의 가장 큰 그룹은 주요 조직적합성 항원들 (MHC)이다. 이들 단백질들은 모든 더 높은 척추동물들의 표면에서 발현되고 인간 세포에서 (인간 백혈구 항원들에 대한) HLA 항원들로 불린다. TCR처럼, MHC 단백질들은 T 세포 자극에서 필수적 역할을 한다. 항원 제시 세포들 (자주 수지상 세포들)은 MHC 상 세포 표면 상 외래 단백질들의 분해 산물들인 펩타이드들을 보인다. 공-자극 신호의 존재에서, T 세포는 활성화되고, 동일한 펩타이드/MHC 복합체를 또한 보이는 타겟 세포 상에서 작용할 것이다. 예컨대, 자극된 T 헬퍼(helper) 세포는 그것의 MHC와 함께 항원을 보이는 대식세포를 타겟으로 할 것이거나, 또는 세포독성(cytotoxic) T 세포 (CTL)는 외래 바이러스 펩타이드들을 보이는 바이러스에 감염된 세포에서 작용할 것이다.
- [0283] 이와 같이, 덜 동종반응성 T-세포들을 제공하기 위하여, 본 발명의 방법은 하나의 HLA 유전자를 불활성화시키거나 또는 돌연변이시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0284] 인간들에서 클래스 I HLA 유전자 클러스터는 세 개의 주요 자리들, B, C 및 A, 와 더불어 몇몇 주요하지 않은

자리들을 포함한다. 클래스 II HLA 클러스터는 또한 세 개의 주요 자리들, DP, DQ 및 DR을 포함하고, 그리고 클래스 I 및 클래스 II 유전자 클러스터들 둘 다 다형성이며(polymorphic), 이때 군집 내 클래스 I 및 II 유전자들 둘 다의 몇몇 다른 대립형질들(alleles)이 있다. HLA 기능에도 중요한 역할을 하는 몇몇 액세서리 단백질들 또한 있다. Tap1 및 Tap2 서브유닛들은 클래스 I HLA 복합체들 상에 펩타이드 항원들을 로드(load)하는데 필수인 TAP 수송자(transporter) 복합체의 부분들이며, LMP2 and LMP7 프로테오솜(proteosome) 서브유닛들은 HLA에서 보여주기 위하여 펩타이드를 내로 항원들의 단백질가수분해성 분해에 역할을 한다. LMP7에서의 감소는 아마도 안정화의 부족을 통하여 세포 표면에서 MHC 클래스 I의 양을 감소시키는 것으로 보여져 왔다 (Fehling et al. (1999) Science 265:1234-1237). 그 산물이 TAP 복합체 및 HLA 클래스 I 체인들 사이에 다리를 형성하고, TAP 및 LMP에 추가하여 펩타이드 로딩(loading)을 증강시키는 타파신(tapasin) 유전자가 있다. 타파신(tapasin)의 감소는 손상된 MHC 클래스 I 조립을 가진 세포들을 야기시키고, MHC 클래스 I의 세포 표면 발현을 감소시키고, 면역 반응들을 손상시켰다 (Grandea et al. (2000) Immunity 13:213-222 and Garbi et al. (2000) Nat. Immunol. 1:234-238). 상기 유전자들 중 임의의 것이 예컨대 WO 2012/012667에 기재된 대로 본 발명의 부분으로서 불활성화될 수 있다.

[0285] 또다른 예에서, 면역 세포들의 제조 방법은 $\beta 2m$ 을 코딩하는 유전자를 불활성화시키는 추가의 단계를 포함한다. B2M로도 불리든 베타-2 마이크로글로불린은 MHC 클래스 I 분자들의 경쇄이며, 보통 말하는 주요 조직적합성 복합체의 필수적인 부분이다. 인간에서, B2M은 염색체 6 상에 유전자 클러스터로서 위치하는 다른 MHC 유전자들에 반대하여, 염색체 15 상에 위치하는 b2m 유전자에 의하여 코딩된다. 인간 단백질은 119 아미노산들 (서열번호: 1)을 포함하며, 11.800 달톤의 분자량을 갖는다. 베타-2 마이크로글로불린이 결핍된 마우스들 모델들은 B2M이 펩타이드 결합 그루브의 안정성 및 MHC 클래스 I의 세포 표면 발현에 필요하다는 것을 보여 왔다. 정상적인 세포-표면 MHC I 발현이 결핍된 마우스들로부터의 조혈(haemopoietic) 이식들(transplants)이 베타-2 마이크로글로불린 유전자에서의 타겟인 돌연변이 때문에 정상 마우스들에서 NK1.1+ 세포들에 의하여 거부된다는 것이 더 보여졌는데, 이는 MHC I 분자들의 결핍된 발현이 골수 세포들을 숙주 면역 시스템에 민감하게 만든다는 것을 제안한다 (Bix et al. 1991).

[0286] 항-CD38-단일 체인 CAR의 세포외 도메인에서 적어도 하나 에피토프의 삽입

[0287] 본 발명의 항-CD38 CAR는 상기 CAR의 세포외 도메인에서 적어도 하나 에피토프의 삽입을 적어도 포함할 수 있다. 이것은 사이토카인 발작(storm)과 같은 생체내 부작용들의 이벤트에서 CAR를 지닌 것으로 여겨지는 면역 세포들을 시험적으로 격감시키는 것이 의도된다. 게다가, 에피토프 또는 "에피토프-태깅(tagging)"의 이러한 삽입은 그것들의 제조 공정 동안 인 비트로에서 조작된 면역 세포들을 분류 또는 정화하는데 유용할 수 있다. 상기 적어도 하나의 에피토프는 이러한 펩타이드를 인식하는 특정 항체에 의하여 결합되기에 충분히 면역성이 있는 항원성 펩타이드일 수 있다. 예를 들어, 이것은 예컨대, 바람직하게는 CAR 폴리펩타이드 서열 내로 서열 CPYSNPSCS (서열번호 114)의 하나, 그리고 바람직하게는 CD20 미토프의 두 개 카피들을 삽입함으로써 수득될 수 있다. 이후, 간소화 목적을 위하여 N 말단 끝(end)부터 C 말단 끝(end) 까지 scFvs의 순서가 하기와 같이 제시된다: VH 체인 및 그 다음에 VL 체인. 그러나, 이 순서가 반대인 것도 본 발명의 범위 내로 생각될 수 있다: VL 체인 및 그 다음에 VH 체인.

[0288] 본 발명의 항-CD38 CAR 내 적어도 하나 CD20 미토프의 다른 위치들이 도 21A 및 도 21B에 도식화된다. CD20 미토프의 상기 두 개 카피들은 링커에 의하여 VL에 그리고 또한 서로 연결될 수 있다. 그것들은 또한 선택적 링커를 이용하여 항-CD38 scFv 및 (CD8알파와 같은) 힌지 사이에 삽입될 수 있다. CD20 미토프들은 리툭시맙(Rituximab)과 같은 항-CD20 항체들에 의하여 결합될 수 있다 (McLaughlin P, et al. 1998).

[0289] 따라서, 본 발명의 항-CD38 CAR는 선택적으로 인간화된, CD38 세포 표면 항원, 링커 L, 자살 도메인, 힌지 또는 그것의 부분, 막관통 도메인, 공-자극 도메인 및 자극성 도메인에 결합할 수 있는 VH 및 VL 체인들을 포함할 수 있다.

[0290] 더욱 특이적으로, 에피토프들은 하기와 같이 본 발명의 CAR 내로 포함될 수 있다:

[0291] 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mAb-특이적 에피토프들을 포함한다.

[0292] 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인은 적어도 1, 2 또는 3 mAb-특이적 에피토프들을 포함한다.

[0293] 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인이 몇몇 mAb-특이적 에피토프들을 포함할 때, 모든 mAb-특이적 에피토프들이 동일하다.

- [0294] 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인이 몇몇 mAb-특이적 에피토프들을 포함할 때, mAb-특이적 에피토프들은 동일하지 않다. 예컨대, 세포외 결합 도메인은 세 개의 mAb-특이적 에피토프들을 포함하고, 그것들 중 둘은 동일하고 세 번째 것은 다를 수 있다.
- [0295] 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인은 VH, VL, 하나 이상의 mAb-특이적 에피토프들, 바람직하게는 1, 2 또는 3, 더욱 바람직하게는 2 또는 3 mAb-특이적 에피토프들을 포함한다.
- [0296] 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인은 하기 서열 (N 말단은 왼편(left hand side)에 위치한다)을 포함한다:
- [0297] V1-L1-V2-(L)_x-에피토프1-(L)_x;
- [0298] V1-L1-V2-(L)_x-에피토프1-(L)_x-에피토프2-(L)_x;
- [0299] V1-L1-V2-(L)_x-에피토프1-(L)_x-에피토프2-(L)_x-에피토프3-(L)_x;
- [0300] (L)_x-에피토프1-(L)_x-V1-L1-V2;
- [0301] (L)_x-에피토프1-(L)_x-에피토프2-(L)_x-V1-L1-V2;
- [0302] 에피토프1-(L)_x-에피토프2-(L)_x-에피토프3-(L)_x-V1-L1-V2;
- [0303] (L)_x-에피토프1-(L)_x-V1-L1-V2-(L)_x-에피토프2-(L)_x;
- [0304] (L)_x-에피토프1-(L)_x-V1-L1-V2-(L)_x-에피토프2-(L)_x-에피토프3-(L)_x;
- [0305] (L)_x-에피토프1-(L)_x-V1-L1-V2-(L)_x-에피토프2-(L)_x-에피토프3-(L)_x-에피토프4-(L)_x;
- [0306] (L)_x-에피토프1-(L)_x-에피토프2-(L)_x-V1-L1-V2-(L)_x-에피토프3-(L)_x;
- [0307] (L)_x-에피토프1-(L)_x-에피토프2-(L)_x-V1-L1-V2-(L)_x-에피토프3-(L)_x-에피토프4-(L)_x;
- [0308] V1-(L)_x-에피토프1-(L)_x-V2;
- [0309] V1-(L)_x-에피토프1-(L)_x-V2-(L)_x-에피토프2-(L)_x;
- [0310] V1-(L)_x-에피토프1-(L)_x-V2-(L)_x-에피토프2-(L)_x-에피토프3-(L)_x;
- [0311] V1-(L)_x-에피토프1-(L)_x-V2-(L)_x-에피토프2-(L)_x-에피토프3-(L)_x-에피토프4-(L)_x;
- [0312] (L)_x-에피토프1-(L)_x-V1-(L)_x-에피토프2-(L)_x-V2;
- [0313] (L)_x-에피토프1-(L)_x-V1-(L)_x-에피토프2-(L)_x-V2-(L)_x-에피토프3-(L)_x;
- [0314] V1-L1-V2-L-에피토프1;
- [0315] V1-L1-V2-L-에피토프1-L;
- [0316] V1-L1-V2-L-에피토프1-L-에피토프2;
- [0317] V1-L1-V2-L-에피토프1-L-에피토프2-L;
- [0318] V1-L1-V2-L-에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3;
- [0319] V1-L1-V2-L-에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-L;
- [0320] V1-L1-V2-에피토프1;
- [0321] V1-L1-V2-에피토프1-L;
- [0322] V1-L1-V2-에피토프1-L-에피토프2;
- [0323] V1-L1-V2-에피토프1-L-에피토프2-L;
- [0324] V1-L1-V2-에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3;
- [0325] V1-L1-V2-에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-L;
- [0326] 에피토프1-V1-L1-V2;

- [0327] 에피토프1-L-V1-L1-V2;
- [0328] L-에피토프1-V1-L1-V2;
- [0329] L-에피토프1-L-V1-L1-V2;
- [0330] 에피토프1-L-에피토프2-V1-L1-V2;
- [0331] 에피토프1-L-에피토프2-L-V1-L1-V2;
- [0332] L-에피토프1-L-에피토프2-V1-L1-V2;
- [0333] L-에피토프1-L-에피토프2-L-V1-L1-V2;
- [0334] 에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-V1-L1-V2;
- [0335] 에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-L-V1-L1-V2;
- [0336] L-에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-V1-L1-V2;
- [0337] L-에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-L-V1-L1-V2;
- [0338] V1-L-에피토프1-L-V2;
- [0339] L-에피토프1-L-V1-L-에피토프2-L-V2;
- [0340] V1-L-에피토프1-L-V2-L-에피토프2-L;
- [0341] V1-L-에피토프1-L-V2-L-에피토프2-L-에피토프3;
- [0342] V1-L-에피토프1-L-V2-L-에피토프2-에피토프3;
- [0343] V1-L-에피토프1-L-V2-L-에피토프2-L-에피토프3-에피토프4;
- [0344] L-에피토프1-L-V1-L-에피토프2-L-V2-L-에피토프3-L;
- [0345] 에피토프1-L-V1-L-에피토프2-L-V2-L-에피토프3-L;
- [0346] L-에피토프1-L-V1-L-에피토프2-L-V2-L-에피토프3;
- [0347] L-에피토프1-L-V1-L1-V2-L-에피토프2-L;
- [0348] L-에피토프1-L-V1-L1-V2-L-에피토프2-L-에피토프3;
- [0349] L-에피토프1-L-V1-L1-V2-L-에피토프2-에피토프3, or,
- [0350] 에피토프1-L-V1-L1-V2-L-에피토프2-L-에피토프3-에피토프 4.
- [0351] 이때,
- [0352] V1 및 V2는 ScFv의 VH 및 VL이다 (즉, V1은 VL이고 V2는 VH이거나 또는 V1은 VH이고 V2는 VL이다);
- [0353] L1은 ScFv에서 VH 체인을 VL 체인에 연결하기에 적합한 임의의 링커이다;
- [0354] L은 링커이며, 바람직하게는 글리신 및 세린 잔기들을 포함하고, 세포외 결합 도메인에서 L의 각 발생은 동일한 세포외 결합 도메인에서 L의 다른 발생과 동일하거나 또는 다를 수 있고, 그리고,
- [0355] x는 0 또는 1이고, x의 각 발생은 다른 것들과 독립적이고; 그리고
- [0356] 에피토프 1, 에피토프 2 및 에피토프 3은 mAb-특이적 에피토프들이고 동일하거나 또는 다를 수 있다.
- [0357] 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인은 하기 서열 (N말단은 왼편에 위치한다)을 포함한다:
- [0358] VH-L1-VL-L-에피토프1-L-에피토프2-L;
- [0359] L-에피토프1-L-VH-L-에피토프2-L-VL-L-에피토프3-L;
- [0360] VL-L1-VH-L-에피토프1-L-에피토프2-L; or,
- [0361] L-에피토프1-L-VL-L-에피토프2-L-VH-L-에피토프3-L.

- [0362] 이때 L, L1, 에피토프 1, 에피토프 2 및 에피토프 3은 상기에 기재된 바와 같다.
- [0363] 몇몇 예들에서, L1은 글리신 및/또는 세린을 포함하는 링커이다. 몇몇 예들에서, L1은 아미노산 서열 (Gly-Gly-Gly-Ser)_n 또는 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n을 포함하는 링커이고, 이때 n은 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 몇몇 예들에서 L1은 (Gly₄Ser)₄ 또는 (Gly₄Ser)₃이다.
- [0364] 몇몇 예에서, L은 가요성 링커이고, 바람직하게는 글라이신 및/또는 세린을 포함한다. 몇몇 예들에서, L은 SGG, GGS, SGGS, SSGGS, GGGG, SGGGG, GGGGS, SGGGGS, GGGGGS, SGGGGGS, SGGGGG, GSGGGS, GGGGGGS, SGGGGGG, SGGGGGGGS, 또는 SGGGSGGGGS 바람직하게는 SGG, SGGS, SSGGS, GGGG, SGGGGS, SGGGGS, SGGGGG, GSGGGS 또는 SGGGSGGGGS로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 예에서, 세포외 결합 도메인이 L의 몇몇 발생을 가질 때, 모든 L들은 동일하다. 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인 L의 몇몇 발생을 가질 때, L들은 모두 동일하지 않다. 몇몇 예들에서, L은 SGGGS이다. 몇몇 예들에서, 세포외 결합 도메인은 L의 몇몇 발생들을 포함하고, 모든 L들은 SGGGS이다.
- [0365] 몇몇 예들에서, 에피토프 1, 에피토프 2 및 에피토프 3은 동일하거나 또는 다르고, 하기 표 6에 제시된 것과 같이 서열번호 114 내지 서열번호 121 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 갖는 mAb-특이적 에피토프들로부터 선택된다.
- [0366] 표 6: 그것들의 대응되는 서열들을 갖는 미모토프들 및 에피토프들

표 6

리톡시맵		
미모토프(Mimotope)	서열번호 114	CPYSNPCLC
팔리비주맵(Palivizumab)		
에피토프	서열번호 115	NSELLSLINDMPITNDQKKL MSNN
세톡시맵(Cetuximab)		
미모토프 1	서열번호 116	CQFDLSTRRLKC
미모토프 2	서열번호 117	CQYNLSSRLKC
미모토프 3	서열번호 118	CVWQRWQKSYVC
미모토프 4	서열번호 119	CMWDRFSRWYKC
Nivolumab		
에피토프 A	서열번호 120	SFVLNWYRMSPSNQTDKL AAFPEDR
에피토프 B	서열번호 121	SGTYLCGAISLAPKAQIKE

- [0367]
- [0368] 몇몇 예들에서, 에피토프 1, 에피토프 2 및 에피토프 3은 동일하거나 또는 다르고, 이브리투모맵(ibritumomab), 티우세탄(tiuxetan), 무로모넵(muromonab)-CD3, 토시투모맵(tositumomab), 아브시시맵(abciximab), 바실리시맵(basiliximab), 브렌투시맵(brentuximab) 베도틴(vedotin), 세톡시맵(cetuximab), 인플리시맵(infliximab), 리톡시맵(rituximab), 알렘투주맵(alemtuzumab), 베바시주맵(bevacizumab), 세르톨리주맵(certolizumab) 페골(pegol), 다클리주맵(daclizumab), 에쿨리주맵(eculizumab), 에팔리주맵(efalizumab), 겐투주맵(gemtuzumab), 나탈리주넵(natalizumab), 오말리주맵(omalizumab), 팔리비주맵(palivizumab), 라니비주맵(ranibizumab), 토실리주맵(tocilizumab), 트라스투주맵(trastuzumab), 베돌리주맵(vedolizumab), 아달리무맵(adalimumab), 벨리무맵(belumumab), 카나키누맵(canakinumab), 데노수맵(denosumab), 골리무맵(golimumab), 이필리무맵(ipilimumab), 오패투무맵(ofatumumab), 판이투무맵(panitumumab), QBEND-10, 알렘투주맵(alemtuzumab) 또는 우스테키누맵(ustekinumab)에 의하여 특이적으로 인식되는 mAb-특이적 에피토프들로부터 선택된다.
- [0369] 또다른 예에 따라, 에피토프는 미모토프이다. 자주 에피토프의 구조를 흉내낸 펩타이드인, 마크로분자로서, 미모토프는 종래 에피토프보다 더 작은 이점을 갖고, 그러므로 비-입체적인(conformational) 서열에 이로우며 CAR와 같은 폴리펩타이드를 재생산하는데 더 쉽다. 미모토프들은 세톡시맵에 대한 두 개의 10 아미노산 펩타이드들(Riemer et al., 2005) 또는 팔리비주맵(palivizumab)에 대한 24 AA (Arbiza et al., 1992)와 같은 몇몇 약학적으로-승인된 mAb에 대하여 알려져 있다. 이들 미모토프들이 파아지 디스플레이로서 확인될 수 있기 때문에, 동일한 mAb에 대하여 scFv를 동요하게 하지 않는 서열을 수득하기 위하여 그것들 중 몇몇을 시도하는 것이 가능하

다. 그것들의 이용은 보체(complement)-의존적(dependent) 세포독성(cytotoxicity) (CDC)을 증강시킬 수 있다.

- [0370] 선호되는 예에서, 키메라 scFv 내 도입되는 에피토프는 CD20 미모토프 (서열번호 114)이고 - 목적(들)의 분류 및/또는 고갈(depletion)을 위한 이 미모토프에 대한 친화도를 제시하는 융합되는 mAb는 리톡시맙이다.
- [0371] 한 예에서, 상기 적어도 하나의 에피토프는 하나의 링커에 의하여 상기 VH 및 VL 체인들이 선택적으로 연결된, 항-CD38 CAR의 VH 및 VL 체인들 사이에 삽입된다.
- [0372] 몇몇 예에서, scFv의 맥락에서 사용되는 용어 "링커"는 가변 중쇄 및 가변 경쇄 영역들을 서로 연결하기 위하여, 조합하여 또는 단독으로 사용되는 글라이신 및/또는 세린 잔기들과 같은 아미노산들로 구성되는 펩타이드 링커를 가리킨다. 한 예에서, 가용성 폴리펩타이드 링커는 글라이신/세린 링커이고, 아미노산 서열 (Gly-Gly-Gly-Ser)_n 또는 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n을 포함하며, 이때 n은 1 이상의 양의 정수이다. 예컨대, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 및 n=10이다. 한 예에서, 가용성 폴리펩타이드 링커들은 (Gly₄Ser)₄ 또는 (Gly₄Ser)₃을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또다른 예에서, 링커들은 (GlySer)_n, (Gly₂Ser)_n 또는 (Gly₅Ser)_n의 복수의 반복과 같은, (Gly_xSer)_n의 복수의 반복들을 포함하며, 이때 x=1, 2, 3, 4 또는 5 이고 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 또한 본 발명의 범위 내에 참고로서 여기에 포함되는 WO2012/138475에 기재된 링커들이 포함된다.
- [0373] 한 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 나타난 대로, V1, V2 또는 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 이때 하나의 CD20 미모토프는 하나의 링커에 의하여 상기 VH 및 VL 체인들에 선택적으로 연결되는, 항-CD38 CAR의 VH 및 VL 체인들 사이에 삽입된다.
- [0374] 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0375] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고,
- [0376] 이때 하나의 CD20 미모토프는 하나의 링커에 의하여 상기 VH 및 VL 체인들에 선택적으로 연결된, 항-CD38 CAR의 VH 및 VL 체인들 사이에 삽입된다.
- [0377] 또다른 예에서, 상기 적어도 하나의 에피토프는 하나의 링커에 의하여 CAR의 N 말단 말단(end)에서 그리고 VH 체인에 선택적으로 연결된 - 따라서 scFvs의 업프론트(upfront)- CAR의 N 말단 말단(end)에서 삽입된다.
- [0378] 또다른 예에서, 상기 적어도 하나 에피토프는, 하나의 링커에 의하여 힌지에 또는 VL 체인에 선택적으로 연결된, CAR의 힌지 및 scFvs 사이에 삽입된다.
- [0379] 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0380] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이때 하나의 에피토프가, 하나의 링커에 의하여 VL 체인에 그리고 힌지에 선택적으로 연결되는, CAR의 힌지 및 scFv들 사이에 삽입된다.
- [0381] 더 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0382] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50

(13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이때 하나의 에피토프가 하나의 링커에 의하여 VL 체인에 그리고 힌지에 선택적으로 연결되는, CAR의 힌지 및 scFv들 사이에 삽입된다.

[0383] 선호되는 예에서, 적어도 두 개의 에피토프들이 본 발명의 항-CD38의 세포의 도메인에 삽입된다.

[0384] 한 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,

[0385] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고,

[0386] 상기 엑스트라-결합 도메인은 CD38 및 α Fc γ RIII α 또는 CD8 α 또는 IgG1 힌지에 대항하여 항해졌진 VH 및 VL 체인들을 포함하고;

[0387] 이때 상기 2 에피토프들은 scFvs 및 상기 힌지 사이에 나란히 삽입되고, 그리고 선택적으로

[0388] 링커는 2 개의 에피토프들 사이 및/또는 VH 및 2개의 에피토프들 사이를 차지한다.

[0389] 한 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,

[0390] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4), 및 두 개의 CD20 미토포프들과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고,

[0391] 상기 엑스트라-결합 도메인은 CD38 및 Fc γ RIII α 또는 CD8 α 또는 IgG1 힌지에 대항하여 항해지는 VH 및 VL 체인들을 포함하고;

[0392] 이때 상기 2개의 에피토프들은 scFvs의 업프론트에 나란히, 즉 CAR- 의 N 말단 말단(end)에서 삽입되고

[0393] 그리고 선택적으로, 링커는 CAR- 의 N 말단 말단(end) 및/또는 2개의 에피토프들 사이를 차지한다.

[0394] 한 예에 따라, VH가 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 적어도 두 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.

[0395] 또다른 예에 따라, VL이 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 두 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.

[0396] 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,

[0397] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이때 VL이 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 두 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.

[0398] 더 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재되는 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH

및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,

- [0399] 이때, VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이때 VL이 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 두 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.
- [0400] 또다른 예에 따라, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 세포의 결합 도메인을 포함하고, 이때 VH 및 VL 체인들이 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 적어도 두 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.
- [0401] 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0402] 이때 상기 VH 및 VL이 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이때 VH 및 VL 체인들이 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 두 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.
- [0403] 더 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로, V1, V2 및 V3 으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0404] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이때 VH 및 VL 체인들이 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 두 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.
- [0405] 또다른 예에서, 세 개의 에피토프들이 본 발명의 항-CD38 CAR의 세포의 도메인에 삽입된다.
- [0406] 특정 예에 따라, 본 발명의 상기 CD38 특이적 CAR는 세포의 결합 도메인을 포함하고, 이때 VH 및 VL 체인들이 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 세 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.
- [0407] 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0408] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이때 VH 및 VL 체인들이 그것들 사이에 위치하여 이들 요소들 모두가 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지하는 방식으로, 세 개의 에피토프들이 세포의 도메인에 삽입된다.
- [0409] 더 선호되는 예에서, 상기 CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3 으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포의 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0410] 이때 상기 VH 및 VL이 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50

(13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이들 요소들 모두는 적어도 하나의 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지한다.

- [0411] 또다른 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0412] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열 및 세 개의 CD20 에피토프들을 포함하고,
- [0413] 상기 엑스트라-결합 도메인은 CD38 및 Fc γ RIII α 또는 CD8 α 또는 IgG1 힌지에 대항하여 항해진 VH 및 VL 체인들을 포함한다;
- [0414] 이때 상기 3 개의 에피토프들이 scFvs 및 상기 힌지 사이에 나란히 삽입되고, 그리고 선택적으로
- [0415] 링커는 3 개의 에피토프들 사이 및/또는 VH 및 3 개의 에피토프들 사이에 자리를 차지한다.
- [0416] 또다른 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0417] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열, 두 개의 CD20 에피토프들, 및 하나의 CD34 에피토프를 포함하고;
- [0418] 상기 엑스트라-결합 도메인은 CD38 및 Fc γ RIII α 또는 CD8 α 또는 IgG1 힌지에 대항하여 항해진 VH 및 VL 체인들을 포함하고;
- [0419] 상기 2 개의 에피토프들은 scFvs 및 상기 힌지 사이에 나란히 삽입되고,
- [0420] 그리고 상기 CD34 에피토프는 상기 2 개의 CD20 에피토프들 사이에 삽입되고, 모든 요소들은 링커에 의하여 선택적으로 자리를 차지한다.
- [0421] 몇몇 예에서, 에피토프 1은 서열번호 114 또는 116-119의 아미노산 서열을 갖는 mAb-특이적 에피토프이다.
- [0422] 몇몇 예에서, 에피토프 2는 서열번호 114 또는 116-119의 아미노산 서열을 갖는 mAb-특이적 에피토프이다.
- [0423] 몇몇 예에서, 에피토프 3 및 에피토프 4는 서열번호 114 또는 116-119의 아미노산 서열을 갖는 mAbs-특이적 에피토프이다.
- [0424] 몇몇 예에서, 에피토프 1, 에피토프 2, 에피토프 3 및 에피토프 4 중 하나는 CD34 에피토프, 바람직하게는 서열번호 122 또는 123의 에피토프이다. 몇몇 예에서, 에피토프1, 에피토프 2, 에피토프 3 및 에피토프 4 중 하나는 CD34 에피토프, 바람직하게는 서열번호 122 또는 123의 에피토프이고, 다른 mAb 특이적 에피토프들은 CD20 미토프들, 바람직하게는 서열번호 114의 미토프이다.
- [0425] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0426] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열, 및 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 두 개의 CD20 에피토프들을

포함하고, 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르다.

