



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월11일
 (11) 등록번호 10-1956751
 (24) 등록일자 2019년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 15/62 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
 C07K 19/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-7010498
 (22) 출원일자(국제) 2012년10월05일
 심사청구일자 2017년02월22일
 (85) 번역문제출일자 2014년04월18일
 (65) 공개번호 10-2014-0073531
 (43) 공개일자 2014년06월16일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2012/076034
 (87) 국제공개번호 WO 2013/051718
 국제공개일자 2013년04월11일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2011-222510 2011년10월07일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 The Journal of Immunology (2007)
 179:6916-6926*
 (뒷면에 계속)
 전체 청구항 수 : 총 10 항

(73) 특허권자
 고쿠리츠다이가쿠호진 미에다이가쿠
 일본 미에켄 츠시 구리마치야쵸 1577
 다카라 바이오 가부시키키가이사
 일본국 시가켄 쿠사츠시 노지히가시 7쵸메 4방 3
 8고
 (72) 발명자
 시쿠 히로시
 일본 5148507 미에켄 츠시 에도바시 2쵸메 174반
 지 고쿠리츠다이가쿠호진 미에다이가쿠 다이가쿠
 잉 이료케이 겐큐쇼나이
 오리토 유키
 일본 5148507 미에켄 츠시 에도바시 2쵸메 174반
 지 고쿠리츠다이가쿠호진 미에다이가쿠 다이가쿠
 잉 이료케이 겐큐쇼나이
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인한성

심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **키메라 항원 수용체**

(57) 요약

항원에 결합하는 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체로써, 세포내 도메인으로서 글루코코르티코이드 유도 종양괴사인자 수용체(GITR)의 세포내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 키메라 항원 수용체, 당해 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산, 당해 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포 및 당해 세포를 제조하는 방법이 제공된다.

(72) 발명자

미네노 준이치

일본 5202193 시가켄 오츠키시 세타 3-초메 4-1 다카
라 바이오 가부시키키가이샤내

오카모토 사치코

일본 5202193 시가켄 오츠키시 세타 3-초메 4-1 다카
라 바이오 가부시키키가이샤내

아마이시 야스노리

일본 5202193 시가켄 오츠키시 세타 3-초메 4-1 다카
라 바이오 가부시키키가이샤내

(56) 선행기술조사문헌

Current Opinion in Immunology (2009)
21:215-223*

US6103521 A

Cellular Immunology (2005) 235:56-64

The Journal of Immunology (2005) 174:7869-7874

European Journal of Immunology (2002)
32:3617-3627

Molecular Therapy (2013) 21(1):S240

US20060025576 A1

US20020098525 A1

W02010085660 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

항원에 결합하는 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산으로서, 세포내 도메인으로서 글루코코르티코이드 유도 종양괴사인자 수용체(GITR)의 세포내 도메인을 포함하고, 세포내 도메인으로서 추가로 CD3 ζ 세포내 도메인을 포함하며, GITR의 세포내 도메인이 CD3 ζ 세포내 도메인보다 C 말단측에 배치되는 것을 특징으로 하는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 항원이 종양항원인 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 항원에 결합하는 세포외 도메인이 항원에 결합하는 항체의 단쇄항체인 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

항원에 결합하는 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체로서, 세포내 도메인으로서 GITR의 세포내 도메인을 포함하고, 세포내 도메인으로서 추가로 CD3 ζ 세포내 도메인을 포함하며, GITR의 세포내 도메인이 CD3 ζ 세포내 도메인보다 C 말단측에 배치되는 것을 특징으로 하는 키메라 항원 수용체.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 항원이 종양항원인 키메라 항원 수용체.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 항원에 결합하는 세포외 도메인이 항원에 결합하는 항체의 단쇄항체인 키메라 항원 수용체.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재된 핵산을 단리된 세포에 도입하는 공정을 포함하는 키메라 항원 수용체 발현 세포의 제조방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 세포가 T세포 또는 T세포를 함유하는 세포집단인 키메라 항원 수용체 발현 세포의 제조방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 기재된 핵산이 도입된 단리된 키메라 항원 수용체 발현 세포.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 세포가 T세포 또는 T세포를 함유하는 세포집단인 단리된 키메라 항원 수용체 발현 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종양에 대한 양자면역 유전자치료의 분야에 있어서 유용한 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 및 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양에 대한 치료 전략으로서, 특정한 항원에 결합하는 T세포 수용체(TCR) 유전자를 임의의 T세포에 도입하는 것에 의해, 목적의 항원을 표적으로 하는 T세포를 제작하는 것을 기대할 수 있다. 이것에 의거해서, 많은 종양 항원, 예를 들면 WT1, MART1, gp100, CEA, CD19 및 mHAG HA-2 항원을 표적으로 한 TCR 유전자에 의한 양자면역 유전자치료가 시도되고 있다.

[0003] 종양에 대한 새로운 양자면역 유전자치료로서, 유전자변형 T세포요법이 주목 받고 있다. 이 치료법은 종양세포의 표면항원으로서 특이성과 T세포의 활성화능을 가지는 키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor: CAR)를 코딩하는 핵산을 T세포에 도입하고, 수득된 유전자도입 T세포를 체외에서 증식시켜서 수주하는 방법이다. 이 방법은 항체의약에 비해서 항종양 효과가 보다 강력하고, 효과도 보다 장기간 지속된다고 생각되고 있으며, 그 임상효과에 대단히 기대를 하고 있다.

[0004] 대표적인 CAR의 구조는 종양세포의 표면항원을 인식하는 단쇄항체(single chain variable fragment: scFv), 막관통 도메인과 T세포를 활성화시키는 TCR 복합체 CD3 ζ 의 세포내 도메인으로 구성된다. 이러한 구성의 CAR은 제 1 세대 CAR이라 부르고 있다. 단쇄항체 부분의 유전자는 예를 들면, 표적으로 하는 항원을 인식하는 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마로부터 단리된다. CAR을 발현하는 T세포는 종양세포 상의 주요조직 적합 항원 클래스I의 발현과는 무관하게 종양세포의 표면항원을 직접 인식하고, 동시에 T세포를 활성화함으로써, 효율적으로 종양세포를 살상하는 것이 가능하다.

[0005] 제1 세대 CAR의 T세포 활성화능을 증강시킬 목적으로, T세포의 공자극 분자인 CD28의 세포내 도메인을 연결한 제2 세대 CAR이 개발되어 있다. 새로운 개량형으로서, 추가로 종양괴사인자(TNF) 수용체 슈퍼패밀리인 CD137(4-1BB) 또는 CD134(OX40) 유래의 세포내 도메인을 탠덤으로 연결한 제3 세대 CAR도 개발되어, 다양한 종양항원을 표적으로 한 많은 CAR 분자가 보고되고 있다(비특허문헌 1). 그렇지만, 현재 보고되고 있는 제2 세대 및 제3 세대 CAR에서 세포내 도메인으로서 사용되고 있는 공자극 분자는 한정되어 있다. CAR에 연결했을 때에, T세포의 공자극 분자유래의 세포내 도메인이 한결같이 강하게 T세포를 자극해서 표적으로 하는 종양세포를 상해하는 것이 아닌 것임이 알려져 있다. 예를 들면, CD137 유래의 세포내 도메인을 연결한 제2 세대 CAR은 제1 세대 CAR과 동일정도의 세포상해활성밖에 나타내지 않는, 즉 당해 세포내 도메인은 CAR의 기능향상에 효과가 인정되지 않음이 보고되고 있다(비특허문헌 2). 따라서 CAR에 연결했을 때에 유효한 새로운 공자극 분자를 찾아내는 것이 요구되고 있었다.

[0006] T세포의 서브셋인 제어성 T세포에 있어서 발현하고 있는 유전자로서 발견된 글루코코르티코이드 유도 종양괴사인자 수용체(GITR)는 세포표면의 막관통 단백질 수용체이고, TNF 수용체 슈퍼패밀리의 일원이다(비특허문헌 3). GITR은 비활성화T세포위로 구성적으로 존재하는 것이 나타나고 있다. GITR은 GITR 리간드(이하, 'GITRL' 이라고 언급한다.)라고 불리는 별도의 막관통 단백질에 결합한다. GITR에 대한 작용성 항체는 제어성 T세포의 면역억제 활성을 해제하는 것이 나타나 있기 때문에, GITRL은 GITR을 통해서 제어성 T세포의 활성을 제어한다는 기능적인 역할을 하고 있는 것임이 시사되어 있다(비특허문헌 4 참조).

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Current Opinion in Immunology, Vol. 21, pp. 215-223 (2009)
- (비특허문헌 0002) J. Immunology, Vol. 172, pp. 104-113 (2004)
- (비특허문헌 0003) Immunol. Rev., Vol. 182, pp. 18-32 (2001)
- (비특허문헌 0004) Immunity, Vol. 16, pp. 311-323 (2002)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 표적으로 하는 항원에 특이적으로 결합하고, 표적으로 하는 세포에 대한 높은 세포상해활성을 세포에 부여하는 CAR을 코딩하는 핵산 및 당해 CAR을 발현하는 세포를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 상기의 과제를 해결하기 위해서 예의 노력한 결과, GITR의 세포내 도메인을 가지는 CAR을 발현하는 세포는 표적으로 하는 항원에 특이적으로 결합하고, 표적으로 하는 세포에 대해서 높은 세포상해활성을 가지는 것임을 발견하고, 본 발명을 완성시켰다.

[0010] 즉 본 발명을 개략적으로 설명하면 이하에 관한 것이다.

[0011] [1] 항원에 결합하는 세포의 도메인, 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 핵산으로써, 세포내 도메인으로서 GITR의 세포내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 CAR을 코딩하는 핵산.

[0012] [2] 상기 [1]에서, 항원이 종양항원인 CAR을 코딩하는 핵산.

[0013] [3] 상기 [1]에서, 항원에 결합하는 세포의 도메인이 항원에 결합하는 항체의 단쇄항체인 CAR을 코딩하는 핵산.

[0014] [4] 상기 [1]에서, 세포내 도메인으로서 추가로, CD3 ζ 세포내 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 핵산.

[0015] [5] 상기 [4]에서, GITR의 세포내 도메인이 CD3 ζ 세포내 도메인보다 C말단측에 배치되는 CAR을 코딩하는 핵산.

[0016] [6] 항원에 결합하는 세포의 도메인, 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 CAR으로써, 세포내 도메인으로서 GITR의 세포내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 CAR.

[0017] [7] 상기 [6]에서, 항원이 종양항원인 CAR.

[0018] [8] 상기 [6]에서, 항원에 결합하는 세포의 도메인이 항원에 결합하는 항체의 단쇄항체인 CAR.

[0019] [9] 상기 [6]에서, 세포내 도메인으로서 추가로, CD3 ζ 세포내 도메인을 포함하는 CAR.

[0020] [10] 상기 [9]에서, GITR의 세포내 도메인이 CD3 ζ 세포내 도메인보다 C말단측에 배치되는 CAR.

[0021] [11] 상기 [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 기재된 핵산을 세포에 도입하는 공정을 포함하는 CAR 발현세포의 제조 방법.

[0022] [12] 상기 [11]에서, 세포가 T세포 또는 T세포를 함유하는 세포집단인 CAR 발현세포의 제조방법.

[0023] [13] 상기 [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 기재된 핵산이 도입된 CAR 발현세포.

