



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월22일  
(11) 등록번호 10-2136063  
(24) 등록일자 2020년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)  
C07K 14/725 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 16/2896 (2013.01)  
A61K 35/17 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0156433  
(22) 출원일자 2018년12월06일  
심사청구일자 2018년12월06일  
(65) 공개번호 10-2019-0067125  
(43) 공개일자 2019년06월14일  
(30) 우선권주장  
1020170166969 2017년12월06일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20120164673 A1  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
애플론(주)  
서울특별시 구로구 디지털로 285, 14층 1401호 (구로동, 에이스트원타워1)  
(72) 발명자  
이종서  
경기도 성남시 분당구 서판교로 188  
김규태  
경기도 고양시 덕양구 도래울로 16, 618동 2103호 (뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
공병욱

전체 청구항 수 : 총 17 항

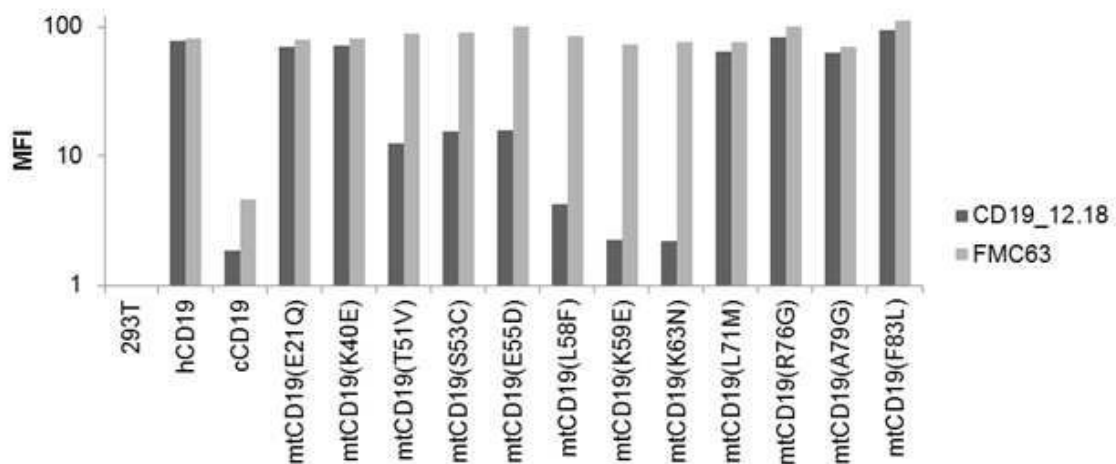
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 악성 B 세포를 특이적으로 인지하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 이를 포함하는 키메라 항체 수용체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 악성 B 세포를 표적하여 암을 치료하는 용도의 신규한 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 이를 포함하는 키메라 항체 수용체 및 이들의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 암 세포(특히, 혈액암)에서 고발현되는 CD19에 특이적으로 결합하는 항체로서 종래의 CD19 타겟 항체들의 CDR 서열과 비교하여 상동성이 매우 낮아, 그 서열의 독특함이 있으며, 종래 CD19에 결합하는 FMC63 항체 단편과 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포는 CD19를 발현하는 양성 세포주에 반응하여 면역세포 활성을 유도하므로 CAR-면역 세포 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

*C07K 14/7051* (2013.01)  
*C12N 5/0636* (2013.01)  
*C07K 2317/622* (2013.01)  
*C07K 2319/03* (2013.01)  
*C12N 2510/00* (2013.01)

(72) 발명자

**고봉국**

서울특별시 관악구 조원로 66 301호 (신림동)

**김기현**

서울특별시 서초구 논현로 7길 30, 502호

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Translational Medicine, Vol. 11,  
No. 23, pp.1-9(2013.)  
KR1020110104032 A  
KR1020070114144 A\*  
KR1020110125664 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	9991006240
부처명	다부처
연구관리전문기관	(재)범부처신약개발사업단
연구사업명	범부처전주기신약개발
연구과제명	신규 CD19 항체 기반 CAR-T 치료제 개발
기여율	1/1
주관기관	애플론(주)
연구기간	2018.02.01 ~ 2019.01.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

다음을 포함하는 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(a) 다음의 중쇄 CDR(Complementarity determining region) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역: 서열번호 1의 CDRH1, 서열번호 2의 CDRH2, 및 서열번호 3, 30 내지 35 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3; 및

(b) 다음의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역: 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 5, 36 내지 39 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2를 추가적으로 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 6, 40, 및 41 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3를 추가적으로 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 7, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 및 70 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 6**

제 1 항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 8, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 및 71 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단하는 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 9**

제7항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 FMC63 항체가 결합하는 에피토프에 결합하지 않는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 10**

제1항, 제3항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자.

**청구항 11**

제10항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

**청구항 12**

제11항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

**청구항 13**

다음을 포함하는 CD19 특이적 키메라 항원 수용체:

- (a) 제1항, 제3항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 도메인(Extracellular domain);
- (b) 막횡단 도메인(transmembrane domain); 및
- (c) 세포내 신호전달 도메인.

**청구항 14**

제13항의 키메라 항원 수용체를 발현하는 효과기 세포.

**청구항 15**

제14항의 효과기 세포를 포함하는 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환, 자가면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서,

상기 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환은 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphocytic leukemia, ALL), 전림프구성 백혈병(prolymphocytic leukemia), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia), 일반 급성 림프구성 백혈병(common acute lymphocytic leukemia, CALLA), Null-acute lymphoblastic leukemia, 비-호지킨 림프종, 미만성 거대 B세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 다발성골수종, 여포 림프종(follicular lymphoma), 비장 림프종(splenic lymphoma), 변연부 림프종(marginal zone lymphoma), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma), 저위험군 B 세포 림프종(indolent B cell lymphoma), 및 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 B 세포 악성종양(B cell malignancy)인 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 16**

제13항의 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 핵산 분자.

**청구항 17**

제 16 항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

**청구항 18**

제 17 항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 악성 B 세포를 표적하여 암을 치료하는 용도의 신규한 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 이를 포함하는 키메라 항체 수용체 및 이들의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 악성 B 세포(B cell malignancy)는 우리 몸의 면역체계를 구성하는 세포계열 중 B 세포에서 생기는 종양을 말한다. 이러한 악성 B 세포는 정상적인 면역체계를 파괴하기 때문에, 외부로부터 침입하는 항원에 대한 면역성을

떨어뜨려 환자를 사망에 이르게 한다. 예를 들어 악성 B 세포 중 하나인 급성 림프구성백혈병(Acute Lymphocytic Leukemia, ALL)은 림프구계 백혈구가 악성 세포로 변하여 골수에서 증식하고 말초 혈액으로 퍼져 간, 비장, 림프계, 대뇌, 소뇌, 척수 등을 침범하는 질병이다. 이러한 급성 림프구성백혈병을 치료하는 방법으로 화학요법(chemotherapy), 표적치료법(targeted therapy), 동종 줄기세포 이식(allogeneic stem cell transplantation)이 대표적이며, 그 치료법이 향상되어 소아 환자의 생존율은 85%를 상회하고 있다. 하지만 여전히 기존 치료제에 미반응하는 환자 혹은 재발 환자가 발생하고 있으며, 소아 암 사망의 가장 큰 원인이 되고 있다.

[0003] 급성 림프구성백혈병 뿐만 아니라 악성 B 세포로부터 발생하는 대부분의 림프종/백혈병(lymphoma/leukemia)들은 세포 표면에 CD19 항원을 발현하기 때문에, 이를 바탕으로 CD19 항원을 인식하는 다양한 치료법들이 시도되고 있다. 이러한 CD19 표적치료제 분야 중, CAR-T 치료제는 기존 치료에 불응하는 급성백혈병 환자를 대상으로 표적세포의 세포독성을 활성화시킴으로써 세포사멸을 유도하는 기작을 통하여 혈액암 치료에 활용되었으며, 이를 통해 높은 완치율(30명중에서 27명 완치)의 임상시험 결과가 보고되었다. 하지만 기존 CD19 CAR-T 치료제는 높은 반응률에도 불구하고, 치료제를 투여한 환자의 10-20%에서 내성이 생기는 문제점이 보고되고 있다(Maude et al., N Eng J Med, 2014, 371:1507; Topp et al., J Clin Oncol, 2014, 32:4134). 따라서, 기존에 사용되는 CD19 표적 항체와는 다른 부위에 결합하는 신규한 항체의 발굴이 필요하다.

[0004] 이러한 배경 하에 본 발명자들은, 악성 B 세포 중 CD19을 발현하는 B 세포를 선택적으로 인식하는 항체 단편을 개발하였으며, 개발된 항체가 기존에 사용되고 있는 FMC63과는 다른 부위의 CD19에 결합하여 상이한 에피토프를 가지는 항체임을 확인하였다. 또한, 개발된 항체 단편을 발현하는 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포독성 T세포가 세포독성 활성을 보유하고 있음을 확인하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 본 발명자들은 기존의 CD19 특이적인 CAR-T 치료제에 대하여 내성이 생기는 문제를 해결하고자, CD19의 다른 에피토프에 결합하는 신규한 항체 및 이를 이용한 키메라 항원 수용체를 개발하고자 노력하였다. 그 결과 본 발명의 CD19\_12.18 항체 및 이들의 변이체가 기존의 FMC63 항체와는 다른 CD19의 에피토프 영역에 결합하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 신규한 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 세포의 도메인(extracellular domain), 막횡단 도메인(transmembrane domain) 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체, 그의 항원 결합 단편, 또는 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 핵산 분자를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체, 그의 항원 결합 단편, 또는 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

[0014] 본 명세서에서는 하기 제1항 내지 제42항의 발명이 청구된다.

[0015] 1. 다음을 포함하는 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

[0016] (a) 다음의 중쇄 CDR(Complementarity determining region) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역: 서열번

호 1의 CDRH1 및 서열번호 2의 CDRH2; 및

- [0017] (b) 다음의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역: 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1.
- [0018] 2. 제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 3, 30 내지 35 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 추가적으로 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0019] 3. 제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 5, 36 내지 39 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2를 추가적으로 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0020] 4. 제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 6, 40, 및 41 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3를 추가적으로 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0021] 5. 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 7, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 및 70 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0022] 6. 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 8, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 및 71 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0023] 7. CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단하는 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0024] 8. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단하는 것인, 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편.
- [0025] 9. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 세 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단하는 것인, 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편.
- [0026] 10. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단하는 것인, 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편.
- [0027] 11. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단하는 것인, 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편.
- [0028] 12. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 결합하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0029] 13. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0030] 14. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 세 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0031] 15. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0032] 16. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

- [0033] 17. 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0034] 18. 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 FMC63 항체가 결합하는 에피토프에 결합하지 않는 것인, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0035] 19. 제18항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 항체 또는 인간화된 항체인 것인, 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편.
- [0036] 20. 제18항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 scFv인 것인, 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편.
- [0037] 21. 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자.
- [0038] 22. 제21항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.
- [0039] 23. 제22항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.
- [0040] 24. 다음을 포함하는 CD19 특이적 키메라 항원 수용체:
  - [0041] (a) 제 1 항의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 도메인(Extracellular domain);
  - [0042] (b) 막횡단 도메인(transmembrane domain); 및
  - [0043] (c) 세포내 신호전달 도메인.
- [0044] 25. 제24항에 있어서, 상기 막횡단 도메인은 T-세포 수용체, CD27, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8(CD8 $\alpha$ ), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154의 알파, 베타 또는 제타 사슬로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인인 것인, CD19 특이적 키메라 항원 수용체.
- [0045] 26. 제24항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 $\zeta$  (CD3 제타) 사슬로부터 유래된 도메인인 것인, 키메라 항원 수용체.
- [0046] 27. 제24항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 OX40 (CD134), CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 공동자극 분자(costimulatory molecule)를 추가적으로 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체.
- [0047] 28. 제24항 내지 제27항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포.
- [0048] 29. 제28항에 있어서, 상기 세포는 수지상 세포, 킬러 수지상 세포, 비만 세포, NK-세포, B-세포 또는 염증성 T-림프구, 세포독성 T-림프구, 조절 T-림프구 또는 헬퍼 T-림프구로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 세포인 것인, 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포.
- [0049] 30. 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환, 자가면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [0050] 31. 제30항에 있어서, 상기 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환은 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphocytic leukemia, ALL), 전림프구성 백혈병(pro-lymphocytic leukemia), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia), 일반 급성 림프구성 백혈병(common acute lymphocytic leukemia, CALLA), Null-acute lymphoblastic leukemia, 비-호지킨 림프종, 미만성 거대 B세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 다발성골수종, 여포 림프종(follicular lymphoma), 비장 림프종 (splenic lymphoma), 변연부 림프종(marginal zone lymphoma), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma), 저위험군 B 세포 림프종(indolent B cell lymphoma), 및 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 B 세포 악성종양(B cell malignancy)인 것인, 약제학적 조성물.
- [0051] 32. 제30항에 있어서, 상기 자가면역 질환 또는 염증질환은 다발성 경화증, 류마티스성 관절염 및 전신성 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus, SLE)로 이루어진 군으로부터 선택된 질환인 것인, 약제학적 조성물.
- [0052] 33. 제28항 또는 제29항의 세포를 포함하는 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환, 자가면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [0053] 34. 제33항에 있어서, 상기 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환은 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic

leukemia, CLL), 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphocytic leukemia, ALL), 전림프구성 백혈병(pro-lymphocytic leukemia), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia), 일반 급성 림프구성 백혈병(common acute lymphocytic leukemia, CALLA), Null-acute lymphoblastic leukemia, 비-호지킨 림프종, 미만성 거대 B세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 다발성골수종, 여포 림프종(follicular lymphoma), 비장 림프종(splenic lymphoma), 변연부 림프종(marginal zone lymphoma), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma), 저위험군 B 세포 림프종(indolent B cell lymphoma), 및 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 B 세포 악성종양(B cell malignancy)인 것인, 약제학적 조성물.

- [0054] 35. 제33항에 있어서, 상기 자가면역 질환 또는 염증질환은 다발성 경화증, 류마티스성 관절염 및 전신성 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus, SLE)로 이루어진 군으로부터 선택된 질환인 것인, 약제학적 조성물.
- [0055] 36. 제24항 내지 제27항의 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 핵산 분자.
- [0056] 37. 제36항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.
- [0057] 38. 제37항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.
- [0058] 39. 제30항 내지 35항 중 어느 한 항의 조성물을 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환, 자가면역질환 또는 염증질환의 치료방법.
- [0059] 40. 제39항에 있어서, 상기 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환은 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphocytic leukemia, ALL), 전림프구성 백혈병(pro-lymphocytic leukemia), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia), 일반 급성 림프구성 백혈병(common acute lymphocytic leukemia, CALLA), Null-acute lymphoblastic leukemia, 비-호지킨 림프종, 미만성 거대 B세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 다발성골수종, 여포 림프종(follicular lymphoma), 비장 림프종(splenic lymphoma), 변연부 림프종(marginal zone lymphoma), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma), 저위험군 B 세포 림프종(indolent B cell lymphoma), 및 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 B 세포 악성종양(B cell malignancy)인 것인, 치료방법.
- [0060] 41. 제39항에 있어서, 상기 자가면역 질환 또는 염증질환은 다발성 경화증, 류마티스성 관절염 및 전신성 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus, SLE)로 이루어진 군으로부터 선택된 질환인 것인, 치료방법.
- [0061] 42. 제39항에 있어서, 상기 대상체는 포유동물 또는 인간인, 치료방법.
- [0063] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다:
- [0064] (a) 다음의 중쇄 CDR(Complementarity determining region) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역: 서열번호 1의 CDRH1 및 서열번호 2의 CDRH2; 및
- [0065] (b) 다음의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역: 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1.
- [0066] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 3, 30 내지 35 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 추가적으로는 포함한다.
- [0067] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 5, 36 내지 39 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2를 추가적으로 포함한다.
- [0068] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 6, 40, 및 41 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3를 추가적으로 포함한다.
- [0069] 본 발명의 구체적인 구현예에서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 7, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 및 70 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0070] 본 발명의 다른 구체적인 구현예에서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 8, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 및 71 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0072] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단하는 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 상기 서열번호 92의 아미노산 서열은 human B lymphocyte antigen CD19의 아미노산 서열로, UniProtKB의 ID:

P15391로 공지되어 있다.

- [0073] 본 발명의 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단한다.
- [0074] 본 발명의 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 세 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단한다.
- [0075] 본 발명의 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단한다.
- [0076] 본 발명의 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단한다.
- [0077] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 결합한다.
- [0078] 본 발명의 다른 일 구현예에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합한다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 일 구현예에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 세 개 이상의 아미노산 잔기에 결합한다.
- [0080] 본 발명의 구체적인 구현예에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기에 결합한다.
- [0081] 본 발명의 다른 구체적인 구현예에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하고, 서열번호 92의 아미노산 서열의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합한다.
- [0082] 본 발명의 일 실시예에서 확인한 바와 같이, 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편(e.g. CD19\_12.18)은 상술한 서열번호 92의 아미노산 서열로 이루어진 hCD19의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63 아미노산 잔기를 각각 변형한 mtCD19(T51V), mtCD19(S53C), mtCD19(E55D), mtCD19(L58F), mtCD19(K59E), 및 mtCD19(K63N)에 대하여 결합력의 감소를 나타내었다. 상기 결과로부터 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 상기 6개의 아미노산 잔기를 CD19에 대한 결합에 있어서 주요한 key residue로 가짐을 확인하였다. 또한, 그 중에서도 L58, K59, 및 K63을 변형시킨 mutant hCD19에 대해서 결합력이 현저하게 감소한다는 점에서 L58, K59, 및 K63의 아미노산 잔기가 CD19 결합에 더욱 중요한 key residue임을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 92의 아미노산 서열로 이루어진 hCD19의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나, 두 개, 또는 세 개 이상의 아미노산 잔기에 결합한다. 보다 구체적으로는 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 92의 아미노산 서열로 이루어진 hCD19의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나, 또는 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합한다. 그 결과, 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 92의 아미노산 서열로 이루어진 hCD19의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 항원 결합 단편의 적어도 하나, 두 개, 또는 세 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단한다. 보다 구체적으로는 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 92의 아미노산 서열로 이루어진 hCD19의 L58, K59, 및 K63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나, 또는 두 개 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 CD19에 대한 결합을 차단한다.

