(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0152824
(43) 공개일자 2023년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 39/4611 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7036909(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년12월23일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-7031979
원출원일자(국제) 2015년12월23일
심사청구일자 2022년09월15일
(85) 번역문제출일자 2023년10월26일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2015/054137
(87) 국제공개번호 WO 2016/102965
국제공개일자 2016년06월30일
(30) 우선권주장
1423172.4 2014년12월24일 영국(GB)

(71) 출원인
오토러스 리미티드
영국 런던 191 우드 레인 더 미디어웍스 (우편번호: 더블유12 7에프피)
(72) 발명자
풀레 마틴
영국 런던 더블유1티 4티피 토트넘 코트 로드 97 더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내
코르도바 숀
영국 런던 더블유1티 4티피 토트넘 코트 로드 97 더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

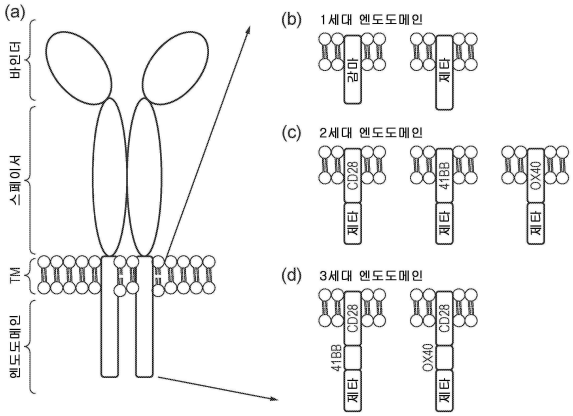
전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 **세포**

(57) 요 약

본 발명은 제1 키메라 항원 수용체(CAR) 및 제2 CAR을 세포 표면에 공동발현하는 세포를 제공하고, 각각의 CAR은 항원 결합 도메인을 포함하고, 제1 CAR의 항원 결합 도메인은 CD19에 결합하고, 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22에 결합한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/4631 (2023.05)
A61P 35/02 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/02 (2013.01)
(72) 발명자
오누오하 시모비
영국 런던 더블유1티 4티피 토트넘 코트 로드 97 더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내
토마스 시몬
영국 런던 더블유1티 4티피 토트넘 코트 로드 97 더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 키메라 항원 수용체(CAR) 및 제2 CAR을 세포 표면에 공동발현시키는 세포로서, 각각의 CAR은 항원 결합 도메인을 포함하고, 제1 CAR의 항원 결합 도메인은 CD19에 결합하고, 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22에 결합하는 것인 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 각각의 CAR은

(i) 항원 결합 도메인;

(ii) 스페이서; 및

(iii) 경막 도메인

을 포함하고, 제1 CAR의 스페이서는 제2 CAR의 스페이서와 상이한 것인 세포.

청구항 3

제2항에 있어서, 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22의 Ig 도메인 1, 2, 3 또는 4 상의 에피토프에 결합하는 것인 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 제1 및 제2 키메라 항원 수용체(CAR) 둘 모두를 코딩하는 핵산 서열.

청구항 5

제4항에 있어서, 하기 구조:

AgB1-스페이서1-TM1-coexpr-AbB2-스페이서2-TM2

를 가지며,

상기 구조에서,

AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

coexpr은 CAR 둘 모두를 공동발현할 수 있게 하는 핵산 서열이고;

AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이며;

이 핵산 서열은, T 세포에서 발현될 때, 제1 및 제2 CAR이 T 세포 표면에서 공동발현되도록 절단 부위에서 절단되는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 핵산 서열.

청구항 6

제5항에 있어서, coexpr은 자가 절단 펩티드를 포함하는 서열을 코딩하는 것인 핵산 서열.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상동성 재조합을 피하기 위해, 동일 또는 유사 아미노산 서열을 코딩하는 서열의 영역에 대체 코돈(alternative codon)이 사용되는 것인 핵산 서열.

청구항 8

하기 (i) 및 (ii)를 포함하는 키트:

(i) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제1 핵산 서열:

AgB1-스페이서1-TM1

상기 구조에서,

AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

스페이서1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이다;

(ii) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제2 핵산 서열:

AgB2-스페이서2-TM2

상기 구조에서,

AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

스페이서2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이다.

청구항 9

제8항에 정의된 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터; 및 제8항에 정의된 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터를 포함하는 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 벡터는 통합 바이러스 벡터 또는 트랜스포존인 키트.

청구항 11

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터 또는 트랜스포존인 벡터.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 세포를 제조하는 방법으로서, 제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 핵산 서열; 제8항에 정의된 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열; 및/또는 제9항에 정의된 제1 벡터 및 제2 벡터 또는 제11항 또는 제12항에 따른 벡터를 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 것인 세포의 제조 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 세포는 피험체로부터 단리된 샘플로부터 유래한 것인 제조 방법.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 세포를 다수 포함하는 약학 조성물.

청구항 16

제15항에 따른 약학 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환의 치료 및/또는 예방 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

(i) 피험체로부터 세포 함유 샘플을 단리하는 단계;

(ii) 제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 핵산 서열; 제8항에 정의된 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열; 제9항 또는 제10항에 정의된 제1 벡터 및 제2 벡터 또는 제11항 또는 제12항에 따른 벡터로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계; 및

(iii) (ii) 단계로부터의 세포를 피험체에게 투여하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 질환은 암인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 암은 B 세포 악성종양인 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 질환을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한 것인 약학 조성물.

청구항 21

질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 세포의 용도.

청구항 22

하기 a) 및 b)를 포함하는 CD19-결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR):

a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

CDR1 - SYWMN (서열번호 15);

CDR2 - QIWPGDGDTNYNGKFK (서열번호 16);

CDR3 - RETTTVGRYYYAMDY (서열번호 17); 및

b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):

CDR1 - KASQSVDYDGDSYLN (서열번호 18);

CDR2 - DASNLVS (서열번호 19);

CDR3 - QQSTEDPWT (서열번호 20).

청구항 23

제22항에 있어서, CD19 결합 도메인은 서열번호 23, 또는 서열번호 24로 표시되는 서열을 갖는 VH 도메인; 또는 서열번호 25, 서열번호 26 또는 서열번호 40으로 표시되는 서열을 갖는 VL 도메인; 또는 CD19에 결합하는 능력을 유지하는 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 것인 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 24

제22항에 있어서, CD19 결합 도메인은 서열번호 21, 서열번호 22 또는 서열번호 39로 표시되는 서열; 또는 CD19에 결합하는 능력을 유지하는 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 것인 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 25

하기 a) 및 b)를 포함하는 CD22-결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR):

a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

CDR1 - NYWIN (서열번호 27);

CDR2 - NIYPSDSFTNYNQKFKD (서열번호 28);

CDR3 - DTQERSWYFDV (서열번호 29); 및

b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):

CDR1 - RSSQSLVHSNGNTYLH (서열번호 30);

CDR2 - KVSNRFS (서열번호 31);

CDR3 - SQSTHVPWT (서열번호 32).

청구항 26

제25항에 있어서, CD22 결합 도메인은 서열번호 35, 또는 서열번호 36으로 표시되는 서열을 갖는 VH 도메인; 또는 서열번호 37, 또는 서열번호 38로 표시되는 서열을 갖는 VL 도메인; 또는 CD22에 결합하는 능력을 유지하는 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 것인 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 27

제25항에 있어서, CD22 결합 도메인은 서열번호 33 또는 서열번호 34로 표시되는 서열; 또는 CD22에 결합하는 능력을 유지하는 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 것인 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 28

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CAR은 제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 정의된 것이고, 제2 CAR은 제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 정의된 것인 세포.

청구항 29

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 정의된 제1 CAR, 및 제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 정의된 제2 CAR을 코딩하는 것인 핵산 서열.

청구항 30

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 서열은 제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 정의된 제1 CAR을 코딩하고, 제2 핵산 서열은 제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 정의된 제2 CAR을 코딩하는 것인 키트.

청구항 31

제11항 또는 제12항에 있어서, 제29항에 따른 핵산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 32

제1 키메라 항원 수용체(CAR) 및 제2 CAR을 세포 표면에서 공동발현하는 세포로서, 각각의 CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 제1 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 공자극성 도메인을 포함하고; 제2 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 TNF 수용체 패밀리 엔도도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 33

제32항에 있어서, 공자극성 도메인은 CD28 공자극성 도메인인 세포.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, TNF 수용체 패밀리 엔도도메인은 OX-40 또는 4-1BB 엔도도메인인 세포.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 ITAM 함유 도메인을 또한 포함하는 것인 세포.

청구항 36

제35항에 있어서, 제1 CAR은 하기 구조를 갖고:

AgB1-스페이서1-TM1-costim-ITAM

상기 구조에서,

*AgB1*은 제1 CAR의 항원 결합 도메인이고;

스페이서*1*은 제1 CAR의 스페이서이고;

*TM1*은 제1 CAR의 경막 도메인이고;

*costim*은 공자극성 도메인이고;

*ITAM*은 ITAM 함유 엔도도메인이며;

제2 CAR은 하기 구조를 갖는 것인 세포:

AgB2-스페이서2-TM2-TNF-ITAM

상기 구조에서,

*AgB2*는 제2 CAR의 항원 결합 도메인이고;

*스페이서2*는 제2 CAR의 스페이서이고;

*TM2*는 제2 CAR의 경막 도메인이고;

*TNF*는 TNF 수용체 엔도도메인이고;

*ITAM*은 ITAM 함유 엔도도메인이다.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 정의된 제1 및 제2 키메라 항원 수용체(CAR) 둘 모두를 코딩하는 핵산 서열.

청구항 38

제37항에 있어서, 하기 구조:

AgB1-스페이서1-TM1-costim-ITAM1-coexpr-AbB2-스페이서2-TM2-TNF-ITAM2

를 갖는 핵산 서열로서,

상기 구조에서,

AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

스페이서1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

costim은 공자극성 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

ITAM1은 제1 CAR의 ITAM 함유 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

coexpr은 CAR 둘 모두를 공동발현할 수 있게 하는 핵산 서열이고;

AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

스페이서2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

TNF는 TNF 수용체 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

ITAM2는 제2 CAR의 ITAM 함유 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이며;

이 핵산 서열은, 세포에서 발현될 때, 제1 및 제2 CAR이 세포 표면에서 공동발현되도록 절단 부위에서 절단되는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 핵산 서열.

청구항 39

하기 (i) 및 (ii)를 포함하는 키트:

(i) 제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 정의된 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제1 핵산 서열:

AgB1-스페이서1-TM1-costim-ITAM1

상기 구조에서,

AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

스페이서1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

costim은 공자극성 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

ITAM1은 제1 CAR의 ITAM 함유 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이다;

(ii) 제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 정의된 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제2 핵산 서열:

AbB2-스페이서2-TM2-TNF-ITAM2

상기 구조에서,

AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

스페이서2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

TNF는 TNF 수용체 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

ITAM2는 제2 CAR의 ITAM 함유 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이다.

청구항 40

제37항 또는 제38항에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 41

제37항 또는 제38항에 따른 세포를 제조하는 방법으로서, 제37항 또는 제38항에 따른 핵산 서열; 제39항에 정의된 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열; 또는 제40항에 따른 벡터를 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 세포의 제조 방법.

청구항 42

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 세포를 다수 포함하는 약학 조성물.

청구항 43

제42항에 따른 약학 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환의 치료 및/또는 예방 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 질환을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한 것인 약학 조성물.

청구항 45

질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약의 제조에서의 제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 세포의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 1 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 세포에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 치료적 단일클론 항체(mAb), 면역접합 mAb, 방사능접합 mAb 및 이중특이적 T 세포 인게이저를 포함해, 수많은 면역치료제가 암치료에서의 사용을 위해 기술되어 왔다.

[0003] 전형적으로 이들 면역치료제들은 단일 항원을 표적으로 삼으며, 예를 들어 리툭시맙은 CD20이 표적이고; 미엘로타르그는 CD33이 표적이며; 알렘투주맙은 CD52가 표적이다.

[0004] 인간 CD19 항원은 면역글로불린 수퍼패밀리에 속하는 95 kd 경막 당단백질이다. CD19는 B-세포 분화의 매우 초기에 발현되어 형질 세포로의 말기 B-세포 분화시에만 상실된다. 결과적으로, CD19는 다발성 골수종을 제외한 모든 B-세포 악성종양에서 발현된다. 정상 B-세포 구획의 상실은 용인되는 독성이므로, CD19는 매력적인 CAR 표적이며 CAR로 CD19를 표적으로 삼는 임상 연구들은 기대되는 결과를 보였다.

[0005] 종양학 분야의 구체적인 문제는 골디-콜드만(Goldie-Coldman) 가설에 의해 제시되었는데, 단일 항원의 단독 표적화는 대부분의 암에서의 고유한 고돌연변이율로 인한 상기 항원의 조정에 의해 종양 탈출을 야기할 수 있다는 것이다. 이러한 항원 발현의 조정은 CD19를 표적으로 삼는 것을 포함하여, 기지의 면역요법의 효능을 감소시킬 수 있다.

[0006] 따라서, CD19를 표적으로 하는 면역치료제의 문제는 B-세포 악성종양이 돌연변이되어 CD19-음성이 될 수 있다는 것이다. 이러한 문제는 CD19 표적화 요법에 반응하지 않는 CD19-음성 암의 재발을 초래할 수 있다. 예를 들어, 소아과 실험에서, Grupp 등은 B-급성 림프아구성 백혈병(B-ALL)에 대한 CD10-표적화 키메라 항원 수용체 요법 이후 모든 재발의 절반이 CD19-음성 질환에 의한 것이었다고 보고하였다(56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition).

[0007] 따라서 CD19-양성 암을 포함한, 많은 암과 연관된 마커 발현의 복잡한 패턴을 반영하도록 1 이상의 세포 표면 구조물을 표적으로 할 수 있는 면역치료제에 대한 요구가 존재한다.

[0008] *키메라 항원 수용체(CAR)*

[0009] 키메라 항원 수용체는 T-세포의 이펙터 기능에 예를 들어, 단일클론 항체(mAb)의 특이성을 접목시킨 단백질이다. 그들의 일반적인 형태는 T 세포 생존 및 활성 신호를 전달하는 화합물 엔도도메인에 모두 연결된 경막 도메인, 스페이서, 항원 인식 아미노 말단을 갖는 제I형 경막 도메인이다(도 1A 참조).

[0010] 이들 분자의 가장 일반적인 형태는 신호전달 엔도도메인에 스페이서 및 경막 도메인을 통해 융합된, 표적 항원을 인식하는 단일클론 항체로부터 유도된 단쇄 가변 단편(scFv)의 융합체이다. 이러한 분자는 그 표적의 scFv에 의한 인식에 대응하여 T-세포 활성화를 야기시킨다. T 세포가 그러한 CAR을 발현하면, 그들은 표적 항원을 발현하는 표적 세포를 인식하여 사멸시킨다. 몇몇 CAR은 종양 연관 항원에 대항하여 개발되었고, 그러한 CAR 발현 T 세포를 사용하는 입양 전달 접근법들이 현재 다양한 암치료를 위해 임상 실험 중이다.

[0011] 암 치료에 CAR 접근법을 사용하면, 종양 불균질성 및 면역편집이 CAR 치료로부터의 탈출을 야기시키는 것이 관찰되었다. 예를 들어, Grupp 등이 기술한 연구(2013; New Eng. J. Med 368:1509-1518, paper No 380, ASH 2014)에서, CAR-변형된 T 세포 접근법이 급성 B-림프성 백혈병의 치료에 사용되었다. 그 임상 실험에서, 1개월 후 완벽하게 차도를 보인 10명 환자가 재발되었고 그들 중 5명은 CD19-음성 질환으로 재발되었음이 확인되었다.

[0012] 따라서, 암 탈출 및 종양 불균질성의 문제를 해결하는 대안적인 CAR 치료 접근법이 요구된다.

[0013] 2종 CAR 결합 특이성의 발현

[0014] 탠덤 CAR 또는 TanCAR이라고 알려진 이중특이적 CAR이 다수의 암 특이적 마커를 동시에 표적화하려는 시도로 개

발되었다. TanCAR에서, 세포외 도메인은 링커에 의해 연결된, 2개 항원 결합 특이성을 직렬로 포함한다. 따라서, 2개 결합 특이성(scFv)은 둘 모두가 단일 경막 부분에 연결되는데, 한 scFv는 막과 병치되고 다른 하나는 원위에 존재한다.

[0015] Grada 등(2013, Mol Ther Nucleic Acids 2:e105)은 CD19-특이적 scFv와 후속되는 Gly-Ser 링커 및 그 다음으로 HER2-특이적 scFv를 포함하는 TanCAR을 기술한다. HER2-scFv는 막인접 위치에 존재하고, CD19-scFv는 원위에 존재한다. Tan CAR은 2종의 종양 제한 항원 각각에 대항하여 별개의 T 세포 반응성을 유도시키는 것으로 확인되었다. 이러한 배열은 HER2(632 aa/125Å) 및 CD19(280 aa, 65Å)의 각 길이가 그 자체에 특정한 공간 배열을 부여하기 때문에 선택되었다. HER2 scFv가 HER2의 최원위 4개 루프에 결합한다고도 알려졌다.

[0016] 이러한 접근법의 문제는 막인접 scFV가 특히 항원에 결합된, 원위 scFV의 존재로 인해 접근불가할 수 있다는 것이다. 표적 세포 상의 항원의 공간 배열 관점에서 2개 scFv의 상대적 위치를 선택하는 것이 필요하다는 점에서, 모든 scFv 결합 쌍에 대해 이러한 접근법을 사용하는 것은 가능하지 않다. 게다가, TanCar 접근법은 2 이상의 scFv를 이용할 수 있을 것으로 보이지 않는데, 3개 또는 그 이상의 scFv를 갖는 TanCAR는 매우 거대한 분자여서 scFv가 서로 충분히 역폴딩되어 항원 결합 부위를 가릴 수 있다. 또한 2개 또는 그 이상의 추가 scFv에 의해 경막 도메인으로부터 이격된, 최원위 scFv에 의한 항원 결합이 T 세포 활성화를 촉발시킬 수 있을지 의심스럽다.

[0017] 따라서, T 세포와 같은 세포 표면 상에서 2가지 CAR 결합 특이성을 발현시키기 위한 대안적인 접근법이 요구된다.

발명의 내용

[0018] 본 발명자는 CD19에 특이적인 것과 CD22에 특이적인 것인 2종의 CAR을 세포 표면에 발현하는 CAR T 세포를 개발하였다.

[0019] 따라서, 제1 측면에서 본 발명은 세포 표면에 제1 키메라 항원 수용체(CAR) 및 제2 CAR을 공동발현하는 세포를 제공하고, 각각의 CAR은 항원 결합 도메인을 포함하고, 제1 CAR의 항원 결합 도메인은 CD19에 결합하고, 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22에 결합한다.

[0021] 하나의 CAR이 CD19에 결합하고 다른 CAR은 CD22에 결합한다는 사실은 일부 림프종 및 백혈병이 CD19 표적화 이후에 CD19 음성(또는 아마도 CD22 이후에 CD22 음성)이 되어, "백업" 항원이 주어지는 것이 일어날 수 있으므로, 유리하다.

[0022] 세포는 면역 이펙터 세포, 예컨대 T-세포 또는 자연 살해(NK) 세포일 수 있다. T 세포와 연관하여 본원에서 언급하는 특징들은 다른 면역 이펙터 세포, 예컨대 NK 세포에 동등하게 적용된다.

[0023] 각각의 CAR은

[0024] (i) 항원 결합 도메인;

[0025] (ii) 스페이서; 및

[0026] (iii) 경막 도메인

[0027] 을 포함한다.

[0028] 각각의 CAR은

[0029] (i) 항원 결합 도메인;

[0030] (ii) 스페이서;

[0031] (iii) 경막 도메인;

[0032] (iv) 엔도도메인

[0033] 을 포함한다.

[0034] 제1 CAR의 스페이서는 제2 CAR의 스페이서와 상이하여, 제1 및 제2 CAR은 이종이량체를 형성하지 않는다.

[0035] 제1 CAR의 스페이서는 제2 CAR의 스페이서와 길이 및/또는 입체형태가 상이하여, 각각의 CAR은 이의 개별 표적

항원의 인식을 위해 재단된다.

[0036] 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22 상의 막-원위 에피토프에 결합한다. 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22의 Ig 도메인 1, 2, 3 또는 4, 예를 들어, CD22의 Ig 도메인 3에 결합한다.

[0037] 제1 CAR의 항원 결합 도메인은 엑손 1, 3 또는 4에 의해 코딩되는 CD19 상의 에피토프에 결합한다.

[0038] 하나의 CAR의 엔도도메인은 공자극성 도메인 및 ITAM 함유 도메인을 포함하고, 다른 CAR의 엔도도메인은 TNF 수용체 패밀리 도메인 및 ITAM 함유 도메인을 포함한다.

[0039] 예를 들어, 하나의 CAR(CD19 또는 CD22-특이적)은 다음의 구조를 갖는다:

[0040] AgB1-스페이서1-TM1-costim-ITAM

[0041] 상기 구조에서,

[0042] AgB1은 항원 결합 도메인이고;

[0043] 스페이서 1은 스페이서이고;

[0044] TM1은 경막 도메인이고;

[0045] costim은 공자극성 도메인이고;

[0046] ITAM은 ITAM 함유 엔도도메인이다.