[0024] [14] 상기 [13]에서, 세포가 T세포 또는 T세포를 함유하는 세포집단인 CAR 발현세포.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 의해, 종양항원 등의 항원을 표적으로 한 양자면역 유전자치료의 분야에 있어서 유용한 키메라 항원 수용체, 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 및 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포가 제공된다. 본 발명의 키메라 항원 수용체는 도입된 세포에서의 발현량이 높고, 도입된 세포는 높은 세포상해활성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0026]

도 1은 실시예에서 사용하는 CAR의 제작순서를 나타내는 도면이다. 항CEA(carcinoembryonic antigen) 모노클로날 항체의 scFv를 「CEA-scFv」, 힌지 도메인을 「CD8 hinge」, CD28의 막관통 도메인을 「CD28 TM」, CD28의 세포내 도메인을 「CD28 ICD(Intra Cellular Domain)」, CD3 ζ 세포내 도메인을 「CD3 ζ」, 말단반복서열을 「LTR」, 스플라이스 도너서열을 「SD」, 스플라이스 억셉터 서열을 「SA」, 패키징 시그널 서열을 「ψ」으로 표시한다.

도 2는 실시예에서 사용하는 CAR의 구조를 나타내는 도면이다. 항원에 결합하는 항체의 scFv를 「scFv」, 스페이서 도메인을 「Spacer domain」, CD28의 막관통 도메인을 「CD28 TM」, CD28의 세포내 도메인을 「CD28 ICD」, GITR의 막관통 도메인을 「GITR TM」, GITR 세포내 도메인을 「GITR ICD」, CD3 ζ 세포내 도메인을 「CD3 ζ」으로 나타낸다. 본 명세서 중, 각 CDR의 구조를 (1) z, (2) 28z, (3) z28, (4) Gz, (5) zG, (6) 28Gz, (7) G28z, (8) zG28, (9) 28zG, 및 (10) z28G로 약칭해서 표시한다.

도 3은 레트로바이러스 카피수에 대한 CAR이 도입된 세포에 CEA가 결합하는 비율을 나타내는 도면이다.

도 4는 레트로바이러스 카피수에 대한 CAR이 도입된 세포에 결합하는 표지한 CEA의 형광강도를 나타내는 도면이다.

도 5는 CAR이 도입된 세포에 CEA가 결합하는 비율을 나타내는 도면이다.

도 6은 CAR이 도입된 세포에 결합하는 표지한 CEA의 형광강도를 나타내는 도면이다.

도 7은 CAR이 도입된 세포의 세포상해활성을 나타내는 도면이다.

도 8은 레트로바이러스 카피수에 대한 CAR이 도입된 세포에 CEA가 결합하는 비율을 나타내는 도면이다.

도 9은 레트로바이러스 카피수에 대한 CAR이 도입된 세포에 결합하는 표지한 CEA의 형광강도를 나타내는 도면이다.

도 10은 CAR이 도입된 세포의 세포상해활성을 나타내는 도면이다.

도11은 레트로바이러스 카피수에 대한 CAR이 도입된 세포에 CEA가 결합하는 비율을 나타내는 도면이다.

도 12는 레트로바이러스 카피수에 대한 CAR이 도입된 세포에 결합하는 표지한 CEA의 형광강도를 나타내는 도면이다.

도 13은 레트로바이러스 카피수에 대한 사이토카인 IFN γ 을 생산하는 세포의 비율을 나타내는 도면이다.

도 14는 레트로바이러스 카피수에 대한 사이토카인 IFN γ 의 생산량을 나타내는 도면이다.

도 14는 레트로바이러스 카피수에 대한 사이토카인 TNF α 를 생산하는 세포의 비율을 나타내는 도면이다.

도 16은 레트로바이러스 카피수에 대한 사이토카인 TNF α 의 생산량을 나타내는 도면이다.

도 17은 레트로바이러스 카피수에 대한 CAR이 도입된 세포에 EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)이 결합하는 비율을 나타내는 도면이다.

도 18은 레트로바이러스 카피수에 대한 CAR이 도입된 세포에 결합하는 표지한 EGFR의 형광강도를 나타내는 도면이다.

도 19는 레트로바이러스 카피수에 대한 사이토카인을 생산하는 세포의 비율을 나타내는 도면이다.

도 20은 레트로바이러스 카피수에 대한 사이토카인의 생산량을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

본 명세서에 있어서 「키메라 항원 수용체(CAR)」란 항원에 결합하는 세포외 도메인, 상기 세포외 도메인과는 다른 폴리펩티드에 유래하는 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질을 나타낸다. 「키메라 항원 수용체(CAR)」는 「키메라 수용체」, 「T-body」, 「키메라 면역 수용체(CIR)」라고 불리는 경우가 있다. 「항원에 결합하는 세포외 도메인」은 어떤 항원에 결합할 수 있는 임의의 올리고 또는 폴리펩티드를 나타내고, 「세포내 도메인」은 세포내에서 생물학적 프로세스의 활성화 또는 저해를 가져오는 시그널을 전달하는 도메인으로서 기능하는 것임이 알려져 있는 임의의 올리고 또는 폴리펩티드를 의미한다.

[0028]

본 명세서에 있어서 「종양항원」이란 세포의 암화(癌化)에 동반해서 새롭게 발현이 인정되게 되는, 항원성을

가지는 생체분자를 의미한다. 종양항원의 검출, 예를 들면, 면역학적인 검출은 암화된 세포와 그 모세포의 구별에 유용하다. 본 발명에서의 종양항원은 종양특이항원(종양세포에만 존재하고, 다른 정상세포에서는 볼 수 없는 항원), 또는 종양관련 항원(다른 장기·조직 또는 이종이계의 정상세포에도 존재하는 항원, 발생·분화의 도상에 있어서 발현하는 항원)을 포함한다.

[0029] 본 명세서에 있어서 「글루코코르티코이드 유도 종양괴사인자 수용체(GITR)」란 글루코코르티코이드 유도 종양괴사인자 수용체 패밀리에 관한 유전자(Glucocorticoid-induced TNF receptor-family related gene)의 산물인 단백질을 나타낸다. GITR은 세포표면의 막관통 단백질수용체로서, TNF 수용체(TNFR) 슈퍼패밀리의 일원이다. GITR은 비활성화 T세포 상에 구축적으로 존재하는 것임이 나타나 있고, GITR 리간드(GITRL)라고 불리는 별도의 막관통 단백질에 결합한다. GITR의 아미노산 서열은 NCBI Reference Sequence(NCBI RefSeq): NP_004186.1, Curr. Biol., 제9권, 제4호, 제215-218쪽(1999)에 기재된다.

[0030] 본 명세서에 있어서 「단쇄항체(scFv)」이란 항원과 결합능력을 지닌, 항체유래의 싱글-스트랜드 폴리펩티드를 의미한다. 예를 들면 재조합 DNA기술에 의해 형성되고, 스페이서 서열을 통해서 면역글로블린 중쇄(H쇄) 및 경쇄(L쇄) 프래그먼트의 Fv영역을 연결한 항체 폴리펩티드가 예시된다. scFv의 각종 제작방법이 공지되어 있는데, 미국특허 제4694778호; Science, 제242권, 제423-442쪽(1988); Nature, 제334권, 제54454쪽(1989); Science, 제242권, 제1038-1041쪽(1988)에 기재되어 있는 방법을 들 수 있다.

[0031] 본 명세서에 있어서 「도메인」이란 폴리펩티드 내의 1영역으로써, 다른 영역과는 독립해서 특정한 구조로 접어 지는(폴딩되는) 영역을 의미한다.

[0032] (1) 본 발명의 CAR

[0033] 본 발명의 CAR은 N말단측에서 차례로 항원에 결합하는 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하고, 세포내 도메인으로서 GITR의 세포내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 CAR은 세포에서의 발현량이 높고, 본 발명의 CAR을 발현하는 세포는 세포의 증식율, 사이토카인의 생산량이 높고, CAR이 결합하는 항원을 표면에 가지는 세포에 대해서 높은 세포상해활성을 갖는다.

[0034] (a) 세포외 도메인

[0035] 본 발명의 CAR에 사용되는 「항원에 결합하는 세포외 도메인」은 표적으로 하는 항원에 결합할 수 있는 올리고 또는 폴리펩티드를 포함하는 도메인으로서 예를 들면, 항체의 항원결합 도메인, 수용체의 리간드 결합 도메인이 포함된다. 이 도메인은 항원, 예를 들면, 세포표면에 존재하는 항원과 결합하고, 상호작용하는 것에 의해 CAR을 발현하는 세포에 특이성을 부여한다. 본 발명에 있어서 특히 유용한 세포외 도메인으로서 항체(H쇄 및 L쇄), TCR의 가변영역(TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ), CD8 α , CD8 β , CD11A, CD11B, CD11C, CD18, CD29, CD49A, CD49B, CD49D, CD49E, CD49F, CD61, CD41, 또는 CD51에 유래하는 것이 예시된다. 이것들의 단백질 전체를 사용하는 것이 유효한 경우도 있지만, 특히 항원이나 리간드에 결합하는 도메인, 예를 들면, 항체 Fab 프래그먼트, 항체가변영역[H쇄의 V영역(VH) 및 L쇄의 V영역(VL)] 또는 수용체의 세포외 도메인을 사용할 수 있다. 특히 scFv를 효과적으로 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명의 CAR의 세포외 도메인은 1종류의 항원 또는 리간드에만 결합하는 것일 수도 있고, 2종 이상의 항원 또는 리간드에 결합하는 세포외 도메인일 수도 있다. 본 발명에는, 하나의 세포외 도메인을 포함하는 CAR 및 2개 이상의 세포외 도메인을 포함하는 CAR의 어느 것이나 포함된다.

[0037] 세포외 도메인은 표적으로 하는 항원을 인식하는 항체 또는 상기 항원과 상호작용하는 분자로부터 선택할 수 있다. 이 항원은 예를 들면, 바이러스항원, 세균(특히 감염성 세균)항원, 기생충항원, 특정한 병상에 관계된 표적 세포 상의 세포표면 마커(예를 들면 종양항원)이나 면역 관련 세포의 표면분자를 포함한다.

[0038] 본 발명의 하나의 형태로서, 예를 들면, 레트로바이러스과(retroviridae, 예를 들면, HIV-1 및 HIV-LP와 같은, 인간 면역부전 바이러스), 피코루나바이러스과(Picornaviridae, 예를 들면, 폴리오바이러스, A형 간염 바이러스, 엔테로바이러스, 인간 콕사키바이러스, 라이노바이러스, 에코바이러스), 풍진바이러스, 코로나바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스, 에볼라 바이러스, 과라인플루엔자 바이러스, 뎀프스바이러스, 홍역바이러스, 호흡기합포체 바이러스, 인플루엔자 바이러스, B형 간염 바이러스, 파보바이러스, 아데노위르스과(Adenoviridae), 포진바이러스과(Herpesviridae, 예를 들면, 1형 및 2형의 단순포진 바이러스(HSV), 수두대상포진 바이러스, 시토크갈로바이러스(CMV), 헤르페스바이러스), 폭스바이러스과(Poxviridae, 예를 들면, 천연두 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스), C형 간염 바이러스에 유래하는 항원에 결합하는 CAR이 제공된

다.

