



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0020140
(43) 공개일자 2018년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
C07K 14/725 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0638 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7034648
(22) 출원일자(국제) 2016년04월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년11월29일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2016/051235
(87) 국제공개번호 WO 2016/174461
국제공개일자 2016년11월03일
(30) 우선권주장
1507368.7 2015년04월30일 영국(GB)

(71) 출원인
유씨엘 비즈니스 피엘씨
영국 더블유1티 4티피 런던 토텐햄 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩
(72) 발명자
앤더슨 존
영국 런던 더블유1티 4티피 97 토트넘 코트 로드
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내
피셔 조나단
영국 런던 더블유1티 4티피 97 토트넘 코트 로드
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 감마-델타 T 세포 수용체(TCR) 및 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포

(57) 요약

본 발명은 감마-델타 T 세포 수용체(TCR) 및 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포를 제공하되, 상기 CAR은 항원 결합 도메인; 막관통 도메인; 및 공동 자극 세포 내 신호전달 도메인을 포함하고; 상기 세포 내 신호전달 도메인은 항원이 항원 결합 도메인에 결합한 후 T 세포에 공동 자극 신호를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

C12N 2501/599 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

푸레 마틴

영국 런던 더블유1티 4티피 97 토트넘 코트 로드
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내

구스타프슨 켄스

영국 런던 더블유1티 4티피 97 토트넘 코트 로드
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내

명세서

청구범위

청구항 1

감마-델타 T 세포 수용체(TCR) 및 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포로서,

상기 CAR은,

- (i) 항원 결합 도메인;
- (ii) 막관통 도메인; 및
- (iii) 공동 자극 세포 내 신호전달 도메인을 포함하며;

상기 세포 내 신호전달 도메인은 항원이 상기 항원 결합 도메인에 결합한 후 상기 T 세포에 공동 자극 신호를 제공하는, T 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 종양-연관 항원(TAA)에 결합할 수 있는, T 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 GD2, CD33, CD19 또는 EGFR에 결합할 수 있는, T 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD8 대(stalk) 또는 CD28 막관통 도메인을 포함하는, T 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, Nkp30, Nkp44 또는 DNAM-1(CD226) 신호전달 도메인을 포함하는, T 세포.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10 신호전달 도메인을 포함하는, T 세포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 감마-델타 TCR에 제1 항원을 결합시키는 것은 신호 1 생성을 초래하고, 상기 CAR의 항원 결합 도메인에 제2 항원을 결합시키는 것은 신호 2 생성을 초래하는, T 세포.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 항원 결합 도메인과 막관통 도메인, 예를 들어 CD8 대 또는 Fc 영역 사이에 스페이서 도메인을 더 포함하는, T 세포.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 감마-델타 TCR은 인 항원; 주요 조직 적합 유전자 복합체 클래스 I 사슬-관련 A(MICA); 주요 조직 적합 유전자 복합체 클래스 I 사슬-관련 B(MICB); NKG2D 리간드 1-6(ULBP 1-6); CD1c; CD1d; 혈관 내피 단백질 C 수용체(EPCR); 리포핵사펩타이드; 피코에리트린 또는 히스티딜-tRNA-신 타제에 결합할 수 있는, T 세포.

청구항 10

키메라 항원 수용체(CAR)로서,

- (i) 항원 결합 도메인;
- (ii) 막관통 도메인; 및
- (iii) 세포 내 신호전달 도메인을 포함하되,

상기 세포 내 신호전달 도메인은 공동 자극 세포 내 신호전달 도메인을 포함하지만 CD3 엔도도메인을 포함하지 않는, CAR.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 공동 자극 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 또는 DNAM-1(CD226) 신호전달 도메인으로부터 선택되는, CAR.

청구항 12

키메라 항원 수용체(CAR)로서,

- (i) 항원 결합 도메인;
- (ii) 막관통 도메인; 및
- (iii) 세포 내 신호전달 도메인을 포함하되,

상기 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10 신호전달 도메인을 포함하는, CAR.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 세포 내 신호전달 도메인은 CD3 엔도도메인을 포함하지 않는, CAR.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제2항 내지 제9항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 CAR인, CAR.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 CAR을 암호화하는 핵산 서열.

청구항 16

제15항에 정의된 바와 같은 핵산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 17

제16항에 있어서, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 트랜스포존인, 벡터.

청구항 18

제15항에 따른 핵산 서열 또는 제16항 또는 제17항에 따른 벡터를 세포 내에 도입하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 세포를 제조하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 세포는 감마 델타 T 세포 자극제로 자극되는, 세포를 제조하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 감마-델타 T 세포 자극제는 아이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP); IPP의 유사체; 및 과 네실 파이로포스페이트 신타제(FPPS)의 억제제로부터 선택되는, 세포를 제조하는 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 세포는 대상체로부터 단리된 샘플 유래인, 세포를 제조하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 세포, 제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 CAR, 제15항에 따른 핵산 서열 또는 제16항 또는 제17항에 따른 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 23

제22항에 따른 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 대상체에게 감마-델타 T 세포 자극제를 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 감마-델타 T 세포 자극제는 아이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP); IPP의 유사체; 및 파네실 파이로포스페이트 신타제(FPPS)의 억제제로부터 선택되는, 질환을 치료하는 방법.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 대상체로부터 세포-함유 샘플을 분리시키는 단계;
- (ii) 세포를 제15항에 따른 핵산 또는 제16항 또는 제17항에 따른 벡터를 이용하여 형질도입 또는 형질감염시키는 단계; 및
- (iii) (ii)로부터의 상기 세포를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료하는 방법.

청구항 27

질환을 치료 및/또는 예방하는 데 사용하기 위한, 제22항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 28

질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서의, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 세포의 용도.

청구항 29

제23항 내지 제26항, 제24항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 암, 미생물 감염 또는 바이러스 감염인, 방법 또는 용도.

청구항 30

제23항 내지 제26항, 제27항 및 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 암인, 방법 또는 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 요법 T 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)를 포함하는 면역 요법 감마-델타 T 세포를 제공한다.

배경 기술

[0002] 암 면역 요법을 위해 개발된 키메라 항원 수용체(CAR)는 단일 분자 내에서 세포 외 항원 인식 도메인을 효과기(effector) 세포에 특이적인 신호전달 도메인과 결합시킨다. 가장 일반적인 CAR 시스템은 T 세포에 대한 활성화 신호를 제공하는 신호전달 도메인에 융합된 단클론성 항체로부터 유래된 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0003] 전형적으로, CAR의 신호전달 도메인은 세포 독성, 증식 및 생존 신호를 제공하여 항원 인식 도메인에 항원의 결

합 시 효과기 세포를 활성화시킨다(신호 1 및 2).

[0004] 이 기술의 한계는 '온 타겟-오프 종양 독성(on target-off tumor toxicity)'에 대한 잠재성이다. 이 독성은 정상 조직 상에서 CAR에 의해 인식되는 낮은 수준의 암-연관 항원의 인식에 의해 야기된다. 예를 들어, GD2는 신경아세포종에 대한 표적이지만, 또한 신경에서도 발견되며; PSMA는 전립선 암 세포에 대한 표적이지만, 또한 정상적인 신장, 간 및 결장 세포, 및 뇌 성상교세포 상에서도 발견된다. 이 문제는 고도로 선택적인 표적이 부족한 고형 종양에서 더 심각하다.

[0005] 따라서, 상기 문제를 해결하기 위한 암 면역 요법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0006] 본 발명자들은 감마 델타($\gamma \delta$) T-세포에서 CAR을 사용함으로써 '온 타겟-오프 종양 독성'을 감소시키는 메커니즘을 결정하였다. 본 명세서에 기재된 시스템에서, CAR은 CAR의 항원 인식 도메인에 항원의 결합 시 $\gamma \delta$ T-세포에 공동 자극 신호(신호 2)를 제공하기 위해 사용된다. 이러한 방법으로, 신호 2는 이의 표적 항원에 CAR의 결합 시 T-세포에만 제공된다(도 2a). $\gamma \delta$ T-세포 활성화를 위한 신호 1은 내인성 TCR에 의해 제공되며, 상기 내인성 TCR은 인 항원(phosphoantigen)과 같은 위험 신호에 의해 활성화된다.

[0007] $\gamma \delta$ T-세포는 최적의 효과기 작용을 위해 신호 1과 신호 2를 둘 다 필요로 한다. 따라서, 본 시스템에서 $\gamma \delta$ T-세포는, 표적 세포가 (i) CAR에 의해 인식되는 항원을 발현하고; (ii) 내인성 $\gamma \delta$ TCR에 의해 인식되는 위험 신호를 발현하는 경우, 단지 세포 독성, 증식 및 사이토카인 분비에 대해서만 완전히 활성화될 것이다.

[0008] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 감마-델타 T 세포 수용체(TCR) 및 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포를 제공하되, CAR은,

[0009] (i) 항원 결합 도메인;

[0010] (ii) 막관통 도메인; 및

[0011] (iii) 공동 자극 세포 내 신호전달 도메인을 포함하며, 상기 세포 내 신호전달 도메인은 항원이 항원 결합 도메인에 결합한 후 T 세포에 공동 자극 신호를 제공한다.

[0012] 이와 같이, $\gamma \delta$ TCR에 대한 제1 항원의 결합은 신호 1의 생성을 초래하고, CAR의 항원 결합 도메인에 제2 항원의 결합은 신호 2의 생성을 초래한다.

[0013] 항원 결합 도메인은 종양-연관 항원(tumour-associated antigen; TAA)에 결합할 수 있다.

[0014] 항원 결합 도메인은 GD2, CD33, CD19 또는 EGFR에 결합할 수 있다.

[0015] 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, Nkp30, Nkp44 또는 DNAM-1(CD226) 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0016] CAR의 막관통 도메인은 CD8 대(stalk) 또는 CD28 막관통 도메인을 포함할 수 있다.

[0017] CAR의 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0018] CAR은 항원 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에 스페이서 도메인을 추가로 포함할 수 있다.

[0019] $\gamma \delta$ TCR은 인 항원/부티로필린 3A1 복합체; 주요 조직 적합 유전자 복합체 클래스 I 사슬-관련 A(MICA); 주요 조직 적합 유전자 복합체 클래스 I 사슬-관련 B(MICB); NKG2D 리간드 1-6(ULBP 1-6); CD1c; CD1d; 혈관 내피 단백질 C 수용체(EPCR); 리포핵사펩타이드; 피코에리트린 또는 히스티딜-tRNA-신타제에 결합할 수 있다.

[0020] CAR은 다음 아미노산 서열 중 하나를 포함할 수 있다:

[0021] 서열번호 1(aCD33-Fc-DAP10 CAR)

MAVPTQVLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYFNLVWYQ
QKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNY
PLTFGQGTKEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISR
DNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGLTVTVSSMDPAEPK
SPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGKKDPKFWLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVCARPRRSPAQEDGKVYINMPGR
G

[0022]

[0023] 서열번호 2(aGD2-Fc-DAP10 CAR)

METDTLLLWLLLWPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLTITCTVSGFSLASYNHWW
RQPPGKGLEWLGVWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVY
YCAKRSDDYSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSENQMTQSPSSLSA
SVGDRVMTCRASSSVSSYLHWYQQKSGKAPKVVYSTSNLASGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTKEIKRSDPAEPKSPDKTHTCP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKF
WLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG

[0024]

[0025] 추가 양태에서, 본 발명은 (i) 항원-결합 도메인; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포 내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 제공하되; 상기 세포 내 신호전달 도메인은 공동 자극 세포 내 신호전달 도메인을 포함하지만 CD3 엔도도메인(endodomain)을 포함하지 않는다.

[0026] 공동 자극 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, Nkp30, Nkp44 또는 DNAM-1(CD226) 신호전달 도메인으로부터 선택될 수 있다.

[0027] 제2 양태에서, 본 발명은 항원-결합 도메인; 막관통 도메인; 및 세포 내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다; 상기 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10 신호전달 도메인을 포함한다. 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10 신호전달 도메인으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이것으로 이루어질 수 있다.

[0028] 특정 실시형태에서, 본 발명의 제2 양태에 따른 CAR의 세포 내 신호전달 도메인은 CD3 엔도도메인을 포함하지 않는다.

[0029] 본 발명의 제2 양태에 따른 CAR은 본 발명의 제1 양태에서 정의된 바와 같은 CAR일 수 있다.

[0030] 제3 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1 또는 제2 양태에서 정의된 바와 같은 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 제공한다.

[0031] 제4 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제3 양태에 의해 정의된 바와 같은 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0032] 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 트랜스포존일 수 있다.

[0033] 제5 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태에 따른 세포를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제3 양태에 따른 핵산 서열 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 벡터를 세포 내에 도입하는 단계를 포함한다.

- [0034] 본 방법은 세포를 감마 델타 T 세포 자극제로 자극시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0035] $\gamma \delta$ T 세포 자극제는, 예를 들어 아이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP); 브로모하이드린 파이로포스페이트 및 (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 파이로포스페이트와 같은 IPP의 유사체; 및 아미노비스포스포네이트(예를 들어, 줄레드로네이트 또는 파미드로네이트)와 같은 파네실 파이로포스페이트 신타제(FPPS)의 억제제로부터 선택될 수 있다.
- [0036] 세포는 대상체로부터 단리된 샘플 유래의 것일 수 있다.
- [0037] 제6 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태에 따른 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0038] 제7 양태에서, 본 발명은 질환을 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제6 양태에 따른 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0039] 본 방법은 $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0040] $\gamma \delta$ T 세포 자극제는, 예를 들어 아이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP); 브로모하이드린 파이로포스페이트 및 (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 파이로포스페이트와 같은 IPP의 유사체; 및 아미노비스포스포네이트(예를 들어, 줄레드로네이트 또는 파미드로네이트)와 같은 파네실 파이로포스페이트 신타제(FPPS)의 억제제로부터 선택될 수 있다.
- [0041] 본 방법은 다음 단계를 포함할 수 있다:
- [0042] (i) 대상체로부터 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계;
- [0043] (ii) 세포를 본 발명의 제3 양태에 따른 핵산 샘플 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 벡터를 이용하여 형질도입 또는 형질감염시키는 단계; 및
- [0044] (iii) (ii)로부터의 세포를 대상체에게 투여하는 단계.
- [0045] 제8 양태에서, 본 발명은 질환을 치료하는 데 사용하기 위한 본 발명의 제6 양태에 따른 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 제9 양태에서, 본 발명은 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 제1 양태에 따른 세포의 용도에 관한 것이다.
- [0047] 본 명세서에 기재된 질환은 암, 미생물 감염 또는 바이러스 감염일 수 있다.
- [0048] 따라서 본 발명은 내인성 $\gamma \delta$ TCR에 결합(따라서 생성 신호 1을 자극)할 수 있는 제1 항원 및 CAR에 결합(따라서 생성 신호 2를 자극)할 수 있는 제2 항원을 발현하는 표적 세포에 의해서만 완전히 활성화되어, 따라서 상기 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 $\gamma \delta$ T 세포를 제공한다.
- [0049] 따라서, 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포는 원치않는 '온 타겟-오프 종양' 효과를 감소시키는 데 유용하다. 특히, 낮은 수준의 TAA를 발현하는 정상 세포는 내인성 $\gamma \delta$ TCR에 의해 인식되는 위험 신호를 나타내지 않고, 따라서 $\gamma \delta$ T 세포의 완전한 활성화에 필요한 신호 1을 제공하지 않을 것이므로, 상기 정상 세포는 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포를 활성화시키지 않을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0050] **도 1** - 표적 세포를 사멸시키는 $\gamma \delta$ T 세포의 완전한 활성화에 필요한 신호전달의 다이어그램. a) 및 b) $\gamma \delta$ TCR 또는 공동 수용체를 통한 신호전달 단독으로는 $\gamma \delta$ T 세포의 완전한 활성화를 초래하지 않는다. c) $\gamma \delta$ TCR 및 공동 수용체 신호전달의 조합은 $\gamma \delta$ T 세포의 완전한 활성화를 초래한다.
- 도 2** - 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포의 예시적인 다이어그램. a) 표적 세포에 의한 $\gamma \delta$ T 세포의 정상적인 활성화. b) 암 세포에 의해 분비된 가용성 NKG2D 리간드에 의한 신호 2의 차단은 $\gamma \delta$ T 세포의 완전한 활성화를 방지한다. c) 형질전환된 세포에 의한 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포의 완전한 활성화. d) 정상적인 건강한 세포는 내인성 $\gamma \delta$ T 세포 수용체에 의해 인식된 위험 신호를 나타내지 않으며, 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포를 완전히 활성화시키지 않는다.
- 도 3** - 본 발명에서 사용될 수 있는 예시적인 CAR의 예
- 도 4** - $\gamma \delta$ T 세포에서 $\gamma \delta$ TCR(V δ 2) 및 GD2-DAP10 CAR(Fc, CD20 마커 및 CD34 마커)의 공동 발현을 예시하

는 대표적인 유세포분석 도트 플롯

도 5 - aGD2-Fc-DAP10 CAR로 형질도입된 $\gamma\delta$ T 세포에 의한 GD2+ 세포주 LAN1 및 TC71의 사멸

(A) GD2+ 신경아세포종 세포주 LAN1의 현저한 사멸은 CAR 형질도입된 세포가 사용될 때에만 보이고 비형질도입 (NT) $\gamma\delta$ 2가 효과기로서 사용될 때에는 보이지 않는다. (B) GD2+ 유잉 육종 세포주 TC71에 대하여 인 항원 생성을 증가시키는 24시간 줄레드론산 노출과 결합될 때 aGD2-Fc-DAP10 CAR의 상가효과. (C) 세포 스트레스에 반응하여 $\gamma\delta$ TCR에 의해 제공되는 신호 1이 없는 $\alpha\beta$ T 세포에 CAR의 첨가는, $\gamma\delta$ 2+ $\gamma\delta$ T 세포에서 CAR의 효과와 달리 세포독성에 대하여 영향을 미치지 않는다. 이는 CAR 신호 단독으로는 T-세포 활성화에 불충분하다는 것을 나타낸다. 오차 막대는 3~6명의 독립적인 공여자에 대한 SEM을 나타낸다.