[0047] 다른 CAR(CD22 또는 CD19-특이적)은 다음의 구조를 갖는다:

[0048] AgB2-스페이서2-TM2-TNF-ITAM

[0049] 상기 구조에서,

[0050] AgB2는 항원 결합 도메인이고;

[0051] 스페이서 2는 스페이서이고;

[0052] TM2는 경막 도메인이고;

[0053] TNF는 TNF 수용체 엔도도메인이고;

[0054] ITAM은 ITAM 함유 엔도도메인이다.

[0055] 제2 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에서 정의한 바와 같은 제1 및 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0056] 핵산 서열은 하기 구조를 갖는다:

[0057] AgB1-스페이서1-TM1-coexpr-AbB2-스페이서2-TM2

[0058] 상기 구조에서,

[0059] AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0060] 스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0061] TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0062] coexpr은 CAR 둘 모두를 공동발현할 수 있게 하는 핵산 서열이고;

[0063] AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0064] 스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0065] TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0067] 여기서 핵산 서열은, T 세포에서 발현될 때, 제1 및 제2 CAR이 T 세포 표면에서 공동발현되도록 전달 부위에서 절단되는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0068] 핵산 서열은 하기 구조를 갖는다:

[0069] AgB1-스페이서1-TM1-endo1-coexpr-AbB2-스페이서2-TM2-endo2

[0070] 상기 구조에서,

[0071] AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0072] 스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0073] TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0074] endo 1은 제1 CAR의 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0075] coexpr은 CAR 둘 모두를 공동발현할 수 있게 하는 핵산 서열이고;

[0076] AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0077] 스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0078] TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0079] endo 2는 제2 CAR의 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0080] 여기서 핵산 서열은, T 세포에서 발현될 때, 제1 및 제2 CAR이 T 세포 표면에서 공동발현되도록 절단 부위에서 절단되는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0081] 2종의 CAR의 공동발현을 허용하는 핵산 서열은 2종의 CAR을 공동발현하는 대안적인 수단 예컨대 내부 리보솜 진입 서열 또는 제2 프로모터 또는 다른 그와 같은 수단을 허용하여 당업자가 동일한 벡터에서 2종의 단백질을 발현할 수 있는 서열 또는 자가 절단 펩티드를 코딩한다.

[0082] 상동성 재조합을 피하기 위해서, 경막 및/또는 세포내 T 세포 신호전달 도메인(엔도도메인) 등과 같은 동일하거나 또는 유사한 아미노산 서열을 코딩하는 서열 영역에 대체 코돈이 사용될 수 있다. 예를 들어, 대체 코돈은 스페이서, 경막 도메인 및/또는 엔도도메인의 전부 또는 일부를 코딩하는 서열의 일부에 사용되어, 2종의 CAR이 이러한 또는 이들 부분(들)에 대해 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 갖지만 상이한 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0083] 제3 측면에서, 본 발명은 하기 (i) 및 (ii)를 포함하는 키트를 제공한다:

[0084] (i) 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제1 핵산 서열:

[0085] AgB1-스페이서1-TM1

[0086] 상기 구조에서,

[0087] AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0088] 스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0089] TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이다;

[0090] (ii) 제2 키메라 항원 수용체를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제2 핵산 서열:

[0091] AgB2-스페이서2-TM2

[0092] 상기 구조에서,

[0093] AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0094] 스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0095] TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이다.

[0096] 키트는 하기 (i) 및 (ii)를 포함한다:

[0097] (i) 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제1 핵산 서열:

[0098] AgB1-스페이서1-TM1-endo1

[0099] 상기 구조에서,

[0100] AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0101] 스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0102] TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0103] endo 1은 제1 CAR의 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이다;

[0104] (ii) 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제2 핵산 서열:

[0105] AgB2-스페이서2-TM2-endo2

[0106] 상기 구조에서,

[0107] AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0108] 스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0109] TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0110] endo 2는 제2 CAR의 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이다.

[0111] 제4 측면에서, 본 발명은 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터; 및 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터를 포함하는 키트를 제공한다.

[0112] 벡터는 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 트랜스포존 벡터일 수 있다. 벡터는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

[0113] 제5 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제2 측면에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 벡터는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

[0114] 벡터는 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 트랜스포존 벡터이다.

[0116] 제6 측면에서, 본 발명은 제1 및 제2 CAR을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열(들); 또는 상기 정의된 바와 같은 1 이상의 벡터(들)를 T 세포에 도입시키는 단계를 포함하는, 본 발명의 제1 측면에 따른 세포를 제조하는 방법을 제공한다

[0117] 세포는 환자, 관련 또는 미관련 조혈 이식 도너, 완전히 미관련된 도너, 제대혈에서 단리되거나, 배아 세포주에서 분화되거나, 유도성 전구체 세포주에서 분화되거나, 또는 형질전환된 세포주에서 유도된 샘플일 수 있다.

[0118] 제7 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 세포를 다수 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0119] 제8 측면에서, 본 발명은 피험체에게 본 발명의 제7 측면에 따른 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0120] 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:

[0121] (i) 피험체로부터 세포 함유 샘플을 단리하는 단계;

[0122] (ii) 제1 및 제2 CAR을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열(들) 또는 그러한 핵산 서열(들)을 포함하는 1 이상의 벡터(들)로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계; 및

[0123] (iii) 피험체에게 (ii) 단계로부터의 세포를 투여하는 단계.

[0124] 질환은 암일 수 있다. 암은 B 세포 악성종양일 수 있다.

[0125] 제9 측면에서, 본 발명은 질환 및/또는 질환을 치료하는데 사용하기 위한 본 발명의 제7 측면에 따른 약학 조성물을 제공한다.

[0126] 제10 측면에서, 본 발명의 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약의 제조에서 본 발명의 제1 측면에 따른 세포의 용도를 제공한다.

[0127] 본 발명은 또한

[0128] a) 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 제1 뉴클레오티드 서열;

[0129] b) 제2 CAR을 코딩하는 제2 뉴클레오티드 서열; 및

[0130] c) 2종의 CAR이 개별 독립체로서 발현되도록, 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열 사이에 위치되는 자가 절단 펩티드를 코딩하는 서열

[0131] 을 포함하는 핵산 서열을 제공하고, 여기서 하나의 CAR은 CD19에 결합하고, 다른 CAR은 CD22에 결합한다.

[0132] 동일하거나 또는 유사한 아미노산 서열(들)을 코딩하는 영역의 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열의 1 이상의 위치(들)에서 대체 코돈이 사용될 수 있다.

[0133] 본 발명은 또한 이러한 핵산을 포함하는 벡터 및 세포를 제공한다.

[0134] 본 발명자는 개선된 특성을 갖는 신규한 항-CD19 및 항-CD22 CAR을 또한 개발하였다.

[0135] 따라서, 제11 측면에서, 본 발명은 하기 a) 및 b)를 포함하는 CD19-결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다:

[0136] a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

[0137] CDR1 - SYWMN (서열번호 15);

[0138] CDR2 - QIWPGDGDTNYNGKFK (서열번호 16)

[0139] CDR3 - RETTTVGRYYYAMDY (서열번호 17); 및

[0140] b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):

[0141] CDR1 - KASQSVDYDGDSYLN (서열번호 18);

[0142] CDR2 - DASNLVS (서열번호 19)

[0143] CDR3 - QQSTEDPWT (서열번호 20).

[0144] CD19 결합 도메인은 서열번호 23, 또는 서열번호 24로 표시되는 서열을 갖는 VH 도메인; 또는 서열번호 25, 서열번호 26 또는 서열번호 40으로 표시되는 서열을 갖는 VL 도메인 또는 CD19에 결합하는 능력을 유지하는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0145] CD19 결합 도메인은 서열번호 21, 서열번호 22 또는 서열번호 39로 표시되는 서열 또는 CD19에 결합하는 능력을 유지하는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0146] 제12 측면에서, 본 발명은 하기 a) 및 b)를 포함하는 CD22-결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다:

[0147] a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

[0148] CDR1 - NYWIN (서열번호 27);

[0149] CDR2 - NIYPSDSFTNYNQKFKD (서열번호 28)

[0150] CDR3 - DTQERSWYFDV (서열번호 29); 및

[0151] b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):

[0152] CDR1 - RSSQSLVHSNGNTYLH (서열번호 30);

[0153] CDR2 - KVSNRFS (서열번호 31)

[0154] CDR3 - SQSTHVPWT (서열번호 32).

[0155] CD22 결합 도메인은 서열번호 35, 또는 서열번호 36으로 표시되는 서열을 갖는 VH 도메인; 또는 서열번호 37, 또는 서열번호 38로 표시되는 서열을 갖는 VL 도메인 또는 CD22에 결합하는 능력을 유지하는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0156] CD22 결합 도메인은 서열번호 33 또는 서열번호 34로 표시되는 서열 또는 CD22에 결합하는 능력을 유지하는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0157] 제13 측면에서, 본 발명은 세포 표면에 본 발명의 제11 측면에 따른 키메라 항원 수용체 또는 본 발명의 제12 측면에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 제공한다.

[0158] 제14 측면에서, 본 발명의 제11 측면에 따른 키메라 항원 수용체 또는 본 발명의 제12 측면에 따른 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0159] 제15 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제14 측면에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0160] 벡터는 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 트랜스포존 벡터이다.

[0161] 제16 측면에서, 본 발명은 1 이상의 핵산 서열(들); 또는 상기 정의된 바와 같은 1 이상의 벡터(들)을 세포에 도입시키는 단계를 포함하는, 본 발명의 제13 측면에 따른 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0162] 세포는 T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포이다. 세포는 환자, 관련 또는 미관련 조혈 이식 도너, 완전하게 미관련된 도너, 제대혈에서 단리되거나, 배아 세포주에서 분화되거나, 유도성 전구체 세포주에서 분화하거나, 또는 형질전환된 세포주에서 유도된 샘플이다.

[0163] 제17 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제13 측면에 따른 세포를 다수 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0164] 제18 측면에서, 본 발명은 피험체에게 본 발명의 제17 측면에 따른 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0165] 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:

[0166] (i) 피험체로부터 세포 함유 샘플을 단리하는 단계;

[0167] (ii) CAR을 코딩하는 핵산 서열 또는 그러한 핵산 서열을 포함하는 벡터로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계; 및

[0168] (iii) 피험체에게 (ii) 단계로부터의 세포를 투여하는 단계.

[0169] 질환은 암일 수 있다. 암은 B 세포 악성종양일 수 있다.

[0170] 제19 측면에서, 본 발명의 질환을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한 본 발명의 제17 측면에 따른 약학 조성물을 제공한다.

[0171] 제20 측면에서, 본 발명은 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 제13 측면에 따른 세포의 용도를 제공한다.

[0172] 본 발명의 제11 측면에서 정의된 바와 같은 제1 CAR 및 본 발명의 제12 측면에서 정의된 바와 같은 제2 CAR을 포함하는, 본 발명의 제1 측면에 따른 세포를 제공한다.

[0173] 본 발명의 제11 측면에서 정의된 바와 같은 제1 CAR 및 본 발명의 제12 측면에서 정의된 바와 같은 제2 CAR을 코딩하는, 본 발명의 제2 측면에 따른 핵산 서열을 또한 제공한다.

[0174] 본 발명의 제3 측면에 따른 키트를 또한 제공하고, 여기서 제1 핵산 서열은 본 발명의 제11 측면에서 정의된 바와 같은 제1 CAR을 코딩하고, 제2 핵산 서열은 본 발명의 제12 측면에서 정의된 바와 같은 제2 CAR을 코딩한다.

[0175] 본 발명의 제11 측면에서 정의된 바와 같은 제1 CAR 및 본 발명의 제12 측면에서 정의된 바와 같은 제2 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 본 발명의 제5 측면에 따른 벡터를 또한 제공한다.

[0176] 본 발명은 또한 OR 게이트 시스템에서, 공자극성 도메인 및 생존 신호 생성 도메인이 2종(또는 그 이상)의 CAR 사이에서 "분할"되면 성능이 개선됨을 확인하였다.

[0177] 따라서, 제21 측면에서, 세포 표면에 제1 키메라 항원 수용체(CAR) 및 제2 CAR을 공동발현하는 세포를 제공하고, 각각의 CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함하며, 이때 제1 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 공자극성 도메인을 포함하고, 제2 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 TNF 수용체 패밀리 엔도도메인을 포함한다.

[0178] 공자극성 도메인은 CD28 공자극성 도메인이다.

[0179] TNF 수용체 패밀리 엔도도메인은 예를 들어, OX-40 또는 4-1BB 엔도도메인이다.

[0180] 제1 및 제2 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 또한 ITAM 함유 도메인, 예컨대 CD3 제타 엔도도메인을 포함한다.

[0181] 제1 CAR은 하기 구조를 갖는다:

[0182] *AgB1-스페이서1-TM1-costim-ITAM*

[0183] 상기 구조에서,

[0184] *AgB1*은 제1 CAR의 항원 결합 도메인이고;

[0185] *스페이서 1*은 제1 CAR의 스페이서이고;

[0186] *TM1*은 제1 CAR의 경막 도메인고;

[0187] *costim*은 공자극성 도메인이고;

[0188] *ITAM*은 ITAM 함유 엔도도메인이다.

[0189] 제2 CAR은 하기 구조를 갖는다:

[0190] *AgB2-스페이서2-TM2- TNF-ITAM*

[0191] 상기 구조에서,

[0192] *AgB2*는 제2 CAR의 항원 결합 도메인이고;

[0193] *스페이서 2*는 제2 CAR의 스페이서이고;

[0194] *TM2*는 제2 CAR의 경막 도메인이고;

[0195] *TNF*는 TNF 수용체 엔도도메인이고;

[0196] *ITAM*은 ITAM 함유 엔도도메인이다.

[0197] 제1 및 제2 CAR 중 한 CAR은 CD19를 표적으로 하고 다른 CAR은 CD22를 표적으로 한다.

[0198] 제22 측면에서, 본 발명의 제21 측면에서 정의한 바와 같은 제1 및 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0199] 핵산 서열은 하기 구조를 갖는다:

[0200] AgB1-스페이서1-TM1-costim-ITAM1-coexpr-AbB2-스페이서2-TM2-TNF-ITAM2

[0201] 상기 구조에서,

[0202] AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0203] 스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0204] TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0205] costim은 공자극성 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0206] ITAM1은 제1 CAR의 ITAM 함유 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0207] coexpr은 CAR 둘 모두를 공동발현할 수 있게 하는 핵산 서열이고;

[0208] AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0209] 스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0210] TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0211] TNF는 TNF 수용체 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0212] ITAM2는 제2 CAR의 ITAM 함유 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이다.

[0213] 핵산 서열이 세포에서 발현되면, 제1 및 제2 CAR이 세포 표면에서 공동발현되도록 절단 부위에서 절단되는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0214] 제23 측면에서, 하기 (i) 및 (ii)를 포함하는 키트를 제공한다:

[0215] (i) 본 발명의 제21 측면에서 정의된 바와 같은 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제1 핵산 서열:

[0216] AgB1-스페이서1-TM1-costim-ITAM1

[0217] 상기 구조에서,

[0218] AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0219] 스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0220] TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0221] costim은 공자극성 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0222] ITAM1은 제1 CAR의 ITAM 함유 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이다;

[0223] (ii) 본 발명의 제21 측면에서 정의한 바와 같은 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 하기 구조를 갖는 제2 핵산 서열:

[0224] AbB2-스페이서2-TM2-TNF-ITAM2

[0225] 상기 구조에서,

[0226] AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0227] 스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0228] TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0229] TNF는 TNF 수용체 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0230] ITAM2는 제2 CAR의 ITAM 함유 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열이다.

[0231] 제24 측면에서, 본 발명의 제22 측면에 따르거나 또는 본 발명의 제23 측면에서 정의된 바와 같은 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0232] 제25 측면에서, 본 발명의 제22 측면에 따른 핵산 서열; 본 발명의 제23 측면에서 정의한 바와 같은 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열; 또는 본 발명의 제24 측면에 따른 벡터를 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 본 발명의 제21 측면에 따른 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0233] 제26 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제21 측면에 따른 세포를 다수 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0234] 본 발명의 제26 측면에 따른 약학 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 또한 제공한다.

[0235] 또한 질환을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한 본 발명의 제26 측면에 따른 약학 조성물을 제공한다.

[0236] 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약의 제조에서 본 발명의 제21 측면에 따른 세포의 용도를 제공한다.

[0237] CD19를 표적으로 하는 하나의 CAR 및 CD22를 표적으로 하는 하나의 CAR을 제공하여, 이들 마커 각각을 표적으로 하는 것이 가능해져, 암 탈출 문제가 감소된다.

[0238] CAR이 개별 분자로서 세포 표면 상에서 발현되므로, 이러한 접근법은 TanCAR과 연관된 공간 및 접근성 문제를 극복한다. 세포 활성화 효능이 또한 개선된다. 각각의 CAR이 그 자신의 스페이서를 가지면, 스페이서와 그에 따라서 결합 도메인이 세포 표면으로부터 돌출된 거리 및 특정 표적 항원에 대한 탄력성 등을 재단하는 것이 가능하다. 이러한 선택은 TanCAR과 연관된 고려 사항을 디자인함으로써 자유로워지는데, 즉 하나의 CAR은 T 세포막에 병치될 필요가 있고 한 CAR은 제1 CAR과 직렬로 위치되어, 원위에 존재할 필요가 있다.

[0239] 절단 부위에 의해 분리되는 2종 CAR을 코딩하는 단일 핵산을 제공함으로서, 단순한 단일 형질도입 절차를 사용해 2종 CAR을 공동발현하도록 세포를 조작하는 것이 가능하다. 이중 형질감염 절차는 개별 구성체의 CAR-코딩 서열을 사용할 수 있지만, 이는 보다 복잡하고 비싸며 핵산에 대한 보다 통합된 부위들을 요한다. 이중 형질감염 절차는 또한 2종의 CAR-코딩 핵산이 효과적으로 형질감염되어 발현되는지 여부에 대한 불확실성과 연관된다.

[0240] CAR은 고도의 상동성 부위를 갖게되는데, 예를 들어 경막 및/또는 세포내 신호전달 도메인이 고도로 상동성일

수 있다. 동일하거나 또는 유사한 링커를 2종의 CAR에서 사용하게 되면, 역시 고도로 상동성이다. 이는 2종의 CAR이 하나의 핵산 서열에 제공되는 접근법이 부적절할 수 있음을 시사하는데, 서열 간의 상동성 재조합 가능성 때문이다. 그러나, 본 발명자들은 고도의 상동성 영역을 코딩하는 서열 부분을 "코돈 워블링"하여, 높은 효율로 단일 구성체로부터 2종의 CAR을 발현하는 것이 가능함을 발견하였다. 코돈 워블링은 동일하거나 또는 유사한 아미노산 서열을 코딩하는 서열 영역에 대체 코돈을 사용하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0242] **도 1**: a) 고전적인 CAR을 예시한 개략도. (b) 내지 (d): CAR 엔도도메인의 상이한 세대 및 과돌연변이: (b) 초기 디자인은 FcεR1-γ 또는 CD3ζ 엔도도메인을 통해 단독으로 ITAM 신호가 전달된 반면, 후기 디자인은 동일한 화합물 엔도도메인에서 추가의 (c) 하나 또는 (d) 2가지 공자극성 신호를 전달하였다.

도 2: B-세포 성숙 경로/ B-세포 개체발생. DR=HLA-DR; cCD79 = 세포질 CD79; cCD22 = 세포질 CD22. CD19 및 CD22 항원은 둘 모두 B-세포 성숙화의 초기 단계 동안 발현된다. B-세포 급성 백혈병으로 진행되는 것이 이들 세포이다. CD22를 비롯하여 CD19를 동시에 표적화하는 것은 B-세포 급성 백혈병을 표적으로 하는 것이 가장 적합하다.

도 3: 항-CD19 OR CD22 CAR 카세트의 디자인을 위한 전략. CD19를 인식하는 바인더 및 CD22를 인식하는 바인더가 선택된다. 최적 스페이서 도메인 및 신호전달 도메인이 각 CAR에 대해 선택된다. (a) 2종 CAR이 FMD-2A 펩티드를 사용해 공동발현되도록 OR 게이트 카세트를 제작한다. 임의의 상동성 서열은 재조합을 피하도록 코돈-워블링된다. (c) 2종의 CAR이 T-세포 표면 상에서 개별 단백질로서 공동발현된다.

도 4: 동일한 펩티드 서열의 레트로바이러스 벡터에서 공동발현은 허용하지만 상동성 재조합은 피하는 코돈-워블링의 예. 여기서, 야생형 HCH2CH3-CD28tm제타를 코돈-워블링된 HCH2CH3-CD28tm제타와 정렬시킨다.