- [0039] 본 발명의 다른 형태로서, 포도상구균속(*Staphylococci*)의 균종, 연쇄구균속(*Streptococcus*)의 균종, 대장균(*Escherichia coli*)의 균종, 슈우도모나드속(*Pseudomonas*)의 균종 및 살모넬라속(*Salmonella*)의 균종에 유래하는 항원에 결합하는 CAR이 포함된다. 특히, 감염성 세균, 예를 들면, 헬리코박터피로리(*Helicobacter pyloris*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophilia*), 마이코박테리움속(*Mycobacteriasps*)의 균종(예를 들면, *M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansaii*, *M.gordonea*), 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 임균(*Neisseria gonorrhoeae*), 수막염균(*Neisseria meningitidis*), 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*), 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*), A군 연쇄구균, B군 연쇄구균(*Streptococcus agalactiae*), 폐렴연쇄 구균(*Streptococcus pneumoniae*), 과상풍균(*Clostridiumtetani*)에 유래하는 항원에 결합하는 CAR이 제공된다.
- [0040] 본 발명의 다른 형태로서, 5T4, 알파 5β1-인테그린, 707-AP, AFP, ART-4, B7H4, BAGE, β-카테닌/m, Bcr-ab1, MN/CIX 항원, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CDC27/m, CD30, CD33, CD52, CD56, CD80, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, EGFR, ErbB3, ELF2M, EMMPRIN, EpCam, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/new, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT(또는 hTRT), iCE, IGF-1R, IL-2R, IL-5, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/melan-A, MART-2/Ski, MC1R, 미오신/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, PAP, 프로테이나제-3, p190 마이너 bcr-ab1, Pml/RARα, PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RU1 또는 RU2, SAGE, SART-1 또는 SART-3, 서바이빈, TEL/AML1, TGFβ, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, VEGF, WT1, NY-Eso-1 또는 NY-Eso-B 등의 종양항원에 결합하는 CAR이 제공된다. 또, 세포표면 접착 분자, 자기면역질환에 있어서 출현하는 염증세포의 표면분자, 및 자기면역을 일으키는 TCR에 결합하는 CAR도 제공된다.
- [0041] (b) 세포내 도메인
- [0042] 본 발명에 사용되는 세포내 도메인은 동일분자 내에 존재하는 세포의 도메인이 항원과 결합(상호작용)했을 때에, 세포내에 시그널을 전달하는 것이 가능한 분자이다.
- [0043] 본 발명의 CAR은 세포내 도메인으로서 GITR의 세포내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다. GITR의 세포내 도메인은 동일한 기능을 가지는 그 변이체를 포함한다. 용어 「변이체」는 1개 또는 수 개~복수 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함하는 임의의 변이체를 의미하지만, 단, 해당 변이체는 원래의 서열이 지니고 있었던 것과 동일한 기능을 실질적으로 지닌다. 예를 들면, 본 발명에 사용하는 GITR의 세포내 도메인은 GITR(NCBI RefSeq: NP_004186.1)의 아미노산번호 193~241(서열번호 28)을 포함하는 세포내 도메인이 예시된다.
- [0044] 본 발명의 CAR는 GITR의 세포내 도메인에 부가해서 다른 폴리펩티드에 유래하는 세포내 도메인을 사용할 수 있다. 이러한 세포내 도메인은 TCR 복합체 및 공자극 분자에 유래하는 세포질 서열, 및 그것들의 서열의 동일한 기능을 가지는 임의의 변이체가 포함된다.
- [0045] TCR 복합체만을 통해서 발생된 시그널은 T세포의 활성화에 불충분한 것, 및 2차 또는 공자극 시그널도 필요하다는 것이 알려져 있다. 천연의 T세포 활성화는 2개의 서로 다른 종류의 세포질 시그널 전달서열, 즉 TCR 복합체를 통해서 항원 의존적 1차 활성화를 개시시키는 서열(1차 세포질 시그널 전달서열) 및 항원 비의존적으로 작용해서 2차 또는 공자극 시그널을 제공하는 서열(2차 세포질 시그널 전달서열)에 의해 전달되고 있다. 호적한 형태에 있어서, 본 발명의 CAR은 세포내 도메인으로서, 상기 1차 세포질 시그널 전달서열 및/또는 2차 세포질 시그널 전달서열을 포함한다.
- [0046] 1차 세포질 시그널 전달서열은 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절한다. 활성화를 자극하는 1차 세포질 시그널 전달서열은 면역 수용체 타이로신 베이스 활성화 모티브(ITAM)로서 알려지는 시그널전달 모티브를 포함하는 경우가 있다[Nature, 제338권, 제383-384쪽(1989)]. 한편, 억제적으로 작용하는 1차 세포질 시그널 전달서열은 면역 수용체 타이로신 베이스 억제 모티브(ITIM)로서 알려지는 시그널전달 모티브를 포함한다[J Immunol., 제162권, 제2호, 제897-902쪽(1999)]. 본 발명에는 ITAM 또는 ITIM을 가지는 세포내 도메인을 사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 사용할 수 있는 ITAM을 가지는 세포내 도메인은 예를 들면, CD3 ζ, FcR γ, FcR β, CD3 γ, CD3 δ, CD3 ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d에 유래하는 ITAM을 포함한다. 구체적으로는 CD3 ζ (NCBI RefSeq: NP_932170.1)의 아미노산번호 51~164(서열번호 26), Fc ε RI γ (NCBI RefSeq: NP_004097.1)의 아미노산번호 45~86, Fc ε RI β (NCBI RefSeq: NP_000130.1)의 아미노산번호 201~244, CD3 γ (NCBI RefSeq: NP_000064.1)의 아미노산번호 139~182, CD3 δ (NCBI RefSeq: NP_000723.1)의 아미노산번호 128~171, CD3 ε (NCBI RefSeq:

NP_000724.1)의 아미노산번호 153~207, CD5(NCBI RefSeq: NP_055022.2)의 아미노산번호 402~495, CD22(NCBI RefSeq: NP_001762.2)의 아미노산번호 707~847, CD79a(NCBI RefSeq: NP_001774.1)의 아미노산번호 166~226, CD79b(NCBI RefSeq: NP_000617.1)의 아미노산번호 182~229, CD66d(NCBI RefSeq: NP_001806.2)의 아미노산번호 177~252의 서열을 가지는 펩티드 및 이것들로 동일한 기능을 가지는 그 변이체를 들 수 있다. 또, 본 명세서에 기재하는 NCBI RefSeq ID나 GenBank의 아미노산 서열정보에 의거하는 아미노산번호는 각 단백질의 전구체(시그널 펩티드 서열 등을 포함한다)를 전장으로 해서 붙여진 번호이다.

[0048] 본 발명에서 사용할 수 있는 2차 세포질 시그널 전달서열을 포함하는 세포내 도메인에는 예를 들면, CD2, CD4, CD5, CD8 α, CD8 β, CD28, CD134, CD137, ICOS, 및 CD154에 유래하는 서열이 포함된다. 구체적으로는 CD2(NCBI RefSeq: NP_001758.2)의 아미노산번호 236~351, CD4(NCBI RefSeq: NP_000607.1)의 아미노산번호 421~458, CD5(NCBI RefSeq: NP_055022.2)의 아미노산번호 402~495, CD8 α(NCBI RefSeq: NP_001759.3)의 아미노산번호 207~235, CD8 β(GenBank:AAA35664.1)의 아미노산번호 196~210, CD28(NCBI RefSeq: NP_006130.1)의 아미노산번호 181~220(서열번호25), CD137(4-1BB, NCBI RefSeq: NP_001552.2)의 아미노산번호 214~255, CD134(OX40, NCBI RefSeq: NP_003318.1)의 아미노산번호 241~277, ICOS(NCBI RefSeq: NP_036224.1)의 아미노산번호 166~199의 서열을 가지는 펩티드 및 이것들로 동일한 기능을 가지는 그 변이체를 들 수 있다.

[0049] 본 발명은 세포내 도메인으로서 GITR의 세포내 도메인만을 포함하는 CAR, GITR의 세포내 도메인의 이외에 하나 또는 복수, 예를 들면, 2개 또는 3개의 세포내 도메인을 포함하는 CAR을 포함한다. 특히 적합하게는, 세포내 도메인으로서 GITR의 세포내 도메인 및 CD3 ζ의 세포내 도메인을 포함하는 CAR, GITR의 세포내 도메인, CD3 ζ의 세포내 도메인 및 CD28의 세포내 도메인을 포함하는 CAR이 예시된다. 동일종류의 세포내 도메인을 복수 개 탠덤으로 연결한 CAR도 본 발명에 포함된다. 본 발명의 1형태는 GITR의 세포내 도메인이 CD3 ζ의 세포내 도메인보다 C말단측에 배치되는 CAR이다. 즉, N말단측에서 CD3 ζ의 세포내 도메인, GITR의 세포내 도메인의 순으로 연결된 세포내 도메인을 포함하는 CAR이다. 이 CAR에 추가로 CD28의 세포내 도메인을 추가하고, N말단측에서 CD28의 세포내 도메인, CD3 ζ의 세포내 도메인, GITR의 세포내 도메인의 순으로 연결된 세포내 도메인을 포함하는 CAR, N말단측에서 차례로 CD3 ζ의 세포내 도메인, GITR의 세포내 도메인, CD28의 세포내 도메인의 순으로 연결된 세포내 도메인을 포함하는 CAR도 본 발명에 포함된다. 본 발명의 다른 형태로서 GITR의 세포내 도메인이 C말단측에 배치되는 CAR도 본 발명에 포함된다.

[0050] 복수의 세포내 도메인을 포함하는 CAR은 그것들의 세포내 도메인 사이에 올리고펩티드 링커 또는 폴리펩티드 링커를 삽입해서 연결할 수 있다. 바람직하게는 길이가 2~10개의 아미노산으로 이루어지는 링커를 사용할 수 있다. 특히 글리신-세린 연속서열을 가지는 링커를 사용할 수 있다.

[0051] (c) 막관통 도메인 및 스페이서 도메인

[0052] 본 발명의 CAR은 막관통 도메인을 포함한다. 막관통 도메인은 천연의 폴리펩티드에 유래하는 것일 수도 있고, 인위적으로 설계한 것일 수도 있다. 천연의 폴리펩티드 유래의 막관통 도메인은 임의의 막결합 또는 막관통 단백질로부터 취득할 수 있다. 예를 들면, T세포 수용체의 α, β쇄, CD3 ζ쇄, CD28, CD3 ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR의 막관통 도메인을 사용할 수 있다. 또, 인위적으로 설계된 막관통 도메인은 로이신 및 발린 등의 소수성 잔기를 주로 포함하는 폴리펩티드이다. 또, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛이 합성 막관통 도메인의 각 말단에 발견되는 것이 바람직하다. 경우에 따라서, 짧은 올리고펩티드 링커 또는 폴리펩티드 링커, 예를 들면 길이가 2~10개의 아미노산 서열로 이루어지는 링커를, 막관통 도메인과 상기 (b)의 세포내 도메인 사이에 배치할 수 있다. 특히 글리신-세린 연속서열을 가지는 링커서열을 사용할 수 있다.

[0053] 본 발명의 1형태로서, 막관통 도메인은 CD28(NCBI RefSeq: NP_006130.1)의 아미노산번호 153~180(서열번호 24)의 서열을 가지는 막관통 도메인을 사용할 수 있다. 또 다른의 형태로서, GITR(NCBI RefSeq: NP_004186.1)의 아미노산번호 162~183(서열번호 27)의 서열을 가지는 막관통 도메인을 사용할 수 있다.

[0054] 본 발명의 CAR은 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이, 또는 세포내 도메인과 막관통 도메인 사이에, 스페이서 도메인을 배치할 수 있다. 스페이서 도메인은 막관통 도메인과 세포외 도메인 및/또는 막관통 도메인과 세포내 도메인을 연결하는 작용을 하는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 스페이서 도메인은 300개까지의 아미노산, 바람직하게는 10~100개의 아미노산, 가장 바람직하게는 25~50개의 아미노산을 포함한다.

[0055] 스페이서 도메인은 CAR와 항원의 결합을 촉진하고, 세포내로의 시그널전달을 향진하는 서열인 것이 바람직하다. 결합을 촉진한다고 예상되는 아미노산은 시스테인, 하진 아미노산 또는 잠재적인 글리코실화 부위내의 세린 또

는 트레오닌 등의 아미노산이 예시되고, 스페이스 도메인을 구성하는 아미노산으로서 사용할 수 있다.