도 6 - GC2+ 세포주 LAN1의 사멸 및 GC2- 세포주 SKNSH의 무사멸. 오차 막대는 3~6명의 독립적인 공여자에 대한 SEM을 나타낸다.

도 7 - 연장된 공동 배양과 GD2 특이적 확장 후 CAR 발현의 보존

(A) 공동 배양은 형질도입 후 24일째에 시작하였다(D0으로 표시함). 조사된 GD2+(LAN1) 및 GD2-(SK-N-SH) 신경아세포종의 존재 하에 CAR(Y 축) 및 TCRV δ 2(X 축)의 존재에 대한 세포의 연속 분석을 수행하였다. 3명의 공여자 중 1명으로부터의 대표적인 데이터가 표시되어 있다. (B) 조사된 GD2+ 표적 세포의 존재 하에서만 aGD2-Fc-DAP10 형질도입된 $\gamma\delta$ 2+ 세포의 확장을 보였다(그래프 표현, n=3명의 독립적인 공여자, 오차 막대는 SEM을 나타냄).

도 8 - AML 세포주(Nomol, Sh1 및 MV4; 11) 및 신선하게 단리된 단핵세포의 CD33 발현에 대한 유세포분석 염색은 동일하다.

도 9 - A) aCD33-DAP10-형질도입 $\gamma\delta$ 2 세포는 ZOL의 부재 하에 단핵세포를 남겨두지만 aCD33-CD28z-형질도입 $\gamma\delta$ 2 세포는 그렇지 않다. B) aCD33-DAP10-형질도입 $\gamma\delta$ 2 세포는 NT $\gamma\delta$ 2 세포보다 AML을 더 잘 사멸시키지만, 단핵세포를 남겨두지 않는다. 오차 막대는 3명의 독립적인 공여자에 대한 SEM을 나타낸다.

도 10 - 항-GD2-Fc-DAP10 CAR의 핵산 및 아미노산 서열

도 11 - 항-CD33-Fc-DAP10 CAR의 핵산 및 아미노산 서열

도 12 - aCD33-DAP10-형질도입 $\gamma\delta$ 2 세포는 조혈 줄기 세포를 남겨두지만, aCD33-CD28z-형질도입 $\gamma\delta$ 2 세포는 그렇지 않다. 정상 인간 골수를 나타낸 CAR T 세포와 함께 배양하였다. 연한천에서의 골수 콜로니 형성에 의해 생존한 조혈 줄기 세포를 분석하였다. 데이터는 3명의 독립적인 공여자로부터의 형질도입된 $\gamma\delta$ 2 세포를 사용하여 유도된다.

도 13 - "동시 자극-유일" CAR과 $\gamma\delta$ 9v $\gamma\delta$ 2 TCR의 차별 교차결합은 차별화된 사이토카인 반응을 초래한다. 상단: 실험 설계의 도식. 바이오티닐화 비드를 (A) 항원 없이/무관한 항체, 또는 (B) TCR(항-CD3) 또는 CAR(CAR의 스페이서 영역에 결합하는 항-Ig)에 결합하는 항체로 코팅하고; (C) 가교결합 후, 세포 내 사이토카인 분비는 활성화를 측정하기 위해 사용된다. 대조군으로서, 자극성 항-CD3/CD28 비드(밀텐이(Miltenyi))를 사용한다. 좌측 하단: 대표적인 FACS 플롯; 우측 하단: 가교결합에 대한 사이토카인 반응은, "동시 자극-유일" CAR 교차결합이 TNF- α 반응을 초래하지만 추가적인 TCR 관여(engagement)가 인터페론 감마 및 TNF- α 둘 다를 포함하는 완전한 반응에 필요하다는 것을 나타낸다. 데이터는 5명의 공여자의 평균 \pm SD이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051]

$\gamma\delta$ T 세포

[0052]

T-세포는 T-세포 수용체(TCR) 성분을 기초로 하여 2개의 군으로 나뉜다. TCR 이질이량체는 T 세포의 95%에서 α 및 β 사슬로 구성된다. 이들은 항원 제시 세포 상에서 MHC 분자에 의해 제시된 펩타이드를 통해 외래 항원을 인식하고 획득 면역에 필수적이다.

[0053]

T 세포의 5%는 γ 및 δ 사슬로 이루어진 TCR을 가진다. $\gamma\delta$ TCR은 MHC 독립적으로 종양에 의해 발현되는 세포 스트레스의 마커를 검출한다.

[0054]

$\gamma\delta$ T 세포는 병원체 및 형질전환된 세포를 HLA-무제한 방식으로 인식한다. $\gamma\delta$ T 세포는 세포 스트레스의 마커(예를 들어, 메발로네이트 생합성 경로의 부산물로서 형질전환된 세포에 의해 방출되는 인 항원)에 반응한다. $\gamma\delta$ T 세포는, 특히 항체-옵소닌화된 표적 세포의 존재 하에, 선천적인 세포독성 기능 및 항원-제시 능력 둘

다를 나타낸다.

- [0055] $\gamma \delta$ T-세포는 "림프성 스트레스 감시(lymphoid stress surveillance)", 즉 클론 확장 또는 신규 분화의 필요 없이 감염 또는 비미생물 스트레스에 즉각적으로 감지하고 응답하는 것을 담당한다.
- [0056] $\gamma \delta$ T 세포의 활성화는 자극 신호와 억제 신호 사이의 균형에 의해 조절된다. 이들은 활성화 수용체 살생 세포 렉틴-유사 수용체 서브패밀리 K, 구성원 1(KLRK1)(NKG2D로도 공지됨)의 MHC-연관 리간드, 예컨대 MHC 클래스 I 폴리펩타이드-관련 서열 A(MICA), MICB, 및 UL16-결합 단백질(ULBP) 패밀리의 다양한 구성원과 함께 $\gamma \delta$ TCR 리간드(예를 들어, 인 항원)에 의해 활성화된다.
- [0057] $\gamma \delta$ 세포는 또한, 살생 세포 면역글로불린-유사 수용체, 2개 도메인, 긴 세포질 꼬리, 1(KIR2DL1) 및 살생 세포 면역글로불린-유사 수용체, 3개 도메인, 긴 세포질 꼬리, 1(KIR3DL1)을 비롯하여, 활성화 또는 억제될 수 있는 살생-세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR)를 발현한다.
- [0058] 표적 세포의 효과적인 살생을 초래하는 $\gamma \delta$ T 세포의 완전한 활성화는 생성 신호 1 및 신호 2 생성을 필요로 한다(도 1 및 2a).
- [0059] $\gamma \delta$ T-세포는 형질전환된 또는 감염된 세포 상에 존재하는 위험 신호 항원으로부터 T 세포 활성화의 신호 1을 유도한다. 이러한 위험 신호 항원은 $\gamma \delta$ TCR을 통해 인식된다. $\gamma \delta$ T-세포에 대한 T 세포 활성화의 신호 2는 또한 통상적으로 형질전환 또는 감염된 세포에 존재하는 위험 신호 분자(예컨대, MICA)에 의해 유도된다. 신호 2는, 예를 들어 NKG2D 수용체 및 DAP 10을 통해, 형질도입될 수 있다(도 2a).
- [0060] 면역검출을 피하는 수단으로서, 암 세포는 $\gamma \delta$ T-세포에서 신호 2를 효과적으로 차단함으로써 가용성 NKG2D 리간드를 자주 분비하고, 따라서 상기 세포의 활성화를 방지하고 종양 침윤을 용이하게 한다(도 2b).
- [0061] 제 1 양태에서, 본 발명은 $\gamma \delta$ TCR 및 CAR을 발현하는 T 세포를 제공하되, 상기 CAR의 세포 내 신호전달 도메인은 T 세포에 공동 자극 신호를 제공한다.
- [0062] 따라서, $\gamma \delta$ TCR 및 CAR의 배열은 각각의 수용체에 결합 시 각각 $\gamma \delta$ TCR이 신호 1을 제공하고 CAR이 신호 2를 제공하는 것이다.
- [0063] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 공동 자극 신호는, 완전한 $\gamma \delta$ T 세포 활성화에 필요한 신호 2와 동의어이다.
- [0064] 따라서, 본 발명의 제1 양태에 따른 $\gamma \delta$ T 세포는 단지 완전히 활성화되어 $\gamma \delta$ TCR에 결합(따라서 생성 신호 1을 자극)할 수 있는 제1 항원 및 CAR에 결합(따라서 생성 신호 2를 자극)할 수 있는 제2 항원을 발현하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있을 것이다(도 2c).
- [0065] $\gamma \delta$ TCR에 결합하는 항원의 부재 하에, 신호 1은 생성되지 않으며 완전한 $\gamma \delta$ T 세포 활성화는 이루어지지 않는다. 다시 말하면, $\gamma \delta$ TCR에 결합하는 항원의 부재 하에, $\gamma \delta$ T 세포는 표적 세포를 사멸시키도록 자극되지 않는다(도 2d).
- [0066] CAR에 결합하는 항원의 부재 하에, 신호 2는 생성되지 않으며, 완전한 $\gamma \delta$ T 세포 활성화는 이루어지지 않는다. 다시 말하면, CAR에 결합하는 항원의 부재 하에, $\gamma \delta$ T 세포는 표적 세포를 사멸시키도록 자극되지 않는다.
- [0067] 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포는 임의의 $\gamma \delta$ TCR을 발현할 수 있다. $\gamma \delta$ TCR 리간드의 예는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Vantourout, P. & Hayday, A. Nat. Rev. Immunol. 13, 88-100 (2013)] 참조).
- [0068] 예로서, 본 발명의 세포에 의해 발현되는 $\gamma \delta$ TCR은 인 항원(예를 들어, 아이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP), 브로모하이드린 파이로포스페이트(BrHPP) 및 (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 파이로포스페이트(HMBPP)); 주요 조직 적합 유전자 복합체 클래스 I 사슬-관련 A(MICA); 주요 조직 적합 유전자 복합체 클래스 I 사슬-관련 B(MICB); NKG2D 리간드 1-6(ULBP 1-6); CD1c; CD1d; 혈관 내피 단백질 C 수용체(EPCR); 리포핵사펩타이드; 피코에리트린 또는 히스티딜-tRNA-신타제를 인식할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 세포의 한 가지 이점은 상기 세포가 (i) 특이적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인 및 (ii) 특정 공동 자극 엔도도메인을 포함하는 CAR을 포함하는 것이다. 이와 같이, CAR에 의한 항원의 결합이 공동 자극 엔도도메인 및 신호 2 생성을 통해 신호전달을 초래할 것이므로, 본 발명의 세포는 CAR에 의해 결합될 수 있는 항원을 포함하는 환경에서 활성화에 대하여 더 큰 경향을 가질 것이다. 예를 들어, CAR의 항원-결합 도메인이 TAA에

특이적인 경우, 본 발명의 세포는 CAR에 의해 제공되는 공동 자극 신호로 인하여 TAA가 발현되는 종양 환경에서 활성화 방향으로 증가된 경향을 가질 것이다.

[0070] 키메라 항원 수용체

[0071] 본 발명에 따른 T 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현한다.

[0072] 키메라 항원 수용체(CAR)는 면역 효과기 세포 상으로 임의의 특이성을 접목시키는 조작된 수용체이다. 고전적인 CAR에서, 단일클론 항체의 특이성은 T 세포 상으로 접목된다. CAR-암호화 핵산은, 예를 들어 레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포로 전달될 수 있다. 이러한 방법으로, 다수의 암-특이적 T 세포가 양자 세포 전달을 위해 생성될 수 있다. 이 접근법의 I 상 임상 연구는 효능을 나타낸다.

[0073] CAR의 표적-항원 결합 도메인은 일반적으로 스페이서 및 막관통 도메인을 통해 신호전달 엔도도메인에 융합된다. CAR이 표적-항원에 결합할 때, 이는 CAR이 발현되는 T-세포에 활성화 신호를 전달한다.

[0074] 초기 CAR 설계는 $Fc\epsilon R1$ 또는 $CD3\zeta$ 의 γ 사슬의 세포 내 부분에서 유래된 엔도도메인을 가졌다. 결과적으로, 이러한 제1 세대 수용체는 면역학적 신호 1을 전송하였는데, 이는 동족 표적 세포의 T-세포 사멸을 촉발시키는 데 충분하였지만, T-세포를 완전히 활성화시켜 증식시키고 생존시키는 못하였다. 이러한 한계를 극복하기 위하여, 화합물 엔도도메인이 구축되었으며: $CD3\zeta$ 의 세포 내 부분의 T-세포 공동 자극 분자의 세포 내 부분의 융합은 항원 인식 후 활성화 신호와 공동 자극 신호를 동시에 전송할 수 있는 제2 세대 수용체를 생성한다. 가장 일반적으로 사용되는 공동 자극 도메인은 $CD28$ 의 도메인이다. 이는 가장 강력한 공동 자극 신호, 즉 면역학적 신호 2를 공급하는데, 상기 신호는 T-세포 증식을 촉발시킨다. TNF 수용체 패밀리의 엔도도메인, 예컨대 생존 신호를 전송하는 밀접한 관련성이 있는 $OX40$ 및 $41BB$ 를 포함하는 일부 수용체가 또한 기재되었다. 활성화, 증식 및 생존 신호를 전송할 수 있는 엔도도메인을 가지는 훨씬 더 강력한 제3 세대 CAR이 이제 기재되었다.

[0075] 본 발명의 $\gamma\delta$ T 세포는 표적 항원의 결합 시 신호 2를 $\gamma\delta$ T 세포에 전송하는 공동 자극 신호전달 엔도도메인을 포함하는 CAR을 포함한다.