- [0427] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR) 은 도 8에 기재된 대로 V2로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, CD8 α 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0428] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 두 개의 CD20 에피토프들을 포함하고, 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르다.
- [0429] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 각각 서열번호 124에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0430] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 나타난 대로 V1으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, FcRIII α 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0431] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 62 및 58 (28F5)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 CD20 에피토프들을 포함하고, 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르다.
- [0432] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 각각 서열번호 126에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0433] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 도 8에 기재된 대로 V2로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, CD8 α 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0434] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 CD20 에피토프들을 포함하고, 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르다.
- [0435] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 각각 서열번호 126에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0436] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 도 8에 기재된 대로 V2로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, FcRIII α 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0437] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 두 개의 CD20 에피토프들을 포함하고, 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르다.
- [0438] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 각각 서열번호 128에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0439] 한 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 도 8에 기재된 대로 V1, V2 및 V3로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,

- [0440] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10), 서열번호 62 및 58 (28F5), 서열번호 54 및 50 (13F11), 서열번호 30 및 26 (16B5), 서열번호 38 및 34 (10F7), 서열번호 46 및 42 (27B6) 또는 서열번호 22 및 18 (29B4)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 세 개의 CD20 에피토프들이 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖고, 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르고, 하나의 CD34 에피토프는 서열번호 122 또는 123의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0441] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR) 은 도 8에 기재된 대로 V2로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, CD8 α 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0442] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 62 및 58 (28F5)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 세 개의 CD20 에피토프들을 포함하고, 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르고, 하나의 CD34 에피토프는 서열번호 122 또는 123의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0443] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 각각 서열번호 125와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0444] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)은 도 8에 나타난 대로 V1으로부터 선택된 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, FcRIII α 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0445] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 62 및 58 (28F5)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 세 개의 CD20 에피토프들을 포함하고; 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르며, 하나의 CD34 에피토프는 서열번호 122 또는 123의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0446] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 각각 서열번호 127과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0447] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR) 은 도 8에 기재된 대로 V2로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, CD8 α 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0448] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10)과 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 세 개의 CD20 에피토프들을 포함하고; 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르며, 하나의 CD34 에피토프는 서열번호 122 또는 123의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0449] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 각각 서열번호 129와 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0450] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR) 은 도 8에 나타난 대로 V1으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인, CD8 α 힌지, 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,
- [0451] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 두 개의 CD20 에피토프들을 포함하고; 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르다.
- [0452] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 각각 서열번호 130에 적어도 90 %, 적어도

도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0453] 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 도 8에 나타난 대로 V1으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고, 상기 구조체는 단일클론 항-CD38 항체로부터의 VH 및 VL을 포함하는 세포 외 리간드 결합-도메인, FcRIII α 힌지, _α 막관통 도메인, CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및 4-1BB로부터의 공-자극 도메인을 포함하고,

[0454] 이때 상기 VH 및 VL은 각각 서열번호 14 및 10 (25A10)에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 항-CD38 CAR는 서열번호 114 또는 116-119로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 세 개의 CD20 에피토프들을 포함하고, 상기 CD20 에피토프들은 동일하거나 또는 다르고, 하나의 CD34 에피토프는 서열번호 122 또는 123의 아미노산 서열을 갖는다.

[0455] 더 선호되는 예에서, CD38 특이적 키메라 항원 수용체 (항-CD38 CAR)는 각각 서열번호 131에 적어도 90 %, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0456] 약물-내성 T-세포들을 조작하는 방법

[0457] 암 치료 및 동종이계 T-세포들의 선택적 이식을 개선하기 위하여, 학요법 또는 면역억제제들의 독성 부작용으로부터 그것들을 보호하기 위하여 약물 내성이 조작된 T-세포들에 부여될 수 있다. 과연 본 발명자들은 대부분의 환자들이 T-세포 면역요법 전 표준 치료로서 면역 격감 제제들 및 화학요법으로 치료된 것을 관찰하여 왔다. 또한 그들은 치료 전 생체 외(ex-vivo)에서 세포들의 확장을 위한 배양 배지에서 화학요법 약물들을 첨가함으로써, 또는 화학요법 또는 면역억제 치료들 하 환자들에서 생체 내(in-vivo)로 조작된 T-세포들의 선택적 확장을 얻음으로써, 그들이 조작된 T-세포들의 선택을 돕기 위하여 이들 치료들의 이점을 이용할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0458] 또한 약물 내성 유전자를 발현시키는 T-세포들은 약물 민감성 세포들에 비례하여 크게 증가할 것이기 때문에, T-세포들의 약물 내성은 생체 외(ex vivo)에서, 또는 그것들의 풍부를 허용한다. 특히, 본 발명은 하기를 포함하는, 동종이계 및 면역요법에 내성인 약물 내성 T-세포들을 조작하는 방법에 대한 것이다:

[0459] (a) T-세포를 제공하는 단계;

[0460] (b) 적어도 하나의 약물을 선택하는 단계;

[0461] (c) T-세포를 변형시켜 상기 T-세포에 약물 내성을 부여하는 단계;

[0462] (d) 상기 약물의 존재 하 상기 조작된 T-세포를 확장시키는 단계, 및 선택적으로

[0463] 앞의 단계들은 전술함 바와 같이 그 방법들의 단계들과 조합될 수 있다.

[0464] 약물 내성은 하이포잔틴-구아닌(hypoxanthine-guanine) 포스포리보실(phosphoribosyl) 트랜스페라제(transferase) (HPRT) 유전자 (Genbank: M26434.1)와 같이, 약물에 대한 세포의 민감도의 원인이 되는 하나 이상의 유전자(들) (약물 민감성 유전자(들))을 불활성화시킴으로써 T-세포에 부여될 수 있다. 특히 HPRT는 세포분열억제제(cytostatic) 대사산물, 암, 특히 백혈병들의 환자들을 치료하는데 현재 사용되며, HPRT에 의하여 세포독성 티오구아닌 뉴클레오타이드로 전환되는 6-티오구아닌(thioguanine) (6TG),에 대한 내성을 부여하기 위하여 조작된 T-세포들에서 불활성화될 수 있다 (Hacke, Treger et al. 2013). T-세포의 표면에서 정상적으로 발현되는 CD3의 불활성화가 테플리주맙(teplizumab)과 같은 항-CD3 항체들에 대한 저항을 부여할 수 있는 경우 또한 예.

[0465] 한 예에서, 불활성화되는 내성 유전자는 디옥시시티딘(deoxycytidine) 키나제 (dCk)를 코딩하는 것이다. 디옥시시티딘 키나제 (DCK)는 몇몇 디옥시리보뉴클레오사이드들 및 그것들의 뉴클레오사이드 유사체들(analogs)의 인산화에 요구된다. DCK의 결핍은 항바이러스 및 항암 화학요법 제제들에 대한 내성과 관련된다. 반대로, 증가되는 디옥시시티딘 키나제 활성은 세포독성 뉴클레오사이드 트리포스페이트 유도체들에 이들 화합물들의 증가된 활성화와 관련된다. DCK는 약물 내성 및 민감도에 대한 그것의 관계 때문에 임상적으로 중요하다 (Hazra S, Szewczak A, Ort S, Konrad M, Lavie A (2011) "Post-translational phosphorylation of serine 74 of human deoxycytidine kinase favors the enzyme adopting the open conformation making it competent for nucleoside binding and release". Biochemistry 50 (14): 2870-8).

[0466] 약물 내성은 또한 약물 내성 유전자를 발현시킴으로써 T-세포에 부여될 수 있다. 상기 약물 내성 유전자는 (예컨대 메토폭사트(methotrexate)) 화학요법 제제와 같은, 제제에 "내성"을 코딩하는 핵산 서열을 가리킨다. 다

시 말해서, 세포에서 약물 내성 유전자의 발현은 약물 내성 유전자가 없는 대응되는 세포의 증식보다 더 큰 정도로 제제의 존재 하 세포들의 증식을 허용한다. 본 발명의 약물 내성 유전자는 항-대사산물, 메토틱렉사트(methotrexate), 빈블라스틴(vinblastine), 시스플라틴(cisplatin), 알킬화제들, 안트라사이클린들(anthracyclines), 세포독성 항생제들, 항-이뮤노필린들(immunophilins), 그것들의 유사체들 또는 유도체들 등에 대한 내성을 코드할 수 있다.

[0467] 디하이드로폴레이트(dihydrofolate) 리덕타제(reductase) (DHFR), 이노신(inosine) 모노포스페이트(monophosphate) 디하이드로게나제(dehydrogenase) 2 (IMPDH2), 칼시뉴린(calcineurin) 또는 메틸구아닌(methylguanine) 트랜스페라제(transferase) (MGMT)와 같은 몇몇 유전자들의 여러가지 대린 유전자들은 세포에 약물 내성을 부여하는 것이 확인되어 왔다. 상기 약물 내성 유전자는 상기 유전자를 코드하는 이식유전자를 세포 내로 도입함으로써 또는 상기 약물 내성 유전자를 상동 재조합에 의하여 세포의 게놈 내로 통합시킴으로써 세포에서 발현될 수 있다. 몇몇 다른 약물 내성 유전자들이 타겟인 세포들에 약물 내성을 부여하는데 잠재적으로 사용될 수 있다는 것이 확인되어 왔다 (Takebe, Zhao et al. 2001; Sugimoto, Tsukahara et al. 2003; Zielske, Reese et al. 2003; Nivens, Felder et al. 2004; Bardenheuer, Lehmborg et al. 2005; Kushman, Kabler et al. 2007).

[0468] DHFR은 세포에서 테트라하이드로폴레이트(tetrahydrofolate)의 양을 조절하는데 수반되는 효소이며 DNA 합성에 필수적이다. 메토틱렉사트(methotrexate) (MTX)와 같은 엽산(folate) 유사체들은 DHFR을 억제하며, 그러므로 임상에서 항-신생 제제들로서 사용된다. 치료에서 사용되는 항-엽산들에 의한 억제에 내성을 증가시켜온 DHFR의 다른 돌연변이 형태들이 기재되어 왔다. 특정 예에서, 본 발명에 따른 약물 내성 유전자는 메토틱렉사트와 같은 항-엽산 치료에 내성을 부여하는 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 인간 야생형 DHFR의 돌연변이 형태를 코드하는 핵산 서열일 수 있다 (GenBank: AAH71996.1). 특정 예에서, DHFR의 돌연변이 형태는 G15, L22, F31 또는 F34 자리에서, 바람직하게는 L22 또는 F31 자리들에서, 적어도 하나의 돌연변이된 아미노산을 포함한다 ((Schweitzer, Dicker et al. 1990); International application WO 94/24277; US patent US 6,642,043).

[0469]

[0470] 여기에서 사용된 대로 "항엽산 제제" 또는 "엽산(folate) 유사체들"은 어느 정도 수준에서 엽산 대사물질 경로를 방해하도록 향해지는 분자를 가리킨다. 항엽산 제제들의 예들은, 메토틱렉사트 (MTX); 아미노프테린(aminopterin); 트리메트렉사트(trimetrexate) (Neutrexin™); 에다트렉사트(edatrexate); N10-프로파길(propargyl)-5,8-디데아자폴릭 엑시드(dideazafolic acid) (CB3717); ZD1694 (Tumodex), 5,8-디데아자이소폴릭 엑시드(dideazaisofolic acid) (IAHQ); 5,10-디데아자테트라하이드로폴릭 엑시드(dideazatetrahydrofolic acid) (DDATHF); 5-디아자폴릭 엑시드(deazafolic acid); PT523 (N 알파-(4-아미노-4-디옥시프로에일(deoxypteroyl))-N델타(delta)-헤미프탈로일(hemiphthaloyl)-L-오르니틴(ornithine)); 10-에틸-10-디아자아미노프테린(deazaaminopterin) (DDATHF, lomatrexol); 피리트렉심(piritrexim); 10-EDAM; ZD1694; GW1843; 페메트렉사트(Pemetrexate) 및 PDX (10-프로파길(propargyl)-10-디아자아미노프테린(deazaaminopterin))을 포함한다.

[0471] 약물 내성 유전자의 또다른 예는 구아노신 뉴클레오타이드들의 데 노보(de novo) 합성에서 속도-제한 효소인, 이오니신(ionisine)-5'-모노포스페이트(monophosphate) 디하이드로게나제(dehydrogenase) II (IMPDH2)의 돌연변이 또는 변형된 형태일 수 있다. IMPDH2의 돌연변이 또는 변형된 형태는 IMPDH 억제제 내성 유전자이다. IMPDH 억제제들은 마이코페놀릭 엑시드(mycophenolic acid) (MPA) 또는 그것의 프로드러그 마이코페놀레이트(mycophenolate) 모페틸(mofetil) (MMF)일 수 있다. 돌연변이 IMPDH2은 IMPDH 억제제에 대한 상당히 증가된 내성으로 이끄는 야생형 인간 IMPDH2의 MAP 결합 부위에서 적어도 하나, 바람직하게는 두 개의 돌연변이들을 포함할 수 있다 (NP_000875.2). 그 돌연변이들은 바람직하게는 T333 및/또는 S351 자리들에서이다 (Yam, Jensen et al. 2006; Sangiolo, Lesnikova et al. 2007; Jonnalagadda, Brown et al. 2013). 특정 예에서, 333 자리의 트레오닌 잔기는 이소류신 잔기로 대체되고, 351 자리의 세린 잔기는 티로신 잔기로 대체된다.

[0472] 또다른 약물 내성 유전자는 칼시뉴린의 돌연변이 형태이다. 칼시뉴린(PP2B)은 T-세포 활성화의 중심이 되며, 많은 생물학적 공정들에 관여되는 도처에 존재하는 식으로 발현되는 세린/트레오닌 단백질 포스포타제이다. 칼시뉴린은 촉매적 서브유닛 (CnA; 세 개의 이소폼들) 및 조절성 서브유닛 (CnB; 두 개의 이소폼들)로 이루어지는 헤테로다이머이다. T-세포 수용체의 참여(engagement) 후, 칼시뉴린은 전사 인자 NFAT를 탈인산화하는데, 이는 그것이 IL2와 같은 활성인 주요 타겟 유전자 및 핵으로 이동하는 것을 가능하게 한다. FKBP12과 복합체에서 FK506, 또는 CyPA와 복합체에서 사이클로스포린(cyclosporine) A (CsA)는 칼시뉴린의 h활성 부위로의 NFAT 접

근을 막는데, 이는 그것의 탈인산화를 방지하고, 이로써 T-세포 활성화를 억제한다 (Brewin, Mancao et al. 2009). 본 발명의 약물 내성 유전자는 FK506 및/또는 CsA와 같은 칼시뉴린 억제제에 대하여 내성인 칼시뉴린의 돌연변이 형태를 코딩하는 핵산 서열일 수 있다. 특정 예에서, 상기 돌연변이 형태는 자리들: V314, Y341, M347, T351, W352, L354, K360에서 야생형 칼시뉴린 헤테로다имер a의 적어도 하나의 돌연변이된 아미노산, 바람직하게는 T351 및 L354 또는 V314 및 Y341 자리들에서 이중 돌연변이들을 포함할 수 있다. 여기에 기재된 아미노산 자리들의 대응성은 야생형 인간 칼시뉴린 헤테로다имер의 형태의 아미노산들의 자리들에 관하여 자주 발견된다 (GenBank: ACX34092.1).

[0473] 또다른 특정 예에서, 상기 돌연변이 형태는 자리들: V120, N123, L124 또는 K125에서 야생형 칼시뉴린 헤테로다имер b의 적어도 하나의 돌연변이된 아미노산, 바람직하게는 자리들 L124 및 K125에서 이중 돌연변이들을 포함할 수 있다. 여기에 기재된 아미노산 자리들의 대응성은 야생형 인간 칼시뉴린 헤테로다имер b 폴리펩타이드의 형태의 아미노산들의 자리들에 관하여 자주 발견된다 (GenBank: ACX34095.1).

[0474] 또다른 약물 내성 유전자는 인간 알킬 구아닌 트랜스페라제 (hAGT)를 코딩하는 O(6)-메틸구아닌 메틸트랜스페라제(methylguanine methyltransferase) (MGMT) 이다. AGT는 니트로소우레아들(nitrosoureas) 및 테모졸로미드(temozolomide) (TMZ)과 같은 알킬화 제제들의 세포독성 효과들에 내성을 부여하는 DNA 수선 단백질이다. 6-벤질구아닌(benzylguanine) (6-BG)은 타이트로소우레아 독성을 강하게 하는 AGT의 억제제이며, 이 제제의 세포독성 효과들을 강력하게 하기 위하여 TMZ와 함께(co)-투여된다. AGT의 변종들을 코딩하는 MGMT의 몇몇 돌연변이 형태들이 6-BG에 의하여 불활성화에 매우 내성을 가지나, DNA 손상을 수선하는 그것들의 능력은 유지된다 (Maze, Kurpad et al. 1999). 특정 예에서, AGT 돌연변이 형태는 야생형 AGT 자리 P140의 돌연변이된 아미노산을 포함할 수 있다 (UniProtKB: P16455).

[0475] 또다른 약물 내성 유전자는 다중약물(multidrug) 내성(resistance) 단백질 1 (MDR1) 유전자이다. 이 유전자는 세포 막을 가로지르는 물질대사의 부산물들의 이동에 관여하는 P-당단백질(glycoprotein) (P-GP)로 알려진, 막당단백질을 코딩한다. P-Gp 단백질은 몇몇 구조적으로 관련없는 화학요법 제제들에 대한 넓은 특이성을 보인다. 이와 같이, 약물 내성은 MDR-1 을 코딩하는 핵산 서열의 발현에 의하여 세포들에 부여된다 (NP_000918).

[0476] 약물 내성 유전자는 또한 ble 유전자 또는 mcrA 유전자와 같은 세포독성 항생제들일 수 있다. 면역 세포에서 ble 유전자 또는 mcrA의 이소형(ectopic) 발현은 각각 블레오마이신(bleomycine) 또는 마이토마이신(mitomycin) C인, 화학요법 제제에 노출될 때 선택적 이점을 준다.

[0477] T-세포들은 또한 면역억제제들에 내성으로 만들어질 수 있다. 면역억제제는 작동의 몇몇 메커니즘들 중 하나에 의하여 면역 기능을 억제하는 제제이다. 다시 말해서, 면역억제제는 면역 반응의 정도 및/또는 폭(voracity)을 감소시키는 능력에 의하여 억제되는 화합물에 의하여 수행되는 역할이다. 제한되지 않는 예로서, 면역억제제는 칼시뉴린 억제제, 라파마이신(rapamycin)의 타겟, 인터루킨-2 α-체인 차단제(blocker), 이노신 모노포스페이트 디하이드로게나제의 억제제, 디하이드로폴릭 엑시드 리덕타제의 억제제, 코르티코스테로이드 또는 면역억제 대사길항물질일 수 있다. 전통적 세포독성 면역억제제들은 DNA 합성을 억제함으로써 작용한다. 다른 것들은 헬퍼 세포들의 활성화를 억제함으로써 또는 T-세포들의 활성화를 통하여 작용할 수 있다. 본 발명에 따른 방법은 T 세포들에서 면역억제제의 타겟을 불활성화시킴으로써 면역요법에 대한 T 세포들의 면역억제 내성을 부여하는 것을 가능하게 한다. 제한되지 않는 예들로서, 면역억제제에 대한 타겟들은 CD52, 글루코코르티코이드 수용체 (GR), FKBP 패밀리 유전자 멤버 및 사이클로필린 패밀리 유전자 멤버:와 같은 면역억제제에 대한 수용체일 수 있다.

[0478] 면역적격(immunocompetent) 숙주들에서, 동종이계 세포들은 숙주 면역 시스템에 의하여 보통 빠르게 거부된다. 방사선조사되지 않은 혈액 산물들에 존재하는 동종이계 백혈구들은 겨우 5 내지 6일 동안 지속될 것이다. 이와 같이, 동종이계 세포들의 거부를 방지하기 위하여, 숙주의 면역 시스템 은 효과적으로 억제되어야 한다. 글루코코르티코이드스테로이드들은 면역억제를 위하여 널리 치료적으로 사용된다. 스테로이드 호르몬들의 이 종류는 T 세포들의 시토줄에 존재하는 글루코코르티코이드 수용체 (GR)에 결합하여 핵으로의 이동 및 면역 공정에 관여하는 다수의 유전자들의 발현을 조절하는 특정 DNA 모티프들의 결합을 야기한다. 글루코코르티코이드 스테로이드들로 T 세포들의 치료는 T 세포 활성화에서 간섭 및 T 세포 면역성 결여(anergy)를 이끄는 사이토카인 생산의 감소된 수준들을 야기한다. CAMPATH-1H으로도 알려진 알레투주맙(Alemtuzumab)은 12 아미노산 글리코실포스파티딜(glycosylphosphatidyl)-이노시톨(inositol)- (GPI) 연결된 당단백질인, CD52를 타겟팅하는 인간화된 단일클론 항체이다 (Waldmann and Hale, 2005). CD52는 T 및 B 림프구들 상에서 높은 수준으로, 단핵구들 상에서 낮은 수준으로 발현되며, 반면, 과립구들 및 골수 전구체들 상에는 없다. CD52에 대항하여 향해지는 인간화된 단

일클론 항체, 알레투주맵으로 하는 치료는 순환하는 림프구들 및 단핵구들의 급격한 격감을 유도하는 것으로 보여져 왔다. 그것은 T 세포 림프종들의 치료에서 그리고 이식(transplantation)의 컨디셔닝 식이요법의 부분으로서 특정 경우들에서 자주 사용된다. 그러나, 입양 면역요법의 경우에, 면역억제 약물들의 사용은 도입되는 치료적 T 세포들 상에 해로운 효과 또한 가질 것이다. 그러므로 이들 질병들에서 입양 면역요법 접근을 효과적으로 이용하기 위하여, 도입되는 세포들은 면역억제 치료에 내성일 필요가 있을 것이다.

[0479] 상기 단계들의 선호되는 예로서, 면역억제 치료에 특이적인, 단계 (b)의 상기 유전자는 CD52이고, 단계 (d)의 면역억제 치료는 CD52 항원을 타겟팅하는 인간화된 항체를 포함한다. 또다른 예로서, 면역억제 치료에 특이적인 단계 (b)의 상기 유전자는 글루코코르티코이드 수용체 (GR) 이고, 단계 (d)의 면역억제 치료는 덱사메타손(dexamethasone)과 같은 코르티코스테로이드를 포함한다. 또다른 예로서, 면역억제 치료에 특이적인 단계 (b)의 상기 타겟 유전자는 FKBP 패밀리에 유전자 멤버 또는 그것의 변종이고, 단계 (d)의 면역억제 치료는 타크롤리무스(Tacrolimus) 또는 푸지마이신(fujimycin)으로도 알려진 FK506을 포함한다. 또다른 예로서, 상기 FKBP 패밀리에 유전자 멤버는 FKBP12 또는 그것의 변종이다. 또다른 예로서, 면역억제 치료에 특이적인, 단계 (b)의 상기 유전자는 사이클로필린 패밀리에 유전자 멤버 또는 그것의 변종이고, 단계 (d)의 면역억제 치료는 사이클로스포린을 포함한다.

[0480] 본 발명의 특정 예에서 그 방법의 유전적 변형 단계는 CD52 및 GR, CD52 및 TCR 알파, CDR52 및 TCR 베타, GR 및 TCR 알파, GR 및 TCR 베타, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 두 개 유전자들의 불활성화에 의존한다. 또다른 예에서, 그 방법의 유전적 변형 단계는 둘보다 많은 유전자들의 불활성화에 의존한다. 유전적 변형은 바람직하게는 다른 유전자들을 타겟팅하는 적어도 두 개의 RNA 가이드들을 이용하여 생체 외(ex-vivo)에서 작동된다.

[0481] 유전자들을 불활성화시킴으로써, 흥미있는 유전자가 기능적 단백질 형태로 발현되지 않는 것이 의도된다.

[0482] 면역요법을 위한 매우 활성인 T 세포들의 조작

[0483] 본 발명에 따라, T-세포들은 염증성 T-림프구들, 세포독성 T-림프구들, 조절성 T-림프구들 또는 헬퍼 T-림프구들로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 세포는 CD4+ T-림프구들 및 CD8+ T-림프구들로 구성되는 군으로부터 유래될 수 있다. 그것들은 혈액으로부터 추출되거나 또는 줄기 세포들로부터 유래될 수 있다. 줄기 세포들은 성체 줄기 세포들, 배아 줄기 세포들, 더욱 특히 인간이 아닌 줄기 세포들, 제대혈 줄기 세포들, 간세포(progenitor cells)들, 골수 줄기 세포들, 유도된 다능(pluripotent) 줄기 세포들, 전능(totipotent) 줄기 세포들 또는 조혈(hematopoietic) 줄기 세포들일 수 있다. 대표적인 인간 세포들은 CD34+ 세포들이다. 본 발명의 세포들의 확장 및 유전적 변형 전, 세포들의 소스는 여러가지 제한되지 않는 방법들을 통하여 대상으로부터 수득될 수 있다. T-세포들은 말초 혈액 단핵 세포들, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수(ascites), 흉막(pleural) 삼출액(effusion), 비장(spleen) 조직, 및 종양들을 포함하는 여러가지 제한되지 않는 소스들로부터 수득될 수 있다. 본 발명의 특정 예들에서, 이용가능하고 업계에 알려진 많은 T 세포주들이 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 세포는 건강한 기증자, 암으로 진단받은 환자 또는 감염으로 진단받은 환자로부터 유래될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 세포는 다른 표현형 특성들을 보이는 세포들의 혼합된 군집의 부분이다. 본 발명의 범위는 또한 전술한 방법에 따라 형질전환된 T-세포로부터 수득된 세포주들을 포함한다.

[0484] 본 발명의 추가의 측면으로써, 본 발명에 따른 T-세포들은 더 조작되어, 바람직하게는 유전적으로 조작되어, 특히 "면역-체크포인트들"로 불리는, 전반적인 T-세포 조절에 수반되는 단백질들의 발현을 조절함으로써, 그것들의 활성 및/또는 활성화를 향상시킬 수 있다.

[0485] 면역 체크 포인트들

[0486] 용어 '면역 체크포인트들'이 T 세포들에 의하여 발현되는 일 군의 분자들을 의미한다는 것이 당업자에 의하여 이해될 것이다. 이들 분자들은 효과적으로 면역 반응을 억제하거나 또는 하향-조절하기 위하여 "브레이크들"로 작용한다. 면역 체크포인트 분자들은 면역 세포들을 직접적으로 억제하는 프로그램된(Programmed) 사망(Death) 1 (PD-1, PDCD1 또는 CD279으로도 알려짐, accession number: NM_005018), 세포독성(Cytotoxic) T-림프구(Lymphocyte) 항원(Antigen) 4 (CTLA-4, CD152로도 알려짐, GenBank accession number AF414120.1), LAG3 (CD223로도 알려짐, accession number: NM_002286.5), Tim3 (HAVCR2로도 알려짐, GenBank accession number: JX049979.1), BTLA (CD272로도 알려짐, accession number: NM_181780.3), BY55 (CD160로도 알려짐, GenBank accession number: CR541888.1), TIGIT (1VSTM3로도 알려짐, accession number:

NM_173799), LAIR1 (CD305으로도 알려짐, GenBank accession number: CR542051.1, {Meyaard, 1997 #122}), SIGLEC10 (GeneBank accession number: AY358337.1), 2B4 (CD244으로도 알려짐, accession number: NM_001166664.1), PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, CD96, CRTAM, SIGLEC7 {Nicol1, 1999 #123}, SIGLEC9 {Zhang, 2000 #124; Ikehara, 2004 #125}, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBR1I, TGFRBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF {Quigley, 2010 #121}, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3 을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예컨대, CTLA-4은 특정 CD4 및 CD8 T 세포들 상에 발현되는 세포-표면 단백질이다; 세포들을 제시하는 항원 상에 그것의 리간드들 (B7-1 and B7-2)에 의하여 참여 (engage)될 때, T-세포 활성화 및 효과기 기능이 억제된다. 이와 같이, 본 발명은 면역 체크-포인트에 관여되는 적어도 하나 단백질, 특히 PD1 및/또는 CTLA-4 또는 표 7에 언급된 임의의 면역-체크포인트 단백질들,을 불활성화시킴으로써, T-세포들을 유전적으로 변형시키는 단계를 포함하는, 특히 면역요법을 위한, T-세포들을 조작하는 방법에 대한 것이다.

[0487] 표 7: 면역 체크포인트 단백질들을 코딩하는 유전자들의 리스트

표 7

경로	경로에서 불활성화될 수 있는 유전자들
공-억제 수용체들	CTLA4 (CD152)
	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22
	PDCD1 (PD-1, CD279)
	PDCD1
	CD223 (lag3)
	LAG3
	HAVCR2 (tim3)
	HAVCR2
	BTLA(cd272)
	BTLA
	CD160(by55)
	CD160
IgSF 패밀리	TIGIT
	CD96
LAIR1(cd305)	CRTAM
	LAIR1
SIGLECs	SIGLEC7
	SIGLEC9
CD244(2b4)	CD244
사망(Death) 수용체들	TRAIL
	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7
FAS	FADD, FAS
사이토카인 신호전달	TGF-베타 신호전달
	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1
	IL10 신호전달
IL6 신호전달	IL10RA, IL10RB, HMOX2
	IL6R, IL6ST
아르기닌/트립토판 기아	EIF2AK4
TCR 신호전달의 방지	CSK, PAG1
	SIT1
유도된 Treg	유도된 Treg
	FOXP3
고갈(exhaustion)을 통제하는 전사인자	고갈을 통제하는 전사인자들
	PRDM1 (=blimp1, 이형접합체들 마우스들은 야생형 또는 조건부 KO 보다 더 좋은 만성 바이러스 감염을 통제한다.)
저산소증 매개 저항력(tolerance)	BATF
	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3

[0488]

[0489] 치료적 적용들

[0490] 일반적인 측면에서, 본 발명은 자가-면역 질환들, 감염들 및 암과 같은 병적인 세포들의 발달과 관련된 질환들

의 치료에 있어 새로운 입양 면역요법 전략들을 위한 방법들에 대한 것이다.