- [0083] 또한, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 CD19<sub>12.18</sub> 항체 또는 이들의 변이체는 종래의 키메라 항원 수용체에 사용되는 항체인 FMC63의 에피토프와 다른 CD19의 에피토프에 결합하며, 서로 동일한 에피토프를 가지거나, 또는 동일한 에피토프에 대해 경쟁적으로 결합한다.
- [0084] 본 발명의 실시예에서 확인한 바와 같이, 서열번호 92의 아미노산 서열로 이루어진 hCD19의 T51, S53, E55, L58, K59, 및 K63 아미노산 잔기를 각각 변형한 mtCD19(T51V), mtCD19(S53C), mtCD19(E55D), mtCD19(L58F), mtCD19(K59E), 및 mtCD19(K63N)에 대하여 본 발명의 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편의 결합력이 크게 저하되었으나, FMC63 항체의 경우 결합력이 온전하게 유지되었다. 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 mtCD19(H218R/KSS)에도 정상적으로 결합하였으나, FMC63 항체는 상기 mtCD19(H218R/KSS)에 대해 결합력이 크게 저하되었다. 따라서, 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 FMC63 항체가 결합하는 에피토프에는 결합하지 않는다.
- [0085] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 CD19<sub>12.18</sub> 항체의 변이체(i.e. CD19<sub>1218.81</sub> 항체를 ELISA 플레이트에 코팅하고, CD19-ECD-Ck 또는 CD19-ECD-Ck 및 CD19<sub>1218</sub> 항체를 가하여 competitive ELISA를 수행한 결과, CD19<sub>1218</sub> 항체가 존재하는 경우 CD19<sub>1218.81</sub> 항체와 CD19-ECD-Ck에 경쟁적으로 결합하는 결과 결합된 CD19-ECD-Ck의 양이 저하됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 항-CD19 항체 및 이들의 변이체는 서로 동일한 에피토프를 가지거나, 또는 동일한 에피토프에 대해 경쟁적으로 결합한다.
- [0086] 본 발명에서 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 항체이거나, 또는 인간화된 것일 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 scFv일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0087] 본 발명에서 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 CDR 그래프팅(CDR grafting) 방법을 이용하여 마우스에서 개발한 기존 항체의 상보성 결정부위(complementarity determining regions, CDRs)를 기존 항체의 프레임워크 영역(framework region)보다 안정적인 프레임워크 영역(framework region)에 이식하였다. “CDR 그래프팅”이란 마우스 단일클론 항체를 인간 환자에게 사용시 면역반응이 유발되어 중화(neutralization)되어 버리는 문제점을 해결하기 위하여 개발된 방법으로 비-인간 항체(non-human antibody)를 인간화(humanization)하는 가장 대표적인 방법이다. 즉, CDR 그래프팅은 동물 항체의 CDR 부위를 인간 항체의 프레임워크(framework)로 이식하는 것이다.
- [0088] 본 명세서에서, 상기 발명의 일 양태에 따른 항체는 CD19<sub>12.18</sub> 항체 또는 그의 변이체이다. 구체적으로, 상기 CD19<sub>12.18</sub> 항체의 변이체는 hzCD19<sub>1218.81</sub>, hzCD19<sub>1218.82</sub>, hzCD19<sub>1218.81.12</sub>, hzCD19<sub>1218.81.17</sub>, hzCD19<sub>1218.81.52</sub>, hzCD19<sub>1218.81.55</sub>, hzCD19<sub>1218.81.64</sub>, 또는 hzCD19<sub>1218.81.79</sub>이며, 이들의 CDR 및 경쇄 가변영역 또는 중쇄 가변영역에 대한 아미노산 서열 및 뉴클레오타이드 서열은 본원 명세서 및 첨부된 서열 목록에 기재되어 있다.
- [0089] 본 명세서에서 “FMC63” 항체는 뮤린 항-CD19 단일클론 항체의 한 예이다(Nicholson et al., *Molecular Immunology*, 34(16-17): 1157-1165 (1997)). FMC63 단일클론 항체의 가변 영역들은 임상 시험에서 시험된 CAR에 사용되어 왔다(예를 들어, 문헌[Kochenderfer et al., *Nature Review Clinical Oncol.*, 10(5): 267-276 (2013); Porter et al., *New Eng. J. Med.*, 365(8): 725-733 (2011); Kalos et al., *Science Translational Medicine*, 3(95): 95ra73 (2011); Kochenderfer et al., *Blood*, 116(20): 4099-4102 (2010); and Kochenderfer et al., *Blood*, 119(12): 2709-2720 (2012)] 참조).
- [0090] 본 명세서에서, 용어 “항체(antibody)”는 CD19에 대한 특이 항체로서, 완전한 항체 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편(antigen binding fragment)을 포함한다.
- [0091] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 및 엡실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1( $\gamma$ 1), 감마2( $\gamma$ 2), 감마3( $\gamma$ 3), 감마4( $\gamma$ 4), 알파1( $\alpha$ 1) 및 알파2( $\alpha$ 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다.
- [0092] 본 명세서에서, 용어 “항원 결합 단편(antigen binding fragment)”은 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab(fragment antigen binding)는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')<sub>2</sub>항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체 조각으로

Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain variable fragment, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다), 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0093] 따라서, 본 발명에서 항체는 구체적으로 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFv) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0094] 본 명세서에서, 용어 “중쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3 개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한 본 명세서에서 용어 “경쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.

[0095] 본 명세서에서, 용어 “가변 영역(variable region)” 또는 “가변 도메인(variable domain)”은 항체를 항원에 결합시키는 것과 관련되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 의미한다. Native 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각 도메인은 4 개의 보존된 프레임워크 영역 (framework regions, FR) 및 3 개의 초가변 영역 (hypervariable regions, HVR)을 포함한다. (Kindt et al., Kuby Immunology, 제 6 판, W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)).

[0096] 본 명세서에서, 용어 “CDR(complementarity determining region)”은 면역글로블린 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)). 중쇄(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 경쇄(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)에는 각각 3개의 CDRs이 포함되어 있다. CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공한다.

[0097] 본 명세서에서, 용어 “프레임 워크(Framework)” 또는 “FR”은 초가변 영역 (hypervariable region, HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 나타낸다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4 개의 FR 도메인 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 구성된다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH에서 다음의 순서로 나타난다:

[0098] FRH1(Framework region 1 of Heavy chain)-CDRH1 (complementarity determining region 1 of Heavy chain)-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4;

[0099] 또한, HVR 및 FR서열은 일반적으로 VL(또는 Vk)에서 다음의 순서로 나타난다:

[0100] FRL1(Framework region 1 of Light chain)-CDRL1(complementarity determining region 1 of Light chain)-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4.

[0101] 본 명세서에서, 용어 “특이적으로 결합한다” 또는 이와 같은 것은, 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 scFv와 같은 다른 구성물이 생리적 조건 하에서 비교적 안정한 항원과 복합체를 형성한다는 것을 의미한다. 특이적 결합은 적어도 약 1 x 10<sup>-6</sup> M이하의 평형 해리 상수 (예를 들어, 이보다 작은 KD는 보다 단단한 결합을 나타냄)로 특성화될 수 있다. 2 개의 분자가 특이적으로 결합하는지 여부를 결정하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 평형 투석, 표면 플라즈몬 공명 등을 포함한다.

[0102] 본 명세서에서, 용어 “친화도(Affinity)”는 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호 작용의 총합의 강도를 의미한다. 달리 명시하지 않는 한, “결합 친화력(binding affinity)”은 결합 쌍 (예를 들어, 항체 및 항원)의 구성원 간의 1:1 상호 작용을 반영하는 내인성(intrinsic) 결합 친화력을 나타낸다. 분자 X와 그의 파트너 Y의 친화도는 일반적으로 해리 상수(Kd)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기술된 것들을 포함하여 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0103] 또한 본 명세서에서 용어, “인간 항체(human antibody)” 또는 “인간화 항체(humanized antibody)”는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성된 항체, 또는 인간 항체 레퍼토리(repertoires) 또는 다른 인간 항체 코딩 서열을 이용하는 비인간 근원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유한다.

[0104] 본 명세서에서 용어, “키메라(chimeric) 항체”는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 근원(source) 또는 중

(species)으로부터 유래되고, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 상이한 근원 또는 종에서 유래한 항체를 의미한다.

- [0105] 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, CD19를 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다.
- [0106] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0107] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).
- [0108] 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는  $\pm 2$  이내, 보다 바람직하게는  $\pm 1$  이내, 보다 더 바람직하게는  $\pm 0.5$  이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에서 치환을 한다.
- [0109] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0  $\pm$  1); 글루타메이트(+3.0  $\pm$  1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5  $\pm$  1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).
- [0110] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는  $\pm 2$  이내, 보다 바람직하게는  $\pm 1$  이내, 보다 더 바람직하게는  $\pm 0.5$  이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에서 치환을 한다.
- [0111] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0112] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 상술한 서열번호 1 내지 3, 서열번호 30 내지 35 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 1 이상의 CDR을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 4 내지 6, 서열번호 36 내지 41 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 1 이상의 CDR을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0113] 본 발명의 다른 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 상술한 서열번호 7, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 및 70 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함한다.
- [0114] 본 발명의 또 다른 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 상술한 서열번호 8, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 및 71 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [0115] 본 발명의 다른 구현예에서 본 발명의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 항-CD19 scFv이다.
- [0116] 본 발명의 구체적인 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 포함되는 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역

역은 (Gly-Ser)<sub>n</sub>, (Gly<sub>2</sub>-Ser)<sub>n</sub>, (Gly<sub>3</sub>-Ser)<sub>n</sub> 또는 (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub> 링커에 의해 연결된다. 여기서 n은 1 내지 6의 정수이고, 구체적으로는 3 내지 4이나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 scFv의 경쇄가변영역 및 중쇄가변영역은 예를 들어 다음의 배향으로 존재할 수 있다: 경쇄가변영역-링커-중쇄가변영역; 또는 중쇄가변영역-링커-경쇄가변영역.

- [0117] 한편, 본 발명의 항체 CDR 서열은 종래 항-CD19 항체 또는 이들을 포함하는 키메라 항원 수용체들의 CDR 서열과 비교하여 상동성(similarity)이 매우 낮아, 그 서열의 독특함이 있다. 예를 들어, 본 발명의 CD19<sub>12.18</sub> 항체에 대하여 ncbi 웹사이트에서 BLAST 검색을 한 결과, 상동성이 가장 높은 것으로 나온 미국 특허 제9074002호에 개시된 항체(서열번호 29의 아미노산 서열)는 본 발명의 CD19<sub>12.18</sub> 항체와 CDR 서열 상동성이 81.7%에 불과하며, 더욱이 미국 특허 제9074002호에 기재된 항체는 Protein Tyrosine Phosphatase 1B(PTP1B)에 결합하는 항체로서, 본 발명의 항체와 그 타겟이 상이하다.
- [0118] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0119] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 분자는 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호 10 내지 12의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 CDR을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 13 내지 15의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 CDR을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0120] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 분자는 서열번호 16, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 및 72로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 중쇄가변영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0121] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 분자는 서열번호 17, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 및 73으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 중쇄가변영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0122] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 분자는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0123] 본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0124] 본 발명의 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 상기 키메라 항원 수용체 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 상기 키메라 항원 수용체 분자를 구성하는 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열인 것으로 족하며, 어느 특정 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 자명하다.
- [0125] 이는 뉴클레오타이드 서열의 변이가 발생하더라도 변이된 뉴클레오타이드 서열을 단백질로 발현하면 단백질 서열에서 변화를 가져오지 않는 경우도 있기 때문이다. 이를 코돈의 축퇴성이라고 한다. 따라서 상기 뉴클레오타이드 서열은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0126] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 본 발명의 CD19에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 CDR, 경쇄 CDR, 중쇄 가변영역, 경쇄 가변영역, 중쇄, 또는 경쇄를 이루는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열은 본 명세서의 첨부된 서열목록에 수록되어 있다.
- [0127] 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 본 발명의 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- [0128] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편; 또는 키메라 항원

수용체 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 ncbi 웹사이트의 BLAST 페이지를 통하여 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 ncbi 웹사이트의 BLAST help 페이지에서 확인할 수 있다.

- [0129] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 제조법 벡터를 제공한다.
- [0130] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 제조법 벡터로 형질 전환된 숙주세포를 포함한다.
- [0131] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 상기 벡터의 적합한 진핵세포 숙주 세포는 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells), NSO 세포, SP2/0, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK-293 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0133] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 CD19 특이적 키메라 항원 수용체를 제공한다:
- [0134] (a) 상기의 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 도메인(Extracellular domain);
- [0135] (b) 막횡단 도메인(transmembrane domain); 및
- [0136] (c) 세포내 신호전달 도메인.
- [0137] 본 명세서에서, 용어 “키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)”는 T-세포 신호전달 또는 T-세포 활성화 도메인에 연결된 항체의 항원 결합 도메인(예를 들어, 단일쇄 가변 단편(scFv))을 함유하는 인공적으로 제작된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 키메라 항원 수용체는 단일클론 항체의 항원-결합 성질을 이용하여 비-MHC-제한 방식으로, 선택된 표적에 대한 T-세포 특이성 및 반응성을 재유도하는 능력을 갖는다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR을 발현하는 T-세포에게 항원 처리와 무관하게 항원을 인식하는 능력을 제공하여, 중앙 도피의 주요 메커니즘을 회피시킨다. 또한, CAR은 T-세포에서 발현될 때, 유리하게는 내재성 T-세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 사슬과 이량체화되지 않는다.
- [0138] 본 발명의 키메라 항원 수용체는 B 림프구 항원으로 알려진 CD19에 대해 유도된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다. 본 발명에서 상기 CD19에 대해 유도된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 상술한 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.
- [0139] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키메라 항원 수용체는 세포의 표면에서 발현된다. 따라서 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 상기 막횡단 도메인은 당해 분야에서 공지된 천연 공급원으로부터 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 상기 막횡단 도메인은 예를 들어 T-세포 수용체, CD27, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8(CD8  $\alpha$ ), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154의 알파, 베타 또는 제타 사슬로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0140] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 막횡단 도메인은 서열번호 20의 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 CD8 유래 힌지/막횡단 도메인이다.
- [0141] 본 명세서에서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이차전령(2nd messenger)를 생성하거나 또는 상기 이차전령에 반응하여 이펙터로서 기능함으로써 규정된 신호전달 경로를 통한 세포 활성을 조절하기 위해 정보를 세포 내로

전달함으로써 작용하는 단백질의 기능성 부분을 의미한다.

- [0142] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 키메라 항원 수용체는 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 상기 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포 및 면역 반응의 활성화를 야기시키는 타겟(예컨대 CD19)에 상기 세포의 도메인을 결합시킨 후 세포내 신호전달의 원인이 된다. 즉, 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포의 정상 이펙터(effector) 기능들 중 적어도 하나의 활성화의 원인이 된다. 예를 들어, T 세포의 이펙터 기능은 사이토카인의 분비를 포함하는 세포독성 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 키메라 항원 수용체에서 사용하기 위한 신호 변환 도메인의 바람직한 예는 항원 수용체 결합(engagement) 후 신호 변환을 개시하기 위해 협력하여 작용하는 T 세포 수용체 및 공동-수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 동일한 기능적 능력을 갖는 이러한 서열의 임의 유도체 또는 변형체 및 임의 합성 서열일 수 있다.
- [0143] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 키메라 항원 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ (CD3 제타) 사슬로부터 유래된 도메인이다.
- [0144] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CD3 ζ (CD3 제타) 사슬로부터 유래된 도메인은 서열번호 22의 서열을 포함하는 염기서열에 의해 인코딩되는 CD3 ζ 도메인이다.
- [0145] 본 발명의 다른 구체적인 구현예에 따르면, 상기 키메라 항원 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 OX40 (CD134), CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 공동자극 분자(costimulatory molecule)를 추가적으로 포함한다. 상기 세포내 신호전달 도메인은 상술한 도메인 외에도 당해 분야에서 공지된 다른 세포내 신호전달 분자로부터 획득되거나 유래될 수 있고, 세포내 신호전달 도메인이 유래되는 분자의 전체 또는 그의 단편을 포함할 수 있다.
- [0146] 본 발명의 구체적인 일 구현예에 따르면, 상기 공동자극 도메인은 CD28, OX40, 4-1BB (CD137), 및/또는 ICOS (CD278)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질로부터 획득된 기능적 신호전달 도메인일 수 있고, 보다 구체적으로는 CD28 및/또는 OX40의 기능적 신호전달 도메인일 수 있다.
- [0147] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 상기 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB, CD28, OX40, CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인, 또는 이들의 조합이다. 상기 세포내 신호전달 도메인은 가장 구체적으로는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인이다.
- [0148] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CD137을 포함하는 공동자극 분자는 서열번호 21의 서열을 포함하는 염기서열에 의해 인코딩되는 CD3 ζ 도메인이다.
- [0149] 본 발명의 키메라 항원 수용체의 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인은 상술한 구체적인 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인들 중 1 이상 선택된 조합으로 포함될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 키메라 항원 수용체는 CD8 α 막횡단 도메인 및 CD28 및 CD3 ζ 의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0150] 본 발명의 일 구현예에 따른 CAR 컨스트럭트의 구조 및 아미노산/뉴클레오타이드 서열은 도 9 및 서열목록에 첨부되어 있다.
- [0151] 본 발명의 다른 일양태에 따르면, 본 발명은 상술한 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0152] 본 명세서에서 상술한 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편(폴리펩타이드)와 이를 인코딩하는 핵산 분자, 항-CD19 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 및 이를 인코딩하는 핵산 분자는 단리된 상태이다.
- [0153] 본 명세서에서, 용어 "단리된"은 자연/천연 상태에서부터 변형되거나 제거됨을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩타이드는 "단리된" 것이 아니지만, 그로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩타이드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는 예를 들어 숙주 세포와 같은 비-천연 환경에 존재할 수 있다.
- [0154] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 본 명세서에서 후술되는 "벡터"에 대해서는 상술한 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 핵산 분자와 관련하여 공통적으로 적용된다.
- [0155] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 전달 벡터와 발현 벡터를 포함한다.
- [0156] 본 명세서에서 용어 "전달 벡터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는데 사용될 수

있는 물질의 조성을 지칭한다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 연결된 폴리뉴클레오티드, 플라즈미드 및 바이러스를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로 상기 전달 벡터는 자가 복제성 플라즈미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 세포 내로의 핵산의 전이를 촉진시키는 비-플라즈미드 및 비-바이러스성 화합물, 예컨대 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 추가적으로 포함할 수 있는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스성 전달 벡터는 아데노 바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0157] 본 명세서에서 용어 “발현 벡터”는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위하여, 발현시킬 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스 작용 인자(cis-acting element)를 포함하고, 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포 또는 시험관 내 발현 시스템에 의해 제공될 수 있다. 상기 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라즈미드 벡터; 코즈미드 벡터; 그리고 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스, 레트로 바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터에서 상기 스위치 분자를 코딩하는 핵산 분자는 상기 벡터의 프로모터와 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0158] 본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0159] 본 발명의 벡터는 유전자 클로닝을 위한 벡터, 단백질의 발현을 위한 벡터, 또는 유전자의 전달을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.

[0160] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β-액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 물로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 이들은 일반적으로 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 갖는다.

[0161] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 벡터가 전달 벡터인 경우 “레트로바이러스 벡터”일 수 있다. 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 유전자 전달을 위해 선택된 유전자는 레트로바이러스 벡터 내에 삽입되고, 레트로바이러스 입자 내에 패키징될 수 있다. 이어서 재조합된 레트로바이러스는 인 비보, 또는 인 비트로에서 목적하는 숙주 세포로 전달될 수 있다. 많은 레트로바이러스 벡터가 관련 기술분야에 알려져 있으며, 본 발명의 구체적인 구현예에서 상기 레트로바이러스 벡터는 MLV-기반의 레트로바이러스벡터인 pMT 레트로바이러스 벡터이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0162] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터이다.

[0163] 본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 폴리펩타이드 또는 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타민 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 한편, 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 이를 포함하는 CAR 폴리펩타이드의 발현을 평가하기 위한 선택 표지로서 선택가능 마커 유전자 및/또는 리포터 유전자를 포함할 수 있다. 선택가능 마커 유전자로는 당업계에 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 제네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다. 리포터 유전자로는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 또는 녹색형광 단백질 유전자를 포함한다.