[0076] CAR이 세포, 예컨대 T-세포 내부에서 발현될 때, 신생 단백질이 소포체로, 이어서 CAR이 발현되는 세포 표면으로 유도되도록, 본 발명의 T 세포의 CAR은 신호 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0077] 신호 펩타이드의 코어는 단일 알파-나선체를 형성하는 경향이 있는 소수성 아미노산의 긴 스트레치를 함유할 수 있다. 신호 펩타이드는 아미노산의 짧은 양으로 하전된 스트레치로 시달될 수 있으며, 이는 전좌 동안 폴리펩타이드의 적절한 위상(topology)을 시행하는 것을 돕는다. 신호 펩타이드의 말단에는, 전형적으로 신호 펩티다제에 의해 인식되고 절단되는 아미노산의 스트레치가 존재한다. 신호 펩티다제는 전좌의 완료 동안 또는 완료 후에 절단되어 유리 신호 펩타이드 및 성숙 단백질을 생성할 수 있다. 그 다음, 유리 신호 펩타이드는 특이적 프로테아제에 의해 분해된다.

[0078] 신호 펩타이드는 분자의 아미노 말단에 있을 수 있다.

[0079] 신호 펩타이드는 서열번호 6, 7 또는 8, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 돌연변이(삽입, 치환 또는 첨가)를 가지는 이의 변이체를 포함할 수 있되, 단 신호 펩타이드는 여전히 CAR의 세포 표면 발현을 야기하도록 작용한다.

[0080] 서열번호 6: **MGTSLLCWMALCLLGADHADG**

[0081] 서열번호 6의 신호 펩타이드는 소형이면서 매우 효율적이다. 이는 말단 글리신 다음에 약 95%의 절단을 제공하여, 신호 펩티다제에 의한 효율적인 제거를 제공하는 것으로 예상된다.

[0082] 서열번호 7: **MSLPVTALLPLALLLHAARP**

[0083] 서열번호 7의 신호 펩타이드는 IgG1로부터 유래된다.

[0084] 서열번호 8: **MAVPTQVLGLLLLWLTDARC**

[0085] 서열번호 8의 신호 펩타이드는 CD8로부터 유래된다.

[0086] 공동 자극 세포 내 신호전달 도메인

[0087] 세포 내 도메인/엔도도메인은 고전적인 CAR의 신호-전송 부분이다.

- [0088] 본 발명의 $\gamma\delta$ T 세포는 표적 항원의 결합 시 $\gamma\delta$ T 세포에 신호 2를 전송하는 공동 자극 신호전달 엔도도메인을 포함하는 CAR을 포함한다. 따라서, 본 발명의 $\gamma\delta$ T 세포는 표적 항원의 결합 시 $\gamma\delta$ T 세포에 신호 1을 전송하지 않는 CAR을 포함한다.
- [0089] T-세포 동시 자극 수용체는 활성화 역치를 낮추고 T-세포 아네르기(anergy)를 방지하며 T 세포 기능을 향상시키는 질적 및 양적 변화를 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [0090] $\gamma\delta$ T 세포에 대한 다수의 공동 수용체가 당업계에서 알려져 있다. 이들 수용체 중 하나 이상을 통한 생성 신호 전달은 $\gamma\delta$ T 세포의 완전한 활성화 및 표적 세포 사멸을 초래할 수 있다.
- [0091] CAR의 항원-결합 도메인에 대한 항원의 결합이 $\gamma\delta$ T 세포에서 생성 신호 2 신호전달을 생성하도록, 본 발명의 $\gamma\delta$ T 세포는 $\gamma\delta$ T 공동 수용체 유래의 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0092] 세포 내 신호전달 도메인은, 예를 들어 DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 또는 DNAM-1(CD226) 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0093] 세포 내 신호전달 도메인은 DAP10 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0094] DAP10은 NKG2D 수용체와 회합하는 신호전달 서브유닛이다(도 1 참조). 이는 NKG2D에 대한 독점적인 결합 파트너 이면서 신호전달 중간체이고, 지질 키나제 캐스케이드를 촉발시키는 YxxM 활성화 모티브를 함유한다.
- [0095] DAP10 신호전달 도메인에 대한 아미노산의 예는 하기에 제시되어 있다:
- [0096] 서열번호 3 - **CARPRSPAQEDGKVYINMPGRG**
- [0097] 추가의 예시적인 공동 자극 도메인은 서열번호 9 내지 19에 제시되어 있다.
- [0098] 서열번호 9(CD28 엔도도메인)
- [0099] **KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY**
- [0100] 서열번호 10(CD27 엔도도메인)
- [0101] **QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP**
- [0102] 서열번호 11(41BB 엔도도메인)
- [0103] **KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL**
- [0104] 서열번호 12(OX40 엔도도메인)
- [0105] **RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI**
- [0106] 서열번호 13(CD30 엔도도메인)
- HRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGL**
MSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIM
KADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVML
SVEEEGKEDPLPTAASGK
- [0107]
- [0108] 서열번호 14(IL2-R 엔도도메인)
- [0109] **TWQRRQRKSRRTI**
- [0110] 서열번호 15(IL7-R 엔도도메인)
- KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEG**
FLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACD
APILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPFSLQSGILTLPVAQGGQ
PILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQ
- [0111]

- [0112] 서열번호 16(IL21-R 엔도도메인)
- SLKTHPLWRLWKKIWAVSPERFFMPPLYKGCSDGDFKKWVGAPFTGSSLELGPWSP
EVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVKPSFWPTAQNSGGSAYS
EERDRPYGLVSDITVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLD
AGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVS
ESEAGSPLAGLMDTDFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPrSYLRQWVIPP
LSSPGPQAS
- [0113]
- [0114] 서열번호 17(NKp30 엔도도메인)
- [0115] GSTVYYQGKCLTWKGPRRQLPAVVPAPLPPPCGSSAHLPPVPGG
- [0116] 서열번호 18(NKp44 엔도도메인)
- VWWDIWWKTMMELRSLDTQKATCHLQQVTDLPWTSVSSPVEREILYHTVARTKISD
DDDEHTL
- [0117]
- [0118] 서열번호 19(DNAM-1(CD226) 엔도도메인)
- NRRRRRERRDLFTESWDTQKAPNNYRSPISTSQPTNQSMDDTREDIYVNYPTFSRR
PKTRV
- [0119]
- [0120] 세포 내 신호전달 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 공동 자극 신호전달 도메인을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어질 수 있다.
- [0121] 세포 내 신호전달 도메인은 서열번호 3 또는 9 내지 19로서 나타낸 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0122] 서열이 효과적인 공동 자극 신호전달 도메인을 제공한다면, 변이체는 서열번호 3 또는 9 내지 19와 적어도 75%의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0123] 서열이 효과적인 공동 자극 신호전달 도메인을 제공한다면, 변이체는 서열번호 3 또는 9 내지 19와 적어도 80%의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0124] 서열이 효과적인 공동 자극 신호전달 도메인을 제공한다면, 변이체는 서열번호 3 또는 9 내지 19와 적어도 85%의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0125] 서열이 효과적인 공동 자극 신호전달 도메인을 제공한다면, 변이체는 서열번호 3 또는 9 내지 19와 적어도 90%의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0126] 서열이 효과적인 공동 자극 신호전달 도메인을 제공한다면, 변이체는 서열번호 3 또는 9 내지 19와 적어도 95%의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0127] 서열이 효과적인 공동 자극 신호전달 도메인을 제공한다면, 변이체는 서열번호 3 또는 9 내지 19와 적어도 99%의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0128] 일 실시형태에서, 세포 내 신호전달 도메인은, 서열이 효과적인 공동 자극 신호전달 도메인을 제공한다면, 서열번호 3과 적어도 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%의 서열 동일성을 공유하는 서열번호 3으로서 나타낸 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0129] 일 실시형태에서, 엔도도메인은 CD3 엔도도메인을 포함하지 않는다. 예를 들어, 엔도도메인은 CD3 엡실론 사슬, CD3 감마 사슬 및/또는 CD3 델타 사슬을 포함하지 않는다. 특정 실시형태에서, 엔도도메인은 CD3-제타 엔도도메인을 포함하지 않는다.
- [0130] 예시적인 CD3-제타 엔도도메인은 서열번호 26으로서 제시되어 있다.

- [0131] 서열번호 26(CD3 제타 엔도도메인)
- RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
- [0132] ALPPR
- [0133] 본 명세서에 기재된 바와 같이 CD3-제타 엔도도메인은 서열번호 26과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가지고 효과적인 막관통 도메인/세포 내 T 세포 신호전달 도메인을 제공하는 서열번호 26 또는 이의 변이체를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.
- [0134] 항원 결합 도메인
- [0135] 항원 결합 도메인은 항원을 인식하는 CAR의 부분이다. 항체, 항체 모방체, 및 T-세포 수용체의 항원 결합 부위를 기반으로 하는 것을 포함하여, 다수의 항원-결합 도메인이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 항원-결합 도메인은, 단클론성 항체로부터 유래된 단쇄 가변 단편(scFv); 표적 항원의 천연 리간드; 표적에 대하여 충분한 친화성을 가지는 펩타이드; 단일 도메인 항체; 인공 단일 결합체, 예컨대 다르핀(Darpin)(설계된 안키린 반복 단백질); 또는 T-세포 수용체로부터 유래된 단쇄를 포함할 수 있다.
- [0136] 항원 결합 도메인은 항체의 항원 결합 부위를 기반으로 하지 않는 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 종양 세포 표면 수용체에 대하여 가용성 리간드인 단백질/펩타이드(예를 들어, 사이토카인 또는 케모카인과 같은 가용성 펩타이드)를 기반으로 하는 도메인; 또는 결합 쌍 대응물이 종양 세포 상에서 발현되는 막 고착(anchored) 리간드 또는 수용체의 세포 외 도메인을 포함할 수 있다.
- [0137] 예로서, 본 명세서에 기재된 예는 각각 GD2 및 CD33에 결합하는 CAR에 관한 것이다.
- [0138] 항원 결합 도메인은 항원의 천연 리간드를 기반으로 할 수 있다.
- [0139] 항원 결합 도메인은 조합 라이브러리 유래의 친화성 펩타이드 또는 새로 설계된 친화성 단백질/펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0140] 종양-연관 항원(TAA)
- [0141] 항원 결합 도메인은 종양-연관 항원(TAA)에 결합할 수 있다.
- [0142] 광범위한 TAA가 당업계에 알려져 있으며, 본 발명에서 사용되는 CAR은 임의의 TAA에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.
- [0143] 예로서, 본 발명에서 사용하기 위한 CAR은 표 1에 열거된 TAA에 특이적으로 결합할 수 있다.

표 1

항원	관심 대상 종양
CD20	B- 세포 림프종, CLL
CD19	프리-B ALL, B- 세포 림프종, CLL
CD22	프리-B ALL, B- 세포 림프종, CLL
CD30	호지킨 림프종, ALCL
CD52	T- 세포 AML, 프리-B ALL
CD70	호지킨 림프종, DLCL, 신장 세포 암종, EBV+ 교모세포종, 미분화 비인두 육종
CD33	AML, MDS, APL, CML, JMML, ALL (단지 18%)
CD47	프리-B ALL, T 세포 ALL, AML
IL7 수용체 α	프리-B ALL, B 세포 림프종
TSLPR	프리-B ALL (7%), 다운 증후군에서 프리-B ALL (60%)
ROR1	프리-B ALL, CLL 외투세포 림프종
GD2	신경아세포종, 골육종, 유잉 육종, 연조직 육종, 흑색종
IL13R α 2	교모세포종, DIPG, 흑색종, 다양한 육종, 증피종
VEGFR2	종양 맥관구조
HER2	골육종, 결장암, 유방암
ALK	신경아세포종, 신경외배엽 종양, 교모세포종, 횡문근육종, 흑색종
EGFRvIII	신경교종
FGFR4	횡문근육종
B7-H3	신경아세포종
글리피칸-3/글리피칸-5	윌름스 종양, 신경아세포종, 횡문근육종, 간 암종, 흑색종
FOLR1	횡문근육종, 골육종

[0144]

[0145]

암 면역요법에서 TAA의 표적화와 연관된 문제는 낮은 수준의 TAA가 정상 조직 상에서 발현될 수 있다는 것이다. 예를 들어, GD2는 신경아세포종 TAA이지만, 이는 또한 신경 상에서도 발현되고; PSMA는 전립선 암 TAA이지만 또한 정상 신장, 간 및 결장 세포, 및 뇌 정상교세포 상에서도 발견된다. 이러한 문제는 고도로 선택적인 표적이 부족한 고품 종양에서 더 심오하다.

[0146]

정상적인 건강한 세포 상에서 TAA의 발현은 '온-타겟, 오프-종양' 부작용을 초래할 수 있다. 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포는 $\gamma \delta$ TCR 및 CAR 둘 다에 대한 리간드를 발현하는 세포에 의해서만 활성화되기 때문에, 본 발명은 이들 효과를 완화시킨다. 그러므로, 낮은 수준으로 TAA를 발현하는 정상적인 건강한 세포는 $\gamma \delta$ TCR에 결합할 수 있는 위험 신호 항원을 발현하지 않기 때문에, 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포를 활성화시키지 않을 것이다(도 2d).

[0147]

CAR의 항원 결합 도메인은 GD2, CD33, CD19 또는 EGFR에 결합할 수 있다.

[0148]

다이스알로강글리오사이드(GD2, 예를 들어 퍼브캠(pubchem)에 의해 나타내어진 바와 같음: 6450346)는 주로 세포 표면 상에서 발현되는 시알산-함유 글리코스핑고리피드이다. 이 탄수화물 항원의 기능은 완전히 이해되지 않지만; 그러나, 세포 외 기질 단백질에 종양 세포의 부착에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. GD2는 신경아세포종 상에서 조밀하고 균질하며 거의 보편적으로 발현된다. 정상 조직에서 GD2 발현은 피부 멜라노사이트, 및 말초 통증 섬유 미엘린초로 크게 제한된다. CNS 내에서, GD2는 배아 항원인 것으로 보이지만, 산재한 올리고덴드로사이트에서 및 뇌하수체 후엽 내에서 희미하게 발현되는 것으로 발견된다.

[0149]

항원 결합 도메인은 서열번호 20으로서 나타낸 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있되, 다만 변이체는 GD2에 결합하는 능력을 보유한다.

[0150]

서열번호 20

METDTLLWLLLWPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLASYNIHWWRQPPG
KGLEWLGVIWAGGSTNYSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDYS
WFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSENQMTQSPSSLSASVGDRTMTCRASSS
VSSSYLHWYQQKSGKAPKVVWYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQ
QYSGYPITFGQGTKVEIKRS

[0151]

항원 결합 도메인은, 서열번호 20으로서 나타난 서열, 또는 이의 변이체가 GD2에 결합하는 능력을 보유한다면, 서열번호 20과 적어도 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%의 서열 동일성을 공유하는 상기 변이체를 포함할 수 있다.

[0153]

CD33(예를 들어, 유니프롯(Uniprot) 수납 번호 P20138에 의해 나타난 바와 같음)은 세포에 대한 시알산 의존성 결합을 매개하는 골수단핵구성-유래 세포의 추정적인 접착 분자이다. 이는 보통 골수-특이적인 것으로 고려되지만, 또한 일부 림프계 세포 상에서 발견될 수 있다.

[0154]

항원 결합 도메인은, 서열번호 21로서 나타난 서열 또는, 이의 변이체가 GD2에 결합하는 능력을 보유한다면, 상기 변이체를 포함할 수 있다.

[0155]

서열번호 21

MAVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGK
APKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLE
IKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYG
MHWIRQAPGKLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CAAQDAYTGGYFDYWGQGTLLTVSSM

[0156]

항원 결합 도메인은, 서열번호 21로서 나타난 서열, 또는 이의 변이체가 GD2에 결합하는 능력을 보유한다면, 서열번호 21과 적어도 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%의 서열 동일성을 공유하는 상기 변이체를 포함할 수 있다.