- [0491] 본 발명의 주된 목적은 T-세포들과 마찬가지로 특이적 항원 마커들을 지닌 병적인 세포들을 타겟팅하는 가능성이다. 병적인 세포에 의하여 건강 저하를 야기하는 것으로 여겨지는, 환자에게 존재하는 세포들의 임의의 타입들이 의미된다.
- [0492] 일반적으로, 병적인 세포들은 환자의 차도를 얻기 위하여 감소 또는 제거될 필요가 있는 악성 또는 감염된 세포들이다.
- [0493] 이들 항-CD38 CAR들 면역 세포들은, 특히 그것들이 CD38 유전자 불활성화를 겪을 때, CD38-발현 세포-매개 병적인 질환 또는 MM, MM, RRMM, ALL, (앞서 언급된 바와 같이) NHL 림프종과 같은, CD38-발현 세포의 직접 또는 간접 활성화에 의하여 특징되는 질환, 그것들의 관련된 합병증, 및 그것들의 관련된 질환들을 치료하기 위한 것일 수 있다.
- [0494] 한 예에서, CD8 유전자-불활성화된 면역 세포들에서 상기 항-CD38 CAR는 의약으로 사용되며, 그것들은 서열번호 82-84 (25A10), 서열번호 100-102 (28F5), 서열번호 97-99 (13F11), 서열번호 88-90 (16B5), 서열번호 91-93 (10F7), 서열번호 94-96 (27B6) 및 서열번호 85-87(29B4)로부터, 더욱 바람직하게는 서열번호 82-84 (25A10), 서열번호 100-102 (28F5), 서열번호 97-99 (13F11) 및 서열번호 88-90 (16B5)로부터, 그리고 더욱 바람직하게는 서열번호 82-84 (25A10) 및 서열번호 100-102 (28F5)로부터 선택되는 하나에 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0495] 선호되는 예에서, CD8 유전자-불활성화된 면역 세포들에서 상기 항-CD38 CAR는 의약으로서 사용되고, 그것들은 서열번호 82-84 (25A10) 및 서열번호 100-102 (28F5)로부터 선택된 하나에 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0496] 더 선호되는 예에서, CD8 유전자-불활성화된 면역 세포들에서 상기 항-CD38 CAR이 의약으로서 사용되고 그것들은 서열번호 82 (25A10-V1 CAR)로부터 선택된 하나에 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 보이는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0497] 상기 치료는 개선, 치유 또는 예방될 수 있다. 그것은 자가조직 면역요법의 부분 또는 동종이계 면역요법 치료의 부분일 수 있다. 자가조직에 의하여, 환자들을 치료하기 위하여 사용되는 세포들, 세포주 또는 세포들의 군집이 인간(Human) 백혈구(Leucocyte) 항원(Antigen) (HLA) 서로 호환가능한(compatible) 기증자로부터 또는 상기 환자로부터 유래한다는 것이 의미된다. 동종이에 의하여 환자들을 치료하기 위하여 사용되는 세포들 또는 세포들의 군집이 상기 환자가 아니라 기증자로부터 유래된다는 것이 의미된다.
- [0498] 앞의 발명들 중 하나에 따라 조작되는, T-세포들과 같은, 면역 세포들은 공동으로 되고(pool), 동결되고, 그리고 하나 또는 몇몇 환자들에 투여된다. 따라서, 본 발명은 환자 자신의 T-세포들에 대항하여 전술한 바와 같이 조작된 T-세포들을 함함으로써 면역 질환을 치료하는 방법을 포함한다. 그것들이 비-동종반응성으로 만들어질 EO, 그것들은 "기성품인" 치료적 제품으로 이용가능한데, 이는 그것들이 그것을 필요로 하는 환자들에게 일반적으로 주입될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0499] 한 예에서, 전술한 대로 상기 분리된 세포로부터 유래된 세포주 또는 다른 방법들에 의하여 수득된 분리된 세포가 의약으로서 사용될 수 있다.
- [0500] 선호되는 예에서, 본 발명에 따른 상기 분리된 세포 또는 상기 분리된 세포로부터 유래된 세포주는 그것을 필요로 하는 환자의 암의 치료를 위한 의약의 제조에 사용될 수 있다.
- [0501] 선호되는 예에서, 본 발명의 항-CD38 CAR -발현 세포들을 이용하여 치료될 수 있는 암은 백혈병 또는 림프종, 백혈병 또는 림프종과 관련된 질환 또는 그것의 합병증이다.
- [0502] 특정 예에서, 항-CD38 CAR 발현시키는 T 세포는 특히 효과적인 표준 치료가 없거나 (난치/재발된 환자들) 또는 표준 치료 시 또는 그 후 진행된, CD38+ 혈액의 악성종양들의 치료를 위한 의약으로서 제공된다.
- [0503] "재발된"에 의하여: 혈액의 악성종양들이 치료되고 개선되나, 혈액의 악성종양이 재발된 대상이 가리켜진다.
- [0504] "난치"에 의하여, 혈액의 악성종양이 어떠한 개선도 없이 치료되고 혈액의 악성종양이 이와 같이 진행되는 대상이 가리켜진다.
- [0505] 본 공개의 맥락에서, CD38+ 혈액의 악성종양은 특히 비(non)-호지킨(Hodgkin) 림프종 (NHL) (예컨대 버킷

(Burkitt's) 림프종 (BL) 및 T 세포 림프종 (TCL)을 포함함), 다발성 골수종 (MM), 만성 림프성(lymphocytic) 백혈병 (CLL) (예컨대 B 만성 림프성 백혈병 (B-CLL) 또는 털모양(hairy) 세포 백혈병 (HCL)와 같음), B 및 T 급성 림프성 백혈병 (ALL), 급성 골수성(myeloid) 백혈병 (AML), 호지킨(Hodgkin) 림프종 (HL), 및 만성 골수성 백혈병 (CML)로부터 선택되고, 이때 암 세포들은 CD38+ 세포들이거나 이를 포함한다.

- [0506] 특히, CD38+ 혈액의(hematological) 악성종양들은 B-세포 비(non)-호지킨(Hodgkins) 림프종 (NHL), 다발성 골수종 (MM), 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 림프아구성 백혈병 (B-세포 ALL) 및/또는 만성 림프성 백혈병 (CLL), 더욱 특히 다발성 골수종 (MM), 가장 특히 재발된 그리고/또는 난치의 다발성 골수종이다.
- [0507] 혈액의 악성종양을 확인하는 방법들은 당업자들에게 알려져 있으며 첫 단계로서 완전(complete) 혈구(blood) 측정(count) (CBC) 및 말초 혈액 스미어(smear)의 테스트를 포함한다. 최종적인 진단은 보통 적절한 골수 흡인 및/또는 유동세포분석법 분석에 의하여 결국 보완되는 형태 연구들을 위한 생검, 세포유전학 및 나아가 분자 기술들을 요구한다. 이 혈액의 악성종양으로부터 유래한 세포들이 CD38+이라는 것을 확인하기 위한 기술들은 당업자들에게 알려져 있고, 예컨대, 폴리메라제 체인 반응 (PCR)과 같은 표준 분자 생물학 기술들 및/또는 웨스턴 블롯 분석과 같은 면역화학적 방법들을 포함한다.
- [0508] 선호되는 예에서, 본 발명은 20세 미만의 환자들 또는 60세 초과 환자들에서 상기 제시된 것과 같은 CD38+ 혈액의 악성종양들의 치료를 제공한다.
- [0509] 선호되는 예에서, 상기 의약은 난치성/재발성 다발성 골수종 (RRMM)과 같은 MM 서브타입의 다발성 골수종 (MM)의 치료를 위하여 사용될 수 있다.
- [0510] 또다른 예에서, 상기 의약은 급성 림프아구성(lymphoblastic) 백혈병 (ALL)의 치료에 사용될 수 있다.
- [0511] 다발성 골수종
- [0512] 다발성 골수종은 단일클론 단백질들 (M 단백질들)의 존재에 의하여 검출될 수 있다.
- [0513] "M-단백질"은 파라단백질(paraprotein)을 가리킨다(단일클론 단백질, 또는 M 단백질). 이 파라 단백질은 원형질 세포들의 클론 증식에 의하여 과도하게 생산되는 면역글로불린 경쇄 또는 면역글로불린이다. 특정 역치보다 더 높은 양들은 다발성 골수종을 가리킨다. M-단백질은 보통 소변과 더불어 혈청에서 정량화된다. 혈청에서 M-단백질 수준은 보통 혈청 전기영동법에 의하여 또는 예컨대 특정 면역글로불린 분석들에 의하여 측정된다; 그러나 특정 면역글로불린 정량화는 항상 M-단백질을 과대평가하는데, 이는 정상적인 면역글로불린들이 결과에 포함되기 때문이다. 이 이유로 M-단백질의 베이스라인 및 후속 측정들이 동일한 방법으로 이루어져야 한다 (Riches P G et al., 1991).
- [0514] 치료되는 MM 환자들의 그룹들/투여량
- [0515] 한 예에서, 0.5 g/dL 보다 높은 혈청 내 M-단백질은 다발성 골수종을 가리킨다.
- [0516] 한 예에서, 24시간 소변에서 200 mg보다 높은 소변 내 M-단백질은 다발성 골수종 (MM)을 가리킨다.
- [0517] 또다른 예에서, 비정상적인 FLC 비율 및 약 10 mg/dL보다 큰 FLC를 가진 상승된 혈청 프리(free) 경쇄들(light chains)은(FLC) 다발성 골수종을 가리킨다. MM은 소변에서 발견되는 면역글로불린 경쇄에 의하여 더 확인될 수 있는데, 이 파라단백질(paraprotein)은 Bence Jones 단백질로 불리며, 프리 경쇄들로 이루어진 소변 파라단백질로, 이때 경쇄들은 람다 (λ) 및/또는 카파 (κ) 프리 경쇄들이다. 이들 프리 경쇄들 (FLC)은 상업적인 테스트들에 의하여 측정될 수 있다. 프리 경쇄 측정은 FLC 카파의 FLC 람다에 대한 프리 경쇄 비율 (FLC) (FLC κ/λ 비율)을 주는 FLC 카파 및 FLC 람다 프리 경쇄들의 측정을 가리키며, 이때 정상적인 FLC κ/λ 비율은 0.26 부터 1.65 까지의 범위이다.
- [0518] 다발성 골수종을 가진 환자들에서, 경쇄들, 카파 또는 람다가 우세하게 생산될 수 있으며, 이는 FLC κ/λ 비율의 변화들을 야기한다. 다발성 골수종을 가리키는 비정상적인 FLC κ/λ 비율들은 이런 식으로 0.26 보다 낮거나 또는 1.65 보다 높은 FLC κ/λ 비율들이다.
- [0519] 그러므로, 한 예에서, 다발성 골수종을 가진 대상은 a) 약 0.5 g/dL보다 큰 측정 가능한 혈청 M-단백질, 및/또는 b) 약 200 mg (24-시간 소변)보다 큰 소변 M-단백질, 및/또는 c) 비정상적인 FLC 비율과 약 10 mg/dL 보다 더 큰 FLC를 가진 상승된 혈청 프리 경쇄들 (FLC)을 가진다.
- [0520] 한 예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포들에 의하여 치료되는 대상들은 다발성 골수종 및 Philadelphia 염색체

로 달려진, 염색체들 9 및 22 사이의 전좌; 또는 염색체들 4 및 11 [t(4;11)(q21;q23)] 사이의 전좌; 3염색체성(trisomy) 4, 10, 17)과 같은 고이배성(hyperdiploidy), 또는 염색체 9p 결실과 같은 특정 유전적 특징들을 갖는다.

[0521] 그러므로 한 예에서, 본 발명의 분리된 세포들에 의하여 치료되는 대상은 17p 결실, t (4, 14), t (14, 16), t (14, 20) 및/또는 3 카피들 초과 1q21 을 가진다. 다발성 골수종 및 염색체 결실 17p, 전좌들 t (4, 14), t (14, 16), t (14, 20) 또는 3 카피 초과 1q21와 같은 증폭들과 같은 특정 유전적 특징들은 더 나쁜 결과 (Avet-Loiseau H et al., 2011)와 관련된다는 것이 당업계에 알려져 있다. Van Laar et al. (2014)와 같은 연구자들은 다발성 골수종을 가진 대상에 대하여 게놈 프로파일링 테스트를 개발하여 왔다. 이 타입의 테스트는 의사들이 다발성 골수종을 가진 대상들을 몇몇 염색체 이상 뿐 아니라 그것의 게놈 발현 프로파일에 기초하여 분류하는 것을 가능하게 하였다.

[0522] 한 예에서, 대상은 고위험의 유전자 발현 프로파일링 (GEP)을 가질 수 있다. 예컨대, 이 주제는 Shaughnessy et al (2007)에서 더 자세히 기재된다.

[0523] 대상은 상기 언급된 특징들 중 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0524] 급성 림프아구성 백혈병 (ALL)

[0525] 한 예에서, 본 발명의 의약에 의하여 테스트될 수 있는 백혈병은 급성 림프아구성 백혈병 (ALL)이다.

[0526] 상기의 임의의 것의 또다른 예에서, 백혈병은 소아 (아동기) ALL 이다.

[0527] 상기의 임의의 것의 또다른 예에서, 백혈병은 재발된 ALL이다.

[0528] 상기의 임의의 것의 또다른 예에서, 백혈병은 난치성 ALL이다.

[0529] 상기의 임의의 것의 또다른 예에서, 백혈병은 약물-내성 ALL이다.

[0530] 추가의 예에서, 백혈병은 글루코코르티코이드-내성 ALL이다.

[0531] 더 또다른 예에서, 상기 의약은 맨틀(mantle) 세포 백혈병 (MCL)과 같은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL) 환자들의 치료를 위하여 사용될 수 있다.

[0533] 다른 CD38-매개 병적 질환들

[0534] 또다른 예에 따라, 본 발명의 조작된 면역 세포들은 전립선, 정낭, 맹장과 같은 CD38+세포-매개 고형 종양들을 치료하는데 또는 당뇨와 같은 병적 측면에 사용된다 (Antonelli et al; 2004).

[0535] 관련 치료들

[0536] 몇몇 예들에서, 대상은 항-암 요법으로 앞서 치료되었다. 특히, 상기 앞의 항-암 요법은 화학요법, 타겟된 암 요법들, 방사선요법, 골수 및/또는 줄기 세포 이식(transplantation) 및 면역요법으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 더 선호되는 예에서, 본 발명은 소아 치료, 특히 MM, RRMM 또는-관련된 질환들 또는 합병증들에 대한 소아 치료를 제공한다.

[0537] 한 예에서, 대상은 보르테오미브(bortezomib) 및/또는 레날리도마이드(lenalidomide)로 앞서 치료되었다.

[0538] "방사선 요법" 또는 "방사선"은 높은 에너지의 방사선을 암 세포들을 제거하기 위하여 사용한다. 방사선 요법은 골수 또는 말초 혈액 줄기 세포 이식 전에 사용될 수 있다.

[0539] "골수 및/또는 줄기 세포 이식"은 높은 용량들의 화학요법 및/또는 방사선 요법에 의하여 파괴된 줄기 세포들을 회복시키기 위한 목적으로 하는 세포 이식(transplantation)을 가리킨다. 줄기 세포들의 소스들은 골수, 말초 혈액 또는 제대혈을 포함한다. 이식되는 줄기 세포들의 소스에 의존하여, 절차는 골수 이식 (BMT) 또는 말초 혈액 줄기 세포 이식 (PBSCT) 또는 제대혈 이식(transplantation) (UCBT)으로 분류될 수 있다. 게다가 골수 및/또는 줄기 세포 이식은 자가조직 줄기 세포 이식 및/또는 동종이계 이식을 가리킬 수 있다.

[0540] 약물에 대한 내성 또는 면역억제제

[0541] 전술된 바와 같이, 조작된 면역 세포들은, 그것들이 특히 플루다라빈(fludarabine) 및 사이클로포스파미드 (Cyclophosphamide)의 조합 및 메토트렉사틴, 표준 치료로 이용되는 면역억제 약물들 및 화학요법 약물들에

대한 내성으로 만들어질 때, 여러가지 형태들의 암을 치료하는데 특히 적합하다. 과연, 본 발명은 바람직하게는 세포들 또는 세포들의 군집에 의존한다. 이 측면에서, 화학요법 및/또는 면역억제 치료가 인 비보에서 조작된 T-세포들의 확장 및 선택을 도와야 한다는 것이 예상된다.

[0542] 본 발명의 특정 예들에서, 세포들은 항바이러스 요법과 같은 제제로 하는 치료, 시도포비르(cidofovir) 및 인터루킨-2, (ARA-C으로도 알려진) 시타라빈(Cytarabine) 또는 MS 환자들을 위한 나탈리지맙(natalizimab) 치료 또는 건선 환자들을 위한 알리티맙(aliztimab) 치료 또는 ML 환자들을 위한 다른 치료들을 포함하나 이에 제한되지 않는, 많은 관련 치료와 (예컨대 그 전에, 동시에 또는 그 후에) 함께 환자에게 투여된다. 추가의 예들에서, 본 발명의 T 세포들은 화학요법, 방사선, 사이클로스포린(cyclosporin), 아자티오프린(azathioprine), 메토크렉사트, 마이코페놀레이트(mycophenolate), 및 FK506 과 같은 면역억제제들, 항체들, 또는 CAMPATH와 같은 다른 면역제거(immunoablative) 제제들, 항-CD3 항체들 또는 다른 항체 요법들, 사이토신(cytosin), 플루다라빈(fludarabine), 사이클로스포린, FK506, 라파마이신(rapamycin), 마이코플리에놀릭 액시드(mycophenolic acid), 스테로이드들, FR901228, 사이토카인들, 및 방사선조사와 조합하여 사용될 수 있다. 이들 약물들은 칼슘 의존적 포스포타제 칼시뉴린 (사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 또는 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다 (라파마이신)(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citr. Opin. mm n. 5:763-773, 93). 추가의 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 골수 이식(transplantation), 플루다라빈과 같은 화학요법 제제들을 이용한 T 세포 제거(ablative) 요법 using either , 외부(external)-빔(beam) 방사선 요법 (XRT), 사이클로포스파미드, 또는 OKT3와 같은 항체들 또는 CAMPATH와 함께 (예컨대 그 전, 동시에 또는 그 후에) 환자에게 투여된다. 또다른 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 예컨대, 리툭산(Rituxan)인 CD20과 반응하는 제제들과 같은 B-세포 제거 요법 후 투여된다. 예컨대, 한 예에서, 대상들은 고 용량 화학요법으로 표준 치료를 겪고 뒤이어 말초 혈액 줄기 세포 이식이 이어진다. 특정 예들에서, 이식 후, 대상은 본 발명의 확장된 면역 세포들의 주입을 받는다. 추가적인 예에서, 확장된 세포들은 수술 전 또는 후에 투여된다. 여기에 기재된 방법들 중 임의의 하나에 의하여 수득되는 상기 변형된 세포들은 수주(Host) 대이식편(versus Graft) (HvG) 거부(rejection) 및 이식편대 숙주 질병 (GvHD)에 대하여 이를 필요로 하는 환자들을 치료하기 위한 본 발명의 특정 측면에 사용될 수 있다; 그러므로 본 발명의 범위내, 불활성화된 TCR 알파 및/또는 TCR 베타 유전자들을 포함하는 변형된 세포들의 효과적인 양을 상기 환자에게 투여함으로써 상기 환자를 치료하는 단계를 포함하는 숙주대 이식편 (HvG) 거부 및 이식편 대 숙주 질병 (GvHD)에 대하여 그것을 필요로 하는 환자들을 치료하는 방법이 있다.

[0543] 투여

[0544] 또다른 측면에서, 본 발명은 그것을 필요로 하는 환자들을 치료하는 방법들에 의존하며, 상기 방법은 하기 단계들 중 적어도 하나를 포함한다:

[0545] (a) 전술한 방법들 중 임의의 하나에 의하여 수득가능한 면역-세포를 제공하는 단계;

[0546] (b) 상기 형질전환된 면역 세포들을 상기 환자에게 투여하는 단계.

[0547] 본 발명에 따른 세포들 또는 세포들의 군집은 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 임플란트(implantation) 또는 이식(transplantation)을 포함하는 임의의 종래 방식으로 수행될 수 있다. 여기에 기재된 조성물들은 환자에게 피하로, 피내로, 종양내로, 결절내로(intranodally), 척수 내로, 근육내로, 정맥 또는 림프관내 주사에 의하여, 또는 복강내로 투여될 수 있다. 한 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 바람직하게는 정맥 주사에 의하여 투여된다.

[0548] 세포들 또는 세포들의 군집의 투여는 그 범위들 내 세포 수들의 모든 정수값들을 포함하는 kg 체중 당 10^4 - 10^9 세포들, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 세포들/kg 체중의 투여로 구성될 수 있다. 세포들 또는 세포들의 군집은 하나 이상의 용량들로 투여될 수 있다. 또다른 예에서, 세포들의 상기 효과적인 양은 단일 투여량으로서 투여된다. 또다른 예에서, 세포들의 상기 효과적인 양은 일정 기간 동안 하나의 투여량보다 많이 투여된다. 투여의 타이밍은 담당 의사의 판단 내이며 환자의 임상적 컨디션에 의존한다. 세포들 또는 세포들의 군집은 혈액은행 또는 기증자와 같은, 임의의 소스로부터 수득될 수 있다. 개인적인 요구는 다양한 반면, 당업계의 기술 내 특정 질환 또는 질병에 대한 주어진 세포 타입의 효과적인 양의 최적의 범위들의 결정. 효과적인 양은 치료적 또는 예방적 이점을 제공하는 양을 의미한다. 투여되는 투여량은 받는 사람(recipient)의 연령, 건강 및 체중, 동시에 하는 치료의 종류, 만약 있다면 치료의 빈도 및 바람직한 효과의 특성에 의존할 것이다.

[0549] 또다른 예에서, 그 세포들을 포함하는 조성물 또는 세포들의 상기 효과적인 양은 비경구적으로 투여된다. 상기

투여는 정맥내 투여될 수 있다. 상기 투여는 종양 내로 주사에 의하여 직접적으로 이루어질 수 있다.

- [0550] 본 발명의 예는 하기를 포함하는 환자를 치료하는 방법에 대한 것이다:
- [0551] (a) 면역 세포들과 마찬가지로 CD38-특이적 항원 마커들을 제시하는 병적인 세포들의 존재에 대하여 상기 환자를 진단하는 단계;
- [0552] (b) 앞서 자세히 나타낸 방법에 따라 조작된 면역 세포들의 군집을 제조하는 단계;
- [0553] (c) 상기 조작된 면역 세포들을 상기 병적인 세포들에 대하여 진단된 상기 환자에게 투여하는 단계.
- [0554] 당업자에게 잘 알려진 진단 단계, 예컨대 Durig J, Naschar M, Schmucker U, Renzing-Kohler K, Holter T, Huttmann A, Duhrsen U, (2002) "CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia" Leukemia. 16(1):30-5에 참조가 될 수 있다.
- [0555] 면역 요법을 위한 본 발명에 따른 T-세포들을 조작하기 위한 단계들의 예
- [0556] 본 발명을 더 잘 이해하기 위하여, 백혈병 CD38 양성 세포들에 대하여 항해지는 T-세포들을 생산하는 것을 따라하기 위하여 단계들의 예를 하기에 제공한다:
- [0557] 1. 세포 배양으로부터 또는 혈액 샘플로부터 환자 개인으로부터 또는 혈액 은행으로부터 T-세포들을 제공하는 단계 및 항-CD3/C28 activator 비드들 (Dynabeads®)을 이용하여 상기 T 세포들을 활성화시키는 단계. 비드들은 T 세포들의 확장 및 활성화에 요구되는 주요(primary) 및 공-자극 신호들을 제공한다.
- [0558] 2. 상기 세포들을 CD3제타 활성화 도메인, 4-1BB 공-자극 도메인, a 막관통 도메인 및 항-CD38 항체의 가변 체인을 코딩하는 서열에 융합된 IgG1 또는 CD28 α ,Fc ϵ III γ 로부터의 힌지의 융합으로 구성되는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 이식유전자를 포함하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입하는 단계. 형질전환된 T-세포의 개선을 담보하기 위하여, 리톡시마에 민감한 자살 유전자가 T2A 스플리팅(splitting) 서열들에 의하여 분리되는 렌티바이러스 벡터 내로 WO 2013/153391에 기재된 대로 더 도입될 수 있다.
- [0559] 3. (선택적으로) 비 동종반응성 및/또는 내성 T 세포들을 조작하는 단계:
- [0560] a) WO 2013/176915에 기재된 프로토콜을 따름으로써 세포의 표면으로부터 TCR을 제거하고 동종이계의 TCR에 의하여 외래로 숙주 조직이 인식하는 것을 방지하여, 이와 같이 GvHD를 피하기 위하여 상기 세포들에서 TCR 알파를 불활성화시키는 것이 가능하다.
- [0561]
- [0562] b) 이식된 T 세포들에 영향을 미치지 않고 이식편 거부를 방지하기 위하여 상기 세포들을 면역억제 또는 화학요법에 내성으로 만들기 위하여 화학요법 약물 또는 면역억제제에 대한 타겟을 코딩하는 하나의 유전자를 불활성화시키는 것 또한 가능하다. 이 예에서, 면역억제제들의 타겟은 CD52이고 면역억제제는 WO 2013/176915에 기재된 대로 인간화된 단일클론 항-CD52 항체 (예: 알렘투주맵)이다.
- [0563] 4. 유전자 불활성화는 특정 TAL-엔도뉴클레아제를 코딩하는 mRNA로 T-세포들을 전기천공함으로써 수행된다 (TALENTM - Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, France). 불활성화된 T 세포들은 자성 비드들을 이용하여 분류된다. 예컨대, 이미 CD38 타겟된 유전자를 발현시키는 T 세포들은 고정 표면에 고정되어 제거될 수 있고, 불활성화된 세포들은 칼럼을 통하여 통과되는 스트레스에 노출되지 않는다. 이 온화한 방법은 적절하게 조작된 T-세포들의 농도를 증가시킨다.
- [0564] 5. CD3 복합체의 자극을 통한 환자에게 투여 후 환자 또는 생체내(in vivo) 투여 전 조작된 T-세포들의 인 비트로에서의 확장. 투여 단계 전, 환자들은 인간화된 단일클론 항-CD52 항체인 CAMPATH-1H와 같은 면역억제 치료에 가해질 수 있다.
- [0565] 6. 타겟 항원에 가깝게 조작된 세포들을 가져오기 위하여 환자에게 투여 후 생체내에서 또는 환자에게 투여 전 이종특이적 항체들 생체 외(ex vivo)에 상기 세포들을 선택적으로 노출시킨다.
- [0566] 일반적인 방법들
- [0567] -주요(primary) T-세포 배양들
- [0568] T 세포들이 EasySepTM Direct Human T Cell Isolation Kit (줄기 세포들)을 이용하여 FS (Etablissement

Francais du Sang, Paris, France)에 의하여 제공된 버퍼 코트 샘플들로부터 정제되었다. 정제된 T 세포들은 20ng/mL 인간 IL-2, 5% 인간 혈청, 및 비드:세포 1:1에서 Dynabeads 인간 T 활성화인자(activator) CD3/CD28로 보충된 X-VivoTM-15 배지 (Lonza) 에서 활성화되었다 (Life Technologies).

[0569] -CD38 TALEN 형질주입

[0570] 도식 표시가 도 8에 보여진다.

[0571] CD38 유전자 내 15-bp 스페이서(spacer)에 의하여 분리된 (반(half) 타겟들로 불리는) 두 개의 17-bp 길이 서열들을 타겟팅하는 헤테로다имер TALE-뉴클레아제가 설계되고 생산되었다. 각각의 반(half) 타겟은 표 3에 목록으로 된 반(half) TALE-뉴클레아제들의 반복들(repeats)에 의하여 인식된다. CD38 타겟들의 서열들은 도 5에 제공된다. 각각의 TALE-뉴클레아제 구조체는 T7 프로모터의 통제 하 포유류 발현 벡터 (pCSL10794)에서 제한 효소 효소 (삽입 : SfaNI-BbvI 및 벡터 : BsmBI)를 이용하여 서브클로닝되었다. CD38 게놈 서열을 절단하는 TALE-뉴클레아제를 코딩하는 mRNA가 mMESSAGE mMACHINE T7 키트 (Life Technologies)를 이용하여 생산되었고 RNeasy 미니 스핀(Spin) 칼럼들 (Qiagen)을 이용하여 정제되었다. 형질주입들이 사이토피스(Cytopulse) 기술을 이용하여 이루어졌다. 두 개의 0.1 mS 펄스들을 3000V/cm에서 적용하고 뒤이어 네 개의 0.2 mS 펄스들이 325V/cm에서 0.4cm 갭(gap) 큐벳들에서(cuvettes) 최종 부피 200 μ l의 "Cytoporation 버퍼 T" (BTX Harvard Apparatus)에서 이루어졌다. 세포들이 X-VivoTM-15 배지 (Lonza)에서 즉시 희석되었고 30 °C로 5% CO₂에서 배양되었다. (Miltenyi Biotec으로부터의) IL-2가 20ng/mL에서 전기천공 2시간 후 첨가되었다. 18시간 후, 세포들이 37 °C로 5% CO₂에서 이동되었다.

[0572] -CD38 음성 T 세포들 정제

[0573] CD38 TALEN 형질주입 육 일 후, CD38 음성 세포들이 자성 분리에 의하여 정제되었다.