[0164] 본 발명의 재조합 벡터를 세포 내로 도입하고 발현시키는 방법은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 벡터는 당업계에 공지된 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모, 또는 곤충 세포 내로 쉽게 도입될 수 있다. 예를 들면, 벡터는 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 상기

물리적 수단은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 폭격(particle bombardment), 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. 상기 화학적 수단은 콜로이드 분산액 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노 캡슐, 마이크로스피어, 비드, 및 수중유 에멀전, 마이셀 (micelle), 혼합된 마이셀, 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 또한, 상기 생물학적 수단은 상술한 렌티바이러스, 레트로바이러스 등, DNA 또는 RNA 벡터의 사용을 포함한다.

- [0165] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제공한다.
- [0166] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 세포는 면역세포로서 선천성 및/또는 후천성 면역 반응의 개시 및/또는 실행을 담당하는 조혈기원의 세포를 지칭한다.
- [0167] 본 발명에 따른 상기 면역 세포는 줄기세포로부터 유래될 수 있다. 줄기 세포는 성체 줄기세포, 비-인간 배아 줄기세포, 제대혈 유래 줄기세포, 골수유래 줄기세포, 유도만능 줄기세포, 또는 조혈 줄기 세포일 수 있다. 보다 구체적으로는 상기 면역세포는 수지상 세포, 킬러 수지상 세포, 비만 세포, NK-세포, B-세포 또는 염증성 T-림프구, 세포독성 T-림프구, 조절 T-림프구 또는 헬퍼 T-림프구로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 세포일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0168] 본 발명에서 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포는 효과기 세포(effector cell)라고도 불리운다. 상기 효과기 세포는 자가 세포 또는 동종이형 세포의 집단을 포함한다. 즉, 상기 효과기 세포는 본 CD19에 특이적인 CAR를 발현하는 자가 세포 또는 동종이형 세포의 집단을 포함한다.
- [0169] 또한, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 효과기 세포는 CD19 특이적 CAR를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질감염 또는 형질 도입된 세포의 집단을 포함한다. 상기 형질 감염 또는 형질 도입은 상술한 바와 같이 당업계에 알려진 다양한 수단에 의해 제한없이 이루어질 수 있다.
- [0170] 따라서, 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면 본 발명의 효과기 세포, 예컨대 T 림프구, 또는 자연살해 세포로 전달되고, CD19 특이적 CAR 코딩 핵산 분자는 mRNA로 전사되며, 상기 mRNA로부터 CD19 특이적 CAR 폴리펩티드가 번역되어 효과기 세포의 표면에 발현된다.
- [0171] 또한 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0172] 상기 약제학적 조성물은 상술한 본 발명의 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0173] 본 발명의 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포가 약제학적 조성물의 형태로 투여되는 경우, 상기 세포는 투여되는 대상체(subject)에 대해 동종동물 유래 또는 자가유래 세포일 수 있다.
- [0174] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포의 집단을 포함할 수 있다.
- [0175] 본 발명의 약제학적 조성물은 상술한 본 발명의 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 유효성분으로 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0176] 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 CD19<sub>12.18</sub> 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 T 세포(CD19<sub>12.18</sub> CAR-T cell)는 CD19 항원을 발현하는 세포주(RaJi)와 동시 배양하는 경우 CD19 양성 세포주(RaJi) 표면의 CD19 항원을 인식함으로써, 키메라 항원 수용체 세포의 활성화를 유도하므로 CD19 항원과 관련된 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.
- [0177] 본 발명의 약제학적 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 질환으로는 CD19를 발현하는 세포와 연관된 인간 및 포유동물의 질환으로서, 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia, ALL), 전림프구성 백혈병(pro- lymphocytic leukemia), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia), 일반 급성 림프구성 백혈병(common acute lymphocytic leukemia, CALLA), Null-acute lymphoblastic leukemia, 비-호지킨 림프종, 미만성 거대 B세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 다발성골수종, 여포 림프종(follicular lymphoma), 비장 림프종(splenic lymphoma), 변연부 림프종(marginal zone lymphoma), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma), 저위험군 B 세포 림프종(indolent B cell lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 B 세포 악성종양(B cell malignancy)을 포함한다.
- [0178] 또한 상기 질환은 부적절하거나 증강된 B 세포수 및/또는 활성화와 연관된 자가면역 질환 및 염증 질환을 포함

한다. 상기 자가면역 질환 및 염증질환의 예로는 다발성 경화증, 류마티스성 관절염 및 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)를 포함한다.

[0179] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0180] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 흉골내 주입, 종양내 주입, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0181] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 질환을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0182] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질환 상태의 방지 또는 보호적인 치료를 의미한다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 질환상태의 감소, 억제, 진정 또는 근절을 의미한다.

[0183] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0184] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 상술한 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포 이외에 다른 약제학적 활성 약제 또는 약물, 예를 들어, 아스파라기나제, 부설판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐티시딘, 하이드록시우레아, 메토틱세이트, 파클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등의 화학치료제; 베바시주맵(bevacizumab), 올라파립(olaparib) 등의 표적치료제; 또는 니볼루맵(nivolumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab)과 같은 면역관문억제제를 포함하거나, 이들과 함께 병용투여될 수 있다.

[0185] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 CD19에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물; 또는 상기의 CD19 특이적 키메라 항원 수용체를 발현하는 효과기 세포를 포함하는 조성물을 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환, 자가면역질환 또는 염증질환의 치료방법을 제공한다.

[0186] 본 발명의 치료방법의 대상 질병인 CD19를 발현하는 세포와 연관된 질환, 자가면역질환 또는 염증질환은 상기 약학적 조성물의 치료 대상 질병과 관련하여 정의한 것과 같다.

[0187] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 대상체는 포유동물 또는 인간이다.

[0188] 본 발명의 암 또는 염증성 질환의 치료방법은 유효성분으로서 상술한 항체 또는 항원 결합 단편; 또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 효과기 세포를 공통적으로 사용하는 방법이므로, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

**발명의 효과**

[0190] 본 발명의 항체는 암 세포(특히, 혈액암)에서 고발현되는 CD19에 특이적으로 결합하는 항체로서 종래의 CD19 타겟 항체들의 CDR 서열과 비교하여 상동성이 매우 낮아, 그 서열의 독특함이 있으며, 종래 CD19에 결합하는 FMC63 항체 단편과 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항-CD19 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포는 CD19를 발현하는 양성 세포주에 반응하여 면역세포 활성을 유도하므로 CAR-면역 세포 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0192] 도 1은 CD19\_12.18 항체 단편에 대한 CD19-ECD 단백질에 대한 결합을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 CD19\_12.18 항체 단편에 대한 CD19 양성 세포주인 RaJi, RS4;11 세포주 및 CD19 음성 세포주인 Jurkat 세포주에 대한 결합능을 유세포 분석기를 통하여 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 개발된 항체 단편의 FMC63 항체 단편과의 에피토프를 비교한 결과를 나타낸 도이다. FMC63과의 에피토프 비교를 위하여, 센서칩에 FMC63과 CD19-ECD 단백질을 고정화한 후 본 발명의 CD19\_12.18 항체 단편과의 결합을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 개발된 항체 단편의 결합 부위 확인을 유세포 분석기를 통하여 진행한 결과이다. Mutant CD19이 transient transfection을 통하여 발현된 293세포와 개발된 항체 단편을 이용하였으며, 대조군으로 FMC63 항체를 사용하였다.
- 도 5는 FMC63의 보고된 결합 부위에 FMC63과 개발된 항체 단편의 결합 유무를 확인한 결과이다. 결합 부위 확인은 mutant CD19이 transient transfection을 통하여 발현된 293세포를 이용하여 진행하였다.
- 도 6은 개발된 항체 단편이 연결된 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포독성 T 세포의 활성을 인터페론 감마 분비량으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 친화도 증진 및 인간화를 통하여 개발된 항체 단편의 세포 결합능을 확인한 결과이다. CD19 양성 세포주인 RaJi세포가 분석에 사용되었다. [단위: MFI(mean fluorescence intensity)]
- 도 8a는 친화도가 다른 개발된 항체 단편을 포함하는 세포독성 T세포의 활성을 인터페론 감마의 양으로 확인한 결과이다. CD19 양성 세포주인 RaJi-Luc세포와 세포독성 T세포를 1:5의 비율로 공동 배양한 후, 배양액의 인터페론 감마를 측정하였다. 도 8b는 CD19 양성 세포주인 RaJi-Luc세포와 세포독성 T세포를 공동 배양한 후, 살아남은 RaJi-Luc세포의 luciferase를 측정하여 세포독성을 확인하였다.
- 도 9는 개발된 항체 단편의 활성을 최적화하기 위해, 키메라 항원 수용체를 구성하는 힌지 영역, 막통과 도메인 및 보조 자극 도메인이 변경된 7종의 컨스트럭트를 보여주는 그림이다.
- 도 10은 변경된 7종의 키메라 항원 수용체의 발현을 유세포 분석기를 통하여 분석한 결과이다. 세포독성 T세포에서의 키메라 항원 수용체의 발현을 분석하기 위하여 마커로 CD3를 사용하였다.
- 도 11a는 7종의 키메라 항원 수용체가 발현되는 세포독성 T세포의 활성을 인터페론 감마의 양으로 확인한 결과이다. 표적 세포로 CD19 양성 세포인 RaJi와 CD19 음성 세포인 Jurkat을 사용하였으며, 세포독성 T세포와 1:5의 비율로 공동배양하여 인터페론 감마를 측정하였다. 도 11b는 CD19 양성 세포주인 RaJi-Luc세포와 세포독성 T세포를 공동 배양한 후, 살아남은 RaJi-Luc세포의 luciferase를 측정하여 세포독성을 확인한 결과이다.
- 도 12a는 CD19\_1218, CD19\_1218.81, CD19\_1218.81.79, 및 CD19\_1218.82 항체가 FMC63과 다른 부위에 결합함을 확인하기 위한 octet 실험의 결과이다. 도 12b는 CD19\_1218과 CD19\_1218.81 항체를 이용한 competition ELISA 시험의 결과이다. 경쟁물질이 없는 상태(CD19-ECD-Ck 단독)의 흡광도를 100%로 하여 상대적인 결합을 나타냈다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0193] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0195] **실시예**

[0196] **실시예 1: CD19에 대한 항체 개발**

[0197] 항체 개발을 위해 인간 CD19 단백질의 세포 외부 도메인 (extracellular domain, ECD) 부위를 동물세포를 이용하여 생산하였다. ECD의 C-말단에 인간 IgG1의 힌지 및 Fc 부위 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)가 결합된 형태(CD19-ECD-Fc)와 His tag이 결합된 형태(CD19-ECD-His)의 DNA를 pCEP4 (Invitrogen, Cat. No. V044-50)에 Hind-III와 BamH-I 제한효소를 이용하여 클로닝 하였다. 이어, FreeStyle 293F(Invitrogen, Cat. No. R790-07) 세포에 폴리에틸렌이민 (Polyscience Inc., Cat. No. 23966)을 이용하여 상기 클로닝된 벡터를 일시 형질전환(transient

transfection)시키고, 세포 배양액으로부터 protein-A Ceramic HyperD F 레진(PALL, Cat No. 20078-028) 또는 Ni-NTA Superflow(Qiagen, Cat No. 30410)를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질을 Protein assay dye(Bio-Rad, Cat. No. 500-0006)를 이용하여 정량하고 SDS-PAGE 후 쿠마시 블루 염색을 통하여 농도 및 순도를 확인하였다. 확보한 CD19-ECD-His 단백질을 닭 피하에 주사하고, 면역이 완료된 닭으로부터 비장 및 활액낭을 얻었다. 채취한 비장 및 활액낭 시료로부터 TRI 시약(Invitrogen, 미국)을 사용하여 total RNA를 추출하고, 이로부터 cDNA를 합성하였다. 면역글로불린의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역에 특이적인 공지의 프라이머를 이용하여 항체 단편 라이브러리를 제작하였다(표 1, Phage display: a laboratory manual, Carlos Barbas III, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press 참조).

표 1

[0198]

항체 단편 라이브러리 제작에 사용된 프라이머

구분	센스	안티센스
중쇄 가변 영역 프라이머	5 ' GGTCAGTCTCTAGATCTTCGGCGGTGGTGGCAGCT CCGGTGGTGGCGGTTCCGCCGTGACGTTGGACGAG 3 ' (SEQ ID NO: 24)	5 ' CTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGGAGGAGACGATGACT TCGGTCC 3' (SEQ ID NO: 25)
경쇄 가변 영역 프라이머	5 ' GTGGCCAGGCGGCCCTGACTACGCCGTCTCGGTGT C 3' (SEQ ID NO: 26)	5' GGAAGATCTAGAGGACTGACCTAGGACGGTCAGG 3' (SEQ ID NO: 27)
오버래핑 PCR 프라이머	5 ' GAGGAGGAGGAGGAGGAGGTGGCCAGGCGGCCCTGA CTCAG 3' (SEQ ID NO: 28)	5 ' GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGCCA CTAGTGGAGG 3' (SEQ ID NO: 29)

[0200]

제작된 닭 면역 라이브러리와 CD19-ECD-Fc 단백질을 항원으로 이용하여 파지 바이오-패닝(bio-panning)을 실시하였다. 항체 라이브러리는 VCSM13 헬퍼 파지(helper phage)를 이용하여 파지 형태로 수득하여 패닝에 이용하였다. 패닝 라운드(panning round)는 4 라운드까지 실시하였으며, 친화도가 높은 파지가 선택적으로 잘 선별될 수 있는 패닝 전략으로 패닝 라운드 횟수가 늘어감에 따라 항원의 양을 줄이고 세척 횟수는 늘리는 방법을 적용하였다. 타겟 항원에 결합한 파지의 수는 ER2537 *E. coli*(New England Biolabs, Cat. No. 801-N)를 이용하여 하기와 같이 적정하였다. 바이오-패닝 각 라운드에서 얻은 바인더 파지(binder phage)를 pH 2.2의 글라이신 완충액으로 용출하였다. SB 배양액(super broth medium)에서 하룻밤동안 배양한 ER2537 *E. coli*를 새로운 SB 배양액을 이용하여 1/200으로 희석하여 계대하였다. 이어서, 3시간 동안 37°C에서 추가 배양하여 로그 파지(log phage)에 도달하도록 하였다. 100 µl의 신선한 ER2537 *E. coli*와 10 µl의 희석된 파지를 1.5 ml 튜브에서 혼합한 다음, 30분 동안 배양한 후 암피실린(ampicillin) LB 플레이트(lysogeny broth agar plate)에 도말하였다. 이어서, 37°C에서 하룻밤 동안 배양하여 생성된 콜로니(colony) 수와 희석 인자를 적용하여 파지 수를 측정하였다.

[0201]

바이오-패닝 각 라운드에서 얻은 바인더 파지는 ER2537 *E. coli*에 감염시켜 콜로니 형태로 유지한 상태에서 ELISA 방법으로 각 항원에 대한 결합여부를 확인하였다. 파지를 감염시켜 얻은 콜로니를 SB 배양액에 접종한 다음 OD<sub>600</sub>에서 0.5가 될 때까지 배양하였다. 이어서, 0.5 mM의 IPTG를 넣고 30°C에서 셰이킹(shaking) 배양하여 항체 단편 단백질이 과발현되도록 하였다. CD19에 특이적으로 결합하는 항체는 CD19-ECD-Fc 단백질을 이용한 ELISA와 CD19 과발현 세포주인 Raji 세포를 이용한 flow cytometry 방법으로 선별하였다. 이를 통해 인간 CD19에 대한 결합능이 가장 우수한 항체 CD19\_12.18을 선별하였으며, 선별된 CD19\_12.18 항체의 가변부위의 아미노산 서열은 표 2와 같았다.

표 2

[0202]

CD19\_12.18 항체의 CDR(complementarity determining region)의 아미노산 서열

구분	경쇄	중쇄
CDR1	SGGYSSYYG (SEQ ID NO: 4)	SYDMG (SEQ ID NO: 1)
CDR2	ESNKRPS (SEQ ID NO: 5)	GIDDDGRYTSYGSVDG (SEQ ID NO: 2)
CDR3	GGWDSTHAGI (SEQ ID NO: 6)	GNAGWIDA (SEQ ID NO: 3)

[0203]

선별된 CD19\_12.18 항체의 결합을 정량적으로 확인하기 위해서 상기 가변부위를 포함하는 항체 단편을 동물세포

를 이용하여 생산하였다. 항체 단편의 C-말단에 인간 IgG1의 힌지 및 Fc 부위(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)가 결합된 형태의 DNA를 pCEP4 벡터(Invitrogen, Cat. No. V044-50)에 클로닝하였다. 이어서, FreeStyle™ 293F 세포(Invitrogen, Cat. No. R790-07)에 상기 클로닝 된 벡터를 일시적으로 형질전환시키고, 세포 배양액으로부터, Fc 융합 단백질 형태의 항체(Anti-CD19 scFv-Fc)를 확보하였다.

[0204] 선별된 항체의 결합능을 측정하기 위하여 CD19-ECD 카파 경쇄 융합단백질(CD19-ECD-Ck)을 코팅 항원으로 이용한 ELISA를 진행하였다. CD19-ECD 단백질이 코팅된 플레이트에 정제된 항체 단편(Anti-CD19 scFv-Fc)을 농도 의존적으로(50, 12.5, 3.1 µg/mL) 처리하였으며, 2차 항체(Anti-human Fc HRP)를 처리한 후 TMB로 발색반응을 발생시켜 ELISA 리더기(Victor X3 PerkinElmer)를 이용하여 OD<sub>450</sub> 값을 측정하였다(도 1). 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 CD19\_12.18 항체는 CD19-ECD 단백질에 특이적으로 결합하는 항체임을 확인하였다.

[0205] 또한, CD19-ECD 단백질에 결합하는 CD19\_12.18에 대해 CD19 양성 세포주인 RaJi, RS4;11 세포주와 CD19 음성 세포주인 Jurkat에 대한 결합능을 확인하였다. 정제된 항체 단편(Anti-CD19 scFv-Fc)을 CD19 양성 세포주인 RaJi, RS4;11과 CD19 음성 세포주인 Jurkat에 처리하고, 세포주에 결합한 항체 단편은 항-인간 IgG-FITC를 이용하여 염색하였다. 세포주에 결합한 항체 단편에 대한 분석은 유세포 분석기를 통하여 측정하였다(도 2). 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 CD19\_12.18 항체는 CD19 양성 세포에 특이적으로 결합하는 항체임을 확인하였다.