[0158]

인간 CD19 항원은 면역글로불린 슈퍼패밀리(예를 들어, 유니프롯 P15391에 의해 나타난 바와 같음)에 속하는 95 kd의 막관통 당단백질이다. CD19는 B-세포 분화에서 매우 초기에 발현되며, 혈장 세포로의 말단 B-세포 분화에 서만 손실된다. 결과적으로, CD19는 다발성 골수종과 별개로 모든 B-세포 악성 종양 상에서 발현된다. CD19는 또한 정상적인 B 세포 구획에 의해 발현된다.

[0159]

EGFR(예를 들어, 유니프롯 수납 번호 P00533에 의해 나타난 바와 같음)은 EGF 패밀리의 리간드에 결합하고 몇몇 신호전달 캐스케이드를 활성화하여 세포 외 신호를 적절한 세포 반응으로 전환시키는 수용체 티로신 키나제이다. 알려진 리간드는 EGF, TGFA/TGF-알파, 암피레굴린, 에피젠/EPGN, BTC/베타셀룰린, 에피레굴린/EREG 및 HBEGF/헤파린-결합 EGF를 포함한다. EGFR은 다수의 암 세포에 의해 높은 수준으로 발현된다. 그러나, 이는 또한 정상적인 건강한 세포에 의해 발현된다.

[0160]

스페이스 도메인

[0161]

CAR은 항원-결합 도메인을 막관통 도메인과 연결시키고 항원-결합 도메인을 엔도도메인으로부터 공간적으로 분리시키는 스페이스 서열을 포함할 수 있다. 가요성(flexible) 스페이스는 항원-결합 도메인이 상이한 방향으로 배향되도록 하여 결합을 용이하게 할 수 있다.

[0162]

예를 들어, 스페이스 서열은 IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 인간 CD8 대 또는 마우스 CD8 대를 포함할 수 있다. 스페이스는 대안적으로 IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 CD8 대로서 유사한 길이 및/또는 도메인 간격 특성을 가지는 대안적인 링커 서열을 포함할 수 있다. 인간 IgG1 스페이스는 변경되어 Fc 결합 모티프를 제거할 수 있다.

[0163]

이들 스페이스에 대한 아미노산 서열의 예는 하기에 제공되어 있다:

- [0164] 서열번호 22(인간 IgG1의 힌지-CH₂CH₃)
- AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
- [0165] SLSLSPGKKD
- [0166] 서열번호 23(인간 CD8 대)
- [0167] TTTAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
- [0168] 서열번호 24(인간 IgG1 힌지)
- [0169] AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK
- [0170] 스페이서는 서열번호 22 내지 24와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 공유하고 서열번호 9 내지 11로서 나타낸 아미노산 서열의 기능적 활성을 보여주는 서열번호 22 내지 24 중 임의의 것의 변이체일 수 있다.
- [0171] 막관통 도메인
- [0172] 막관통 도메인은 막을 가로지르는 CAR의 서열이다.
- [0173] 막관통 도메인은 막에서 열역학적으로 안정적인 임의의 단백질 구조물일 수 있다. 이는 전형적으로 몇몇 소수성 잔기로 구성되는 알파 나선체이다. 임의의 막관통 단백질의 막관통 도메인은 본 발명의 막관통 부분을 공급하기 위해 사용될 수 있다. 단백질의 막관통 도메인의 존재 및 범위는 TMHMM 알고리즘(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 또한, 단백질의 막관통 도메인이 비교적 단순한 구조, 즉 막을 가로지르기에 충분한 길이의 소수성 알파 나선체를 형성하는 것으로 예상되는 폴리펩타이드 서열인 것을 고려하면, 인위적으로 설계된 TM 도메인이 또한 사용될 수 있다(US 7052906 B1은 합성 막관통 구성요소를 기재함).
- [0174] 막관통 도메인은 임의의 유형 I 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 막관통 도메인은 소수성 나선체를 형성하는 것으로 예상되는 합성 서열일 수 있다.
- [0175] 막관통 도메인은 CD28로부터 유래될 수 있으며, 이는 양호한 수용체 안정성을 제공한다.
- [0176] 막관통 도메인은 서열번호 25로서 나타낸 서열을 포함할 수 있다.
- [0177] 서열번호 25(CD28 막관통 도메인)
- [0178] FWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV
- [0179] 핵산
- [0180] 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 제공한다.
- [0181] 핵산 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2로서 나타낸 아미노산 서열을 가지는 CAR을 암호화할 수 있다.

[0182] 서열번호 4(aCD33-Fc-DAP10 CAR)

ATGGCCGTGCCCCACTCAGGTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCC
AGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGCGA
GATCGCGTCACCATCACCTGTGCGAGCAAGTGAGGACATTTATTTAATTTAGTGT
GGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATC
GCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAG
TATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCAACCCGAAGATTTGCAACCTATTATTGTC
AACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTCCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCA
AAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTC

[0183]

GGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGC
TTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTAC
TCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGA
GTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCTACCTTCAA
ATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACAGGA
CGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGT
CTCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA
AACCCAAGGACACCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCG
GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCT
GAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGCTGGTGGTGG
GAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCT
GGGTGTGCGCCAGACCACGGCGGAGCCAGCCAGGAGGACGGCAAGGTGTA
CATCAACATGCCCCGGCCGCGGCTGA

[0184]

[0185] 서열번호 5(aGD2-Fc-DAP10 CAR)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAG
CACCGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCCAGC
CAGACCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGGCCAGCTACAA
CATCCACTGGGTGCGGCAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTG
ATCTGGGCTGGCGGCAGCACCAACTACAACAGCGCCCTGATGAGCCGGCTGAC
CATCAGCAAGGACAACAGCAAGAACCAGGTGTTCTGAAGATGAGCAGCCTGAC
AGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGCGGAGCGACGACTACAGCT
GGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCTCTGGCGGAGG
CGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGAACCAGATGACC

[0186] CAGAGCCCCAGCAGCTTGAGCGCCAGCGTGCGGACCGGGTGACCATGACCT
GCAGAGCCAGCAGCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAG
AGCGGCAAGGCCCCAAAGGTGTGGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGG
CGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACACCCTGACC
ATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG
CGGCTACCCCATCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTTCGG
ATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAG
CACCTCCCGTGCGCCGGCCCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACCTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC
TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
ATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCA
GGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTGCTGG
CCTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGTGCGCCA
GACCACGGCGGAGCCCAGCCCAGGAGGACGGCAAGGTGTACATCAACATGCC
CGGCCGCGGCTGA

[0187]

[0188] 핵산 서열은 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여 서열번호 1 또는 2에 의해 암호화되는 것과 동일한 아미노산 서열을 암호화할 수 있지만, 상이한 핵산 서열을 가질 수 있다. 핵산 서열은, 본 발명의 제1 양태에 정의된 바와 같이 CAR을 암호화한다면, 서열번호 4 또는 서열번호 5로서 나타난 서열과 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99%의 동일성을 가질 수 있다.

[0189] 변이체

[0190] 서열 비교는 눈으로, 또는 보다 일반적으로 용이하게 이용가능한 서열 비교 프로그램의 도움으로 수행될 수 있다. 이러한 공개적으로 그리고 상업적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 사이의 서열 동일성을 계산할 수 있다.

- [0191] 서열 동일성은 인접한 서열에 대하여 계산될 수 있는데, 즉 하나의 서열은 다른 서열과 정렬되고 하나의 서열에서 각각의 아미노산은 한 번에 하나의 잔기씩 다른 서열에서 상응하는 아미노산과 직접 비교된다. 이는 "갭이 없는(ungapped)" 정렬이라고 불린다. 전형적으로, 이와 같은 갭이 없는 정렬은 비교적 짧은 수의 잔기(예를 들어 50개 미만의 인접한 아미노산)에 대하여 실행된다.
- [0192] 이는 매우 간단하고 일관된 방법이지만, 예를 들어 다른 동일한 서열 쌍에서 하나의 삽입 또는 결실이 다음 아미노산 잔기가 정렬을 벗어나게 하여, 잠재적으로 전반적인 정렬이 실행될 때 상동성 %에서 큰 감소를 가져올 것임을 고려하지 못한다. 결과적으로, 대부분의 서열 비교 방법은 전반적인 상동성 점수를 지나치게 불리하게 만들지 않으면서 가능한 삽입 및 결실을 고려한 최적의 정렬을 생성하도록 고안되어 있다. 이는 서열 정렬에서 "갭"을 삽입하여 국소 상동성을 최대화하려고 시도함으로써 이루어진다.
- [0193] 그러나, 이러한 보다 복잡한 방법은 정렬에서 발생하는 각각의 갭에 "갭 페널티"를 할당하므로, 동일한 수의 동일한 아미노산에 대하여, 가능한 적은 갭을 가지는 서열 정렬(비교된 2개의 서열 사이에서 더 높은 관련성을 반영함)은 다수의 갭을 가지는 것보다 더 높은 점수를 얻을 것이다. 갭의 존재에 대해 상대적으로 높은 비용을 청구하고 갭 내의 각각의 후속 잔기에 대해 더 적은 페널티를 부과하는 "아핀 갭 비용(affine gap cost)"이 전형적으로 사용된다. 이는 가장 일반적으로 사용되는 갭 채점 시스템이다. 물론 높은 갭 페널티는 더 적은 수의 갭을 가지는 최적화된 정렬을 생성할 것이다. 대부분의 정렬 프로그램은 갭 페널티가 변형될 수 있게 한다. 그러나, 서열 비교를 위한 이와 같은 소프트웨어를 사용할 때 디폴트 값을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, GCG 위스콘신 베스트피트(Wisconsin Bestfit) 패키지(하기 참조)를 사용할 때 아미노산 서열에 대한 디폴트 갭 페널티는 갭에 대해 -12이고 각각의 연장에 대해 -4이다.
- [0194] 그러므로, 최대 서열 동일성 %의 계산은 우선 갭 페널티를 고려하여 최적의 정렬의 생성을 필요로 한다. 이와 같은 정렬을 수행하기 위한 적합한 컴퓨터 프로그램은 GCG 위스콘신 베스트피트 패키지(위스콘신 대학교, 미국; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387)이다. 서열 비교를 실행할 수 있는 다른 소프트웨어의 예는 블라스트(BLAST) 패키지(문헌 [Ausubel *et al.*, 1999, 상기 문헌 18장] 참조), 파스타(FASTA)(Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) 및 진워크스(GENEWORKS) 비교 도구 모음을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 블라스트 및 파스타 둘 다 오프라인 및 온라인 검색에 이용가능하다(문헌[Ausubel *et al.*, 1999, 상기 문헌 페이지 7-58 내지 7-60] 참조). 그러나, GCG 베스트피트 프로그램을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0195] 최종 서열 동일성은 동일성에 관하여 측정될 수 있지만, 정렬 과정 자체는 전형적으로 양단간(all-or-nothing)의 비교를 기반으로 하지 않는다. 대신, 화학적 유사성 또는 진화 거리를 기반으로 하는 각각의 쌍별 비교에 점수를 할당하는 스케일링된 유사성 점수 매트릭스가 일반적으로 사용된다. 일반적으로 사용되는 이와 같은 매트릭스의 예는 블로섬62(BLOSUM62) 매트릭스(블라스트 프로그램 모음을 위한 디폴트 매트릭스)이다. GCG 위스콘신 프로그램은 일반적으로 공개된 디폴트 값 또는 공급된다면 사용자 정의 기호 비교표(더 상세한 내용에 대해서는 사용자 설명서 참조)를 사용한다. GCG 패키지에 대해서는 공개된 디폴트 값을 사용하거나, 다른 소프트웨어의 경우 블로섬62와 같은 디폴트 매트릭스를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0196] 소프트웨어가 최적 정렬을 생성하면, 서열 동일성 %를 계산할 수 있다. 소프트웨어는 전형적으로 서열 비교의 일부로서 이를 수행하고 수치 결과를 생성한다.
- [0197] 본 발명에 따른 용어 "변이체"는 생성된 아미노산 서열이 비변형 서열과 실질적으로 동일한 활성을 유지한다면, 서열로부터 또는 서열로 하나(또는 그 이상)의 아미노산의 임의의 치환, 변이, 변형, 대체, 결실 또는 첨가를 포함한다.
- [0198] 보존적 치환은, 예를 들어 하기 표에 따라 이루어질 수 있다. 제2 칼럼에서 동일한 블록 및 바람직하게는 제3 칼럼에서 동일 라인의 아미노산은 서로 치환될 수 있다:

지방족	비극성	G A P
		I L V
	극성 - 비하전	C S T M
		N Q
	극성 - 하전	D E
		K R
방향족		H F W Y

[0199]

[0200]

숙련자는 다수의 상이한 폴리뉴클레오타이드 및 핵산이 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서 동일한 폴리펩타이드를 암호화할 수 있음을 이해할 것이다. 추가적으로, 숙련자가, 일상적인 기법을 사용하여, 폴리펩타이드가 발현되어야 하는 임의의 특정 숙주 유기체의 코돈 선호도를 반영하도록 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 폴리펩타이드 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오타이드 치환이 이루어지게 할 수 있음이 이해되어야 한다.

[0201]

본 명세서에 기재된 바와 같은 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 본 명세서에 나타낸 바와 같은 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있다.

[0202]

백터

[0203]

본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 서열을 포함하는 백터를 제공한다. 이와 같은 백터는 본 발명의 제1 양태에 따른 분자를 발현하고 생성하도록, 핵산 서열을 숙주 세포 내에 도입하기 위해 사용될 수 있다.

[0204]

백터는, 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 백터, 예컨대 레트로바이러스 백터 또는 렌티바이러스 백터일 수 있다.

[0205]

백터는 T 세포를 형질감염 또는 형질도입할 수 있다.

[0206]

백터는 또한 자살 유전자, 예컨대 iCasp9 또는 RQR8을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0207]

자살 유전자는 허용가능하지 않은 독성에 직면하여, T-세포와 같은 입양으로 전달된 세포를 선택적으로 파괴할 수 있는 유전적으로 암호화된 메커니즘이다.

[0208]

카스파제 9(Caspase 9)의 활성화는 세포 자멸을 초래한다. 카스파제 9 뒤의 활성화 메커니즘은 iCasp9 분자에 의해 활용되었다. 카스파제 9가 활성화되는 데 필요한 모든 것은 카스파제 9가 동종이량체화하기 위해 에너지 장벽을 극복하는 것이다. 동종이량체는 구조 변화를 겪고 한 쌍의 이량체 중 하나의 단백질 분해 도메인은 활성화된다. 생리학적으로, 이는 카스파제 9의 CARD 도메인의 APAF-1에의 결합에 의해 일어난다. iCasp9에서, APAF-1 도메인은 이량체화의 화학 유도제(chemical inducer of dimerization; CID)에 선택적으로 결합하도록 돌연변이된 변형된 FKBP12로 대체된다. CID의 존재는 동종이량체화 및 활성화를 초래한다. iCasp9는 인간 FK506 결합 단백질(FK506 binding protein; FKBP)에 융합된 변형된 인간 카스파제 9를 기반으로 한다(Straathof et al (2005) Blood 105:4247-4254). 이는 AP1903으로 알려진 소분자 CID의 존재 하에 조건부 이량체화를 가능하게 한다.

[0209]

RQR8의 발현은 T-세포를 항-CD20 항체 리투시맵(Rituximab)에 민감하게 만들지만 전장 CD20 분자보다 더 소형이다(Philip, B. et al. (2014) Blood doi: 10.1182/blood-2014-01 -545020).

[0210]

약제학적 조성물

[0211]

본 발명은 또한 본 발명의 백터 또는 CAR-발현 T 세포를, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제, 및 선택적으로 하나 이상의 추가의 약학적으로 활성인 폴리펩타이드 및/또는 화합물과 함께 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 이와 같은 제형은, 예를 들어 정맥 내 주입에 적합한 형태일 수 있다.

