

ÖZET**BİR CD-19 BAĞLAMA ALANI İÇEREN KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRÜ (CAR)**

- a) aşağıdaki dizilere sahip tamamlayıcılık belirleme bölgelerine (CDR'ler) sahip bir ağır zincir değişken bölgesi (VH): CDR1 - GYAFSSS (SEQ ID No. 1); CDR2 - YPGDED (SEQ ID No. 2) CDR3 - SLLYGDYLDY (SEQ ID No. 3) ve b) aşağıdaki dizilere sahip CDR'lere sahip bir hafif zincir değişken bölgesi (VL): CDR1 - SASSSVSYMH (SEQ ID No. 4); CDR2 - DTSKLAS (SEQ ID No. 5) CDR3 - QQWNINPLT (SEQ ID No. 6) içeren bir CD19-bağlama alanı içeren bir kimerik antijen reseptörü (CAR) sağlanmaktadır.
- Ayrıca, bu tip bir CAR içeren bir hücre ve bu tip bir hücrenin kanserin, özellikle bir B hücresi malignitesinin tedavisinde kullanımı da sağlanmaktadır.

İSTEMLER

1. Bir CD19-bağlama alanı içeren bir kimerik antijen reseptörü (CAR) olup, özelliği aşağıdakileri içermesidir
 - 5 a) aşağıdaki dizilere sahip tamamlayıcılık belirleme bölgelerine (CDR'ler) sahip bir ağır zincir değişken bölgesi (VH):
 CDR1 - GYAFSSS (SEQ ID No. 1);
 CDR2 - YPGDED (SEQ ID No. 2)
 CDR3 - SLLYGDYLDY (SEQ ID No. 3); ve
 - 10 b) aşağıdaki dizilere sahip CDR'lere sahip bir hafif zincir değişken bölgesi (VL):
 CDR1 - SASSSVSYMH (SEQ ID No. 4);
 CDR2 - DTSKLAS (SEQ ID No. 5)
 CDR3 - QQWNINPLT (SEQ ID No. 6).
- 15 2. İstem 1'e göre bir CAR olup, özelliği CD19 bağlama alanının, SEQ ID No. 7 olarak gösterilen diziye sahip bir VH alanı ve/veya SEQ ID No. 8 olarak gösterilen bir VL alanı veya bunun en az %95 dizi özdeşliğine sahip bir varyantını içermesidir.
- 20 3. İstem 1'e göre bir CAR olup, özelliği CD19-bağlama alanının, VH-VL yönlendirmesinde bir scFv içermesidir; tercihen burada CD19 bağlama alanı SEQ ID No. 9 olarak gösterilen diziyi veya bunun en az %90 dizi özdeşliğine sahip bir varyantını içerir.
- 25 4. Önceki istemlerin herhangi birine göre bir CAR olup, özelliği CD19-bağlama alanı ve transmembran alanının bir aralayıcıyla bağlı olmasıdır; opsiyonel olarak burada aralayıcı aşağıdakilerin birini içerir: bir insan IgG1 Fc alanı; bir IgG1 desteği; veya bir CD8 sapı.
- 30 5. Önceki istemlerin herhangi birine göre bir CAR olup, özelliği ayrıca bir hücre içi T-hücresi sinyalleme alanı içermesidir; opsiyonel olarak burada hücre içi T hücreleri sinyalleme alanı aşağıdaki endo-alanların birini veya daha fazlasını içerir: CD28 endo-alanı; 41BB endo-alanı, OX40 endo-alanı ve CD3-Zeta endo-alanı; tercihen burada hücre içi T-hücresi sinyalleme alanı aşağıdakileri içerir:
 - 35 (i) 41BB endo-alanı ve CD3-Zeta endo-alanı;

(ii) OX40 endo-alanı ve CD3-Zeta endo-alanı; veya

(iii) aşağıdaki endo-alanlarının tamamı: CD28 endo-alanı; OX40 ve CD3-Zeta endo-alanı.

- 5 6. Önceki istemlerin herhangi birine göre bir CAR olup, özelliği SEQ ID No. 10 ile 15 arasındaki herhangi biri olarak gösterilen dizileri veya bunların en az %80 dizi özdeşliğine sahip ancak i) CD19'a bağlanma ve ii) T hücresi sinyallemesini indüklenme kapasitesini koruyan bir varyantını içermesidir.
- 10 7. Önceki istemlerin herhangi birine göre bir CAR olup, özelliği bir T-hücresi tarafından eksprese edildiğinde ve bir CD19 eksprese eden hücrenin hedeflenmesi için kullanıldığında, aşağıdakileri içeren bir CD19-bağlama alanı içeren bir CAR eksprese eden bir T-hücresinin neden olduğundan, CD19-eksprese eden hedef hücre tarafından daha düşük IFN γ salımına neden
- 15 olmasındır
- a) aşağıdaki dizilere sahip tamamlayıcılık belirleme bölgelerine (CDR'ler) sahip bir ağır zincir değişken bölgesi (VH):
- CDR1 - GVSLPDY (SEQ ID No. 16);
- CDR2 - WGSET (SEQ ID No. 17);
- 20 CDR3 - HYYYGGSYAMDY (SEQ ID No. 18); ve
- a) aşağıdaki dizilere sahip tamamlayıcılık belirleme bölgelerine (CDR'ler) sahip bir hafif zincir değişken bölgesi (VL):
- CDR1 - RASQDISKYLN (SEQ ID No. 19);
- CDR2 - HTSRLHS (SEQ ID No. 20)
- 25 CDR3 - QQGNTLPYT (SEQ ID No. 21).
8. Önceki istemlerin herhangi birine göre bir CAR olup, özelliği CDR'lerin, bir insan veya insanlaştırılmış çerçeve üzerine yamanmasıdır.
- 30 9. Önceki istemlerin herhangi birine göre bir CAR kodlayan bir nükleik asit dizisidir.
10. İstem 9'a göre bir nükleik asit dizisi içeren bir vektördür.
11. İstemler 1 ile 8'den herhangi birine göre bir CAR içeren bir hücre olup, özelliği
- 35 tercihen hücrenin bir T hücresi veya bir doğal öldürücü (NK) hücre olmasıdır.

12. İstem 11'e göre birden fazla hücre içeren bir hücre bileşimidir.
- 5 13. (i) İstem 11'e göre bir hücrenin yapılması için, bir hücrenin istem 10'a göre bir vektörle kalıt aktarılması veya transfekte edilmesi adımını içeren veya (ii) istem 12'ye göre bir hücre bileşiminin yapılması için, bir süjeden hücrelerin bir numunesinin istem 10'a göre bir vektörle ex vivo kalıt aktarılması veya transfekte edilmesi adımını içeren bir yöntemdir.
- 10 14. Farmakolojik olarak kabul edilen bir taşıyıcı, seyreltici veya ekspiyan ile birlikte istem 11'e göre bir hücre veya istem 12'ye göre bir hücre bileşimi içeren bir farmasötik bileşimdir.
- 15 15. İstem 11'e göre bir hücre, istem 12'ye göre bir hücre bileşimi veya istem 14'e göre bir farmasötik bileşim olup, özelliği kanserin tedavisinde kullanım için olmasıdır, tercihen burada kanser bir B hücresi malignitesidir.

TARİFNAME

BİR CD-19 BAĞLAMA ALANI İÇEREN KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRÜ (CAR)

BULUŞUN SAHASI

5

Mevcut açıklama, B-lenfosit antijeni CD19'u (Başkalaşım Kümesi 19) bağlayan bir kimerik antijen reseptörüyle (CAR) ilgilidir. Bu tip bir CAR'yi eksprese eden T hücreleri, B-hücresi lösemiler ve lenfomalar gibi kanseröz hastalıkların tedavisinde faydalıdır.

10 BULUŞUN ALT YAPISI

Kimerik Antijen Reseptörleri

15 Geleneksel olarak, antijene-özü T-hücreleri, hedef antijen için natif olarak özü olan periferik kan T-hücrelerinin seçimli genişletilmesiyle üretilmiştir. Ancak, birçok kanser antijeni için özü çok sayıda T-hücrelerinin seçilmesi ve genişletilmesi güçtür ve epey sıklıkla imkansızdır. Vektörlerin entegre edilmesiyle gen-terapisi bize bu sorun için bir çözüm sağlamaktadır: Kimerik Antijen Reseptörünün (CAR) transgenik ekspresyonu, herhangi bir yüzey antijenine özü çok sayıda T-hücresinin, periferik kan T-hücrelerinin 20 büyük bir popülasyonunun *ex vivo* viral vektör kalıt aktarımıyla kolayca üretilmesine olanak sağlar.

Bu moleküllerin en yaygın formları, bir hedef antijeni tanıyan monoklonal antikorlardan türetilen, bir aralayıcı ve bir transmembran alan vasıtasıyla bir sinyalleşici endo-alana 25 kaynaştırılmış tek-zincirli değişken fragmanların (scFv) füzyonlarıdır. Bu tip moleküller, kognat hedefinin scFv'si tarafından tanınmaya yanıt olarak T-hücresinin aktivasyonu ile sonuçlanır. T hücreleri bu tip bir CAR eksprese ettiğinde, bunlar hedef antijeni eksprese eden hedef hücreleri tanır ve öldürür. Tümörle ilişkili antijenlere karşı çeşitli CAR'ler geliştirilmiştir ve bu tip CAR-eksprese eden T hücreleri kullanan adoptif 30 transfer yaklaşımları halihazırda çeşitli kanserlerin tedavisi için klinik denemededir. Ancak bugüne kadar, CAR terapisinin ana klinik araştırması ve potansiyel uygulaması B-hücresi maligniteleri için tedavi olarak.

CD19'a karşı yönlendirilen CAR'ler

35

CD19, B-hücresi farklılaştırılmasına çok erken eksprese edilen ve yalnızca plazma hücrelerinin içine terminal B-hücresi farklılaştırılmasına kaybolan bir B-hücresi antijenidir. Dolayısıyla, CD19, çoklu miyelom dışında tüm B-hücresi maligniteleri üzerinde eksprese edilir. Diğer hematopoietik popülasyonlar veya hematopoietik-olmayan hücreler üzerinde eksprese edilmez ve bu nedenle bu antijenin hedeflenmesi kemik iliğine veya hematopoietik-olmayan organlara toksisiteye yol açmamalıdır. Normal B-hücresi bölmesinin kaybı, lenfoid maligniteleri tedavi edilirken kabul edilebilir bir toksisite olarak kabul edilir, çünkü her ne kadar etkili CD19 CAR T hücre terapisi B hücreleri aplazisi ile sonuçlanacak olsa da, ardıl hipogamaglobulinemi havuzlanmış immünoglobülinle tedavi edilebilir.

CD19 bu nedenle cazip bir CAR hedefidir. Bugüne kadar, CAR alanının ana klinik odağı, Tablo 1’de özetlendiği üzere refrakter B-hücresi kanserlerine CD19’u hedefleyen çalışmalar olmuştur.

CAR’lerin farklı tasarımları, Tablo 1’de özetlendiği üzere CD19’a karşı farklı merkezlerde test edilmiştir.

Tablo 1. CD19 hedefleyen CAR deneyinin özeti

Merkez	Bağlayıcı	Endo-alan	Yorum
University College London	Fmc63	CD3-Zeta	Düşük-seviye kısa persistans
Memorial Sloane Kettering	SJ25C1	CD28-Zeta	Kısa-vadeli persistans
NCI/KITE	Fmc63	CD28-Zeta	Uzun-vadeli düşük-seviye persistans
Baylor, Centre for Cell and Gene Therapy	Fmc63	CD3-Zeta/CD28-Zeta	Kısa-vadeli düşük-seviye persistans
UPENN/Novartis	Fmc63	41BB-Zeta	Uzun-vadeli yüksek-seviye persistans

Çalışmaların çoğu CD19 CAR’leri, fmc63 hibridomundan türetilen bir scFv’ye dayalı olarak test etmiştir. En umut vaat edici olanı, Akut Lenfoblastik Löseminin (ALL) tedavisinde olmuştur.

CD19'a karşı CAR'lerle Klinik Deneyler

CD19 yönlendirilmiş CAR terapisi en çok ALL'de etkili gibi görünmektedir. ALL'deki ilk çalışmalar 2013 Baharında, Memorial Sloane Kettering'den (Brentjens, et al. (2013) Leukemia. Sci. Transl. Med. 5, 177ra38) ve Pennsylvania Üniversitesinden gruplar tarafından yayınlanmıştır. İkinci çalışmanın bir güncelleme raporu yakın dönemde yapılmıştır (Maude et al. (2014) N. Engl. J. Med. 371, 1507-1517). Burada, 25 yaşın altındaki 25 ve bu yaşın üstündeki 5 hasta tedavi edilmiştir. %90'ı bir ayda bir tam yanıt almıştır, 28 değerlendirilebilir vakadan 22'si bir MRD negatif durum elde etmiştir ve 6 ay vakasız sağkalım oranı %67 olmuştur. 15 hasta çalışmadan sonra hiç başka terapi almamıştır.