[0207] **실시예 2. 개발된 항체 단편의 FMC63과의 에피토프 비교**

[0208] 개발된 항체가 B 세포 유래 혈액암 치료를 위한 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)에 사용되는 마우스 유래 CD19 항체인 FMC63과 에피토프가 중복되는지 확인하기 위해서 Octet(Pall ForteBio) 기기를 이용하여 에피토프 비닝(epitope binning)을 진행하였다. AR2G 센서칩 (ForteBio, Cat. No. 18-5092(tray), 18-5093(pack), 18-5094(case))에 FMC63-Fc를 10 µg/mL의 농도로 EDC/NHS를 이용한 아민 커플링 방법으로 고정시켰다. FMC63이 고정된 센서칩에 CD19-ECD 카파 경쇄 융합 단백질(CD19-ECD-Ck)을 10 µg/mL의 농도로 10분 동안 결합시키고 이후 5분 동안 FMC63과 CD19-ECD 사이의 결합을 안정화시켰다. 이후 본 발명의 항체인 CD19\_12.18 또는 FMC63을 10 µg/mL의 농도로 10분 동안 결합시키고, 10분간 항원과 항체 사이의 결합을 안정화 시켰다. FMC63을 고정한 이후에 모든 항체 항원은 kinetics buffer (ForteBio, cat No. 18-1092)를 이용하여 희석하였고, 안정화시키는 단계에서도 역시 같은 buffer를 사용하였다. 만약 2차로 결합시킨 항체가 FMC63과 결합된 CD19-ECD 단백질에 추가 결합한다면, 이는 FMC63과 에피토프를 공유하지 않는 항체로 해석할 수 있다. 도 3에 나타낸 바와 같이, FMC63은 추가로 결합하지 않는 반면 본 발명자들에 의해 개발된 항체인 CD19\_12.18은 FMC63에 결합된 CD19-ECD에 추가 결합함을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 CD19\_12.18 항체는 기존의 FMC63 항체와 결합하는 에피토프가 상이함을 알 수 있었다.

[0209] **실시예 3: 개발된 항체 단편의 에피토프 검증**

[0210] 개발된 항체 단편의 에피토프를 확인하기 위한 방법으로, 다양한 mutant CD19을 구축한 후 개발된 항체 단편의 결합을 유세포 분석기를 이용하여 확인하였다. 보다 구체적으로, CD19 단백질의 발현을 확인하기 위해서 pLenti6-V5/DEST 렌티바이러스 벡터 (Invitrogen, 미국)에 T2A system을 이용하여 GFP 단백질을 동시에 발현하는 bi-cistronic expression system(mutant CD19-T2A-GFP)을 ClaI/XhoI으로 절단 및 결합시켰다. 제조된 컨스트럭트는 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 항체의 결합 여부는 full length CD19 단백질을 transient transfection을 통하여 발현한 293 세포에 정제된 항체 단편(Anti-CD19 scFv-Fc)을 결합하여 유세포 분석기로 분석하는 방법을 사용하였다.

[0211] 먼저, Recombinant human CD19 (hCD19, UniProtKB: P15391, SEQ ID NO: 92) 및 cynomolgus monkey CD19 (cCD19, UniprotKB: G7Q0T7, SEQ ID NO: 93) 단백질과의 결합능을 측정하여, 개발된 항체가 FMC63과 동일하게 cCD19에 cross-reactivity가 없음을 확인하였다 (도 4). 이를 바탕으로 개발된 항체의 에피토프를 규명하기 위해서 특정 위치의 아미노산을 cynomolgus monkey의 아미노산으로 변형한 mutant CD19(mtCD19)을 개발하였다. 기존에 보고된 FMC63 결합 부위 이외의 부분 중 hCD19과 cCD19 사이에 차이가 나는 12개 residue에 대해서 cCD19의 아미노산을 갖는 mutant CD19을 개발하고 항체의 결합 능력을 확인하였다. GFP-positive 세포에 대한 결합 여부는 mean fluorescence intensity (MFI)를 바탕으로 분석하였다. 그 결과 test된 12개 mutant 중에서 6개 residue(T51V, S53C, E55D, L58F, K59E, K63N)가 개발된 항체인 CD19\_12.18과 hCD19 사이의 결합에 중요한 역할을 하고 있었으며, 특히 이들 중 3개 residue(L58F, K59E, K63N)의 경우 CD19\_12.18의 결합을 완전히 억제하여 key residues 임을 확인하였다 (도 4). 이들 주요 6개 mutant hCD19에 FMC63은 온전히 결합하기 때문에

해당 mutant 들이 hCD19의 전체 구조에 영향을 주어 CD19\_12.18이 결합하지 않는 것이 아님을 확인할 수 있었다.

[0212] 추가적으로 CD19\_12.18 항체가 FMC63의 결합에 중요한 부위가 변경된 mutant에 결합할 수 있음을 확인하기 위해서 FMC63 결합에 중요할 것으로 예상되는 부위에 대한 5종의 mutant를 제작(Sommermeier D et al., Leukemia, 2017, 31(10):2191)하여 시험을 진행하였다. 참고문헌의 결과와 동일하게, FMC63은 218 residue가 arginine으로 변경되고 224 residue에 serine이 추가된 mutant(H218R/KSS)에서만 결합에 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 개발된 항체인 CD19\_12.18은 변경된 mutant에서도 정상적으로 결합하는 것을 확인함으로써 FMC63과는 상이한 부위에 결합한다는 사실을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0214] **실시예 4: 개발된 항체 단편이 연결된 키메라 항원 수용체를 포함하는 렌티바이러스의 제작**

[0215] 개발된 항체 CD19\_12.18을 이용하여 키메라 항원 수용체를 개발하였다. 키메라 항원 수용체는 CD8 리더, scFv 형태의 CD19\_12.18, CD8 힌지 및 막횡단 영역, CD137 세포질 영역, 및 CD3제타의 세포질 영역을 코돈 최적화한 후 pLenti6-V5/DEST 렌티바이러스 벡터 (Invitrogen, 미국)에 SpeI/XhoI으로 절단 및 결합시켰다. 제조된 컨스트럭트(서열번호 23)는 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

[0216] 제조된 렌티바이러스 컨스트럭트를 바이러스 외피 단백질인 VSV-G(vesicular stomatitis indiana virus G protein)를 코딩하는 핵산과 gag, pol 및 rev 유전자를 포함하는 플라스미드인 pCMV-dR8.91과 함께 Lenti-X 293T(Takara Bio Inc., 일본) 세포주에 형질도입시켰다. 형질도입은 리포펙타민 2000(Invitrogen, 미국)을 사용하여 제조사의 프로토콜대로 수행하였다. 72시간 후, 렌티바이러스가 함유된 배양액을 원심분리형 필터장치 (Millipore, 미국)를 사용하여 10배 농축하여 보관하였다.

[0218] **실시예 5. 개발된 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 세포독성 T 세포의 제조**

[0219] 실시예 3에서 제조된 렌티바이러스를 이용하여, CD19\_12.18 항체 단편(scFv)을 포함하는 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 세포독성 T 세포를 제조하였다.

[0220] 먼저, 인간의 naive T 세포를 분리하여 Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28(ThermoFisher scientific, 미국)로 24시간 동안 자극하고, 폴리브렌(Sigma-Aldrich, 미국) 및 상기 렌티바이러스를 상기 세포에 첨가하여 24시간 동안 배양하며 형질도입 시켰다. 이후, IL-2(Gibco, 미국)가 포함된 배지로 교체하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 배양하였다. 그 후, CD19\_12.18 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체의 형질 도입 여부를 키메라 항원 수용체를 구성하는 CD3z 항체(BD, 미국)와 웨스턴 블랏(Western blot) 방법을 이용하여 분석하였다(도 4).

[0221] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 개발된 CD19\_12.18 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체는 T 세포의 표면에 발현될 수 있음을 확인하였다. 위와 같이 제조된 CD19\_12.18 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 T 세포(CD19\_12.18 CAR-T cell)는, 제조 후 24시간 이내로 이후의 실험에 사용하였다.

[0223] **실시예 6. 개발된 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 세포독성 T 세포의 활성 확인**

[0224] 실시예 4에서 제조한 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 세포독성 T세포(CD19\_12.18 CAR-T cell)를 사용하여, 상기 T 세포가 세포 표면의 CD19을 인식함으로써, 키메라 항원 수용체 세포의 활성화를 유도하는지 여부를 확인하였다.

[0225] 구체적으로, CD19 양성 세포주인 RaJi와 CD19 음성 세포주인 Jurkat E6.1 세포주를 10% 소태아혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 RPMI-1640배지에 배양하여 사용하였다. 먼저, CD19 양성 혹은 음성 세포주를 바닥이 둥근 형태의 96-웰 플레이트에 웰 당 3x10<sup>4</sup>개가 되도록 분주하였다. 배양 상등액을 제거한 뒤, 웰 당 처리 비율에 맞게 제조한 키메라 항원 수용체 T세포(CD19\_12.18 CAR-T cell)를 첨가하고, 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 그 결과, 배지에 분비된 인터페론 감마의 양을 ELISA 키트를 사용하여 제조사의 프로토콜대로 측정하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 이때, 대조군으로서 세포를 배양하지 않은 플레이트에 키메라 항원 수용체 T 세포를 첨가한 군(Effector T cell only), 세포를 배양한 플레이트에 아무것도 첨가하지 않은 군(Target cell only)을 사용하였다.

[0226] 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 CD19\_12.18 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 T 세포(CD19\_12.18 CAR-T cell)와 CD19 양성 세포주(RaJi)에서 인터페론 감마의 분비가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 CD19\_12.18 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 세포독성 T세포(CD19\_12.18 CAR-T cell)는 키메라 항원 수용체를 사용하여 CD19 양성 세포(RaJi) 표면의 CD19을 인식함으로써, 키메라 항원

수용체 세포의 활성화를 유도함을 확인하였다.

**[0228] 실시예 7. 개발된 항체 단편에 대한 친화도 증진 및 인간화 항체 개발**

**[0229]** CD19에 대하여 CD19\_12.18대비 우수한 결합력을 가진 항체 단편을 확보하기 위하여 중쇄와 경쇄 라이브러리를 조합하여 새로운 서브 라이브러리를 제작하였다. 서브 라이브러리를 생성하기 위하여, NNK 동의 코돈 (degenerate codons)을 함유하는 올리고뉴클레오티드가 사용되었으며, 이 때 CD19\_12.18의 서열이 70% 이상 유지되도록 하였다. CD19\_12.18 항체 단편은 template DNA로 사용되었다. 무작위 코돈은 PCR에 의해 6개의 CDR에 도입되었다. 증폭된 항체 단편은 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 미국)에 의해 정제되었다. 항체 단편 및 pComb3XSS 벡터는 sfi I 제한 효소로 절단되었고 라이게이션 후 ER2537에 형질 주입하여 파지 라이브러리를 제작하였다. 제작된 파지 라이브러리를 기반으로 실시예 1과 동일한 방법으로 항체를 선별하였다.

**[0230]** 선별된 항체의 인간화 항체를 CDR 그래프팅 방법을 이용하여 개발하였다. 개발된 항체의 CDR을 이식받을 인간 항체는 IMGT/V-QUEST를 이용하여 염기서열 기준 유사성이 높은 인간 생식선(germline) 항체 유전자의 V 및 J 유전자를 선별하였다(Brochet, X. et al., Nucl Acids Res. 36:503-508(2008)). 개발된 인간화 항체들을 Fc tag 형태로 FreeStyle™ 293F 세포주를 이용하여 생산하였다. 중쇄사슬의 V 유전자와 J 유전자로 IGHV3-74\*01과 IGHJ5\*01이, 경쇄사슬의 V 유전자와 J 유전자로 IGLV1-51\*02와 IGLJ2\*01이 사용되었다. 개발된 항체들의 중쇄가 변영역 및 경쇄가 변영역의 아미노산 서열은 표 3 및 표 4와 같다.

**표 3**

친화도 증진이 진행된 항체의 중쇄 CDR 부위의 아미노산 서열

항체	제1중쇄	제2중쇄	제3중쇄
hzCD19_1218.81	SYDMG	GIDDDGRYTSYGSAVDG	GNAGWIDA
hzCD19_1218.82	SYDMG	GIDDDGRYTSYGSAVDG	GNAGWIDA
hzCD19_1218.81.12	SYDMG	GIDDDGRYTSYGSAVDG	GNAGWIST (SEQ ID NO: 30)
hzCD19_1218.81.17	SYDMG	GIDDDGRYTSYGSAVDG	GNAGWIET (SEQ ID NO: 31)
hzCD19_1218.81.52	SYDMG	GIDDDGRYTSYGSAVDG	GNAGWILT (SEQ ID NO: 32)
hzCD19_1218.81.55	SYDMG	GIDDDGRYTSYGSAVDG	GNAGWIQN (SEQ ID NO: 33)
hzCD19_1218.81.64	SYDMG	GIDDDGRYTSYGSAVDG	GNAGWIQT (SEQ ID NO: 34)
hzCD19_1218.81.79	SYDMG	GIDDDGRYTSYGSAVDG	GNAGWIDH (SEQ ID NO: 35)

**표 4**

친화도 증진이 진행된 항체의 경쇄 CDR 부위의 아미노산 서열

항체	제1경쇄	제2경쇄	제3경쇄
hzCD19_1218.81	SGGYSSYYG	ESNKRPS	GGLTPTHAGI (SEQ ID NO: 40)
hzCD19_1218.82	SGGYSSYYG	ESNKRPS	GQSTRTHAGI (SEQ ID NO: 41)
hzCD19_1218.81.12	SGGYSSYYG	ESDKRPA (SEQ ID NO: 36)	GGLTPTHAGI
hzCD19_1218.81.17	SGGYSSYYG	ESNKRPS	GGLTPTHAGI
hzCD19_1218.81.52	SGGYSSYYG	ETDKRPQ (SEQ ID NO: 37)	GGLTPTHAGI
hzCD19_1218.81.55	SGGYSSYYG	ESGKRPA (SEQ ID NO: 38)	GGLTPTHAGI
hzCD19_1218.81.64	SGGYSSYYG	ESQKRPL (SEQ ID NO: 39)	GGLTPTHAGI
hzCD19_1218.81.79	SGGYSSYYG	ESNKRPS	GGLTPTHAGI

**[0234]** 친화도 증진 및 인간화를 통해 선별된 항체에 대해 CD19 양성 세포주인 RaJi 세포주에 대한 결합능을 확인하였다. 정제된 항체 단편을 CD19 양성 세포주인 RaJi에 농도 의존적으로 처리하고, CD19 양성 세포주인 RaJi에 결합한 항체 단편은 항-인간 IgG-FITC를 이용하여 염색하였다. RaJi 세포주에 결합한 항체 단편에 대한 분석은 유세포 분석기를 통하여 측정하였으며(도 7), 결합능의 분석은 Graphpad Prism으로 수행하였다(표 5). 이를 통해서 CD19\_12.18 대비 결합능이 향상된 항체들을 확보하였다.

**표 5**

[0236]

친화도 증진된 항체에 대한 RaJi 세포주에서의 결합능(EC<sub>50</sub>)

항체	EC <sub>50</sub> (μg)
CD19_12.18	0.213
hzCD19_1218.81	0.032
hzCD19_1218.82	0.078
hzCD19_1218.81.12	0.034
hzCD19_1218.81.17	0.038
hzCD19_1218.81.52	0.038
hzCD19_1218.81.55	0.059
hzCD19_1218.81.64	0.033
hzCD19_1218.81.79	0.030

[0238]

**실시예 8: 친화도 증진 및 인간화가 이루어진 항체 단편이 연결된 키메라 항원 수용체를 포함하는 렌티바이러스의 제작**

[0239]

개발된 항체 중 친화도가 다른 3종(hzCD19\_1218.81, hzCD19\_1218.82, hzCD19\_1218.81.79)을 이용하여 키메라 항원 수용체를 개발하였다. 키메라 항원 수용체는 CD8 리더, scFv 형태의 개발된 항체, CD8 힌지 및 막횡단(transmembrane) 영역, CD137 세포질 영역, 및 CD3제타의 세포질 영역을 GeneOptimizer(Invitrogen) 알고리즘을 이용하여 코돈 최적화한 후 프로모터가 EF-1 alpha로 변경된 pLenti6.3/V5-TOPO 렌티바이러스 벡터(Invitrogen, 미국)에 SpeI/PacI으로 절단 및 결합시켰다. 제조된 컨스트럭트는 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

[0240]

제조된 렌티바이러스 컨스트럭트를 바이러스 외피 단백질인 VSV-G(vesicular stomatitis indiana virus G protein)를 코딩하는 핵산과 gag, pol 및 rev 유전자를 포함하는 플라스미드인 pCMV-dR8.91과 함께 Lenti-X 293T(Takara Bio Inc., 일본) 세포주에 형질도입시켰다. 형질도입은 리포펙타민 2000(Invitrogen, 미국)을 사용하여 제조사의 프로토콜대로 수행하였다. 렌티바이러스가 함유된 배양액을 Lenti-X concentrator(Takara Bio Inc., 일본)를 사용하여 농축하여 보관하였다.

[0242]

**실시예 9. 친화도 증진 및 인간화가 이루어진 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 세포독성 T 세포의 제조 및 활성화 확인**

[0243]

실시예 8에서 제조된 렌티바이러스를 이용하여, CD19\_12.18 항체 단편(scFv)을 포함하는 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 세포독성 T 세포를 실시예 5의 방법을 이용하여 제조하였다. 이를 통하여 키메라 항원 수용체가 표면에 제시된 세포독성 T세포들을 사용하여, 상기 T 세포가 세포 표면의 CD19을 인식함으로써, 키메라 항원 수용체 세포의 활성화를 유도하는지 여부를 확인하였다.

[0244]

구체적으로, CD19 양성 세포주인 RaJi에 GFP-Luciferase가 발현되는 렌티바이러스를 도입하여 유전자 도입 세포주인 RaJi-Luc 세포주를 구축하여 실험에 사용하였다. 먼저, RaJi-Luc 세포주를 바닥이 둥근 형태의 96-웰 플레이트에 웰 당 3x10<sup>4</sup>개가 되도록 분주하였다. RaJi-Luc 세포주(T)가 분주된 플레이트에 웰 당 처리 비율(T:E=1:2, 1:5, 또는 1:10)에 맞게 제조한 세포독성 T세포(E)를 첨가하고, 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지에 분비된 인터페론 감마의 양을 ELISA 키트를 사용하여 제조사의 프로토콜대로 측정하였고, 세포독성 T세포의 독성 효과를 luciferase 측정(Bio-Glo Luciferase assay system, Promega, 미국)을 통하여 확인하였다.

[0245]

도 8a에 나타난 바와 같이, 본 발명의 항체 단편을 포함하는 세포독성 T 세포(E)와 RaJi-Luc 세포(T)가 처리된 실험군에서 인터페론 감마의 분비가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 본 발명의 항체 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체의 세포 독성 효과는 세포독성 T 세포와 RaJi-Luc의 배양 후, 남아있는 RaJi-Luc 세포주를 3X Lysis buffer(75mM Tris(pH 8.0), 30% glycerol, 3% Triton X100)로 파쇄하여 용출되어 나오는 luciferase를 substrate와 반응시켜 확인하였다. Raji-Luc 세포만 배양한 well에서 나오는 signal을 100% 하여 lysis 비율을 결정하였다. 본 발명의 항체 단편이 포함된 키메라 항원 수용체 T 세포에서는 처리 비율에 따라 세포 독성 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, CD19\_12.18 대비 친화도가 증진된 항체 단편이 포함된 세포독성 T 세포에서 세포 독성 효과가 우수하게 나타남을 확인하였다(도 8b).