[0574] -CAR mRNA 형질주입

[0575] 형질주입들이 T-세포 정제 및 활성화 4일 또는 11일 후에 이루어졌다. 5백만의 세포들이 다른 CAR 구조체들을 코딩하는 mRNA 15 μ g으로 형질주입되었다. CAR mRNA들이 mMESSAGE mMACHINE T7 키트 (Life Technologies)을 이용하여 생산되었고 RNeasy 미니 스핀 칼럼들 (Qiagen)을 이용하여 정제되었다. 두 개의 0.1 mS 펄스들이 3000V/cm에서 적용되고, 뒤이어 네 개의 0.2 mS 펄스들이 325V/cm에서 0.4cm 갭 큐벳들에서 최종 부피 200 μ l의 "전기천공(Cytoporation) 버퍼 T" (BTX Harvard Apparatus)가 이어져 형질주입들이 사이토피스 기술을 이용하여 이루어졌다. 세포들은 X-VivoTM-15 배지 (Lonza)에서 즉시 희석되었고 5% CO₂로 37°C에서 배양되었다. (Miltenyi Biotec로부터) IL-2가 20ng/mL에서 전기천공 2 시간 후 첨가되었다.

[0576] - 탈과립 분석 (CD107a 동원)

[0577] T-세포들이 여러가지 수준들의 CD38 단백질을 발현시키는 세포들의 동일한 양과 함께 96-웰 플레이트들 (40,000 세포들/웰)에서 배양되었다. 공-배양들이 최종 부피 100 μ l의 X-VivoTM-15 배지 (Lonza)에서 6시간 동안 5% CO₂로 37°C에서 유지되었다. CD107a 염색이, 1 μ g/ml의 항-CD49d, 1 μ g/ml의 항-CD28, 및 1x 모넨신(Monensin) 용액과 함께, 공-배양의 시작부터 형광 항-CD107a 항체의 첨가에 의하여 세포 자극 동안 이루어졌다. 5 시간 배양 기간 후, 세포들이 항-CD3 및 플루오로크롬 -콘쥬게이트된 항-CD8 및 고정가능한 생존능 염료로 염색되었고 유동세포분석법에 의하여 분석되었다. 탈과립화 활성이 생존가능한/CD3+/CD8+/CD107a+ 세포들의 %로써, 그리고 CD8+ 세포들 중 CD107a 염색을 위한 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) 신호 (MFI)를 곱셈으로써 결정되었다. 탈과립화 분석들이 mRNA 형질주입 24 시간 후 수행되었다.

[0578] -세포독성 분석

[0579] T-세포들이 동일한 웰에서 10,000 대조군 (CD38neg) 세포들 및 (CD38을 발현시키는) 10,000 타겟 세포들과 함께 96-웰 플레이트들 (100,000 세포들/웰)에서 배양되었다. 타겟 및 대조군 세포들이 CAR+ T-세포들과 그것들을 공-배양하기 전에 형광 세포내 염료들 (CFSE 또는 Cell Trace Violet)로 표지되었다. 공-배양들이 5% CO₂로 37 °C에서 4 시간 동안 배양되었다. 이 배양 기간 후, 세포들이 고정가능한 생존능력 염료로 표지되었고 유동세포분석법에 의하여 분석되었다. 각각의 세포 군집의 생존능력 (타겟 세포들 또는 CD38neg 대조군 세포들)이 결정되었고 특정 세포 용해의 %가 계산되었다. 세포독성 분석들이 mRNA 형질주입 48 시간 후 수행되었다.

[0580] 실시예 1: TALE 뉴클레아제를 이용한 녹아웃(KO)에 의한 T 세포들에서 CD38 항원의 불활성화

- [0581] CD38은 또한 활성화된 T 세포들에 의하여 고 발현되었다. IL-2 및 CD3/CD28 비드들로 활성화 후 T 세포들에 의한 CD38 발현이 FACS에 의하여 3-4 일 마다 17 일 동안 분석되었다 (도 3A). 90% 초과 T 세포들이 활성화 후 6일 및 17일 사이에 CD38을 발현시키는 것이 관찰되었다 (도 3B).
- [0582] 이와 같이 항-CD38 CAR+ T 세포들에 의하여 활성화된 T 세포들이 죽이는 것을 피하기 위하여, T 세포들에서 CD38 표면 발현이 방지될 필요가 있다. 이것은 TALE-뉴클레아제들을 이용한 CD38 유전자의 불활성화에 의하여 달성될 수 있다. 실험은 도 4A에 나타난 대로 수행되었다.
- [0583] CD38 유전자 내 13-pb 스페이서에 의하여 분리된 두 개의 17-pb 길이 서열들 을 타겟팅하는 헤테로다이머인 TALE-뉴클레아제들이 설계되고 생산되었다. 각각의 반(half) 타겟이 표 4 및 도 5에 목록화된 반(half) TALE-뉴클레아제들의 반복들에 의하여 인식된다.
- [0584] 각 TALE-뉴클레아제 구조체가 T7 프로모터의 통제 하 포유류 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 이용하여 서브클로닝되었다. CD38을 절단하는 TALE-뉴클레아제를 코딩하는 mRNA가 T7 프로모터로부터 다운스트림 서열을 코딩하는 플라스미드들로부터 합성되었다.
- [0585] 제조한 IL-2 및 항 CD3/CD28 코팅된 비드들로 4일 동안 활성화된 정제된 T 세포들이 반(half) TALE-뉴클레아제들 둘 다를 코딩하는 2 mRNA들 (각 10ug)의 각각으로 전기천공 (Cytopulse)에 의하여 형질주입되었다. 조사하기 위하여, CD38 음성 T 세포들의 퍼센트, CD38 KO가 7일에 유동세포분석법에 의하여 평가되었다 (도 6). 세 개의 TALEN들이 CD38 KO를 유도할 수 있었으나 CD38-1이 가장 효과적이었다 (60.95% +/- 7.6 CD38neg T 세포들).
- [0586] CD38-1 TALEN에 의하여 유도된 CD38 불활성화는 3 주 동안 배양에서 안정적이었다 (도 7A). CD38 결핍 T 세포들은 항-CD38 마이크로비드들 (Miltenyi)을 이용하여 쉽게 분류될 수 있었다 (도 7A). 정제된 CD38 결핍 T 세포들의 증식 속도는 형질주입되지 않거나 또는 정제되지 않은 T 세포들에 필적했다 (도 7B).
- [0587] 두 개의 독립적인 실험들에서, CD38 TALEN 형질주입이 T 세포들 10^6 당 $2 \mu\text{g}$ 의 RNA를 이용하여, 그리고 전기천공을 이용하여 수행되었고, 이러한 형질주입이 높은 빈도로 CD38 KO를 유도한다는 것이 도 23에 보여진다. 또다른 실험에서, 백만 세포들 당 $2 \mu\text{g}$ and $1 \mu\text{g}$ 또는 $0.5 \mu\text{g}$ 의 비교가 시험되었다. mRNA TALEN의 양은 T 세포들의 증식 속도를 변형시키지 않았으나 (도 24B), CD38 음성 세포들의 %에서 감소하였다 (도 24A).
- [0588] 실시예 2: 야생형 T 세포들에서 mRNA 형질주입 후 항-CD38 CAR들 활성의 연구
- [0589] CAR 구조체
- [0590] scFvs의 여덟 쌍들이 시험되었고, 그것들의 대응되는 CDR들을 포함하는 그것들의 서열들 서열번호: 10 내지 73가 표 2에 제시된다.
- [0591] scFvs의 각 쌍에 대하여, 3 개의 다른 CAR들 구조체들이 41BB 공자극 도메인, CD3 ζ 활성화 도메인, CD8 α 막관통 도메인 및 각각 서열번호: 76, 77 및 78의 서열들의 3 개의 다른 힌지들로 설계되었다.
- [0592] V1: Fc ϵ RIII α 힌지
- [0593] V2: CD8 α 힌지
- [0594] V3: IgG1 힌지.
- [0595] 도 9 및 도 2A는 각각 백본으로 이용되는 하나와 서브클로닝을 위하여 만들어진 CAR의 다른 버전들의 플라스미드들의 이름을 보여준다. 또한 그것들의 각 scFvs에 대한 Kd의 값이 제공된다.
- [0596] 표 1은 모든 24개 다른 항-CD38 CAR들 (scFv X 3 버전들 V1, V2&V3의 8 쌍들) 및 (표 2에 나타난 scFvs을 제외한) 그것들의 구성성분들에 대한 서열번호: 82 내지 105 서열들을 보여준다.
- [0597] 타겟 세포들의 선택
- [0598] 만들어진 CAR 분자들이 CAR mRNA로 T 세포들의 일시적 형질주입 후 CD38을 발현시키는 타겟 세포주들을 향한 세포독성 활성 및 탈과립화에 대하여 스크리닝되었다. CD38의 다른 발현 수준들을 발현시키는 타겟 세포주들 (도 3B)가 활성 테스트에 사용되었다 (도 10A 및 도 10B).
- [0599] 세포 당 CD38 분자들의 수가 하기 세포주들에 대하여 Qifikit 분석 (DAKO Company)을 이용하여 평가되었다:
- [0600] - 항-CD38 마이크로비드들을 이용한 자성 분리에 의한 U266B1 세포주 (#ATCC® TIB-196™)로부터 수득된 U266

CD38- (230 분자들/세포) 및 U266 CD38+ B-세포 골수종 (48216 분자들/세포);

[0601] - CD38을 높은 수준으로 (259889 분자들/세포) 발현시키는 다발성 골수종 세포주 (#DSMZ ACC 569)인 MOLP8;

[0602] - CD38을 높은 수준들로 발현시키는 Burkitt 림프종으로부터 유래된 세포주인, Daudi (#ATCC® CCL-213™);

[0603] - 만성 골수성 백혈병으로부터 유래된 세포주 CD38 음성 세포주인 K562 (#ATCC® CCL-243).

[0604] *T 세포 활성화 5일 후 야생형 T 세포들에서 CAR mRNA 형질주입*

[0605] T 세포들이 버피 코트 샘플들로부터 정제되었고 항-CD3/CD28 코팅된 비드들을 이용하여 활성화되었다. 세포들이 항-CD38 CAR를 코딩하는 mRNA 15 μ g으로 활성화 5일 후 형질주입되었다 (실험의 기간이 도 4C에 나타나 있다). CART 세포들의 CAR 발현 및 탈과립화 용량이 형질주입 24 시간 후 평가되었다.

[0606] T 세포들 상 CD38 발현에도 불구하고, 5일에 CAR mRNA 형질주입 후 중요한 T 세포 사망률이 관찰되지 않았다.

[0607] *발현*

[0608] 세 개의 검출 방법들이 활성화 5 일 후 형질주입된 세포들에 대하여 평가되었다: 항-Fab 항체, L-단백질 염색 및 (LakePharma에 의하여 생산된) CD38-Fc 단백질 염색 (도 11). 항-CD38 CAR들 13F11-V2, 16B5-V2&V3, 25A10-V1&V2, 28F5-V1&V2, GMB005-V1&V2&V3 이 적어도 하나 방법에 의하여 검출가능하다. 몇몇 CAR들은 이들 방법들 중 임의의 것으로 검출할 수 없지만 CD38 의존적 방식으로 탈과립화할 수 있었다 (다음 섹션 참조).

[0609] *탈과립 능력*

[0610] CAR T 세포 탈과립화가 유동세포분석법에 의하여 평가되었다. 판독은 타겟 세포들로 5시간 배양 후 T 세포 원형질 막에서 CD107a 발현이다 (도 12). scFv의 대부분이 10F7, 27B6 및 29B4을 제외하고 CD38 의존적 방식으로 T 세포 탈과립화를 유도한다. scFv의 3 개 버전들 (V1, V2 및 V3), 13F11, 16B5, 25A10, 28F5 및 도구 CAR GMB005-V1이 12일에 스크리닝을 위하여 선택되었다.

[0611] 실시예 3: mRNA 형질주입에 의하여 획득되는 일련의 항-CD38 CAR들의 활성화에 대한 CD38 음성 T 세포들의 정제 및 CD38 KO의 효과의 평가

[0612] i. WT / CD38-결핍 / 정제된 CD38 결핍 T 세포들에서 비교 CAR mRNA 스크리닝

[0613] T 세포들이 버피 코트 샘플들로부터 정제되었고 항-CD3/CD28 코팅된 비드들을 이용하여 활성화되었다 (실험 기간이 도 4B에 나타나 있다). 세포들이 항-CD38 CAR를 코딩하는 mRNA 15 μ g으로 활성화된 12 일 후 형질주입되었고 T 세포들의 중요한 사망률이 관찰되었다.

[0614] CD38 KO 및 CD38 음성 정제가 시험되었고 평가되었다. CD38-1 TALEN mRNA가 항-CD3/CD28 코팅된 비드들로 활성화 4일 후에 T 세포들에서 형질주입되었다 (또는 형질주입되지 않았다). 자성 분리를 이용하여 6일 후 CD38 음성 세포들이 정제되었다 (또는 정제되지 않았다)(Miltenyi의 프로토콜). 그 다음 날, CAR mRNA들이 형질주입되었다. CART 세포들의 탈과립화 능력(capacity) 및 CAR 발현이 형질주입 24 시간 후 평가되었다. CART 세포들의 세포독성 능력 및 CAR 발현이 형질주입 48 시간 후 평가되었다. 항-CD38 CAR들, 13F11-V2 및 -V3이 분석을 위하여 이용되었다. CAR mRNA들 형질주입 24 시간 후, T 세포 생존능력이 정제된 CD38 KO T 세포와 CD38 KO T 세포들에서 증가되었고 가장 좋은 생존능력을 보였다 (도 13A).

[0615] *발현*

[0616] CAR 발현이 CD38-Fc 단백질을 이용한 유동세포분석법에 의하여 분석되었다. CAR 발현이 CD38-결핍 T 세포들에서 1일 및 2일에 더 높은 수준에서 검출가능했다. 정제된 또는 정제되지 않은 CD38 KO T 세포들 사이에 중요한 차이는 관찰되지 않았다 (도 13B).

[0617] *탈과립화 능력*

[0618] 타겟 세포주들과 배양 후 탈과립화된 T 세포들의 퍼센트는 야생형 CAR T 세포들에서 CD38-비의존적이지만 CAR T 세포들이 CD38-결핍일 때는 CD38-의존적이다 (도 14A). 정제 단계는 시험된 조건들에서 CAR T 세포 탈과립화에서 효과가 없다.

[0619] *세포독성 활성*

[0620] CAR mRNA들 형질주입 사십팔 시간 후, 타겟 세포주들에 대항한 CAR T 세포들의 세포독성 활성이 없었다. 이 세

포도독성 활성화는 CD38 결핍 CAR T 세포들에서 회복되었다. 이 세포독성 활성화는 CD38-의존적이었으나, 정제된 그리고 정제되지 않은 CD38-결핍 T 세포들에서 차이는 관찰되지 않았다 (도 14B).

[0621] 완전히, 이들 결과들은 T 세포들에서 항-CD38 CAR mRNA 형질주입 전 세포독성 활성화에 대한 (CD38-1 TALEN에 의하여 유도된) CD38 불활성화의 개선된 효과를 가리킨다. 다음 실험들이 정제된 CD38-결핍 T 세포들을 이용하여 수행되었다.

[0622] ii. 정제된 CD38 결핍 T 세포들에서 T 세포 활성화 12일 후 CAR mRNA 형질주입

[0623] T 세포들이 버피 코트 샘플들로부터 정제되었고 항-CD3/CD28 코팅된 비드들 및 IL-2을 이용하여 활성화되었다. CD38-1 TALEN mRNA가 활성화 4일 후 T 세포들에서 형질주입되었고, 6일 후 CD38 음성 세포들이 자성 분리를 이용하여 정제되었다 (Miltenyi). 그 다음 날, CAR mRNA들이 형질주입되었다. CART 세포들의 탈과립화 능력 및 CAR 발현이 형질주입 24시간 후 평가되었다. CART 세포들의 세포독성 능력 및 CAR 발현이 형질주입 48시간 후 평가되었다.

[0624] 발현

[0625] 모든 CAR들이 25A10-V3를 제외하고 형질주입 24 시간 후 검출되었다. 그러나, 후자의 것이 배경 위에 항-CD38 CAR를 발현시켰다. 13F11-V2, 25A10-V1, 25A10-V2 및 28F5-V2이 (80% 초과로) 높게 발현되었다. CAR-V2 및 -V3 발현은 -V1 보다 48 시간에서 더 안정적이었다 (도 15).

[0626] 탈과립화 능력

[0627] CART 세포들 대부분이 CD38를 발현시키는 세포주들에 대항하여 탈과립화할 수 있었다. 16B5-V3, 28F5-V3, 25A10-V3 만이 낮은 탈과립화 능력을 보인다. U266 CD38+ 및 U266 CD38-에 대항하여 탈과립화의 가장 좋은 비율들 (>2)을 보이는 CART 세포들은 13F11-V1, -V3, 16B5-V1, -2 25A10-V1, 28F5-V1, -V2 및 GMB005-V1이었다 (도 16). CAR-V1 및 -V3은 CAR-V2 보다 자가조직 T 세포들 CD38+ 에 대항하여 더 낮은 수준에서 탈과립화할 수 있었다.

[0628] 세포독성 활성화

[0629] CAR T 세포들의 대부분이 CD38+ 타겟 세포주들을 (4시간에 20% 초과) 효과적으로 죽일 수 있었다 (도 17). CD38+ 타겟 세포주들에 대항하여 매우 세포독성인 16B5-V2, 25A10-V2 및 28F5-V2 이 또한 자가조직 활성화된 T 세포들에 대항하여 매우 세포독성이다. 흥미롭게도, 25A10 and 28F5의 -V1 버전은 CD38hi 세포주들에 대항하여 세포독성이었으나, 그러나 자가조직 T 세포들에 대하여 더 낮은 세포독성 활성을 보였다.

[0630] 시험된 모든 CAR들의 모든 결과들로부터, CAR들 25A10-V1, 25A10-V2, 28F5-V1 and 28F5-V2이 - 특히 그것들이 불활성화된 그것들의 CD38 유전자를 가질 때 - 암인 CD38-발현 세포들에 대한 세포독성의 측면에서 더 높은 잠재력을 가지는 반면, T 세포들과의 상호작용 (즉, 동일한 기증자로부터 다른 활성화된 CD38 T 세포들)에서 감소된 효과를 보인다는 것이 나타났다.

[0631] 실시예 4: 생체 내에서 항-CD19 CAR 활성화에 대한 CD38-KO의 영향 평가

[0632] CAR 활성화에 대한 CD38-KO의 영향을 평가하기 위하여, NOG 마우스들이 T-세포들의 주사 8일 전 치사량에 가깝게 방사선조사되었다. (-7)일에 5×10^5 Daudi 루시페라제(Luciferase) 세포들/마우스가 iv 주사되었다. 마우스들은 그 다음에 야생형 또는 CD38-/- CAR-CD19 RQR8 T-세포들이 주입되었다. FMC63 scfv를 포함하는 도구 CD19 CAR는 WO2014/184143에 개시된 서열번호 16 서열을 가진 폴리뉴클레오타이드에 대응된다. CAR-CD19 RQR8 T-세포들이 Donnelly ML et al, (2001) J Gen Virol.;82(Pt 5):1027-1041 와 같은 선행기술에 개시된 방법들에 따라 항-CD19 및 RQR8 둘다의 공-발현에 의하여 수득되었다. 생물발광 신호가 T-세포들의 주입 후 D(-1), D7, D14, D21 및 D28에 평가되었다 (도 22A 및 도 22B). 중앙 진행 및 생존율이 평가될 때, CD38-/- CAR-CD19 RQR8 세포들이 CAR-CD19 RQR8 T 세포들과 동일한 항-종양 활성을 생체내에서 보였다는 것이 나타난다 (도 22C) 그리고 CD19 CAR 및 KO CD38 결핍을 지닌 것으로 여겨지는 T 세포들이 더 오래 생존하였다 (도 22D). 이와 같이, CD38-KO는 생체내에서 CAR T-세포들의 항-종양 활성화에 영향을 미치지 않는다.

[0633] 실시예 5: 이중 KO TRAC/CD38 T 세포들에서 렌티바이러스 형질도입에 의하여 수득되는 항-CD38 CAR의 활성화 평가

[0634] 발현 플라스미드에서 CAR 클로닝

[0635] 4 개의 항-CD38 CAR들 25A10-v1, 25A10-v2, 28F5-v1 및 28F5-v2이 제한 효소 XmaI를 이용하여 EF1a 프로모터의

통제 하 RQR8 (pCCL-RQR8-T2A-CAR)를 포함하는 최종 rLV 백본 내로 클로닝되었다. 이들 플라스미드들의 서열들이 분석되었고 플라스미드들은 rLV 생산을 위하여 Vectalys (France)에 보내졌다.

[0636] rLV MOI의 기능에서 rLV CD38 CAR 형질도입

[0637] 주요 T 세포들을 형질도입하는데 필요한 CAR CD38 rLV 투여량이 T 세포 활성화 7일 후 평가되었다.

[0638] T 세포들이 활성화 3일 후 CD38 TALEN mRNA로 형질주입되었고 MOI 5, 10 and 15에서 4 개의 CAR 후보 rLVs (25A10-v1, -v2, 28F5-v1 및 -v2)으로 4일 후 형질도입되었다.

[0639] 형질도입 효율이 양성 CAR 또는 양성 RQR8 세포들의 퍼센트의 검출에 의하여 형질도입 3일 후 평가되었다. 3 MOI들 사이의 형질도입 효율의 중요한 차이는 관찰되지 않았다 (각각 도 25A 및 도 25B). 하기 rLV 스크리닝이 MOI 5에서 형질도입로 수행될 것이다.

[0640] CD38-KO 및 TCR-KO 특성들로 스크리닝

[0641] 공정의 대략은 도 26에서 보여진다. 파라미터들은 하기와 같다: T 세포들이 Dynabeads CD3-CD28를 이용하여 활성화되었다, 배양은 IL-2 20ng/ml + 열 불활성화된 5% 인간 혈청+ 배지 Xvivo를 이용하여 되었다, 이중 KO (DKO) CD38-TRAC이 세포들 백만 당 2 μ g TALEN mRNA의 비율을 이용하여 수행되었다 (5백만 세포들/큐벳); 형질도입은 5의 MOI에서 Vectalys(France)로부터 rLV를 이용하여 수행되었다.

[0642] CAR들의 세포독성 능력을 평가하기 위하여, MOLP8, Daudi, U266 CD38+ 및 U266 CD38- 가 mRNA 스크리닝 동안 앞서 이용된 타겟 세포들로서 사용되었다. 이들 세포주들은 (Daudi를 제외하고) CD38의 다른 수준들을 보이는 다발성 골수종 세포주들이다.

[0643] rLV CAR 스크리닝은 3 개의 다른 PBMC 기증자들을 이용하여 3 개의 다른 실험들에서 이루어졌다. CAR 발현, CAR 형질도입 후 CD38 음성 세포들의 강화 및 4 개의 CAR들 25A10-v1, -v2, 28F5-v1 및 -v2의 세포독성 능력이 분석되었다.

[0644] 항-CD38 CAR 발현 및 CART 표현형화의 평가

[0645] DKO T 세포들에서 rLV 형질도입 후 4 개의 CAR들 25A10-v1, -v2, 28F5-v1 및 -v2의 스크리닝이 모든 CAR들이 그 중 3개가 80% 가 넘고 모든 CAR들이 높은 효율 (>40%)로 (도 27C) T 세포 표면에서 발현되었다는 것을 보였다. RQR8 발현은 CAR 발현과 연관성이 있다 (도 27A). T 세포들이 CD38 CAR들로 형질도입될 때, T 세포들 대부분이 CD38 음성이었다 (도 27A). 상기 4 개의 CAR들을 지닌 것으로 여겨지는 T 세포들 중 60-85%가 DKO TRAC/CD38이었다는 것이 보여진다 (도 27B).

[0646] DKO CD38 CART 세포들은 주로 CD8+ 이었고 (도 28A) 효과기/효과기 기억 표현형을 보였다. CAR 구조체들 사이에 차이는 없었다 (도 28B).

[0647] 인 비트로에서 CAR 활성화의 평가

[0648] CART 탈과립화가 유동세포분석법에 의하여 평가되었다. 판독은 타겟 세포들과 배양 5시간 후 T 세포 원형질 막에서 CD107a 발현이다. 이들 CAR들은 CD38+ T 세포들에 대항하는 것과 더불어 CD38+ 다발성 골수종 세포주들에 대항하여 높은 효율로 탈과립화할 수 있었다 (도 29A). 4 개의 CD38 CAR 후보들이 CD38 투여량 의존적 방식으로 CD38+ 다발성 골수종 세포주들에서 세포용해를 유도할 수 있었다 (도 29B).

[0649] 실시예 6: T 세포들 급성 림프아구성 백혈병 (T-ALL)에 대항한 항-CD38 CAR T 세포들의 평가

[0650] 도 30에 나타난 대로, T-ALL 세포들이 높은 수준으로 CD38을 발현시켰다. 이 병적 측면은 환자에서 항-CD38 T 세포들의 투여에 기초한 치료에 대한 또다른 적용일 수 있었다.

[0651] CD38-KO과 새로운 T-ALL 세포주의 개발

[0652] 테스트된 모든 T-ALL 세포주들이 CD38+이었다. T-ALL에 대항한 CAR 활성을 평가하기 위하여 음성 세포주가 대조군으로서 필요했다. CD38-KO CCRF-CEM 세포주들이 CD38 TALEN mRNA으로 CCRF-CEM 세포들의 형질주입에 의하여 만들어졌다. CD38 음성 세포들이 자성 분리에 의하여 (항-CD38 마이크로비드들, Miltenyi- 도 31) 정제되었다. 새로운 세포주는 세포독성 분석을 위한 음성 대조군으로서 사용되었다.

[0653] T-ALL 세포주들에 대항한 항-CD38 CAR T 세포 활성화의 평가

[0654] T-ALL 세포주들에 대항한 항-CD38 CAR T 세포 활성화가 CD38을 발현시키는 몇몇 T-ALL 세포주들과의 공배양 후 그

것들의 탈과립화의 분석에 의하여 평가되었다. UCART38의 높은 다수 (>70%)가 T-ALL CD38+ 세포들의 존재 하 탈과립화될 수 있었다 (도 32A). 인 비트로에서 T-ALL 세포들에 대항한 UCART38의 세포독성이 4 시간 동안 T-ALL 세포들과 UCART38의 공배양에 의하여 평가되었다. UCART38 세포들은 CD38+ T-ALL 세포들의 세포용해를 유도할 수 있었다 (도 32B).

- [0655] 참고문헌들
- [0656] Antonelli A, Ferrannini E.(2004) "CD38 autoimmunity: recent advances and relevance to human diabetes." J Endocrinol Invest. 27(7):695-707.
- [0657] Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L, Magrangeas F, Sebban C, Lioure B, Decaux O, Lamy T, Legros L, Fuzibet JG, Michallet M, Corront B, Lenain P, Hulin C, Mathiot C, Attal M, Facon T, Harousseau JL, Minvielle S, Moreau P; Intergroupe Francophone du Myelome. (2011) "Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor?" Blood. 2011 Feb 10;117(6):2009-11.
- [0658] Bardenheuer, W., K. Lehmborg, et al. (2005). "Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells." Leukemia 19(12): 2281-8.
- [0659] Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods 281(1-2): 65-78.
- [0660] Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." Science 326(5959): 1509-12.
- [0661] Brewin, J., C. Mancao, et al. (2009). "Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease." Blood 114(23): 4792-803.
- [0662] Cambier, J.C. (1995) "Antigen and Fc Receptor Signaling:The Awesome Power of the Immunoreceptor Tyrosine- I Based Activation Motif (ITAM)" The Journal of Immunology 155 (7) 3281-3285.
- [0663] Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science 339(6121): 819-23.
- [0664] Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." Trends Biochem Sci 23(10): 394-8.
- [0665] Dalgaard, J. Z., A. J. Klar, et al. (1997). "Statistical modeling and analysis of the LAGLIDADG family of site-specific endonucleases and identification of an intein that encodes a site-specific endonuclease of the HNH family." Nucleic Acids Res 25(22): 4626-38.
- [0666] Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature 471(7340): 602-7.
- [0667] Garneau, J. E., M. E. Dupuis, et al. (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." Nature 468(7320): 67-71.
- [0668] Gasiunas, G., R. Barrangou, et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A 109(39): E2579-86.
- [0669] Hacke, K., J. A. Treger, et al. (2013). "Genetic modification of mouse bone marrow by lentiviral vector-mediated delivery of hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase short hairpin RNA confers chemoprotection against 6-thioguanine cytotoxicity." Transplant Proc 45(5): 2040-4.
- [0670] Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." Blood 116(7): 1035-44.
- [0671] Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science 337(6096): 816-21.