Brentjens et al., (yukarıdaki gibi) yetişkin grubunda, 5 ALL hastasını (2'si refrakter nüksetmiş, 2'si MRD pozitif hastalığı olan ve MRD negatif olan 1 hasta) SJ25C1 hibridomundan ve bir CD28 eş-uyarıcı alandan türetilen bir scFv içeren bir CD19 CAR eksprese etmek için retroviral olarak kalıt aktarılmış olan otolog T-hücreleriyle tedavi etmiştir. Bunların tamamı, bu hastaların 4'ünün bir alojenik SCT almasını sağlayarak, bir derin moleküler azalma elde etmiştir. Bu durum, yanıtların dayanıklılığının değerlendirilmesini imkansız kılmıştır ancak CAR T hücreleri yalnızca kanda veya kemik iliğinde infüzyondan sonra 3-8 hafta süreyle saptanabilir olmuştur. Nakil yapılmayan hasta 90 günde CD19+ hastalığıyla nüksetmiştir. Müteakiben, Davila et al. ((2014). Sci. Transl. Med. 6, 224ra25) bu kohortu güncellemiştir: 16 yetişkin hastanın 14'ü CAR T hücresi infüzyonu noktasında, kurtarma kemoterapisine ve siklofosamid koşullamaya rağmen saptanabilir hastalığa sahip olmuştur. 16'dan 14'ü, 9 hastadan 7'sinin kurtarma kemoterapisinden sonra saptanabilir kalıt hastalığının morfolojik kanıtı olması dahil olmak üzere sayım iyileşmesi olsun veya olmasın bir tam azalma elde etmiştir. 16 hastadan 12'si MRD negativite elde etmiştir ve bu da 7'sinin, yayın esnasında alojenik nakil geçirmesine olanak sağlamıştır. Yanıtlar, 8 nakil-olmamış hastanın 4'ünün, her ne kadar bu kohort için sağkalım eğrileri henüz stabil olmasa da 24 aya kadar takipte morfolojik azalmaya devam etmesiyle bazı hastalarda dayanıklı olmuştur.

Baskın olarak ALL'si olan pediatrik ve genç yetişkin hastaların bir kohortunda son dönemde yayınlanan bir çalışma, çıktılarının birinci tedaviye-niyetlenme analizini sağlamaktadır. Bu, yapısında CAR T hücrelerinin öngörülen dozunu almayan hastaları

hariç tutmak olan yanılmanın ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilir (Lee et al. (2014) Lancet. doi:10.1016/S0140-6736(14)61403-3). 21 hasta bir CD28 alanı-ihiva eden ikinci nesil CAR ile tedavi edilmiştir. Hemen hemen 2 hasta, bu tedavinin refrakter veya artan-nüksetmiş ALL'si olanlara bu tedavinin aktarılmasının uygulanabilirliğinin altını çizecek şekilde, öngörülen T hücresi dozunu almıştır. Bu çalışma, aşağıdaki etkililiği göstermektedir: ALL'si olanların %67'si bir tam azalma elde eder ve %60'ı MRD negatif durum elde eder.

CD19 CAR terapisinin immün toksisitesi

10

Sitokin salım sendromu (CRS), hipotansiyon ve solunum yetmezliğiyle ılımlıdan çoklu-organ yetmezliğine değişen bir dizi enflamatuvar semptomu kapsamaktadır. CRS'nin bir derecesi yaygın olarak CD19 CAR T hücreleriyle tedavi edilen hastalarda ortaya çıkar. Son kohortlarda tedavi edilen hastaların yaklaşık %30'u (21/73) bir derece CRS göstermiştir (Davilia et al (2014) supra; Lee et al (2014) supra; Kochenderfer (2014) J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.. doi:10.1200/JCO.2014.56.2025). CRS ayrıca, hem CD19'u hem CD3'ü tanıyan bir ikili-özgül rekombinan tek-zincirli antikor olan blinatumomab ile tedavi edilen hastalarda da görülmüştür. CRS tipik olarak CAR T hücresi infüzyonundan 5-21 gün sonra ortaya çıkar.

20

CRS yaşamı tehdit edebilir ve bir yoğun bakım ortamında tedavi gerektirir. CRS yükselmiş serum sitokin seviyeleriyle ilişkilidir. En kayda değer şekilde yükselen sitokinler IL-6, IL-10 ve interferon gammadır (IFN γ). Ağır seyirli CRS'nin klinik belirtileri (ateş, hepatosplenomegali, koagülopati ve hiperferitinemi), örneğin T-hücrelerinde doğuştan kusurları olan hastalarda bulunan makrofaj aktivasyon sendromunu (MAS) andırmaktadır. Bu durum, ortak immünopatolojik süreçlerin yer aldığını ortaya koymaktadır. Halihazırda kilit sitokinlerin, özellikle IL-6'nın üretilmesinden hangi hücrelerin (CAR T hücreleri, ölen tümör hücreleri veya lokal olarak-aktif makrofajlar) sorumlu olduğu net değildir. Ancak, MAS'de bir kilit başlatma faktörü bol interferon-gamma salımıdır (López-Alvarez et al. (2009). Clin. Vaccine Immunol. CVI 16, 142-145).

30

Nörotoksisite

Kurumlar arasındaki CD19 CAR çalışmalarındaki birkaç hasta, afaziden obduntasyona, deliryuma ve nöbetlere kadar değişen bir şiddet spektrumuyla geçici nörotoksisite geliştirmiştir (Davilia et al (2014) supra). Bu durum, ALL'si olan hastalarla sınırlı gibi görünmektedir ve benzer bir sendrom blinatumomab terapisinden sonra belgelenmiştir.

- 5 Beyin görüntüleme normal görünmektedir. Nörotoksisite, kan-beyin bariyerini geçen sistemik sitokinlerin yüksek seviyelerini yansıtabilir.

Persistans, nüksetme ve T-hücresi tükenmesi

- 10 Dayanıklı yanıtlar dolaşımdaki CAR kalıt aktarılmış T hücrelerinin yüksek pik seviyeleriyle ve ayrıca B hücresi aplazisinin süresiyle korele gibi görünmektedir. CD19-hastalığıyla nükseden hastalar hariç, nüksetme genel olarak dolaşımdaki CAR T hücrelerinin kaybıyla ve normal B hücrelerinin geri kazanımıyla ilişkili olmuştur.
- 15 T hücresi tükenmesi, birçok kronik enfeksiyon ve kanser esnasında ortaya çıkan bir T hücresi fonksiyon bozukluğu durumudur. Yetersiz efektör fonksiyonuyla, önleyici reseptörlerin sürekli ekspresyonu ve fonksiyonel efektör veya bellek T hücrelerinden ayrı bir transkripsiyonel durumla tanımlanır. Tükenme, enfeksiyon ve tümörlerin optimal kontrolünü engeller. Son dönemde, tükenmiş T hücrelerinin fonksiyonel ve fenotipik
- 20 profilin daha net bir resmi, bir kilit unsur olarak aktive T hücrelerinin bir negatif regülatörü olan önleyici reseptör programlı ölüm 1'in (PD-1; PDCD1 olarak da bilinmektedir) ekspresyonu ile meydana çıkmıştır (Day et al. (2006) Nature 443, 350-354).
- 25 CD19 CAR çalışmalarındaki yanıtlar, T-hücrelerinin yüksek seviyelerde uzun bir süre boyunca persistansının, dayanıklı yanıtlar sağlamada önemli olduğunu ortaya koymaktadır. T-hücresi tükenmesini indirgeyen bir CD19 CAR, gelişmiş klinik yanıtlarla sonuçlanabilir.
- 30 WO2014184143, monoklonal antikor 4G7'den türetilen bir scFv içeren bir CD19'a özgü CAR tarif etmektedir.

Bu yüzden, CD19'a karşı yönlendirilmiş, yukarıdaki dezavantajlarla ilişkili olmayan alternatif bir CAR'ye ihtiyaç vardır.

ŞEKİLLERİN AÇIKLAMASI

Şekil 1. Açıklamalı ve numaralandırılmış (a) CAT19 VH dizileri; (b) CAT19 VL

- 5 VH ve VL dizileri Chothia numaralandırma kullanılarak numaralandırılır. Çerçeve ve CRD bölgeleri gösterilmektedir. Sokuntular da gösterilmektedir.

Şekil 2. CD19 pozitif hücrelerin rekombinan CAT19 ile boyanması

- 10 SupT1 hücreleri normalde CD19 eksprese etmez ancak bu çalışmada bunu yapmaları için işlenmiştir. CAT19 VH ve VL dizileri, her ikisi de memeli ekspresyon plazmidlerinde olan fare IgG2a ağır zincir formatının ve fare kappa hafif zincir formatının içine klonlanmıştır. 293T hücreleri eşzamanlı olarak hem ağır hem hafif zincirle transfekte edilmiş ve ortaya çıkan antikor A proteiniyle saflaştırılmıştır. SupT1 hücreleri ve
15 SupT1.CD19 hücreleri bu rekombinan antikorlar (veya düz 293T üst fazı ile) boyanmış ve ayrıca bir floresan olarak konjuge anti-fare sekonderiyle boyanmıştır. Rekombinan CAT19 antikorunun bağlanması akış-sitometriyle kolayca saptanabilmektedir.

Şekil 3. CD19 pozitif hücrelerin CAT19 scFv ile boyanması

- 20 CAT19'un VH ve VL'si, sayesinde VH ve VL'nin bir (SGGGGS)₃ bağlayıcı tarafından ayrıldığı bir scFv oluşturacakları şekilde klonlandı. İki scFv hem VH-VL hem VL-VH yönlendirmelerinde CAT scFv ile üretildi. Ek olarak, anti-CD19 antikorları olan fmc63 ve 4g7'den yine her iki yönlendirmede scFv'ler de üretildi. (a) scFv görüntüleme
25 formatı: bu, sayesinde scFv'nin, CD8 transmembran alanına ve CD8 endo-alanının ilk 12 kalıntısına sahip bir insan IgG1 Fc aralayıcısı üzerine klonlandığı bir retroviral vektördür. Bu dolayısıyla FMD-2A peptidi TaV ve trunkat insan CD34 ile çerçevededir. Bu şekilde, scFv bir hücrenin yüzeyinde görüntülenir ve transgen ekspresyonu CD34'ün ayrı olarak saptanmasıyla kontrol edilebilir. 6 farklı scFv formatının herhangi
30 birini eksprese eden SupT1 hücreleri üretildi ve bu hücreler rekombinan insan trunkat CD19 – fare IgG2a Fc füzyonuyla ve anti-CD34 ile boyandı; (b) fmc63 VH-VL ve VL-VH formatıyla boyama; (c) 4g7 VH-VL ve VL-VH formatıyla boyama ve (d) CAT19 VH-VL ve VL-VH formatıyla boyama. Şaşırtıcı şekilde, CAT19 VH-VL scFv iyi bağlanırken, VL-VH scFv kayda değer şekilde daha az saptanabilir bağlanma verdi.

Şekil 4. CAR'lerin farklı nesilleri ve test edilen ilk CAR'ler

- (a) Bir antijen bağlama alanı (en çoğunlukla bir scFv'dir), bir aralayıcı alan, bir transmembran alan ve bir veya birçok sinyalleme alanı içeren tipik bir CAR formatı. (b) Birinci nesil CAR'ler bir aktivasyon sinyali iletir; bunların endo-alanları ya FcGamma reseptörü endo-alanından veya CD3 Zeta endo-alanından türetilir; (c) İkinci nesil reseptörler iki sinyal iletir: bunların endo-alanları CD3-Zeta'nın endo-alanına bağlı bir eş-uyarıcı alan içerir. Eş-uyarıcı alan çoğunlukla ya CD28'in endo-alanıdır, OX40'ın endo-alanıdır veya 41BB'nin endo-alanıdır. (d) Üçüncü nesil reseptörler üç sinyal iletir: bunların endo-alanları CD28 endo-alanının 41BB endo-alanıyla ve CD3-Zeta endo-alanıyla veya CD28 endo-alanının OX40 endo-alanıyla ve CD3-Zeta endo-alanıyla bir füzyonunu içerir. (e) VH-VL yönlendirmesinde bir scFv, bir CD8 sap aralayıcı ve 41BB-Zeta'dan oluşan 2. nesil endo-alan içeren CAT19 tabanlı CAR ilk olarak test edildi (Campana CAR formatı).

15

Şekil 5. CAT19 CAR fonksiyonunun fmc36 CAR'sine karşı in vitro karşılaştırılması

- 5 farklı donörden primer insan T-hücreleri Campana formatında CAT19 CAR veya Campana CAR'sinin kendisi için kodlama yapan lentiviral vektörlerle kalıt aktarıldı. Bu T-hücreleri daha sonra çeşitli tayinlerde kullanıldı. (a) SupT1 hücrelerine karşı krom açığa çıkarma tayini gerçekleştirildi. Bu hücreler CD19 negatiftir. CAR T-hücrelerinin bu hücre çizgisine (noktalı çizgiler) karşı yanıt vermedi. Krom açığa çıkarma tayini, SupT1.CD9 hücrelerine karşı gerçekleştirildi. Her iki CAR de bu hücre çizgisine (düz çizgiler) karşı eşit olarak performans gösterdi. Daha sonra, ya NT T-hücreleri, fmc63 CAR T-hücreleri ya CAT19 CAR T-hücreleri kullanılarak ya SupT1 veya SupT1.CD19'a karşı bir degranülasyon tayini gerçekleştirildi. (b) CD4+ T-hücreleri ve (c) CD8+ T-hücreleri üzerinde geçirilen veriler gösterilmektedir. Degranülasyon CAR19 CAR T-hücreleriyle arttırıldı. (d) Proliferasyon, tritiye timidilat birleştirme kullanılarak kestirildi. NT, fmc63 CAR T-hücreleri, CAT19 CAR T-hücreleri SupT1.CD19'a karşı test edildi. Bu deneyde, GD2 hedefleyen bir ilgisiz CAR de test edildi. CAR19 CAR T-hücreleriyle artan proliferasyona bir eğilim vardı. (e) SupT1 veya SupT1.CD19 hücrelerine karşı zorlamadan 24 saat sonra ya NT T-hücrelerinden, fmc63 CAR T-hücrelerinden, CAT19 CAR T-hücrelerinden veya GD2 CAR T-hücrelerinden interferon-gamma salımı, CAT19

CAR T-hücreleri CD19+ hedefleriyle zorlandığında fmc63 CAR T-hücrelerinden kayda değer şekilde daha IF-G üretti.