도 5: 항-CD19 OR CD22 CAR 게이트의 기능성 입증. (a) 구성체의 간략도: S1 - 신호 펩티드 1; HA - 해마글루틴 태그; HCH2CH3 - 힌지, IgG1 야생형 서열의 CH2CH3; CD28tmZ - CD28 경막 도메인 및 CD3 제타 워블링된 서열; 2A - 구제역 질환 2A 펩티드; S2 - 신호 펩티드 2; V5 - v5 에피토프 태그; aCD22 - 항-CD22 scFv; HCH2CH3' - 힌지, IgG1 워블링된 서열의 CH2CH3; CD28tmZ - CD28 경막 도메인 및 CD3 제타 워블링된 서열; (b) 단일 벡터로부터 2종 수용체의 공동발현. 말초 혈액 T-세포를 OKT3 및 항-CD28로 자극시킨 후, 이중시스트론 벡터로 형질도입시켰다. 세포는 항-V5-FITC(invitrogen) 및 항-HA-PE(abCam)로 염색하여 형질도입 후 5일 후에 분석하였다. 2종의 CAR을 T-세포 표면 상에서 동시에 검출할 수 있다. (c) 비형질도입 T-세포, 항-CD19 CAR만을 발현하는 T-세포, 항-CD22 CAR만을 발현하는 T-세포 및 항-CD19 OR CD22 CAR 게이트를 발현하는 T-세포를 CD19 또는 CD22를 발현하지 않거나, CD19 또는 CD22를 단독으로 발현하거나, 또는 2종의 항원을 발현하는 표적 세포로 챌린지시켰다. 항-CD19 OR CD22 CAR 게이트를 발현하는 T-세포는 하나의 항원이 부재하더라도 표적 세포를 사멸시킬 수 있었다.

도 6: 쥣과동물 CD22ALAb scFv, 인간화 CD22ALAb scFv 및 M971 scFv에 대한 비아코어 친화성 결정.

도 7: 쥣과동물 CD19ALAb scFv 및 인간화 CD19ALAb에 대한 비아코어 친화성 결정.

도 8: CD19ALAb scFv 및 fmc63 scFv에 대한 가용성 scFv-CD19 결합 간 결합 동역학의 비교.

도 9: 비교 실험에서 사용된 CD19ALAb CAR, fmc63 CAR, CD22ALAb CAR 및 M971 CAR을 예시하는 개략도.

도 10: CAR을 CD19ALAb 항원 결합 도메인과 비교하고 균등한 CAR을 fmc63 결합 도메인과 비교한 CD19 양성 표적 세포의 사멸 검정법.

도 11: A) CAR을 CD22ALAb 항원 결합 도메인과 비교하고 균등한 CAR을 M971 결합 도메인과 비교하는 CD22 양성 표적 세포의 사멸 검정법. B) CD22 양성 SupT1 세포와 1:1 공동배양 후 IFNγ 방출을 비교한 검정법.

도 12: CD19 구조 및 엑손.

도 13: 실시예 5에서 시험된 4종의 구성체를 예시한 개략도 및 구성체 지도. 구성체 지도에서, '으로 표시된 위치는 코돈 워블링된다.

A: CD19 및 CD22 CAR 둘 모두는 41BB-CD3제타 화합물 엔도도메인을 갖는다; B: CD19 및 CD22 CAR 둘 모두는 OX40-CD3제타 화합물 엔도도메인을 갖는다; C: CD19 CAR은 41BB-CD3제타 화합물 엔도도메인을 갖고 CD22 CAR은

CD28-CD3제타 화합물 엔도도메인을 갖는다; D: CD19 CAR은 OX40-CD3제타 화합물 엔도도메인을 갖고 CD22 CAR은 CD28-CD3제타 화합물 엔도도메인을 갖는다.

도 14: 도 13에 도시된 구성체를 발현하는 세포에 의한 표적 세포 사멸.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0243] 키메라 항원 수용체(CAR)

[0244] 도 1에 개략적으로 도시한 CAR은 세포외 항원-인식 도메인(바인더)을 세포내 신호전달 도메인(엔도도메인)에 연결하는 키메라 I형 경막 단백질이다. 바인더는 전형적으로 단일클론 항체(mAb)에서 유도된 단쇄 가변 단편(scFv)이지만, 항체-유사 항원 결합 부위를 포함하는 다른 형태를 기반으로 할 수 있다. 스페이서 도메인은 일반적으로 막으로부터 바인더를 격리시켜서 적합한 배향이 되도록 하는데 필수적이다. 사용되는 일반적인 스페이서 도메인은 IgG1의 Fc이다. 보다 조밀한 스페이서는, 항원에 따라서, 예를 들어 CD8α 유래의 줄기부 및 심지어는 IgG1 힌지 단독 등이 충분할 수 있다. 경막 도메인은 세포막에 단백질을 앵커링시키고 스페이서를 엔도도메인에 연결시킨다.

[0245] 초기 CAR 디자인은 CD3ζ 또는 FcεR1의 γ 사슬의 세포내 부분에서 유도된 엔도도메인을 가졌다. 결과적으로, 이들 1세대 수용체는 면역학적 신호 1을 전달하였고, 이는 동족 표적 세포의 T-세포 사멸을 촉발시키는데 충분하였지만 증식과 생존을 위해 T-세포를 완전하게 활성화시키는데는 실패하였다. 이러한 한계를 극복하기 위해서, 화합물 엔도도메인을 제작하였는데, CD3ζ의 그것에 T-세포 공자극성 분자의 세포내 일부분의 융합에 의해 항원 인식 후 동시에 활성화 및 공자극성 신호를 전달할 수 있는 2세대 수용체가 얻어졌다. 가장 일반적으로 사용되는 공자극성 도메인은 CD28의 도메인이다. 이는 T-세포 증식을 촉발시키는, 면역학적 신호 2라고 하는 가장 강력한 공자극성 신호를 공급한다. TNF 수용체 패밀리 엔도도메인, 예컨대 생존 신호를 전달하는 밀접하게 관련된 OX40 및 41BB를 포함해, 일부 수용체가 또한 기술된 바 있다. 활성화, 증식 및 생존 신호를 전달할 수 있는 엔도도메인을 갖는, 심지어 보다 강력한 3세대 CAR을 이제 기술한다.

[0246] CAR-코딩 핵산은 예를 들어, 레트로바이러스 벡터를 사용해 T 세포에 전달될 수 있다. 렌티바이러스 벡터가 적용될 수도 있다. 이러한 방식으로, 대량의 암-특이적 T 세포가 양자 세포 전달을 위해 생성된다. CAR이 표적 항원에 결합되면, 그것이 발현된 T-세포에 활성화 신호의 전달을 야기시킨다. 따라서, CAR은 표적 항원을 발현하는 종양 세포를 향하여 T 세포의 특이성 및 세포독성을 지정하게 된다.

[0247] 본 발명의 제1 측면은 제1 CAR 및 제2 CAR을 공동발현하는 세포에 관한 것으로서, 여기서 하나의 CAR은 CD19에 결합하고 다른 CAR은 CD22에 결합하여, T-세포가 이들 마커 중 하나를 발현하는 표적 세포를 인식할 수 있다.

[0248] 따라서, 본 발명의 제1 및 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 상이한 항원에 결합하고, CAR 둘 모두는 활성화 엔도도메인을 포함한다. 2종의 CAR은 2종의 상이한 수용체의 교차-페어링을 방지하도록 충분히 상이하거나, 또는 같을 수 있는 스페이서 도메인을 포함한다. 따라서 세포는 CD19 또는 CD22 중 하나 또는 둘 모두의 인식 시 활성화되도록 조작된다. 이는 단일 항원의 단독 표적화가 대부분의 암에서 고유한 높은 돌연변이율로 인한 상기 항원의 조정으로 인해 종양 탈출이 초래될 수 있다는 골디-콜드만 가설에서 언급한 바대로 종양학 분야에서 유용하다. 2종의 항원을 동시에 표적화하여, 아마도 이러한 탈출은 기하급수적으로 감소된다.

[0249] 2종의 CAR이 이종이량체화되지 않는 것이 중요하다.

[0250] 본 발명의 T 세포의 제1 및 제2 CAR은 절단 부위와 함께, 2종의 CAR을 포함하는 폴리펩티드로서 생성될 수 있다.

[0251] 신호 펩티드

[0252] 본 발명의 세포의 CAR은 CAR이 세포, 예컨대 T-세포 내부에서 발현시 초기 단백질이 소포체로 향하고 이후에 그것이 발현되는 세포 표면을 향하도록 신호 펩티드를 포함한다.

[0253] 신호 펩티드의 중심은 단일 알파-나선을 형성하는 경향을 갖는 소수성 아미노산의 긴 스트레치를 함유할 수 있다. 신호 펩티드는 전좌동안 폴리펩티드의 적절한 토폴로지를 시행하는데 도움을 주는, 양으로 하전된 짧은 아미노산 스트레치로 시작된다. 신호 펩티드의 말단에는 전형적으로 신호 펩티다제에 의해 인식되어 절단되는 아미노산 스트레치가 존재한다. 신호 펩티다제는 전좌의 완료 동안 또는 그 이후에 절단되어 자유 신호 펩티드 및 성숙한 단백질이 생성된다. 자유 신호 펩티드는 이후에 특이적 프로테아제에 의해 분해된다.

[0254] 신호 펩티드는 분자의 아미노 말단에 존재할 수 있다.

[0255] 신호 펩티드는 서열번호 1, 2 또는 3, 또는 신호 펩티드가 여전이 CAR의 세포 표면 발현을 야기시키는 기능을 하는 한 5, 4, 3, 2 또는 1개 아미노산 돌연변이(삽입, 치환 또는 부가)를 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0256] 서열번호 1: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

[0257] 서열번호 1의 신호 펩티드는 조밀하고 고도로 효율적이다. 신호 펩티다제에 의한 효율적인 제거가 제공되게, 말단 글리신 이후에 약 95% 절단이 이루어질 것으로 예상된다.

[0258] 서열번호 2: MSLPVTALLLPLALLLHAARP

[0259] 서열번호 2의 신호 펩티드는 IgG1에서 유래된 것이다.

[0260] 서열번호 3: MAVPTQVLGLLLLWLTDARC

[0261] 서열번호 3의 신호 펩티드는 CD8에서 유래된 것이다.

[0262] 제1 CAR의 신호 펩티드는 제2 CAR의 신호 펩티드와는 상이한 서열을 가질 수 있다.

[0263] CD19

[0264] 인간 CD19 항원은 면역글로불린 수퍼패밀리에 속하는 95 kd의 경막 당단백질이다. CD19는 I형 경막 단백질로 분류되는데, 단일 경막 도메인, 세포질 C-말단, 및 세포외 N-말단을 갖는다. CD19의 일반 구조는 도 12에 예시하였다.

[0265] CD19는 정상 및 신생물성 B 세포를 비롯하여, 여포성 수지상 세포의 생체마커이다. 사실, 발생 동안 최초기에 인식가능한 B-계통 세포부터 B-세포의 아세포에 이르는 B 세포 상에 존재하지만 형질 세포로 성숙시 소실된다. CD21 및 CD81과 함께 B 세포 공동수용체로서 주로 작용한다. 활성화시, CD19의 세포질 꼬리부가 인산화되어, Scr-패밀리 키나제의 결합 및 PI-3 키나제의 동원을 유발시킨다. CD19는 B-세포 분화의 매우 초기에 발현되어 형질 세포로의 B-세포 분화 말기에만 소실된다. 결과적으로, CD19는 다발성 골수종을 제외한 모든 B-세포 악성 종양에서 발현된다.

[0266] 하기 표에 약술한 바와 같이, 다양한 센터에서 CD19에 대해 상이한 디자인의CAR를 시험하였다.

표 1

[0267]

센터	*바인더*	*엔도도메인*	*설명*
런던 대학(University College London)	Fmc63	CD3-제타	낮은 수준으로 단기간 지속
메모리얼 슬로운 케터링 암센터(Memorial Sloane Kettering)	SJ25C1	CD28-제타	단기간 지속
NCI/KITE	Fmc63	CD28-제타	장기간 낮은 수준으로 지속
베일러, 세포 및 유전자 치료 센터(Baylor, Centre for Cell and Gene Therapy_	Fmc63	CD3-제타/ CD28-제타	단기간 낮은 수준으로 지속
UPENN/노바티스(Novartis)	Fmc63	41BB-제타	장기간 높은 수준으로 지속

[0268] 상기에 나타낸 바와 같이, 지금까지 수행된 대부분의 연구들은 CD19를 인식하는 결합 도메인의 일부로서 하이브리도마 fmc63에서 유도된 scFv를 사용하였다. 도 12에 도시한 바와 같이, CD19를 코딩하는 유전자는 10개 엑손을 포함하는데, 엑손 1 내지 4는 세포외 도메인을 코딩하고, 엑손 5는 경막 도메인을 코딩하며, 엑손 6 내지 10은 세포질 도메인을 코딩한다.

[0269] 본 발명의 CD19/CD22 OR 게이트에서, 항-CD10 CAR의 항원 결합 도메인은 CD19 유전자의 엑손 1에 의해 코딩되는 CD19의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0270] 본 발명의 CD19/CD22 OR 게이트에서, 항-CD19 CAR의 항원 결합 도메인은 CD19 유전자의 엑손 3에 의해 코딩되는 CD19의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0271] 본 발명의 CD19/CD22 OR 게이트에서, 항-CD19 CAR의 항원 결합 도메인은 CD19 유전자의 엑손 4에 의해 코딩되는 CD19의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0272] CD19ALAb

[0273] 본 발명자는 바인더 fmc63을 포함하는 기지의 항-CD19 CAR과 비교해 개선된 특성을 갖는 신규한 항-CD19 CAR을 개발하였다(실시예 2 및 3 참조). CAR의 항원 결합 도메인은 이하 동정된 CDR 및 VH/VL 영역을 갖는, CD19 바인더 CD19ALAb를 기반으로 한다.

[0274] 따라서, 본 발명자는 또한 하기 a) 및 b)를 포함하는 CD29-결합 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다:

[0275] a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

[0276] CDR1 - SYWMN (서열번호 15);

[0277] CDR2 - QIWPGDGDTNYNGKFK (서열번호 16)

[0278] CDR3 - RETTTVGRYYYAMDY (서열번호 17); 및

[0279] b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):

[0280] CDR1 - KASQSVDYDGDSYLN (서열번호 18);

[0281] CDR2 - DASNLVS (서열번호 19)

[0282] CDR3 - QQSTEDPWT (서열번호 20).

[0283] CD19-결합 활성에 부정적인 영향을 주지 않고 CDR 또는 각각의 CDR에 1 이상의 돌연변이(치환, 부가 또는 결실)를 도입시키는 것이 가능하다. 각각의 CDR은 예를 들어, 1, 2, 또는 3종의 아미노산 돌연변이를 가질 수 있다.

[0284] 본 발명의 CDR은 하기 아미노산 서열 중 하나를 포함할 수 있다:

[0285]
서열번호 21 (쥣과동물 CD19ALAb scFv 서열)

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDT
NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG
TTVTVSSDIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDA
SNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

서열번호 22 (인간화 CD19ALAb scFv 서열 – 중쇄 19, 카파 16)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT
NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
TLVTVSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDA
SNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

서열번호 39 (인간화 CD19ALAb scFv 서열 – 중쇄 19, 카파 7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT
NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
TLVTVSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKVLIYD
ASNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

[0286] scFv는 VH-VL 배향(서열번호 21, 22 및 39에 도시한 바와 같음) 또는 VL-VH 배향일 수 있다.

[0287] 본 발명의 CAR은 하기 VH 서열 중 하나를 포함할 수 있다:

[0288]
서열번호 23 (쥣과동물 CD19ALAb VH 서열)

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDT
NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG
TTVTVSS

서열번호 24 (인간화 CD19ALAb VH 서열)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT
NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
TLVTVSS

[0289] 본 발명의 CAR은 하기 VL 서열 중 하나를 포함할 수 있다:

서열번호 25 (쥣과동물 CD19ALAb VL 서열)
DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGI
PPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

서열번호 26 (인간화 CD19ALAb VL 서열, 카파 16)
DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

서열번호 40 (인간화 CD19ALAb VL 서열, 카파 7)
DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKVLIYDASNLVSG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

[0290]

[0291] 본 발명의 CAR은 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열번호 21, 22, 23, 24, 25, 26, 39 또는 40에 도시된 바와 같은 서열의 변이체를 포함하되, 단 그 변이체 서열은 CD19에 결합하는 능력을 유지(적절하다면 상보성 VL 또는 VH 도메인과 함께인 경우)한다.

[0292] 2개 폴리펩티드 서열 간 동일성 비율은 http://blast.ncbi.nlm.nih.gov에서 자유롭게 입수할 수 있는 BLAST와 같은 프로그램으로 용이하게 결정할 수 있다.

[0293] CD22

[0294] 인간 CD22 항원은 렉틴의 SIGLEC 패밀리에 속하는 분자이다. 성숙한 B 세포의 표면 및 일부 미성숙 B 세포 상에서 발견된다. 일반적으로, CD22는 자가면역 질환의 발생 및 면역계의 과활성화를 예방하는 조절 분자이다.

[0295] CD22는 그의 N-말단에 위치된 면역글로불린(Ig) 도메인과 시알산에 특이적으로 결합하는 당 결합 경막 단백질이다. Ig 도메인의 존재로 CD22는 면역글로불린 수퍼패밀리의 구성원이 된다. CD22는 B 세포 수용체(BCR) 신호전달을 위한 억제성 수용체로서 기능한다.

[0296] CD22는 2가지 이소폼으로 존재할 수 있는 IgSF 분자로서, 그 하나는 3개 ITIM(Immune receptor Tyrosin-based Inhibitory Motif) 및 하나의 ITAM을 포함하는 세포질내 꼬리부 및 7개 도메인을 가지며, 하나의 ITIM을 보유한 세포질내 꼬리부와 5개 세포외 도메인으로 대신 구성된 스플라이싱 변이체이다. CD22는 항원에 대한 B-세포 반응의 제어에 관여하는 억제성 수용체로 여겨진다. CD19처럼, CD22도 광범위한 범-B 항원으로 간주되지만, 일부 비림프성 조직 상에서의 발현이 기술된 바 있다. 치료적 단일클론 항체 및 면역접합체를 사용한 CD22의 표적화가 임상 실험에 들어갔다.

[0297] 항-CD22 CAR의 예가 문헌 [Haso *et al.* (Blood; 2013; 121(7))]에 기술되어 있다. 구체적으로, m971, HA22 및 BL22 scFv에서 유도된 항원 결합 도메인을 갖는 항-CD22 CAR이 기술되어 있다.

[0299] 항-CD22 CAR의 항원 결합 도메인은 30-50 nM 범위, 30-40 nM 범위의 K_D로 CD22에 결합한다. K_D는 약 32 nM이다.

[0300] CD22는 통상적으로 Ig 도메인 1 내지 Ig 도메인 7로 식별되는 7개 세포외 IgG-유사 도메인을 갖는데, Ig 도메인 7이 B 세포막에 가장 가깝게 존재하며 Ig 도메인 7은 Ig 세포막으로부터는 가장 멀리 위치한다(상기 도 2B에 도시한 바와 같이, 문헌 [Haso et al. 2013] 참조).

[0301] CD22의 아미노산 서열 관점에서 Ig 도메인의 위치(http://www.uniprot.org/uniprot/P20273)를 하기 표에 요약한다:

Ig 도메인	아미노산
1	20-138
2	143-235
3	242-326
4	331-416
5	419-500
6	505-582
7	593-676

[0302]

[0303] 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22 상의 막-원위 에피토프에 결합할 수 있다. 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22의 Ig 도메인 1, 2, 3 또는 4, 예를 들어 CD22의 Ig 도메인 3 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22의 아미노산 20-416, 예를 들어 CD22의 아미노산 242-326 사이에 위치하는 에피토프에 결합할 수 있다.

[0304] 이하에 기술된, 항-CD22 항체 HA22 및 BL22(상기에 기술한 바와 같은 문헌 [Haso et al 2013]) 및 CD22ALb는 CD22의 Ig 도메인 3의 에피토프에 결합한다.

[0305] 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22 상의 막-근위 에피토프에 결합하지 않는다. 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22의 Ig 도메인 5, 6 또는 7 상의 에피토프에 결합하지 않는다. 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22의 아미노산 419-676, 예컨대 CD22의 아미노산 505-676 사이에 존재하는 에피토프에 결합하지 않는다.

[0306] CD22ALAb

[0307] 본 발명자는 바인더 m971을 포함하는 기지의 항-CD22 CAR과 비교해 개선된 특성을 갖는 신규한 항-CD22 CAR을 개발하였다(예를 들어, 실시예 2 및 3과 상기의 문헌 [Haso et al (2013)] 참조). CAR의 항원 결합 도메인은 이하에서 동정된 VH/VL 영역 및 CDR을 갖는, CD22 바인더 CD22ALAb를 기반으로 한다.

[0308] 따라서 본 발명은 또한 하기 a) 및 (b)를 포함하는 CD22-결합 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다:

[0309] a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

[0310] CDR1 - NYWIN (서열번호 27);

[0311] CDR2 - NIYPSDSFTNYNQKFKD (서열번호 28)

[0312] CDR3 - DTQERSWYFDV (서열번호 29); 및

[0313] b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):

[0314] CDR1 - RSSQSLVHSNGNTYLH (서열번호 30);

[0315] CDR2 - KVSNRFS (서열번호 31)

[0316] CDR3 - SQSTHVPWT (서열번호 32).

[0317] CD22-결합 활성에 부정적인 영향없이 그 CDR 또는 각각의 CDR에 1 이상의 돌연변이(치환, 부가 또는 결실)를 도입시키는 것이 가능하다. 각각의 CDR은 예를 들어, 1, 2, 또는 3종의 아미노산 돌연변이를 갖는다.