- [0056] 스페이스 도메인은 CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3)의 힌지 영역인 아미노산번호 118~178(서열번호 23), CD8 β (GenBank: AAA35664.1)의 아미노산번호 135~195, CD4(NCBI RefSeq: NP_000607.1)의 아미노산번호 315~396, 또는 CD28(NCBI RefSeq: NP_006130.1)의 아미노산번호 137~152의 전부 또는 일부분을 사용할 수 있다. 또, 스페이스 도메인은 항체H쇄 또는 L쇄의 정상영역의 일부(CH1영역 또는 CL영역, 예를 들면 서열번호 34에 기재되는 아미노산 서열을 가지는 펩티드)도 사용할 수 있다. 추가로, 인공적으로 합성한 서열일 수도 있다.
- [0057] 본 발명의 CAR은 다량체, 특히 2량체가 되도록 설계할 수 있다. 예를 들면, 스페이스 도메인 및/또는 막관통 도메인에 시스테인을 삽입하는 것에 의해, CAR이 다량체화(2량체화) 된다.
- [0058] 또, 본 발명의 CAR은 N말단에 시그널 펩티드 서열을 연결할 수 있다. 시그널 펩티드 서열은 많은 분비 단백질, 막 단백질의 N말단에 존재하고, 15~30아미노산의 길이를 갖는다. 세포내 도메인으로서 상기에 예시한 단백질 분자의 대부분은 시그널 펩티드 서열을 가지고 있기 때문에, 이것들의 시그널 펩티드를 본 발명의 CAR의 시그널 펩티드로서 사용할 수 있다.
- [0059] (2) CAR을 코딩하는 핵산
- [0060] 본 발명은 상기 (1)에 기재하는 CAR을 코딩하는 핵산을 제공한다. CAR을 코딩하는 핵산은 특정된 CAR의 아미노산 서열로부터 통상의 방법에 의해 용이하게 제작할 수 있다. 상기에 기재한 각 도메인의 아미노산 서열을 나타내는 NCBI RefSeq ID나 GenBank의 Accession 번호로부터 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 취득하는 것이 가능하고, 표준적인 분자생물학적 및/또는 화학적 순서를 사용해서 본 발명의 핵산을 제작할 수 있다. 예를 들면, 이들 염기서열을 바탕으로 핵산을 합성할 수 있고, 또, cDNA 라이브러리로부터 폴리머라아제 연쇄반응(PCR)을 사용해서 수득되는 DNA단편을 조합시켜서 본 발명의 핵산을 제작할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 핵산은 적당한 프로모터의 제어 하에 발현되도록 다른 핵산과 연결할 수 있다. 프로모터로서는 구성적으로 발현을 촉진하는 것, 약제 등(예를 들면, 테트라사이클린 또는 독소루비신)에 의해 유도되는 것 등의 어느 것이나 사용할 수 있다. 또, 핵산의 효율이 좋은 전사를 달성하기 위해서, 프로모터 또는 전사 개시부위와 협동하는 다른 조절요소, 예를 들면, 인핸서 서열 또는 터미네이터 서열을 포함하는 핵산을 연결할 수도 있다. 또, 추가로 본 발명의 핵산에 부가해서, 당해 핵산의 발현을 확인하기 위한 마커가 될 수 있는 유전자(예를 들면, 약제내성 유전자, 리포터 효소를 코딩하는 유전자, 또는 형광 단백질을 코딩하는 유전자 등)을 통합할 수도 있다.
- [0062] 본 발명은 본 발명의 핵산을 활성성분으로서, 약학적으로 허용할 수 있는 부형제와 함께 포함하는 조성물을 제공한다. 적합한 약학적으로 허용할 수 있는 부형제는 당업자에게는 잘 알려져 있으며, 예를 들면, 인산완충 생리식염수(예를 들면, 0.01M 인산염, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH7.4), 염산염, 브롬화 수소산염, 인산염, 황산염 등의 무기산염을 함유하는 수용액, 생리식염액, 글리콜 또는 에탄올 등의 용액 및 아세트산염, 프로피온산염, 말론산염, 벤조산염 등의 유기산의 염을 포함한다. 습윤제 또는 유화제 등의 보조제, 및 pH완충제도 사용할 수 있다. 약학적으로 허용할 수 있는 부형제로서는 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub. Co., N. J. 1991)(출전명시에 의해 본 명세서의 일부로 한다.)에 기재되는 것을 적당하게 사용할 수 있다. 조성물은 비경구 투여, 예를 들면, 주사 또는 주입에 적합한 공지의 형태로 할 수 있다. 추가로 현탁화제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제 등의 제제 보조제, 보존 중의 유효기한을 연장시키기 위해서 보존제를 사용할 수 있다. 조성물은 사용 전에 적절한 무균의 액체에 의해 재구성하기 위한 건조형태일 수도 있다. 미립자 중개 투여용에는 현미경 사이즈의 금입자 등의 입자 상에 DNA를 코딩할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 핵산을 생체외에서 세포에 도입하는 경우에는, 본 발명의 핵산은 상기의 부형제에 첨가해서 세포로의 핵산의 이행을 촉진하는 물질, 예를 들면 리포솜, 양이온성 지질(Cationic lipid)과 같은 핵산도입용 시약과 조합시킬 수도 있다. 또, 후술하는 같이 본 발명의 핵산을 지니는 벡터도 유용하다. 특히, 적절한 벡터에 유지된 본 발명의 핵산을 함유하는, 생체로의 투여에 적합한 형태의 조성물은 in vivo 유전자치료에 호적하다.
- [0064] 본 발명의 핵산을 활성성분으로 포함하는 조성물은 그 핵산이 코딩하는 CAR이 결합하는 항원에도 따르지만, 예를 들면, 암[혈액암(백혈병), 고형종양 등], 염증성 질환/자기면역질환(천식, 습진), 감염이나, 인플루엔자, HIV등의 바이러스, 세균, 진균이 원인이 되는 감염성 질환, 예를 들면, 결핵, MRSA, VRE, 심재성 진균증 등의 질환의 치료를 위해서 투여할 수 있다. 본 발명의 핵산을 활성성분으로 포함하는 조성물은 한정하는 것은 아니지만, 비경구 투여, 예를 들면, 주사 또는 주입에 의해, 피내, 근육내, 피하, 복강내, 비강내, 동맥내, 정맥내, 종양내, 또는 수입 림프관내 등에 투여할 수 있다.

- [0065] (3) CAR을 발현하는 세포의 제조방법
- [0066] 본 발명의 CAR을 발현하는 세포의 제조방법은 상기 (2)에 기재하는 CAR을 코딩하는 핵산을 세포에 도입하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다. 공정은 생체외(ex vivo)에서 실시된다. 예를 들면, 본 발명의 핵산을 포함하는 바이러스 벡터 또는 비바이러스 벡터를 이용하고, 세포를 생체외에서 형질전환 하는 것에 의해 제조할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 방법은 포유동물, 예를 들면, 인간 유래의 세포 또는 원숭이, 마우스, 랫트, 돼지, 소, 개 등의 비인간 포유 동물유래의 세포를 사용할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 세포에 특별하게 한정되지 않고, 임의의 세포를 사용할 수 있다. 예를 들면, 혈액(말초혈, 체대혈 등), 골수 등의 체액, 조직 또는 기관에서 채취, 단리, 정제, 유도된 세포를 사용할 수 있다. 말초혈 단핵세포(PBMC), 면역세포[수지상 세포, B세포, 조혈간세포, 마크로파지, 단구, NK세포 또는 혈구계 세포(호중구, 호염기공)], 체대혈 단핵구, 섬유아세포, 전구지방세포, 간세포, 피부 각화세포, 중간엽계 줄기세포, 지방 줄기세포, 각종 암 세포주 또는 신경 줄기세포를 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서는, 특히 T세포, T세포의 전구세포(조혈간세포, 림프구전구세포 등) 또는 이것들을 함유하는 세포집단의 사용이 바람직하다. T세포에는 CD8 양성 T세포, CD4 양성 T세포, 제어성 T세포, 세포상해성 T세포, 또는 중앙집음 림프구가 포함된다. T세포 및 T세포의 전구세포를 함유하는 세포집단에는 PBMC가 포함된다. 상기의 세포는 생체에서 채취된 것, 그것을 확대 배양한 것, 또는 세포주로서 수립된 것의 어느 것이더라도 좋다. 제조된 CAR을 발현하는 세포 또는 당해 세포에서 분화시킨 세포를 생체에 이식하는 것이 소망되는 경우에는, 그 생체자신 또는 동종의 생체로부터 채취된 세포에 핵산을 도입하는 것이 바람직하다.
- [0068] 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산을 벡터에 삽입하고, 이 벡터를 세포에 도입할 수 있다. 예를 들면, 레트로바이러스 벡터(온코레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 슈도타입 벡터를 포함한다.), 아데노바이러스 벡터, 아데노수반바이러스(AAV) 벡터, 시미안바이러스 벡터, 백시니아바이러스 벡터 또는 쉐다바이러스 벡터, 엡스타인-바 바이러스(EBV)벡터, HSV벡터 등의 바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 상기 바이러스 벡터로서는 감염한 세포 중에서 자기복제할 수 없도록 복제능을 결손시킨 것이 호적하다.
- [0069] 또, 리포솜 및 국제공개 제96/10038호 팸플릿, 국제공개 제97/18185호 팸플릿, 국제공개 제97/25329호 팸플릿, 국제공개 제97/30170호 팸플릿 및 국제공개 제97/31934호 팸플릿(모두, 출원명시에 의해 본 명세서의 일부로 하달.)에 기재되어 있는 양이온 지질 등의 축합제와의 병용에 의해, 비바이러스 벡터도 본 발명에 사용할 수 있다. 추가로 인산 칼슘 형질입, DEAE-텍스트란, 일렉트로포레이션, 유전자총에 의해 세포에 본 발명의 핵산을 도입할 수 있다.
- [0070] 예를 들면, 레트로바이러스 벡터를 사용하는 경우, 벡터가 가지고 있는 LTR서열 및 패키징 시그널 서열에 의거해서 적절한 패키징 세포를 선택하고, 이것을 사용해서 레트로바이러스 입자를 조제해서 실시할 수 있다. 예를 들면, PG13(ATCC CRL-10686), PA317(ATCC CRL-9078), GP+E-86이나 GP+envAm-12(미국특허 제5, 278, 056호), Psi-Crip[미국과학 아카데미 정기 간행물, 제85권, 제6460-6464쪽(1988)]의 패키징 세포가 예시된다. 또, 트랜스펙션 효율이 높은 293 세포나 293T 세포를 사용해서 레트로바이러스 입자를 제작할 수도 있다. 많은 종류의 레트로바이러스를 기초로 제조된 레트로바이러스 벡터 및 당해 벡터의 패키징에 사용 가능한 패키징 세포는 각사에서 널리 시판되고 있다.
- [0071] 핵산을 세포에 도입하는 공정에서, 도입효율을 향상시키는 기능성 물질을 사용할 수도 있다[예를 들면, 국제공개 제95/26200호 팸플릿, 국제공개 제00/01836호 팸플릿(모두, 출원명시에 의해 본 명세서의 일부로 한다.)]. 도입효율을 향상시키는 물질로서는 바이러스 벡터에 결합하는 활성을 가지는 물질, 예를 들면, 피브로넥틴 또는 피브로넥틴 프래그먼트 등의 물질을 들 수 있다. 적합하게는, 헤파린 결합부위를 가지는 피브로넥틴 프래그먼트, 예를 들면 레트로넥틴(RetroNectin, 등록상표, CH-296, TAKARA BIO INC.)으로 시판되고 있는 프래그먼트를 사용할 수 있다. 또, 레트로바이러스의 세포에의 감염 효율을 향상시키는 작용을 가지는 합성 폴리양이온인 폴리브렌, 섬유아세포 증식인자, V형 콜라겐, 폴리리신 또는 DEAE-텍스트란을 사용할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 호적한 형태에 있어서, 상기의 기능성 물질은 적절한 고상, 예를 들면 세포배양에 사용되는 용기(플레이트, 배양접시, 플라스크 또는 백 등) 또는 담체(마이크로비즈 등)에 고정화된 상태로 사용할 수 있다.
- [0073] (4) CAR을 발현하는 세포
- [0074] 본 발명의 CAR을 발현하는 세포는 상기(3)의 제조방법에 의해, 상기 (2)의 CAR을 코딩하는 핵산이 도입·발현된 세포이다.