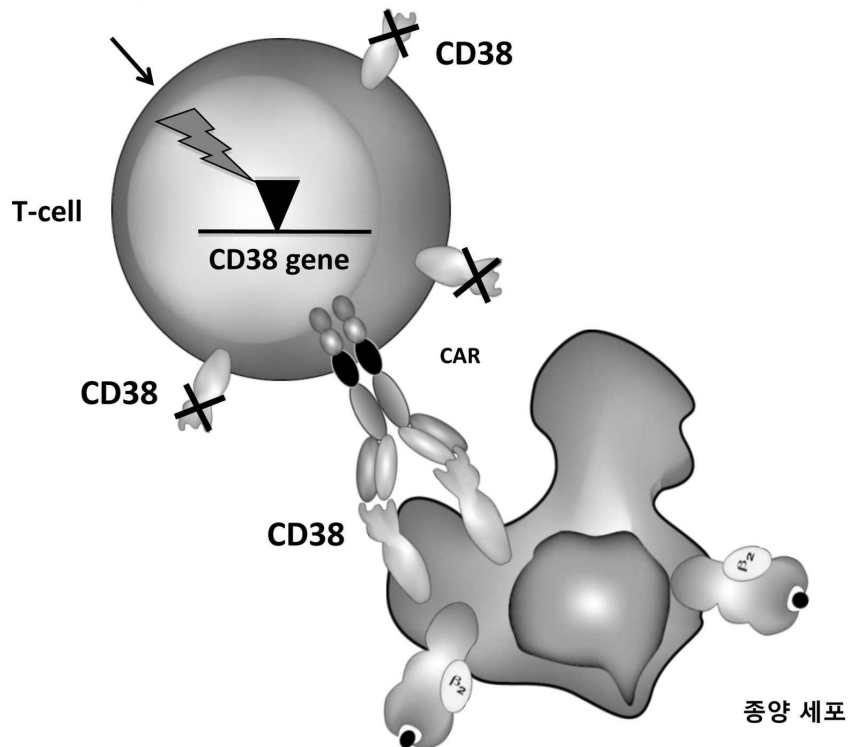
- [0672] Jonnalagadda, M., C. E. Brown, et al. (2013). "Engineering human T cells for resistance to methotrexate and mycophenolate mofetil as an in vivo cell selection strategy." *PLoS One* 8(6): e65519.
- [0673] Kushman, M. E., S. L. Kabler, et al. (2007). "Expression of human glutathione S-transferase P1 confers resistance to benzo[a]pyrene or benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol mutagenesis, macromolecular alkylation and formation of stable N2-Gua-BPDE adducts in stably transfected V79MZ cells co-expressing hCYP1A1." *Carcinogenesis* 28(1): 207-14.
- [0674] Lackner, G., N. Moebius, et al. (2011). "Complete genome sequence of *Burkholderia rhizoxinica*, an Endosymbiont of *Rhizopus microsporus*." *J Bacteriol* 193(3): 783-4.
- [0675] Ma, J. L., E. M. Kim, et al. (2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences." *Mol Cell Biol* 23(23): 8820-8.
- [0676] Mak, A. N., P. Bradley, et al. (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target." *Science* 335(6069): 716-9.
- [0677] Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." *Science* 339(6121): 823-6.
- [0678] Metzger, H. et al. (1986) "The Receptor with High Affinity for Immunoglobulin E" *Annual Review of Immunology*. 4: 419-470
- [0679] Mihara, K., Yanagihara K., Takigahira, M., Imai, C., Kitanaka, A., Takihara, Y., Kimura A (2009) "Activated T-cell-mediated immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 in B-cell non-Hodgkin lymphoma". *J Immunother*. 32(7):737-43
- [0680] Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* 326(5959): 1501.
- [0681] Nivens, M. C., T. Felder, et al. (2004). "Engineered resistance to camptothecin and antifolates by retroviral coexpression of tyrosyl DNA phosphodiesterase-I and thymidylate synthase." *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2): 107-15.
- [0682] Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* 29(11): 550-7.
- [0683] Sangiolo, D., M. Lesnikova, et al. (2007). "Lentiviral vector conferring resistance to mycophenolate mofetil and sensitivity to ganciclovir for in vivo T-cell selection." *Gene Ther* 14(21): 1549-54.
- [0684] Schweitzer, B. I., A. P. Dicker, et al. (1990). "Dihydrofolate reductase as a therapeutic target." *Faseb J* 4(8): 2441-52.
- [0685] Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, Stewart JP, Kordsmeier B, Randolph C, Williams DR, Xiao Y, Xu H, Epstein J, Anaissie E, Krishna SG, Cottler-Fox M, Hollmig K, Mohiuddin A, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Sawyer J, Alsayed Y, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B., (2007) "A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1." *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2276-84
- [0686] Sugimoto, Y., S. Tsukahara, et al. (2003). "Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91." *J Gene Med* 5(5): 366-76.
- [0687] Takebe, N., S. C. Zhao, et al. (2001). "Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene." *Mol Ther* 3(1): 88-96.
- [0688] Van Laar, R., Flinchum, R., Brown, N., Ramsey, J., Riccitelli, S., Heuck, C., Barlogie, B. and Shaughnessy JD., (2014) "Translating a gene expression signature for multiple myeloma prognosis into a robust high-throughput assay for clinical use" *BMC Medical Genomics*, 7:25

- [0689] Waldmann H. and Hale G. (2005) "CAMPATH: from concept to clinic". *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1707-1711.
- [0690] Yam, P., M. Jensen, et al. (2006). "Ex vivo selection and expansion of cells based on expression of a mutated inosine monophosphate dehydrogenase 2 after HIV vector transduction: effects on lymphocytes, monocytes, and CD34+ stem cells." *Mol Ther* 14(2): 236-44.
- [0691] Zielske, S. P., J. S. Reese, et al. (2003). "In vivo selection of MGMT(P140K) lentivirus-transduced human NOD/SCID repopulating cells without pretransplant irradiation conditioning." *J Clin Invest* 112(10): 1561-70.

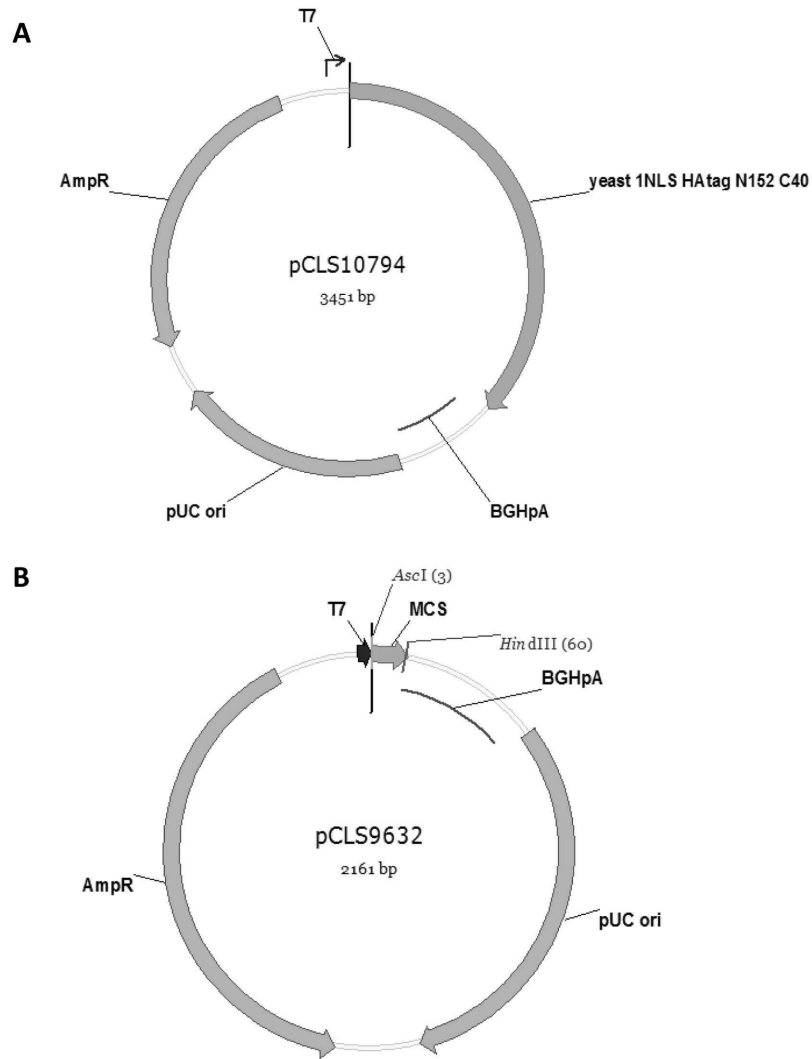
도면

도면1

TAL-뉴클레아제
징크 핑거 뉴클레아제
메가뉴클레아제
Cas9 + 특이적 가이드 RNA

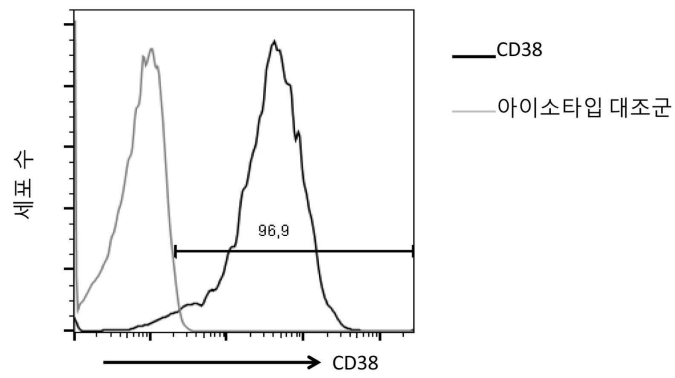


도면2

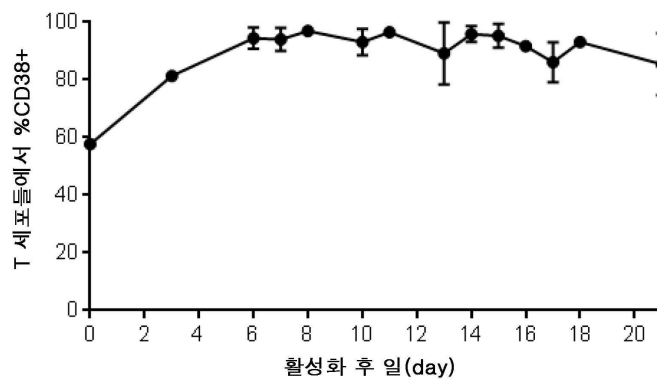


도면3

A

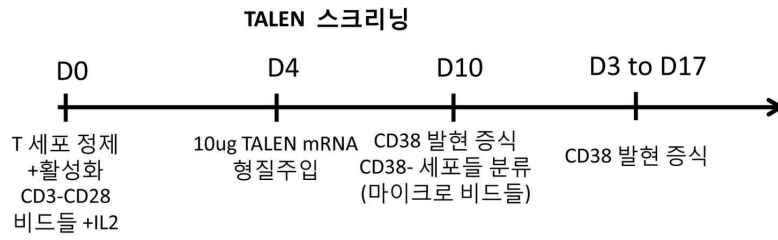


B



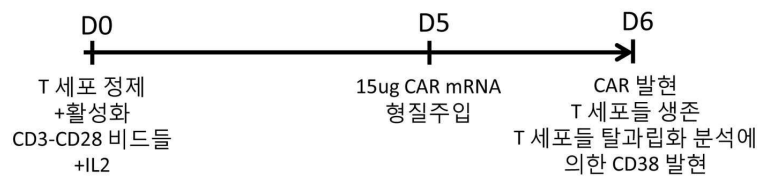
도면4

A



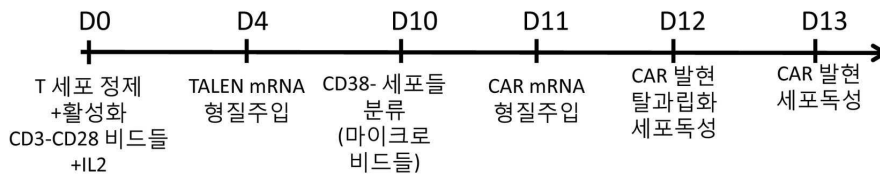
B

T 세포 활성화 5일 후 야생형 T 세포들에서 CAR mRNA 형질주입



C

정제된 CD38 결핍 T 세포들에서 T 세포 활성화 12일 후 CAR mRNA 형질주입

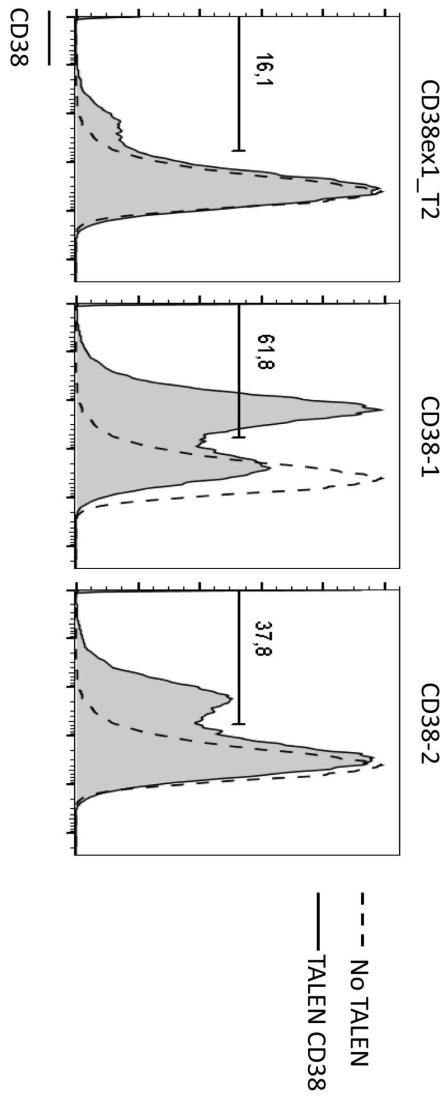


도면5

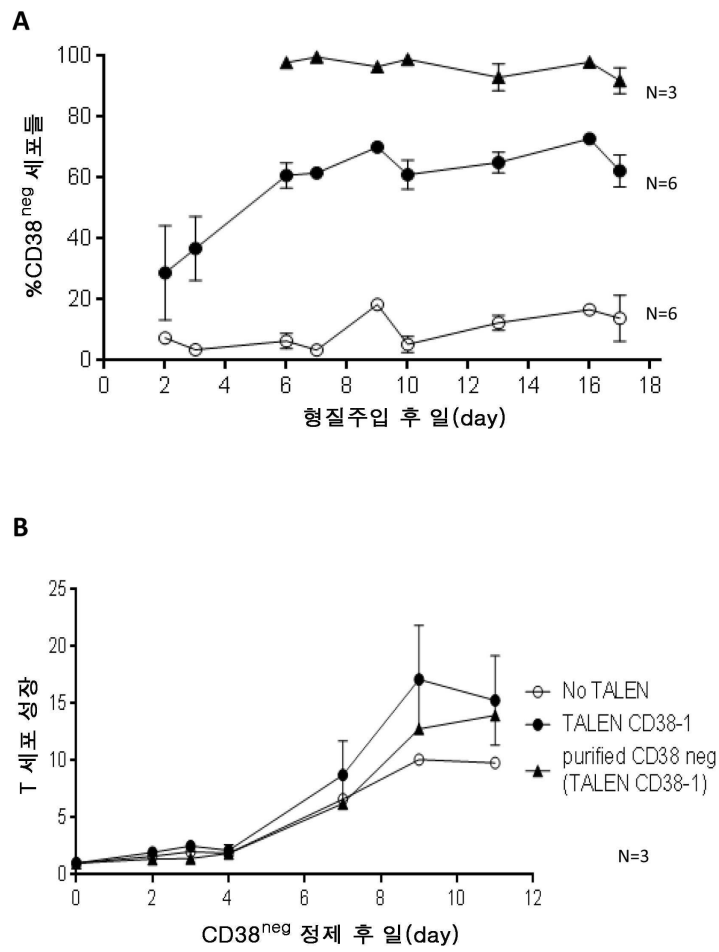
1	ATGGCCAACT GCGAGTTCAG CCGAGTGTCC GGGGCAAAAC CCTGCTGCC GCTCTCTGG AAGCCCAAC TCTGTCTGG CGTCAATAC CTGATCC GA TACGGGTTTA CGCTCAAGTC GGGCCAAAG CCCCTGTTT GAAACAAGGC CAGAAATCC TCTGGGTTT AAGACAAACC GCAATCATAG GGCAGG ACT
101	TCTCTGTGT GTGCTGCGG GTGCTGTCC CAGAGTGGCG CAAAGCTGG AGCGGTCCGG GCAACACCA GCGCTTTCC GAGACGTTC TGGCGGATG AAGAGCAACA CAGAGAGCG CACCAACAGG GCTCAACCG GTTCGT CACC TGGCAAGGC CGTGTGTT CTCGAAAGG CTCTGCAGG ACCGCGCTAC
201	CGTCAATAC ACTGAATTC ATCTGAGT GAGGTGGTT GCGCACTAG GCGACCGGT GGGCACTGG GGAACACAG GCGCCCGCG GCAAGGAGC GCAATCATG TGAATTAG TAGACTCA CTCACCAAA CCGGTGATC CGGTGGCA CCGGTGAGC CCTGTGTG CCGGAGCGCG CGTCCCTTCG
301	GCCCCGATC GCC GGGGGCTTAG CGG

CD38 엑손 1 : AA n°1 부터 n°233까지
CD38-1: 1번째 프레임 (AA n°9 부터 n°58까지)
CD38-2: 2번째 프레임 (AA n°98부터 n°146까지)
CD38ex1_T2: 3번째 프레임 (AA n°229 부터 n°276까지)

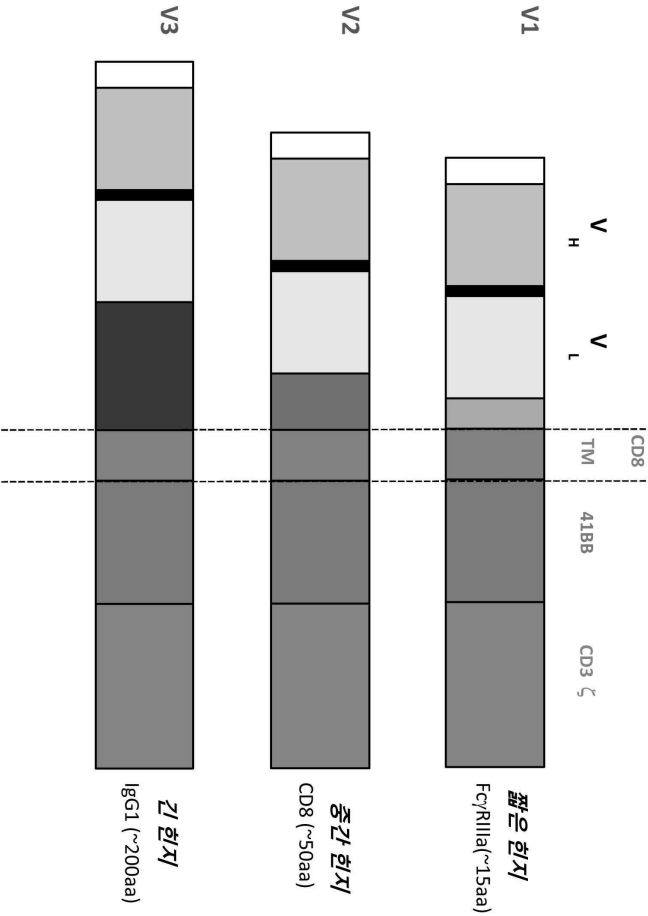
도면6



도면7



도면8

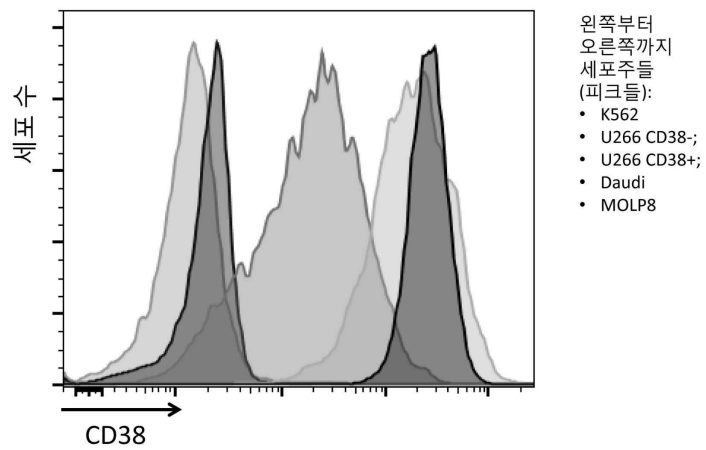


도면9

플라스미드 이름	백본	서열 이름	Kd (nM)
pCLS27540	pCLS9632	10F7-V1	30
pCLS27541	pCLS9632	10F7-V2	
pCLS27542	pCLS9632	10F7-V3	
pCLS27543	pCLS9632	13F11-V1	0,8
pCLS27544	pCLS9632	13F11-V2	
pCLS27545	pCLS9632	13F11-V3	
pCLS27546	pCLS9632	16B5-V1	3,2
pCLS27547	pCLS9632	16B5-V2	
pCLS27548	pCLS9632	16B5-V3	
pCLS27549	pCLS9632	25A10-V1	0,25
pCLS27550	pCLS9632	25A10-V2	
pCLS27551	pCLS9632	25A10-V3	
pCLS27552	pCLS9632	27B6-V1	2,2
pCLS27553	pCLS9632	27B6-V2	
pCLS27554	pCLS9632	27B6-V3	
pCLS27555	pCLS9632	28F5-V1	unknown
pCLS27556	pCLS9632	28F5-V2	
pCLS27557	pCLS9632	28F5-V3	
pCLS27558	pCLS9632	29B4-V1	0,52
pCLS27559	pCLS9632	29B4-V2	
pCLS27560	pCLS9632	29B4-V3	
pCLS27561	pCLS9632	GMB005-V1	119
pCLS27562	pCLS9632	GMB005-V2	
pCLS27563	pCLS9632	GMB005-V3	

도면10

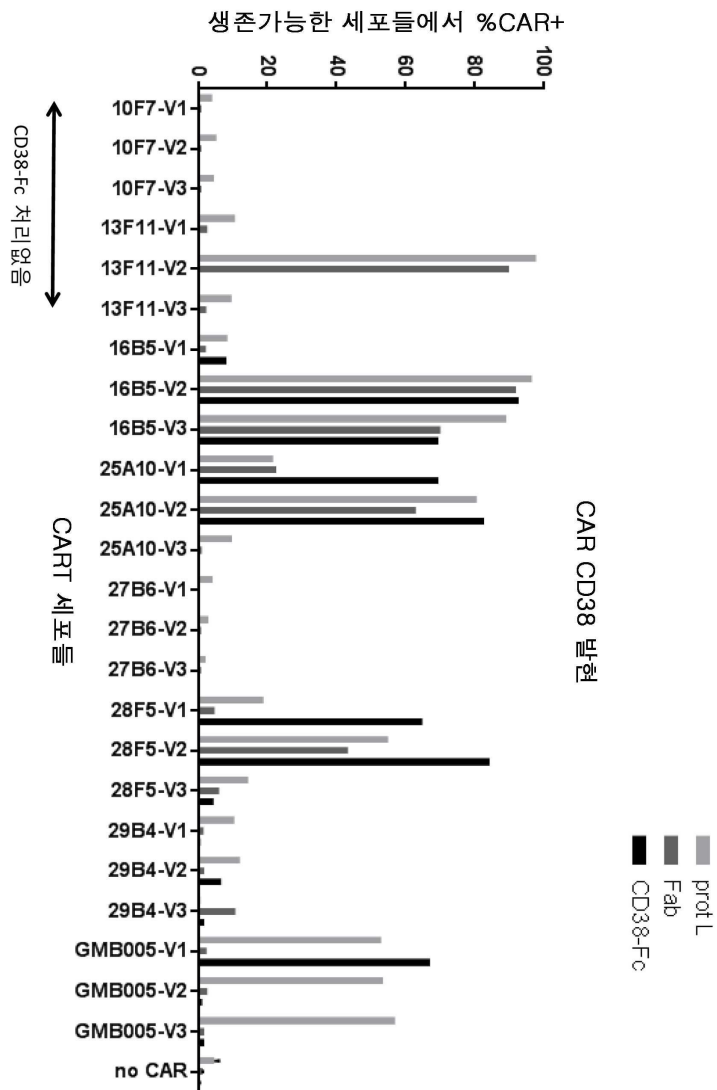
A



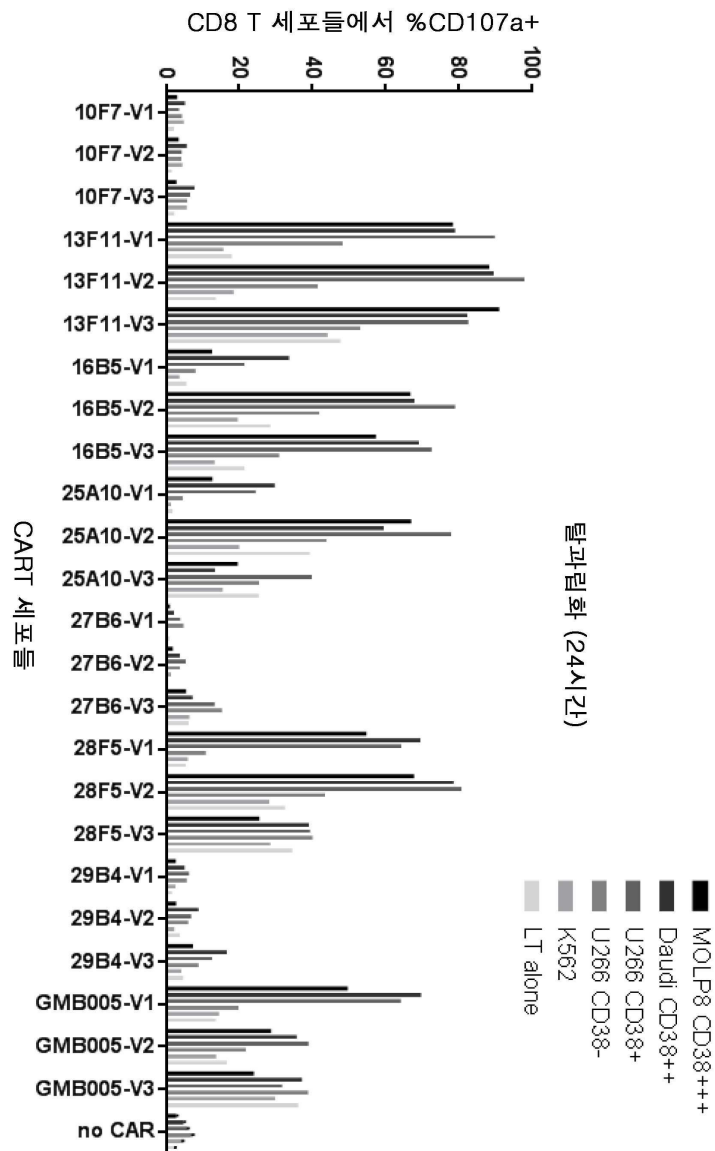
B

세포주들	질병	% CD38+	분자들 CD38/세포들
MOLP8	MM	97,34	482346
Daudi	Burkitt's lymphoma	97,73	259889
U266 CD38+	MM	84,335	48216
U266 CD38-	MM	2,39	230
K562	CML	0	0