[0318] 본 발명의 CAR은 하기 아미노산 서열 중 하나를 포함한다:

[0319]
서열번호 33 (쥣과동물 CD22ALAb scFv 서열)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRDTQERSWYFDVWGAGTTVTVSS
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK

서열번호 34 (인간화 CD22ALAb scFv 서열)

EVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
NQKFKDRATLTVDKSTSTAYLELRNLRSDDTAVYYCTRDTQERSWYFDVWGQGTLVTVSS
DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFS
GVPARFSGSGSGVEFTLTISSLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTRLEIK

[0320] scFv는 VH-VL 배향(서열번호 33 및 34에 도시한 바와 같음) 또는 VL-VH 배향일 수 있다.

[0322] 본 발명의 CAR은 하기 VH 서열 중 하나를 포함한다:

서열번호 35 (쥣과동물 CD22ALAb VH 서열)
QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRDTQERSWYFDVWGAGTTVTVSS

서열번호 36 (인간화 CD22ALAb VH 서열)
EVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
NQKFKDRATLTVDKSTSTAYLELRNLRSDDTAVYYCTRDTQERSWYFDVWGQGTLVTVSS

[0323]

[0324] 본 발명의 CAR은 하기 VL 서열 중 하나를 포함한다:

서열번호 37 (쥣과동물 CD22ALAb VL 서열)
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK

서열번호 38 (인간화 CD22ALAb VL 서열)
DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFS
GVPARFSGSGSGVEFTLTISSLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTRLEIK

[0325]

[0326] 본 발명의 CAR은 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열번호 33, 34, 35, 36, 37 또는 38로 표시된 서열의 변이체를 포함하되, 단 그 변이체 서열은 CD22에 결합하는 능력을 유지한다(적절하다면 상보적 VL 또는 VH 도메인과 함께인 경우).

[0327] B-세포 개체발생 및 후속 종양 동안 B-세포 항원 발현

[0328] CD19는 광범위하게 범-B 항원으로 간주되지만, 매우 빈번하게, 일부 계통 부정을 보일 수 있다. CD19 분자는 하나의 ITAM을 보유하는, 분자의 세포외 부분만큼 거의 큰, 긴 세포질내 꼬리부와 보다 작은 도메인에 의해 분리된 2개의 세포외 IgSF 도메인을 포함한다. CD19는 B-세포의 발생 및 활성화의 핵심 분자이다. CD22는 2개의 이소폼으로 존재하는 IgSF의 분자로서, 하나는 3개의 ITIM(Immune receptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) 및 하나의 ITAM을 포함하는 세포질내 꼬리부와 7개 도메인을 가지며, 하나의 ITIM을 보유하는 세포질내 꼬리부와 5개 세포외 도메인을 대신 포함하는 스플라이싱 변이체이다. CD22는 항원에 대한 B-세포 반응의 제어에 관여하는 억제성 수용체로 여겨진다. CD19처럼, CD22는 범-B 항원으로 광범위하게 여겨지지만, 일부 비림프성 조직상에서 발현이 기술된 바 있다(Wen et al. (2012) J. Immunol. Baltim. Md 1950 188, 1075-1082). 치료적 단일클론 항체 및 면역접합체를 사용한 CD22의 표적화가 임상 실험에 들어갔다. CD22 특이적 CAR의 생성이 기술되어 있다(Haso et al, 2013, Blood: Volume 121; 7: 1165-74, and James et al 2008, Journal of immunology, Volume 180; Issue 10; Pages 7028-38).

[0329] B-세포 백혈병에 관한 상세한 면역표현형 연구는 표면 CD19가 항상 존재하는 한편, 표면 CD22도 거의 항상 존재함을 보여준다. 예를 들어, Raponi 등(2011, 상기와 같음)은 B-ALL의 427건 사례의 표면 항원 표현형을 연구하였고 연구된 사례의 341건에서 CD22 존재를 밝혔다.

[0330] 상기 기술된 CAR19 표적화 이후 CD19 하향 조절 사건은 골디-콜드만 가설로 설명될 수 있다. 골디-콜드만 가설은 종양 세포가 그들의 고유한 유전자 불안정성에 의존적인 속도로 내성 표현형으로 돌연변이되고 암이 내성 클론을 함유할 확률은 돌연변이율 및 종양 크기에 의존적이라고 예측한다. 암 세포가 세포독성 T-세포의 직접 사멸에 고유하게 내성이 되는 것은 어렵지만, 항원 상실은 가능한 채로 남아 있는다. 이러한 현상은 흑색종 항원 및 EBV-유도 림프종을 표적화하기 전에 보고되었었다. 골디-콜드만 가설에 따라서, 최고의 치유 기회는 비-교차 내성 표적으로 동시에 공격하는 것이다. CD22가 B-ALL의 거의 모든 사례에서 발현되는 것을 고려하면, CD22와 함께 CD19의 동시 CAR 표적화는 내성 CD19 음성 클론의 출현을 감소시킬 수 있다.

[0331] 항원 결합 도메인

[0332] 항원 결합 도메인은 항원을 인식하는 CAR의 일부분이다. 수많은 항원 결합 도메인이 당분야에 알려져 있는데, 항체의 항원 결합 부위를 기반으로 하는 것, 항체 모방체, 및 T-세포 수용체를 포함한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 단일클론 항체에서 유도된 단쇄 가변 단편(scFv); 표적 항원의 천연 리간드; 표적에 대해 충분한 친화성을 갖는 펩티드; 단일 도메인 항체; 인공 단일 바인더 예컨대 달핀(앤키린 반복 단백질로 디자인됨); 또는 T-세포 수용체에서 유도된 단쇄를 포함한다.

[0333] CD19에 결합하는 CAR의 항원 결합 도메인은 CD19에 결합할 수 있는 임의의 도메인일 수 있다. 예를 들어, 항원

결합 도메인은 표 1에 기술된 바와 같은 CD19 바인더를 포함할 수 있다.

[0334] CD19에 결합하는 CAR의 항원 결합 도메인은 표 2에 도시된 바와 같은 CD19 바인더 중 하나에서 유도된 서열을 포함할 수 있다.

표 2

[0335]

바인더	*참조문헌*
HD63	Pezzutto(Pezzutto, A. et al. J. Immunol. Baltim. Md 1950 138, 2793-2799 (1987)
4g7	Meeker 등(Meeker, T. C. *et al. Hybridoma* **3,** 305-320 (1984)
Fmc63	Nicholson 등(Nicholson, I. C. et al. Mol. Immunol. 34, 1157-1165 (1997)
B43	Bejcek 등(Bejcek, B. E. *et al. Cancer Res.* **55,** 2346-2351 (1995)
SJ25C1	Bejcek 등(1995, 상동)
BLY3	Bejcek 등(1995, 상동)
B4, 또는 재표면화 또는 인간화 B4	Roguska 등(Roguska, M. A. et al. Protein Eng. 9, 895-904 (1996)
HB12b, 최적화 및 인간화	Kansas 등Kansas, G. S. & Tedder, T. F. J. Immunol. Baltim. Md 1950 147, 4094-4102 (1991); Yazawa 등(Yazawa et al Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 15178-15183 (2005); Herbst 등(Herbst, R. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 335, 213-222 (2010)

[0336] CD22에 결합하는 CAR의 항원 결합 도메인은 CD22에 결합할 수 있는 임의의 도메인일 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 표 3에 기술된 바와 같은 CD22 바인더를 포함할 수 있다.

표 3

[0337]

바인더	*참조문헌*
M5/44 또는 인간화 M5/44	John 등(J. Immunol. Baltim. Md 1950 170, 3534-3543 (2003); 및 DiJoseph 등(Cancer Immunol. Immunother. CII 54, 11-24 (2005)
M6/13	DiJoseph 등(상동)
HD39	Dorken 등(J. Immunol. Baltim. Md 1950 136, 4470-4479 (1986)
HD239	Dorken 등(상동)
HD6	Pezzutto 등(J. Immunol. Baltim. Md 1950 138, 98-103 (1987)
RFB-4, 또는 인간화 RFB-4, 또는 친화성 성숙화	Campana 등(J. Immunol. Baltim. Md 1950 134, 1524-1530 (1985); Krauss 등(Protein Eng. 16, 753-759 (2003), Kreitman 등(J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 30, 1822-1828 (2012))
To15	Mason 등(Blood 69, 836-840 (1987))
4KB128	Mason 등(상동)
S-HCL1	Schwarting 등(Blood 65, 974-983 (1985))
mLL2 (EPB-2), 또는 인간화 mLL2 - hLL2	Shih 등(Int. J. Cancer J. Int. Cancer 56, 538-545 (1994)), Leonard 등(J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 21, 3051-3059 (2003))
M971	Xiao 등(mAbs 1, 297-303 (2009))
BC-8	Engel 등(J. Exp. Med. 181, 1581-1586 (1995))
HB22-12	Engel 등(상동)

[0338] 스페이서 도메인CAR은 경막 도메인과 항원 결합 도메인을 연결하기 위한 스페이서 서열을 포함하고 항원 결합 도메인을 엔도도메인으로부터 공간적으로 분리시킨다. 탄성 스페이서는 항원 결합 도메인으로 하여금 결합을 촉진하는 상이한 방향으로 배향되도록 한다.

[0340] 본 발명의 세포에서, 제1 및 제2 CAR은 상이한 스페이서 분자를 포함한다. 예를 들어, 스페이서 서열은 예를 들어, IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 인간 CD8 줄기부 또는 마우스 CD8 줄기부를 포함한다. 스페이서는 대안적으로 IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 CD8 줄기부와 유사한 길이 및/또는 도메인 공간 특성을 갖는 대체 링커 서열을 포함한다. 인간 IgG1 스페이서는 Fc 결합 모티프를 제거하도록 변경될 수 있다.

[0341] 항-CD19 CAR에 대한 스페이서는 CD8 줄기부 스페이서, 또는 CD8 줄기부 스페이서와 균등한 길이를 갖는 스페이서를 포함한다. 항-CD19 CAR에 대한 스페이서는 적어도 30개 아미노산 또는 적어도 40개 아미노산을 포함한다. 35-55개 아미노산, 예를 들어 40-50개 아미노산을 가질 수 있다. 약 46개 아미노산을 가질 수 있다.

[0342] 항-CD22 CAR에 대한 스페이서는 IgG1 힌지 스페이서, 또는 IgG1 힌지 스페이서와 균등한 길이를 갖는 스페이서를 포함할 수 있다. 항-CD22 CAR에 대한 스페이서는 30개 미만의 아미노산 또는 25개 미만의 아미노산을 가질 수 있다. 15-25개 아미노산, 예를 들어 18-22개 아미노산을 가질 수 있다. 약 20개 아미노산을 가질 수 있다.

[0343] 이들 스페이서에 대한 아미노산 서열의 예를 하기에 제공한다:

서열번호 4 (인간 IgG1 의 힌지-CH2CH3)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

서열번호 5 (인간 CD8 줄기부):

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

서열번호 6 (인간 IgG1 힌지):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

서열번호 7 (CD2 엑토도메인)

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDKKKIAQFRKEKETFKEKDTYKLF
KNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNG
TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSVEPVSCP
EKGLD

서열번호 8 (CD34 엑토도메인)

SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKF
TSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATS
PTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ
ADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVA
SHQSYSQKT

[0344]

[0345] CAR은 전형적으로 동종이량체(도 1a 참조)이므로, 교차-페어링에 의해 이종이량체 키메라 항원 수용체가 생성될 수 있다. 이는 다양한 이유때문에 바람직하지 않은데, 예를 들어 (1) 에피토프가 표적 세포 상에서 동일한 "수준"에 존재하지 않아서 교차-페어링된 CAR이 하나의 항원에만 결합할 수 있고, (2) 2종의 상이한 scFv 유래 VH 및 VL이 교환되어 표적 인식이 실패되거나 또는 기대치 않은 예상하지 못한 항원을 더 심하게 인식할 수 있다. 제1 CAR의 스페이서는 교차-페어링을 피하도록 제2 CAR의 스페이서와 충분히 상이할 수 있다. 제1 스페이서의 아미노산 서열은 제2 스페이서와 아미노산 수준에서 50%, 40%, 30% 또는 20% 미만의 동일성을 공유할 수 있다.

[0346] 경막 도메인

[0347] 경막 도메인은 막을 관통하는 CAR의 서열이다.

[0348] 경막 도메인은 막에서 열역학적으로 안정한 임의의 단백질 구조물이다. 이는 전형적으로 몇몇 소수성 잔기를 포함하는 알파 나선이다. 임의의 경막 단백질의 경막 도메인이 사용되어 본 발명의 경막 부분을 공급한다. 단백질의 경막 도메인의 존재 및 관통부는 당업자가 TMHMM 알고리즘 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)을 사용해 결정할 수 있다. 또한, 단백질의 경막 도메인이 비교적 단순한 구조, 즉 막을 관통하는 충분한 길이의 소수성 알파 나선을 형성할 것으로 예측되는 폴리펩티드 서열이라는 것을 고려하면, 인공적으로 디자인된 TM 도메인이 또한 사용될 수 있다(US 7052906 B1은 합성 경막 성분을 기술함).

[0349] 경막 도메인은 양호한 수용체 안정성을 제공하는, CD28에서 유도될 수 있다.

[0350] 경막 도메인은 인간 Tyrp-1에서 유도될 수 있다. tyrp-1 경막 서열은 하기 서열번호 45에 도시된 바와 같다.

[0351] 서열번호 45

[0352] IIAIAVVGALLLVALIFGTASYLI

[0353] 활성화 엔도도메인

[0354] 엔도도메인은 CAR의 단일-전달 부분이다. 항원 인식 후, 수용체 무리, 천연 CD45 및 CD148이 시냅스로부터 배제되고 신호가 세포로 전달된다. 가장 일반적으로 사용되는 엔도도메인 성분은 3개 ITAM을 함유하는 CD3-제타의 것이다. 이는 항원이 결합된 후 T 세포에 활성화 신호를 전달한다. CD3-제타가 완전하게 유능한 활성화 신호를 제공할 수 없으므로 부가적인 공자극성 신호전달이 요구될 수 있다. 예를 들어, 키메라 CD28 및 OX40은 증식/생존 신호를 전달하기 위해 CD3-제타와 함께 사용되거나, 또는 모든 3종이 함께 사용될 수 있다.

[0355] 본 발명의 세포는 2종의 CAR을 포함하고, 각각은 엔도도메인을 갖는다.

[0356] 제1 CAR의 엔도도메인 및 제2 CAR의 엔도도메인은

[0357] (i) ITAM 함유 엔도도메인, 예컨대 CD3 제타 유래의 엔도도메인; 및/또는

[0358] (ii) 공자극성 도메인, 예컨대 CD28 유래의 엔도도메인; 및/또는

[0359] (iii) 생존 신호를 전달하는 도메인, 예를 들어 TNF 수용체 패밀리 엔도도메인 예컨대 OX-40 또는 4-1BB

[0360] 를 포함한다.

[0361] 한가지 배열에서, 공자극성 및 생존 신호-생성 도메인은 OR 게이트의 2종(또는 그 이상)의 CAR 사이에서 "공유된다". 예를 들어 OR 게이트가 2종의 CAR, CAR A 및 CAR B를 갖는 경우, CAR A는 공자극성 도메인(예를 들어, CD28 엔도도메인)을 포함하고, CAR B는 TNF 수용체 패밀리 엔도도메인, 예컨대 OX-40 또는 4-1BB를 포함할 수 있다.

[0362] ITAM 모티프를 함유하는 엔도도메인은 본 발명에서 활성화 엔도도메인으로서 작용한다. 몇몇 단백질은 1 이상의 ITAM 모티프를 갖는 엔도도메인을 함유하는 것으로 알려져 있다. 그러한 단백질의 예는 몇가지 예를 들면 CD3 엡실론 사슬, CD3 감마 사슬 및 CD3 델타 사슬을 포함한다. ITAM 모티프는 YxxL/I 서명으로 제공되는, 임의의 2가지 다른 아미노산에 의해 류신 또는 이소류신으로부터 분리된 티로신으로서 쉽게 인식될 수 있다. 전형적으로, 항상은 아니지만, 이들 모티프 중 2개는 분자의 꼬리부에서 6 내지 8개 아미노산에 의해 분리되어진다(YxxL/Ix(6-8)YxxL/I). 따라서, 당업자는 활성화 신호를 전달하는 1 이상의 ITAM을 함유하는 존재하는 단백질을 쉽게 찾을 수 있다. 또한, 모티프가 단순하고 복합 2차 구조가 필요하지 않다는 점에서, 당업자는 활성화 신호를 전달하는 인공 ITAM을 함유하는 폴리펩티드를 디자인할 수 있다(합성 신호전달 분자에 관한, WO 2000/063372 참조).

[0363] 활성화 엔도도메인을 갖는 CAR의 경막 및 세포내 T-세포 신호전달 도메인(엔도도메인)은 서열번호 9, 10 또는 11로 표시된 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

서열번호 9 (CD28 경막 도메인 및 CD3 Z 엔도도메인 포함)

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

서열번호 10(CD28 경막 도메인 및 CD28 및 CD3 제타 엔도도메인 포함)

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP
RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

서열번호 11(CD28 경막 도메인 및 CD28, OX40 및 CD3 제타 엔도도메인 포함)

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP
RDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0364]

[0365] 변이체 서열은 서열번호 9, 10 또는 11과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖되, 단

그 서열은 효과적인 경막 도메인 및 효과적인 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 제공한다.

[0366] "분할" OR 게이트 엔도도메인

[0367] 본 발명은 공자극성/생존 신호 도메인이 2종의 CAR 사이에서 분할된 OR 게이트를 제공한다.

[0368] 이러한 점에서, 본 발명은 세포 표면에서 제1 키메라 항원 수용체(CAR) 및 제2 CAR을 공동발현하는 세포를 제공하고, 각각의 CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 공자극성 도메인을 포함하며, 제2 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 TNF 수용체 패밀리 엔도도메인을 포함한다.

[0369] 제1 및 제2 CAR은 상이한 항원에 결합할 수 있다. 예를 들어, 제1 CAR은 CD19에 결합하고, 제2 CAR은 CD22에 결합할 수 있으며, 대안적으로 제1 CAR이 CD22에 결합하고 제2 CAR은 CD19에 결합할 수 있다.

[0370] 제1 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 공자극성 도메인을 포함하고 생존 신호를 전달하는 도메인(예컨대 TNF 수용체 패밀리 엔도도메인)은 포함하지 않는다. 제2 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 TNF 수용체 패밀리 엔도도메인을 포함하고 공자극성 도메인(예컨대 CD28 엔도도메인)은 포함하지 않는다.

[0371] 공자극성 도메인은 CD28 공자극성 도메인일 수 있다. CD28 공자극성 도메인은 서열번호 41로 표시된 서열을 가질 수 있다.

[0372] 서열번호 41 (CD28 공자극성 엔도도메인)

[0373] SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0374] 본 발명의 CAR은 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열번호 41로 도시된 서열의 변이체를 포함하되, 단 변이체 서열은 항원 인식 시 T 세포를 공동자극하는 능력을 유지하며, 다시 말해 T 세포에 신호 2를 제공한다.

[0375] TNF 수용체 패밀리 엔도도메인은 OX40 또는 4-1BB 엔도도메인일 수 있다. OX40 엔도도메인은 서열번호 42로 도시된 서열을 가질 수 있다. 4-1BB 엔도도메인은 서열번호 43으로 도시된 서열을 가질 수 있다.

[0376] 서열번호 42 (OX40 엔도도메인)

[0377] RDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

[0378] 서열번호 43 (4-1BB 엔도도메인)

[0379] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0380] 본 발명의 CAR은 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열번호 42 또는 43으로 표시된 서열의 변이체를 포함하되, 단 변이체 서열은 항원 인식시 T 세포에 생존 신호를 전달하는 능력을 유지한다.

[0381] 제1 및/또는 제2 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 또한 ITAM 함유 도메인, 예컨대 CD3 제타 도메인을 함유한다. CD3 제타 도메인은 서열번호 44로 도시된 서열을 가질 수 있다.

[0382] 서열번호 44 (CD3제타 엔도도메인)

[0383] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL

[0384] YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0385] 본 발명의 CAR은 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열번호 44에 도시된 서열의 변이체를 포함하되, 단 변이체 서열은 항원 인식시 T-세포 신호전달을 유도하는 능력을 유지하며, 다시 말해 T 세포에 신호 1을 제공한다.

[0386] 제1 CAR은 하기의 구조를 가질 수 있다:

[0387] AgB1-스페이서1-TM1-costim-ITAM

[0388] 상기 구조에서,

[0389] AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인이고;

[0390] 스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서이고;

[0391] TM1은 제1 CAR의 경막 도메인이고;

[0392] costim은 공자극성 도메인이며;

[0393] ITAM은 ITAM 함유 엔도도메인이다.

[0394] "Costim"은 CD28 공자극성 도메인이다.

[0395] "ITAM"은 CD3 제타 엔도도메인이다.

[0396] 제2 CAR은 하기 구조를 가질 수 있다:

[0397] AgB2-스페이서2-TM2-TNF-ITAM

[0398] 상기 구조에서,

[0399] AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인이고;

[0400] 스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서이고;

[0401] TM2는 제2 CAR의 경막 도메인이고;

[0402] TNF는 TNF 수용체 엔도도메인이고;

[0403] ITAM은 ITAM 함유 엔도도메인이다.

[0404] "TNF"는 TNF 수용체 엔도도메인 예컨대 OX40 또는 4-1BB 엔도도메인이다.