[0075] 본 발명의 세포는 CAR을 통해서 특정한 항원과의 결합에 의해 세포내에 시그널이 전달되고, 활성화된다. CAR을 발현하는 세포의 활성화는 숙주세포의 종류나 CAR의 세포내 도메인에 따라 다르지만, 예를 들면, 사이토카인의 방출, 세포증식율의 향상, 세포표면분자의 변화 등을 지표로 해서 확인할 수 있다. 예를 들면, 활성화된 세포로부터의 세포상해성의 사이토카인(종양괴사인자, 림프호트키신 등)의 방출은 항원을 발현하는 표적세포의 파괴를 초래한다. 또, 사이토카인 방출이나 세포표면분자의 변화에 의해, 다른 면역세포, 예를 들면, B세포, 수지상 세포, NK세포, 마크로파지 등을 자극한다.

[0076] CAR을 발현하는 세포는 질환의 치료제로 사용할 수 있다. 그 치료제는 CAR을 발현하는 세포를 활성성분으로 포함하고, 추가로, 적당한 부형제를 포함할 수도 있다. 그 부형제로서는 예를 들면, 본 발명의 핵산을 활성성분으로 포함하는 조성물에 대해서 기재된 상기한 약학적으로 허용할 수 있는 부형제, 여러 세포 배양배지, 등장식염수 등을 들 수 있다. CAR을 발현하는 세포가 투여되는 질환으로서의 당해 세포에 감수성을 나타내는 질환일 수 있으며, 특별하게 한정은 없지만, 예를 들면, 암[혈액암(백혈병), 고형종양 등], 염증성 질환/자기면역질환(천식, 습진), 간염이나, 인플루엔자, HIV등의 바이러스, 세균, 진균이 원인이 되는 감염성 질환, 예를 들면 결핵, MRSA, VRE, 심재성 진균증이 예시된다. 상기의 질환에 있어서 감소 혹은 소실이 소망되는 세포가 가지고 있는 항원, 즉 종양항원, 바이러스항원, 세균항원 등에 결합하는 본 발명의 CAR을 발현하는 세포가 이것들 질환의 치료를 위해서 투여된다. 또, 본 발명의 세포는 골수이식이나 방사선 조사후의 감염증 예방, 재발 백혈병의 관해를 목적으로 한 도너 림프구 수주 등에도 이용할 수 있다. CAR을 발현하는 세포를 활성성분으로 포함하는 치료제는 한정하나 것은 아니지만, 비경구 투여, 예를 들면, 주사 또는 주입에 의해, 피내, 근육내, 피하, 복강내, 비강내, 동맥내, 정맥내, 종양내, 또는 수입 림프관내 등에 투여할 수 있다.

[0077] **실시예**

[0078] 이하에 실시예를 들어서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0079] 또, 본 명세서에 기재된 조작 중, 기본적인 조작에 대해서는 2001년, Cold Spring Harbor Laboratory 발행, T. Maniatis et al, 편집, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. (출판명시에 의해 본 명세서의 일부로 한다)에 기재된 방법에 따랐다.

[0080] **실시예 1: 항CEA-CAR 발현벡터의 제작**

[0081] 우선, pMSCVneo(Clontech사)을 주형으로 서열번호 1에 기재된 3MSCV5 프라이머 및 서열번호 2에 기재된 3MSCV3 프라이머로 PCR를 실시하고, MSCV3' LTR 부위를 증폭했다. 수득된 증폭단편을 제한효소 XhoI와 EcoRI로 절단하고, pM 벡터[Gene Therapy, 제7권, 제797-804쪽(2000)에 기재되어 있는 pM 벡터]의 XhoI-EcoRI 사이트에 클로닝하고, pMS-MC를 제작했다. 추가로, pMEI-5 벡터(TAKARA BIO INC.)를 제한효소 MluI와 XhoI로 절단하고, pMS-MC의 MluI-XhoI 사이트에 삽입하고, pMS3-MC를 제작했다. pMS3-MC는 5' 말단으로부터 차례로 MMLV 유래의 5'LTR, MMLV 유래의 SD, MMLV 유래의 ψ, 인간 EF1α 유전자 유래의 SA, U3영역은 MSCV 유래이고, 나머지의 영역은 MMLV 유래의 3'LTR을 포함한다.

[0082] 도 1A, B에 나타나 있는 바와 같이 서열번호 3에 나타내는 염기서열의 인공합성 유전자(도 1A 중, 항CEA-28z-CAR라고 표기한다.) 및, 서열번호 4에 나타내는 염기서열의 인공합성 유전자(도 1B 중, 항CEA-z28-CAR라고 표기한다.)를 제작했다. 이것들의 인공합성 유전자는 암 항원 CEA(carcinoembryonic antigen)와 결합하는 항CEA 모노클로날 항체의 scFv(아미노산 서열을 서열번호 22에 기재한다.), 서열번호 23에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 CD8α쇄 힌지 도메인, 서열번호 24에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 CD28 막관통 도메인, 서열번호 25에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 CD28 세포내 도메인, 서열번호 26에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 CD3 ζ 세포내 도메인으로 이루어지는 1분자의 키메라 단백질을 코딩한다. 도 1에 있어서, 항CEA 모노클로날 항체의 scFv를 「CEA-scFv」, 힌지 도메인을 「CD8 hinge」, 막관통 도메인을 「CD28 TM」, CD28의 세포내 도메인을 「CD28 ICD(IntraCellular Domain)」, CD3 ζ 세포내 도메인을 「CD3 ζ」, 말단반복서열을 「LTR」, 스플라이스 도너 서열을 「SD」, 스플라이스 억셉터 서열을 「SA」, 패키징 시그널 서열을 「ψ」라고 표시한다. 이것들의 인공합성 유전자를 포함하는 핵산단편을 BglII-BamHI로 소화한 pMS3-MC 벡터에 클로닝하고, CD28 세포내 도메인이 CD3 ζ 세포내 도메인에 대해서 N말단측에 배치되는 CAR을 발현하는 pMS3-CEA-28z-CAR 벡터를 제작했다. 반대로, CD3 ζ 세포내 도메인이 CD28 세포내 도메인에 대해서 N말단측에 배치되는 CAR을 발현하는 pMS3-CEA-z28-CAR

벡터를 제작했다.

[0083] 실시예 2: GTR 유전자를 탑재한 CAR 발현벡터의 제작

[0084] 서열번호 5에 나타내는 인공합성 유전자를 제작했다. 이 인공합성 유전자는 서열번호 27에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 GTR 막관통 도메인 및 서열번호 28에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 GTR 세포내 도메인을 코딩한다. 이 인공합성 유전자를 주형으로 하고, 서열번호 6에 나타내는 28TM-G-F 프라이머와 서열번호 7에 나타내는 G-z-R프라이머를 사용한 PCR를 실시해서 증폭 DNA단편 A를, 서열번호 8에 나타내는 z-G-F프라이머와 서열번호 9에 나타내는 G-MC-R 프라이머를 사용한 PCR를 실시해서 증폭 DNA단편 B를, 서열번호 10에 나타내는 28SD-G-F 프라이머와 서열번호 7에 나타내는 G-z-R 프라이머를 사용한 PCR를 실시해서 증폭 DNA단편 C를, 서열번호 11에 나타내는 hinge-G-F 프라이머와 서열번호 12에 나타내는 G-28SD-R 프라이머를 사용한 PCR를 실시해서 증폭 DNA단편 D를, 서열번호 8에 나타내는 z-G-F 프라이머와 서열번호 13에 나타내는 G-28SD-R2 프라이머를 사용한 PCR를 실시해서 증폭 DNA단편 E를 각각 얻었다.

[0085] 실시예 1에서 제작한 pMS3-CEA-28z-CAR 벡터를 주형으로 하고, 서열번호 14에 나타내는 28TM-R 프라이머와 서열번호 15에 나타내는 z-F 프라이머를 사용한 PCR를 실시했다. 이렇게 해서 수득된 증폭산물에, In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit(Clontech사)를 사용해서 증폭 DNA단편 A를 클로닝하고, pMS3-CEA-Gz-CAR 벡터를 제작했다.

[0086] 이하 마찬가지로, 실시예 1에서 제작한 pMS3-CEA-z28-CAR 벡터를 주형으로 하고, 서열번호 16에 나타내는 z-R프라이머와 서열번호 17에 나타내는 END-MC-F 프라이머를 사용한 PCR를 실시했다. 이렇게 해서 수득된 증폭산물에 증폭 DNA단편 B를 클로닝하고, pMS3-CEA-zG-CAR 벡터를 제작했다. 이 벡터가 발현하는 CEA-zG-CAR의 아미노산 서열을 서열번호 29에 나타낸다.

[0087] pMS3-CEA-28z-CAR 벡터를 주형으로 하고, 서열번호 18에 나타내는 28SD-R 프라이머와 서열번호 15에 나타내는 z-F 프라이머를 사용한 PCR를 실시했다. 이렇게 해서 수득된 증폭산물에 증폭 DNA단편 C를 클로닝하고, pMS3-CEA-28Gz-CAR 벡터를 제작했다.

[0088] pMS3-CEA-28z-CAR 벡터를 주형으로 하고, 서열번호 19에 나타내는 hinge-R 프라이머와 서열번호 20에 나타내는 28SD-F 프라이머를 사용한 PCR를 실시했다. 이렇게 해서 수득된 증폭산물에 증폭 DNA단편 D를 클로닝하고, pMS3-CEA-G28z-CAR 벡터를 제작했다.

[0089] pMS3-CEA-z28-CAR 벡터를 주형으로 하고, 서열번호 16에 나타내는 z-R 프라이머와 서열번호 21에 나타내는 28SD-F2 프라이머를 사용한 PCR를 실시했다. 이렇게 해서 수득된 증폭산물에 증폭 DNA단편 E를 클로닝하고, pMS3-CEA-zG28-CAR 벡터를 제작했다. 이 벡터가 발현하는 CEA-zG28-CAR의 아미노산 서열을 서열번호 30에 나타낸다.

[0090] pMS3-CEA-28z-CAR 벡터를 주형으로 하고, 서열번호 16에 나타내는 z-R 프라이머와 서열번호 17에 나타내는 END-MC-F 프라이머를 사용한 PCR를 실시했다. 이렇게 해서 수득된 증폭산물에 증폭DNA단편 B를 클로닝하고, pMS3-CEA-28zG-CAR 벡터를 제작했다.

[0091] 제작한 각 벡터가 발현하는 CAR의 구조는, 도 2에 나타나는 구조(2)~(9)에 대응한다. 즉, pMS3-CEA-28z-CAR 벡터는 (2) 28z, pMS3-CEA-z28-CAR 벡터는 (3) z28, pMS3-CEA-Gz-CAR 벡터는 (4) Gz, pMS3-CEA-zG-CAR 벡터는 (5) zG, pMS3-CEA-28Gz-CAR 벡터는 (6) 28Gz, pMS3-CEA-G28z-CAR 벡터는 (7) G28z, pMS3-CEA-zG28-CAR 벡터는 (8) zG28, pMS3-CEA-28zG-CAR 벡터는 (9) 28zG의 구조를 가지는 CAR을 발현한다.

[0092] 실시예 3: 레트로바이러스 용액의 제작

[0093] 실시예 1 및 2에서 제작한 플라스미드 벡터에 의해 대장균 JM109를 각각 형질전환하고, 형질전환체를 얻었다. 이것들 형질전환체가 가지는 플라스미드 DNA를 QIAGEN Plasmid Midi Kit(Qiagen사)를 사용해서 각각 정제하고, 트랜스팩션용 DNA로 해서 이하의 조작에 적용했다.