Şekil 6. CAT29 etkililiğinin in vivo modeli.

5

(a) İn vivo model için deney düzeneğinin özeti. NSG farelerine kuyruk damarı enjeksiyonu vasıtasıyla 2.5×10^5 Raji.FLuc hücreleri enjekte edildi. 24 saat sonra, ya NT primer insan T-hücrelerinin, ya fmc63 CAR ile kalıt aktarılmış T-hücrelerinin veya CAT19 CAR ile kalıt aktarılmış T-hücrelerinin 4×10^6 'sı kuyruk-damarı vasıtasıyla verildi. Tümör yanıtı sıralı olarak biyoluminesan görüntüleme ile ölçüldü. Kuyruk-damarı kanı 4. günde yamanma ve serum sitokini açısından örneklendi. Hayvanlar 11. günde seçilip öldürüldü ve dokular CAR T-hücrelerinin persistansı ve tümör yükü açısından çalışıldı. (b) 10. günde farklı fare kohortlarının Bioluminesan görüntülemesi. Yaygın hastalık NT T-hücreleriyle tedavi edilen farelerin pelvisinde, omurgasında, kaburgalarında, kafatasında ve dalağında görülürken, ya CAT19 CAR T-hücrelerini veya fmc63 CAR T-hücrelerini almış olan farelerde minimal sinyal belirgindir. (c) Zaman içinde farklı fare kohortlarından ortalaması alınan kantitatif bioluminesan sinyal. Y-ekseni bir log-ölçeğidir. NT T-hücreleri almış olan farelerdeki ve CAR T-hücreleri almış olan farelerdeki sinyal birikiminde bariz bir farklılık görülmektedir. fmc63 CAR T-hücreleri veya CAT19 CAR T-hücreleri almış olan farelerde sinyal birikiminde hiç farklılık görülmemektedir. (d) Akış-sitometri deneyin sonunda farelerden alınan kemik-iliğinde tümör yükü belirlendi. Neredeyse hiç Raji hücresi, ya fmc63 veya CAT19 CAR T-hücreleri almış olan farelerin iliğinde saptanamadı.

Şekil 7. İn vivo persistans CAR T-hücrelerinin karakterizasyonu

(a) Yukarıda özetlenen modelde fmc63 CAR T-hücreleriyle veya CAT19 CAR T-hücreleriyle tedavi edilen hayvanlardan farelerin dalaklarındaki CAR T-hücrelerinin mutlak sayıları. Bu, aynı sayıların her ikisinde de olduğunu göstermektedir; (b) fmc63 CAR T-hücreleriyle veya CAT19 CAR T-hücreleriyle tedavi edilen farelerin kemik-iliğindeki CAR T-hücrelerinin mutlak sayıları. Bu, aynı sayıların her ikisinde de olduğunu göstermektedir; ya fmc63 CAR T-hücreleriyle veya CAT19 CAR T-hücreleriyle tedavi edilen farelerin (c) dalağında ve (d) kemik-iliğinde CAR T-hücreleri eksprese eden PD1-'in mutlak sayıları. CAT19 T-hücrelerinin daha azı her iki bölmede PD1+'dır.

BULUŞUN YÖNLERİNİN KISA AÇIKLAMASI

5 Mevcut buluşun sahipleri, önceden tarif edilmemiş olan CDR'lerle yeni bir CD19-özgü CAR geliştirmiştir. UPENN çalışmalarında kullanılan fmc63-tabanlı CAR'ye eşdeğer kuvvete sahiptir, ancak indirgenmiş toksisiteyle ve indirgenmiş T-hücresi tükenmesiyle sonuçlanır.

10 Böylelikle, mevcut buluşun bir birinci yönü, a) aşağıdaki dizilere sahip tamamlayıcılık belirleme bölgelerine (CDR'ler) sahip bir ağır zincir değişken bölgesi (VH):

CDR1 - GYAFSSS (SEQ ID No. 1);

CDR2 - YPGDED (SEQ ID No. 2)

CDR3 - SLLYGDYLDY (SEQ ID No. 3) ve

b) aşağıdaki dizilere sahip CDR'lere sahip bir hafif zincir değişken bölgesi (VL):

15 CDR1 - SASSSVSYMH (SEQ ID No. 4);

CDR2 - DTSKLAS (SEQ ID No. 5)

CDR3 - QQWNINPLT (SEQ ID No. 6)

20 içeren bir CD19-bağlama alanı içeren bir kimerik antijen reseptörü (CAR) sağlamaktadır.

CD19 bağlama alanı, SEQ ID No. 7 olarak gösterilen diziye sahip bir VH alanı ve/veya SEQ ID No. 8 olarak gösterilen bir VL alanı veya bunun en az %95 dizi özdeşliğine sahip bir varyantını içerebilir.

25 CD19-bağlama alanı VH-VL yönlendirmesinde bir scFv içerebilir.

CD19 bağlama alanı SEQ ID No. 9 olarak gösterilen diziyi veya bunun en az %90 dizi özdeşliğine sahip bir varyantını içerebilir.

30 CD19-bağlama alanı bir insan antikör çerçevesi üzerine yamanmış, istem 1'de tanımlanan 6 CDR içerebilir.

CD19-bağlama alanı ve transmembran alanı, aşağıdakilerden birini içerebilen bir aralayıcıyla bağlı olabilir: bir insan IgG1 Fc alanı; bir IgG1 desteği veya bir CD8 sapı.

35 Aralayıcı bir CD8 sapı içerebilir.

CAR bir hücre için T-hücresi sinyalleme alanı içerebilir veya bununla ilişkili olabilir.

Hücre içi T-hücresi sinyalleme alanı aşağıdaki endo-alanların birini veya daha fazlasını içerebilir: CD28 endo-alanı; 41BB endo-alanı, OX40 endo-alanı ve CD3-Zeta endo-alanı.

Özellikle CAR bir CD8 sapı aralayıcısı ve 41BB endo-alanını ve CD3-Zeta endo-alanını içeren bir hücre içi T-hücresi sinyalleme alanı içerebilir.

10

Özellikle CAR bir CD8 sapı aralayıcısı ve OX40 endo-alanını ve CD3-Zeta endo-alanını içeren bir hücre içi T-hücresi sinyalleme alanı içerebilir.

Alternatif bir uygulamada, hücre içi T-hücresi sinyalleme alanı aşağıdaki endo-alanların tamamını içerebilir: CD28 endo-alanı; OX40 ve CD3-Zeta endo-alanı.

15

CAR, SEQ ID No. 10 ila 15 arasındaki herhangi biri olarak gösterilen dizileri veya bunların en az %80 dizi özdeşliğine sahip ancak i) CD19'a bağlanma ve ii) T hücreleri sinyallemesini indüklemeye kapasitesini koruyan bir varyantını içerebilir. CAR, UPENN çalışmalarında kullanılan fmc63-tabanlı CAR'ye kıyasla avantajlı özelliklere sahip olabilir. Örneğin, CAR, bir T-hücresi tarafından eksprese edildiğinde ve bir CD19 eksprese eden hücrenin hedeflenmesi için kullanıldığında, aşağıdakileri içeren bir CD19-bağlama alanı içeren bir CAR eksprese eden bir T-hücresinin neden olduğundan, CD19-eksprese eden hedef hücre tarafından daha düşük IFN γ salımına neden olabilir: a) aşağıdaki dizilere sahip tamamlayıcılık belirleme bölgelerine (CDR'ler) sahip bir ağır zincir değişken bölgesi (VH): CDR1 - GVSLPDY (SEQ ID No. 16); CDR2 - WGSET (SEQ ID No. 17); CDR3 - HYYYGGSYAMDY (SEQ ID No. 18) ve a) aşağıdaki dizilere sahip tamamlayıcılık belirleme bölgelerine (CDR'ler) sahip bir hafif zincir değişken bölgesi (VL): CDR1 - RASQDISKYLN (SEQ ID No. 19); CDR2 - HTSRLHS (SEQ ID No. 20) CDR3 - QQGNTLPYT (SEQ ID No. 21). CDR'ler bir insan veya insanlaştırılmış çerçeve üzerine yamanabilir.

20

25

30

Bir ikinci yönde, mevcut buluş, buluşun birinci yönüne göre bir CAR kodlayan bir nükleik asit dizisi sağlamaktadır.

35

Bir üçüncü yönde, buluşun ikinci yönüne göre bir nükleik asit dizisi içeren bir vektör sağlanmaktadır.

Üçüncü yönde, buluşun birinci yönüne göre bir CAR içeren bir hücre sağlanır.

5

Hücre bir T hücresi veya bir doğal öldürücü (NK) hücre gibi bir sitolitik immün hücre olabilir.

10 Bir dördüncü yönde, buluşun üçüncü yönüne göre birden fazla hücre içeren bir hücre bileşimi sağlanmaktadır.

Bir beşinci yönde, buluşun üçüncü yönüne göre bir hücrenin yapılması için, bir hücrenin buluşun üçüncü yönüne göre bir vektörle kalıt aktarılması veya transfekte edilmesi adımı içeren bir yöntem sağlanmaktadır.

15

Bir altıncı yönde, buluşun dördüncü yönüne göre hücre bileşiminin yapılması için, bir süjeden hücrelerin bir numunesinin buluşun üçüncü yönüne göre bir vektörle *ex vivo* kalıt aktarılması veya transfekte edilmesi adımı içeren bir yöntem sağlanmaktadır.

20

Hücrelerin numunesi, örneğin, bir periferik kan tek çekirdekli hücre (PBMC) numunesi gibi bir kan numunesi veya bunun bir türevi olabilir.

25 Bir yedinci yönde, farmakolojik olarak kabul edilen bir taşıyıcı, seyreltici veya eksipiyan ile birlikte buluşun bir birinci yönüne göre bir hücre veya buluşun dördüncü yönüne göre bir hücre bileşimi içeren bir farmasötik bileşim sağlanmaktadır.

30 Bir sekizinci yönde, kanserin tedavi edilmesi için, buluşun birinci yönünde göre bir hücrenin, buluşun dördüncü yönüne göre bir hücre bileşiminin veya buluşun yedinci yönüne göre farmasötik bir bileşimin bir süjeye verilmesi adımı içeren bir yöntem sağlanmaktadır.

35 Yöntem, süjeden hücrelerin, buluşun üçüncü yönüne göre bir vektörle *ex vivo* kalıt aktarılması veya transfekte edilmesi, daha sonra transfekte edilen hücrelerin veya bir miktarının süjeye geri verilmesi adımı içerebilir.

Ayrıca, kanserin tedavi edilmesinde kullanım için buluşun yedinci yönüne göre farmasötik bir bileşim de sağlanmaktadır.

- 5 Ayrıca, buluşun üçüncü yönüne göre bir hücrenin, kanserin tedavi edilmesi için farmasötik bir bileşimin üretiminde kullanılması da sağlanmaktadır.

Kanser, örneğin, bir B hücresi malignitesi olabilir.

10 BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRLERİ (CAR'LER)

- 15 Kimerik T hücresi reseptörleri, yapay T hücresi reseptörleri ve kimerik immünoresseptörler olarak da bilinen kimerik antijen reseptörleri (CAR'ler), bir immün efektör hücrenin üzerine isteğe bağlı bir özgüllük yamayan işlenmiş reseptörlerdir. Klasik bir CAR'de, bir monoklonal antikorun özgüllüğü bir T hücresi üzerine yamanır. CAR-kodlayan nükleik asitler, örneğin, retroviral vektörler kullanılarak T hücrelerine transfer edilebilir. Bu şekilde, büyük bir sayıda kansere-özgü T hücreleri, adoptif hücre 20 transferi için üretilebilir. Bu yaklaşımın Evre I klinik çalışmaları etkililik göstermektedir.

- Bir CAR'nin hedef-antijen bağlama alanı yaygın olarak bir aralayıcı ve transmembran alan vasıtasıyla bir endo-alana kaynaştırılır. Endo-alan bir hücre içi T-hücresi sinyalleme alanı içerebilir veya bununla ilişkili olabilir. CAR hedef-antijeni bağladığında, 25 bu durum bir aktive edici sinyalin üzerinde eksprese edildiği T-hücrelerine iletilmesiyle sonuçlanır.

Mevcut buluşun CAR'si, bir fare anti-CD19 monoklonal antikoruna dayalı olan, aşağıdakileri içeren bir CD19 bağlama alanı içerir

- 30 a) aşağıdaki dizilere sahip tamamlayıcılık belirleme bölgelerine (CDR'ler) sahip bir ağır zincir değişken bölgesi (VH):

CDR1 - GYAFSSS (SEQ ID No. 1);

CDR2 - YPGDED (SEQ ID No. 2)

CDR3 - SLLYGDYLDY (SEQ ID No. 3); ve

- 35 b) aşağıdaki dizilere sahip CDR'lere sahip bir hafif zincir değişken bölgesi (VL):

Endo-alan, CAR'nin sinyal-iletim kısmıdır. Antijen tanınmasından sonra, reseptörler kümelenir ve hücreye bir sinyal iletilir. En yaygın olarak kullanılan endo-alan bileşeni, 3 ITAM ihtiva eden CD3-Zetanıktır. Bu, antijen bağlandıktan sonra T hücresine bir aktivasyon sinyali iletir. CD3-Zeta tamamen yetkin bir aktivasyon sinyali sağlamayabilir ve ilave eş-uyarıcı sinyalleme gerekebilir. Örneğin, CD28 veya OX40 veya 41BB'den 5 endo-alanlar, bir proliferatif/sağkalım sinyali iletmek için CD3-Zeta ile kullanılabilir veya üçünün hepsi birlikte kullanılabilir.