[0405] 또한 "분할" 엔도도메인을 갖는 제1 및 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 서열, 및 상기 정의된 바와 같은 분할 엔도도메인을 포함하는 제1 CAR을 코딩하는 하나의 핵산 및 제2 CAR을 코딩하는 하나의 핵산으로서 2종의 핵산을 코딩하는 키트를 제공한다.

[0406] 공동발현 부위

[0407] 본 발명의 제2 측면은 제1 및 제2 CAR을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0408] 핵산은 절단 부위에 의해 연결된 2종의 CAR 분자를 포함하는 폴리펩티드를 생성시킨다. 절단 부위는 자가-절단되어서, 폴리펩티드가 생성된 경우에, 임의의 외부 절단 활성의 필요없이 제1 및 제2 CAR로 즉시 절단된다.

[0409] 다양한 자가-절단 부위가 알려져 있는데, 구제역 바이러스(FMDV) 2A 펩티드 및 유사 서열(Donnelly et al, Journal of General Virology (2001), 82, 1027-1041), 예를 들어 서열번호 12로 표시되는 서열을 갖는 토시아 아시그나(Thosea asigna) 바이러스 유래의 2A-유사 서열같은 것을 포함한다:

[0410] 서열번호 12

[0411] RAEGRGSLLTCGDVEENPGP

[0412] 공동발현 서열은 내부 리보솜 진입 서열(IRES)일 수 있다. 공동발현 서열은 내부 프로모터일 수 있다.

[0413] 세포

[0414] 본 발명은 세포 표면에서 제1 CAR 및 제2 CAR을 공동발현하는 세포에 관한 것이며, 여기서 하나의 CAR은 CD19에 결합하고 다른 CAR은 CD22에 결합한다.

[0415] 세포는 세포 표면에서 CAR을 발현할 수 있는 임의의 진핵생물 세포, 예컨대 면역학적 세포일 수 있다.

[0416] 구체적으로, 세포는 면역 이펙터 세포 예컨대 T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포일 수 있다.

[0417] T 세포 또는 T 림프구는 세포-매개 면역에서 핵심 역할을 하는 림프구 유형이다. 그들은 세포 표면 상에 T-세포 수용체(TCR)의 존재에 의해 다른 림프구, 예컨대 B 세포 및 자연 살해 세포(NK 세포)와 구별될 수 있다. 하기에 요약한 바와 같이, 다양한 유형의 T 세포가 존재한다.

[0418] 헬퍼 T 헬퍼 세포(TH 세포)는 형질 세포 및 기억 B 세포로 B 세포의 성숙화, 및 세포독성 T 세포 및 마크로파지의 활성화를 포함한, 면역학적 과정에서 다른 백혈구를 보조한다. TH 세포는 그들 표면 상에 CD4를 발현시킨다. TH 세포는 그들이 항원 제시 세포(APC) 표면 상의 MHC 클래스 II 분자에 의해 펩티드 항원이 제시될 때 활성화된다. 이들 세포는 상이한 유형의 면역 반응을 촉진시키는 상이한 사이토카인을 분비하는, TH1, TH2, TH3, TH17, Th9, 또는 TFH를 포함한, 몇몇 아형 중 하나로 분화된다.

[0419] 세포독성 T 세포(TC 세포, 또는 CTL)는 바이러스 감염된 세포 및 종양 세포를 파괴하고, 또한 이식 거부에 관여된다. CTL은 그들 표면에 CD8을 발현시킨다. 이들 세포는 모든 유핵 세포 표면 상에 존재하는, MHC 클래스 I와 연관된 항원에 결합하여 그들 표적을 인식한다. IL-10, 아데노신 및 조절 T 세포에 의해 분비되는 다른 분자들을 통해서, CD8+ 세포는 자가면역 질환 예컨대 실험적 자가면역성 뇌척수염을 예방하는, 아네르기 상태로 불활성화된다.

[0420] 기억 T 세포는 감염이 해결된 후 장기간 지속되는 항원-특이적 T 세포의 서브셋이다. 그들은 그들의 동족 항원에 재노출 시 대량의 이펙터 T 세포로 신속하게 확대되어, 과거 감염에 대항한 "기억"을 면역계에 제공한다. 기억 T 세포는 3종의 아형을 포함하는데, 중심 기억 T 세포(TCM 세포) 및 2가지 유형의 이펙터 기억 T 세포(TEM 세포 및 TEMRA 세포)이다. 기억 세포는 CD4+이거나 또는 CD8+일 수 있다. 기억 T 세포는 전형적으로 세포 표면 단백질 CD45RO을 발현한다.

[0421] 조절 T 세포(Treg 세포)는 이전에 억제성 T 세포로 알려져 있었으며, 면역 내성의 유지에서 핵심적이다. 그들의 주요 역할은 면역 반응의 종료쪽으로 T 세포 매개 면역을 정지시키고 흉선에서 음성적 선택 과정을 탈출한 자가-반응성 T 세포를 억제하는 것이다.

[0422] 2가지 주요 클래스의 CD4+ Treg 세포, 즉 천연 발생 Treg 세포 및 순응적 Treg 세포가 기술되어 있다.

[0423] 천연 발생 Treg 세포(CD4+CD25+FoxP3+ Treg 세포라고도 알려짐)는 흉선에서 발생하고, TSLP로 활성화된 골수성(CD11c+) 및 형질세포양(CD123+) 수지 세포 둘 모두와 발생 T 세포 간의 상호작용과 관련된다. 천연 발생 Treg 세포는 FoxP3이라고 하는 세포내 분자의 존재에 의해 다른 T 세포와 구별된다. FOXP3 유전자의 돌연변이는 치명적인 자가면역 질환 IPEX를 야기하는, 조절 T 세포 발생을 방지할 수 있다.

[0424] 순응성 Treg 세포(Tr1 세포 또는 Th3 세포라고도 알려짐)는 정상 면역 반응 동안 유래될 수 있다.

[0425] 본 발명의 T 세포는 상기에 언급한 임의의 T 세포 유형, 구체적으로 CTL일 수 있다.

[0426] 자연 살해(NK) 세포는 선천성 면역계의 일부를 형성하는 세포용해성 세포 유형이다. NK 세포는 MHC 독립적 방식으로 바이러스 감염된 세포로부터의 선천적 신호에 신속한 반응을 제공한다.

[0427] NK 세포(선천적 림프성 세포군에 속함)는 거대 과립성 림프구(LGL)로 정의되며 B 및 T 림프구를 생성하는 일반 림프성 전구체에서 분화된 제3 유형의 세포로 구성된다. NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도선 및 흉선에서 분화되고 성숙되어 여기서 이후에 순환계로 들어가는 것으로 알려져 있다.

[0428] 본 발명의 CAR 세포는 상기 언급한 임의 유형의 세포일 수 있다.

[0429] CAR 발현 세포, 예컨대 CAR 발현 T 또는 NK 세포는 환자 자신(당사자)의 말초혈 유래, 기증자(제2 당사자) 말초혈 유래 조혈 줄기 세포 이식물 배경에서, 또는 미관련 기증자(제3자) 유래 말초혈에서 생체외에서 생성시킬 수 있다.

[0430] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 CAR 발현 T 세포 및/또는 CAR 발현 NK 세포를 포함하는 세포 조성물을 제공한다. 세포 조성물은 본 발명에 따른 핵산으로 생체외에서 혈액 샘플을 형질도입시켜 만들 수 있다.

[0431] 대안적으로, CAR 발현 세포는 관련 세포 유형, 예컨대 T 세포로의 유도성 전구체 세포 또는 배아 전구체 세포의 생체외 분화로부터 유도될 수 있다. 대안적으로, 불멸화 세포주 예컨대 그의 용해 기능을 유지하고 치료제로서 작용할 수 있는 T 세포주가 사용될 수 있다.

[0432] 모든 이들 실시형태에서, CAR 세포는 바이러스 벡터를 사용한 형질도입, DNA 또는 RNA를 사용한 형질감염을 포함한 많은 수단 중 하나를 통해 CAR을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입시켜 생성된다.

[0433] 본 발명의 CAR T 세포는 피험체 유래의 생체외 T 세포일 수 있다. T 세포는 말초혈 단핵 세포(PBMC) 샘플에서 유래할 수 있다. T 세포는 예를 들어 항-CD3 단일클론 항체를 사용한 처리에 의해, CAR-코딩 핵산으로 형질도입시키기 전에 활성화 및/또는 확장될 수 있다.

[0434] 본 발명의 CAR T 세포는

[0435] (i) 피험체 또는 상기 열거된 다른 공급원 유래의 T 세포 함유 샘플의 단리; 및

[0436] (ii) 제1 및 제2 CAR을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열(들)로 T 세포의 형질도입 또는 형질감염

[0437] 에 의해 제조될 수 있다.

[0438] 다음으로 T 세포는 정제되며, 예를 들어 제1 및 제2 CAR의 공동발현을 기반으로 선택된다.

[0439] 핵산 서열

[0440] 본 발명의 제2 측면은 본 발명의 제1 측면에서 정의된 바와 같은 제1 CAR 및 제2 CAR을 코딩하는 1 이상의 핵산 서열(들)에 관한 것이다.

[0441] 핵산 서열은 예를 들어, RNA, DNA 또는 cDNA 서열이다.

[0442] 핵산 서열은 CD19에 결합하는 하나의 키메라 항원 수용체(CAR) 및 CD22에 결합하는 CAR을 코딩한다.

[0443] 핵산 서열은 하기 구조를 갖는다:

[0444] AgB1-스페이서1-TM1-coexpr-AbB2-스페이서2-TM2

[0445] 상기 구조에서,

[0446] AgB1은 제1 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0447] 스페이서 1은 제1 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0448] TM1은 제1 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0449] coexpr은 CAR 둘 모두를 공동발현할 수 있게 하는 핵산 서열이고;

[0450] AgB2는 제2 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;

[0451] 스페이서 2는 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열이고;

[0452] TM2는 제2 CAR의 경막 도메인을 코딩하는 핵산 서열이며;

[0453] 여기서 핵산 서열은, T 세포에서 발현될 때, 절단 부위에서 절단되어 제1 및 제2 CAR이 세포 표면에서 공동발현되는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0454] 제1 CAR은 CD19에 결합하고 제2 CAR은 CD22에 결합한다. 대안적으로 제1 CAR은 CD22에 결합하고 제2 CAR은 CD19에 결합한다.

[0455] 상동성 재조합을 피하기 위해, 동일 또는 유사 아미노산 서열을 코딩하는 서열 영역에서 대체 코돈이 사용될 수 있다.

[0456] 유전자 코드의 축퇴성 덕분에, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 대체 코돈을 사용하는 것이 가능하다. 예를 들어, 코돈 "ccg" 및 "cca"는 둘 모두 아미노산 프롤린을 코딩하므로, 번역되는 단백질 서열의 그 위치에 아미노산에 영향없이 "ccg"의 사용을 "cca"로 교체할 수 있다.

[0457] 각각의 아미노산을 코딩하는데 사용될 수 있는 선택적 RNA 코돈을 하기 표 3에 요약하였다.

[0458] [표 3]

	U		C		A		G	
U	UUU	Phe (F)	UCU	Ser (S)	UAU	Tyr (Y)	UGU	Cys (C)
	UUC		UCC		UAC		UGC	
	UUA	Leu (L)	UCA		UAA	Ocher	UGA	Opal
	UUG		UCG		UAG	Amber	UGG	Trp(W)
C	CUU	Leu (L)	CCU	Pro (P)	CAU	His (H)	CGU	Arg (R)
	CUC		CCC		CAC		CGC	
	CUA		CCA		CAA	Gln (Q)	CGA	
	CUG		CCG		CAG		CGG	
A	AUU	Ile (I)	ACU	Thr (T)	AAU	Asn (N)	AGU	Ser (S)
	AUC		ACC		AAC		AGC	
	AUA		ACG		AAA	Lys (K)	AGA	Arg (R)
	AUG	Met(M)	ACG		AAG		AGG	
G	GUU	Val (V)	GCU	Ala (A)	GAU	Asp (D)	GGU	Gly (G)
	GUC		GCC		GAU		GGC	
	GUA		GCA		GAA	Glu (E)	GGA	
	GUG		GCG		GAG		GGG	

[0459]

[0460] 대체 코돈은, 특히 동일하거나 유사한 스페이서가 제1 및 제2 CAR에 사용된 경우, 제1 CAR의 스페이서 및 제2 CAR의 스페이서를 코딩하는 핵산 서열의 일부분에 사용될 수 있다. 도 4는 그 중 하나에 대체 코돈이 사용된, 스페이서 HCH2CH3 - 힌지를 코딩하는 2개 서열을 보여준다.

[0461] 대체 코돈은, 특히 같거나 또는 유사한 경막 도메인이 제1 및 제2 CAR에 사용되는 경우, 제1 CAR의 경막 도메인 및 제2 CAR의 경막을 코딩하는 핵산 서열의 일부분에 사용될 수 있다. 도 4는 그 중 하나에 대체 코돈이 사용된, CD28 경막 도메인을 코딩하는 2개 서열을 보여준다.

[0462] 대체 코돈은 제1 CAR의 엔도도메인의 전부 또는 일부 및 제2 CAR의 엔도도메인의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열의 일부에 사용될 수 있다. 대체 코돈은 CD3 제타 엔도도메인에 사용될 수 있다. 도 4는 그 중 하나에 대체 코돈을 사용한, CD3 제타 엔도도메인을 코딩하는 2개 서열을 보여준다.

[0463] 대체 코돈은 1 이상의 공자극성 도메인, 예컨대 CD28 엔도도메인에 사용될 수 있다.

[0464] 대체 코돈은 생존 신호를 전달하는 1 이상의 도메인, 예컨대 OX40 및 41BB 엔도도메인에 사용될 수 있다.

[0465] 대체 코돈은 CD3제타 엔도도메인을 코딩하는 핵산 서열의 일부분 및/또는 1 이상의 공자극성 도메인(들)을 코딩하는 핵산 서열의 일부분 및/또는 생존 신호를 전달하는 1 이상의 도메인(들)을 코딩하는 핵산 서열의 일부분에 사용될 수 있다.

[0466] 벡터

[0467] 본 발명은 또한 1 이상의 CAR-코딩 핵산 서열(들)을 포함하는 벡터, 또는 벡터 키트를 제공한다. 그러한 벡터를 사용해 제1 및 제2 CAR을 발현하도록 숙주 세포에 핵산 서열(들)을 도입시킬 수 있다.

[0468] 벡터는 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터, 또는 트랜스포존 기반 벡터 또는 합성 mRNA일 수 있다.

[0469] 벡터는 T 세포를 형질감염 또는 형질도입시킬 수 있다.

[0470] 약학 조성물

[0471] 본 발명은 또한 CAR 발현 세포, 예컨대 본 발명의 제1 측면에 따른 T 세포 또는 NK 세포를 다수 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 약학 조성물은 부가적으로 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다. 약학 조성물은 경우에 따라서 1 이상의 추가의 약학적 활성 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함한다. 그러한 제제는 예를 들어 정맥내 주입에 적합한 형태일 수 있다.

[0472] 치료 방법

[0473] 본 발명의 세포는 암 세포, 예컨대 B-세포 림프종 세포를 사멸시킬 수 있다. CAR 발현 세포, 예컨대 T 세포는 환자 자신(당사자)의 말초혈, 또는 기증자(제2 당사자) 말초혈 유래의 조혈 줄기 세포 이식 상황에서, 또는 비

관련 기증자(제3자) 유래의 말초 혈액에서 생체외 생성시킬 수 있다. 다르게, CAR T-세포는 T-세포로의 유도성 전구체 세포 또는 배아 전구체 세포의 생체외 분화로부터 유도될 수 있다. 이들 예에서, CAR T-세포는 바이러스 벡터를 사용한 형질도입, DNA 또는 RNA를 사용한 형질감염을 포함한 많은 수단 중 하나에 의해 CAR을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입시켜 생성된다.

[0474] 본 발명의 세포는 표적 세포, 예컨대 암세포를 사멸시킬 수 있다. 표적 세포는 CD19 또는 CD22의 발현에 의해 인식될 수 있다.

표 4

[0475]

표 4 - 림프성 백혈병 상에서 림프성 항원의 발현								
	CD19	CD22	CD10	CD7	CD5	CD3	cIgμ	sIgμ
초기 프리-B	100	>95	95	5	0	0	0	0
프리-B	100	100	>95	0	0	0	100	0
이행성 프리-B	100	100	50	0	0	0	100	0
B	100	100	50	0	0	0	>95	>95
T	<5	0	0	100	95	100	0	0

[0476] 문헌 [Campana *et al.* Immunophenotyping of leukemia. J. Immunol. Methods 243, 59-75 (2000)]에서 발췌). cIg μ - 세포질 면역글로불린 중쇄; sIg μ - 표면 면역글로불린 중쇄.

[0477] 상이한 유형의 B-세포 백혈병 상에서 일반적으로 연구되는 림프성 항원의 발현은 B-세포 개체발생을 반영한다(도 2 참조).

[0478] 본 발명의 T 세포를 사용해 암, 구체적으로 B-세포 악성종양을 치료할 수 있다.

[0479] CD19 또는 CD22를 발현하는 암의 예는 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종을 포함한 B-세포 림프종; 및 B-세포 백혈병이다.

[0480] 예를 들어, B-세포 림프종은 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 여포성 림프종, 변연부 림프종(MZL) 또는 점막-연관 림프성 조직 림프종(MALT), 소세포 림프성 림프종(만성 림프성 백혈병과 중복), 외투 세포 림프종(MCL), 버킷 림프종, 원발성 종격동(흉선) 거대 B-세포 림프종, 림프형질세포성 림프종(발덴스트롬 마크로글로불린혈증으로 나타남), 결절 변연부 B 세포 림프종(NMZL), 비장 변연부 림프종(SMZL), 혈관내 거대 B-세포 림프종, 원발성 삼출성 림프종, 림프종양 육아종증, T 세포/조직구-풍부 거대 B-세포 림프종 또는 원발성 중추 신경계 림프종일 수 있다.

[0481] B-세포 백혈병은 급성 림프아구성 백혈병, B-세포 만성 림프성 백혈병, B-세포 프로림프성 백혈병, 전구체 B 림프아구성 백혈병 또는 모세포 백혈병일 수 있다.

[0482] B-세포 백혈병은 급성 림프아구성 백혈병일 수 있다.

[0483] 본 발명의 T 세포를 사용한 치료는 종종 표준 접근법으로 발생되는 종양 세포의 방출 또는 탈출을 예방하는데 도움을 줄 수 있다.

[0484] 본 발명을 이제 실시예를 통해 더욱 설명하며, 이는 본 발명을 수행하는 당업자에게 도움을 주기 위해 제공하려는 것이며 본 발명의 범주를 임의 방식으로 한정하려는 의도가 아니다.

[0485] 실시예

[0486] **실시예 1** - CD19/CD22 논리적 'OR' 게이트의 개념 증명

[0487] CD19 'OR' CD22 CAR 게이트는 동일한 벡터에서 CD19 및 CD22 CAR의 공동발현에 의해 제작하였다. 항-CD19 바인더는 재표면화된 B4 항체로부터 유도된 scFv(Roguska et al. (1996) Protein Eng. 9, 895-904)였고, 항-CD22 바인더는 인간화 RFB4 항체에서 유도된 scFv였다. 인간 IgG1 힌지-CH2-CH3 스페이서를 2종의 CAR에 대해 사용하였고, 이의 코딩 서열은 통합 벡터에 의한 상동성 재조합을 피하도록 코돈-워블링시켰다. 2종 CAR의 TM 도메인은 CD28의 도메인에서 유도시켰고, 2종의 CAR 엔도도메인은 CD3-제타를 포함한다. 다시 한번, 이들 상동성 서열은 코돈 워블링시켰다. 공동발현은 FMD-2A 펩티드에 의해 분리시킨 인프레임으로 2종의 CAR을 클로닝하여 획득하였다. CD19/CD22 'OR' 게이트의 핵산 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 13 및 14로 도시한다.