[0247]

**실시예 10: 힌지 영역, 막통과 도메인 및 보조 자극 도메인의 변경을 통한 키메라 항원 수용체의 개발**

[0248] 개발된 항체 단편을 이용한 키메라 항원 수용체 활성을 최적화하기 위하여 키메라 항원 수용체를 구성하는 힌지 영역(CD8, CD28, Fc), 막횡단 도메인(CD8, CD28, ICOS) 및 보조 자극 도메인(CD137, CD28, ICOS, CS3)의 변경을 통해 새로운 키메라 항원 수용체(CAR2 내지 CAR7)를 개발하였으며, 활성을 확인하기 위하여 CD19 항원에 결합하는 항체 단편 부위는 hzCD19\_1218.81을 이용하였다(도 9). CAR1 내지 CAR7 각각의 키메라 항원 수용체는 실시예 8과 동일한 방법으로 프로모터가 EF-1 alpha로 변경된 pLenti6.3/V5-TOPO 렌티바이러스 벡터(Invitrogen, 미국)에 절단 및 결합시켰으며 제조된 컨스트럭트는 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 상기 개발된 CAR1 내지 CAR7의 컨스트럭트의 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 74 내지 87의 서열로 서열목록에 첨부되었다. 개발된 각각의 컨스트럭트는 실시예 8의 프로토콜대로 렌티바이러스를 제조 및 농축하여 보관하였다.

[0249] 개발된 키메라 항원 수용체의 활성을 확인하기 위하여 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 세포독성 T세포를 확보하였고, 상기 T 세포가 CD19을 발현하는 세포에 특이적으로 활성을 유도하는지 확인하였다.

[0250] 먼저 확보된 세포독성 T세포에서 CAR가 발현되는 양상을 확인하였다. 키메라 항원 수용체의 발현은 CD19-ECD를 1차 결합시킨 후, 2차 항체로 anti-human IgG FITC(Invitrogen, A11013)를 이용하여 관찰하였다. 이 때, 확인된 세포가 T세포인가를 확인하기 위하여 Anti-human CD3 PE(Biolegend, 317308)를 동시에 결합시켜 유세포 분석기로 분석하였다. 분석 결과, 힌지 영역이 CD8에서 CD28 또는 Fc로 변경된 컨스트럭트(CAR2, CAR3)에서 기존의 CD8 힌지를 쓰던 컨스트럭트 대비 CAR의 발현이 크게 낮아지는 것을 확인하였다. 또한, 막횡단 도메인 및 보조 자극 도메인을 변경한 컨스트럭트에서는 ICOS 막통과 도메인 및 보조 자극 도메인을 사용하는 경우(CAR5)에 CAR의 발현이 상대적으로 낮아지는 것을 확인하였다(도 10).

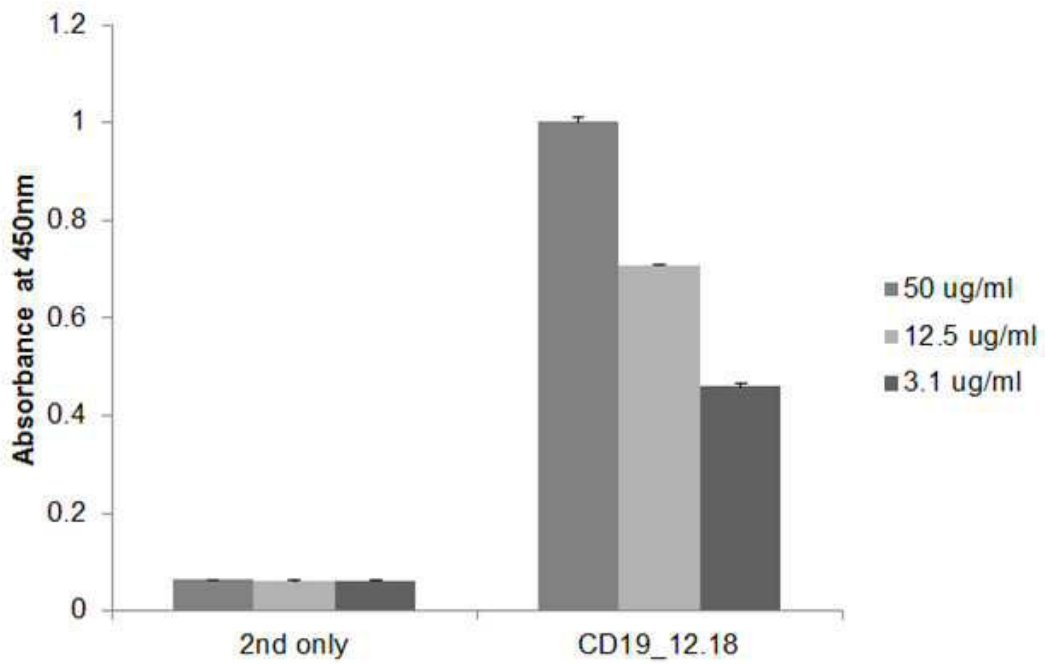
[0251] 개발된 세포독성 T세포에 대한 활성은 실시예 8과 동일한 방법으로 진행하였다. CD19 양성인 RaJi-Luc 세포주와 CD19 음성인 Jurkat 세포주를 제조한 세포독성 T세포의 24시간 배양액에서 인터페론 감마의 양과 세포독성 효과를 측정하였다. 도 11a에 나타난 바와 같이, CD19 양성인 RaJi-Luc와 세포독성 T세포가 같이 배양된 실험군에서만 인터페론 감마의 양이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 실험에 사용된 CAR 컨스트럭트 중, 발현이 가장 좋았던 컨스트럭트 CAR1이 인터페론 감마의 분비를 가장 많이 유도하는 것을 알 수 있었다. 한편, 세포독성 효과에서는 인터페론 감마 분비와는 다르게 컨스트럭트 CAR1, CAR4, CAR5, CAR6이 거의 동등하게 우수한 활성을 보였다(도 11b).

[0253] **실시예 11. CD19\_1218 및 친화도 증진이 이루어진 개발 항체들의 결합부위 분석**

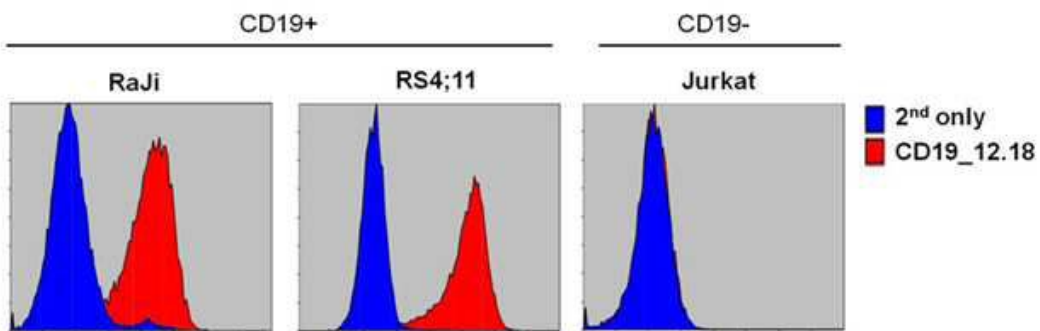
[0254] 본 발명에서 개발된 CD19\_1218 항체 및 이로부터 친화도 증진 및 인간화가 이루어진 항체들이 CD19\_1218 항체와 동일한 결합부위를 갖는지 분석하기 위해서 epitope binning과 competition ELISA를 진행하였다. 실시예 2와 같이, FMC63 항체를 immobilization한 sensor chip에 CD19-ECD 단백질을 결합시킨 후 FMC63, CD19\_1218, hzCD19\_1218.81, hzCD19\_1218.81.79, 및 hzCD19\_1218.82 항체를 각각 추가로 결합시켰다(도 12a). 그 결과 FMC63 항체는 추가 결합을 못하였지만 CD19\_1218을 포함한 4종의 항체는 추가로 결합함을 확인하였다. Competition ELISA는 CD19\_1218.81-Fc 항체를 ELISA plate에 2 µg/mL의 농도로 코팅하고 CD19-ECD-Ck(3 µg/mL) 단독, 혹은 CD19-ECD-Ck(3 µg/mL)와 CD19\_1218-Fc 항체(300 µg/mL)의 혼합액을 가하여 결합시켰다. 이후 CD19\_1218.81-Fc 항체에 결합한 CD19-ECD-Ck 단백질을 anti-Ck-HRP 항체를 이용하여 측정하였다. 그 결과 CD19\_1218 항체가 있는 경우에 CD19\_1218.81-Fc와 CD19-ECD-Ck 단백질의 결합이 억제됨을 확인하였다(도 12b). 이상의 결과를 바탕으로 개발된 항체들이 CD19\_1218 항체와 동일한 결합 부위를 가짐을 확인하였다.