[0212]

방법

- [0213] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 핵산 서열 또는 벡터를 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 세포를 제조하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0214] 본 발명에 따른 CAR-발현 세포는 환자 자신의 말초 혈액으로부터(제1군), 또는 공여자 말초 혈액 유래의 조혈모세포 이식물의 설정에서(제2군), 또는 관련이 없는 공여자 유래의 말초 혈액에서(제3군) 생체 외에서 형성될 수 있다. 대안적으로, CAR T-세포는 유도성 전구세포 또는 배아 전구세포의 T-세포로의 생체 외 분화로부터 유래될 수 있다. 이러한 경우, CAR T-세포는 바이러스 벡터를 이용한 형질도입, DNA 또는 RNA를 이용한 형질감염을 포함하는 다수의 수단 중 하나에 의해 CAR을 암호화하는 DNA 또는 RNA를 도입함으로써 생성된다.
- [0215] 방법은 $\gamma \delta$ T 세포 자극제로 세포를 자극하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, ' $\gamma \delta$ T 세포 자극제'는 세포의 혼합된 출발 집단으로부터 $\gamma \delta$ T 세포의 증식 및/또는 생존을 선택적으로 자극하는 임의의 작용제를 말한다.
- [0216] 따라서, 생성된 세포 집단은, 세포의 출발 집단과 비교하여, 증가된 수의 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 특정 $\gamma \delta$ TCR 수용체를 발현하는 특정 $\gamma \delta$ T 세포)가 풍부해진다.
- [0217] 본 발명에 따라서 생성된 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어 특정 $\gamma \delta$ TCR 수용체를 발현하는 특정 $\gamma \delta$ T 세포가 풍부해질 수 있다. 즉, 본 발명에 따라서 생성된 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 증가된 수의 $\gamma \delta$ T 세포를 가질 것이다. 예를 들어, 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포 집단은, 대상체로부터 분리된 샘플에서 $\gamma \delta$ T 세포와 비교하여, 특정 $\gamma \delta$ TCR 수용체를 발현하는 증가된 수의 $\gamma \delta$ T 세포를 가질 것이다. 다시 말하면, $\gamma \delta$ T 세포의 백분율 또는 비율이 증가될 것이라는 점에서, $\gamma \delta$ T 세포 집단의 조성은 "천연" T 세포 집단(즉, 본 명세서에서 논의된 확장 단계를 거치지 않은 집단)의 조성과 상이할 것이다.
- [0218] 본 발명에 따른 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 적어도 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100%의 $\gamma \delta$ T 세포를 가질 수 있다.
- [0219] 본 발명에 따른 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 적어도 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100%의 특정 $\gamma \delta$ TCR 수용체를 발현하는 $\gamma \delta$ T 세포를 가질 수 있다.
- [0220] 예로서, $\gamma \delta$ T 세포 자극제는 아이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP); IPP의 유사체(예를 들어, 브로모하이드린 파이로포스페이트 또는 (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 파이로포스페이트); 및 파네실 파이로포스페이트 신타제(FPPS)의 억제제 또는 아미노비스포스포네이트, 예컨대 졸레드로네이트 또는 파미드로네이트일 수 있다.
- [0221] $\gamma \delta$ T 자극제는 일반적인 T 세포 분열촉진제(T cell mitogen), 예를 들어 유사분열촉진 사이토카인(mitogenic cytokine), 예컨대 IL-2와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0222] $\gamma \delta$ T 세포를 자극하는 추가적인 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 콘카나발린(Concanavalin) A(Siegers, G. M. *et al.* *PLoS ONE* **6**, e16700 (2011)), 플라스틱 상에 고정화된 항- $\gamma \delta$ TCR 항체; 공급자로서 조작된 인공 항원 제시 세포 및 항- $\gamma \delta$ TCR 항체에서 코팅된 조작된 인공 항원 제시 세포(Fisher, J. *et al.*; *Clin. Cancer Res.* (2014))의 사용을 포함한다.
- [0223] 치료 방법
- [0224] 질환을 치료하기 위한 방법은 본 발명의 벡터 또는 T 세포의 치료적 사용에 관한 것이다. 이 점에 관하여, 벡터 또는 T 세포는 질환과 연관된 적어도 하나의 증상을 경감시키거나, 감소시키거나 또는 개선시키기 위하여 및/또는 질환의 진행을 늦추거나 감소시키거나 차단시키기 위하여 기존 질환 또는 병태를 가지는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0225] CAR-발현 T 세포는 환자 자신의 말초 혈액으로부터(제1군), 또는 공여자 말초 혈액 유래의 조혈모세포 이식물의 설정에서(제2군), 또는 관련이 없는 공여자 유래의 말초 혈액에서(제3군) 생체 외에서 형성될 수 있다. 대안적으로, CAR T-세포는 유도성 전구세포 또는 배아 전구세포의 T-세포로의 생체 외 분화로부터 유래될 수 있다. 이러한 경우, CAR T-세포는 바이러스 벡터를 이용한 형질도입, DNA 또는 RNA를 이용한 형질감염을 포함하는 다수의 수단 중 하나에 의해 CAR을 암호화하는 DNA 또는 RNA를 도입함으로써 생성된다.
- [0226] 일 실시형태에서, $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 샘플은 대상체로부터 사전에 분리될 수 있다.
- [0227] 본 발명에 따른 CAR T 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성될 수 있다. 특히, 질환을 치료하기 위한 방법에 사용하기 위한 CAR-발현 T 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같이 바이러스 벡터로 T 세포를 형

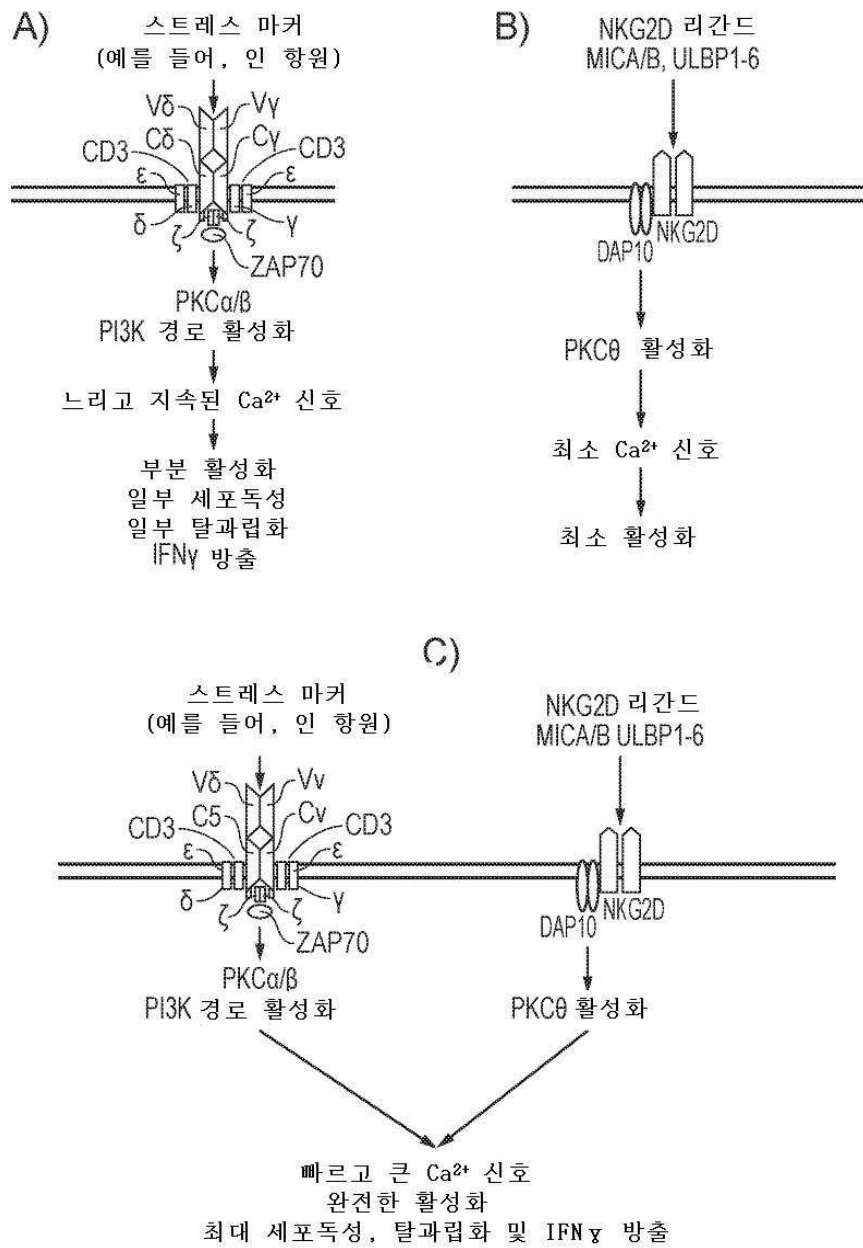
질도입하는 단계 또는 공동 자극 CAR을 암호화하는 DNA 또는 RNA로 형질감염시키는 단계, 및 $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 사용하여 $\gamma \delta$ T 세포를 확장시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다.

- [0228] $\gamma \delta$ T 세포 자극제는, 예를 들어 아이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP); IPP의 유사체(예를 들어, 브로모하이드린 파이로포스페이트 또는 (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 파이로포스페이트); 및 파네실 파이로포스페이트 신타제(FPPS)의 억제제 또는 아미노비스포스포네이트, 예컨대 줄레드로네이트 또는 파미드로네이트일 수 있다.
- [0229] 본 발명의 CAR 분자를 발현하는 T 세포는, 예를 들어 암, 미생물 감염 및 바이러스 감염을 비롯하여 다양한 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [0230] 암은, 예를 들어 방광암, 유방암, 결장암, 자궁암, 신장암(신장 세포), 폐암, 뇌종양, 흑색종, 백혈병, 림프종, 췌장암, 전립선암 또는 갑상선암일 수 있다.
- [0231] 본 발명에 따른 방법 및 용도는 추가적인 조성물과 조합하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 치료될 질환이 암인 경우, 본 발명의 조성물은 추가적인 암 치료법, 예컨대 항암화학요법 및/또는 방사선요법과 병용하여 투여될 수 있다.
- [0232] 본 발명의 조성물은 $\gamma \delta$ T 세포 자극제, 예컨대 아이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP); IPP의 유사체(예를 들어, 브로모하이드린 파이로포스페이트 또는 (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 파이로포스페이트); 및 파네실 파이로포스페이트 신타제(FPPS)의 억제제 또는 아미노비스포스포네이트, 예컨대 줄레드로네이트 또는 파미드로네이트와 조합하여 투여될 수 있다.
- [0233] 특히, 줄레드로네이트 또는 파미드로네이트는 IL-2와 조합하여 $V\delta 2+$ $\gamma \delta$ T 세포의 생체 내 확장에 사용될 수 있다. 이 접근법을 사용한 다수의 제I상 임상 시험이 존재한다(문헌[Fisher *et al.*; Oncolmmunology; 3; e27572] 참조).
- [0234] '조합으로'는 본 발명에 따른 조성물의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후 추가적인 요법 또는 $\gamma \delta$ T 세포 자극제의 투여를 말할 수 있다.
- [0235] 본 발명은 이제 실시예에 의해 추가로 기재될 것이며, 실시예는 본 발명을 수행함에 있어서 당업자를 돕는 역할을 하는 것을 의미하고 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0236] 실시예
- [0237] 실시예 1 - 공동 자극 CAR을 발현하는 $\gamma \delta$ T 세포의 생성
- [0238] 피콜(Ficoll) 밀도 구배 분리를 사용하여 건강한 공여자의 혈액으로부터 PBMC를 추출하였다. 이를 10% FCS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 100 u/ml의 인간 IL-2 및 5 μ M 줄레드로논산을 보충한 RPMI 1640 배지 중에서 5일 동안 배양하였다.
- [0239] 5일 후, 이를, 마커 유전자로서 작용하며 또한 리투시맵(aCD20) 민감성 자살 유전자를 제공하는, RQR8에 융합된 CAR 구조체를 포함하는 레트로바이러스를 이용하여 형질도입하였다.
- [0240] 본 명세서에 기재된 예시적인 CAR은 GD2-특이적 scFv, IgG1의 Fc 부분을 기반으로 한 링커, CD28로부터 유래된 막관통 도메인 및 DAP10의 엔도도메인을 포함한다(도 10 참조).
- [0241] 제2의 예시적인 CAR은 CD33-특이적 scFv, IgG1의 Fc 부분을 기반으로 한 링커, CD28로부터 유래된 막관통 도메인 및 DAP10의 엔도도메인을 포함한다(도 11 참조).
- [0242] $\gamma \delta$ T 세포의 내인성 TCR을 가지는 항-GD2-Fc-DAP10 CAR의 동시 발현이 입증되었다(도 4).
- [0243] 실시예 2 - aGD2-Fc-DAP10 CAR를 이용하여 형질도입된 $V\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포에 의한 GD2+ 세포주인 LAN1 및 TC71의 사멸
- [0244] LAN1 및 TC71 세포주 둘 다 GD2를 발현하는 것으로 알려져 있다.
- [0245] GD2+ 신경아세포종 세포주 LAN1의 현저한 사멸은 단지 CAR 형질도입된 세포가 사용될 때에만 나타났고 비형질도입된(NT) $V\delta 2$ 세포가 효과기로서 사용되었을 때에는 나타나지 않았다(도 5A).
- [0246] aGD2-Fc-DAP10 CAR을 24시간의 줄레드로논산 처리와 조합하여 사용하였을 때 GD2+ 유잉 육종 세포주 TC71에 대하여 상가 효과가 있었다(도 5B).