서열번호 13

[0488]

```
ATGAGCCTGCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGACCATACCCCTACGAC
GTGCCCGACTACGCCAGCCTGAGCGGAGGCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAG
AAGCCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCAACTGGATGCACTGGGTG
AGGCAGGCCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCGAGATCGACCCCAGCGACAGCTACACCAACTACAACCAG
AAGTTCAAGGGCCGGGTGACCATCACCGTGGATAAGAGCGCCAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGA
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCAGCAACCCCTACTACTACGCTATGGACTACTGGGGCCAG
GGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGATCTGGCGGCGGAGGGAGCGAGATC
GTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGTAGCGCCAGCAGC
GGCGTGAATTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGAAGATGGATCTACGACACCAGCAAG
CTGGCCAGCGGCGTGCCCGCCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTG
GAGCCTGAGGATTTCGCCGTGTATTATTGCCACCAGAGGGGCAGCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAG
ATCAAGCGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGT
GATATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT
ATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC
TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTT
CTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATT
TTAAAAGGTGTCCAGTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCAGGGGGTCCCTGCGC
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCGCTTTCAGTATCTATGACATGTCTTGGGTCCGCCAGGTTCCGGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTCTCATATATTAGTAGTGGTGGTGGTACCACCTATTACCCGGACACTGTGAAGGGCCGCTTCACC
ATCTCCCGTGACAATTCCCGCAACACTCTGGATCTTCAAATGAACAGTCTGCGCGTCGAGGACACGGCTGTCTAT
TATTGTGCGCGTCATAGTGGCTACGGTAGTAGCTACGGGGTTTTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCCAGATGACTCAG
TCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACCTGCCGTGCAAGTCAGGACATTAGCAAT
TATTTAAACTGGCTTCAACAGAAACCGGGGAAAGCCCCGAAGCTCCTGATTTACTACACATCAATCTTACACTCA
GGAGTCCCGTCACGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCGGAA
GATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAACTGGAAATC
AAACGTTCGGATCCAGCCGAACCAAAGAGCCCCGATAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTG
CTGGGAGGCCCCAGCGTGTTTCTGTTTCCACCCAAGCCAAAGGATACCCTGATGATTAGTAGAACACCCGAAGTG
ACCTGTGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCCGAGGTGAAATTTAATTGGTATGTTGATGGTGTTGAAGTG
CACAACGCCAAAACCAAACCCAGAGAGGAGCAGTACAATTCTACCTATAGAGTCGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGATTGGCTGAACGGAAAAGAATACAAATGTAAAGTGAGCAATAAGGCCCTGCCCGCTCCAATTGAGAAG
ACAATTAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTATACACTGCCACCCAGTAGAGACGAACTGACA
AAGAATCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGATTTTACCCATCTGATATCGCCGTGGAATGGGAATCTAAC
GGCCAGCCCGAGAATAACTATAAGACAACCCCACCAGTGCTGGATAGCGATGGCAGCTTTTTTCTGTATTCTAAG
CTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGAAATGTGTTTAGCTGTAGTGTCATGCATGAGGCCCTGCACAAT
```

```
CACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCCTGGTGGTGGTGGGA
GGCGTGCTGGCCTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCTCCCGGGTGAAGTTT
TCTCGCTCTGCCGATGCCCCAGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAATGAACTGAACCTGGGCAGGCGG
GAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCACGGCGCAAAAATCCC
CAGGAGGGACTCTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAG
AGAAGACGCGGAAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGATTGTCCACCGCTACAAAAGATACATATGATGCCCTG
CACATGCAGGCCCTGCCACCCAGATGA
```

서열번호 14

[0489]

```
MSLPVTALLLPLALLLHAARPYPYDVPDYASLSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
SNWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
GSNPYYYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSGVNY
MHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSLEPEDFAVYYCHQRGSYTFGGGT
KLEIKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSLL
TCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVR
QVPGKGLEWVSYISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNSRNTLDLQMNSLRVEDTAVYYCARHSGYGSSY
GVLFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWL
QQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKL
EIKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR
SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
```

[0490] 2종의 CAR의 공동발현을 입증하기 위해서, 각각의 CAR의 scFv를 에피토프 태그(각각 HA 또는 V5)로 태깅하였다. 이 후속 단일 오픈 리딩 프레임을 SFG 레트로바이러스 벡터에 클로닝하였다. T-세포에 이 벡터를 형질도입시켰고 2종의 CAR은 항-HA 및 항-V5로 염색하고 유세포측정법으로 발현을 조사하여 카세트를 발현하는 T-세포 표면상에서 검출하였다.

[0491] 다음으로, CD19 OR CD22 CAR 게이트를 발현하는 T-세포를 CAR을 발현하지 않거나, 또는 단지 항-CD19 CAR만을 발현하거나, 또는 항-CD22 CAR만을 발현하는 대조군 T-세포와 함께, 양쪽 항원을 전혀 발현하지 않거나, 둘 모두를 발현하거나 또는 하나의 항원을 발현하는, 표적 세포로 공격하였다. 본 발명자는 OR-게이팅된 CAR T-세포

가 표적 항원 중 하나 또는 둘 모두를 발현하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있음을 확인하였다(도 5).

[0492] **실시예 2** - CD19ALAb 및 CD22ALAb의 동정 및 특징규명

[0493] CD19-바인더(CD19ALAb)를 동정하고 인간화시켰으며 쥣과동물 및 인간화 IgG 둘 모두와 scFv의 결합 친화성을 확인하고 "금표준" 항-CD19 바인더, fmc63과 비교하였다. 동시에, CD22-바인더(CD22ALAb)를 동정하고, 인간화시키고, 쥣과동물 및 인간화 IgG 둘 모두와 scFv의 결합 친화성을 확인하고 "금표준" 항-CD22 바인더, M971와 비교하였다.

[0494] 실험은 러닝 및 희석 완충액으로서 HBS-P를 사용해 Biacore T200 장비 상에서 수행하였다. BIAevaluation 소프트웨어 버전 2.0을 데이터 프로세싱에 사용하였다. 결합 동역학의 경우, 마우스 항-인간 IgG 또는 염소 항-마우스 IgG는 CM5 센서칩에 공유적으로 결합시켰다. IgG 또는 scFv-Fc 단백질을 포획하고, 다양한 농도의 상호작용 파트너 단백질을 플로우셀 상에 30 ㎕/분의 유속으로 주입하였다. 운동 속도 상수는 1:1 랑뮈르 결합 모델에 따라 적합화시킨 곡선을 통해 얻었다. 벌크 굴절률 차이는 포획 항체를 활성 표면과 동일한 수준으로 고정시킨 블랭크 대조군 플로우셀을 사용해 감산하였다. 이중 참조 감산을 완충액만을 사용해 수행하였다.

[0495] 결과를 도 6 내지 8에 도시하였다.

[0496] 데이터는 인간화 CD22ALAb가 쥣과동물 CD22ALAb와 견줄만한 CD22에 대한 결합 친화성(도 6) 및 유사한 결합 동역학을 가짐을 보여준다. scFv 형식인 쥣과동물 및 인간화 CD22ALAb는 금표준 CD22-결합 항체 M971보다 CD22에 대해 유의하게 더 높은 결합 친화성을 갖는다(도 6).

[0497] IgG 형식인 쥣과동물 및 인간화 CD19ALAb의 결합 친화성이 유사한 것으로 확인되었지만(데이터 도시하지 않음), 놀랍게도, 인간화 CD19ALAb의 결합 친화성은 scFv 형식인 쥣과동물 CD19ALAb보다 더 높은 것으로 확인되었다(도 7). CD19ALAb의 결합 친화성은 금표준 항-CD19 Ab, fmc63과 비슷한 것으로 확인되었다(가능하게는 약간 양호)(도 8).

[0498] **실시예 3** - CD19ALAb/fmc63 CAR 및 CD22ALAb/M971 CAR을 사용한 비교 기능 검정법

[0499] CAR의 항원 결합 도메인은 그 기능에 영향을 줄 수 있다. 이러한 실험에서, CAR은 CD19ALAb 및 CD22ALAb를 포함하여 생성시켰고 기능은 fmc63 또는 M971을 기반으로 하는 항원 결합 도메인을 갖는 균등한 CAR과 비교하였다.

[0500] fmc63(항-CD19) 및 M971(항-CD22)을 기반으로 하는 scFv를 포함하는 CAR은 2종의 CAR이 임상 개발중이므로 금표준 항체로서 간주할 수 있다.

[0501] CAR은 CD19ALAb, fmc63, CD22ALAb 및 M971을 기반으로 제작 및 발현시켰다. 그들 구조를 도 9에 도시하였다. CAR은 그들의 항원 결합 도메인이 유일하게 달랐다. 모든 구성체에서, 결합 도메인은 CD8 줄기부 스페이서와 막에 연결되었고 41BB 및 CD3-제타 유래의 세포내 활성화 모티프를 함유하였다.

[0502] 레트로바이러스는 CAR, gag/pol 및 엔벨로프 단백질 RD114을 코딩하는 플라스미드로 293T 세포를 일시적 형질감염시켜 생성시켰다. 3일 후, 상등액을 모으고 레트로넥신-코팅된 플레이트 상의 균등한 역가의 레트로바이러스로 PHA/IL2-활성화된 PBMC를 형질도입하는데 사용하였다. 형질도입 6일 후에 CAR 발현은 유세포측정법으로 확인하였고 PBMC는 1:1 비율로 CD19+ BFP SupT1 세포(fmc63 및 CD19ALAb CAR) 또는 CD22+ BFP SupT1 세포(M971 및 CD22ALAb CAR)와 공동배양하였다. 표적 세포 사멸은 1일 및 3일 후 검정하였다. 또한 1일 및 3일 후에, 상등액을 제거하고 인터페론-γ 수준을 ELISA로 검정하였다.

[0503] 결과를 도 10 및 11에 도시하였다.

[0505] 도 10에 도시한 바와 같이, CD19ALAb 항원 결합 도메인을 갖는 CAR은 fmc63 결합 도메인을 갖는 균등한 CAR 보다, 1일 및 3일 모두에, CD19+ve 표적 세포를 더욱 사멸시켰다(도 10).

[0506] CD22의 경우, CD22ALAb 항원 결합 도메인을 갖는 CAR은 M971 결합 도메인을 갖는 균등한 CAR보다, 3일 후에 CD22+ve 표적 세포를 더욱 사멸시켰다(도 11a). IFNγ 방출은 동일한 시간 이후에 M971 CAR보다 CD22ALAb CAR에서 상당히 더 높았다.

[0507] 따라서, CD19ALAb 및 CD22ALAb 기반 항원 결합 도메인을 갖는 CAR은 fmc63 및 M971 기반의 균등한 CAR보다 표적 세포 사멸 관점에서 개선된 특성을 갖는다.

[0508] CD22ALAb 결과는 상기의 문헌 [Haso et al (2013)]에 보고된 결과를 고려하면, 특히 놀랍다. 그러한

실험에서는, 상이한 항-CD22 CAR을 만들고 항-CD22 항체 HA22, BL22 및 m971을 기반으로 하는 결합 도메인으로 시험하였다. HA22 및 BL22 scFv는 CD22의 Ig 도메인 3에 결합하는 반면, m971은 CD22의 Ig 도메인 5-7 내에 결합하였다(Haso et al (2013), 도 2B). m971-유도된 CAR은 HA22-유도된 CAR보다 우수한 표적 세포 사멸 활성을 나타낸 것으로 보고되었고, 이러한 결과는 CAR에 의해 표적이 되는 CD22 에피토프의 중요성에 기인하였다(Haso et al (2013) page 1168, 마지막 전체 단락). CD22의 막 원위 도메인을 표적으로 하는 것이 고도로 활성인 항-CD22 CAR을 개발하는데 있어 "핵심 성분"이라고 결론내렸다(고찰, 마지막 단락). 이러한 결과와 대조적으로, 본원의 도 11에 도시된 데이터는 m971이 표적으로 삼은 Ig 도메인 5-7 에피토프와 비교해 "막 원위" 에피토프인 CD22의 Ig 도메인 3의 에피토프를 표적으로 하는, CD22ALAb가 m971-기반 항-CD22 CAR보다 우수한 표적 세포 사멸능을 갖는다는 것을 보여주었다.

[0509] **실시예 4** - 상이한 엔도도메인 조합을 사용한 OR 게이트 구성체의 조사

[0510] 4종의 OR 게이트 구성체를 도 13에 도시한 바와 같이 개발하였다. 그들 모두는 동일한 항원 결합 도메인, 스페이서 도메인 및 경막 도메인을 갖는 CD19/CD22 OR 게이트를 코딩하였고, 구성체간 유일한 차이는 하기 표에 나타낸 바와 같이, 엔도도메인이다:

[0511]

구성체	CD19 CAR 엔도도메인	CD22 CAR 엔도도메인
A	41BB-CD3ζ	41BB-CD3ζ
B	OX40-CD3ζ	OX40-CD3ζ
C	41BB-CD3ζ	CD28-CD3ζ
D	OX40-CD3ζ	CD28-CD3ζ

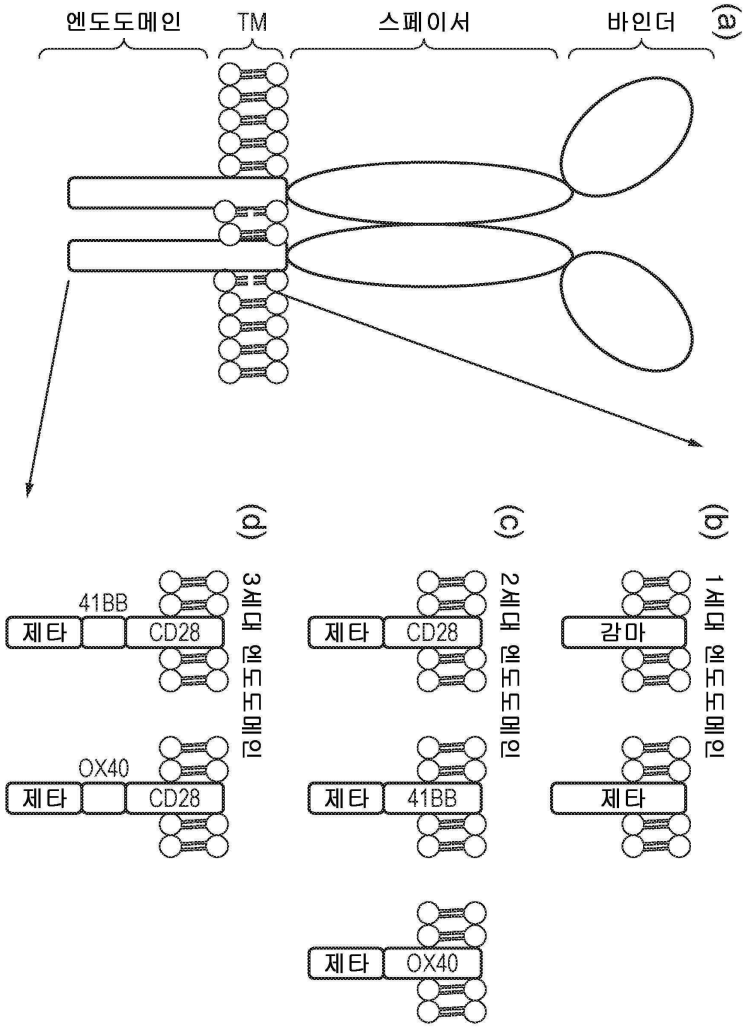
[0512] 시험관 내에서 Raji 세포를 사멸시키는 각각의 CD19/CD22 OR 게이트를 발현하는 세포의 능력을 상기에 기술한 바와 같이 검정하였다. 다양한 OR 게이트 조합을 발현하는 형질도입된 PBMC를 72시간 동안 CD19+/CD22+ Raji 표적 세포와 함께 1:1 및 1:10의 이펙터:표적 세포 비율로 공동배양하였다.

[0513] 결과를 도 14에 도시하였다. 모든 4종의 OR 게이트가 fmc63 및 M971 CAR보다 상당히 양호하게 표적 세포를 사멸시키는 것으로 확인되었다. 1:10의 이펙터:표적 세포 비율에서, 하나의 CAR에는 4-1BB제타/OX40제타를 갖고 다른 CAR에는 CD28제타를 갖는, "분할" 엔도도메인 OR 게이트가 최고 사멸 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

[0514] 상기 명세서에 언급된 모든 출판물을 참조로 본원에 편입시킨다. 본 발명에 기술된 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변이가 본 발명의 범주 및 정신을 벗어나지 않고 당업자에게 자명하다. 본 발명을 특정한 바람직한 실시형태와 함께 설명하였지만, 청구된 바와 같은 본 발명은 그러한 특정 실시형태에 과도하게 한정해서는 안됨을 이해해야 한다. 또한, 분자 생물학, 세포 생물학 또는 관련 분야의 당업자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위해 기술된 방식의 다양한 변형을 이하의 청구항의 범주 내에 포함시키고자 한다.

도면

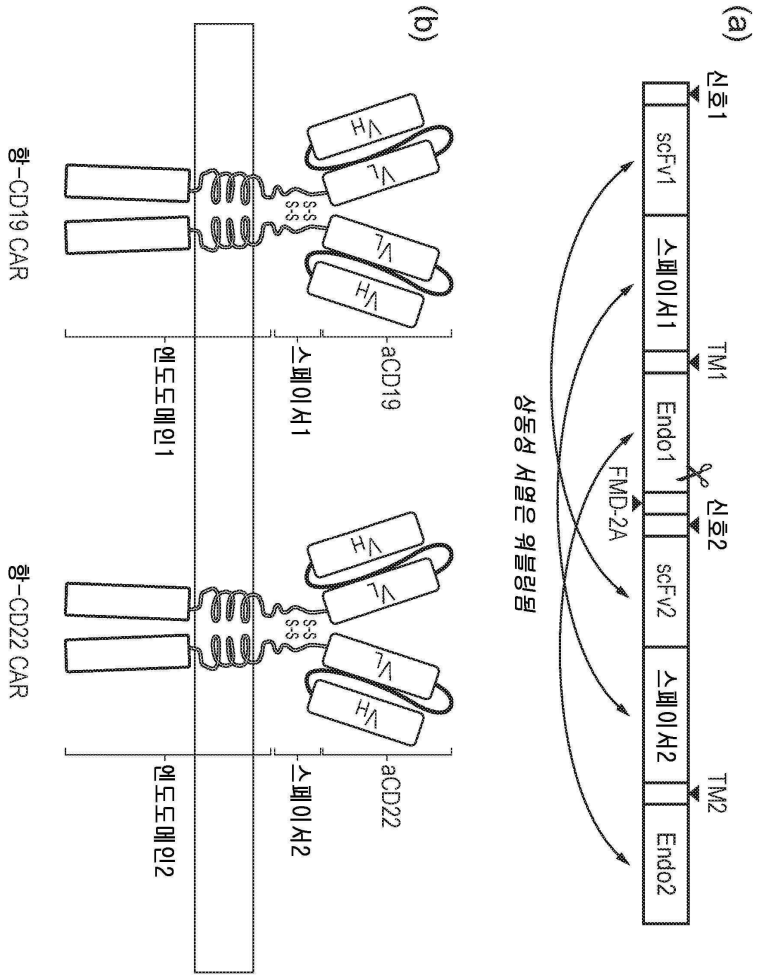
도면1


엔도도메인
TM
스페이서
바인더
(a)
(b)
1세대 엔도도메인
감마
제타
(c)
2세대 엔도도메인
제타
CD28
제타
41BB
제타
OX40
(d)
3세대 엔도도메인
41BB
제타
CD28
OX40
제타
CD28

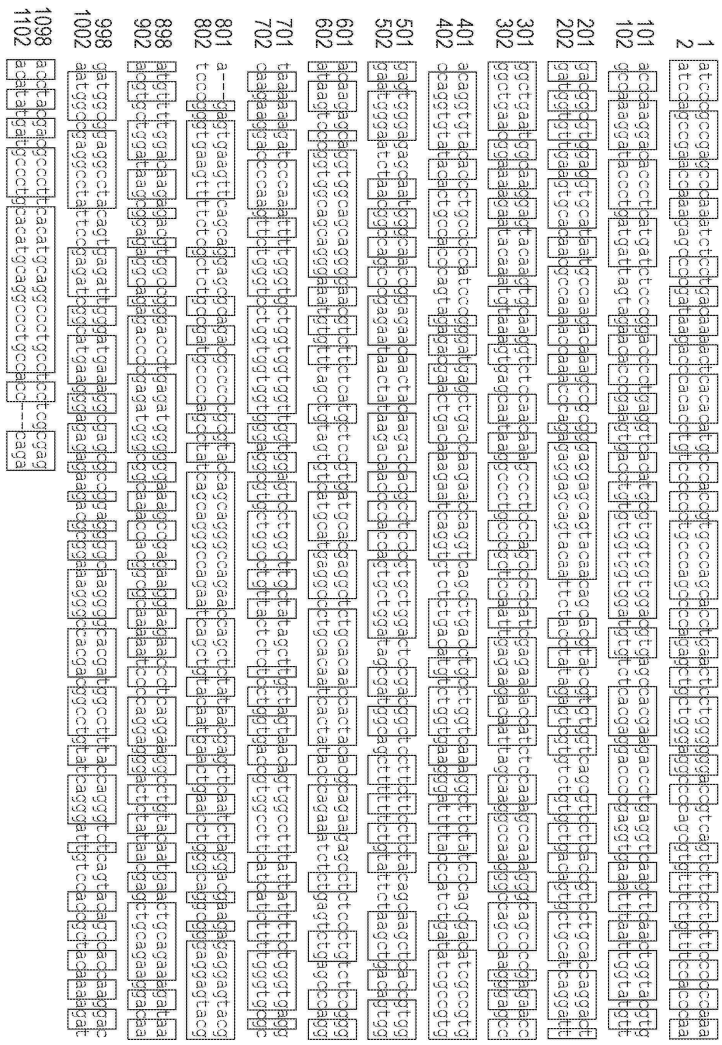
도면2

줄기 세포
CD34
DR
pro B-세포
cCD79
c/sCD22
CD19
초기 B-세포
cCD79
CD22
CD19
CD21
CD10
프리 B-세포
cCD79
CD22
CD19
CD21
CD10
CD20
나이브 B-세포
sCD79
CD22
CD19
CD21
CD20