도면

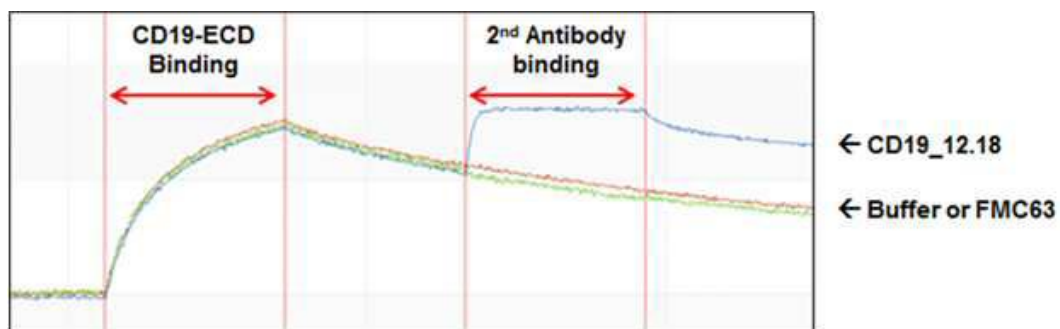
도면1



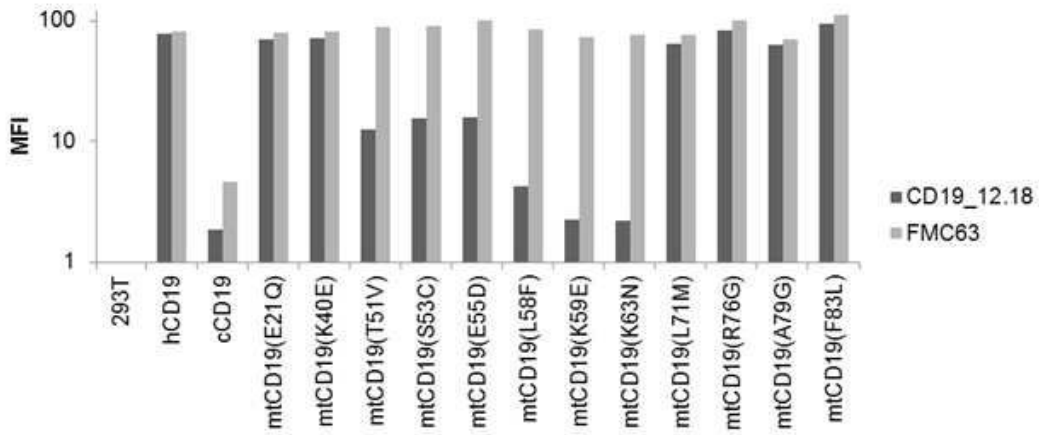
도면2



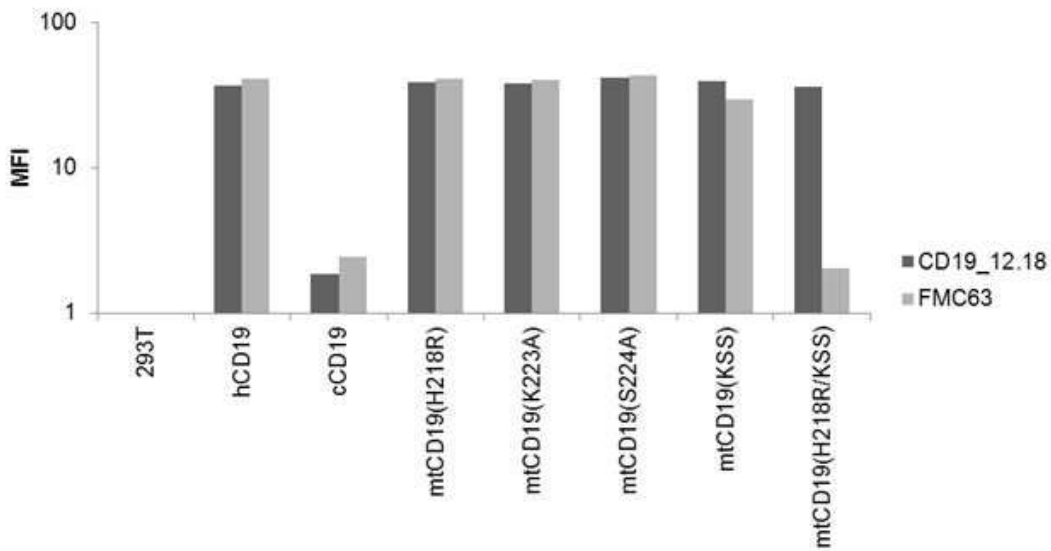
도면3



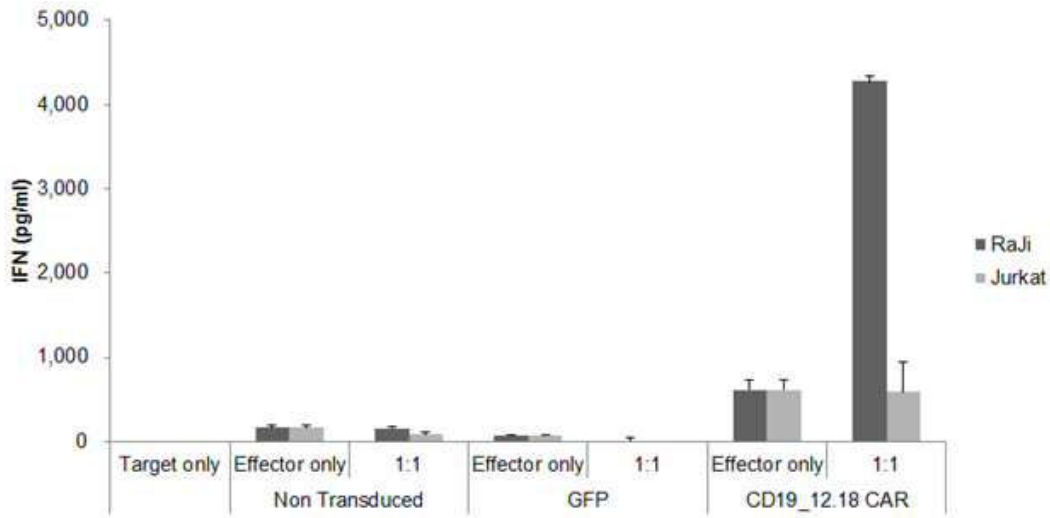
도면4



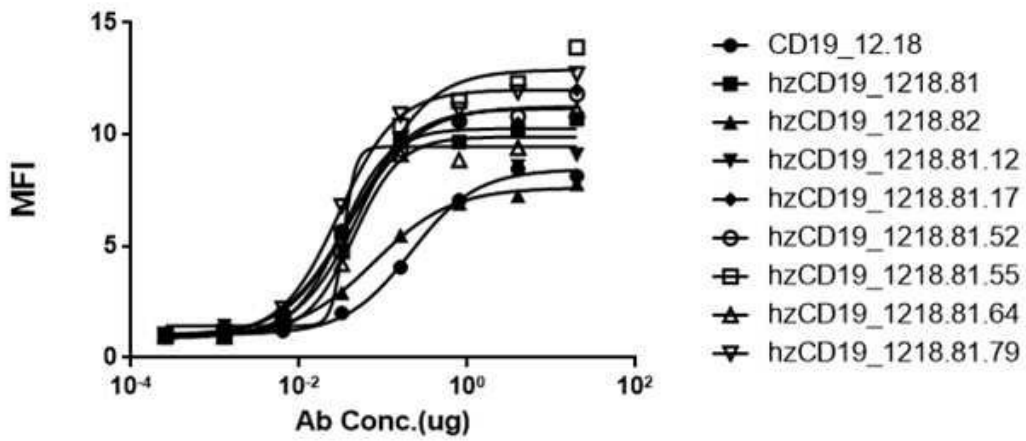
도면5



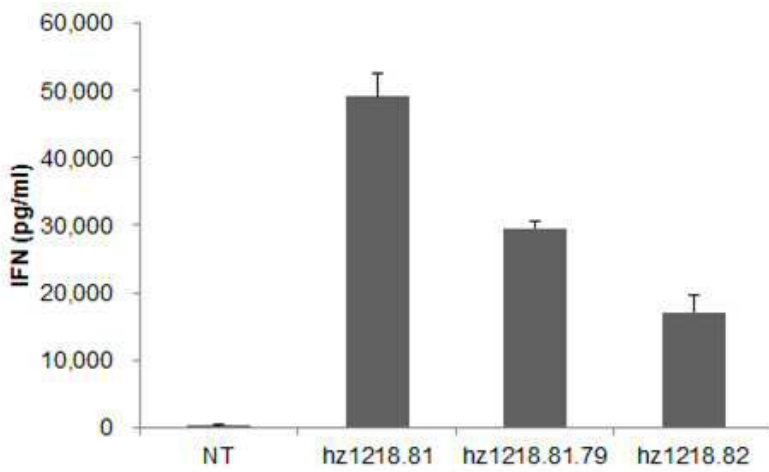
도면6



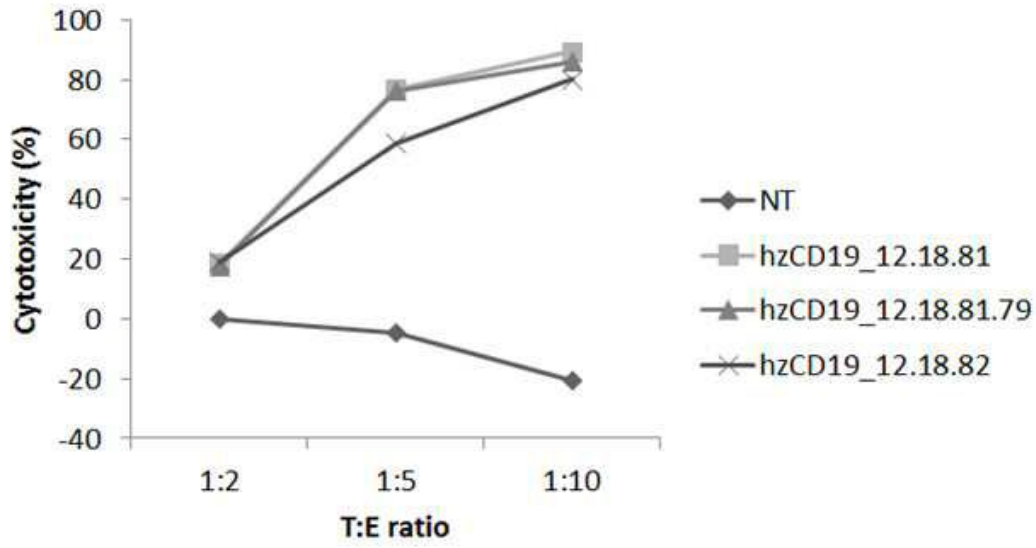
도면7



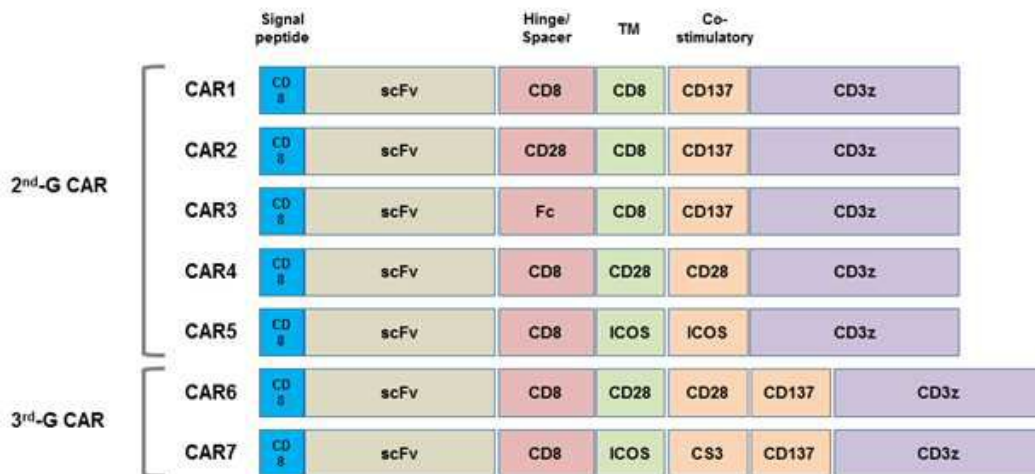
도면8a



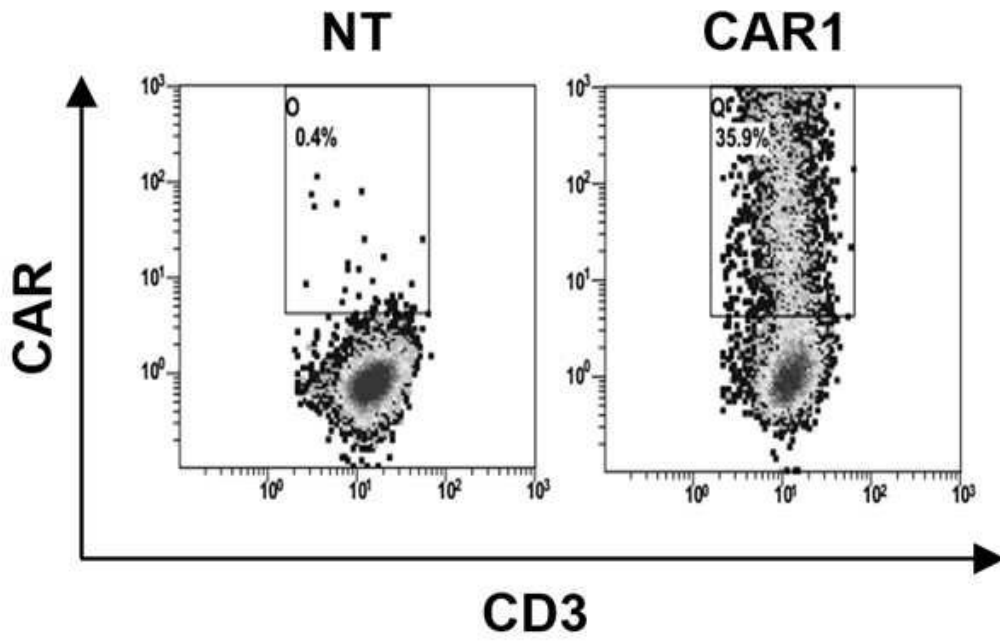
도면8b



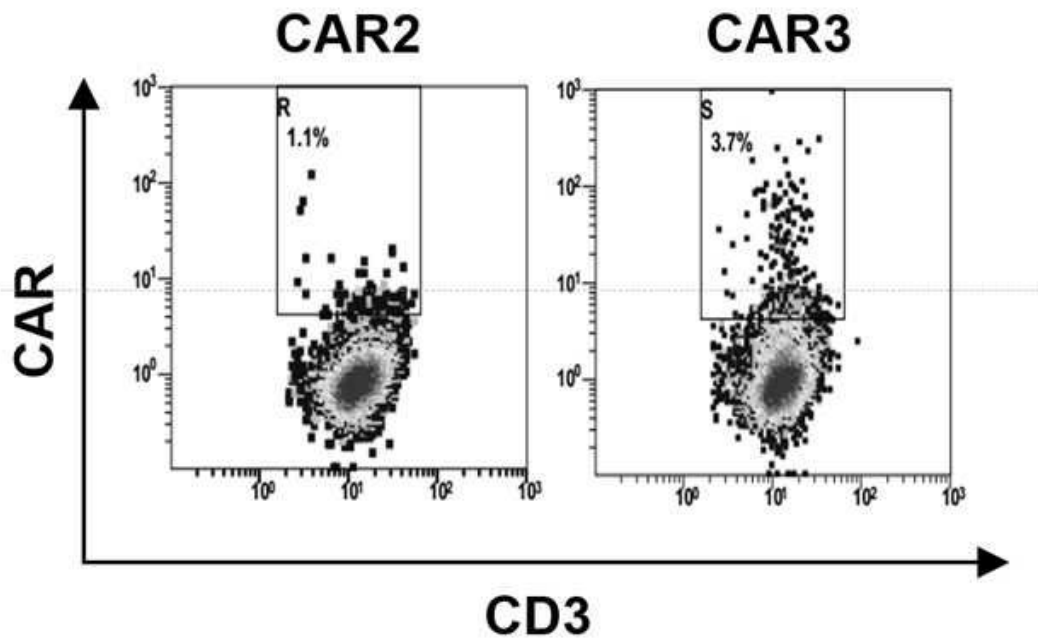
도면9



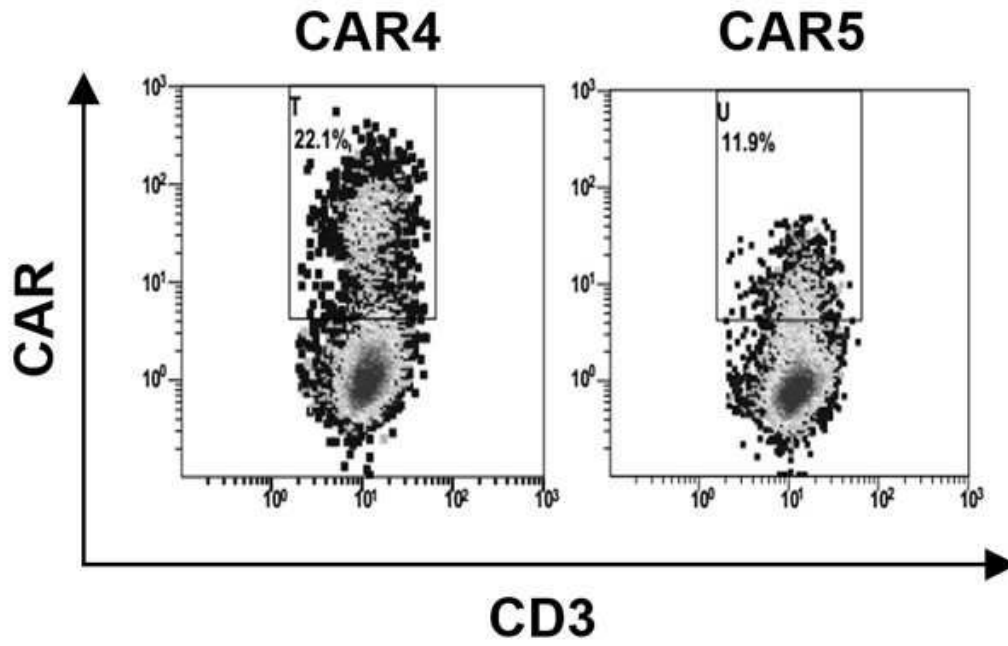
도면10a



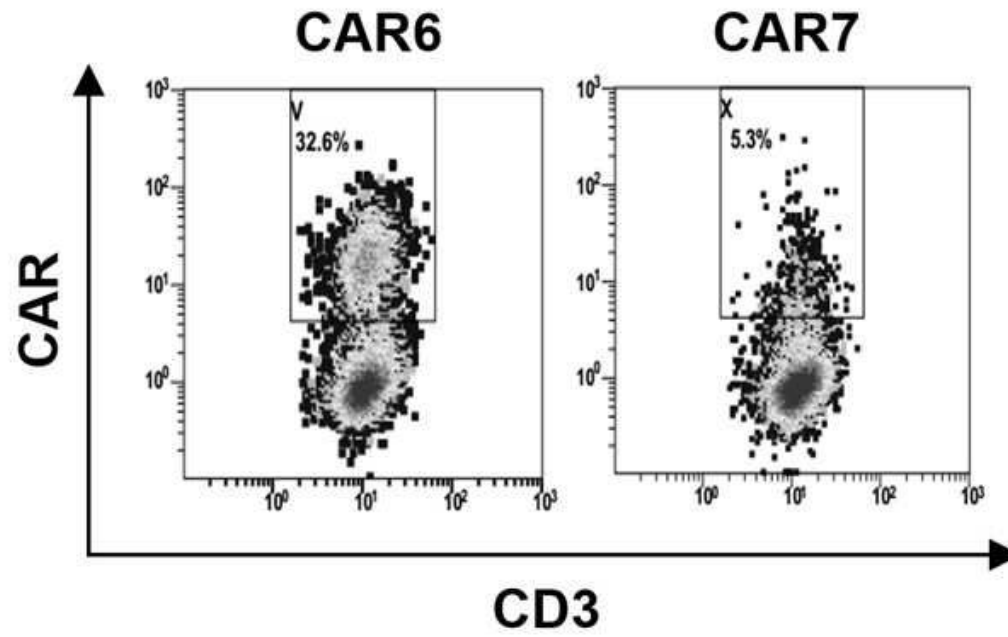
도면10b



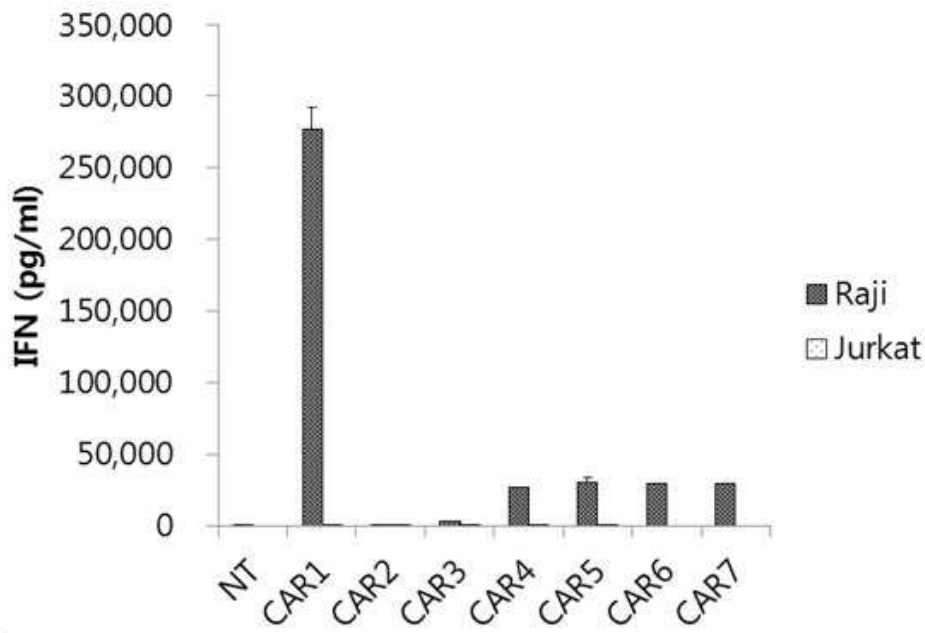
도면10c



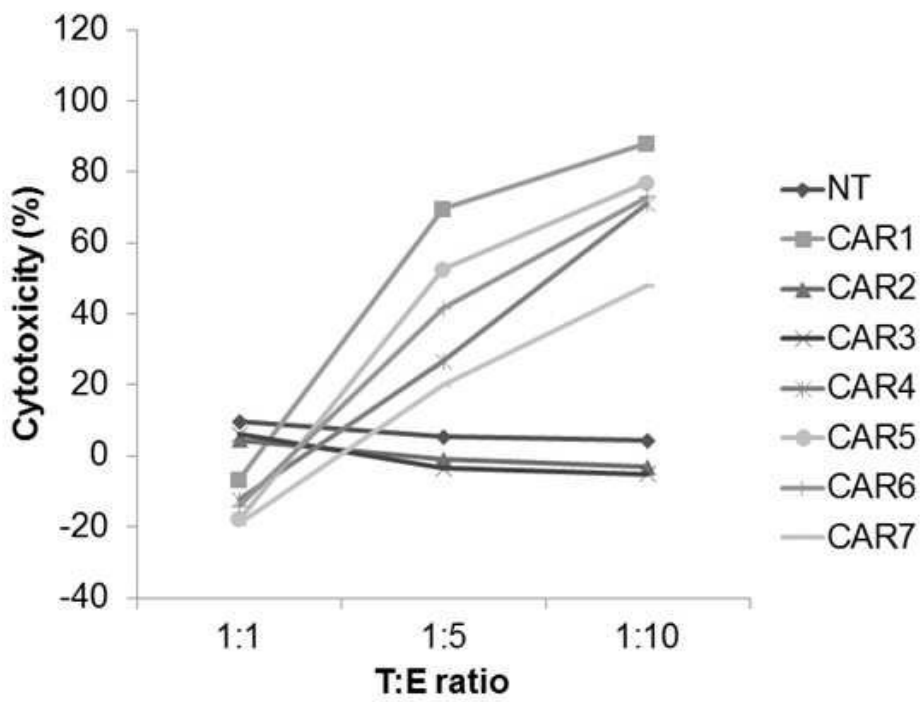
도면10d



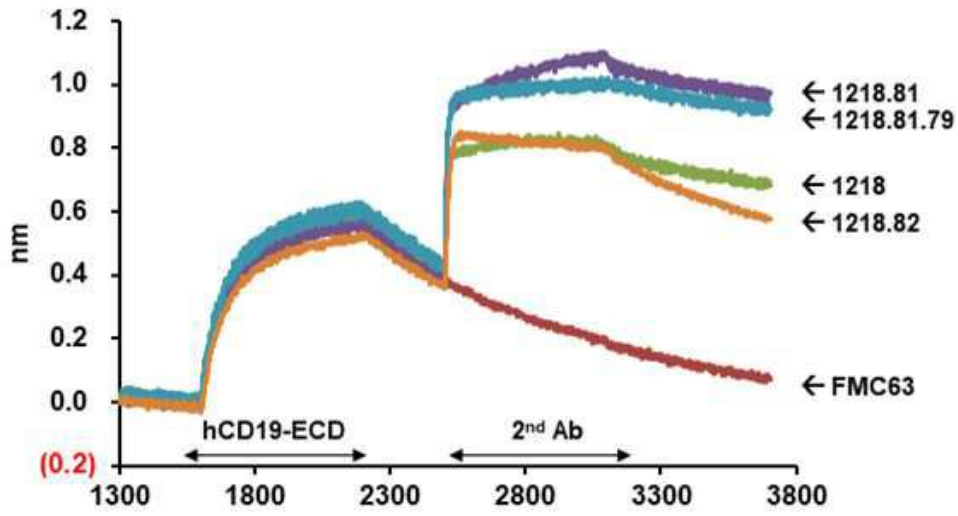
도면11a



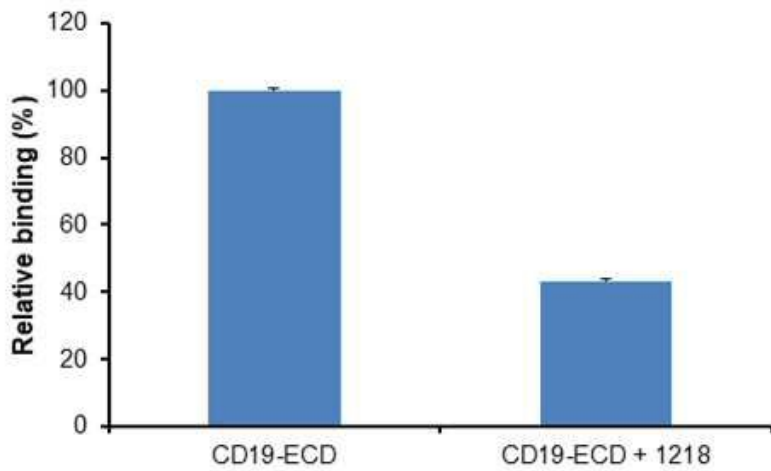
도면11b



도면12a



도면12b



서열목록

- <110> AbClon Inc.
- <120> B Cell Malignancy Recognizing Antibody or Antigen Binding Fragment Thereof, Chimeric Antigen Receptor Comprising The Same and Uses Thereof
- <130> PN170347P
- <150> KR 10-2017-0166969
- <151> 2017-12-06
- <160> 93
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 5

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Amino acid sequence of CDRH1 of CD19\_12.18 antibody  
 <400> 1  
 Ser Tyr Asp Met Gly  
 1 5  
 <210> 2

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Amino acid sequence of CDRH2 of CD19\_12.18 antibody  
 <400> 2  
 Gly Ile Asp Asp Asp Gly Arg Tyr Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val Asp  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Amino acid sequence of CDRH3 of CD19\_12.18 antibody  
 <400> 3  
 Gly Asn Ala Gly Trp Ile Asp Ala  
 1 5  
 <210> 4

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Amino acid sequence of CDRL1 of CD19\_12.18 antibody  
 <400> 4  
 Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly  
 1 5  
 <210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRL2 of CD19\_12.18 antibody

<400> 5

Glu Ser Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRL3 of CD19\_12.18 antibody

<400> 6

Gly Gly Trp Asp Ser Thr His Ala Gly Ile

1 5 10

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain variable region of CD19\_12.18 antibody

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val

35 40 45

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

50 55 60

Asp Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95  
 Thr Arg Gly Asn Ala Gly Trp Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu

100 105 110  
 Val Ile Val Ser Ser

115  
 <210> 8  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Amino acid sequence of light chain variable region of CD19\_12.18  
 antibody

<400> 8  
 Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val Lys

1 5 10 15  
 Ile Thr Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln  
 20 25 30

Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr Glu Ser Asn Lys  
 35 40 45

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser  
 50 55 60

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Val Glu Asp Glu Ala Val  
 65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gly Gly Trp Asp Ser Thr His Ala Gly Ile Phe Gly Ala  
 85 90 95

Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly Gln Ser

100 105  
 <210> 9  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Amino acid sequence of CD19\_12.18 scFv  
 <400> 9

Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Ile Thr Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln  
                   20                    25                    30  
 Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr Glu Ser Asn Lys  
                   35                    40                    45  
  
 Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser  
                   50                    55                    60  
 Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Val Glu Asp Glu Ala Val  
                   65                    70                    75                    80  
 Tyr Tyr Cys Gly Gly Trp Asp Ser Thr His Ala Gly Ile Phe Gly Ala  
                   85                    90                    95  
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly Gln Ser Ser Arg Ser Ser Gly Gly  
                   100                    105                    110  
 Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser  
  