[0094] 조제한 트랜스팩션용 DNA의 각각과 Retrovirus Packaging Kit Eco(TAKARA BIO INC.)에 함유되는 pGP 벡터, pEco 벡터를 293T 세포에 각각 트랜스팩트했다. 이 조작은 상기 키트의 제품 프로토콜에 따라서 수행했다. 수득된 형질도입세포의 각각에서 에코트로픽 바이러스를 함유하는 상청액을 획득하고, 0.45 μ m 필터(MillexHV,

Millipore사)로 여과했다. 이 상청액을 사용해서, 폴리브렌을 사용하는 방법에 의해 PG13 세포(ATCC CRL-10686)에 에코트로픽 바이러스를 감염시켰다. 수득된 세포의 배양 상청액을 회수하고, 0.45 μ m 필터에 의해 여과하고, 항CEA-CAR 발현용 레트로바이러스 용액으로 했다. 각 바이러스는 발현하는 CAR의 구조로부터 각각 (2) CEA-28z, (3) CEA-z28, (4) CEA-Gz, (5) CEA-zG, (6) CEA-28Gz, (7) CEA-G28z, (8) CEA-zG28, (9) CEA-28zG라고 명명했다.

[0095] **실시예 4: 인간 PBMC로의 항CEA-CAR 레트로바이러스의 감염1**

[0096] 설명과 동의를 얻고 채취된 인간 말초혈에서 분리한 말초혈 단핵구(PBMC)에, 실시예 3에서 제작한 각 항CEA-CAR 발현용 레트로바이러스 용액을, 레트로벡틴(등록상표, TAKARA BIO INC.)을 사용한 표준적인 방법으로 2회 감염 시키고, 항CEA-CAR 발현 PBMC를 각각 제작했다. 각 레트로바이러스 용액에 대해서 3군의 PBMC를 준비하고, 2배, 4배, 8배의 3단계로 희석한 레트로바이러스 용액을 사용해서 감염을 실시했다. 2회째의 바이러스감염으로부터 5일 후의 세포에서 FastPure DNA Kit(TAKARA BIO INC.)를 사용해서 게놈 DNA를 추출하고, Provirus Copy Number Detection PrimerSet, Human(TAKARA BIO INC.)과 CycleavePCR Core Kit(TAKARA BIO INC.)를 사용해서, 게놈에 통합된 레트로바이러스 카피수의 측정을 실시했다.

[0097] 또, 2회째의 바이러스감염으로부터 3일 후의 세포에 Biotin-Labeling Kit-NH₂(DOJINDO LABORATORIES)에 의해 비오틴 표지한 CEA 단백질을 첨가한 후, 스트렙타아비딘-PE(피코에리트린: Becton Dickinson사) 및 FITC 표지한 Human CD8 항체(Becton Dickinson사)에 의해 염색했다. 플로우 사이토미터를 사용해서, 염색후의 세포에 대해서, FITC 양성세포 중의 PE 양성인 세포의 비율, 즉 CD8 양성세포 중의 CEA에 결합하는 CAR이 양성인 세포의 비율을 측정했다. 또, 형광색소PE의 평균 형광강도를 측정했다. 평균 형광강도는 항CEA-CAR 양성세포에 있어서의, 항CEA-CAR의 발현량을 반영하고 있다. 그 결과, 어느쪽의 세포에 있어서도 세포표면의 CAR이 양성인 것임을 확인했다. 특히, (5) CEA-zG를 감염시킨 세포는 (4) CEA-Gz를 감염시킨 세포에 비해서 항CEA-CAR의 양성율 및 평균 형광강도가 높았다. (2) CEA-28z, (3) CEA-z28, (5) CEA-zG를 감염시킨 세포에 대해서, 도 3에 항CEA-CAR 양성율(중축)과 게놈에 통합된 레트로바이러스 카피수(횡축)의 관계를 나타내고, 도 4에 비오틴 표지한 CEA단백질이 양성인 세포에 유래하는 PE의 평균 형광강도(중축)과 게놈에 통합된 레트로바이러스 카피수(횡축)의 관계를 나타낸다. 도 3 및 도 4에 나타나 있는 바와 같이, 항CEA-zG-CAR을 도입한 PBMC[(5) CEA-zG]는 G1TR 세포내 도메인을 가지고 있지 않은 다른 항CEA-CAR도입 PBMC과 비교해서, 높은 항CEA-CAR 양성율이 수득되고, 또, 항CEA-CAR의 발현량도 높은 것임을 알 수 있었다.

[0098] **실시예 5: 인간 PBMC로의 항CEA-CAR 레트로바이러스의 감염2**

[0099] 사전동의를 얻고 채취된 인간 PBMC에, 실시예 3에서 제작한 항CEA-CAR 발현용 레트로바이러스 용액 중, (2) CEA-28z를 4배, 6배, 8배 희석, (5) CEA-zG를 원액, 2배, 4배 희석, (9) CEA-28zG 또는 (8) CEA-zG28을 2배, 4배, 8배 희석하고, 레트로벡틴(등록상표, TAKARA BIO INC.)을 사용한 표준적인 방법으로 2회 감염을 실시하고, 항CEA-CAR 발현 PBMC를 각각 제작했다. 2회째의 바이러스감염 6일 후에 세포를 회수하고, 실시예 4와 동일하게 해서 게놈에 통합된 바이러스 카피수의 측정을 실시했다. 비교적 레트로바이러스 카피수가 가까운 각 항CEA-CAR 발현세포[(2) CEA-28z: 0.27카피, (5) CEA-zG: 1.3카피, (9) CEA-28zG: 0.81카피, (8) CEA-zG28: 0.65카피]를 선택하고, 실시예 4와 동일하게 염색한 세포에 대해서, CD8양성세포 중의 항CEA-CAR이 양성인 세포의 비율 및 PE의 평균 형광강도를 측정했다. 도 5에 항CEA-CAR의 양성율을 나타내고, 도 6에 당해 양성세포의 PE 평균 형광강도를 나타낸다. 도 5 및 도 6에 나타나 있는 바와 같이, (5) CEA-zG, (9) CEA-28zG 및 (8) zG28을 감염시킨 세포는, (2) CEA-28z를 감염시킨 세포와 비교해서, 항CEA-CAR을 발현하는 세포의 비율이 높고, 또, 항CEA-CAR의 발현량도 높은 것임을 알 수 있었다.

[0100] 또, 2회째의 바이러스감염 11일 후에 세포를 회수하고, 96-well 플레이트에서 Calsein release assay에 의해 세포상해활성을 측정했다. Calsein-AM(DOJINDO LABORATORIES)을 통합시킨 CEA 양성세포주 MKN-45 및 CEA 음성세포주 MKN-1(모두, RIKEN BioResource Center로부터 입수 가능)을 1.0 \times 10⁵ cells/ml가 되도록 현탁한 후, 1웰당 100 μ l 첨가했다. 또, 상기 항CEA-CAR 도입 PBMC 및 컨트롤로서 벡터를 도입하지 않았던 PBMC(NGMC)를 현탁하고, ET비가 30, 10, 3, 1이 되도록 100 μ l 첨가했다. PBMC 대신에, Low control로서 배지를, High control로서 0.1% Triton X-100을 100 μ l 첨가하는 웰을 준비했다. 세포 및 컨트롤을 조제한 후, 96-well 플레이트를 5.0% CO₂가스

로 평형화한 37°C CO₂ 인큐베이터 중에서 4시간 보온했다. 이어서, 상청액 100 μ l에 대해서 λ_{ex} =490nm, λ_{em} =515nm으로 형광강도를 측정하고, 방출 Calsein량을 측정했다. 세포상해활성(Lysis)을 하기 식에 의해 산출한 결과를 도 7에 나타낸다.

[0101] 세포상해활성(%) = 100×(각 웰의 측정값 - Low control의 측정값) / (High control의 측정값 - Low control의 측정값)

[0102] 도 7에 나타나 있는 바와 같이, CEA 양성세포주 MKN-45에 있어서 항CEA-CAR을 도입한 PBMC에 의한 세포상해활성이 인정되었다. 특히, (5) CEA-zG도입 PBMC, (9) CEA-28zG 도입 PBMC 및 (8) CEA-zG28 도입 PBMC에서 강한 세포상해활성이 획득되고, GITR의 세포내 도메인을 가지는 CAR이 암의 처치에 있어서 유용한 것임이 나타났다.

[0103] **실시예 6: CEA-zG28의 재 제작, 및, 레트로바이러스 용액의 제작**

[0104] 실시예 5에서 사용한 CEA-zG28의 CD28 세포내 도메인의 코드영역에 프레임 시프트가 발견되었기 때문에, 이 프레임 시프트를 수복한 플라스미드 DNA를 제작하고, QIAGEN Plasmid Midi Kit(Qiagen사)를 사용해서 정제했다. 이 정제 플라스미드 DNA를 트랜스팩션용 DNA로 해서 실시예 3과 동일한 방법으로 바이러스 용액을 조제했다. 수득된 레트로바이러스 용액을 (8) CEA-zG28_r이라고 명명했다.

[0105] **실시예 7: 인간 PBMC로의 항CEA-CAR 레트로바이러스 벡터의 감염3**

[0106] 사전동의를 얻고 채취된 인간 PBMC에, 실시예 6에서 제작한 (8) CEA-zG28_r 및 (9) CEA-28zG를 원액, 2배, 4배 희석, 8배 희석하고, 실시예 4와 동일하게 해서 인간 PBMC에 감염시킨 후, 계놈에 통합된 바이러스 카피수의 측정과, CD8 양성세포 중의 항CEA-CAR이 양성인 세포의 비율 및 PE의 평균 형광강도를 측정했다. 도 8에 카피수에 대한 항CEA-CAR의 양성율을 나타내고, 도 9에 카피수에 대한 PE 평균 형광강도를 나타낸다. 도 8 및 도 9에 나타나 있는 바와 같이, (8) CEA-zG28_r을 감염시킨 세포는 항CEA-CAR을 발현하는 것임을 확인했다.

[0107] 또, 2회째의 바이러스감염 6일 후에 비교적 레트로바이러스 카피수가 가까운 각 항CEA-CAR 발현세포[(9) CEA-28zG: 2.22카피, (8) CEA-zG28_r: 2.12카피]를 선택하고, 세포를 회수하고, 실시예 5와 동일하게, CEA 양성세포주 MKN-45 및 CEA 음성세포주 MKN-1에 대한 세포상해활성을 측정했다. 그 결과를 도 10에 나타낸다. 도 10에 나타나 있는 바와 같이, CEA 양성세포주 MKN-45에 있어서, 어느 쪽의 항CEA-CAR을 도입한 PBMC에서도 동등한 세포상해활성이 인정되었다.

[0108] **실시예 8: 인간 PBMC로의 항CEA-CAR 레트로바이러스 벡터의 감염4**

[0109] 실시예 3에서 제작한 (5) CEA-zG 및 (9) CEA-28zG를 원액, 2배, 4배 희석, 8배 희석한 희석액, (2) CEA-28z를 원액, 2배, 4배, 8배, 16배 희석한 희석액을 각각 조제했다. 사전동의를 얻고 채취된 인간 PBMC에 대해서, 이것들의 레트로바이러스 벡터 희석액과 레트로벡터(등록상표)를 사용한 표준적인 방법으로 2회 감염을 실시하고, 항CEA-CAR 발현 PBMC를 각각 제작했다. 2회째의 바이러스감염 5일 후에 세포를 회수하고, 실시예 4에 기재된 방법에 의해 계놈에 통합된 바이러스 카피수를 측정하는 동시에, CD8 양성세포 중의 항CEA-CAR이 양성인 세포의 비율 및 PE의 평균 형광강도를 측정했다. 도 11에 카피수에 대한 항CEA-CAR의 양성율을 나타내고, 도 12에 카피수에 대한 PE 평균 형광강도를 나타낸다. 도 11 및 도 12에 나타나 있는 바와 같이, 카피수에 대한 항CEA-CAR을 발현하는 세포의 비율은 어느 것이나 동등하고, 카피수에 대한 PE의 평균 형광강도, 즉 발현량은 (5) CEA-zG가 가장 높았다.