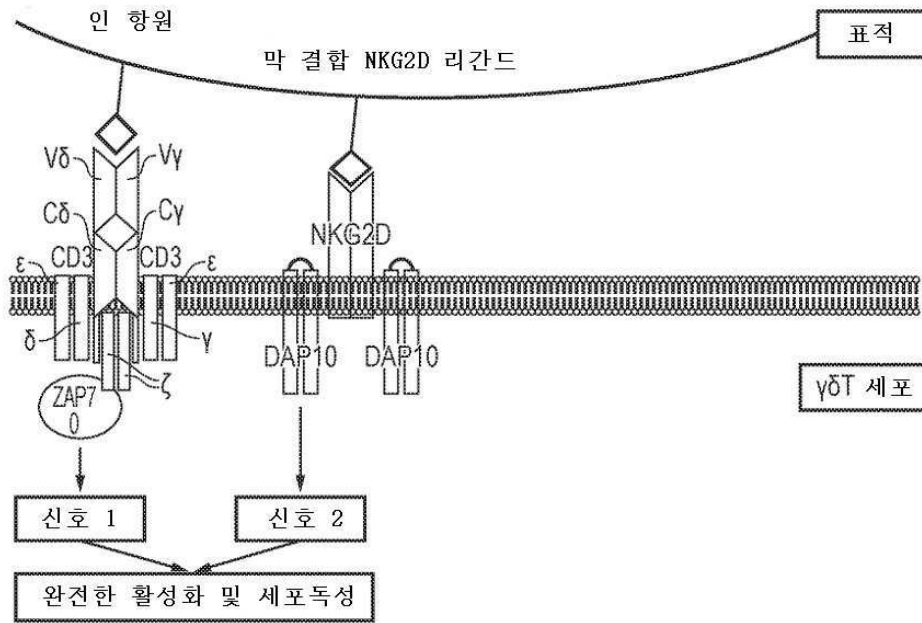
- [0247] CAR의, 세포 스트레스에 반응하여 $\gamma \delta$ TCR에 의해 제공되는 신호 1이 없는 $\alpha \beta$ T 세포에의 첨가는 $V \delta 2+$ $\gamma \delta$ T 세포에서 CAR의 효과와는 달리, 세포독성에 대하여 전혀 영향을 미치지 않았다(도 5C). 이는, CAR 신호 단독으로는 T-세포 활성화에 불충분하다는 것을 나타낸다.
- [0248] $\gamma \delta$ T 세포에서 aGD2-Fc-DAP10 CAR의 발현은 GD2 음성 SK-N-SH 세포의 GD2-특이적 사멸을 초래하지 않았다(도 6).
- [0249] 실시예 3 - 연장된 공동 배양 및 GD2 특이적 확장 후 CAR 발현의 보존
- [0250] 형질도입 24일 후에 공동 배양을 시작하였고, 조사된 GD2+(LAN1) 및 GD2-(SK-N-SH) 신경아세포종 세포의 존재 하에 CAR 및 TCRV $\delta 2$ 의 존재에 대한 세포의 연속 분석을 수행하였다(도 7A).
- [0251] aGD2-Fc-DAP10 형질도입된 $V \delta 2+$ 세포의 확장은 조사된 GD2+ 표적 세포의 존재 하에서만 나타났다(도 7B).
- [0252] 실시예 4 - 항-CD33-DAP10 CAR을 발현하는 $\gamma \delta$ T 세포에 의한 CD33+ 단핵구가 아닌 CD33+ AML 세포의 특이적 사멸
- [0253] 동등한 수준의 CD33 발현을 3가지 AML 세포주 및 단핵구에서 입증하였다(도 8).
- [0254] $V \delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포를 항-CD33-Fc-DAP10 또는 항-CD33-Fc-CD28-CD3z CAR 구조체를 이용하여 형질도입하였다.
- [0255] 항-CD33-Fc-CD28-CD3z CAR 구조체는 CD33의 존재 하에 신호 1 및 신호 2를 제공한다. 항-CD33-Fc-DAP10은 CD33의 존재 하에 신호 2를 제공한다.
- [0256] aCD33-CD28-CD3z CAR을 이용하여 형질도입된 세포는 임의의 CD33 양성 세포를 사멸시켰고 건강한 단핵구를 남겨 두지 않았다. aCD33-Fc-DAP10 CAR을 이용하여 형질도입된 세포는 단핵구를 사멸시키지 않는다(도 9a).
- [0257] 비형질도입 대조군과 비교하여 AML의 사멸은 상당히 향상되었으나 aCD33-Fc-DAP10 CAR을 이용하여 형질도입된 $V \delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포에 의한 단핵구의 사멸은 향상되지 않았다(도 9b).
- [0258] 상기 명세서에 언급된 모든 간행물은 본 명세서에 참고로 포함된다. 기재된 본 발명의 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변이는 본 발명의 범주 및 사상을 벗어나지 않으면서 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명이 바람직한 특정 실시형태와 관련되어 기재되었지만, 청구된 본 발명은 이와 같은 특정 실시형태로 지나치게 제한되어서는 안 된다는 것을 이해하여야 한다. 실제로, 본개 생물학, 세포 면역학 또는 관련 분야의 숙련자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 기재된 방식의 다양한 변형은 하기 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