İlk CAR tasarımları, ya FcεR1'nin veya CD3ζ'in γ zincirinin hücre içi parçalarından türetilen endo-alanlara sahipti. Sonuç olarak, bu birinci nesil reseptörler, kognat hedef hücrelerin T-hücresi öldürülmesini tetiklemek için yeterli olan ancak T-hücresini çoğaltması ve sağkalması için tamamen aktive etmeyi başaramamış olan immünolojik sinyal 1'i iletti. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için, bileşik endo-alanlar inşa edildi. Bir T-hücresi eş-uyarıcı molekülünün CD3ζ'ninkine füzyonu, antijen tanınmasından sonra bir aktive edici ve eş-uyarıcı sinyali eşzamanlı olarak iletebilmiş olan ikinci nesil reseptörlerle sonuçlandı. En yaygın şekilde kullanılan eş-uyarıcı CD28'inkiydi. Bu, T-hücresi proliferasyonunu tetikleyen en kuvvetli eş-uyarıcı sinyali, yani immünolojik sinyal 2'yi tedarik eder. Sağkalım sinyallerini ileten OX40 ve 41BB gibi TNF reseptörü familyası endo-alanlarını içeren bazı reseptörler de tarif edilmiştir. Son olarak, aktivasyon, proliferasyon ve sağkalım sinyalleri iletebilen endo-alanlara sahip olan daha da kuvvetli üçüncü nesil CAR'ler tarif edilmiştir. CAR'ler ve bunların farklı nesilleri Şekil 4'te özetlenmektedir.

25 Mevcut buluşun CAR'sinin endo-alanı, CD3-Zeta endo-alanının, 41BB endo-alanının, OX40 endo-alanının veya CD28 endo-alanının birinin veya daha fazlasının kombinasyonlarını içerebilir.

Mevcut buluşun CAR'sinin hücre içi T-hücresi sinyalleme alanı (endo-alan), SEQ ID No. 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 veya 30 olarak gösterilen diziyi veya bunun en az %80 dizi özdeşliğine sahip bir varyantını içerebilir.

SEQ ID No. 23 (CD3 Zeta endo-alanı)

FRANKLIN D. BROWN, JR., DIRECTOR, OFFICE OF RESEARCH AND DEVELOPMENT, AIR FORCE
 RESEARCH AND DEVELOPMENT, RANDOLPH AIR FORCE BASE, TEXAS

35 SEQ ID No. 24 (41BB endo-alanı)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

SEQ ID No. 25 (OX40 endo-alanı)

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

5

SEQ ID No. 26 (CD28 endo-alanı)

KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY

10 Bu tip endo-alanların kombinasyonlarının örneklerine 41BB-Z, OX40-Z, CD28-Z ve CD28-OX40-Zeta dahildir.

SEQ ID No. 27 (41BB-Z endo-alan füzyonu)

Endo alan füzyonu: 41BB-Z endo alanı (41BB-Z) ile CD28 endo alanı (CD28) füzyonu. Bu füzyon, 41BB-Z endo alanının N-terminusuna CD28 endo alanının C-terminusunu ekler. Füzyonun amino asit dizisi: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI.

15 SEQ ID No. 28 (OX40-Z endo-alan füzyonu)

Endo alan füzyonu: OX40-Z endo alanı (OX40-Z) ile CD28 endo alanı (CD28) füzyonu. Bu füzyon, OX40-Z endo alanının N-terminusuna CD28 endo alanının C-terminusunu ekler. Füzyonun amino asit dizisi: RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY.

SEQ ID No. 29 (CD28Z endo-alan füzyonu)

Endo alan füzyonu: CD28Z endo alanı (CD28Z) ile OX40 endo alanı (OX40) füzyonu. Bu füzyon, CD28Z endo alanının N-terminusuna OX40 endo alanının C-terminusunu ekler. Füzyonun amino asit dizisi: KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI.

20

SEQ ID No. 30 (CD28OXZ)

Endo alan füzyonu: CD28OXZ endo alanı (CD28OXZ) ile OX40 endo alanı (OX40) füzyonu. Bu füzyon, CD28OXZ endo alanının N-terminusuna OX40 endo alanının C-terminusunu ekler. Füzyonun amino asit dizisi: KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI.

25 Bir varyant dizisi, dizinin etkili bir transmembran alanı/hücre içi T hücresi sinyalleme alanı sağlaması şartıyla, SEQ ID No. 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 veya 30'a en az %80, %85, %90, %95, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip olabilir.

SİNYAL PEPTİDİ

Mevcut buluşun CAR'si, CAR bir T-hücresi gibi bir hücre içinde eksprese edildiğinde, yeni oluşan proteinin endoplazmik retikulum ve müteakiben, eksprese edildiği hücre yüzeyine yönlendirildiği şekilde bir sinyal peptidi içerebilir.

- 5 Sinyal peptidinin nüvesi, bir tekli alfa-sarmal oluşturma eğilimine sahip hidrofob amino asitlerin uzun bir germesini ihtiva edebilir. Sinyal peptidi, amino asitlerin, translokasyon esnasında polipeptidin uygun topolojisini takviye etmeye yardımcı olan bir kısa pozitif yüklü germesiyle başlayabilir. Sinyal peptidinin sonunda, tipik olarak sinyal peptidazı tarafından tanınan ve yarılan amino asitlerin bir germesi bulunmaktadır. Sinyal
- 10 peptidazı, bir serbest sinyal peptidi ve bir olgun protein üretmek için ya translokasyon esnasında veya translokasyonun tamamlanmasından sonra yarabilir. Serbest sinyal peptitleri daha sonra spesifik proteazlar tarafından sindirilir.

Sinyal peptidi, molekülün amino ucunda olabilir.

15

Buluşun CAR'si aşağıdaki genel formüle sahip olabilir:

Sinyal peptidi – CD19-bağlama alanı – aralayıcı alanı – transmembran alanı/hücre içi T hücresi sinyalleme alanı.

- 20 Sinyal peptidi SEQ ID No. 31'i veya sinyal peptidinin halen CAR'nin hücre yüzeyi ekspresyonuna neden olmak için işlev görmesi şartıyla bunun, 5, 4, 3, 2 veya 1 amino asit mutasyonuna (sokuntular, ikameler veya silintiler) sahip bir varyantını içerebilir.

SEQ ID No. 31: METDTLLLVLVLLLVVPGSTG

25

SEQ ID No. 31'in sinyal peptidi kompakttır ve oldukça etkilidir. Sinyal peptidazı tarafından etkili yok etme sağlayarak, terminal glisinden sonra yaklaşık %95 yarıma sağladığı öngörülmektedir.

30 **ARALAYICI**

Mevcut buluşun CAR'si, CD19-bağlanma alanını transmembran alanıyla bağlamak ve CD19-bağlama alanını endo-alandan uzamsal olarak ayırmak için bir aralayıcı dizisi içerebilir. Esnek bir aralayıcı, CD19-bağlama alanının CD19 bağlanmasını temin etmek

35 için farklı yönlerde yönlendirilmesine olanak sağlar.

- Aralayıcı dizisi, örneğin, bir IgG1 Fc bölgesi, bir IgG1 desteği veya bir CD8 sapı veya bunların bir kombinasyonunu içerebilir. Aralayıcı alternatif olarak, IgG1 Fc bölgesi, bir IgG1 desteği veya bir CD8 sapı ile benzer uzunluğa ve/veya alan aralama özelliklerine sahip alternatif bir dizi içerebilir.

Bir insan IgG1 aralayıcı, Fc bağlayıcı motifleri yok etmek için değiştirilebilir.

Bu aralayıcılar için amino asit dizilerinin örnekleri aşağıda verilmektedir:

10

SEQ ID No. 32 (insan IgG1'inin destek-CH2CH3'ü)

AEFKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIASTPEFVTCQVWVDVSHEDPEF
VKFNWYVDGVEVFNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKD

SEQ ID No. 33 (insan CD8 sapı):

15

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

SEQ ID No. 34 (insan IgG1 desteği):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

20

SEQ ID No. 35 (IgG1 Destek-Fc)

AEFKSPDKTHTCPPCPAPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEFVTCQVWVDVSHEDPEF
EVKFNWYVDGVEVFNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKDPK

SEQ ID No. 36 (Fc reseptörü tanıma motiflerinin yok edilmesi için modifiye edilmiş IgG1 Desteği - Fc)

AEFKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIASTPEFVTCQVWVDVSHEDPEF
EVKFNWYVDGVEVFNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKDPK

25

Modifiye kalıntıların altı çizilidir; * bir silintiyi simgelemektedir.

İNTERFERON SALIMI VE CAR T-HÜCRESİ TÜKENMESİ

5

Mevcut buluşun sahipleri, CAT19 scFv'ye dayalı bir CD19 CAR'sinin, daha düşük toksisite ve daha iyi etkililikle sonuçlanabilen özelliklere sahip olduğunu bulmuştur.

10

CD19 CAR terapisiyle ana deneyin fmc63 scFv'sine dayalı CAR'lerle yapıldığı ve en eski, en büyük ve belki de en kayda değer klinik veri grubunun fmc63 tabanlı Campana CAR olduğu göz önüne alındığında, mevcut buluşun sahipleri bu Campana CAR'sini "altın-standart" olarak almıştır. Dolayısıyla fmc63-Campana CAR ile benzer ancak fmc63 yerine CAT19 scFv'ye sahip bir CAR arasında bir karşılaştırma yapılmıştır. Şaşırtıcı şekilde, mevcut buluşun sahipleri, CAT19 CAR T-hücreleri CD19 eksprese eden hedef hücrenin öldürülmesini sağlarken ve CD19 eksprese eden hedeflere yanıt olarak çoğalmışken, interferon-gamma salımının daha az olduğunu bulmuştur. Ayrıca, agresif bir B-hücresi lenfomanın bir küçük hayvan modeli, fmc63 ve CAT19 tabanlı CAR'ler arasında eşit etkililik ve eşit yamanma göstermiştir, ancak şaşırtıcı şekilde, fmc63 CAR T-hücrelerinden daha az CAT19 CAR T-hücreleri tüketilmiştir.

20

Buluşun CAR'si, CAR T hücrelerinin hedef hücrelerle temas ettirilmesini içeren bir karşılaştırmalı tayinde %25, 50, 70 veya 90 daha düşük IFN γ salımına neden olabilir.

25

Buluşun CAR'si, CAR T hücrelerinin fmc63 CAR T hücrelerinden daha küçük bir parçasının tükenmiş hale gelmesiyle sonuçlanabilir. T hücresi tükenmesi, PD-1 ekspresyonunun analizi gibi teknikte bilinen yöntemler kullanılarak tayin edilebilir. Mevcut buluşun CAR'si, CAR T hücrelerinin hedef hücrelerle temas ettirilmesini içeren bir karşılaştırmalı tayinde fmc63 CAR T hücrelerinden %20, 30, 40, 50, 60 veya 70 daha CAR T hücrelerinin PD-1 eksprese etmesine neden olabilir.

30

NÜKLEİK ASİT DİZİSİ

Buluşun ikinci yönü, buluşun birinci yönünün bir CAR'si için kodlama yapan bir nükleik asit dizisiyle ilgilidir.

35

Nükleik asit dizisi SEQ ID No. 10-15'in herhangi biri olarak gösterilen amino asit dizisine sahip bir CAR kodlama becerisine sahip olabilir.

VEKTÖR

5

Mevcut buluş ayrıca, mevcut buluşa göre bir nükleik asit dizisi içeren bir vektör de sağlamaktadır. Bu tip bir vektör, mevcut buluşun birinci yönüne göre bir molekül eksprese etmesi ve üretmesi için nükleik asit dizisinin bir konak hücrenin içine eklenmesi için kullanılabilir.

10

Vektör, örneğin, bir plazmid veya bir retroviral vektör veya bir lentiviral vektör gibi bir viral vektör olabilir.

15

Vektör, bir T hücresi gibi bir hücreyi transfekte etme veya kalıt aktarma becerisine sahip olabilir.

HÜCRE

20

Buluş ayrıca, buluşa göre bir nükleik asit içeren bir hücre de sağlamaktadır. Buluş, hücre yüzeyinde buluşun birinci yönüne göre bir CAR eksprese eden bir hücre sağlamaktadır.

25

Hücre, bir T-hücresi veya doğal öldürücü (NK) hücre gibi bir sitolitik immün hücresi olabilir.

Buluşa göre bir CAR eksprese edebilen bir hücre, bir hücrenin CAR-kodlayan nükleik asitle kalıt aktarılmasıyla veya transfekte edilmesiyle yapılabilir.

30

Buluşun CAR-eksprese eden hücresi *ex vivo* üretilir. Hücre, hastadan veya bir donörden bir periferik kan tek çekirdekli hücre (PBMC) gibi bir hücre numunesinden olabilir. Hücreler, CAR-kodlayan nükleik asitle kalıt aktarılma öncesinde, örneğin bir anti-CD3 monoklonal antikoruyla muamele edilerek aktive edilebilir ve/veya genişletilebilir.