[0110] 또, 2회째의 바이러스감염 6일 후에 세포를 회수하고, 96-well 플레이트에서 세포내 사이토카인의 염색을 아래와 같이 실시했다. 세포내 수송 저해제 Brefeldin A(Sigma Corporation)를 포함하는 배지에서 상기 항CEA-CAR 도입 PBMC를 1.0×10⁶ cells/ml가 되도록 현탁한 현탁액을, 상기 플레이트의 1웰당 100 μ l 첨가했다. 또, CEA 양성세포주 MKN-45의 1.0×10⁶ cells/ml 현탁액을 100 μ l 첨가하고, 5시간 공배양시켰다. 공배양시킨 세포를 APCcy7 표지 항Human CD8 항체(Becton Dickinson)에 의해 염색한 후, IntraPrep Reagent(Beckman Coulter Inc.) 처리를 실시하고, PE 표지 항Human IFN γ 항체(Beckman Coulter Inc.) 및 APC 표지 항Human TNF α 항체(eBioscience사)에 의해 염색을 실시했다. 플로우 사이토미터를 사용해서, 염색후의 세포에 대해서, CD8 양성세포 중의 IFN γ 생산세포의 비율과 형광색소PE의 평균 형광강도를 측정하고, 또, CD8 양성세포 중의 TNF α 생산

세포의 비율과 형광색소APC의 평균 형광강도를 측정했다. 평균 형광강도는 항CEA-CAR 양성세포에 있어서의 IFN γ 및 TNF α 의 세포내 사이토카인량을 반영하고 있다.

[0111] 도 13에 레트로바이러스의 카피수(횡축)에 대한, IFN γ 생산세포율(종축)의 관계를 나타내고, 도 14에 레트로바이러스의 카피수(횡축)에 대한 PE 평균 형광강도(종축)의 관계를 나타낸다. 도 13에 나타나 있는 바와 같이, IFN γ 생산율은 (2) CEA-28z에 비해 (9) CEA-28zG가 낮음에도 불구하고, 도 14에 나타나 있는 바와 같이, (9) CEA-28zG의 IFN γ 생산량은 (2) CEA-28z와 동등한 것임이 확인되었다. 즉, IFN γ 생산세포에서의 IFN γ 생산량은 (9) CEA-28zG 도입세포가 높아졌다.

[0112] 또, 마찬가지로 도 15에 레트로바이러스의 카피수(횡축)에 대한, TNF α 생산세포율(종축)의 관계를 나타내고, 도 16에 레트로바이러스의 카피수(횡축)에 대한 APC평균 형광강도(종축)의 관계를 나타낸다. 도 15에 나타나 있는 바와 같이, TNF α 생산율은 (9) CEA-28zG는 (2) CEA-28z보다도 하회함에도 불구하고, 도 16에 나타나 있는 바와 같이, TNF α 생산량은 (9) CEA-28zG가 상회했다. 즉, IFN γ 와 마찬가지로, TNF α 생산세포에서의 IFN γ 생산량은 (9) CEA-28zG 도입세포가 높다는 결과가 되었다.

[0113] 이상으로부터, CD28의 세포내 도메인을 가지는 CAR에 추가로 GITR의 세포내 도메인을 탑재시키는 것에 의해, 사이토카인 생산능이 증강된 세포를 제조하는 것이 가능하게 되는 것이 나타났다.

[0114] **실시예 9: 항EGFR-CAR 발현 레트로바이러스 벡터의 제작**

[0115] 서열번호 31에 나타내는 염기서열의 인공합성 유전자를 제작했다. 이 인공합성 유전자는 항EGFR-CAR인 EGFR-z, 즉, 서열번호 32에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 인간 IgG 리더서열, 서열번호 33에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 암 항원 EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)과 결합하는 항EGFR 모노클로날 항체의 scFv, 서열번호 34에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 인간 IgG-LC(경쇄 정상영역) 도메인, 서열번호 24에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 CD28 막관통 도메인, 서열번호 26에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 CD3 ζ 세포내 도메인으로 이루어지는 1분자의 키메라 단백질을 코딩한다. 이 인공합성 유전자를 포함하는 핵산단편을 NotI-XhoI로 소화한 pMS3-MC 벡터에 클로닝하고, 세포내 도메인으로서 CD3 ζ 세포내 도메인만을 가지는 (1) EGFR-z를 발현하는 pMS3-EGFR-LC-z-CAR을 제작했다. 또, 그 CAR의 구조는 도 2 중의 (1)에 대응한다.

[0116] **실시예 10: GITR 유전자를 탑재한 항EGFR-CAR 발현벡터의 제작**

[0117] 실시예 9에서 제작한 pMS3-EGFR-LC-z-CAR을 기초로, 서열번호 35에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 (2) EGFR-28z를 발현하는 pMS3-EGFR-LC-28z-CAR을 제작했다. 이하 마찬가지로, 서열번호 36에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 (5) EGFR-zG를 발현하는 pMS3-EGFR-LC-zG-CAR, 서열번호 37에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 (9) EGFR-28zG를 발현하는 pMS3-EGFR-LC-28zG-CAR, 서열번호 38에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 (10) EGFR-z28G를 발현하는 pMS3-EGFR-LC-z28G-CAR, 서열번호 39에 기재하는 아미노산 서열을 가지는 (7) EGFR-G28z를 발현하는 pMS3-EGFR-LC-G28z-CAR을 제작했다. 이것들의 CAR의 구조는 각각, 도 2 중의 (2), (5), (9), (7) 및 (10)에 대응한다.

[0118] **실시예 11: 레트로바이러스 용액의 제작**

[0119] 실시예 9 및 10에서 제작한 플라스미드 벡터로부터, 실시예 3과 동일한 방법으로 바이러스 용액을 조제했다. 각 바이러스는 발현하는 CAR의 구조로부터 각각 (1) EGFR-z, (2) EGFR-28z, (5) EGFR-zG, (9) EGFR-28zG, (10) EGFR-z28G, (7) EGFR-G28z라고 명명했다.

[0120] **실시예 12: 인간 PBMC로의 항EGFR-CAR 레트로바이러스 벡터의 감염**

[0121] 사전동의를 얻고 채취된 인간 PBMC에, 실시예 11에서 제작한 각 바이러스 용액을, 원액, 2배, 4배, 8배 희석하고, 레트로넵틴(등록상표)을 사용한 표준적인 방법으로 2회 감염을 실시하고, 항EGFR-CAR 발현 PBMC를 각각 제작했다.

[0122] 2회째의 바이러스감염 5일 후의 세포에, C말단이 His-tag 변형된 Recombinant Human EGFR(SinoBiological사)을

첨가한 후, 비오틴 표지 항His-tag 항체(Miltenyi Biotec K.K.)을 첨가했다. 그 후에 스트렙타아비딘-PE(피코에리트린: Becton Dickinson사) 및 FITC표지 항Human CD8 항체(Becton Dickinson사)에 의해 염색했다. 플로우 사이토미터를 사용하고, 염색후의 세포에 대해서, FITC 양성세포 중의 PE 양성인 세포의 비율, 즉 CD8 양성세포 중의 EGFR에 결합하는 CAR이 양성인 세포의 비율을 측정했다. 또, 형광색소 PE의 평균 형광강도를 측정했다. 추가로, 2회째의 바이러스감염 5일 후에 세포를 회수하고, 실시예 4와 동일하게 해서 계놈에 통합된 바이러스 카피수를 측정했다. 도 17에 레트로바이러스의 카피수에 대한 항EGFR-CAR의 양성세포율을 나타내고, 도 18에 레트로바이러스의 카피수에 대한 PE 평균 형광강도를 나타낸다. 도 17 및 도 18에 나타나 있는 바와 같이, 전부의 항EGFR-CAR의 발현이 확인되었다.

[0123] 또, 2회째의 바이러스감염 6일 후에 세포를 회수하고, EGFR 양성세포주 HeLa를 사용한 이외는 실시예 8과 동일하게 하여 세포내 사이토카인의 염색을 실시했다. 추가로, IFN γ 및 TNF α 에 첨가해서, FITC 표지 항Human IL-2(Becton Dickinson사)에 의한 IL-2의 염색을 실시했다. 플로우 사이토미터를 사용하고, 염색후의 세포에 대해서, 각 사이토카인의 생산세포의 비율과 형광색소의 평균 형광강도를 측정했다. 평균 형광강도는 항CEA-CAR 양성세포에 있어서의 IL-2, IFN γ 및 TNF α 의 세포내 사이토카인량을 반영하고 있다.

[0124] 도 19에 레트로바이러스의 카피수(횡축)에 대한, 각 사이토카인 생산세포율(종축)의 관계를 나타내고, 도 20에 레트로바이러스의 카피수(횡축)에 대한 평균 형광강도(각 사이토카인 생산량)(종축)의 관계를 나타낸다. 도 19, 도20에 나타나 있는 바와 같이, GITR의 세포내 도메인을 탑재한 CAR은 CAR의 발현량에 대한 사이토카인 생산량이 높은 경향이 확인되었다.

[0125] (산업상의 이용 가능성)

[0126] 본 발명에 의해, 표적으로 하는 항원에 특이적으로 결합하고, 표적으로 하는 세포에 대한 높은 세포상해활성을 세포에 부여하는 CAR, 당해 CAR을 코딩하는 핵산 및 당해 CAR을 발현하는 세포가 제공된다. 이것들의 CAR, 핵산, 세포는 종양항원 등의 항원을 표적으로 한 양자면역 유전자치료의 분야에 있어서 유용하다.

[0127] 서열목록 프리텍스트

[0128] SEQ ID NO:1: 3MSCV5 primer

[0129] SEQ ID NO:2: 3MSCV3 primer

[0130] SEQ ID NO:3: Anti CEA-28z-CAR fragment sequence

[0131] SEQ ID NO:4: Anti CEA-z28-CAR fragment sequence

[0132] SEQ ID NO:5: GITR transmembrane region and cytoplasmic domain coding sequence