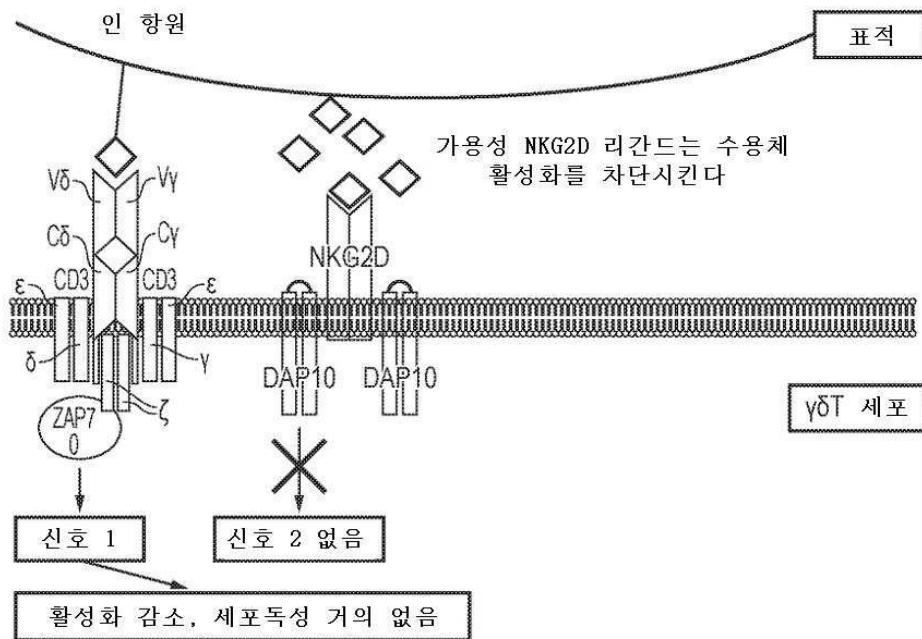
도면1



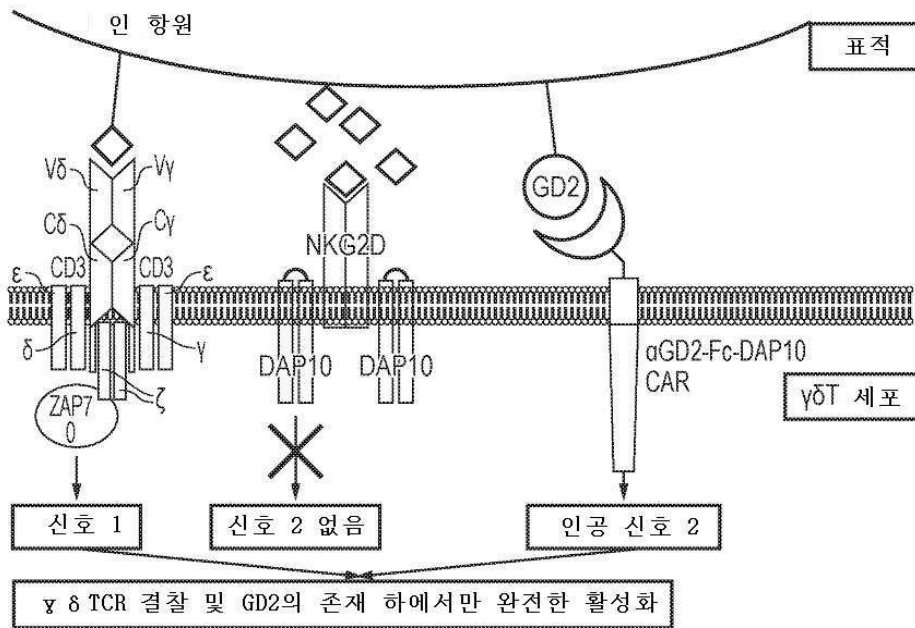
도면2a



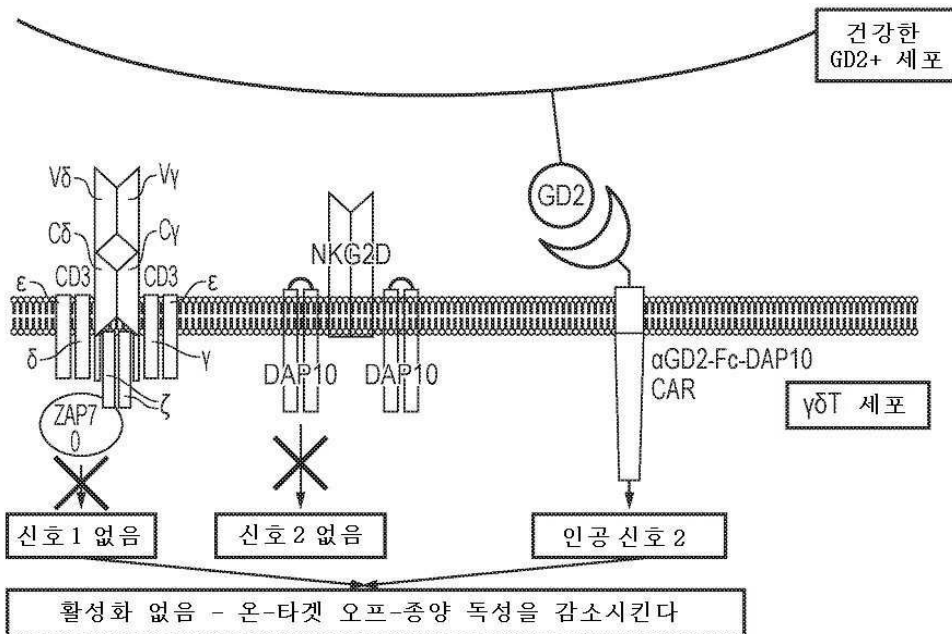
도면2b



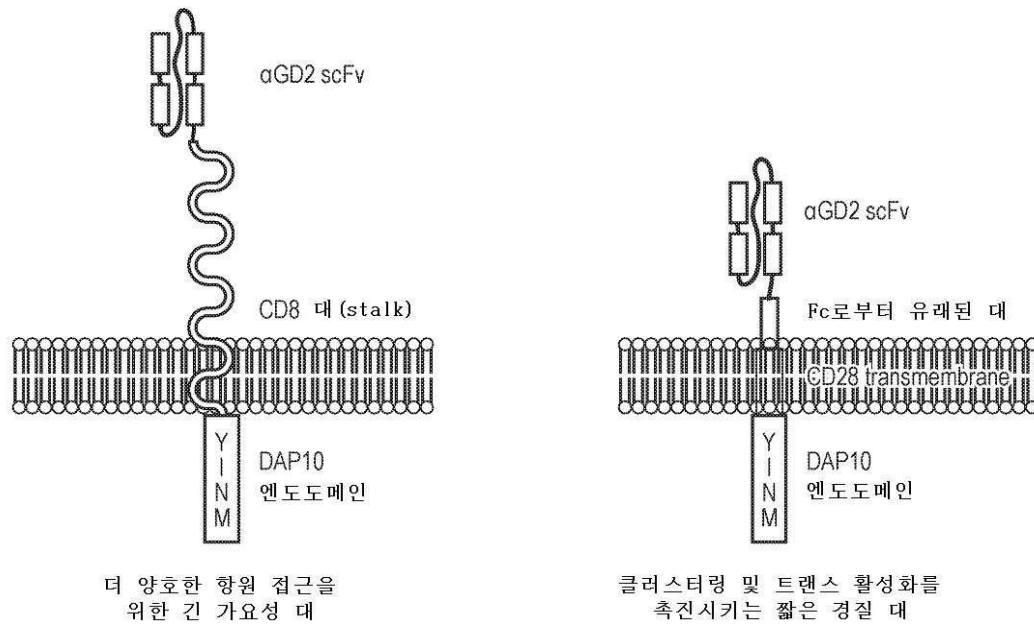
도면2c



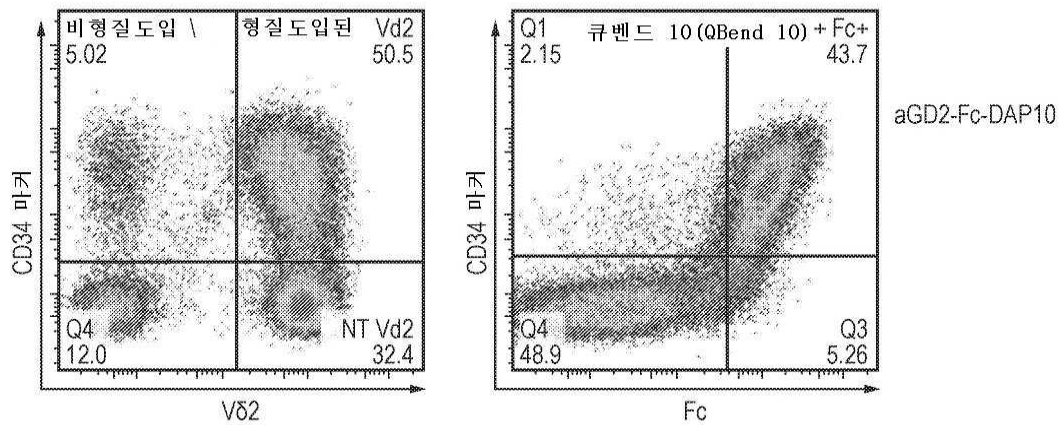
도면2d



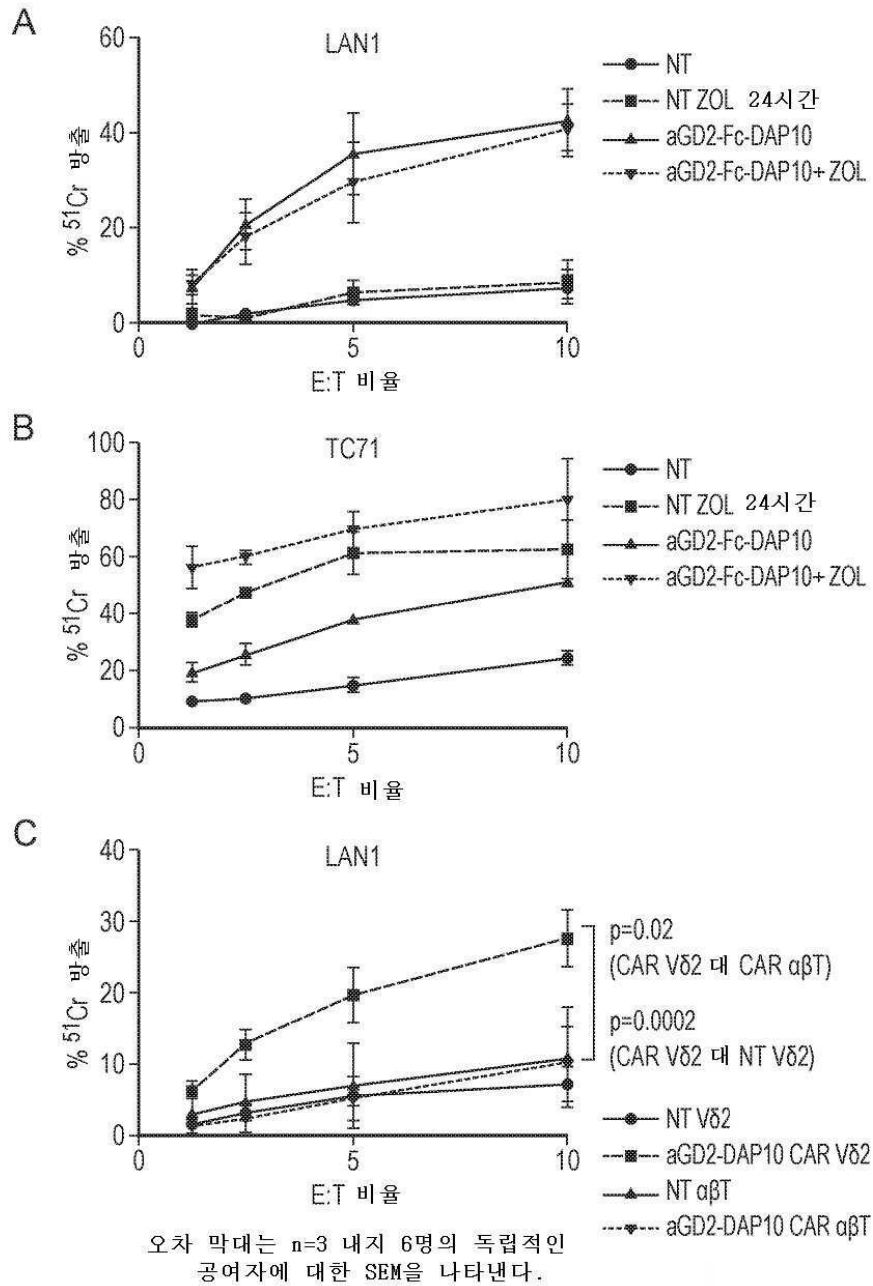
도면3



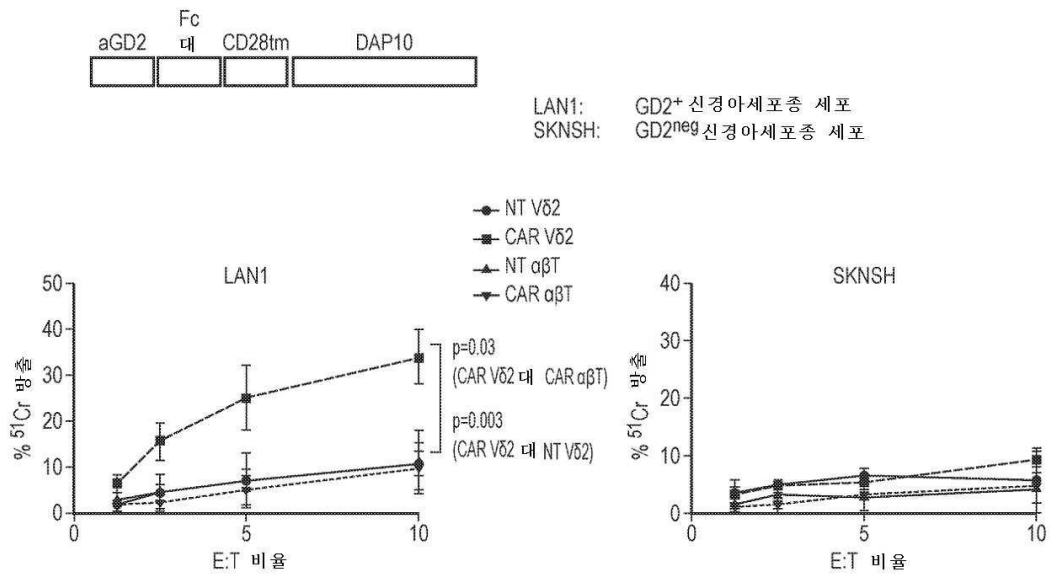
도면4



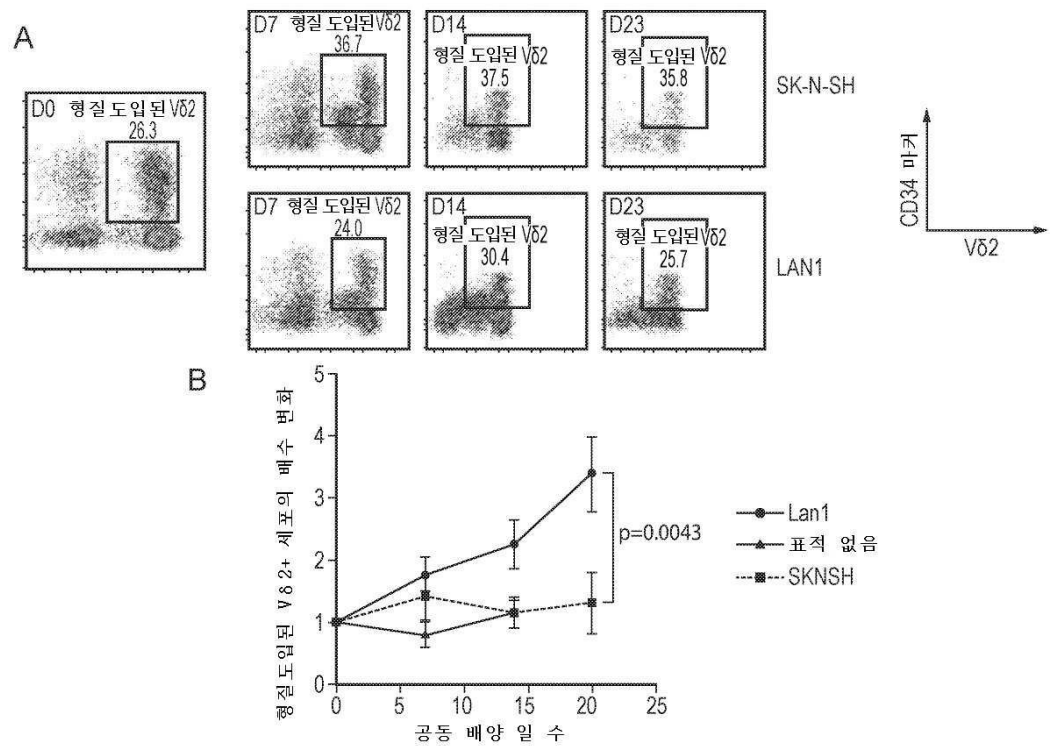
도면5



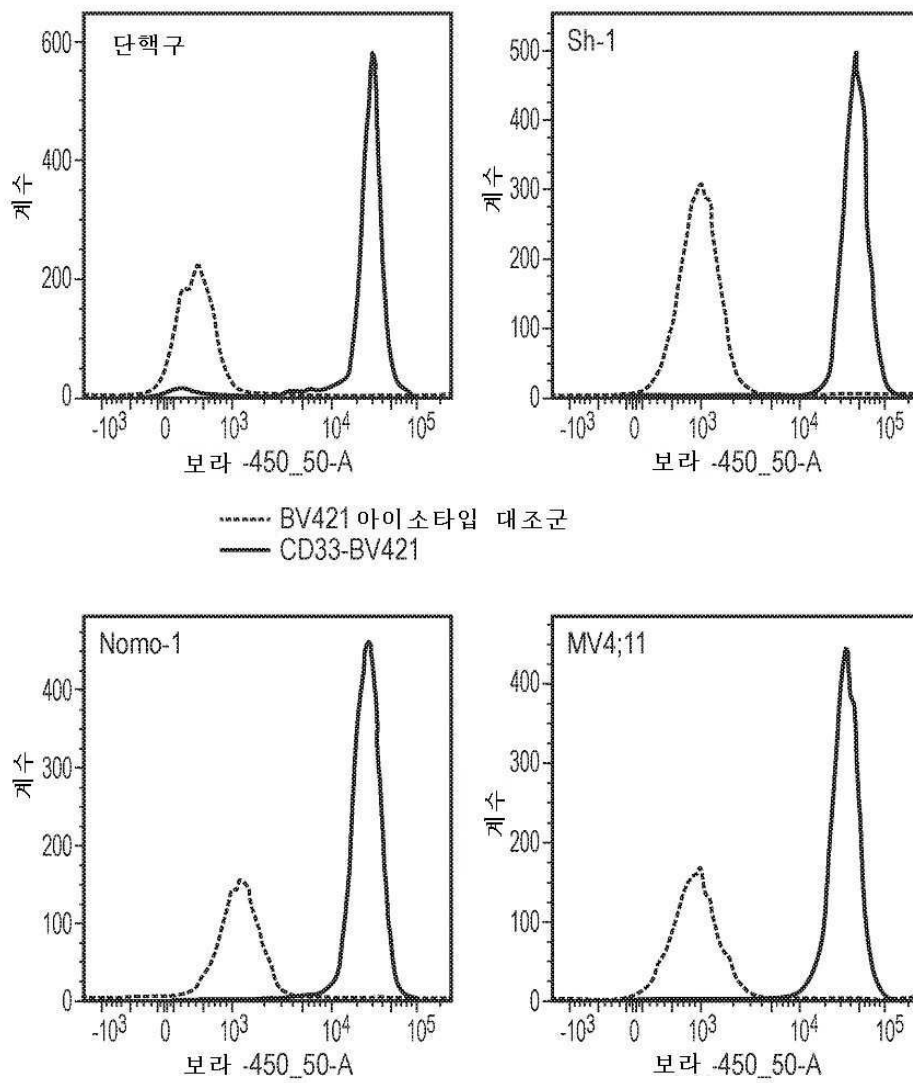
도면6



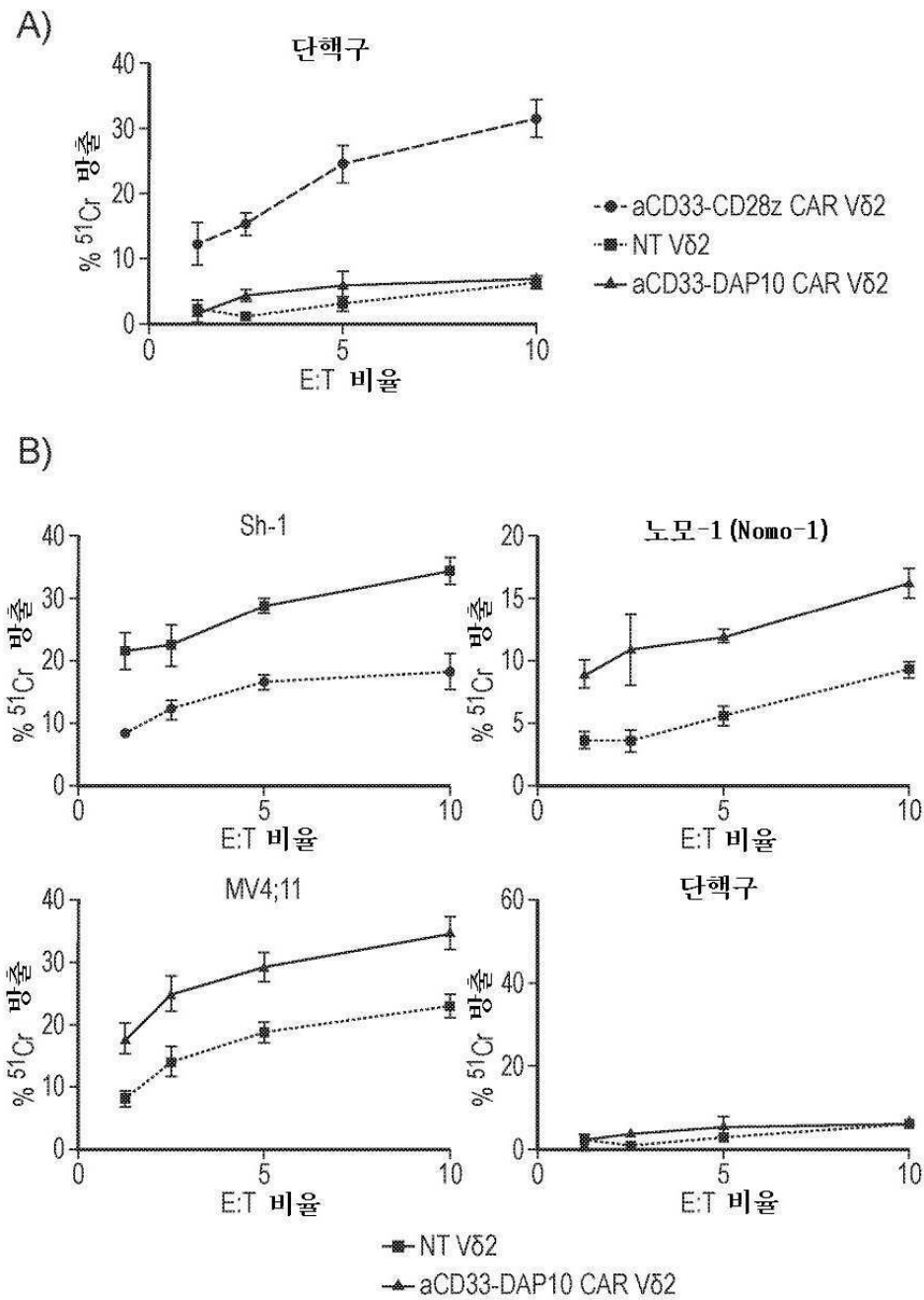
도면7



도면8



도면9



도면10a

aGD2-Fc-DAP10 CAR의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 5)

```

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCA
GGCAGCACCCGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGT
GAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAG
CCTGGCCAGCTACAACATCCACTGGGTGCGGCAGCCCCAGGCAAGGG
CCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGCTGGCGGCAGCACCAACTACAA
CAGCGCCCTGATGAGCCGGCTGACCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAA
CCAGGTGTTCCCTGAAGATGAGCAGCCTGACAGCCGCCGACACCGCGT
GTACTACTGCGCCAAGCGGAGCGACGACTACAGCTGGTTCGCCTACTG
GGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTG
GCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGAACCAGATGACCCAG
AGCCCCAGCAGCTTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATGACC
TGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAG
CAGAAGAGCGGCAAGGCCCCAAAGGTGTGGATCTACAGCACCAGCAAC
CTGGCCAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCAC
CGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCAC
CTACTACTGCCAGCAGTACAGCGGCTACCCCATCACCTTCGGCCAGGGC
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTCCGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCT
GACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCCGTGGCCGGC
CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCG
CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAA
GAAGGACCCCAAGTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTGCTGGC
CTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGTG
GCCAGACCACGGCGGAGCCCAGCCAGGAGGACGGCAAGGTGTACAT
CAACATGCCCCGGCCGCGGCTGA
    
```

aGD2-Fc-DAP10 CAR의 아미노산 서열(서열번호 2)

```

METDTLLWLLWPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLTITVSGFSLAS
YNIHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKM
SSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGG
GSENQMTQSPSSLSASVGDRTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPKV
WIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITF
GGGTKVEIKRSDPAEPKSPDKHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIA
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
MLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
    
```

도면10b

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWLVV
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWICARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG

핵심

항-GD2 scFv
Fc γ 수용체에의 결합을 방지하기 위한 PPVA 돌연변이를 가지는 CH2CH3 스페이서
CD28 막관통 도메인
DAP10 엔도도메인

도면11a

aCD33-Fc-DAP10 CAR의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 4)

```

ATGGCCGTGCCCACTCAGGTCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAG
ATGCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCA
TCTGTCCGAGATCGCGTCACCATCACCTGTCCGAGCAAGTGAGGACATTI
ATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTC
CTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTTCA
GTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCA
ACCCGAAGATTTTCGAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCT
CACGTTCCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGG
AGGGTCAGGAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGA
GGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTG
CAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCACTC
TCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGAAGGGTCT
GGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG
ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCAC
CCTCTACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTAT
TACTGTGCAGCACAGGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGG
GCCAAGGAACGCTGGTCAAGTCTCGTCTATGATCCCCGCCGAGCCCA
AATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCGAGCACCTCCCGT
GGCCGGCCCCGTGAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC
ATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCAT
CGAGAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
GTACACCCTGCCCCCTCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCC
AGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGAGGCGT
GCTGGCCTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGG
GTGTGCGCCAGACCACGGCGGAGCCAGCCAGGAGGACGGCAAGGT
GTACATCAACATGCCCGGCCGCGGCTGA

```

aCD33-Fc-DAP10 CAR의 아미노산 서열(서열번호 1)

```

MAVPTQVLGLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYFN
LVWYQKPGKAPKLLIYDNRADGVP SRFGSGSGTQYTLTISSLQPEDFA
YYCQHYKNYPLTFGGQTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEV
QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSIS
LNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYT
GGYFDYWGGTGLTVSSMDPAEPKSPDKHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPF
KPKDTLMIARTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV

```

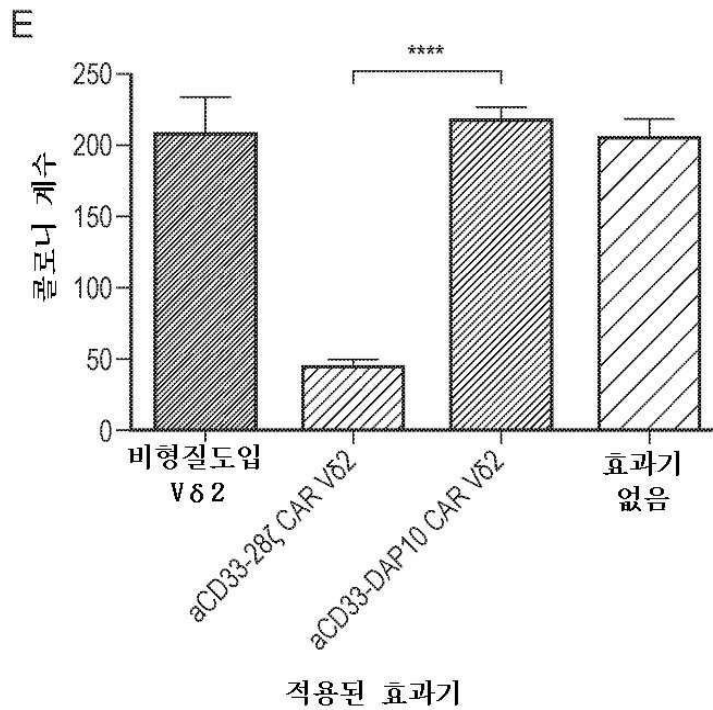
도면11b

YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKKD
PKFWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWICARPRRSPAQEDGKVYINMPGR