도면11

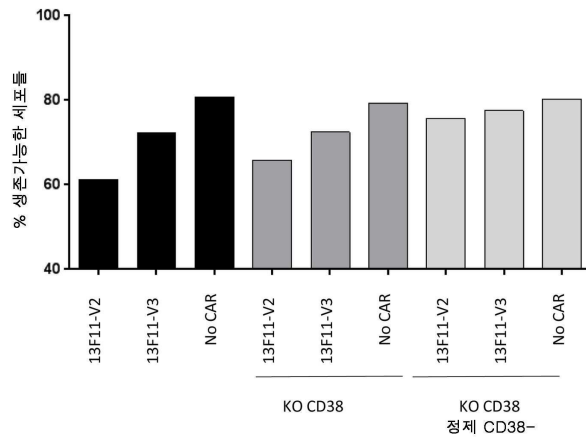


도면12

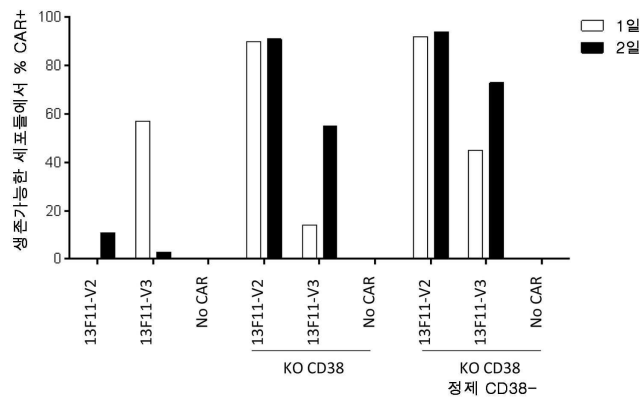


도면13

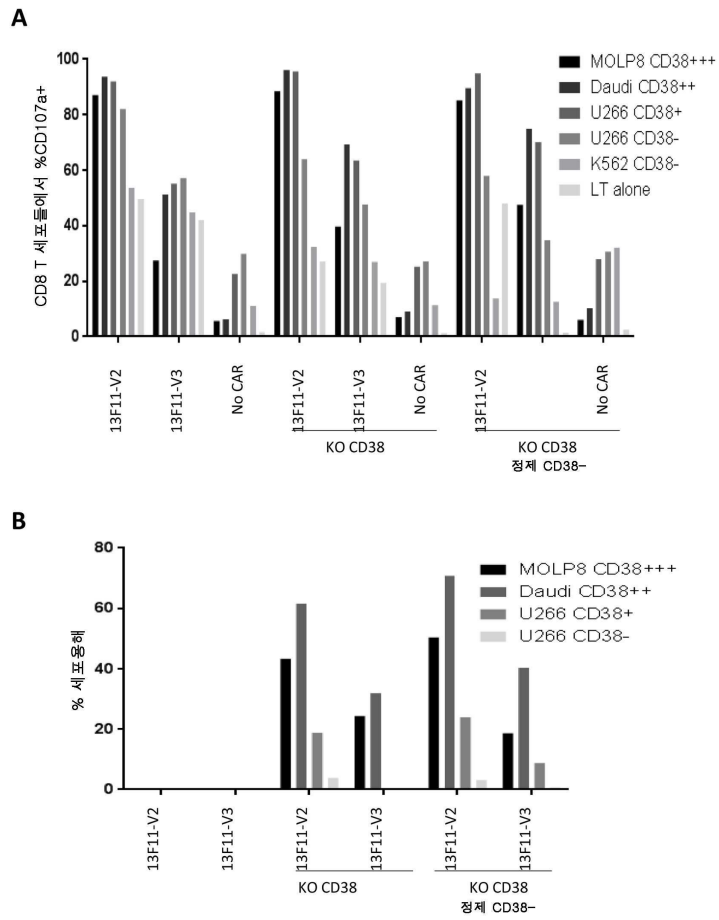
A



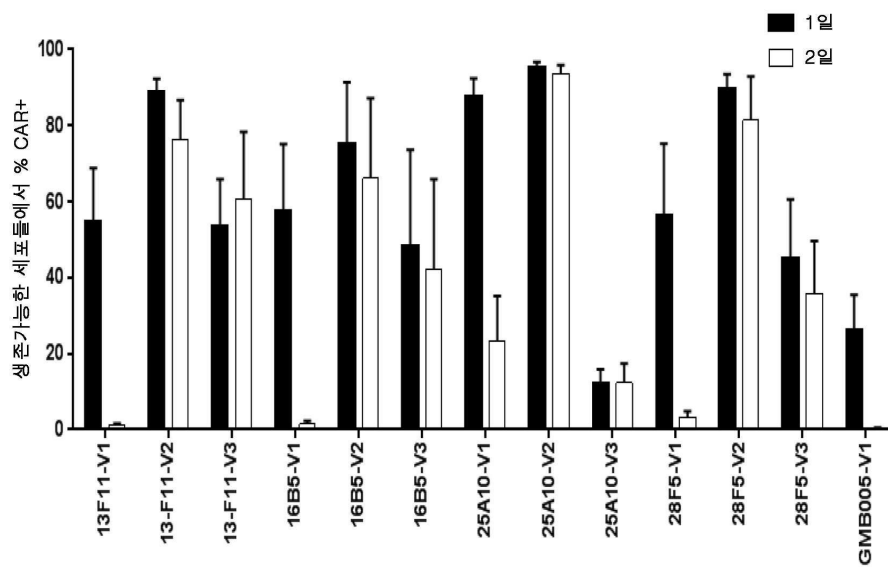
B



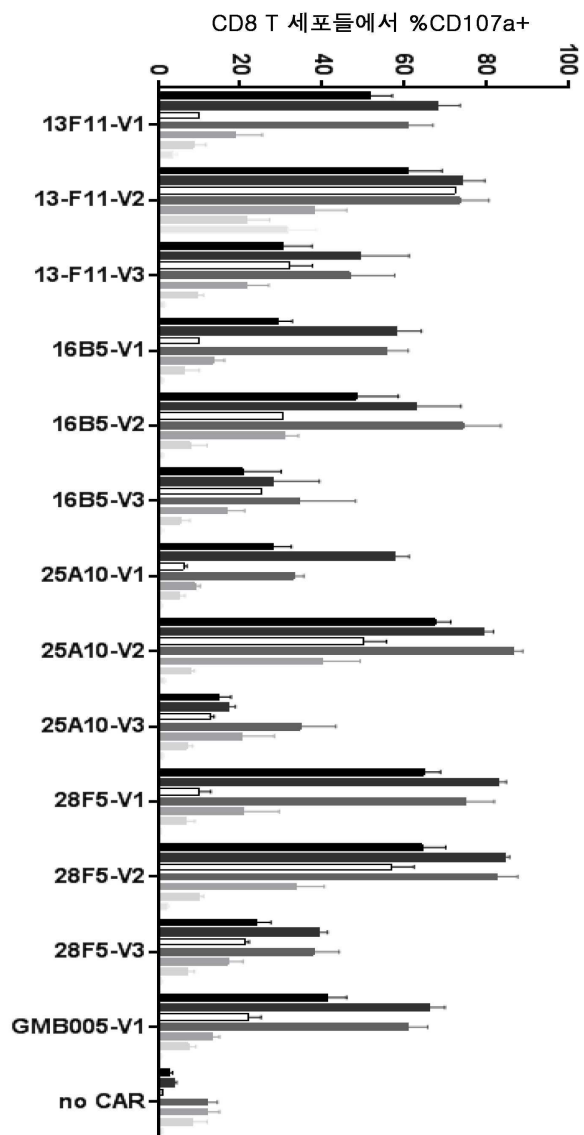
도면14



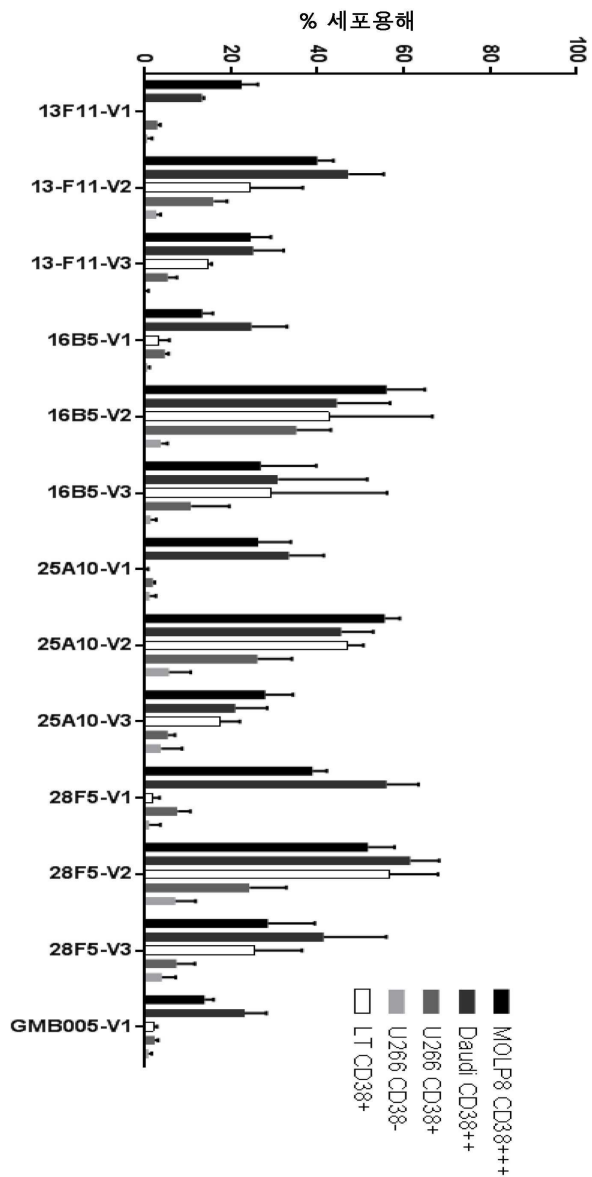
도면15



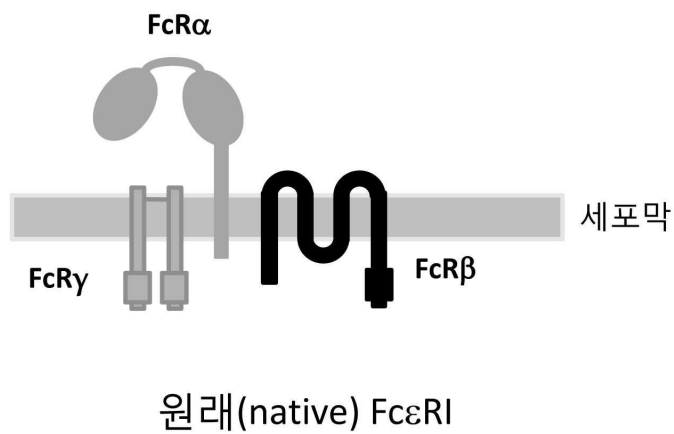
도면16



도면17



도면18

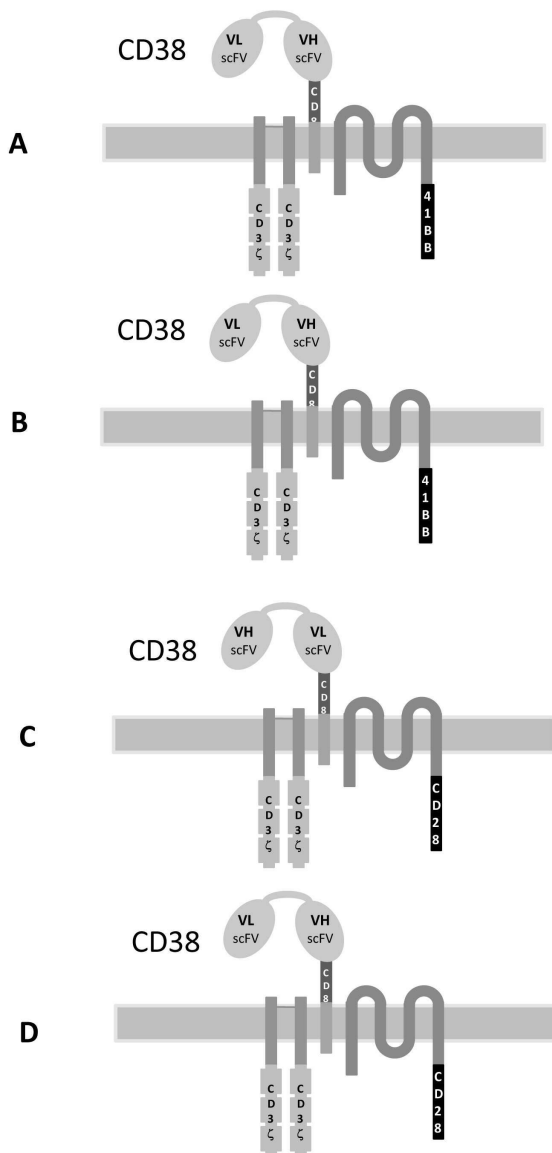


도면19

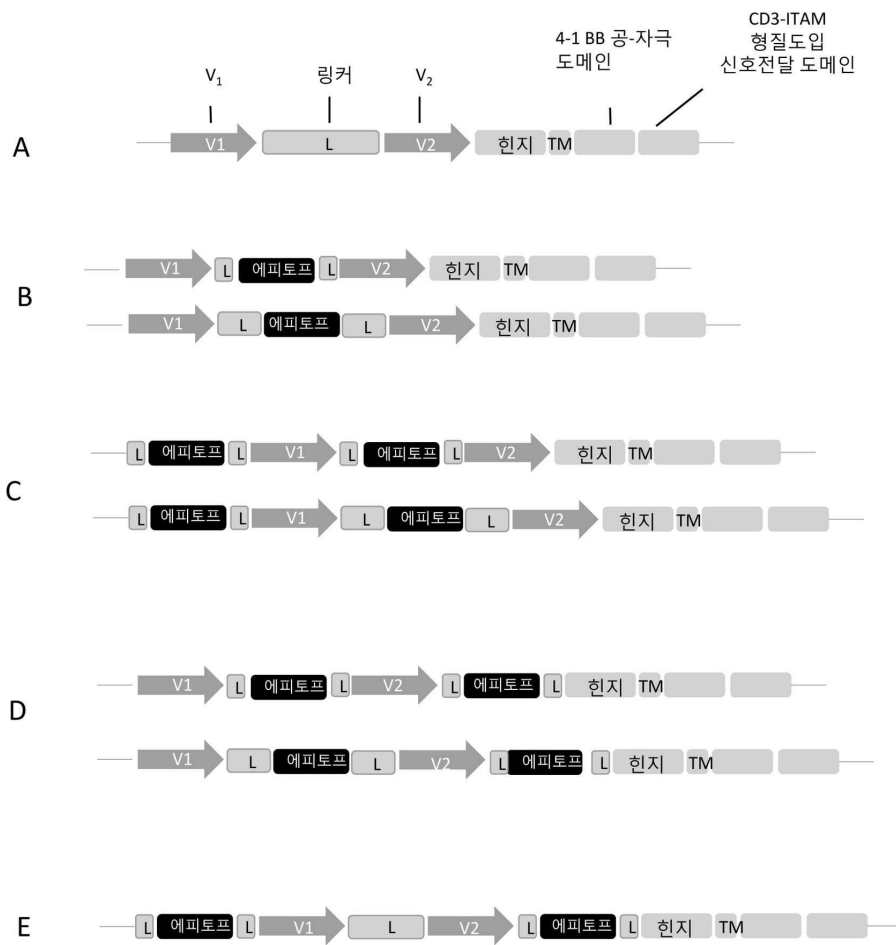


폴리시스트론 mcCAR 구조체의 구조

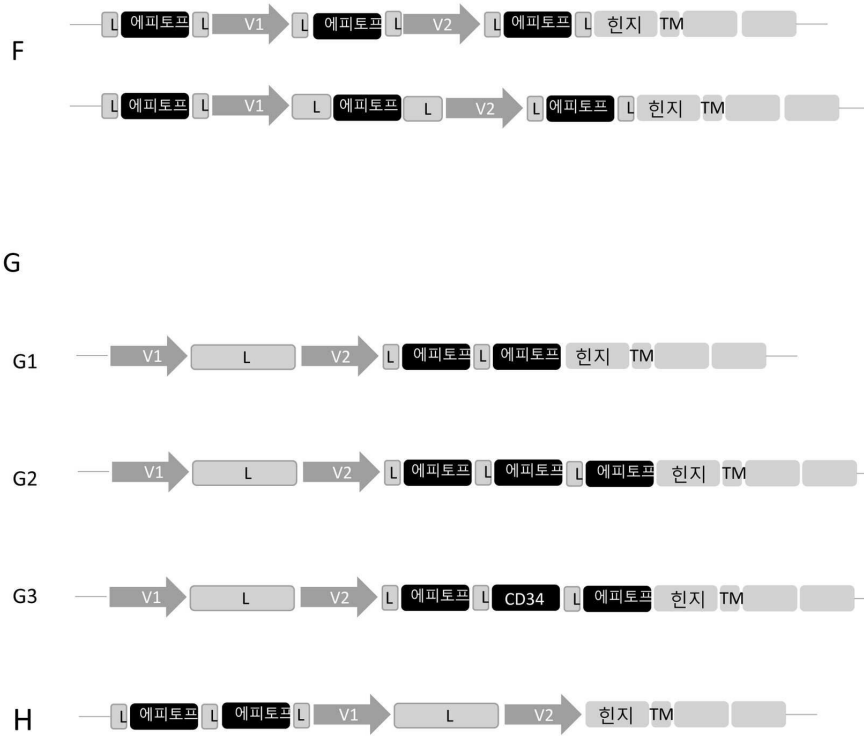
도면20



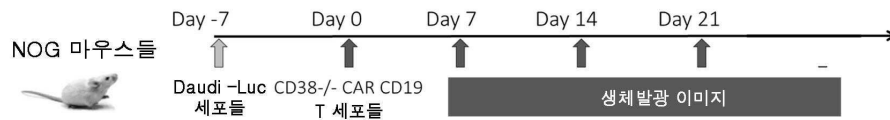
도면21a



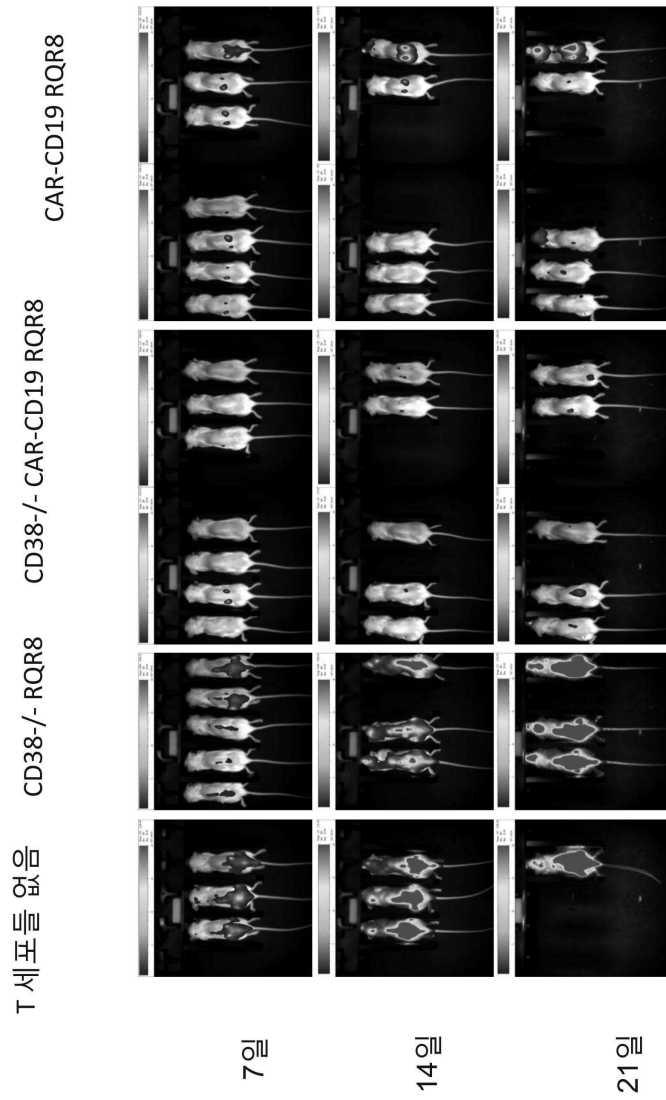
도면21b



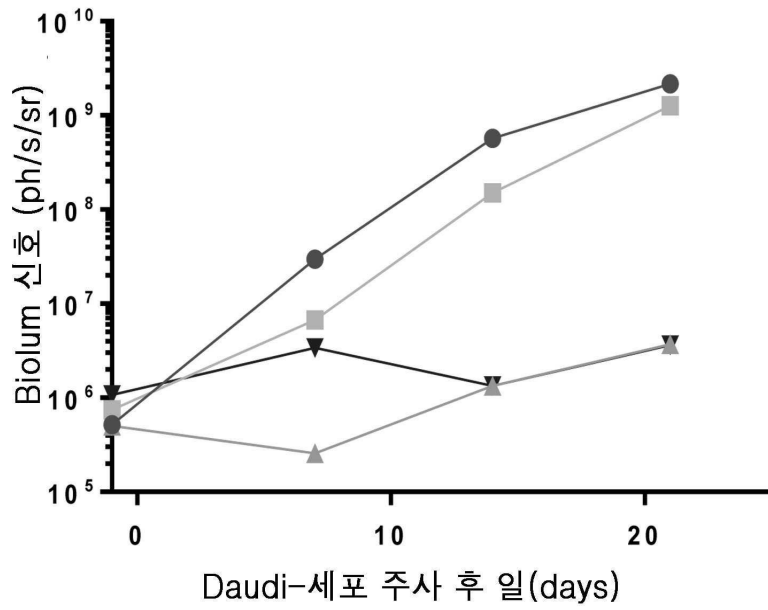
도면22a



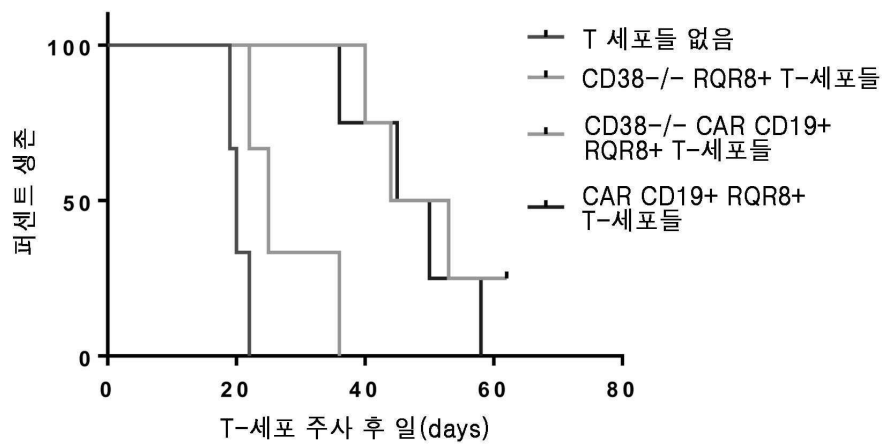
도면22b



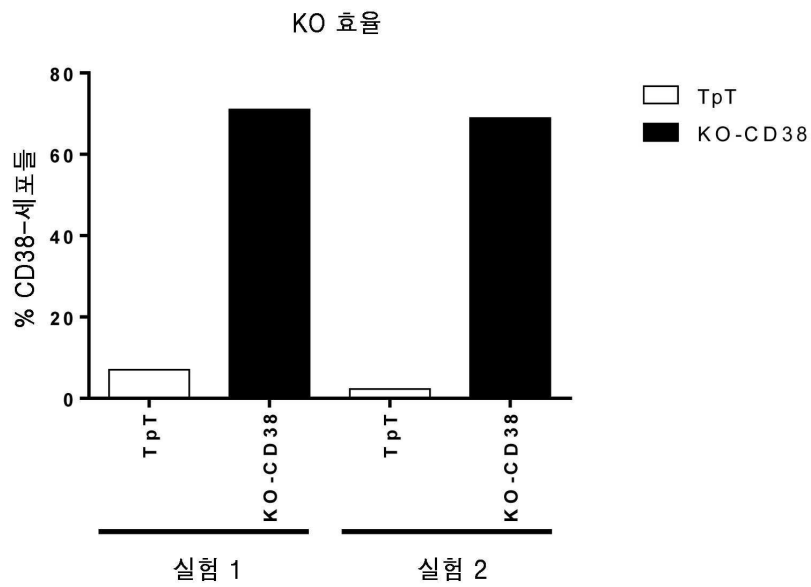
도면22c



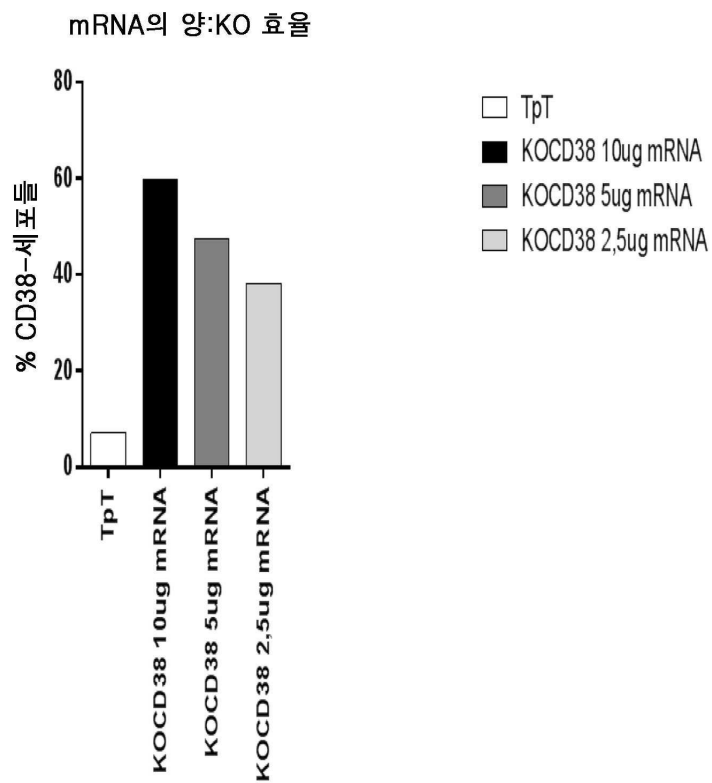
도면22d



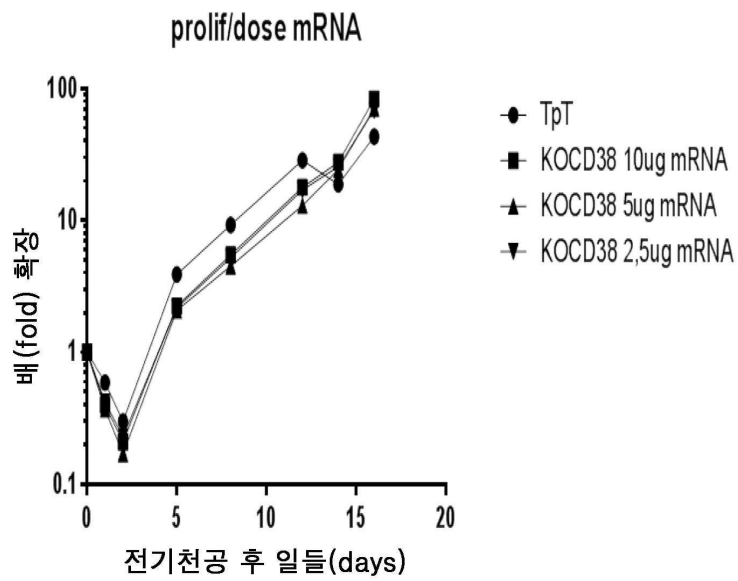
도면23



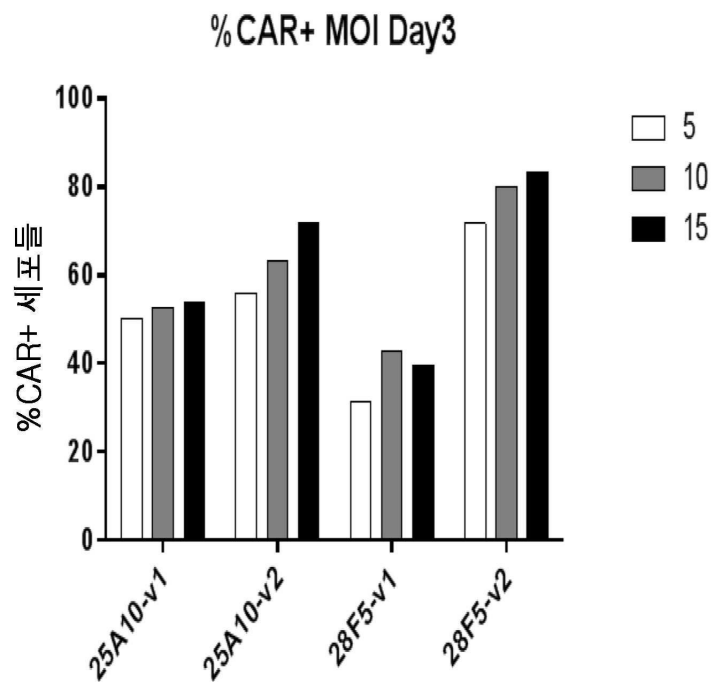
도면24a



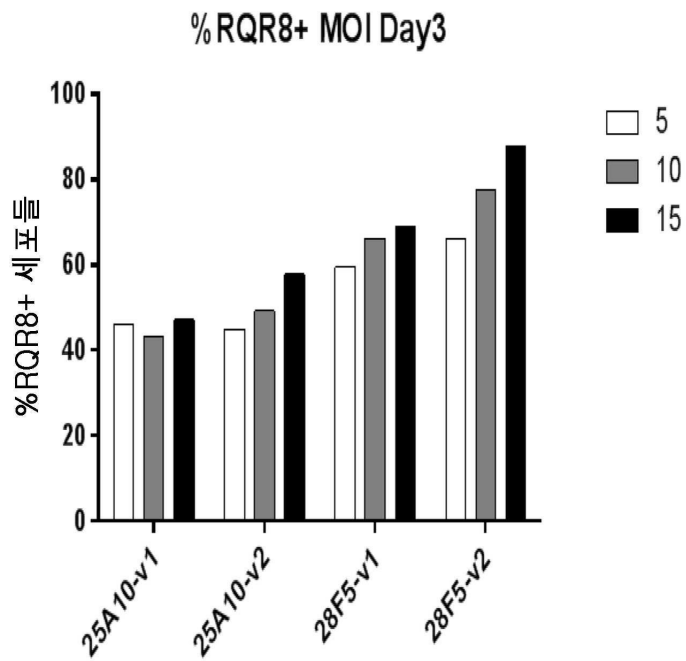
도면24b



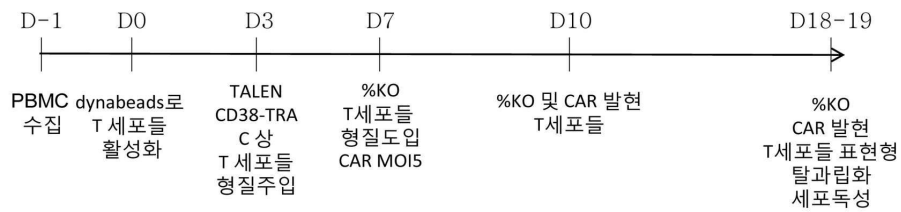
도면25a



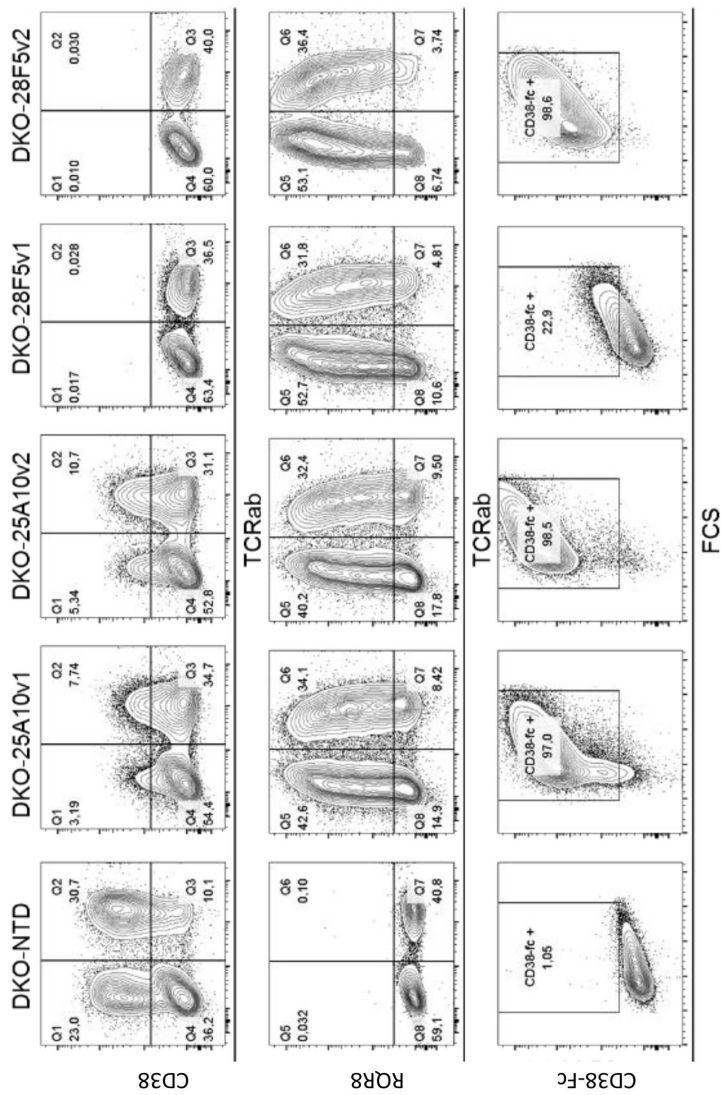
도면25b



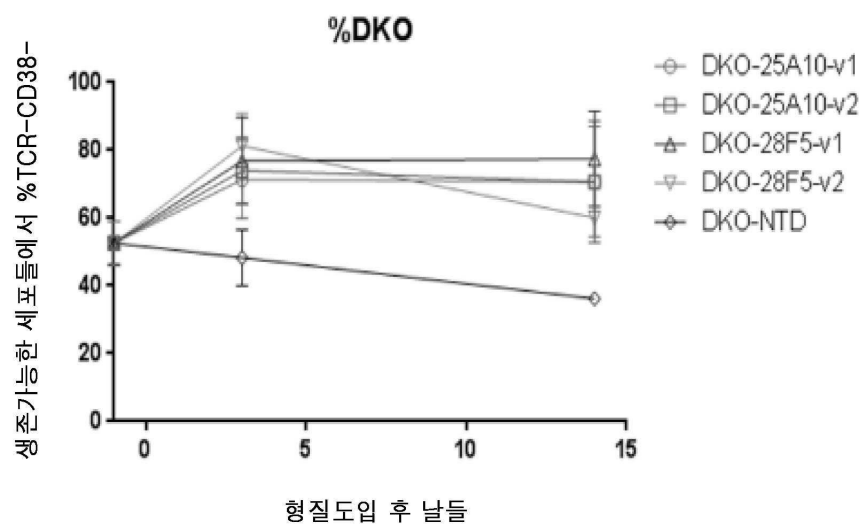
도면26



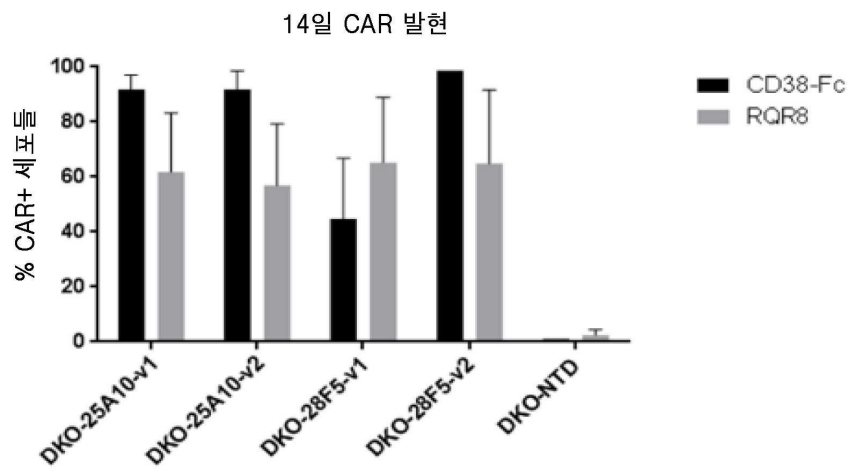
도면27a



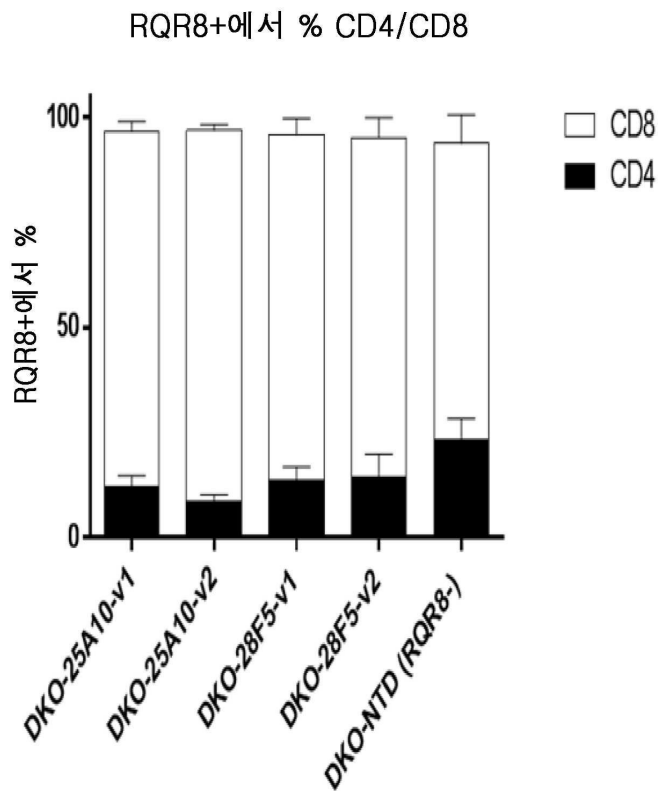
도면27b



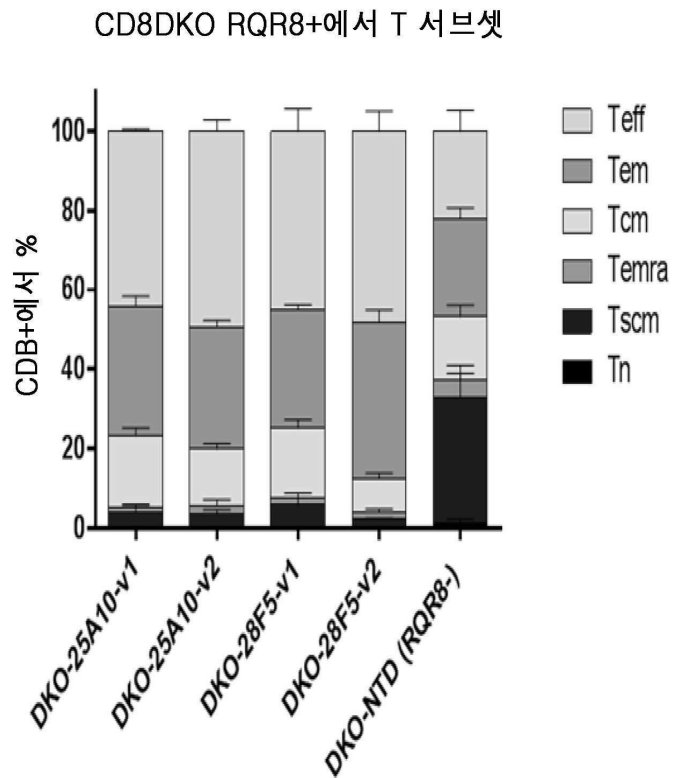
도면27c



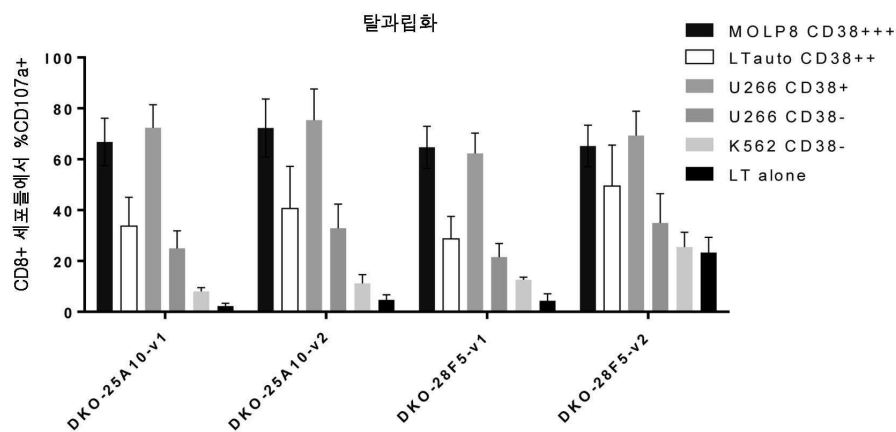
도면28a



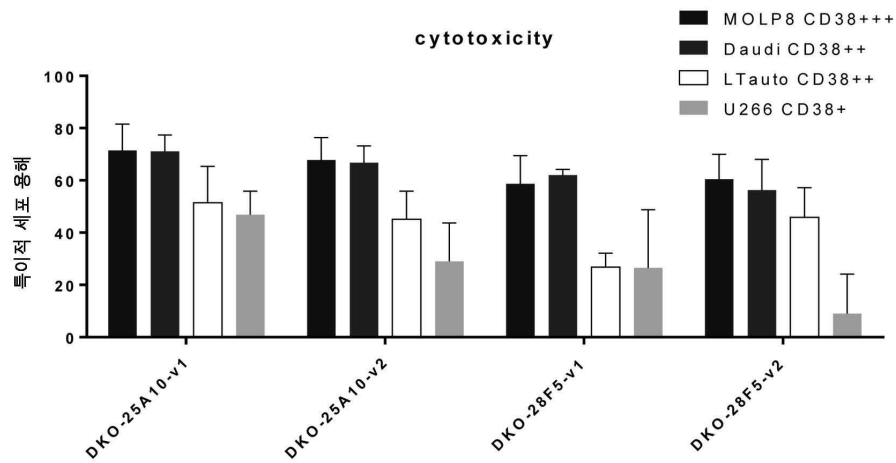
도면28b



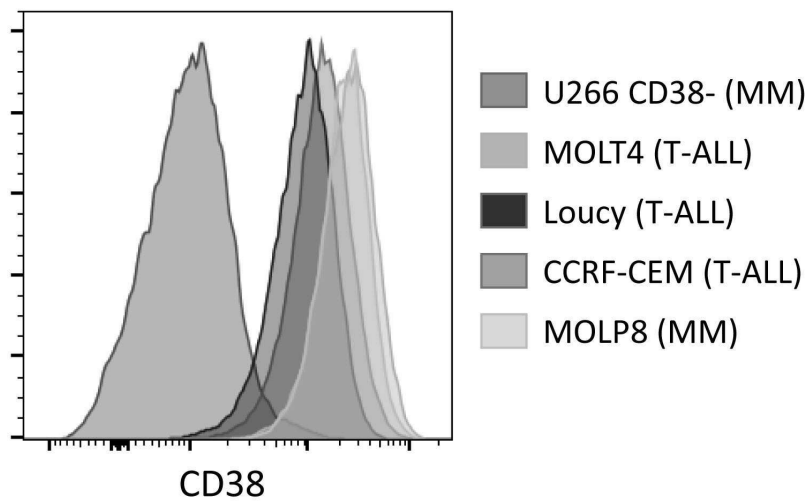
도면29a



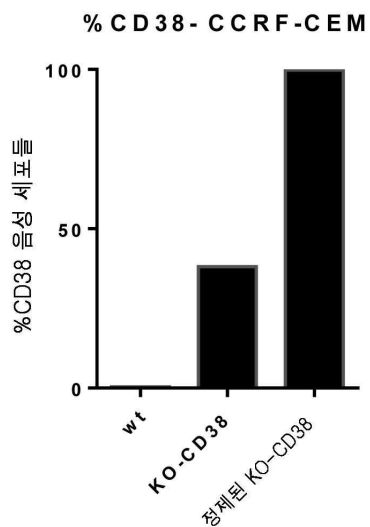
도면29b



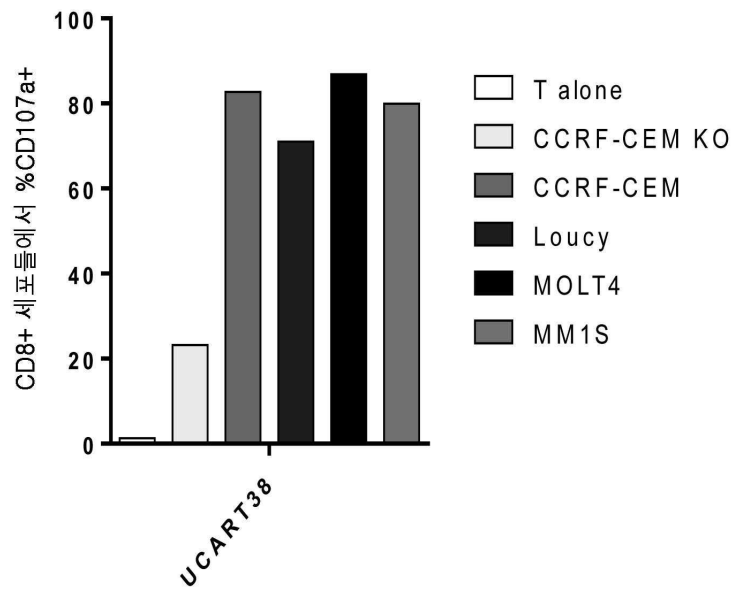
도면30



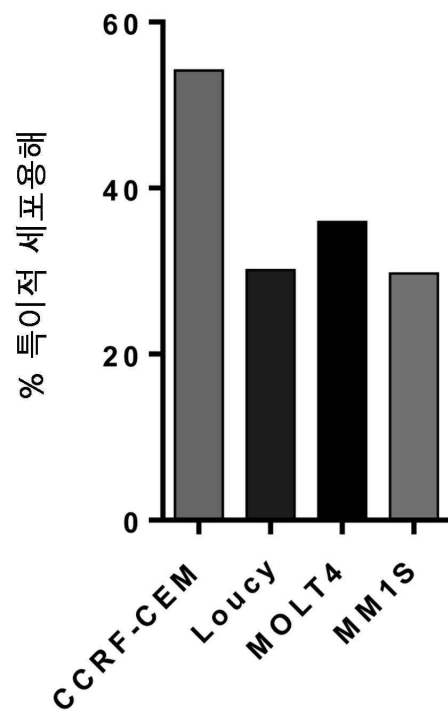
도면31



도면32a



도면32b



서열 목록

- <110> CELLECTIS
- <120> CELLS FOR IMMUNOTHERAPY ENGINEERED FOR TARGETING CD38 ANTIGEN AND
FOR CD38 GENE INACTIVATION
- <130> P81503466PCT00
- <150> PA201570518

<151> 2015-08-11
 <150> PCT/EP2016/051467
 <151> 2016-01-25
 <160> 151
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> gene
 <222> (1)..(47)
 <223> CD38ex1-T2 TALEN target
 <400> 1

tgaggtgggt tggcgactaa ggcgaccgg tgggcactgc ggggaca

47

<210> 2
 <211> 936
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD38ex1-T2 Left TALEN
 <400> 2

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Tyr Pro Tyr Asp

1 5 10 15

Val Pro Asp Tyr Ala Ile Asp Ile Ala Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
355 360 365

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
370 375 380

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
385 390 395 400

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
405 410 415

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
420 425 430

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
435 440 445

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
450 455 460

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
465 470 475 480

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
485 490 495

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
500 505 510

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
515 520 525

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
530 535 540

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
545 550 555 560

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
565 570 575

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
580 585 590

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
595 600 605

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
610 615 620
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
625 630 635 640
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
645 650 655
Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
660 665 670
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
675 680 685
Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala
690 695 700
Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg
705 710 715 720
Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Gly Asp Pro Ile Ser Arg
725 730 735
Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg
740 745 750
His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile
755 760 765
Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu
770 775 780
Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser
785 790 795 800
Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr
805 810 815
Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro
820 825 830
Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr
835 840 845
Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser

850 855 860
 Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly
 865 870 875 880
 Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn
 885 890 895
 Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile
 900 905 910
 Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn

915 920 925
 Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
 930 935

<210> 3
 <211> 942
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD38ex1-T2 Right TALEN
 <400> 3

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Lys Glu Thr Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Ile Asp Ile Ala Asp
 20 25 30
 Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro

35 40 45
 Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His
 50 55 60
 Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro
 85 90 95
 Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly
 100 105 110

Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly

115	120	125	
Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg			
130	135	140	
Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu			
145	150	155	160
Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala			
165	170	175	
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu			
180	185	190	
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala			
195	200	205	
Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg			
210	215	220	
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val			
225	230	235	240
Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val			
245	250	255	
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu			
260	265	270	
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu			
275	280	285	
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr			
290	295	300	
Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala			
305	310	315	320
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly			
325	330	335	
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys			
340	345	350	
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala			
355	360	365	
His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly			

370 375 380
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 385 390 395 400

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

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

 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 545 550 555 560
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 565 570 575
 Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
 580 585 590
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 595 600 605
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys

 610 615 620

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
625 630 635 640

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
645 650 655

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
660 665 670

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
675 680 685

Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg
690 695 700

Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu
705 710 715 720

Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu
725 730 735

Gly Asp Pro Ile Ser Arg Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu
740 745 750

Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr
755 760 765

Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu
770 775 780

Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly
785 790 795 800

Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val
805 810 815

Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser
820 825 830

Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr
835 840 845

Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp
850 855 860

Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val
865 870 875 880

Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn
885 890 895

His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu

900 905 910
Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val

915 920 925

Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp

930 935 940

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(49)

<223> CD38-1 TALEN target

<400> 4

tgcgagttca gcccggtgtc cggggacaaa cctgtgtgcc ggctctcta 49

<210> 5

<211> 970

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD38-1 Left TALEN

<400> 5

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Tyr Pro Tyr Asp

1 5 10 15

Val Pro Asp Tyr Ala Ile Asp Ile Ala Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His

50 55 60

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

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

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

 195 200 205
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
 210 215 220
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 225 230 235 240
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 245 250 255
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 260 265 270

 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 275 280 285
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 290 295 300
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 305 310 315 320
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

325 330 335
Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

340 345 350
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

355 360 365
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

370 375 380
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

385 390 395 400
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala

405 410 415

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

420 425 430

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys

435 440 445

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

450 455 460

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

465 470 475 480

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

485 490 495

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

500 505 510

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

515 520 525

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

530 535 540

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

545 550 555 560

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

565 570 575

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
580 585 590

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
595 600 605

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
610 615 620

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

625 630 635 640

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
645 650 655

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
660 665 670

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
675 680 685

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
690 695 700

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg
705 710 715 720

Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala
725 730 735

Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly
740 745 750

Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Gly Asp Pro Ile
755 760 765

Ser Arg Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu

770 775 780

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile
785 790 795 800

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val
805 810 815

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly
820 825 830

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile
835 840 845

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn
850 855 860

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn
865 870 875 880

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr
885 890 895

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe
900 905 910

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn

915 920 925
Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu
930 935 940

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe
945 950 955 960

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
965 970

<210> 6

<211> 942

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD38-1_Right TALEN

<400> 6

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Lys Glu Thr Ala

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

Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro
85 90 95

Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly
100 105 110

Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly
115 120 125

Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg
130 135 140

Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu

145 150 155 160
Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
165 170 175

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
180 185 190

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
195 200 205

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
210 215 220

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
225 230 235 240

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
245 250 255

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
260 265 270

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
275 280 285

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

290 295 300

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

305 310 315 320
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 325 330 335
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 340 345 350
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 355 360 365

 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 370 375 380
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 385 390 395 400
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 405 410 415
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 420 425 430
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

 435 440 445
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
 450 455 460
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 465 470 475 480
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 485 490 495
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 500 505 510

 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 515 520 525
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 530 535 540
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 545 550 555 560
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

565 570 575
Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala

580 585 590
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

595 600 605
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys

610 615 620
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

625 630 635 640
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

645 650 655
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

660 665 670
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

675 680 685
Ile Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg

690 695 700
Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu

705 710 715 720
Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu

725 730 735
Gly Asp Pro Ile Ser Arg Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu

740 745 750
Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr

755 760 765
Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu

770 775 780
Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly

785 790 795 800
Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val

805 810 815
Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val

Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser
820 825 830
Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr
835 840 845
Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp
850 855 860
Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val

865 870 875 880
Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn
885 890 895
His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu
900 905 910
Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val
915 920 925
Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
930 935 940

<210> 7
<211> 49
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(49)
<223> CD38-2_TALEN target
<400> 7

Thr Gly Ala Thr Cys Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Gly Cys Thr Cys Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr Cys
20 25 30
Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys
35 40 45

Ala

<210> 8

<211> 936

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD38-2 Left TALEN

<400> 8

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Tyr Pro Tyr Asp

1 5 10 15

Val Pro Asp Tyr Ala Ile Asp Ile Ala Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp

115 120 125

Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val

130 135 140

Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

180 185 190

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

195 200 205

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
210 215 220

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