                   115                    120                    125  
 Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys  
                   130                    135                    140  
 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Gly Trp Val Arg Gln  
                   145                    150                    155                    160  
 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val Ala Gly Ile Asp Asp Asp Gly  
                   165                    170                    175  
 Arg Tyr Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val Asp Gly Arg Ala Thr Ile Ser  
                   180                    185                    190  
  
 Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg  
                   195                    200                    205  
 Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Gly Asn Ala Gly Trp  
                   210                    215                    220  
 Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser Thr Ser  
                   225                    230                    235                    240  
 <210>    10  
 <211>    15

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence for encoding CDRH1 of CD19\_12.18 antibody

<400> 10  
 agttacgaca tgggt 15

<210> 11  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence for encoding CDRH2 of CD19\_12.18 antibody

<400> 11  
 ggtattgatg atgatgtag atacacatca tacgggtcgg cgggggatgg c 51

<210> 12  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence for encoding CDRH3 of CD19\_12.18 antibody

<400> 12  
 ggtaatgctg gttggatcga cgca 24

<210> 13  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence for encoding CDRL1 of CD19\_12.18 antibody

<400> 13  
 tccgggggtt acagcagcta ctatggc 27

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence for encoding CDRL2 of CD19\_12.18 antibody

<400> 14  
 gaaagcaaca agagaccctc g 21

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence for encoding CDRL3 of CD19\_12.18 antibody

<400> 15

ggtggctggg atagcactca tgctgtata 30

<210> 16

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence for encoding heavy chain variable region of  
CD19\_12.18 antibody

<400> 16

gccgtgacgt tggacgagtc cggggcggc ctccagacgc cgggaggagc gctcagcctc 60

gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagt agttacgaca tgggttgggt acgacaggcg 120

ccccgcaagg ggctggagtt cgctcctggt attgatgatg atggtagata cacatcatac 180

gggtcggcgg tggatggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacagtgagg 240

ctgcagctga acaacctcag ggctgaggac accgccacct actactgcac cagaggtaat 300

gtgggttga tcgacgcatg gggccacggg accgaagtca tcgtctcctc c 351

<210> 17

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence for encoding light chain variable region of  
CD19\_12.18 antibody

<400> 17

ctgactcagc cgtcctcggg gtcagcaaac ccaggagaaa ccgtaagat cacctgctcc 60

gggggttaca gcagctacta tggctggtac cagcagaagt ctctggcag tggccctgtc 120

actctgatct atgaaagcaa caagagacc tcggacatcc cttcagatt ctccggttcc 180

gcatccggct ccacagccac attaaccatc actggggtcc aagtcgagga cgaggctgtc 240

tattactgtg gtggctggga tagcactcat gctggtatat ttggggccgg gacaaccctg 300

accgtcctag gtcagtcc 318

<210> 18

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence for encoding CD19\_12.18 scFv

<400> 18

ctgactcagc cgtcctcggg gtcagcaaac ccaggagaaa ccgtcaagat cacctgctcc 60

gggggttaca gcagctacta tggctggtag cagcagaagt ctctggcag tgcccctgtc 120

actctgatct atgaaagcaa caagagacc tcggacatcc cttcacgatt ctccggttcc 180

gcatccggct ccacagccac attaaccatc actggggtcc aagtcgagga cgaggtctgc 240

tattactgtg gtggctggga tagcactcat gctggtatat ttggggccgg gacaaccctg 300

accgtcctag gtcagtctc tagatcttc ggcggtggg gcagctccgg tggtagcggg 360

tccgccgtga cgttggacga gtccgggggc ggcctccaga cgcccggagg agcgtcagc 420

ctcgtctgca aggcctccgg gttcaccttc agtagttacg acatgggtg ggtacgacag 480

gcgcccggca aggggctgga gttcgtcgt ggtattgatg atgatgtag atacacatca 540

tacgggtcgg cggtaggatg ccgtgccacc atctcgaggg acaacgggca gagcacagtg 600

aggctgcagc tgaacaact cagggtgag gacaccgcca cctactactg caccagaggt 660

aatgctggtt ggatcgacgc atggggccac gggaccgaag tcctcgtctc ctccactagt 720

720

<210> 19

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence for encoding CD8 leader

<400> 19

atggccctgc ctgtgaccgc tctgtctctg cccttgctc tgctgtgca cgccgtcgc 60

ccc 63

<210> 20

<211> 207

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence for encoding CD8 hinge/transmembrain domain  
 <400> 20  
 accacaactc cagctccccg gcccctacc cctgcaccaa caatgccag ccagcctctg 60  
  
 tccctgagac cagaggcatg taggccagct gcaggaggag cagtgcatac aagaggcctg 120  
 gatttcgct gcgatatcta catttgggct cctctggcag gaacttgtgg cgtgctgctg 180  
 ctgtctctgg teatcacct gtactgc 207  
 <210> 21  
 <211> 126  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence for encoding intracellular domain of CD137  
 <400> 21  
 aaaagggcc gcaagaaact gctgtatatt ttcaagcagc cttcatgcg gcccgtgcag 60  
 accacacagg aggaagacgg gtgctcctgt agattccccg aggaagagga aggcgggtgt 120  
  
 gagctg 126  
 <210> 22  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence for encoding intracellular domain of CD3-zeta  
 <400> 22  
 cgcgtcaagt tcagccgatc agccgatgct cctgcataca agcagggcca gaatcagctg 60  
 tataacgagc tgaatctggg gcgccgagag gaatacgacg tgctggataa gcggagaggg 120  
 agggaccccc aaatgggagg caaacctagg cgcaagaacc cacaggaggg actgtacaat 180  
 gaactgcaga aggacaaaat ggccgagget tattccgaaa ttgggatgaa aggagagcga 240  
  
 cggagagggg agggacacga tgggctgtat cagggactgt ctaccgccac taaagatacc 300  
 tacgacgctc tgcacatgca ggctctgccca cctcgc 336  
 <210> 23  
 <211> 1482  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence of CAR construct comprising CD19\_12.18 scFv

<400> 23

atggccctgc ctgtgaccgc tctgctgctg cccttgctc tgctgctgca cgccgctcgc 60  
 ccctggccc aggcggccct gactcagccg tcctcggtgt cagcaaacc aggagaaacc 120  
 gtcaagatca cctgctccgg gggttacagc agctactatg gctggtacca gcagaagtct 180

cctggcagtg ccctgtcac tctgatctat gaaagcaaca agagaccctc ggacatccct 240  
 tcacgattct cgggttccgc atccggctcc acagccacat taaccatcac tggggtccaa 300  
 gtcgaggacg aggctgtcta ttactgtggt ggctgggata gcactcatgc tggatatatt 360  
 ggggccggga caacctgac cgtcctaggt cagtccctca gatcttccgg cgggtggtggc 420  
 agctccggtg gtggcggttc cgccgtgacg ttggacgagt ccggggcgcg cctccagacg 480  
 cccggaggag cgctcagcct cgtctgcaag gcctccgggt tcaccttcag tagttacgac 540  
 atgggttggg tacgacaggc gcccggcaag gggctggagt tcgtcgctgg tattgatgat 600

gatgtagat acacatcata cgggtcggcg gtggatggcc gtgccacat ctcgagggac 660  
 aacgggcaga gcacagtgag gctgcagctg aacaacctca gggctgagga caccgccacc 720  
 tactactgca ccagaggtaa tgctggttgg atcgacgcat ggggccacgg gaccgaagtc 780  
 atcgtctcct cactagtgg ccaggccggc cagaccacaa ctccagctcc cggcccccct 840  
 accctgcac caacaatgc cagccagcct ctgtccctga gaccagagc atgtaggcca 900  
 gctgcaggag gagcagtga tacaagaggc ctggacttcg cctgcgatat ctacatttgg 960  
 gctcctctgg caggaacttg tggcgtgctg ctgctgtctc tggatcatcac cctgtactgc 1020

aaaaggggc gcaagaaact gctgtatatt ttcaagcagc cttcatgcg gccctgcag 1080  
 accacacagg aggaagacgg gtgctcctgt agattccccg aggaagagga aggcgggtgt 1140  
 gagctgcgcg tcaagttcag ccgatcagc gatgctcctg catacaagca gggccagaat 1200  
 cagctgtata acgagctgaa tctggggcgc cgagaggaat acgacgtgct ggataagcgg 1260  
 agagggaggg accccgaaat gggaggcaaa cctaggcgca agaaccaca ggagggactg 1320  
 tacaatgaac tgcagaagga caaaatggc gagcttatt ccgaaattgg gatgaaagga 1380  
 gagcgacgga gaggggaagg acacgatggg ctgtatcagg gactgtctac cgccactaaa 1440

gatacctac acgctctgca catgcaggct ctgccacctc gc 1482

<210> 24

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain sense primer for Creation of a chicken scFv Ab

phage-display library

<400> 24

ggtcagtcct ctagatcttc cggcgggtgt ggcagctccg gtggtggcgg ttccgccgtg 60

acgttggacg ag 72

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Heavy chain antisense primer for Creation of a chicken scFv Ab  
phage-display library

<400> 25

ctggccggcc tggccactag tggaggagac gatgacttcg gtcc 44

<210> 26

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain sense primer for Creation of a chicken scFv Ab  
phage-display library

<400> 26

gtggcccagg cggccctgac tcagccgtcc tcggtgtc 38

<210> 27

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain antisense primer for Creation of a chicken scFv Ab  
phage-display library

<400> 27

ggaagatcta gaggactgac ctaggacggt cagg 34

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nested sense primer for Creation of a chicken scFv Ab

phage-display library

<400> 28

gaggaggagg aggaggaggt ggcccaggcg gccctgactc ag 42

<210> 29

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nested antisense primer for Creation of a chicken scFv Ab

phage-display library

<400> 29

gaggaggagg aggaggagga gctggccggc ctggcacta gtggagg 47

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3 of hzCD19\_1218.81.12

<400> 30

Gly Asn Ala Gly Trp Ile Ser Thr

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3 of hzCD19\_1218.81.17

<400> 31

Gly Asn Ala Gly Trp Ile Glu Thr

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3 of hzCD19\_1218.81.52

<400> 32

Gly Asn Ala Gly Trp Ile Leu Thr

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3 of hzCD19\_1218.81.55

<400> 33

Gly Asn Ala Gly Trp Ile Gln Asn

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3 of hzCD19\_1218.81.64

<400> 34

Gly Asn Ala Gly Trp Ile Gln Thr

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3 of hzCD19\_1218.81.79

<400> 35

Gly Asn Ala Gly Trp Ile Asp His

1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2 of hzCD19\_1218.81.12

<

<400> 36

Glu Ser Asp Lys Arg Pro Ala

1 5  
 <210> 37  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDRL2 of hzCD19\_1218.81.52  
 <400> 37

Glu Thr Asp Lys Arg Pro Gln

1 5  
 <210> 38  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDRL2 of hzCD19\_1218.81.55  
 <400> 38

Glu Ser Gly Lys Arg Pro Ala

1 5  
 <210> 39  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDRL2 of hzCD19\_1218.81.64  
 <400> 39

Glu Ser Gln Lys Arg Pro Leu

1 5  
 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDRL3 of hzCD19\_1218.81  
 <400> 40

Gly Gly Leu Thr Pro Thr His Ala Gly Ile

1 5 10  
 <210> 41

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR3 of hzCD19\_1218.82  
 <400> 41  
 Gly Gln Ser Thr Arg Thr His Ala Gly Ile  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81 (aa)  
 <400> 42  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Asp Asp Asp Gly Arg Tyr Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Asp Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Gly Asn Ala Gly Trp Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 43  
 <211> 105  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81 (aa)

<400> 43

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp  
 20 25 30

Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Ser  
 35 40 45

Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser

50 55 60

Gly Ser Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu  
 65 70 75 80

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Leu Thr Pro Thr His Ala Gly Ile Phe  
 85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 44

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81 (nt)

<

<400> 44

gaagttcagc tggttgaatc tggcggagga ctggtgcaac ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg ccagcggett caccttcagc agctatgata tgggctgggt cgcacaggcc 120

cctggcaaag gacttgagtt tgtggccggc atcgacgacg atggcagata cacaagctac 180

ggctctgccg tggatggcag ggccaccatt agcagagaca acgccaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtac aagaggcaac 300

gccggatgga tcgatgcctg gggacagggc aactgtgtca ccgtgtcaag c 351

<210> 45

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81 (nt)

<400> 45

```

cagtctgtgc tgacacagcc tccatctgtg tctgctgccc ctggccagaa agtgacaatc      60
agctgtagcg gcggtactc cagctactac ggatggtatc agcagctgcc tggcacagcc      120
cctaagacac tgatctacga gagcaacaag aggcccagcg gcatccctga tagattttct      180
ggcagcgctt ctggcagctc tgccacactg ggaattacag gactgcagac aggcgacgag      240
gccgattact attgtggcgg cctgacacct acacacgccg gaatttttgg cggaggcacc      300
aagctgacag tgctc                                                    315
    
```

<210> 46

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.12 (aa)

<400> 46

```

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

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

115

<210> 47

<211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.12 (aa)  
 <400> 47  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp  
 20 25 30  
 Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Ser  
 35 40 45  
 Asp Lys Arg Pro Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Leu Thr Pro Thr His Ala Gly Ile Phe  
 85 90 95  
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 48  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.12 (nt)  
 <400> 48  
 gaggtgcagc tggtagagtc cggcggcggc ctctccaac caggcggctc cctcagattg 60  
 agctgtgctg ccagcggctt cactttcagc tcttatgaca tgggttgggt gagacaggca 120  
 cctggcaagg gtctggaatt cgtagccggc atcgacgatg acggtagata caccagttac 180  
 ggctctgctg tcgatggctg cgctaccatt agccgagata acgccaagaa taccgtttat 240  
 cttcaatga attcactgag ggcagaagac acagccgttt actattgtac tagaggtaac 300  
 gccgggtgga tttcgacttg gggacagggc aactgtgtga ccgtgagttc a 351

<210> 49

<211> 315  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.12 (nt)  
 <400> 49  
 cagtcagtcc taactcagcc ccctcagtg agtgcggctc cggggcagaa agtgacaatc 60  
 tcgtgcagcg gaggctacag ctcttattac ggatggatc agcagctgcc aggaaccgcc 120  
 cccaagacc ttatctacga gtccgacaaa cggcctgcag ggataccaga caggttttca 180  
 ggcaagtgcgt ctggttcctc tgccacgctc ggcatcaccg ggctgcaaac aggagacgag 240  
 gcagattatt attgcggagg actgacgcct actcacgcag gaatTTTTGG aggtggaaca 300

aaattaacag tgttg 315

<210> 50  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.17 (aa)  
 <400> 50  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Asp Asp Asp Gly Arg Tyr Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Asp Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Gly Asn Ala Gly Trp Ile Glu Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser

115  
 <210> 51  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.17 (aa)  
 <400> 51  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp  
 20 25 30  
 Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Ser  
 35 40 45  
 Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Leu Thr Pro Thr His Ala Gly Ile Phe  
 85 90 95  
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 52  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.17 (nt)  
 <400> 52  
 gaggtgcagc tggtagagtc cggcggcggc ctctgccaac caggcggctc cctcagattg 60  
 agctgtgctg ccagcggctt cactttcagc tcttatgaca tgggttgggt gagacaggca 120  
 cctggcaagg gtctggaatt cgtagccggc atcgacgatg acggtagata caccagttac 180  
 ggctctgctg tcgatggtcg cgctaccatt agccgagata acgccaagaa taccgtttat 240  
 ctcaaatga attcactgag ggcagaagac acagccgttt actattgtac tagaggtaac 300

gccgggtgga ttgagacgtg gggacagggc acaactggtga ccgtgagttc a 351

<210> 53

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.17 (nt)

<400> 53

cagtcagtcc taactcagcc ccctcagtg agtgcggctc cggggcagaa agtgacaatc 60  
 tcgtgcagcg gaggctacag ctcttattac ggatggtatc agcagctgcc aggaaccgcc 120  
 cccaagacc ttatctacga gtcaaataaa cggccttcag ggataccaga caggttttca 180  
 ggcagtgcgt ctggttcctc tgccacgctc ggcatcaccg ggctgcaaac aggagacgag 240  
 gcagattatt attgcgagg actgacgcct actcacgcag gaatTTTTGG aggtggaaca 300

aaattaacag tgttg 315

<210> 54

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.52 (aa)

<400> 54

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 55

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.52 (aa)

<400> 55

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

1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp

20 25 30

Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Thr

35 40 45

Asp Lys Arg Pro Gln Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser

50 55 60

Gly Ser Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu

65 70 75 80

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Leu Thr Pro Thr His Ala Gly Ile Phe

85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 56

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.52 (nt)

<400> 56

gaggtgcagc tggtagagtc cggcggcggc ctcgtccaac caggcggctc cctcagattg 60

agctgtgctg ccagcggctt cactttcagc tcttatgaca tgggttgggt gagacaggca 120

cctggcaagg gtctggaatt cgtagccggc atcgacgatg acggtagata caccagttac 180

ggctctgctg tcgatggtcg cgctaccatt agccgagata acgccaagaa taccgtttat 240  
 cttcaaatga attcactgag ggcagaagac acagccgttt actattgtac tagaggtaac 300  
 gccgggtgga ttcttacttg gggacagggc aactggtga ccgtgagttc a 351

<210> 57

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.52 (nt)

<400> 57

cagtcagtcc taactcagcc ccctcagtg agtgcggtc cggggcagaa agtgacaatc 60  
 tcgtgcagcg gaggtacag ctcttattac ggatggatc agcagctgcc aggaaccgcc 120  
 cccaagacct ttatctacga gactgataaa cggcctcagg ggataccaga caggttttca 180  
 ggcaagtgcgt ctggttcctc tgccacgctc ggcatcaccg ggctgcaaac aggagacgag 240  
 gcagattatt attgtggagg actgacgct actcacgcag gaatttttgg aggtggaaca 300

aaattaacag tgttg 315

<210> 58

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.55 (aa)

<400> 58

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

85 90 95  
 Thr Arg Gly Asn Ala Gly Trp Ile Gln Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 59

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.55 (aa)

<400> 59

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp  
 20 25 30  
 Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Ser  
 35 40 45

Gly Lys Arg Pro Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser  
 50 55 60

Gly Ser Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu  
 65 70 75 80

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Leu Thr Pro Thr His Ala Gly Ile Phe  
 85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 60

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.55 (nt)

<400> 60

gaggtgcagc tggtagagtc cggcggcggc ctcgtccaac caggcggctc cctcagattg

60

agctgtgctg ccagcgctt cactttcagc tcttatgaca tgggttgggt gagacaggca 120  
 cctggcaagg gtctggaatt cgtagccggc atcgacgatg acggtagata caccagttac 180  
 ggctctgctg tcgatggctg cgctaccatt agccgagata acgccaagaa taccgtttat 240  
 cttcaaatga attcactgag ggcagaagac acagccgttt actattgtac tagaggtaac 300  
 gccgggtgga ttcagaattg gggacagggc aactgtgtga ccgtgagttc a 351

<210> 61

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.55 (nt)

<400> 61

cagtcagtcc taactcagcc cccctcagtg agtgcggctc cggggcagaa agtgacaatc 60  
 tcgtgcagcg gaggctacag ctcttattac ggatggtatc agcagctgcc aggaaccgcc 120  
 cccaagacc ttatctacga gtcggggaaa cggcctcggg ggataccaga caggttttca 180  
 ggacagtgcgt ctggttcctc tgccacgctc ggcatcaccg ggctgcaaac aggagacgag 240  
 gcagattatt attgcccagg actgacgcct actcacgcag gaatTTTTGG aggtggaaca 300

aaattaacag tgttg 315

<210> 62

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.64 (aa)

<400> 62

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



<400> 64  
gaggtgcagc tgtagagtc cggcggcggc ctgctcaac caggcggctc cctcagattg 60  
agctgtgctg ccagcggctt cactttcagc tcttatgaca tgggttgggt gagacaggca 120  
cctggcaagg gtctggaatt cgtagccggc atcgacgatg acggtagata caccagttac 180  
ggctctgctg tcgatggtcg cgctaccatt agccgagata acgccaagaa taccgtttat 240  
cttcaaatga attcactgag ggcagaagac acagccgttt actattgtac tagaggtaac 300  
gccgggtgga ttcagacgtg gggacagggc aactgtgtga ccgtgagttc a 351

<210> 65

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.64 (nt)

<400> 65  
cagtcagtcc taactcagcc ccctcagtg agtgcggctc cggggcagaa agtgacaatc 60  
tcgtgcagcg gaggctacag ctcttattac gtaggtatc agcagctgcc aggaaccgcc 120  
cccaagacce ttatctacga gtctcagaaa cggcctcttg ggataccaga caggttttca 180  
ggcagtgctg ctggttcctc tgccacgctc gacatcaccg ggctgcaaac aggagacgag 240  
gcagattatt attgcccagg actgacgcct actcacgcag gaatttttgg aggtggaaca 300  
  
aaattaacag tgttg 315

<210> 66

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.79 (aa)

<400> 66  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val  
35 40 45  
Ala Gly Ile Asp Asp Asp Gly Arg Tyr Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val



<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.79 (nt)

<400> 68