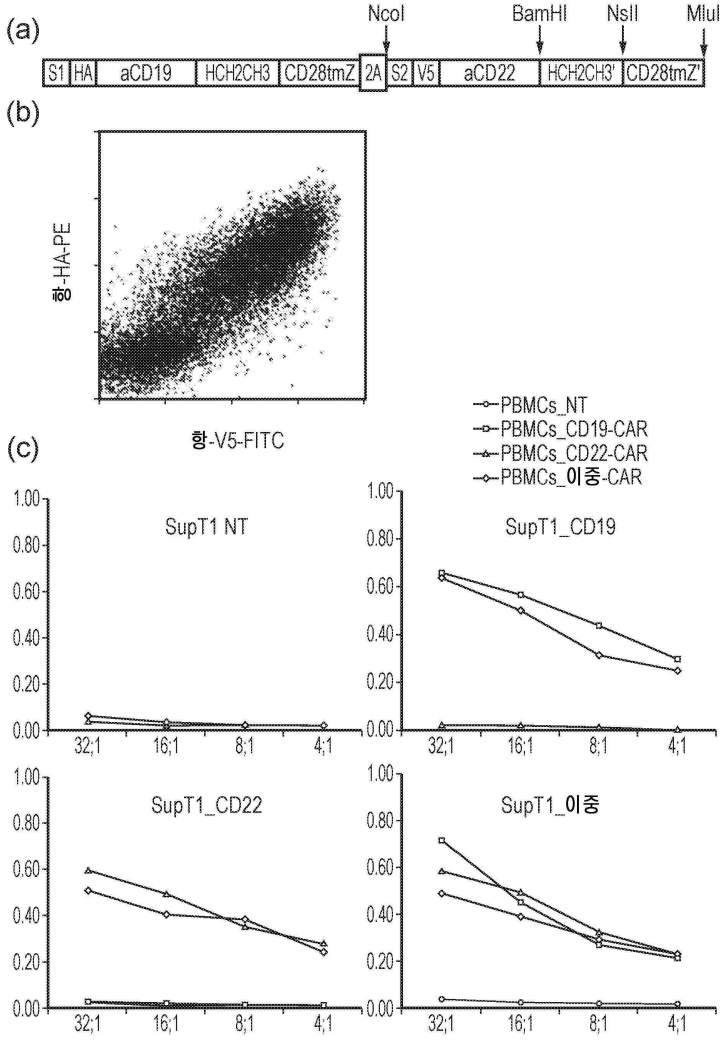
도면3


(a)
신호1
scFv1
스페이서1
TM1
Endo1
신호2
FMD-2A
scFv2
스페이서2
TM2
Endo2
상동성 서열은 워블링됨
(b)
VH
VL
S-S
aCD19
스페이서1
엔도도메인1
항-CD19 CAR
aCD22
스페이서2
엔도도메인2
항-CD22 CAR

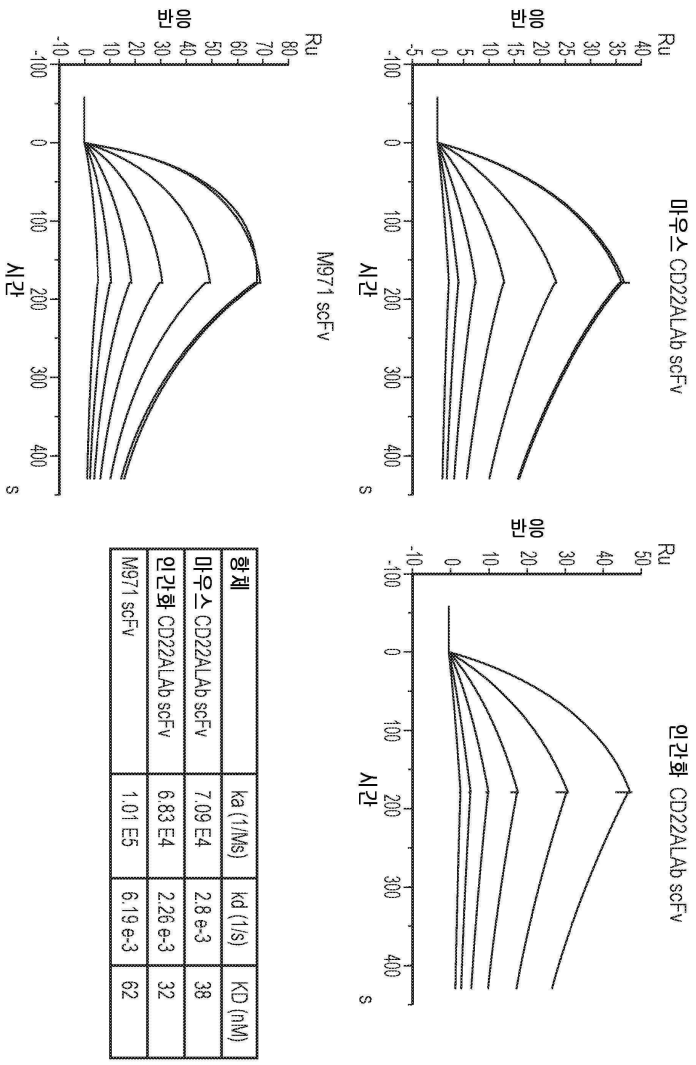
도면4



도면5

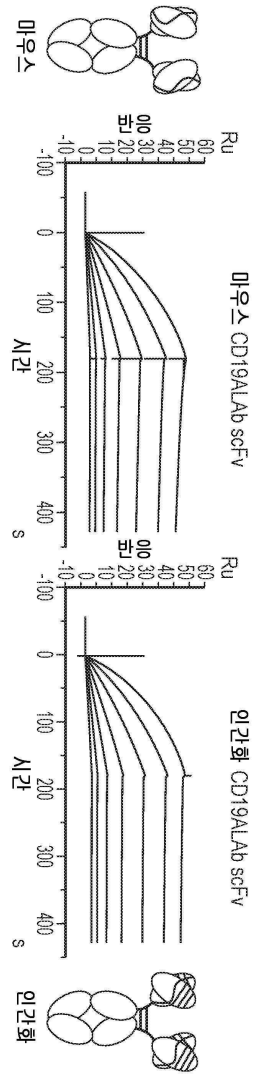

(a)
NcoI
BamHI
NsiI
MluI
S1
HA
aCD19
HCH2CH3
CD28tmZ
2A
S2
V5
aCD22
HCH2CH3'
CD28tmZ'
(b)
항-HA-PE
항-V5-FITC
(c)
PBMCs_NT
PBMCs_CD19-CAR
PBMCs_CD22-CAR
PBMCs_이중-CAR
SupT1 NT
SupT1_CD19
SupT1_CD22
SupT1_이중
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
32;1
16;1
8;1
4;1

도면6



항체			
마우스 CD22ALAb scFv	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
인간화 CD22ALAb scFv	7.09 E4	2.8 e-3	38
M971 scFv	6.83 E4	2.26 e-3	32
	1.01 E5	6.19 e-3	62

도면7

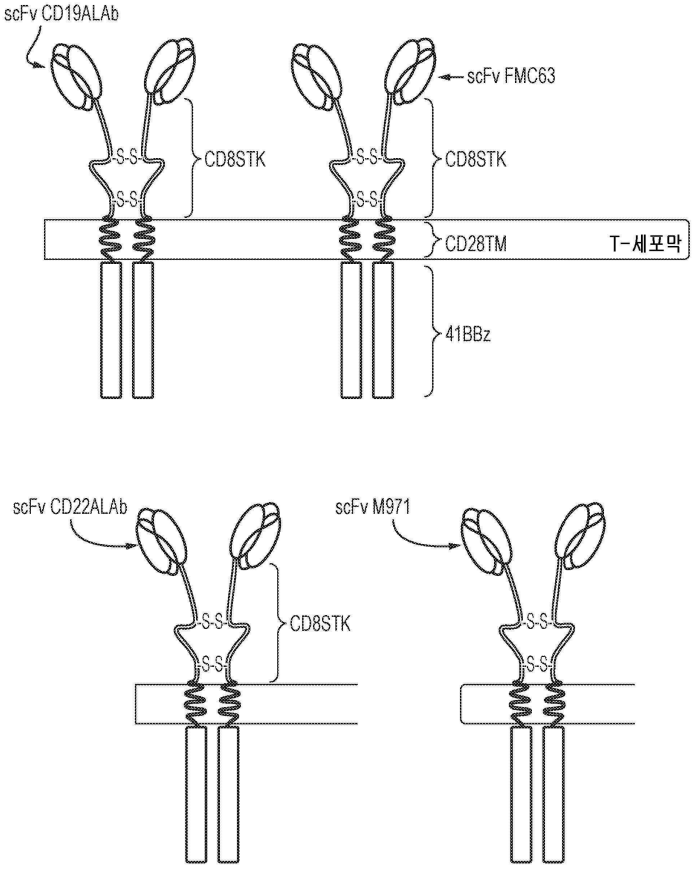


scFv	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
mscFv CD19ALAb	1.78 E5	3.28 E-4	1.85
hscFv CD19ALAb	2.21 E5	2.11 E-4	1.09

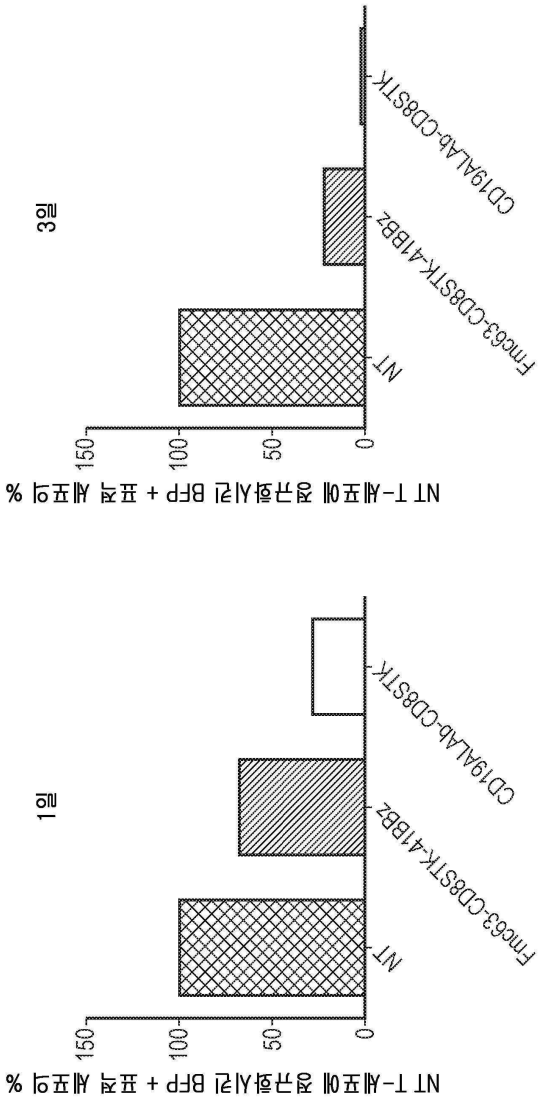
도면8

scFv	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	n
CD19ALAb	1.65 ± 0.143 x 10^5	3.00 ± 2.198 x 10^{-4}	1.1 ± 0.2	2
FMC63	3.2 ± 0.8 x 10^5	3.9 ± 1.2 x 10^{-4}	1.3 ± 0.7	2

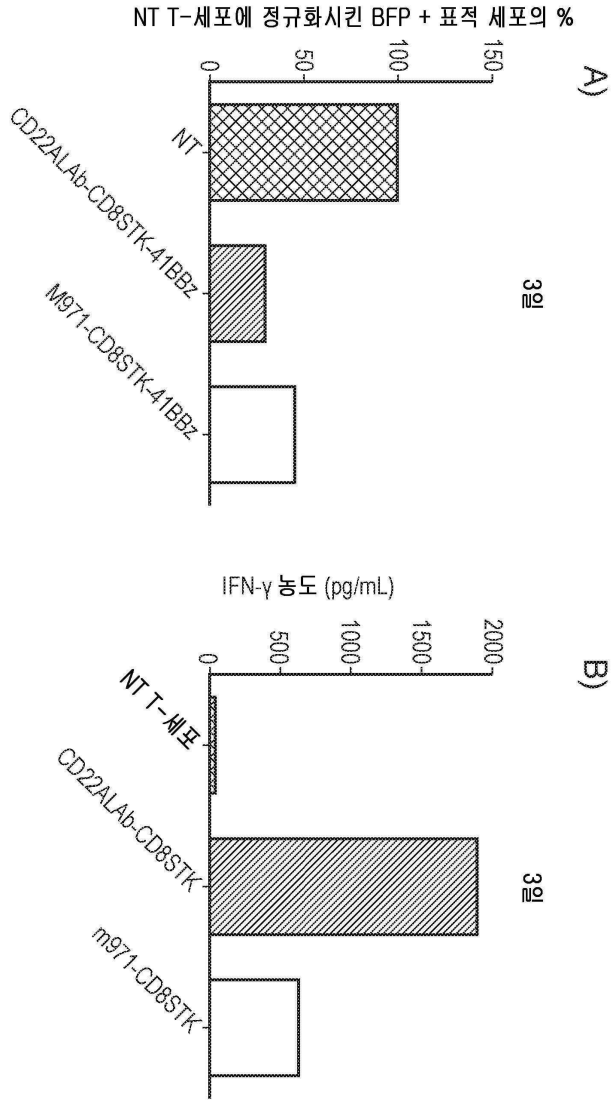
도면9


scFv CD19ALAb
scFv FMC63
CD8STK
CD8STK
CD28TM
T-세포막
41BBz
scFv CD22ALAb
scFv M971
CD8STK

도면10


3일
NT
Fmc63-CD8STK-41BBz
CD19ALAb-CD8STK
0
50
100
150
NT T-세포에 정규화시킨 BFP + 표적 세포의 %
1일
NT
Fmc63-CD8STK-41BBz
CD19ALAb-CD8STK
0
50
100
150
NT T-세포에 정규화시킨 BFP + 표적 세포의 %

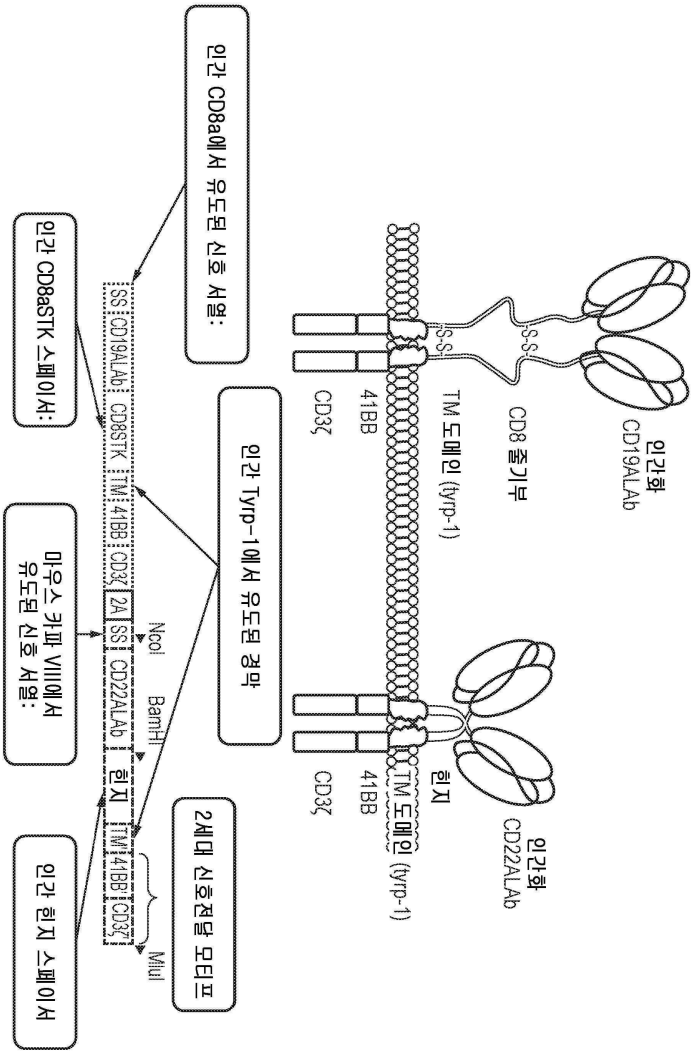
도면11


A)
NT T-세포에 정규화시킨 BFP + 표적 세포의 %
0
50
100
150
NT
CD22ALAb-CD8STK-41BBz
M971-CD8STK-41BBz
3일
B)
IFN-γ 농도 (pg/mL)
0
500
1000
1500
2000
NT T-세포
CD22ALAb-CD8STK
m971-CD8STK
3일

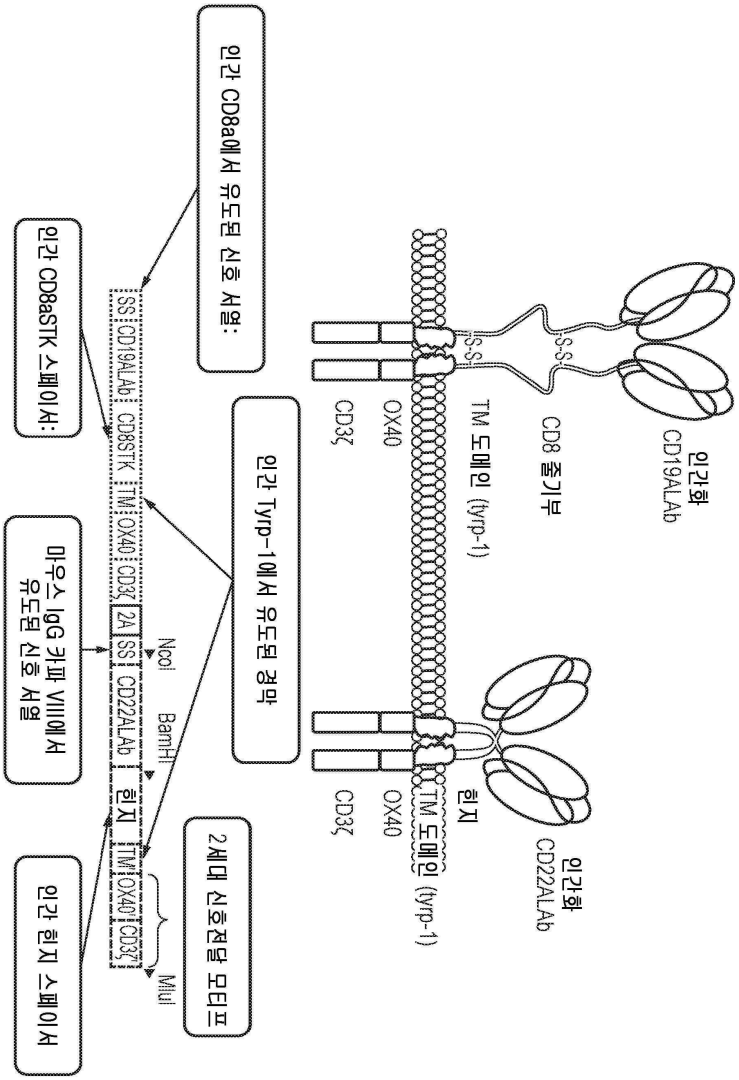
도면12

CD19
세포외 도메인
TM 도메인
세포질 도메인
C1
C2
엑손1
엑손2
엑손3
엑손4
엑손5
엑손 6-10
세포외 서열
EEPLVVKVEE/GDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQM
엑손-1
CD19-Ig-유사 C2-1형
엑손-2
GGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTV|NVEGS/GELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYV
CD19-Ig-유사 C2-1형
엑손-2
엑손-3
WAKDRPEIWEGEPPCLP|PRDSLNQSLSQ/DLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLL
엑손-3
CD19-Ig-유사 C2-2형
엑손-4
SLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARP
CD19-Ig-유사 C2-2형
엑손-4

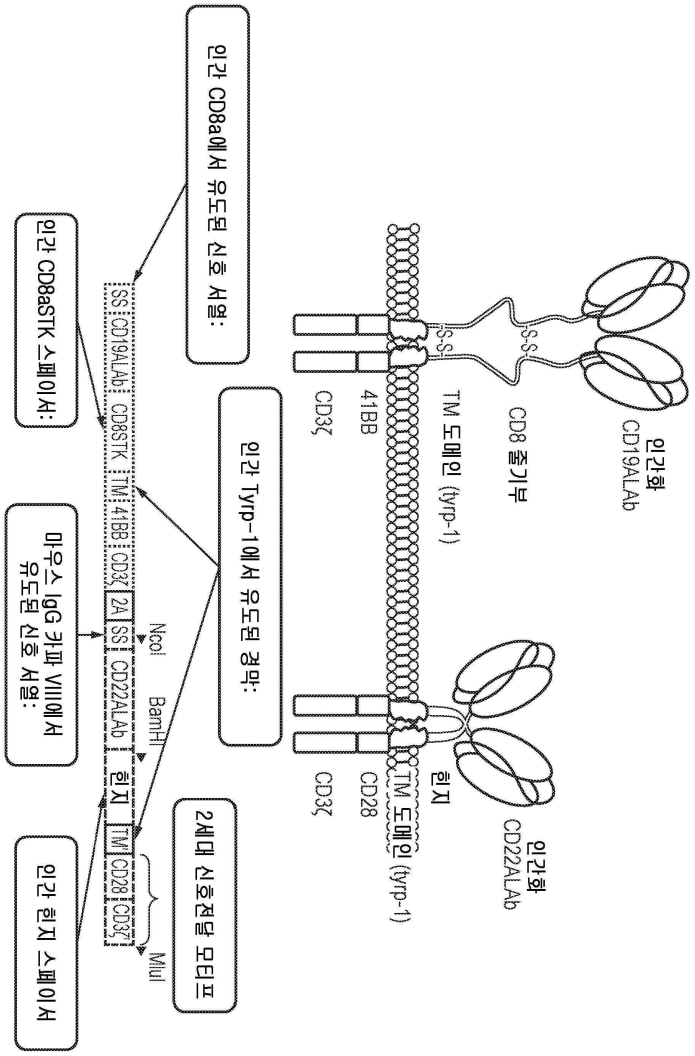
도면13a


인간 CD8a에서 유도된 신호 서열:
인간 CD8aSTK 스페이서:
마우스 카파 VIII에서 유도된 신호 서열:
인간 힌지 스페이서
인간 Tyrp-1에서 유도된 경막
2세대 신호전달 모티프
SS
CD19ALAb
CD8STK
TM
41BB
CD3ζ
2A
SS
CD22ALAb
힌지
TM
41BB
CD3ζ
NcoI
BamHI
MluI
인간화
CD19ALAb
CD8 줄기부
TM 도메인 (tyrp-1)
41BB
CD3ζ
인간화
CD22ALAb
힌지
TM 도메인 (tyrp-1)
41BB
CD3ζ