35

FARMASÖTİK BİLEŞİM

- Mevcut buluş ayrıca, farmakolojik olarak kabul edilen bir taşıyıcı, seyreltici veya eksipiyanla birlikte buluşun bir CAR-eksprese eden hücrelerini veya birden fazla hücrelerini ve opsiyonel olarak bir veya daha fazla diğer farmakolojik olarak kabul edilen aktif polipeptit ve/veya bileşik ihtiva eden bir farmasötik bileşimle de ilgilidir. Bu tip bir formülasyon, örneğin, intravenöz infüzyon için uygun bir formda olabilir.

TEDAVİ YÖNTEMİ

- Mevcut buluşun CAR-eksprese eden hücreleri, B-hücreleri lenfoma hücreleri gibi kanser hücrelerini öldürebilir. T-hücreleri veya NK hücreleri gibi CAR-eksprese eden hücreler ya *ex vivo* olarak ya bir hastanın kendi periferik kanından (1. parti) veya donör periferik kanından bir hematopoietik kök hücre nakli düzeninde (2. parti) veya bağlantısız bir donörden periferik kandan (3. parti) yaratılabilir. Alternatif olarak, CAR-eksprese eden hücreler, indüklenabilir progenitör hücrelerin veya embriyonik progenitör hücrelerin T-hücreleri gibi hücrelere *ex vivo* farklılaştırılmasından türetilebilir. Bu örneklerde, CAR hücreleri CAR için, bir viral vektörle kalıt aktarım, DNA veya RNA ile transfeksiyon dahil olmak üzere birçok aracın biri tarafından DNA veya RNA kodlamasının eklenmesiyle üretilir.
- Mevcut buluşun bir CAR molekülünü eksprese eden T veya NK hücreleri, bir kanseröz hastalığın, özellikle CD19 ekspresyonu ile ilişkili bir kanseröz hastalığın tedavisi için kullanılabilir.
- Hastalığın tedavi edilmesi için bir yöntem, buluşun bir hücrelerinin veya hücrelerin popülasyonunun terapötik kullanımıyla ilgilidir. Bu açıdan, hücreler, hastalıkla ilişkili en az bir semptomun azaltılması, indirgenmesi veya iyileştirilmesi ve/veya hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılması, indirgenmesi veya bloke edilmesi amacıyla mevcut bir hastalık veya durumu olan bir süjeye verilebilir. Buluşun yöntemi, B hücreleri gibi CD19-eksprese eden hücrelerin hücre aracılı öldürülmesine neden olabilir veya bunu teşvik edebilir.
- Buluş şimdi, teknikte uzman bir kişiye buluşu gerçekleştirmesinde yardımcı olma görevi amacıyla olan ve buluşun kapsamını herhangi bir şekilde sınırlama amacıyla olmayan Örnekler yoluyla ayrıntılı olarak tarif edilecektir.

ÖRNEKLER

Örnek 1 – VH ve VL'nin klonlanması ve CD19 bağlamanın ispatı

5

VH ve VL bir fare anti-CD19 monoklonal antikoru klonlandı ve çerçeve içinde insan kappa sabit bölgesiyle ve insan IgG1 sabit bölgesiyle kaynaştırıldı. Bu kimerik ağır ve hafif zincirler bir ekspresyon vektörünün içine klonlandı ve 293T hücrelerinin transfekte edilmesi için kullanıldı. Müteakiben üretilen antikor SupT1 hücrelerinin (CD19 negatif olan bir T-hücre çizgisi) ve CD19 pozitif olmaları için işlenmiş olan SupT1 hücrelerinin boyanması için kullanıldı. Bu boyama, CD19'un özgül bağlanmasını göstermektedir (Şekil 2).

10

Örnek 2 – VH/VL'nin CD19'u bağlayan bir scFv oluşturabildiğinin ispatı

15

Daha sonra, klonlanan VH ve VL'nin CD19'u bir scFv formatında bağlayabilip bağlayamadığı araştırıldı. VH ve VL bir scFv olarak iki yönlendirmede klonlandı: her iki değişken bölgenin (SGGGG)⁴'ten oluşan bir bağlayıcıyla ayrıldığı VH-VL ve VL-VH. Bu scFv'ler, Şekil 3a'da gösterildiği üzere trunkat CD34 ile eş-eksprese edilen bir sinyalleme-yapmayan CAR içine klonlandı. Kısaca, bu bir sinyal peptidinden, scFv'den, insan IgG1'inin destek-CH2-CH3'ünden, CD8 transmembran alanından, CD8 endo-

alanının ilk 12 kalıntısından, bir FMD-2A peptidi olan TeV'den, trunkat insan CD34'ünden oluşur. Karşılaştırma sağlamak için, fmc63'ten scFv ve başka bir anti-CD19 hibridomu 4g7'den scFv, yanı formatta hem VH-VL ve VL-VH yönlendirmelerinde

klonlandı.

20

25

Bu şekilde, çeşitli parametreler çalışılabilir: (1) murin Fc'sine kaynaştırılmış rekombinan kognat hedef antijeninin kullanımıyla hedef antijenin CAR'ye bağlanması, sinyalleme nedeniyle reseptörün içselleştirilmesiyle engelsizleştirilmiş; (2) Reseptörün stabilitesi poliklonal anti-Fc kullanılarak belirlenebilir; (3) kasetin ekspresyon seviyeleri CD34 için eş-boyamayla kontrol edilebilir.

30

Bu yapılar, SupT1 hücrelerinin içine kalıt aktarıldı. Rekombinan CD19-fare IgG2aFc füzyonu oluşturuldu. SupT1 hücreleri, farklı floroforlara konjuge antikolarla fare-Fc, insan-Fc ve anti-CD34 için boyandı, stabilite/bağlanma akış-sitometriyle sorgulandı.

35

CAR'lerin aksinedir. HL CAT CAR'nin bağlanması ve stabilitesi, fmc63'ünkine eşit gibi görünmektedir.

Örnek 3 – CAT19 CAR fonksiyonunun fmc36 CAR'ye karşı in vitro karşılaştırılması

HL yönlendirmesindeki CAT scFv, Campana (Imai et al (2004) Leuk. Off. J. Leuk. Soc, Am. Leuk, Res. Fund. UK 18:676-684) tarafından tasarlanan bir CAR iskelesinin içine klonlandı. Etkili şekilde, fmc63 scFv bir CAT scFv ile değiştirildi ve özgün fmc36 tabanlı CAR ile karşılaştırıldı. Bu CAR bir sinyal peptidi, scFv, bir CD8 sap aralayıcı ve transmembran ve 41BB ve Zeta endo-alanları içerir. CAT CAR ve fmc63 CAR'nin amino asit dizileri aşağıda verilmektedir:

>CAT19_CAR (SEQ ID No. 10)

```
MGTSILCWMAICLLGADHADAQVQLQQSGPFLVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMM
NWWKQRFPGKGLEWIGRIYFGDED^NYSGKFKDKA^LTAOKSS^TAYMQLSSLTSED
SAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGT^LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGQIVLTQSPAM
SASPGRKVMITCSASSSVSYMHWYQQ^KSG^TSPKRWYDTSKIASGVPRDFSGSGS
GTSY^FLTNMCAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAP
^IASQPLSLRPEACRPAAGGAVH^TRGLDFACDIYWAPLAGTQGVLLLSLVITLYCKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQ^TQLELDGCSGRFPEL^LLGGCLLRVKISRSADAPAYQQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGG^KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGVKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL^HMQA_PPR
```

>Fmc63_CAR, Imai et al (2004) supra tarafından tarif edildiği üzere (SEQ ID No. 42)

```
MFTDTLLIWWILLWVPGS^GDIQMTQT^SSLSASLIGDRVTISCRASQDISKYINWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL
PYTFGGG^TKLETKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV^KLQESGPGLVAPSSLS
VTQTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGWVWGSETTY^NSALKSRLTIKDNS^KS
QVFLKMNSLQ^TDDTAIYYCAKHYY^YGGSYAMDYWGQGT^SVTVSSDPTTTPAPRPP
TPAP^IASQPLSLRPEACRPAAGGAVH^TRGLDFACDIYWAPLAGTQGVLLLSLVITLY
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ^TQFFDGGCSGRFPE^FFFGGCFIRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGG^KPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGVKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL^HMQA_PPR
```

5 farklı donörden primer insan T-hücreleri Campana formatında CAT19 CAR veya fmc63 Campana CAR'sinin kendisi için kodlama yapan lentiviral vektörlerle kalıt aktarıldı. Bu T-hücreleri daha sonra çeşitli tاینرlerde kullanıldı. SupT1 hücrelerine karşı

krom açığa çıkarma tayini gerçekleştirildi. Bu hücreler CD19 negatiftir. CAR T-hücrelerinin ikisi de, CAR19 CAR'nin CD19 negatif hücrelere karşı hiç özgül-olmayan öldürme aktivitesine sahip olmadığını ortaya koyarak bu hücre çizgisine karşı yanıt vermedi [Şekil 5(a)]. (b) Krom açığa çıkarma tayini ayrıca, CD19 eksprese etmek için işlenen SupT1 hücrelerine karşı da gerçekleştirildi. Her iki CAR de bu tayinde bu hücre çizgisine karşı yüksek-seviyelerde öldürmeyle eşit olarak performans gösterdi [Şekil 5(b)]. Daha sonra, hedef kültürlerle eş-kültürden sonra efektör hücrelerin yüzeyi üzerinde CD107 için boyamayla bir degranülasyon tayini gerçekleştirildi. Burada ya NT T-hücreleri, fmc63 CAR T-hücreleri ya CAT19 CAR T-hücreleri efektörler olarak kullanıldı ve ya SupT1 ya SupT1.CD19 hücreleri hedefler olarak kullanıldı. Yüzey CD107, CD4+ ve CD8+ hücrelerinin degranülasyonunun diferansiyel ölçümüne olanak sağlamış olan akış-sitometri ile saptandı. [Sırasıyla Şekil 5(c) ve (d)]. Degranülasyon, fmc63 CAR T-hücrelerine kıyasla CAT19 CAR T-hücreleriyle arttı. Proliferasyon, tritiye timidilat birleştirme kullanılarak kestirildi. Burada, NT, fmc63 CAR T-hücreleri, CAT19 CAR T-hücreleri, CD19 eksprese etmesi için işlenmiş olan SupT1 hücreleriyle eş-kültürlendi. Bu deneyde timidilin birleştirilmesiyle, GD2 hedefleyen bir ilgisiz CAR de test edildi. CAR19 CAR T-hücreleriyle artan proliferasyona bir eğilim vardı [Şekil 4(e)]. Daha sonra, SupT1 veya SupT1.CD19 hücrelerine karşı zorlamadan 24 saat sonra ya NT T-hücrelerinden, fmc63 CAR T-hücrelerinden, CAT19 CAR T-hücrelerinden veya GD2 CAR T-hücrelerinden interferon-gamma salımı ELISA ile ölçüldü. CAT19 CAR T-hücreleri CD19+ hedefleriyle zorlandığında fmc63 CAR T-hücrelerinden kayda değer şekilde daha az interferon-gamma üretti.

Örnek 4 – CAT19 CAR terapisinin in vivo etkililiği

Bu in-vivo model için deney düzeneğinin bir özeti şekil 6(a)'da mevcuttur. Kısaca NSG (NOD scid gamma, NOD. *Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*) fareler, insan hücre çizgilerinin ve primer insan T-hücrelerinin yamanması için izin verici olmaları açısından bağışıklıkları yeterince bozulmuştur. Raji hücreleri, Burkitt lenfomasından türetilen bir B-hücre çizgisidir. Bu hücreler, agresif bir lösemi-benzeri sendroma neden olarak NSG farelerinin kemik iliği içerisinde kolayca yamanır. Raji hücreleri, biyoluminesan görüntüleme (BLI) kullanılarak invazif-olmayan izlemeye olanak sağlamak için ateş böceği Lusiferazı eksprese etmek için işlendi. Farelere kuyruk damarı enjeksiyonu vasıtasıyla 2.5×10^5 Raji.FLuc hücreleri enjekte edildi. 24 saat sonra, ya NT primer insan T-hücrelerinin, ya fms63 CAR ile kalıt aktarılmış T-hücrelerinin veya CAT19 CAR

ile kalıt aktarılmış T-hücrelerinin 4×10^6 'sı kuyruk-damarı enjeksiyonu vasıtasıyla verildi. Tümör yanıtı sıralı olarak BLI ile ölçüldü. Kuyruk-damarı kanı 4. günde yamanma ve serum sitokini açısından örneklendi. Hayvanlar 11. günde seçilip öldürüldü ve dokular CAR T-hücrelerinin persistansı ve tümör yükü açısından çalışıldı.

5 10. günde farklı fare kohortlarının BLI görüntülemesi şekil 6(b)'de gösterilmektedir. Yaygın hastalık NT T-hücreleriyle tedavi edilen farelerin pelvisinde, omurgasında, kaburgalarında, kafatasında ve dalağında görülürken, ya CAT19 CAR T-hücrelerini veya fmc63 CAR T-hücrelerini almış olan farelerde minimal sinyal belirgindir. Zaman

10 içinde farklı fare kohortlarından ortalaması alınan kantitatif biyoluminesan sinyal, şekil 6(c)'de bir log-ölçeği üzerinde gösterilmektedir. NT T-hücreleri almış olan farelerdeki ve CAR T-hücreleri almış olan farelerdeki sinyal birikiminde bariz bir farklılık

15 görülmektedir. fmc63 CAR T-hücreleri veya CAT19 CAR T-hücreleri almış olan farelerde sinyal birikiminde hiç farklılık görülmemektedir. Son olarak, öldürüldükten sonra, her bir fareden kemik-iliğinin akış-sitometrik analizi, tümör yükünü doğrudan

belirlemek için gerçekleştirildi. Raji hücreleri, insan B-hücreleri markörleri eksprese ettiklerinden fare hematopoietik hücrelerden ve adoptif olarak aktarılan T-hücrelerinden

kolayca ayırt edilebilir. Minimal Raji hücreleri, ya fmc63 veya CAT19 CAR T-hücreleri almış olan farelerin iliğinde saptanabildi.