```

gaagttcagc tggttgaatc tggcggagga ctggtgcaac ctggcggatc tctgagactg      60
tcttgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctatgata tgggctgggt ccgacaggcc      120
cctggcaaag gacttgagtt tgtggccggc atcgacgacg atggcagata cacaagctac      180
ggctctgccg tggatggcag ggccaccatt agcagagaca acgccaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtac aagaggcaac      300
gccggtgga tcgatcactg gggacagggc aactgtgtca ccgtgtctag c                351
    
```

<210> 69

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.79 (nt)

<400> 69

```

cagtctgtgc tgacacagcc tccatctgtg tctgctgccc ctggccagaa agtgacaatc      60
agctgtagcg gcggtactc cagctactac ggatggatc agcagctgcc tggcacagcc      120
cctaagacac tgatctacga gagcaacaag aggcccagcg gcatccctga tagattttct      180
ggcagcgcct ctggcagctc tgccacactg ggaattacag gactgcagac aggcgacgag      240
gccgattact attgtggcgg cctgacacct acacacgccg gaatttttgg cggaggcacc      300
    
```

```

aagctgacag tgctc                315
    
```

<210> 70

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.82 (aa)

<400> 70

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30
    
```

Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Gly Asn Ala Gly Trp Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 71

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.82 (aa)

<400> 71

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

1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp

20 25 30

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

35 40 45

Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser

50 55 60

Gly Ser Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu

65 70 75 80

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Thr Arg Thr His Ala Gly Ile Phe

85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 72  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of hzCD19\_1218.81.82 (nt)

<400> 72  
 gaagttcagc tggttgaatc tggcggagga ctggtgcaac ctggcggatc tctgagactg 60  
 tcttgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctatgata tgggctgggt ccgacaggcc 120  
 cctggcaaag gacttgagtt tgtggccggc atcgacgacg atggcagata cacaagctac 180  
 ggctctgccg tggatggcag ggccaccatt agcagagaca acgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtac aagaggcaac 300  
 gccggatgga tcgatgcctg gggacagggc aactgtgtca ccgtgtcaag c 351

<210> 73  
 <211> 315  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of hzCD19\_1218.81.82 (nt)

<400> 73  
 cagtctgtgc tgacacagcc tccatctgtg tctgctgccc ctggccagaa agtgacaatc 60  
 agctgtagcg gcggctactc cagctactac ggatggtatc agcagctgcc tggcacagcc 120  
 cctaagacac tgatctacga gagcaacaag aggcccagcg gcatccctga tagattttct 180  
 ggccagcgct ctggcagctc tgccacactg ggaattacag gactgcagac aggcgacgag 240  
 gccgattact actgtggcca gtctacaaga acccacgccg gaatctttgg cggaggcaca 300  
 aaactgacag tgctc 315

<210> 74  
 <211> 669  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CAR1 construct without scFv (nt)

<400> 74  
 acaacgacac ctgctcccag accgectact cccgccccaa ccattgcatc tcagccactc 60  
 tctctgagac ccgaagcgtg tagacctgcg gccgggggcg ctgtccacac aagaggctta 120

gacttcgcct gcgatatcta tatctgggcc ccaactgcag gcacttgtgg agtgctgctg 180  
 ctttcaactcg tgataaccct gtactgcaaa agggggagaa agaagctgct gtatatat 240

aaacaacat ttatgagacc tgttcagact acccaggaag aagacggttg tagttgcaga 300  
 ttccccgagg aggaagaagg aggttgcgag ttgagagtaa agttcagcag atccgcagat 360  
 gccctgctt accagcagg tcaaaaccag ctttacaacg agctgaattt aggtagaaga 420  
 gaggaatatg acgtgttga taaaagaaga ggaagagacc cggaaatggg cggcaagcct 480  
 cgaagaaaa atcccaaga gggactctac aatgagctgc agaaggacaa aatggctgaa 540  
 gcctacagcg agatcggcat gaagggagaa agacgcagag ggaaagggca tgatgggctt 600  
 tatcagggtt tgiccaccgc tacaaggat acttatgacg cactacacat gcaggcctg 660

ccacccgt 669

<210> 75

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR1 construct without scFv (aa)

<400> 75

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



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR2 construct without scFv (aa)

<400> 77

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

210 215

<210> 78  
 <211> 1227  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CAR3 construct without scFv (nt)  
 <400> 78

gaaccaaaga gctgcgataa gaccacacac tgtccgcat gtcccgtcc cgaactgctg 60

ggtgggcccc gcgtgttctt gtttctctcc aagcccaagg atacgttat gatctcaaga 120

acgcccaggg tgacatgcgt ggtggtgat gtgagccatg aagaccccga ggtgaagttc 180

aactggtatg tggacggcgt ggaggtgcat aacgctaaaa caaacctag agaagagcag 240

tataactcga cctacagggt ggttagcgtg ttaactgttc tgcacagga ctggctcaat 300

ggcaaggagt acaaatgtaa agtgtctaataa aaagccctgc ccgccccat tgagaaaact 360

attagcaagg ctaaaggaca gccagagag cccaggtct atacctgcc tccatctaga 420

gatgaattaa caaaaaacca ggtatctctt acatgcctgg tgaaggggtt ttaccctca 480

gacatcgccg tggagtggga aagtaatgga cagcccgaaa ataattataa gaccacacca 540

cccgctgtgg acagcgatgg cagcttcttt ctgtacagca aattgacagt ggataagtec 600

agatggcaac aagggaatgt cttctcatgt agcgtgatgc acgaggccct gcataaccac 660

tacactcaga agtccctgag tcttagcccc ggcatatata tctgggcacc tctcgccgga 720

acctgtggtg tattactgct gagccttgtg attactctgt attgcaaaag aggccggaag 780

aagctgctgt acatctttaa gcagcccttc atgcccggcg ttcagacaac ccaggaggag 840

gatggctgca gctgccgatt tcccgaagaa gaagagggcg gctgagct gagagtgaaa 900

ttctcaagaa gtgctgacgc accagcatac cagcaaggcc agaaccagct gtataacgag 960

ctaaatctgg gcagaagaga agagtacgac gtactggaca agcgcagagg tagagatccc 1020

gaaatggggg gcaaacccgc gagaaagaat cctcaggagg gtctgtataa cgagctgcaa 1080

aaggataaaa tggcagaggc gtacagcgaa atcggcatga aaggcgagcg acgcccgggc 1140

aaagggcacg acggcttcta tcagggactt agcactgcca ccaaggacac ttacgatgcc 1200

ctccacatgc aagctctgcc cccaaga 1227

<210> 79  
 <211> 409  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CAR3 construct without scFv (aa)

<400> 79

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 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 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly

225 230 235 240

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys  
 245 250 255  
 Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg  
 260 265 270  
 Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro  
 275 280 285  
 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser  
 290 295 300  
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg  
 325 330 335  
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln  
 340 345 350  
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr  
 355 360 365  
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp  
 370 375 380  
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala  
 385 390 395 400  
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 405

<210> 80

<211> 675

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR4 construct without scFv (nt)

<400> 80

accaccacc ctgcaccaag acctcctact cccgctccga cgatcgctag ccaacctctg 60  
 agcctgagggc cagaggcgtg tagaccagca gccggcgggg ccgttcacac aagaggcctg 120  
 gacttcgcct gcgacttctg ggtgctgggt gtggctggcg gagtgtagc gtgctattcc 180  
 ctactcgtga ccgtcgcttt tataatcttt tgggtcagaa gtaagagatc tagactcctg 240

catagcgact acatgaatat gactcctaga agacccggtc cgacaagaaa gcactatcag 300  
 ccctatgctc caccagaga ttttcagcc tacagatcaa gagtaaaatt ctctagatcc 360  
 gcagacgccc cagcatacca gcaaggacaa aatcagttgt acaacgaact gaaccttggc 420  
 agaagggagg agtatgatgt gctggataag agaagaggca gagatcccga aatggggggg 480  
 aaaccaagac ggaagaacct ccaggaggga ttgtataatg aactgcagaa agacaagatg 540  
 gccgaagctt atagtgatg tgggatgaag ggcgagagaa gaagaggaaa aggtcatgac 600  
 ggcttgtagc agggactttc aacagccact aaagatacat atgatgctct gcacatgcag 660  
 gcctcccc ctaga 675

<210> 81  
 <211> 225  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CAR4 construct without scFv (aa)

<400> 81  
 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 Phe Trp Val  
 35 40 45  
 Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr  
 50 55 60  
 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu  
 65 70 75 80  
 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg  
 85 90 95  
 Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg  
 100 105 110  
 Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln  
 115 120 125  
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu

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

195 200 205  
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro  
 210 215 220

Arg

225

<210> 82

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR5 construct without scFv (nt)

<400> 82

actaccacce cagcgeccag accteccact cctgctecta ccatcgcaag ccagecctg 60

tctcttagac cagaggcctg ccgaccgct gccggtgggg cagtgcacac gagaggtctg 120

gacttcgct gcgatttctg gctccccatt ggctgtcgg cattcgtcgt cgtttgtatc 180

ctgggatgca ttctgatatg ttggttgacc aaaaagaagt attcaagcag tgtgcatgat 240

cctaattggc agtacatgtt tatgagagca gtaatacag ctaagaaaag cagattaaca 300

gatgtaactc tcagagttaa gttttctaga tccgctgatg ccccagcata ccagcaagga 360

cagaaccagt tatatacga gctcaacctg gggagaagag aagagtatga tgtgctggac 420

aagcgcagag ggagagaccc agaaatgggt ggcaagccta gaagaaagaa tccgcaagag 480

ggcctataca acgaactgca gaaagacaaa atggccgagg cctatagcga aatcgggatg 540

aaggagaaa gaaggagagg caaaggacat gatgggttgt accagggcct ctccacagct 600

acaaaagaca cctacgacgc cctgcacatg caggcccttc cccaaga 648

<210> 83

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR5 construct without scFv (aa)

<400> 83

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

<210> 84  
 <211> 801  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CAR6 construct without scFv (nt)  
 <400> 84  
 acgaccactc cagcccctag acctcccaca cccgctccca caattgcttc acagccattg 60  
 tcaactcagac cagaggcctg cagacctgca gccggaggcg ccgtagcacac cagagccttg 120  
  
 gacttcgctt gtgatttttg ggttctgggt gtcgtcggcg gaggctggc atgctatagc 180  
 ctgctcgtaa ctgtggcttt catcattttc tgggtgagaa gcaagagatc cagactgctc 240  
 catagcgatt acatgaatat gacccacga agacctggac ccaccagaaa gcattaccaa 300  
 ccttacgcgc cacctagaga ttttcagcc tacaggctta aaagaggag aaagaagctt 360  
 ctttacatct ttaaacagcc attcatgaga cgggtccaaa caaccagga agaagacggc 420  
 tgttcttga gattcccga ggaagaggag ggggggtgtg agttaagagt gaagttttct 480  
 aggagtgtg atgcccctgc ctaccaacaa ggccagaacc agctttataa tgaactgaac 540  
  
 ctgggaagaa gagaagaata tgacgtgcta gacaagagaa gaggcagaga tccagaaatg 600  
 ggggtaagc cccgtcgcaa aaatccccag gagggtctgt acaacgaact gcagaaagac 660  
 aaaatggctg aggcataatag tgagatcggg atgaaggag agaggagaag aggaaaaggt 720  
 cagcaggtc tctatcaggg cctgtccact gccaccaaag acacatatga tgcgttgac 780  
 atgcaggccc tgccccccag g 801

<210> 85  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CAR6 construct without scFv (aa)  
 <400> 85  
 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 Phe Trp Val  
 35 40 45

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

- <210> 86
- <211> 774
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> CAR7 construct without scFv (nt)

<400> 86

actaccacgc ccgccccag gcccectaca ccagcaccaa ccattgcaag tcageccctg 60  
 tcactcagac cggaagcttg ccgcccggca gctgggggtg ccgtccacac aagaggactc 120  
 gacttcgctg gtgatttctg gctccctata ggggtgtccg cattcgtcgt tgtgtgcatc 180  
 ctgggatgta tectgatctg ctggetgact aagaagaagt actcctctag cgtgcacgac 240  
 ccaaacggcg aatacatgtt catgagagct gtgaatactg ccaagaaatc aaggctgacc 300  
 gatgtgacgc tgaaacgtgg gagaagaag ttgttatata ttttaaacgc ccttttatg 360  
 agaccagtgc aaacaactca ggaggaagac ggctgttctt gcagatttcc tgaggaagag 420  
  
 gagggaggct gcgagctcag ggttaaattt tctagaagcg ctgacgcacc cgcgtaccag 480  
 caggacaga accaactgta caatgagctt aacctgggca gacgagaaga atatgatgta 540  
 ttggataaaa gaagaggaag agatcctgag atgggtggca agcctagacg taagaacca 600  
 caggagggcc tgtataatga gctacagaag gacaaaatgg ctgaagccta cagcgagatt 660  
 ggtatgaaag gcgagagaag aagagggaaa ggccatgacg gtctgtatca aggcttgtec 720  
 accgccacaa aggataccta cgacgccctt catatgcagg ccttctctcc caga 774

<210> 87

<211> 258

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR7 construct without scFv (aa)

<400> 87

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 Phe Trp Leu  
 35 40 45  
 Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile  
  
 50 55 60  
 Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp  
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys  
 85 90 95  
 Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu  
 100 105 110  
 Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu  
 115 120 125  
  
 Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys  
 130 135 140  
 Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln  
 145 150 155 160  
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly  
 180 185 190  
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu  
 195 200 205  
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly  
 210 215 220  
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro  
 245 250 255

Pro Arg

- <210> 88
- <211> 63
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> T2A Nucleotide sequence

<400> 88

ggctcggcggc agggcagggg aagtcttcta acatgcgggg acgtggagga aaatcccggc 60  
 cca 63

<210> 89  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GFP Nucleotide sequence  
 <400> 89

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60  
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120  
 ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccttcaccta cggcgtgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag 240  
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300  
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360  
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420  
 aagctggagt acaactacaa cagccacaag gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac 480  
 ggcatcaagg tgaacttaaa gaccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540  
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtcgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660  
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720  
 720

<210> 90  
 <211> 783  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> T2A-GFP Nucleotide sequence  
 <400> 90

ggctccggcg agggcagggg aagtcttcta acatgcgggg acgtggagga aaatcccggc 60  
 ccaatggtga gcaagggcga ggagctgttc accgggtggtg tgcccatcct ggtcgagctg 120

gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc 180  
 tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccgt gccttgcccc 240  
 accctcgtga ccaccttac ctacggcgtg cagtgtctcg cccgctaccg cgaccacatg 300  
 aagcagcacg acttcttcaa gtccgcatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc 360  
 ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc 420

ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg 480  
cacaagctgg agtacaacta caacagccac aaggtctata tcaccgccga caagcagaag 540

aacggcatca aggtgaactt caagaccegc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc 600  
gccgaccact accagcagaa cacccecatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac 660  
cactacctga gcacccagtc gcacctgagc aaagacccca acgagaagcg cgtcacatg 720  
gtcctgctgg agttcgtgac cgccgccggg atcactctcg gcatggacga getgtacaag 780  
taa 783

<210> 91  
<211> 1184  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> EF-1 alpha Nucleotide sequence

<400> 91

tgtgaggctc cggtgccgct cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60  
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaaactggg 120  
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180  
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacggggt tgccccaga acacaggtaa 240  
gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggcct tgcgtgcctt 300  
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360  
ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420

cctggcctgg gcctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480  
ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540  
tctggcaaga tagtcttcta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600  
gggcccgggg cggcgacggg gccctgctg cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660  
tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg gtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720  
tcctggcct cgcgccccg tgtatgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780  
caccagtgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaat 840

ggaggacgcg gcgctcggga gagcggcggt gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct 900  
ttcctcctc agccgtcgt tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccagcacc 960  
tcgattagtt ctgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020  
cgatggagtt tccccact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080

tgtaattctc ctiggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140  
 agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1184

<210> 92  
 <211> 556  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of hCD19 (UniProtKB: P15391)

<400> 92

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

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser  
 195 200 205  
 Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp  
 225 230 235 240  
 Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala  
 245 250 255  
 Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu  
 260 265 270  
  
 Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly  
 275 280 285  
 Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu  
 290 295 300  
 Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val  
 325 330 335  
 Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu  
  
 340 345 350  
 Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala  
 355 360 365  
 Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp  
 370 375 380  
 Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly  
 385 390 395 400  
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu  
 405 410 415  
  
 Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu  
 420 425 430  
 Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly





Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp Val Gln Val Asp  
 340 345 350  
 Gly Ala Val Gly Ser Arg Ser Pro Pro Glu Ala Gly Pro Glu Glu Glu  
 355 360 365  
 Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu Gly Ser Glu Phe  
 370 375 380  
 Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Phe Gly Gln Asp Gln Leu Ser Gln Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly Pro Glu Asp Glu  
 405 410 415  
 Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu Asp Glu Glu Leu  
 420 425 430  
 Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser Pro His Gly Ser  
 435 440 445  
 Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly Cys Thr Ser Arg  
 450 455 460  
 Ala Leu Ala Ser Asn Ser Pro Ser Pro Ala Gln Ala Gly Ser Gln Ser  
 465 470 475 480  
 Tyr Glu Asp Met Arg Gly Leu Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Arg Thr  
 485 490 495  
 Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala Asp Ser Tyr  
 500 505 510  
 Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp Gly Gly Gly  
 515 520 525  
 Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Ala Arg  
 530 535