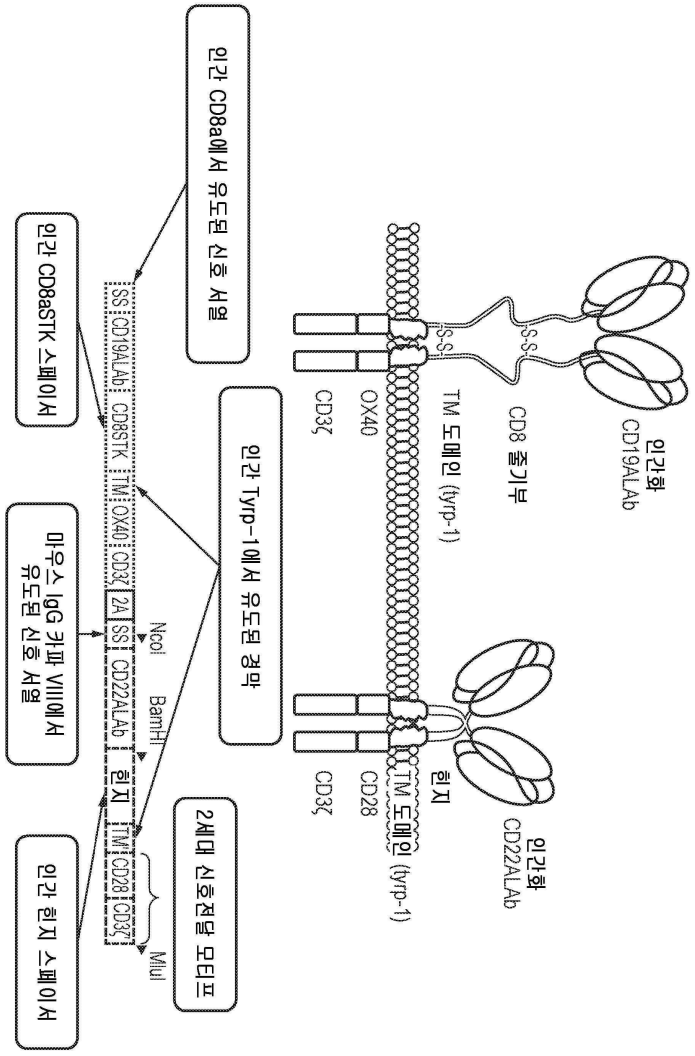
도면13b


인간 CD8a에서 유도된 신호 서열:
인간 CD8aSTK 스페이서:
마우스 IgG 카파 VIII에서 유도된 신호 서열
인간 힌지 스페이서
인간 Tyrp-1에서 유도된 경막
2세대 신호전달 모티프
SS CD19ALAb CD8STK TM OX40 CD3ζ 2A SS CD22ALAb 힌지 TM OX40 CD3ζ
NcoI
BamHI
MluI
인간화 CD19ALAb
CD8 줄기부
TM 도메인 (tyrp-1)
OX40
CD3ζ
인간화 CD22ALAb
힌지
TM 도메인 (tyrp-1)
OX40
CD3ζ
S-S
S-S
S-S

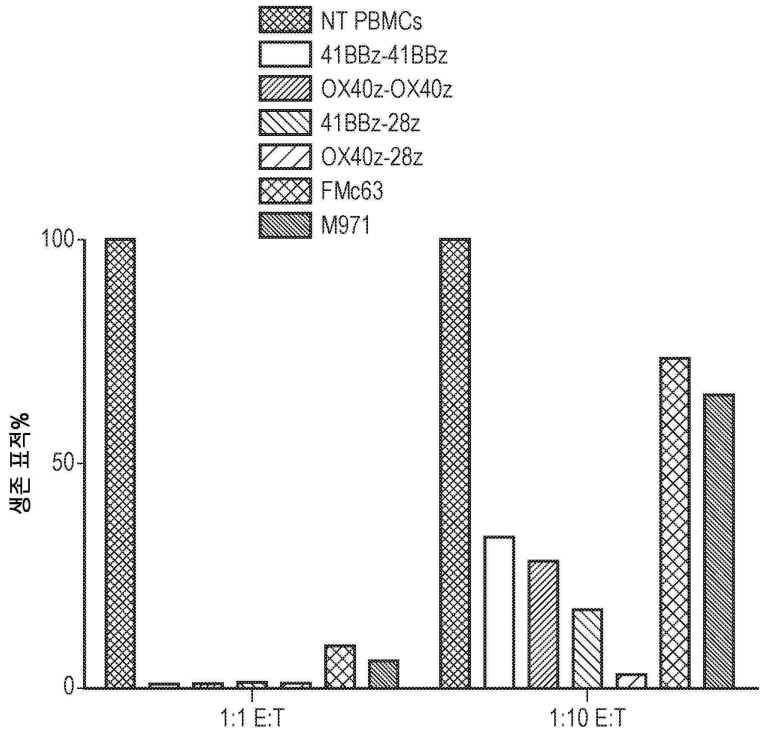
도면13c


인간 CD8a에서 유도된 신호 서열:
인간 CD8aSTK 스페이서:
마우스 IgG 카파 VIII에서 유도된 신호 서열:
인간 힌지 스페이서
인간 Tyrp-1에서 유도된 경막:
2세대 신호전달 모티프
SS
CD19ALAb
CD8STK
TM
41BB
CD3ζ
2A
SS
CD22ALAb
힌지
TM
CD28
CD3ζ
NcoI
BamHI
MluI
인간화
CD19ALAb
CD8 줄기부
TM 도메인 (tyrp-1)
41BB
CD3ζ
인간화
CD22ALAb
힌지
TM 도메인 (tyrp-1)
CD28
CD3ζ

도면13d


인간 CD8α에서 유도된 신호 서열
인간 CD8αSTK 스페이서
마우스 IgG 카파 VIII에서 유도된 신호 서열
인간 힌지 스페이서
인간 Tyrp-1에서 유도된 경막
2세대 신호전달 모티프
SS
CD19ALAb
CD8STK
TM
OX40
CD3ζ
2A
SS
CD22ALAb
힌지
TM
CD28
CD3ζ
NcoI
BamHI
MluI
인간화
CD19ALAb
CD8 줄기부
TM 도메인 (tyrp-1)
OX40
CD3ζ
인간화
CD22ALAb
힌지
TM 도메인 (tyrp-1)
CD28
CD3ζ

도면14



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> UCL Business PLC

Autolus Ltd.

<120> CELL

<130> P106469PCT

<150> GB 1423172.4

<151> 2014-12-24

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide

<400> 1

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> 2

<211> 21

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide

<400> 2

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> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide

<400> 3

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> 4

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

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> 5
<211> 46
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> spacer sequence, human CD8 stalk
<400> 5

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> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, human IgG1 hinge
<400> 6
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> 7
<211> 185
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> spacer sequence, CD2 ectodomain
<400> 7
Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
1 5 10 15
Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp

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

Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys

85 90 95

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

100 105 110

Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe

145 150 155 160

Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro

165 170 175

Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp

180 185

<210> 8

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer sequence, CD34 ectodomain

<400> 8

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

1 5 10 15

Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr

20 25 30

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

35 40 45

Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser

50 55 60

Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln

65 70 75 80

Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val

85 90 95

Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val

100 105 110

Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys

115 120 125

Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile

130 135 140

Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu

145 150 155 160

Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly

165 170 175

Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp

180 185 190

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

195 200 205

Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser

210 215 220

Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly

225 230 235 240

Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser

245 250 255

Gln Lys Thr

<210> 9

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> comprising CD28 transmembrane domain and CD3 Z endodomain

<400> 9

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 Arg Arg Val Lys Phe

20 25 30

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu

35 40 45

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

50 55 60

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

130 135 140

<210> 10

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> comprising CD28 transmembrane domain and CD28 and CD3 Zeta endodomains

<400> 10

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 Arg Ser Lys Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
85 90 95

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
100 105 110
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
115 120 125
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
130 135 140
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
145 150 155 160

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
165 170 175
Leu Pro Pro Arg
180

<210> 11
<211> 216
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> comprising CD28 transmembrane domain and CD28, OX40 and CD3 Zeta endodomains
<400> 11
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 Arg Ser Lys Arg Ser

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

Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp

85 90 95

Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile 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> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A-like sequence

<400> 12

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

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 13

<211> 3402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19/CD22 'OR' gate construct

<400> 13

atgagcctgc ccgtgaccgc cctgctgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccaga 60

ccataccct acgacgtgcc cgactacgcc agcctgagcg gaggcggcgg cagccaggtg 120

cagctggtgc agagcggagc cgaggtgaag aagcctggcg ccagcgtgaa ggtgtcctgt 180

aaggccagcg gctacacctt caccagcaac tggatgcact gggtgaggca ggcccctgga 240

cagggactgg agtggatggg cgagatcgac cccagcgaca gctacaccaa ctacaaccag 300

aagttcaagg gccgggtgac catcaccgtg gataagagcg ccagcaccgc ctacatggag 360

ctgtccagcc tgagaagcga ggataccgcc gtgtactact gtgccagagg cagcaacccc 420

tactactacg ctatggacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc cagcggcgga 480

ggaggaagcg gaggggggcgg atctggcggc ggagggagcg agatcgtgct gacccagagc 540

cccgccaccc tgagcctgag ccctggcgag agagccaccc tgtcctgtag cgccagcagc 600

ggcgtgaatt acatgcactg gtatcagcag aagcccggcc aggcccccag aagatggatc 660

tacgacacca gcaagctggc cagcggcgtg cccgccagat tcagcggcag cggctccggc 720

accagctaca gcctgaccat cagcagcctg gagcctgagg atttcgccgt gtattattgc 780

caccagaggg gcagctacac ctttggcggc ggaacaaagc tggagatcaa gcgctcagat 840

cccaccacga cgccagcgcc gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc 900

ctgtccctgc gcccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg 960

ctggacttcg cctgtgatat cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 1020

tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagagt gaagttcagc 1080

aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140

ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200

gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260

aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320

cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380

atgcaggccc tgcctcctcg cagagccgag ggcaggggaa gtcttctaac atgcggggac 1440

gtggaggaaa atcccgggcc catggagttt gggctgagct ggcttttct tgtggctatt 1500

ttaaaaggtg tccagtgcga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtccagcca 1560

gggggtccc tgcgcctctc ctgtgcagcc tctggattcg ctttcagtat ctatgacatg 1620

tcttgggtcc gccaggttcc ggggaagggg ctggagtggg tctcatatat tagtagtggt 1680

ggtggtacca cctattaccc ggacactgtg aagggccgct tcaccatctc ccgtgacaat 1740

tcccgcaaca ctctggatct tcaaatgaac agtctgcgcg tcgaggacac ggctgtctat 1800

tattgtgcgc gtcatagtgg ctacggtagt agctacgggg ttttgtttgc ttactggggc 1860
caaggaaccc tggtcaccgt ctcctcaggt ggaggcggtt caggcggagg tggctctggc 1920
ggtggcggat cggacatcca gatgactcag tctccgtcct ccctgtctgc atctgtagga 1980
gaccgcgtca ccatcacctg ccgtgcaagt caggacatta gcaattattt aaactggctt 2040
caacagaaac cggggaaagc cccgaagctc ctgatttact acacatcaat cttacactca 2100
ggagtcccgt cacgcttcag cggcagtgga tctgggacag aattcactct cacaatcagc 2160
agcctgcagc cggaagattt tgcaacttat tactgtcaac agggtaatac gcttccgtgg 2220

acgtttggcc aggggaccaa actggaaatc aaacgttcgg atccagccga accaaagagc 2280
cccgataaga cccacacctg tccccctgc ccagccccag agctgctggg aggccccagc 2340
gtgtttctgt ttccacccaa gccaaaggat accctgatga ttagtagaac acccgaagtg 2400
acctgtgtgg tggtggatgt gtctcacgag gaccccgagg tgaaatttaa ttggtatgtt 2460
gatggtgttg aagtgcacaa cgccaaaacc aaacccagag aggagcagta caattctacc 2520
tatagagtcg tgtctgtgct gacagtgctg catcaggatt ggctgaacgg aaaagaatac 2580
aaatgtaaag tgagcaataa ggccctgccc gctccaattg agaagacaat tagcaaggcc 2640

aagggccagc caagggagcc ccaggtgtat acactgccac ccagtagaga cgaactgaca 2700
aagaatcagg tgtctctgac atgtctggtg aagggatttt acccatctga tatcgccgtg 2760
gaatgggaat ctaacggcca gcccgagaat aactataaga caaccccacc agtgctggat 2820
agcgatggca gctttttct gtattctaag ctgacagtgg ataagtcccg gtggcagcag 2880
ggaaatgtgt ttagctgtag tgtcatgcat gaggccctgc acaatcacta tacccagaaa 2940
tctctgagtc tgagcccagg caagaaggac cccaagttct gggtcctggt ggtggtggga 3000
ggcgtgctgg cctgttactc tctcctggtg accgtggcct tcatcatctt ttgggtgcgc 3060

tcccgggtga agttttctcg ctctgccgat gccccagcct atcagcaggg ccagaatcag 3120
ctgtacaatg aactgaacct gggcaggcgg gaggagtacg acgtgctgga taagcggaga 3180
ggcagagacc ccgagatggg cggcaaacca cggcgcaaaa atccccagga gggactctat 3240
aacgagctgc agaaggacaa aatggccgag gcctattccg agatcggcat gaagggagag 3300
agaagacgcg gaaagggcca cgacggcctg tatcagggat tgtccaccgc tacaaaagat 3360
acatatgatg ccctgcacat gcaggccctg ccacccagat ga 3402

<210> 14

<211> 1133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19/CD22 'OR' gate construct

<400> 14

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

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
225 230 235 240
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala

245 250 255
Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Gly Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
260 265 270
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
275 280 285
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
290 295 300
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

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

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

435 440 445
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
450 455 460
Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

465 470 475 480

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe

485 490 495

Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu

500 505 510

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

515 520 525

Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu

580 585 590

Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr

595 600 605

Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

610 615 620

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser

705 710 715 720

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn
725 730 735
Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
740 745 750
Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

755 760 765
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
770 775 780
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
785 790 795 800
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
805 810 815
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

820 825 830
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
835 840 845
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
850 855 860
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
865 870 875 880
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

885 890 895
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
900 905 910
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
915 920 925
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
930 935 940
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

945 950 955 960
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

965 970 975

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

980 985 990

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

995 1000 1005

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Arg Val

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

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

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

Ala Leu Pro Pro Arg

1130

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region (CDR) variable heavy chain (VH) CDR1

<400> 15

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> VH CDR3

<400> 17

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain (VL) CDR1

<400> 18

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR2

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR3

<400> 20

Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 21

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chimeric antigen receptor (CAR), Murine CD19ALAb scFv sequence

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Leu

115 120 125

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

130 135 140

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

180 185 190

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys

195 200 205

Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp

210 215 220

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

225 230 235

<210> 22

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Humanised CD19ALAb scFv sequence - Heavy 19, Kappa 16

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Leu

115 120 125

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

130 135 140

Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Ala Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp

210 215 220

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

225 230 235

<210> 23

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Murine CD19ALAb VH sequence

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 24

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Humanised CD19ALAb VH sequence

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 25

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Murine CD19ALAb VL sequence

<400> 25

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

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

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

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Humanised CD19ALAb VL sequence, Kappa16

<400> 26

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

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

Ser Leu Gln Ala Ala Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr

85 90 95

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

100 105 110

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR1

<400> 27

Asn Tyr Trp Ile Asn

1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2

<400> 28

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

1 5 10 15

Asp

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR3

<400> 29

Asp Thr Gln Glu Arg Ser Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR1

<400> 30

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

1 5 10 15

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> VL CDR2

<400> 31

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR3

<400> 32

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 33

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Murine CD22ALAb scFv sequence

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Phe Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Leu Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly
210 215 220
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
225 230

<210> 34
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CAR, Humanised CD22ALAb scFv sequence
<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Asp Thr Gln Glu Arg Ser Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

225 230

<210> 35

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Murine CD22ALAb VH sequence

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Humanised CD22ALAb VH sequence

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

50 55 60

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

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

85 90 95

Thr Arg Asp Thr Gln Glu Arg Ser Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Murine CD22ALAb VL sequence

<400> 37

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Humanised CD22ALAb VL sequence

<400> 38

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

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

Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 39

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Humanised CD19ALAb scFv sequence - Heavy 19, Kappa 7

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Leu
115 120 125

Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr
130 135 140

Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
145 150 155 160

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile
165 170 175

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
180 185 190

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
195 200 205

Ala Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp
210 215 220

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
225 230 235

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR, Humanised CD19ALAb VL sequence, Kappa 7

<400> 40

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Ala Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr

85 90 95

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

100 105 110

<210> 41

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 co-stimulatory endodomain

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 42

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OX40 endodomain

<400> 42

Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr

20 25 30

Leu Ala Lys Ile

35

<210> 43

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4-1BB endodomain

<400> 43

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> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3zeta endodomain

<400> 44

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

<210> 45

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tyrp-1 transmembrane sequence

<400> 45

Ile Ile Ala Ile Ala Val Val Gly Ala Leu Leu Leu Val Ala Leu Ile
1 5 10 15

Phe Gly Thr Ala Ser Tyr Leu Ile
20

<210> 46

<211> 258

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu
1 5 10 15

Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp
20 25 30

Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly Leu
35 40 45

Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile
50 55 60

Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly
65 70 75 80

Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu
85 90 95

Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu
100 105 110

Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser

115 120 125

Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro

130 135 140

Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser Leu

145 150 155 160

Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu

165 170 175

Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu

180 185 190

Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser Leu

195 200 205

Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu Thr

210 215 220

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

225 230 235 240

Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr Ala

245 250 255

Arg Pro

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITAM motif

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa may be leucine or isoleucine

<400> 47

Tyr Xaa Xaa Xaa

1

<210> 48

<211> 1139

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

atcccgccga gcccaaatct cctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 60

aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga 120

tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg 180

tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 240

aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 300

ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg 360

agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 420

catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480

atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca accggagaac aactacaaga 540

ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg 600

acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcac gaggctctgc 660

acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaaaaagat cccaaatttt 720

gggtgctggt ggtggttggt ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta acagtggcct 780

ttattatttt ctgggtgagg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc 840

agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg 900

ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc 960

ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga 1020

ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca 1080

gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca ggccctgcct cctcgcgag 1139

<210> 49

<211> 1139

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> codon-wobbled HCH2CH3-CD28tmZeta

<400> 49

atccagccga accaaagagc cccgataaga cccacacctg tccccctgc ccagccccag 60

agctgctggg aggccccagc gtgtttctgt ttccacccaa gccaaaggat accctgatga 120

ttagtagaac acccgaagtg acctgtgtgg tggtggatgt gtctcacgag gaccccgagg 180

tgaaatttaa ttggtatgtt gatggtgttg aagtgcacaa cgccaaaacc aaacccagag 240

aggagcagta caattctacc tatagagtcg tgtctgtgct gacagtgctg catcaggatt 300

ggctgaacgg aaaagaatac aaatgtaaag tgagcaataa ggccctgccc gctccaattg 360

agaagacaat tagcaaggcc aagggccagc caagggagcc ccaggtgtat acactgccac 420

ccagtagaga cgaactgaca aagaatcagg tgtctctgac atgtctggtg aagggatttt 480

acccatctga tatcgccgtg gaatgggaat ctaacggcca gcccgagaat aactataaga 540

caaccccacc agtgctggat agcgatggca gctttttttct gtattctaag ctgacagtgg 600

ataagtcccg gtggcagcag ggaaatgtgt ttagctgtag tgtcatgcat gaggccctgc 660

acaatcacta tacccagaaa tctctgagtc tgagcccagg caagaaggac cccaagttct 720

gggtcctggt ggtggtggga ggcgtgctgg cctgttactc tctcctggtg accgtggcct 780

tcatcatctt ttgggtgcgc tcccgggtga agttttctcg ctctgccgat gccccagcct 840

atcagcaggg ccagaatcag ctgtacaatg aactgaacct gggcaggcgg gaggagtacg 900

acgtgctgga taagcggaga ggcagagacc ccgagatggg cggcaaacca cggcgcaaaa 960

atccccagga gggactctat aacgagctgc agaaggacaa aatggccgag gcctattccg 1020

agatcggcat gaagggagag agaagacgcg gaaagggcca cgacggcctg tatcagggat 1080

tgtccaccgc tacaaaagat acatatgatg ccctgcacat gcaggccctg ccacccaga 1139