20 **Örnek 5 – *In vivo* ısrarlı CAR T-hücrelerinin karakterizasyonu**

Yukarıdaki hayvan modellerinden, mevcut buluşun sahipleri, CAR T-hücrelerinin her iki tipinin, bu NSG farelerinin kemik-iliği ve dalağı içinde yamanıp yamanmadığını belirlemeye çalıştı. Sayım boncuklarıyla kemik-iliğinin ve dalağın akış-sitometri analizi,

25 CAR T-hücrelerinin mutlak sayısının belirlenmesine olanak sağladı. Bu veri şekiller 7(a) ve (b)'de gösterilmektedir. fmc63 CAR T-hücreleriyle veya CAT19 CAR T-hücreleriyle tedavi edilen hayvanlardan farelerin dalaklarındaki CAR T-hücrelerinin mutlak sayıları benzerdi. Daha sonra, mevcut buluşun sahipleri, bu farklı dokulardaki tükenmiş T-hücrelerinin sayılarında herhangi bir farklılık olup olmadığını belirmeye girişti.

30 Yukarıdaki numunelerde PD1 ekspresyonu için eş-boyamayla, tükenmiş T-hücrelerinin sayıları belirlenebildi. Bu veri şekiller 7(c) ve (d)'de gösterilmektedir. Şaşırtıcı bir şekilde, CAT19 CAR içeren her iki doku bölmesinde, fmc63 CAR'den daha az tükenmiş T-hücreleri mevcuttu.

35 **DİZİ LİSTESİ**

<110> UCL Business PLC
 <120> Kimerik Antijen reseptörü
 <130> P105665PCT
 5 <150> GB 1503742.7
 <151> 2015-03-05
 <160> 43
 <170> PatentIn versiyonu 3.5
 <210> 1
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> ağır zincir değişken bölgesi (VH) tamamlayıcılık belirleme bölgesi (CDR) CDR1
 15 <400> 1
 Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 1 5
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> VH CDR, CDR2
 <400> 2
 Tyr Pro Gly Asp Glu Asp
 1 5
 25 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 30 <223> VH CDR, CDR3
 <400> 3
 Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> hafif zincir değişken bölgesi (VL) CDR, CDR1
 5 <400> 4
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> VL CDR, CDR2
 <400> 5
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 15 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 20 <223> VL CDR, CDR3
 <400> 6
 Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 119
 25 <212> PRT
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Mürin monoklonal antikordan VH dizisi

<400> 7

Gln Val Gln 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 Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> Mürin monoklonal antikordan VL dizisi

<400> 8

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 Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Glu Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 9

<211> 241

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Mürin monoklonal antikordan VH-VL scFv dizisi

<400> 9

Gln Val Gln 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 Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile
195 200 205

Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
210 215 220

Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 10

<211> 488

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> "Campana" mimarını kullanan CAT19 kimerik antijen reseptörü (CAR)

<400> 10

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45

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

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gln Asp Thr Asn
 65 70 75 80

Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 85 90 95

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

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
 145 150 155 160

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
 165 170 175

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190

Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
 195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 210 215 220

Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 245 250 255

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro 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> 11
 <211> 483
 <212> PRT
 5 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Bir OX40-Zeta endodomeni olan CAT19 CAR
 <400> 11
 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

 Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln 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

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

 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
 65 70 75 80

 Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 85 90 95

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

 Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp
 115 120 125

 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
 145 150 155 160

 Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
 165 170 175

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190
 Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
 195 200 205
 Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 210 215 220
 Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 245 250 255
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro 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 Arg Arg
 325 330 335
 Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser
 340 345 350
 Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu
 355 360 365
 Ala Lys Ile 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> 12

<211> 487

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Bir CD28-Zeta endodomeni olan CAT19 CAR

<400> 12

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln 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
 Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
 65 70 75 80
 Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 85 90 95
 Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 100 105 110
 Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
165 170 175

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
210 215 220

Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Gln Leu Lys Arg Ser Asp Pro 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 Arg Ser
325 330 335

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
340 345 350

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
355 360 365

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser 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 Gln 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> 13

<211> 527

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Üçüncü nesil CD19 CAR

<400> 13

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln 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
 Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
 65 70 75 80
 Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 85 90 95
 Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 100 105 110

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

355 360 365
 Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu
 370 375 380
 Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro
 385 390 395 400
 Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg
 405 410 415
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 420 425 430
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 435 440 445
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Gln Met Gly Gly Lys Pro
 450 455 460
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 465 470 475 480
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 485 490 495
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 500 505 510
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 515 520 525
 <210> 14
 <211> 465
 <212> PRT
 5 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> IgG1 menteşe aralayıcısı ola CAT19 CAR
 <400> 14
 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln 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

Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
 65 70 75 80
 Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 85 90 95
 Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 100 105 110
 Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
 165 170 175
 Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190
 Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
 195 200 205
 Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 210 215 220
 Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Gln Asp Ala Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 245 250 255
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
 260 265 270
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val
 275 280 285
 Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr

290 295 300
 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
 305 310 315 320
 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
 325 330 335
 Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
 340 345 350
 Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 355 360 365
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 370 375 380
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 385 390 395 400
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 405 410 415
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 420 425 430
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 435 440 445
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 450 455 460

Arg
465

<210> 15

<211> 681

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> FcR bağlanma bölgeleri mutasyonla çıkarılmış olan insan IgG1'nin menteşe-CH2-CH3'ü olan CAT19 CAR

<400> 15

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 275 280 285
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala
 290 295 300
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 305 310 315 320
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 325 330 335
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 340 345 350
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 355 360 365
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 370 375 380
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 385 390 395 400
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 405 410 415
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 420 425 430
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 435 440 445
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 450 455 460
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 465 470 475 480
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 485 490 495
 Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
 500 505 510
 Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 515 520 525

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> VH CDR, CDR1

<400> 16

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
1 5

10 <210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> VH CDR, CDR2

<400> 17
 Trp Gly Ser Glu Thr
 1 5
 <210> 18
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> VH CDR, CDR3
 <400> 18
 10 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Yapay Dizi
 15 <220>
 <223> VL CDR, CDR1
 <400> 19
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 20
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> VL CDR, CDR2
 25 <400> 20
 His Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> VL CDR, CDR3

<400> 21

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 22

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> transmembran domeni

<400> 22

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

10 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 23

<211> 114

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

15 <220>

<223> CD3 zeta endodomeni

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

Pro Arg

<210> 24

<211> 42

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> 41BB endodomeni

<400> 24

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> 25

10 <211> 37

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> OX40 endodomeni

15 <400> 25

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
35

<210> 26

<211> 37

<212> PRT

20 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> CD28 endodomeni

<400> 26

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
1 5 10 15

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
20 25 30

Asp Phe Ala Ala Tyr
35

<210> 27

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 41BB-Z endodomen füzyonu

<400> 27

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 Arg Val Lys Phe Ser Arg
35 40 45

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
50 55 60

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
65 70 75 80

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
85 90 95

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
100 105 110

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
115 120 125

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
130 135 140

10 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
145 150

<210> 28

<211> 149

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> OX40-Z endodomen füzyonu

5 <400> 28

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
35 40 45

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
50 55 60

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
65 70 75 80

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
85 90 95

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
100 105 110

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
115 120 125

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
130 135 140

Ala Leu Pro Pro Arg
145

<210> 29

10 <211> 151

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CD28Z endodomen füzyonu

<400> 29

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 20 25 30

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 35 40 45

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 85 90 95

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

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 115 120 125

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 130 135 140

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 145 150

5 <210> 30

<211> 187

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> CD28OXZ

<400> 30

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 1 5 10 15
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 20 25 30
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala
 35 40 45
 His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu
 50 55 60
 Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser
 65 70 75 80
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 85 90 95
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 100 105 110
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Gln Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 115 120 125
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 130 135 140
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 145 150 155 160
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 165 170 175
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 180 185

5 <210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> sinyal peptidi

<400> 31

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly
 20

<210> 32

<211> 234

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> aralayıcı (insan IgG'nin menteşe-CH₂CH₃'ü)

<400> 32

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

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

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

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

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

65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
 225 230

<210> 33

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> aralayıcı (insan CD8 gövdesi)

<400> 33

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 Ile
 35 40 45

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> aralayıcı (insan IgG1 menteşesi)

<400> 34

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

Lys Asp Pro Lys
20

<210> 35

10 <211> 237

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> aralayıcı (IgG1 Menteşe-Fc)

15 <400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

130 135 140
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 195 200 205
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 210 215 220
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
 225 230 235

<210> 36

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> aralayıcı (Fc reseptörü tanıma motiflerini uzaklaştırmak üzere modifiye edilen IgG1 Menteşe - Fc)

10 <400> 36

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

```

      100              105              110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
      115              120              125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
      130              135              140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
      145              150              155              160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
      165              170              175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
      180              185              190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
      195              200              205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
      210              215              220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
      225              230              235

```

<210> 37

<211> 244

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> tek zincirli değişken parça (scFv), scFv_fm63_VH-VL

<400> 37

```

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

```

10

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser
130 135 140

Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala
145 150 155 160

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp
165 170 175

Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
180 185 190

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu
195 200 205

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
210 215 220

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
225 230 235 240

Ile Thr Lys Ala

<210> 38

<211> 244

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> scFv, scFv_fmc63_VL-VH

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

10

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

Thr Val Ser Ser

<210> 39

<211> 249

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> scFv, scFv_4g7_VH-VL

<400> 39

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala
 130 135 140
 Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg
 145 150 155 160
 Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp
 165 170 175
 Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
 180 185 190
 Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 195 200 205
 Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
 210 215 220
 Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 245

5 <210> 40

<211> 250

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> scFv, scFv_4g7_VL-VH

5 <400> 40

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe 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 Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly
 130 135 140

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 145 150 155 160

Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 165 170 175

Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
 180 185 190

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 41

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> scFv, scFv_CAT_VL-VH

<400> 41

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 Ala 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 Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
115 120 125

Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser
130 135 140

10 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val

145 150 155 160
 Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro
 165 170 175
 Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr
 180 185 190
 Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser
 195 200 205
 Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu
 210 215 220
 Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240

Ser Ser

<210> 42

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Fmc63_CAR

<400> 42

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

10

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

355 360 365
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 370 375 380
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 385 390 395 400
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 405 410 415
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 420 425 430
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 435 440 445
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 450 455 460
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 465 470 475 480
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Bağlayıcı

<400> 43

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser

(a)

Kuyruk protein dizisi																						
Chothia numaralandırma																						
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20			
CHOTHIA BÖLGELERİ																						
HER1																						
S	C	K	A	S	G	Y	A	F	S	S	S	W	M	N	W	V	K	Q	R	P	G	K
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
HER2																						
HER3																						
G	L	E	W	I	G	R	I	Y	P	G	D	E	D	T	N	Y	S	G	K	F	K	D
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
HER3																						
HER4																						
K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	T	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
HER4																						
D	S	A	V	Y	F	C	A	R	S	L	L	Y	G	D	Y	L	D	Y	W	G	Q	G
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H100B	H101	H102	H103	H104	H105	H106
HER4																						
HER4																						
T	T	L	T	V	S	S	Sokuntu															
H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113	Öngörülen N-bağlı Glikosilasyon Alanı															
Olağandışı kalıntı (dizilerin <%1'i)																						

ŞEKİL 1

(b)

Kuyruk protein dizisi	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T
Chothia numaralandırma	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20
CHOTHIA BÖLGELERİ																				
												LER1								

M	T	C	S	A	S	S	S	V	S	Y	M	H	W	Y	Q	Q	K	S	G	T	S	P
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43	L44
CDR1												LER2										

K	R	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S
L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66	L67
CDR2												FR3										

G	T	S	Y	F	L	T	I	N	N	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q
L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89	L90
CDR3																						

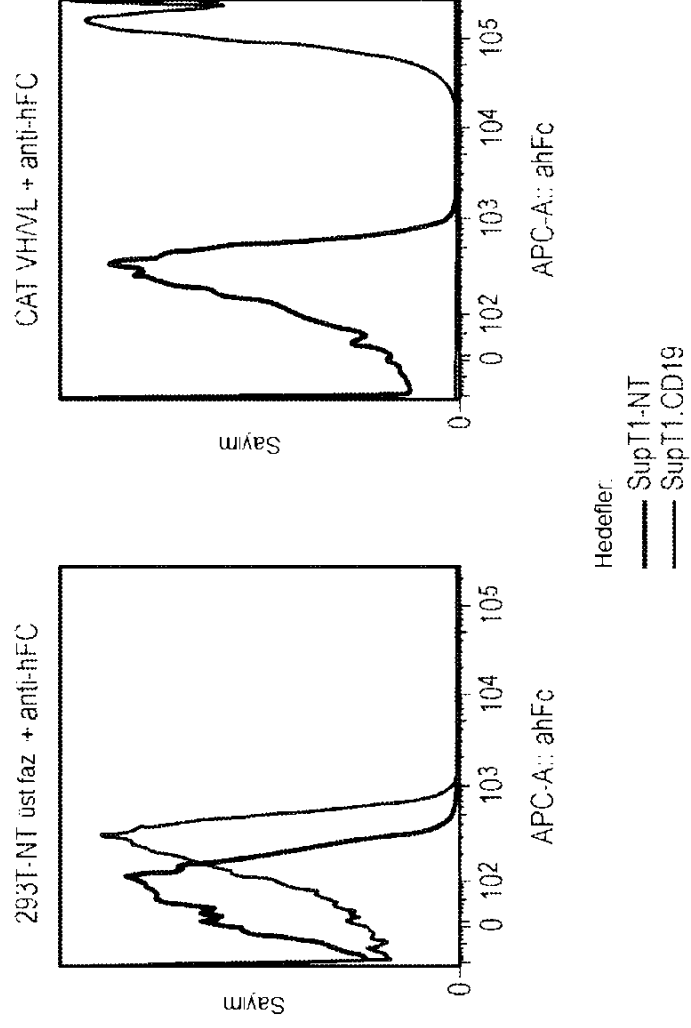
↑

W	N	I	N	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	R
L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107	L108
FR4																	