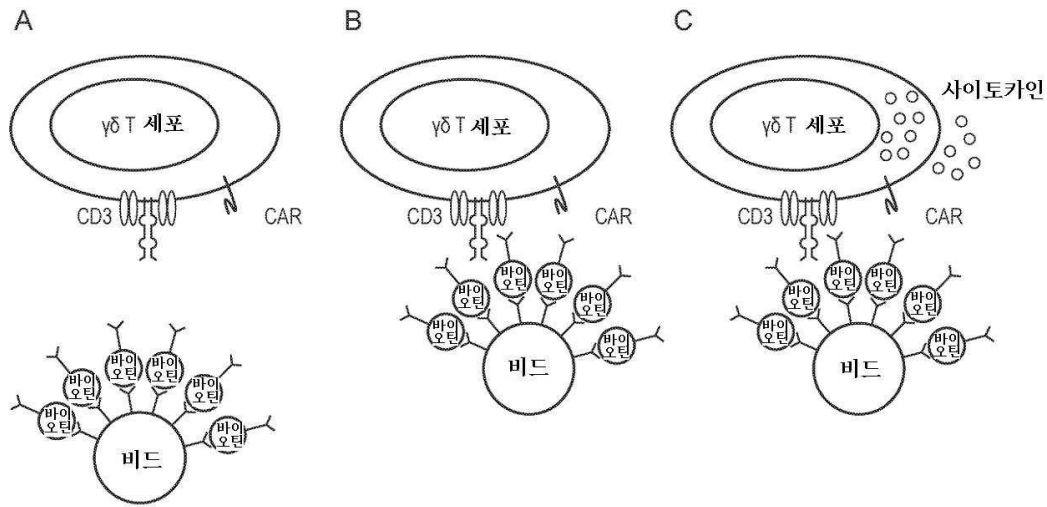
핵심

항-GD33 scFV
Fc 수용체에의 결합을 방지하기 위한
PPVA 돌연변이를 가지는 CH2CH3 스페이서
CD28 막관통 도메인
DAP10 엔도도메인

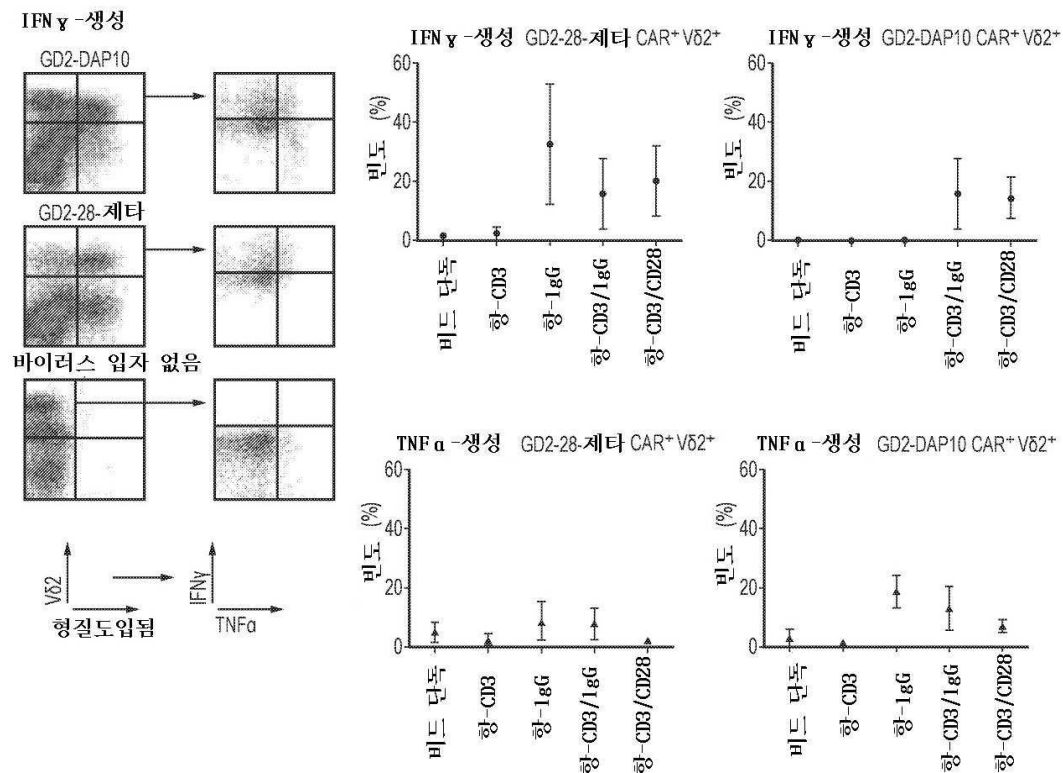
도면12



도면13a



도면13b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> UCL BUSINESS PLC

<120> T CELL WHICH EXPRESSES A GAMMA-DELTA T CELL RECEPTOR (TCR) AND A CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR)

<130> WO/2016/174461

<140> PCT/GB2016/051235
 <141> 2016-04-29
 <150> GB1507368.7
 <151> 2015-04-30
 <160> 27
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aCD33-Fc-DAP10 CAR (chimeric antigen receptor)
 <400> 1

Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr

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

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

130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 165 170 175
 Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro
 180 185 190
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser
 195 200 205
 Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly
 245 250 255
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met
 260 265 270
 Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 275 280 285
 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 290 295 300
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 305 310 315 320
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 325 330 335
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 340 345 350
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 355 360 365
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 370 375 380
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

405 410 415
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 420 425 430
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 435 440 445
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

 450 455 460
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 465 470 475 480
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 485 490 495
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp
 500 505 510
 Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val

 515 520 525
 Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser
 530 535 540
 Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly
 545 550 555 560
 <210> 2
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aGD2-Fc-DAP10 CAR
 <400> 2
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

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

50				55				60							
Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn
65				70				75				80			
Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
85				90				95							
Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
100				105				110							
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp
115				120				125							
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
130				135				140							
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
145				150				155				160			
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys
165				170				175							
Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
180				185				190							
Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu
195				200				205							
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
210				215				220							
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
225				230				235				240			
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
245				250				255							
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp
260				265				270							
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro
275				280				285							
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala
290				295				300							

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
305 310 315 320
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
325 330 335

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
485 490 495
Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
500 505 510
Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
515 520 525

Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr
530 535 540
Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly

545 550

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAP10 signalling domain

<400> 3

Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr

1 5 10 15

Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly

20

<210> 4

<211> 1683

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence which encodes a CAR, aCD33-Fc-DAP10 CAR

<400> 4

atggccgtgc ccactcaggt cctgggggttg ttgctactgt ggcttacaga tgccagatgt 60
gacatccaga tgacacagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtcggaga tcgcgtcacc 120
atcacctgtc gagcaagtga ggacatttat tttaatcttag tgtggtatca gcagaaacca 180
ggaaaggccc ctaagctcct gatctatgat acaaatcgct tggcagatgg ggtcccatca 240
cggttcagtg gctctggatc tggcacacag tatactctaa ccataagtag cctgcaaccc 300

gaagatttcg caacctatta ttgtcaacac tataagaatt atccgctcac gtccggtcag 360
gggaccaagc tggaaatcaa aagatctggt ggcggagggt caggaggcgg aggcagcggg 420
ggcgggtggct cgggaggcgg aggctcgaga tctgaggtgc agttggtgga gtctgggggc 480
ggcttgggtgc agcctggagg gtccctgagg ctctcctgtg cagcctcagg attcactctc 540
agtaattatg gcatgcactg gatcaggcag gctccaggga agggctctgga gtgggtctcg 600
tctattagtc ttaatggtgg tagcacttac tatcgagact ccgtgaaggg ccgattcact 660
atctccaggg acaatgcaaa aagcaccttc taccttcaaa tgaatagtct gagggccgag 720

gacacggccg tctattactg tgcagcacag gacgcttata cgggagggtta ctttgattac 780
tggggccaag gaacgctggt cacagtctcg tctatggatc ccgccgagcc caaatctcct 840
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctcccg tggccggccc gtcagtcttc 900

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatcgccc ggaccctga ggtcacatgc 960
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 1020
 gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1080
 gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1140

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1200
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1260
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1320
 gagagcaatg ggcaaccgga gaacaactac aagaccagc ctcctgtgct ggactccgac 1380
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac 1440
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggcc ctgcacaatc actatacca gaaatctctg 1500
 agtctgagcc caggcaagaa ggaccccaag ttctgggtcc tgggtggtgt gggaggcgtg 1560

ctggcctgtt actctctcct ggtgaccgtg gccttcatca tcttctgggt gtgcgccaga 1620
 ccacggcgga gccagccca ggaggacggc aaggtgtaca tcaacatgcc cggcccgggc 1680
 tga 1683

<210> 5
 <211> 1656
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleic acid sequence which encodes a CAR, aGD2-Fc-DAP10 CAR
 <400> 5

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg cagcaccggc 60
 caggtgcagc tgcaggagtc tggcccaggc ctggtgaagc ccagccagac cctgagcatc 120

acctgcaccg tgagcggctt cagcctggcc agctacaaca tccactgggt gcggcagccc 180
 ccaggcaagg gcctggagtg gctgggctg atctgggctg gcggcagcac caactacaac 240
 agcgccctga tgagcggctt gaccatcagc aaggacaaca gcaagaacca ggtgttctctg 300
 aagatgagca gcctgacagc cgccgacacc gccgtgtact actgcgcaa gcggagcgac 360
 gactacagct ggttcgccta ctggggccag ggaccctgg tgaccgtgag ctctggcgga 420
 ggcggtctctg gcggaggcgg ctctggcgga ggcggcagcg agaaccagat gacccagagc 480
 cccagcagct tgagcgccag cgtgggagc cggtgacca tgacctgcag agccagcagc 540

agcgtgagca gcagctacct gcactggtac cagcagaaga gcggcaaggc cccaaaggtg 600
 tggatctaca gcaccagcaa cctggccagc ggctgacca gccggttcag cggcagcggc 660

agcggcaccg actacaccct gaccatcagc agcctgcagc cggaggactt cgccacctac 720
tactgccagc agtacagcgg ctaccccatc accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc 780
aagcggtcgg atcccgcga gcccaaatct cctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 840
ccagcacctc ccgtggccgg cccgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 900
ctcatgatcg cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 960

cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1020
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gctcctcac cgtcctgcac 1080
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1140
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1200
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 1260
ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca atgggcaacc ggagaacaac 1320
tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 1380

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1440
gccctgcaca atcactatac ccagaaatct ctgagtctga gccaggcaa gaaggacccc 1500
aagttctggg tcttgggtgt ggtgggaggc gtgctggcct gttactctct cctggtgacc 1560
gtggccttca tcattctctg ggtgtgcgcc agaccacggc ggagcccagc ccaggaggac 1620
ggcaaggtgt acatcaacat gcccgccgc ggtcga 1656

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide

<400> 6

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala

1 5 10 15

Asp His Ala Asp Gly

20

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide derived from IgG1

<400> 7

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal peptide derived from CD8

<400> 8

Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys

20

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, CD28 endodomain

<400> 9

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg

1 5 10 15

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg

20 25 30

Asp Phe Ala Ala Tyr

35

<210> 10

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, CD27 endodomain

<400> 10

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
 1 5 10 15
 Ala Glu Pro Cys His Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
 20 25 30
 Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
 35 40 45

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, 41BB endodomain

<400> 11

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

<210> 12

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, OX40 endodomain

<400> 12

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 20 25 30
 Thr Leu Ala Lys Ile
 35

<210> 13

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, CD30 endodomain

<400> 13

His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp

65 70 75 80

Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro

85 90 95

Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile

100 105 110

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

115 120 125

Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly

165 170 175

Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys

180 185

<210> 14

<211

> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, IL2-R endodomain

<400> 14

Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile

1 5 10

<210> 15

<211> 195

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, IL7-R endodomain

<400> 15

Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys

1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val

20 25 30

Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp

35 40 45

Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser

85 90 95

Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala

100 105 110

Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu

115 120 125

Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu

130 135 140

Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr
 180 185 190
 Gln Asn Gln
 195
 <210> 16
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> co-stimulatory domain, IL21-R endodomain
 <400> 16
 Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala

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

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

 130 135 140
 Gly Tyr Pro Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly
 145 150 155 160
 Leu Glu Asp Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly
 165 170 175

Cys Val Ser Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu
180 185 190

Leu Asp Arg Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly

195 200 205
Gly Leu Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu
210 215 220

Ala Gly Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly
225 230 235 240

Phe Val Gly Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser
245 250 255

Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val

260 265 270
Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
275 280 285

<210> 17

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, NKp30 endodomain

<400> 17

Gly Ser Thr Val Tyr Tyr Gln Gly Lys Cys Leu Thr Trp Lys Gly Pro
1 5 10 15

Arg Arg Gln Leu Pro Ala Val Val Pro Ala Pro Leu Pro Pro Pro Cys
20 25 30

Gly Ser Ser Ala His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Gly
35 40 45

<210> 18

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, NKp44 endodomain

<400> 18

Trp Trp Gly Asp Ile Trp Trp Lys Thr Met Met Glu Leu Arg Ser Leu
1 5 10 15

Asp Thr Gln Lys Ala Thr Cys His Leu Gln Gln Val Thr Asp Leu Pro
20 25 30

Trp Thr Ser Val Ser Ser Pro Val Glu Arg Glu Ile Leu Tyr His Thr

35 40 45
Val Ala Arg Thr Lys Ile Ser Asp Asp Asp Glu His Thr Leu
50 55 60

<210> 19

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain, DNAM-1 (CD226) endodomain

<400> 19

Asn Arg Arg Arg Arg Arg Glu Arg Arg Asp Leu Phe Thr Glu Ser Trp
1 5 10 15

Asp Thr Gln Lys Ala Pro Asn Asn Tyr Arg Ser Pro Ile Ser Thr Ser

20 25 30
Gln Pro Thr Asn Gln Ser Met Asp Asp Thr Arg Glu Asp Ile Tyr Val

35 40 45
Asn Tyr Pro Thr Phe Ser Arg Arg Pro Lys Thr Arg Val
50 55 60

<210> 20

<211> 263

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen binding domain

<400> 20

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

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30

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

 Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser
 145 150 155 160
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys
 165 170 175
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190
 Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu
 195 200 205

 Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220
 Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 245 250 255
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser
 260

<210> 21

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antigen binding domain

<400> 21

Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp

35 40 45

Ile Tyr Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro

180 185 190

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser

195 200 205

Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

210 215 220
 Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly

245 250 255
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met
 260 265 270

<210> 22

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, hinge-CH₂CH₃ of human IgG1

<400> 22

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

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

85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp

225 230

<210> 23

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, human CD8 stalk

<400> 23

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, human IgG1 hinge

<400> 24

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

1 5 10 15

Lys Asp Pro Lys

20

<210> 25

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 transmembrane domain

<400> 25

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 26

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 zeta endodomain

<400> 26

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

1 5 10 15

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu

50 55 60

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly

65 70 75 80

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> activation motif

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27

Tyr Xaa Xaa Met

1