225 230 235 240

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
245 250 255

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
260 265 270

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
275 280 285

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
290 295 300

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
305 310 315 320

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
325 330 335

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
340 345 350

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
355 360 365

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
370 375 380

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
385 390 395 400

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
405 410 415

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
420 425 430

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
435 440 445

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
450 455 460

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
465 470 475 480
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
485 490 495
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
500 505 510
Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
515 520 525
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
530 535 540
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
545 550 555 560
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
565 570 575
Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
580 585 590
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
595 600 605
Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
610 615 620
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
625 630 635 640
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
645 650 655
Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
660 665 670
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
675 680 685
Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala
690 695 700
Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg

705 710 715 720
 Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Gly Asp Pro Ile Ser Arg
 725 730 735
 Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg
 740 745 750
 His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile
 755 760 765
 Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu

 770 775 780
 Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser
 785 790 795 800
 Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr
 805 810 815
 Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro
 820 825 830
 Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr
 835 840 845

 Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser
 850 855 860
 Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly
 865 870 875 880
 Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn
 885 890 895
 Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile
 900 905 910
 Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn

 915 920 925
 Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
 930 935
 <210> 9
 <211> 942
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD38-2 Right TALEN

<400> 9

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Lys Glu Thr Ala

1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Ile Asp Ile Ala Asp

20 25 30

Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro

35 40 45

Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro

85 90 95

Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly

100 105 110

Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly

115 120 125

Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg

130 135 140

Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu

145 150 155 160

Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

165 170 175

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

225 230 235 240
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 245 250 255

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

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

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

 465 470 475 480

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
485 490 495

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
500 505 510

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
515 520 525

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
530 535 540

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
545 550 555 560

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
565 570 575

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
580 585 590

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
595 600 605

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
610 615 620

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
625 630 635 640

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
645 650 655

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
660 665 670

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
675 680 685

Ile Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg
690 695 700

Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu
705 710 715 720

Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu
725 730 735

Gly Asp Pro Ile Ser Arg Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu
740 745 750

Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr
755 760 765

Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu
770 775 780

Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly
785 790 795 800

Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val
805 810 815

Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser
820 825 830

Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr
835 840 845

Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp
850 855 860

Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val
865 870 875 880

Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn
885 890 895

His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu
900 905 910

Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val
915 920 925

Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
930 935 940

<210> 10
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VL chain for 25A10
<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95
Asp Tyr Asp Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VL chain for 25A10

<400> 11

Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VL chain for 25A10

<400> 12

Trp Ala Ser

1

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VL chain for 25A10

<400> 13

Gln Asn Asp Tyr Asp Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain for 25A10

<400> 14

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser

20 25 30

Leu Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ser Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VH chain for 25A10

<400> 15

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser Leu

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VH chain for 25A10

<400> 16

Ile Asp Pro Glu Asp Asp Lys Thr

1 5

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH chain for 25A10

<400> 17

Val Ser Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain for 29B4

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR1 of VL chain for 29B4
 <400> 19

Gln Asp Val Asn Thr Ala
 1 5
 <210> 20
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 of VL chain for 29B4
 <400> 20

Trp Ala Ser
 1
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>

CDR3 of VL chain for 29B4
 <400> 21
 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain for 29B4

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ile Ile Ser Asp Gly Gly Ile Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Arg Asp Asp Tyr Asp Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VH chain for 29B4

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe

1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VH chain for 29B4

<400> 24

Ile Ser Asp Gly Gly Ile Tyr Thr

1 5

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH chain for 29B4

<400> 25

Ala Arg Asp Gly Arg Asp Asp Tyr Asp Gly Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 26

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain for 16B5

<400> 26

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Thr Thr Phe Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR1 of VL chain for 16B5
 <400> 27
 Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Thr Thr Phe
 1 5 10

<210> 28
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 of VL chain for 16B5
 <400> 28
 Leu Ala Ser
 1
 <210> 29
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR3 of VL chain for 16B5
 <400> 29
 Gln Gln Asn Lys Glu Asp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH chain for 16B5
 <400> 30
 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

[illegible]

		100				105			110
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	
		115				120			

<210>	31
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	CDR1 of VH chain for 16B5
<400>	31

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn
1				5			
<210>		32					
<211>		8					
<212>		PRT					
<213>		Artificial Sequence					
<220><223>		CDR2 of VH chain for 16B5					
<400>		32					

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr
1 5

$\langle 210 \rangle$	33
$\langle 211 \rangle$	14
$\langle 212 \rangle$	PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH chain for 16B5

<400> 33

Ala Arg Gly Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 34

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain for 10F7

<400> 34

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Thr Phe Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VL chain for 10F7

<400> 35

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Thr Phe

1 5 10

<210> 36
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 of VL chain for 10F7

<400> 36

Leu Ala Ser

1

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VL chain for 10F7

<400> 37

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain for 10F7

<400> 38

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser 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 Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95
Ala Arg Gly Gly Gln Leu Gly Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VH chain for 10F7

<400> 39

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn

1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VH chain for 10F7

<400> 40

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH chain for 10F7

<400> 41

Ala Arg Gly Gly Gln Leu Gly Arg Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain for 27B6

<400> 42

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Thr Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VL chain for 27B6

<400> 43

Ser Ser Val Ser Tyr

1 5

<210> 44

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VL chain for 27B6

<400> 44

Asp Thr Ser

1

<210> 45

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR3 of VL chain for 27B6

<400> 45
 Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain for 27B6

<400> 46
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile

50 55 60

Ser Arg Leu Lys Ile Ser Lys Asp Asp Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg His Ser Pro Leu Val Ser Thr Pro Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VH chain for 27B6

<400> 47

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asn

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VH chain for 27B6

<400> 48

Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH chain for 27B6

<400> 49

Ala Arg His Ser Pro Leu Val Ser Thr Pro Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain for 13F11

<400> 50

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR1 of VL chain for 13F11
 <400> 51

Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 1 5
 <210> 52
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 of VL chain for 13F11
 <400> 52

Glu Gly Asn
 1
 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > CDR3 of VL chain for 13F11
 <400> 53

Leu Gln Ser Asn Asn Met Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 54

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH chain for 13F11
 <400> 54
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Lys Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Tyr Tyr Gly Ser Thr Pro Ser Ser Tyr Thr Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR1 of VH chain for 13F11
 <400> 55
 Gly Tyr Thr Phe Lys Lys Tyr Gly
 1 5
 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VH chain for 13F11

<400> 56

Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH chain for 13F11

<400> 57

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

1 5 10 15

<210> 58

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain for 28F5

<400> 58

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Leu Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Leu Ser Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VL chain for 28F5

<400> 59

Ser Ser Leu Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 60

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VL chain for 28F5

<400> 60

Ser Thr Ser

1

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VL chain for 28F5

<400> 61

His Gln Tyr His Leu Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 62

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain for 28F5

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Glu Val Ser Tyr Tyr Ala
100 105 110

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

115 120 125

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VH chain for 28F5

<400> 63

Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr Gly

1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VH chain for 28F5

<400> 64

Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro

1 5

<210> 65

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH chain for 28F5

<400> 65

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Glu Val Ser Tyr Tyr Ala

1 5 10 15

Met Asp Tyr

<210> 66

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain for GMB005

<400> 66

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VL chain for GMB005

<400> 67

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5
 <210> 68
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 of VL chain for GMB005
 <400> 68
 Asp Ala Ser
 1
 <210> 69
 <211>
 > 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR3 of VL chain for GMB005
 <400> 69
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 70
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH chain for GMB005
 <400> 70
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VH chain for GMB005

<400> 71

Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe Ala

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VH chain for GMB005

<400> 72

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH chain for GMB005

<400> 73

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

1 5 10 15

<210> 74

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8a;-Signal peptide (SP)

<400> 74

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> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GS linker

<400> 75

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

1 5 10 15

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(16)

<223> FCRIIIa; hinge

<400> 76

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

1 5 10 15

<210> 77

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(45)

<223> CD8a; hinge

<400> 77

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
> 78
<211> 231
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(231)
<223> IgG1 hinge
<400> 78
Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30
Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 79

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(24)

<223> CD8a; TM domain

<400> 79

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> 80

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(42)

<223> 4-1 BB co-stimulatory domain

<400> 80

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> 81

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(112)

<223> CD3 ζ activation domain

<400> 81

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln 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> 82

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25A10-V1 CAR

<400> 82

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 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

20 25 30

Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe

35 40 45

Asn Ile Lys Asp Ser Leu Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Asp Lys Thr Lys

65 70 75 80

Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Ser Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

225 230 235 240

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

245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val Ser
 260 265 270

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

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

 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 420 425 430
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 435 440 445
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