↑ Olağandışı kalıntı (dizilerin < %1'i)

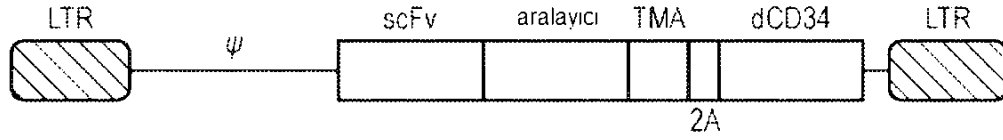
↑

ŞEKİL 1 (Devamı)



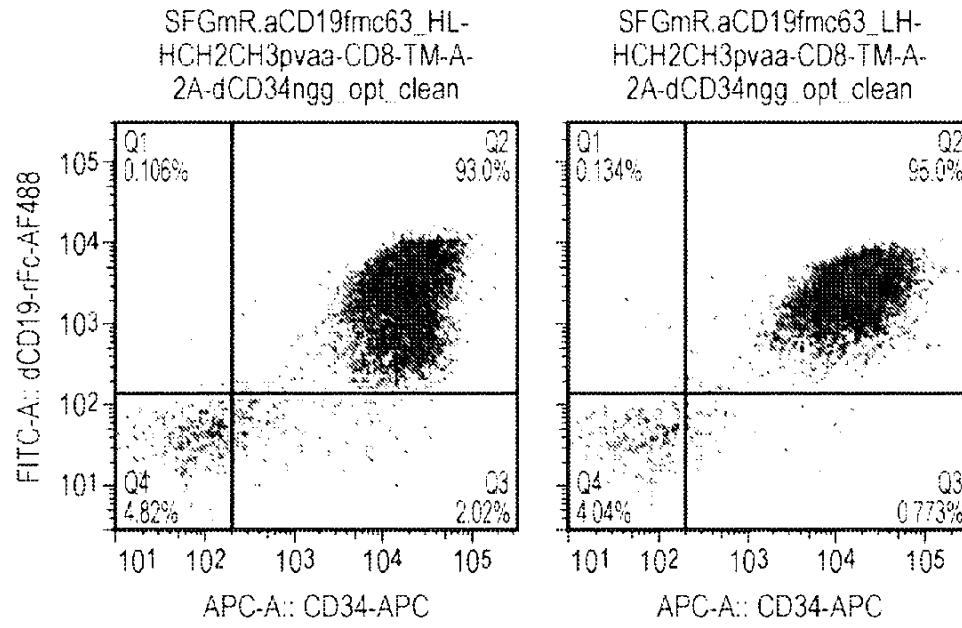
ŞEKİL 2

(a)



(b)

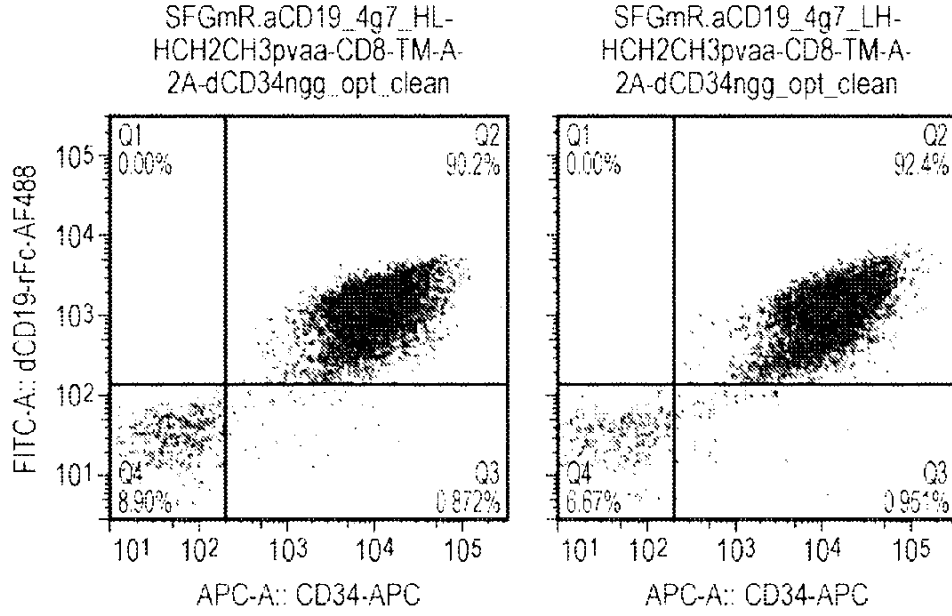
SupT1 - aCD19-fmc63



ŞEKİL 3

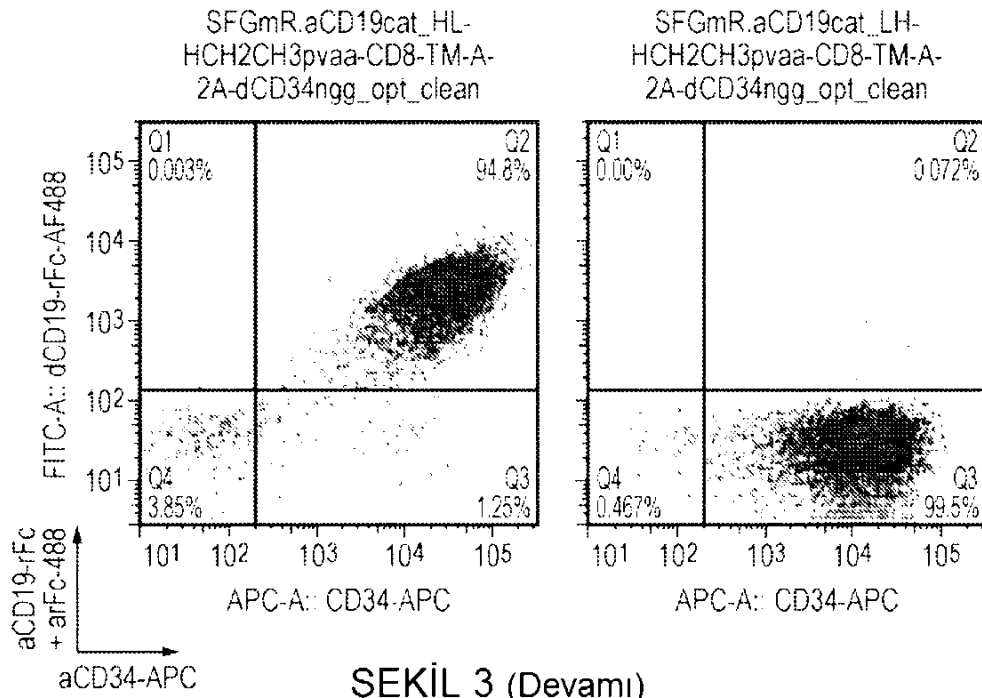
(c)

SupT1 - aCD19-4g7

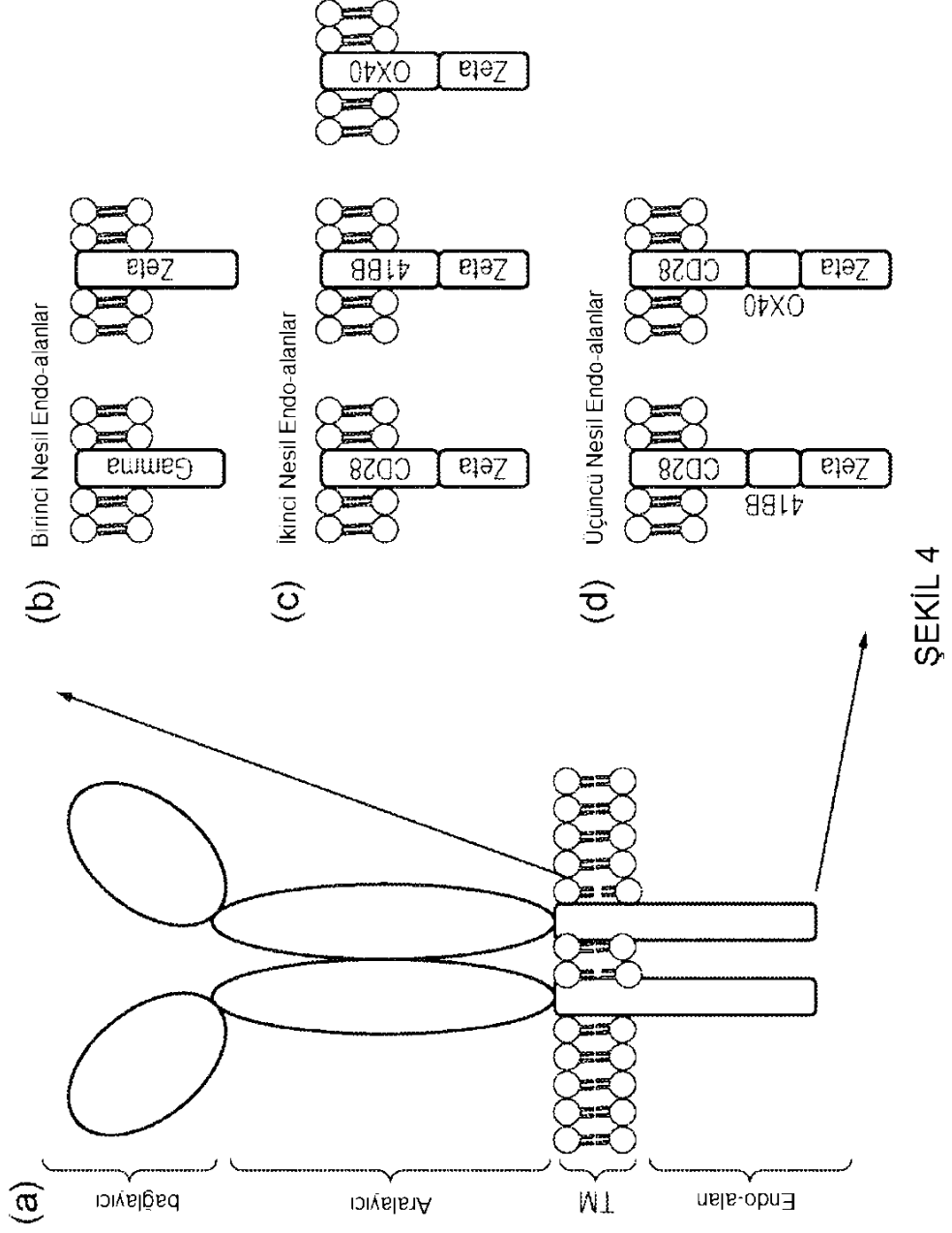


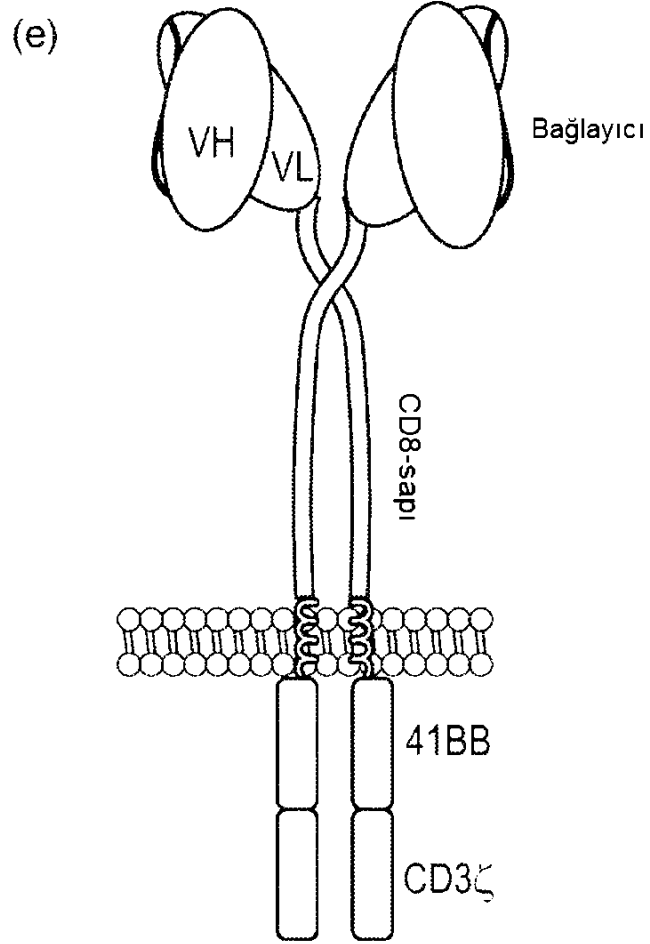
(d)