 <210> 83
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 25A10-V2 CAR

<400> 83

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

Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser
85 90 95
Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Thr Leu Thr Ser Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Ser Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
225 230 235 240

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Asp Tyr Pro Tyr
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala
 260 265 270
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 275 280 285
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 290 295 300
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 325 330 335
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 340 345 350
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 355 360 365
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 370 375 380
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 385 390 395 400
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 405 410 415
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 420 425 430
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 435 440 445
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 450 455 460
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 84

<211> 676

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25A10-V3 CAR

<400> 84

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 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

20 25 30
Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe

35 40 45
Asn Ile Lys Asp Ser Leu Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln

50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Asp Lys Thr Lys

65 70 75 80

Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser
85 90 95

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

Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Ser Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

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

145 150 155 160
Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser

165 170 175
Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr

180 185 190
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

195 200 205

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 210 215 220

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Asp Tyr Pro Tyr
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Pro
 260 265 270
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 275 280 285
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

 290 295 300
 Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 305 310 315 320
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 325 330 335
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 340 345 350
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 355 360 365

 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 370 375 380
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 385 390 395 400
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 405 410 415
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 420 425 430
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

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

450 455 460
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 465 470 475 480
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 485 490 495
 Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 500 505 510

 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
 515 520 525
 Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
 530 535 540
 Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
 545 550 555 560
 Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 565 570 575
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg

 580 585 590
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 595 600 605
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 610 615 620
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 625 630 635 640
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 645 650 655

 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 660 665 670
 Leu Pro Pro Arg
 675
 <210> 85
 <211> 459
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 29B4-V1 CAR

<400> 85

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

145 150 155 160

Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg

165 170 175

Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

180 185 190

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

195 200 205

Ala Ser Thr Arg His Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Thr Asp Tyr Ala Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp

225 230 235 240
 Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe

 245 250 255
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile
 260 265 270
 Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 275 280 285
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 290 295 300
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 305 310 315 320

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

 385 390 395 400
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 405 410 415
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 420 425 430
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 435 440 445
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455

<210> 86

<211> 488

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 29B4-V2 CAR

<400> 86

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

145 150 155 160

Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg

165 170 175

Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

180 185 190

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

195 200 205

Ala Ser Thr Arg His Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Thr Asp Tyr Ala Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
225 230 235 240

Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
325 330 335

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
340 345 350

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
355 360 365

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
385 390 395 400

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
405 410 415

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
420 425 430

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
435 440 445

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
450 455 460

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
465 470 475 480

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

<210> 87

<211> 674

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 29B4-V3 CAR

<400> 87

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

145 150 155 160

Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg

165 170 175

Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 195 200 205
 Ala Ser Thr Arg His Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Thr Asp Tyr Ala Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
 225 230 235 240
 Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe
 245 250 255
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys
 260 265 270
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 275 280 285
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg
 290 295 300
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 305 310 315 320
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 340 345 350
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 370 375 380
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430

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

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

 545 550 555 560
 Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 565 570 575
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 580 585 590
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 595 600 605
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 610 615 620

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

<210> 88
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 16B5-V1 CAR
 <400> 88

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

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

210

215

220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu

225

230

235

240

Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys Glu Asp Pro

245

250

255

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val

260

265

270

Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp

275

280

285

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

290

295

300

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

305

310

315

320

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

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

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

450 455 460

<210> 89

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B5-V2 CAR

<400> 89

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 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

20 25 30

Val Arg Ser Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Leu His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100 105 110

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Thr Thr

180 185 190

Phe Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu

195 200 205
 Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu
 225 230 235 240

 Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys Glu Asp Pro
 245 250 255
 Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu

 305 310 315 320
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380

 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445

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

450

455

460

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

465

470

475

480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

490

<210> 90

<211> 677

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16B5-V3 CAR

<400> 90

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 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

20

25

30

Val Arg Ser Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35

40

45

Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Leu His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100

105

110

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser

115

120

125

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

130

135

140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Val

145 150 155 160
 Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala
 165 170 175
 Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Thr Thr
 180 185 190
 Phe Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 195 200 205
 Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu

 225 230 235 240
 Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys Glu Asp Pro
 245 250 255
 Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser
 260 265 270
 Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 275 280 285
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300

 Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

 370 375 380
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400

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

 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 450 455 460
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 Pro Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 500 505 510
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys

 515 520 525
 Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 530 535 540
 Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
 545 550 555 560
 Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 565 570 575
 Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 580 585 590

 Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
 595 600 605
 Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 610 615 620
 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 625 630 635 640
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 645 650 655

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

660 665 670

Ala Leu Pro Pro Arg

675

<210> 91

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10F7-V1 CAR

<400> 91

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 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

20 25 30

Val Arg Ser Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser

85 90 95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100 105 110

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Gln Leu Gly Arg Pro Trp Phe

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Val Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190
Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

195 200 205
Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly

210 215 220
Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala
225 230 235 240

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Trp
245 250 255

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val Ser
260 265 270

Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala
275 280 285

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
290 295 300

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
305 310 315 320

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

325 330 335
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

340 345 350
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln

355 360 365
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

370 375 380
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

385 390 395 400

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

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

420 425 430
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 435 440 445
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460
 <210> 92
 <211> 490
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10F7-V2 CAR
 <400> 92
 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 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 20 25 30
 Val Arg Ser Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln
 50 55 60

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

 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Val Leu
 145 150 155 160
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr

165 170 175
 Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Thr Phe
 180 185 190
 Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 195 200 205

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

 275 280 285
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 290 295 300
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 325 330 335
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 340 345 350

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

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

420 425 430
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
435 440 445
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
465 470 475 480
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210

> 93

<211> 676

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10F7-V3 CAR

<400> 93

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

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

115 120 125
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Val Leu
 145 150 155 160
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr
 165 170 175
 Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Thr Phe
 180 185 190
 Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 195 200 205
 Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala
 225 230 235 240
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Trp
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Pro
 260 265 270
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 275 280 285
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 290 295 300
 Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 305 310 315 320
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 325 330 335
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 340 345 350
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 355 360 365

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

 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 420 425 430
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 435 440 445
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 450 455 460
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 465 470 475 480
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 485 490 495
 Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 500 505 510
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
 515 520 525
 Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
 530 535 540
 Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
 545 550 555 560

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

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Leu Pro Pro Arg

675

<210> 94

<211> 458

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 27B6-V1 CAR

<400> 94

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 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala

100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Pro Leu Val Ser Thr Pro Asp Trp

115 120 125

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Thr Met Thr Cys Ser Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp

180 185 190

Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly

245 250 255

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

260 265 270

Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 405 410 415
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 420 425 430
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp

 435 440 445
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455
 <210> 95
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 27B6-V2 CAR
 <400> 95
 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 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe

 35 40 45
 Ser Leu Thr Ser Tyr Asn Ile Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr
 65 70 75 80
 Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Lys Ile Ser Lys Asp Asp Ser Lys
 85 90 95
 Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala
 100 105 110

 Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Pro Leu Val Ser Thr Pro Asp Trp
 115 120 125
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
 165 170 175
 Val Thr Met Thr Cys Ser Thr Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp

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

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

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

385 390 395 400
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 405 410 415
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 420 425 430
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 435 440 445
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 450 455 460
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His

 465 470 475 480
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485
 <210> 96
 <211> 673
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 27B6-V3 CAR
 <400> 96
 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 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe

 35 40 45
 Ser Leu Thr Ser Tyr Asn Ile Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr
 65 70 75 80
 Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Lys Ile Ser Lys Asp Asp Ser Lys
 85 90 95
 Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala

100	105	110	
Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Pro Leu Val Ser Thr Pro Asp Trp			
115	120	125	
Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly			
130	135	140	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile			
145	150	155	160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys			
165	170	175	
Val Thr Met Thr Cys Ser Thr Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp			
180	185	190	
Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr			
195	200	205	
Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser			
210	215	220	
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala			
225	230	235	240
Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly			
245	250	255	
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr			
260	265	270	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val			
275	280	285	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr			
290	295	300	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
305	310	315	320
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
325	330	335	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Pro Ala Pro 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 Arg Asp Glu Leu 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 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
450 455 460

Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys Ile
485 490 495

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

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
515 520 525

Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
530 535 540

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
545 550 555 560

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

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
580 585 590

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

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

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

<210> 97
<211> 460
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> 13F11-V1 CAR

<400> 97
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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30
Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Thr Phe Lys Lys Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

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

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

130

135

140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

145

150

155

160

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

165

170

175

Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Thr Leu Ser Glu

225

230

235

240

Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asn Asn Met Pro Tyr Thr

245

250

255

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val Ser Thr

260

265

270

Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

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

420 425 430
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 435 440 445
 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

<210> 98
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 13F11-V2 CAR

<400> 98
 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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 20 25 30
 Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Thr Phe Lys Lys Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser

85 90 95
 Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Tyr Tyr Gly Ser Thr Pro Ser Ser

115	120	125	
Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
130	135	140	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu			
145	150	155	160
Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ala Thr Gly Glu			
165	170	175	
Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met			
180	185	190	
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Val Leu Ile Ser			
195	200	205	
Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser			
210	215	220	
Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Thr Leu Ser Glu			
225	230	235	240
Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asn Asn Met Pro Tyr Thr			
245	250	255	
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro			
260	265	270	
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu			
275	280	285	
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg			
290	295	300	
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly			
305	310	315	320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys			
325	330	335	
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg			
340	345	350	
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro			
355	360	365	

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

370

375

380

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

385 390 395 400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

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

450

455

460

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

465 470 475 480

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

<210> 99

<211> 675

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13F11-V3 CAR

<400> 99

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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr

65

70

75

80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Tyr Tyr Gly Ser Thr Pro Ser Ser

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Thr Leu Ser Glu

225 230 235 240

Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asn Asn Met Pro Tyr Thr

245 250 255

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

260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro

275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala

290 295 300

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

305 310 315 320

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

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

 370 375 380
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 385 390 395 400
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 405 410 415
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 420 425 430
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 435 440 445

 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 450 455 460
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 465 470 475 480
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 485 490 495
 Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 500 505 510
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu

 515 520 525
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 530 535 540
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly
 545 550 555 560
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 565 570 575
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

580 585 590

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

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

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

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

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

660 665 670

Pro Pro Arg
675

<210> 100
<211> 464
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 28F5-V1 CAR
<400> 100

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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Thr Lys Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro Thr
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser
85 90 95

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

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

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
355 360 365

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

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

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

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

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
435 440 445

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

<210> 101

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28F5-V2 CAR

<400> 101

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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Thr Phe Thr Lys Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro Thr
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser
85 90 95

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

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Glu
115 120 125

Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
130 135 140

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Gln Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
165 170 175

Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
195 200 205

Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
210 215 220

Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
225 230 235 240

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Leu
245 250 255

Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
275 280 285

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
290 295 300

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
305 310 315 320

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
325 330 335

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

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

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

485 490

<210> 102

<211> 679

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28F5-V3 CAR

<400> 102

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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 20 25 30
 Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45

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

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

 115 120 125
 Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 130 135 140
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Gln Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 165 170 175
 Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Leu Ser
 180 185 190

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

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

305 310 315 320
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 325 330 335

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

 405 410 415
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 420 425 430
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 435 440 445
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 450 455 460
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 465 470 475 480

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

 545 550 555 560

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu 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> 103

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GMB005-V1 CAR

<400> 103

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 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

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

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

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

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Phe Cys Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro
 115 120 125
 Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 165 170 175
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 180 185 190
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 195 200 205
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 225 230 235 240
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val Ser
 260 265 270
 Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala
 275 280 285
 Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
 290 295 300
 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 305 310 315 320
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 325 330 335

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 340 345 350

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 355 360 365

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 370 375 380

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 385 390 395 400

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

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

420 425 430
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 435 440 445

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

<210> 104

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GMB005-V2 CAR

<400> 104

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 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

225 230 235 240

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

245 250 255

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala

260 265 270

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

275 280 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr

290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala

305 310 315 320

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

325 330 335
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 340 345 350
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 355 360 365
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg

370 375 380
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 385 390 395 400
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 405 410 415
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 420 425 430
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 435 440 445

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 450 455 460
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 105
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GMB005-V3 CAR
 <400> 105

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

35 40 45
 Thr Phe Asn Ser Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Phe Cys Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro
 115 120 125
 Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

 145 150 155 160
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 165 170 175
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 180 185 190
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 195 200 205
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 210 215 220

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 225 230 235 240
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Pro
 260 265 270
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540
 Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
 545 550 555 560
 Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 565 570 575
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg

580 585 590
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 595 600 605
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 610 615 620
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 625 630 635 640
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 645 650 655

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

Leu Pro Pro Arg

675
 <210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(18)

<223> Fc ε RI γ - signal peptide (SP)

<400> 106

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
 1 5 10 15

Ala Ala

<210> 107

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(43)

<223> Fc Receptor for IgE, gamma chain, without ITAM) (Fc ϵ RI
 γ - DITAM)

<400> 107

Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu Phe Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser

35 40

<210> 108

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-P2A ribosomal skip peptide (GSG-P2A)

<400> 108

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 109

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-T2A ribosomal skip peptide (GSG-T2A)

<400> 109

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 110

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(25)

<223> Fc εRI α- signal peptide (SP)

<400> 110

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

1 5 10 15

Phe Phe Ala Pro Asp Gly Val Leu Ala

20 25

<210> 111

<211> 52

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(52)

<223> Fc Receptor for IgE, alpha chain, transmembrane and intracellular domain (Fc εRI α-TM-IC)

<400> 111

Phe Phe Ile Pro Leu Leu Val Val Ile Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

1 5 10 15

Leu Phe Ile Ser Thr Gln Gln Gln Val Thr Phe Leu Leu Lys Ile Lys

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Gly Phe Arg Leu Leu Asn Pro His Pro Lys Pro Asn

35 40 45

Pro Lys Asn Asn

50

<210> 112

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(215)

<223> Receptor for IgE, beta chain, without ITAM
(Fc ε R1 γ - Δ ITAM)

<400> 112

Met Asp Thr Glu Ser Asn Arg Arg Ala Asn Leu Ala Leu Pro Gln Glu

1 5 10 15

Pro Ser Ser Val Pro Ala Phe Glu Val Leu Glu Ile Ser Pro Gln Glu

20 25 30

Val Ser Ser Gly Arg Leu Leu Lys Ser Ala Ser Ser Pro Pro Leu His

35 40 45

Thr Trp Leu Thr Val Leu Lys Lys Glu Gln Glu Phe Leu Gly Val Thr

50 55 60

Gln Ile Leu Thr Ala Met Ile Cys Leu Cys Phe Gly Thr Val Val Cys

65 70 75 80

Ser Val Leu Asp Ile Ser His Ile Glu Gly Asp Ile Phe Ser Ser Phe

85 90 95

Lys Ala Gly Tyr Pro Phe Trp Gly Ala Ile Phe Phe Ser Ile Ser Gly

100 105 110

Met Leu Ser Ile Ile Ser Glu Arg Arg Asn Ala Thr Tyr Leu Val Arg

115 120 125

Gly Ser Leu Gly Ala Asn Thr Ala Ser Ser Ile Ala Gly Gly Thr Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile His Ser Cys Gln Lys Phe Phe Glu Thr Lys Cys Phe Met Ala Ser

165 170 175

Phe Ser Thr Glu Ile Val Val Met Met Leu Phe Leu Thr Ile Leu Gly

180 185 190

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

195 200 205

Lys Gly Asn Lys Val Pro Glu

210 215

<210> 113

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(41)

<223> CD28 co-stimulatory domain (CD28-IC)

<400> 113

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD20 mimotope

<400> 114

Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser

1 5 10

<210> 115

<211> 24

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Epitope for palivizumab

<400> 115

Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp

1 5 10 15

Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn

20

<210> 116
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mimotope 1 for cetuximab
 <400> 116
 Cys Gln Phe Asp Leu Ser Thr Arg Arg Leu Lys Cys
 1 5 10
 <210>
 > 117
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mimotope 2 for cetuximab
 <400> 117
 Cys Gln Tyr Asn Leu Ser Ser Arg Ala Leu Lys Cys
 1 5 10
 <210> 118
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mimotope 3 for cetuximab
 <400> 118
 Cys Val Trp Gln Arg Trp Gln Lys Ser Tyr Val Cys
 1 5 10
 <210> 119
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mimotope 4 for cetuximab
 <400> 119
 Cys Met Trp Asp Arg Phe Ser Arg Trp Tyr Lys Cys
 1 5 10

<210> 120
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Epitope A for nivolumab
 <400> 120
 Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp
 1 5 10 15
 Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg

20 25

<210> 121

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope B for nivolumab

<400> 121

Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln
 1 5 10 15

Ile Lys Glu

<210> 122

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope 1 for CD34

<400> 122

Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr
 1 5 10

<210> 123

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope 2 for CD34

<400> 123

Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser

1 5 10

<210> 124

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28F5v2 CAR with 2 CD20 mimotopes

<400> 124

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Glu

115 120 125

Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

130 135 140

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Leu Ser

180 185 190
 Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 195 200 205
 Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 210 215 220
 Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 225 230 235 240

 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Leu
 245 250 255
 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Asp
 260 265 270
 Pro Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu
 275 280 285
 Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys
 290 295 300
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
 325 330 335
 Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
 340 345 350
 Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys
 370 375 380

 Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 385 390 395 400
 Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
 405 410 415
 Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 420 425 430
 Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

435 440 445
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro

450 455 460
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
465 470 475 480
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
485 490 495
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
500 505 510
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
515 520 525

Ala Leu Pro Pro Arg

530

<210> 125

<211> 573

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28F5v2 CAR with 2 CD20 mimotopes and 1 CD34 epitope

<400> 125

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 Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro

20 25 30

Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp

85 90 95

Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly

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

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
355 360 365

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
370 375 380

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
385 390 395 400

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
405 410 415

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
420 425 430

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
435 440 445

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
450 455 460

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
465 470 475 480

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
485 490 495

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
500 505 510

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
515 520 525

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
530 535 540

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
545 550 555 560

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
565 570

<210> 126

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28F5v1 CAR with 2 CD20 mimotopes

<400> 126

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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Glu

115 120 125

Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

130 135 140

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Leu Ser

180 185 190

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

195 200 205

Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg

210 215 220

Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser

225	230							235							240				
Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	His	Leu				
245				250				255											
Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	Asp				
260				265				270											
Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Cys	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu				
275				280				285											
Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Cys	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Cys				
290				295				300											
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe				
305				310				315				320							
Phe	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr				
325				330				335											
Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg				
340				345				350											
Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro				
355				360				365											
Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu				
370				375				380											
Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala				
385				390				395				400							
Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu				
405				410				415											
Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly				
420				425				430											
Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu				
435				440				445											
Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser				
450				455				460											
Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly				
465				470				475				480							

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
485 490 495

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500

<210> 127

<211> 544

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28F5v1 CAR with 2 CD20 mimotopes and 1 CD34 epitope

<400> 127

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 Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro
20 25 30

Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile
35 40 45

Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val
50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp
85 90 95

Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly
100 105 110

Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
115 120 125

Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
130 135 140

Gly Ala Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Glu Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp
145 150 155 160

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
165 170 175

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Ile Leu Thr
 180 185 190
 Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met
 195 200 205
 Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Leu Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr
 210 215 220
 Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 245 250 255
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 260 265 270
 Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Leu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
 275 280 285
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro
 290 295 300
 Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro
 305 310 315 320
 Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys
 325 330 335
 Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Gly Leu
 340 345 350
 Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr
 355 360 365
 Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 370 375 380
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
 385 390 395 400
 Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
 405 410 415
 Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

420 425 430
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 435 440 445
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 450 455 460
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 465 470 475 480
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 485 490 495
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

 500 505 510
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 515 520 525
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 530 535 540
 <210> 128
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 25A10v2 CAR with 2 CD20 mimotopes
 <400> 128
 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 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 20 25 30
 Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Asn Ile Lys Asp Ser Leu Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Asp Lys Thr Lys
 65 70 75 80

Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Ser Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly

275 280 285

Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly

290 295 300

Gly Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro

305 310 315 320

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

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

370 375 380
Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu
385 390 395 400
Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys
405 410 415
Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
420 425 430
Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
435 440 445

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
450 455 460
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
465 470 475 480
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
485 490 495
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
500 505 510
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro

515 520 525

Pro Arg

530

<210> 129

<211> 569

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25A10v2 CAR with 2 CD20 mimotopes and 1 CD34 epitope

<400> 129

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 Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro

20 25 30

Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

35 40 45

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val

50 55 60

Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser Leu Ile

65 70 75 80

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp

85 90 95

Ile Asp Pro Glu Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Asp

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ser Thr Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Ser

130 135 140

Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

145 150 155 160

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

165 170 175

Gly Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr

180 185 190

Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

195 200 205

His Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

210 215 220

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

225 230 235 240

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

245										250										255																			
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys																								
260										265										270																			
Gln	Asn	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu																								
275										280										285																			
Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Cys	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro																								
290										295										300																			
Ser	Leu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	Pro	Thr	Gln	Gly	Thr																								
305										310										315										320									
Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr																								
325										330										335																			
Ala	Cys	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Cys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro																								
340										345										350																			
Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu																								
355										360										365																			
Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg																								
370										375										380																			
Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly																								
385										390										395										400									
Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys																								
405										410										415																			
Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg																								
420										425										430																			
Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro																								
435										440										445																			
Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser																								
450										455										460																			
Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu																								
465										470										475										480									
Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg																								
485										490										495																			

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
500 505 510

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
515 520 525

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
530 535 540

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
545 550 555 560

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
565

<210> 130

<211> 501

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25A10v1 CAR with 2 CD20 mimotopes

<400> 130

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 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30

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

Asn Ile Lys Asp Ser Leu Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Asp Lys Thr Lys
65 70 75 80

Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser
85 90 95

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

Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Ser Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
 145 150 155 160
 Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser
 165 170 175
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr
 180 185 190
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 195 200 205
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Asp Tyr Pro Tyr
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Asp Pro Gly Ser
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Ser Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro
 305 310 315 320
 Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 325 330 335
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys
 340 345 350
 Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 355 360 365
 Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Ala Leu Pro Pro Arg

500

<210> 131

<211> 541

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25A10v1 CAR with 2 CD20 mimotopes and 1 CD34 epitope

<400> 131

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 Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Tyr Ser Asn Pro

20 25 30

Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

35 40 45

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val

50 55 60

Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser Leu Ile

65 70 75 80

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp

85 90 95

Ile Asp Pro Glu Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Asp

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ser Thr Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Ser

130 135 140

Arg Tyr Ile Asn Tyr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

145 150 155 160

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

165 170 175

Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val

180 185 190

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

195 200 205

Leu His Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys

210 215 220

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr

260 265 270

Cys Gln Asn Asp Tyr Asp Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

275 280 285

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

290 295 300

Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly

305 310 315 320
 Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr
 325 330 335
 Thr Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Gly Leu Ala Val Ser
 340 345 350
 Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala

 355 360 365
 Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
 370 375 380
 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 385 390 395 400
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 405 410 415
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 420 425 430

 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 435 440 445
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 450 455 460
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 465 470 475 480
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 485 490 495
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly

 500 505 510
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 515 520 525
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 530 535 540
 <210> 132
 <211> 117
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain of m2C2

<400> 132

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Phe Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

85 90 95
Ala Arg Ser Ile Ser Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 133

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain of m2C2

<400> 133

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Val Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 134

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain of m5G9

<400> 134

Glu Ile His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Ala Met Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Gly Val Tyr Gly Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 135

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain of m5G9

<400> 135

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 136

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5G9-V1 CAR

<400> 136

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 Glu Ile His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu

50 55 60

Ser Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Tyr

65				70				75				80			
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Met	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
85				90				95							
Ser	Ser	Thr	Ala	Phe	Met	His	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
100				105				110							
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	Val	Tyr	Gly	Leu	Ala	Tyr	Trp
115				120				125							
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
130				135				140							
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
145				150				155				160			
Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
165				170				175							
Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
180				185				190							
Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	Tyr	Ala	Ser	Thr	His	Leu	Ala
195				200				205							
Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Gln	Tyr
210				215				220							
Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr
225				230				235				240			
Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
245				250				255							
Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro
260				265				270							
Pro	Gly	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly
275				280				285							
Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg
290				295				300							
Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln
305				310				315				320			
Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu

325 330 335
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 340 345 350

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 355 360 365

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 370 375 380

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 385 390 395 400

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

450

<210> 137

<211> 483

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5G9-V2 CAR

<400> 137

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 Glu Ile His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu

50 55 60

Ser Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Tyr

65				70				75				80			
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Met	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				85				90				95			
Ser	Ser	Thr	Ala	Phe	Met	His	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
				100				105				110			
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	Val	Tyr	Gly	Leu	Ala	Tyr	Trp
				115				120				125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				130				135				140			
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
145				150				155				160			
Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
				165				170				175			
Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
				180				185				190			
Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	Tyr	Ala	Ser	Thr	His	Leu	Ala
				195				200				205			
Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Gln	Tyr
210				215				220							
Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr
225				230				235				240			
Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
				245				250				255			
Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala
				260				265				270			
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg
				275				280				285			
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys
290				295				300							
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu
305				310				315				320			

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

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 385 390 395 400
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 405 410 415
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 420 425 430
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 435 440 445
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu

450 455 460
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 465 470 475 480
 Pro Pro Arg

<210> 138
 <211> 669
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5G9-V3 CAR
 <400> 138

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu
50 55 60

Ser Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Tyr
65 70 75 80

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ala Met Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
85 90 95

Ser Ser Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Gly Val Tyr Gly Leu Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
145 150 155 160

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

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
180 185 190

Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Ala Ser Thr His Leu Ala
195 200 205

Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Gln Tyr
210 215 220

Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
245 250 255

Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
260 265 270

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
275 280 285

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
305 310 315 320

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

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
340 345 350

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

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
370 375 380

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

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

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
465 470 475 480

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala
485 490 495

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
500 505 510

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
515 520 525

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

530 535 540
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 545 550 555 560
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 565 570 575
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 580 585 590
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

595 600 605
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 610 615 620
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 625 630 635 640
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 645 650 655
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 660 665

<210> 139
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2C2-V1 CAR
 <400> 139

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

50 55 60
 Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Asp Gly Asn Thr Tyr

65				70				75				80			
Tyr	Pro	Asp	Thr	Leu	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
				85				90				95			
Asn	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr
100				105				110							
Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
115				120				125							
Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
130				135				140							
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser
145				150				155				160			
Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Cys
165				170				175							
Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asp	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
180				185				190							
Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Val	Ser	Gln	Ser	Ile
195				200				205							
Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe
210				215				220							
Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr
225				230				235				240			
Cys	Gln	Asn	Ala	His	Ser	Phe	Pro	Ser	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
245				250				255							
Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro
260				265				270							
Pro	Gly	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly
275				280				285							
Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg
290				295				300							
Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln
305				310				315				320			
Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu

325 330 335
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala

340 345 350
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu

355 360 365
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp

370 375 380
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu

385 390 395 400
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile

405 410 415

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

420 425 430
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met

435 440 445

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

450

<210> 140

<211> 483

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2C2-V2 CAR

<400> 140

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 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Phe Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys

50 55 60

Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Asp Gly Asn Thr Tyr

65						70						75						80	
Tyr	Pro	Asp	Thr	Leu	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala				
					85								90						
Asn	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr				
					100								105						
Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp				
					115								120						
Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
					130								135						
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser				
145					150								155			160			
Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Cys				
					165								170						
Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asp	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys				
					180								185						
Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Val	Ser	Gln	Ser	Ile				
					195								200						
Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe				
					210								215						
Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr				
225					230								235			240			
Cys	Gln	Asn	Ala	His	Ser	Phe	Pro	Ser	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys				
					245								250						
Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala				
					260								265						
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg				
					275								280						
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys				
290					295								300						
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu				
305					310								315			320			

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 325 330 335
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 340 345 350
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 355 360 365
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

370 375 380
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 385 390 395 400
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 405 410 415
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 420 425 430
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 435 440 445

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 450 455 460
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 465 470 475 480
 Pro Pro Arg

<210> 141
 <211> 669
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2C2-V3 CAR
 <400> 141

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 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

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

Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Phe Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys
50 55 60

Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Asp Gly Asn Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Pro Asp Thr Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95

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

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ile Ser Arg Tyr Phe Asp Val Trp
115 120 125

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
145 150 155 160

Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys
165 170 175

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
180 185 190

Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Val Ser Gln Ser Ile
195 200 205

Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe
210 215 220

Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Gln Asn Ala His Ser Phe Pro Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
245 250 255

Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
260 265 270

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
275 280 285

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
305 310 315 320

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

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
340 345 350

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

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

370 375 380

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

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

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
465 470 475 480

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala
485 490 495

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
500 505 510

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

515 520 525

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

530 535 540
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 545 550 555 560
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 565 570 575
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 580 585 590

 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 595 600 605
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 610 615 620
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 625 630 635 640
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 645 650 655
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

 660 665
 <210> 142
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH chain of m9E2
 <400> 142
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Asn Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
Ala Arg Ser Gly Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala

	115
<210>	143
<211>	112
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	VL chain of m9E2
<400>	143

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

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

<210> 144

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain of m28B9

<400> 144

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp

20 25 30

Tyr Leu His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Gly Pro Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 145

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain of m28B9

<400> 145

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala

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

100 105

<210> 146

 $\langle 211 \rangle$ 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain of m26D8

<400> 146

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Met Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr His Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Phe Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ile Trp Leu Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain of m26D8

<400> 147

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 148

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain of m15D1

<400> 148

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val 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 Glu Gly Tyr Gln Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 149

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain of m15D1

<400> 149

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Ala Leu Gly

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Ser Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Met

85 90 95

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

100 105 110

<210> 150

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain of m23F2

<400> 150

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ser Ser Thr Asn His Asn Glu Lys Phe

50 55 60
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 151

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain of m23F2

<400> 151

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ala Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Phe
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110