SupT1 - aCD19-CAT-13 1E10

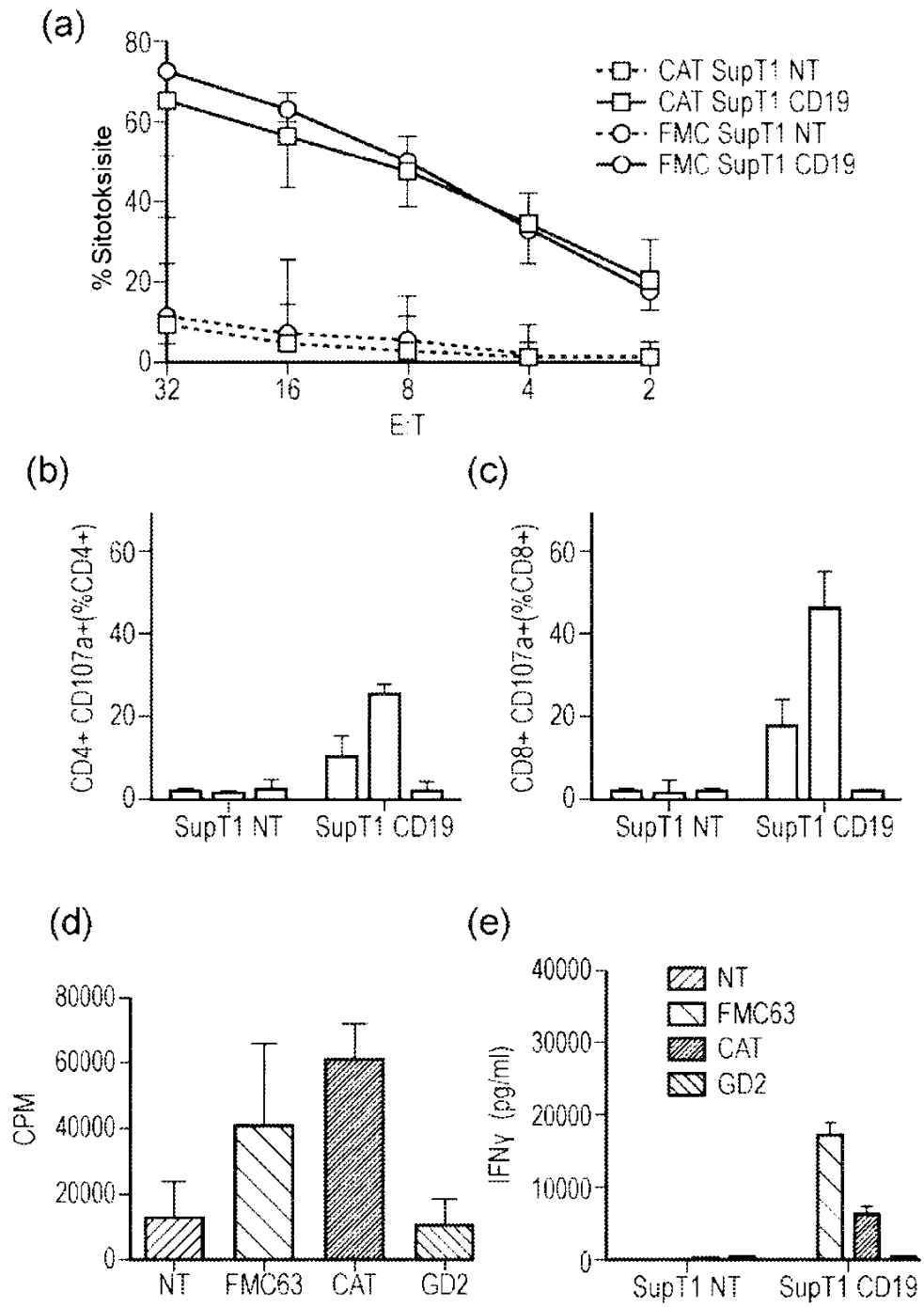


ŞEKİL 3 (Devamı)



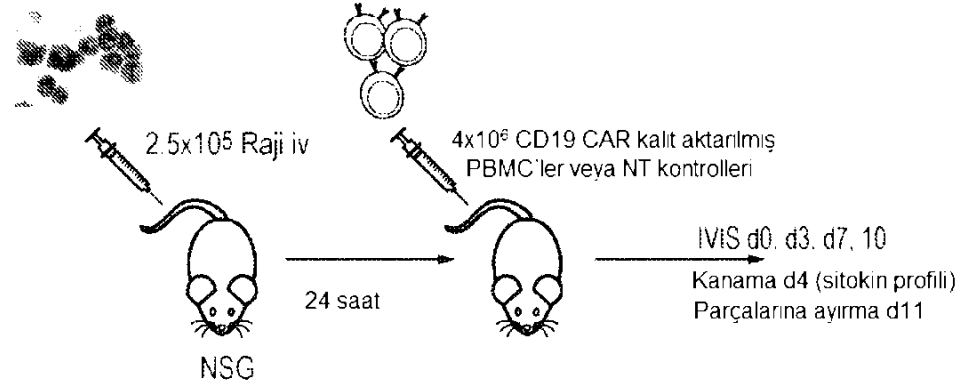


ŞEKİL 4 (Devamı)

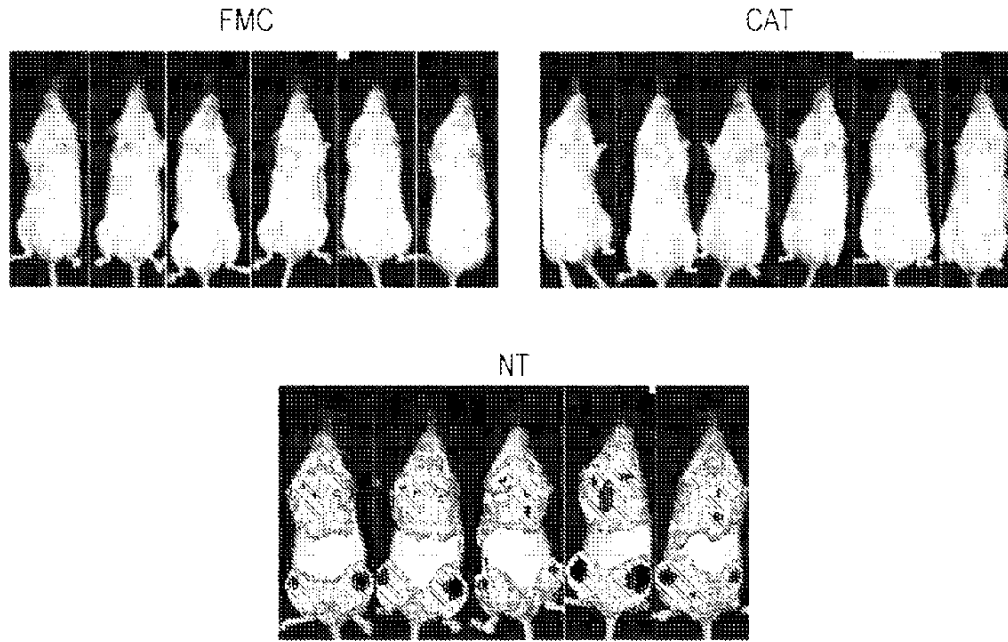


ŞEKİL 5

(a)

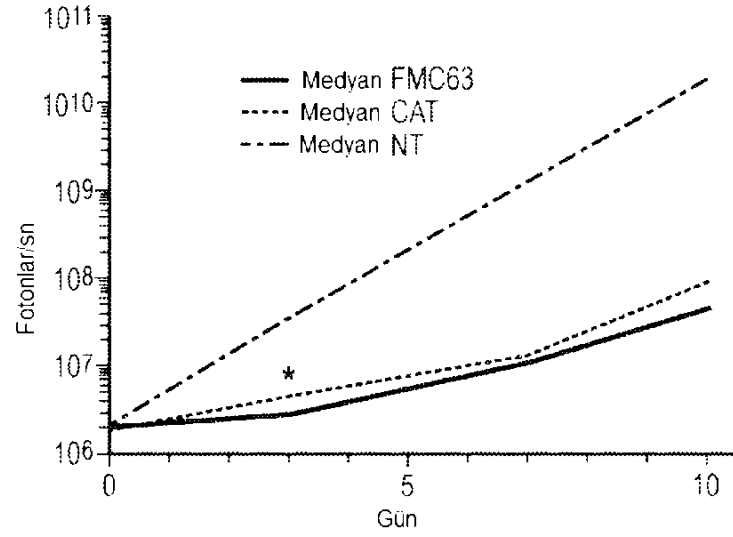


(b)

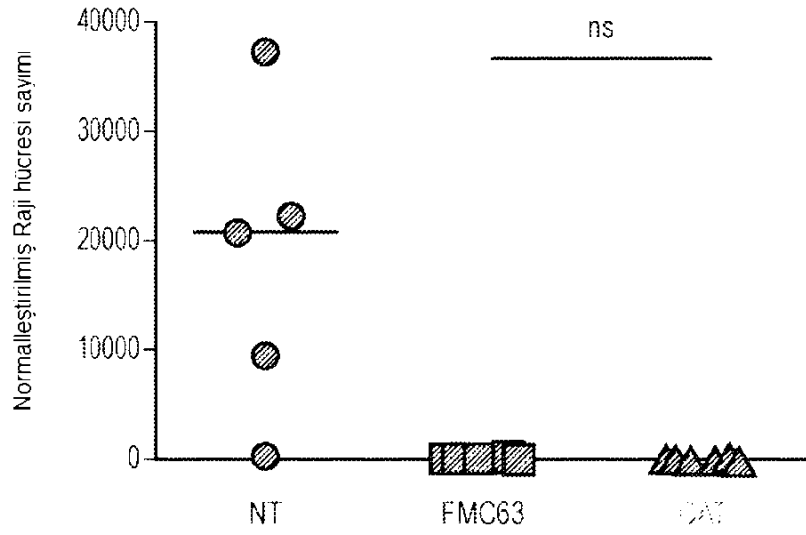


ŞEKİL 6

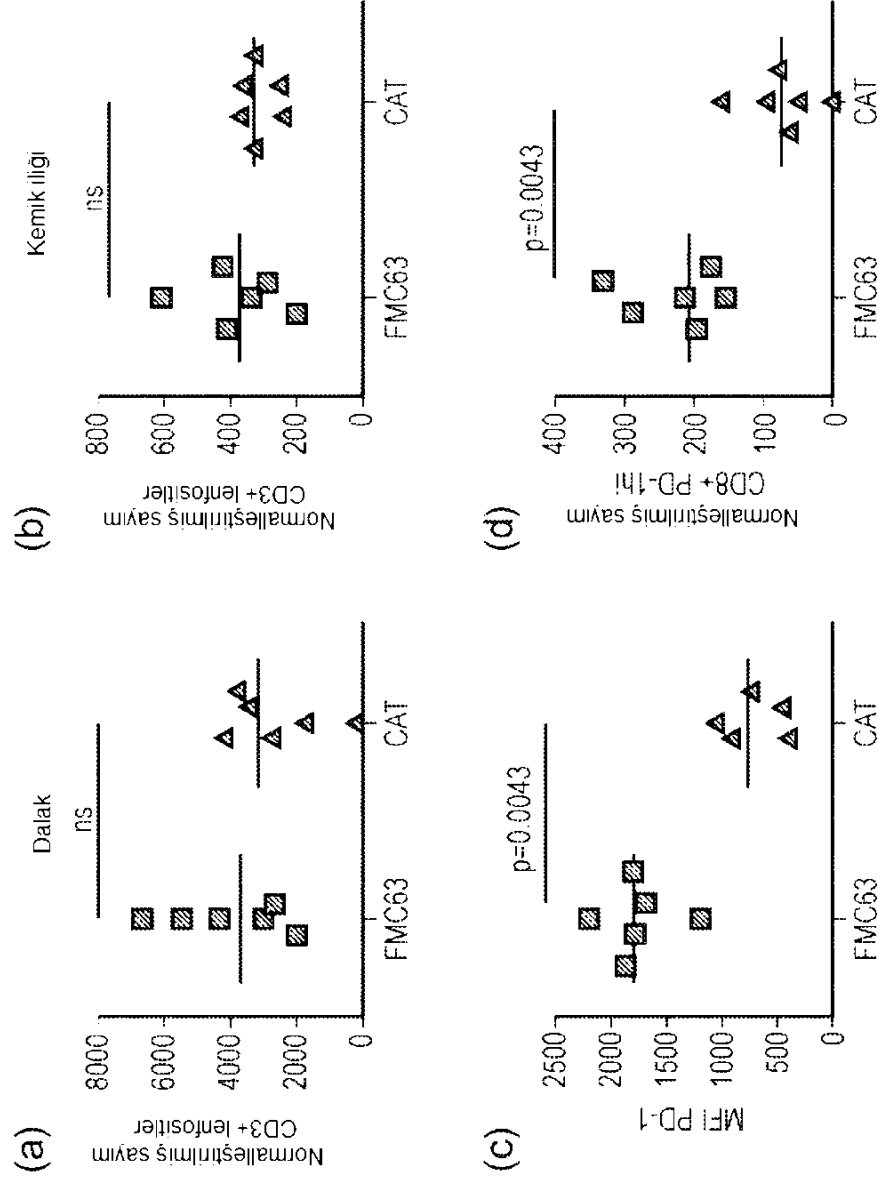
(c)



(d)



ŞEKİL 6 (Devamı)



ŞEKİL 7