[0133] SEQ ID NO:6: 28TM-G-F primer

[0134] SEQ ID NO:7: G-z-R primer

[0135] SEQ ID NO:8: z-G-F primer

[0136] SEQ ID NO:9: G-MC-R primer

[0137] SEQ ID NO:10: 28SD-G-F primer

[0138] SEQ ID NO:11: hinge-G-F primer

[0139] SEQ ID NO:12: G-28SD-R primer

[0140] SEQ ID NO:13: G-28SD-R2 primer

[0141] SEQ ID NO:14: 28TM-R primer

[0142] SEQ ID NO:15: z-F primer

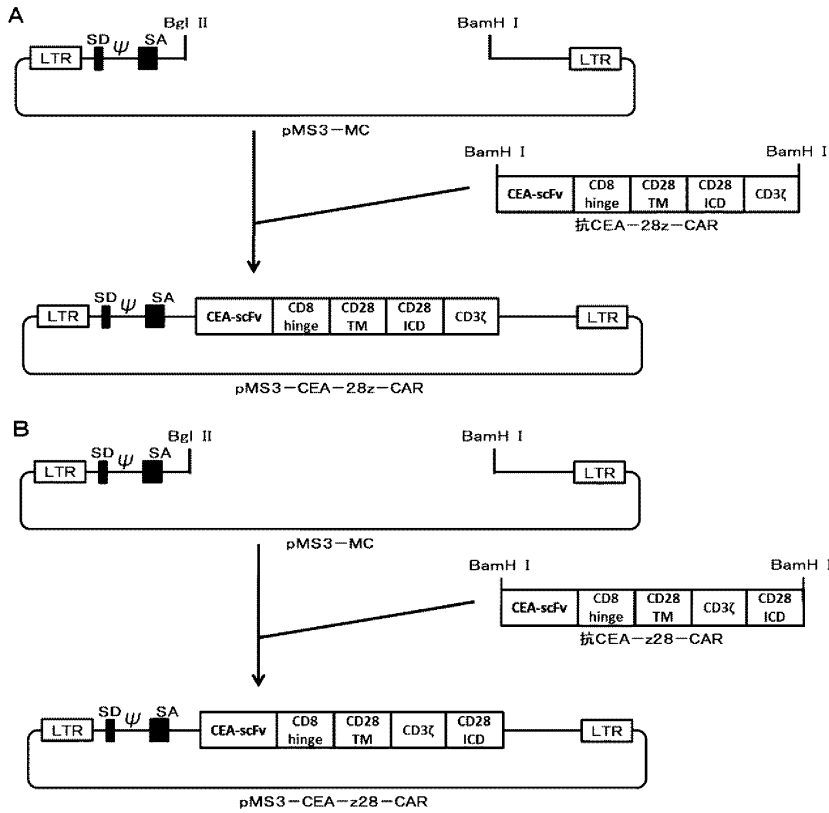
[0143] SEQ ID NO:16: z-R primer

[0144] SEQ ID NO:17: END-MC-F primer

- [0145] SEQ ID NO:18: 28SD-R primer
- [0146] SEQ ID NO:19: hinge-R primer
- [0147] SEQ ID NO:20: 28SD-F primer
- [0148] SEQ ID NO:21: 28SD-F2 primer
- [0149] SEQ ID NO:22: Anti CEA scFv
- [0150] SEQ ID NO:23: Human CD8 alpha chain hinge domain
- [0151] SEQ ID NO:24: Human CD28 transmembrane domain
- [0152] SEQ ID NO:25: Human CD28 cytoplasmic domain
- [0153] SEQ ID NO:26: Human CD3 zeta chain cytoplasmic domain
- [0154] SEQ ID NO:27: Human GITR transmembrane domain
- [0155] SEQ ID NO:28: Human GITR cytoplasmic domain
- [0156] SEQ ID NO:29: Anti CEA-zG-CAR sequence
- [0157] SEQ ID NO:30: Anti CEA-zG28-CAR sequence
- [0158] SEQ ID NO:31: Anti EGFR-LC-z-CAR coding sequence
- [0159] SEQ ID NO:32: Human IgG leaders equence
- [0160] SEQ ID NO:33: Anti EGFR monoclonal antibody scFvs equence
- [0161] SEQ ID NO:34: Human IgG CL sequence
- [0162] SEQ ID NO:35: Anti EGFR-28z-CAR sequence
- [0163] SEQ ID NO:36: Anti EGFR-zG-CAR sequence
- [0164] SEQ ID NO:37: Anti EGFR-28zG-CAR sequence
- [0165] SEQ ID NO:38: Anti EGFR-z28G-CAR sequence
- [0166] SEQ ID NO:39: Anti EGFR-G28z-CAR sequence

도면

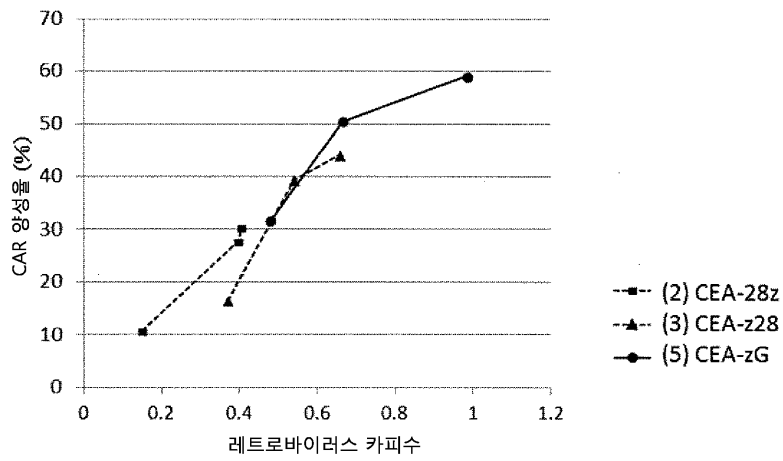
도면1



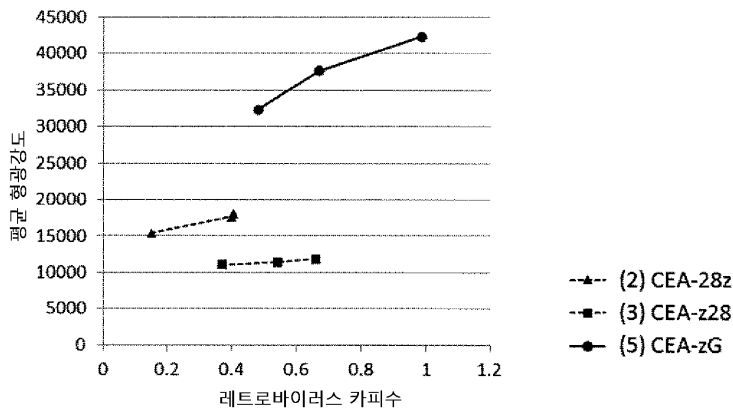
도면2

scFv	Spacer domain	CD28 TM	CD3zeta			(1) z
scFv	Spacer domain	CD28 TM	CD28 ICD	CD3zeta		(2) z28z
scFv	Spacer domain	CD28 TM	CD3zeta	CD28 ICD		(3) z28
scFv	Spacer domain	CD28 TM	GITR ICD	CD3zeta		(4) Gz
scFv	Spacer domain	CD28 TM	CD3zeta	GITR ICD		(5) zG
scFv	Spacer domain	CD28 TM	CD28 ICD	GITR ICD	CD3zeta	(6) z28Gz
scFv	Spacer domain	GITR TM	GITR ICD	CD28 ICD	CD3zeta	(7) G28z
scFv	Spacer domain	CD28 TM	CD3zeta	GITR ICD	CD28 ICD	(8) zG28
scFv	Spacer domain	CD28 TM	CD28 ICD	CD3zeta	GITR ICD	(9) z28zG
scFv	Spacer domain	CD28 TM	CD3zeta	CD28 ICD	GITR ICD	(10) z28G

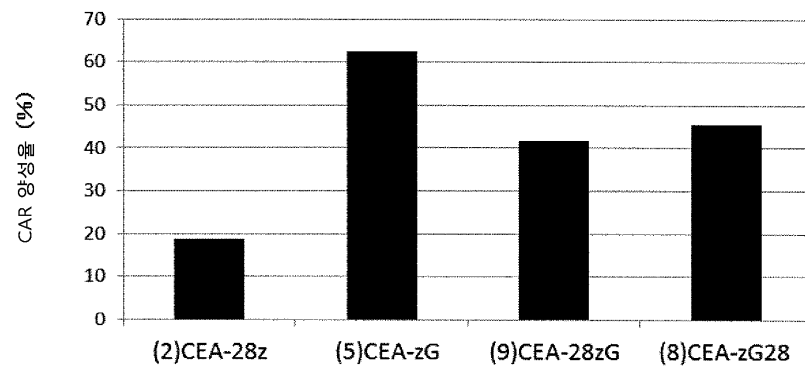
도면3



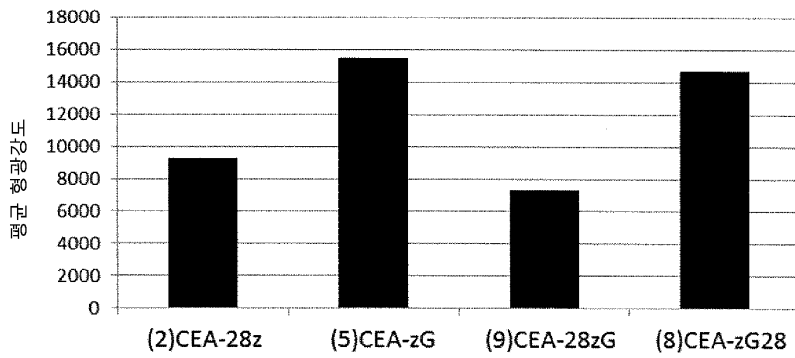
도면4



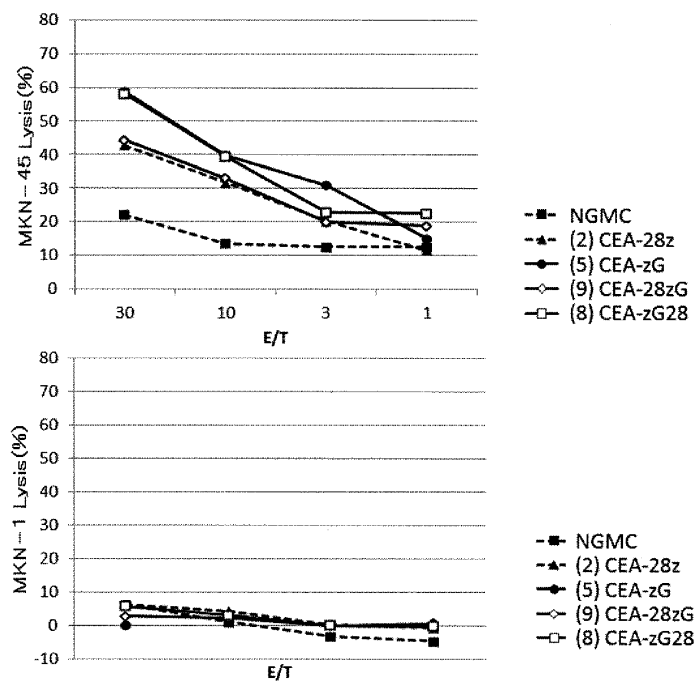
도면5



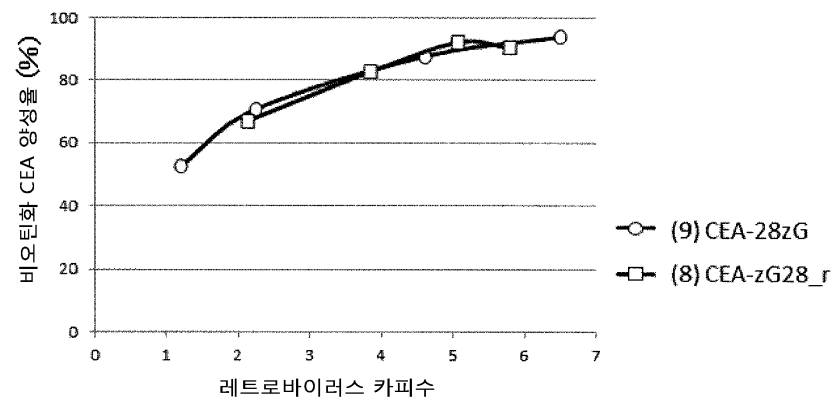
도면6



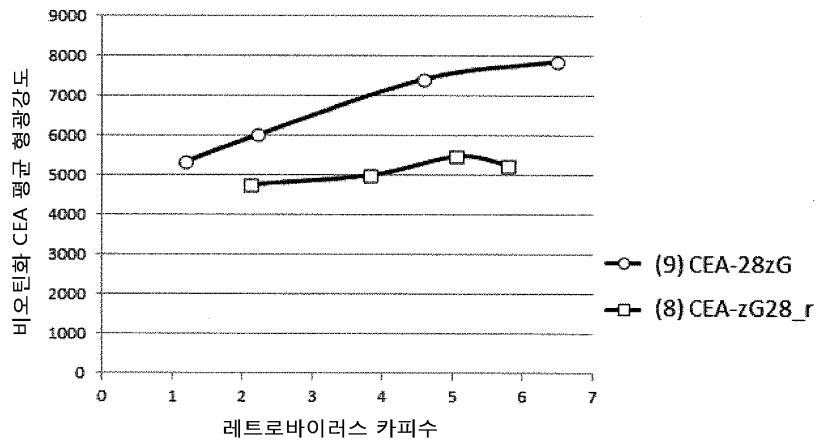
도면7



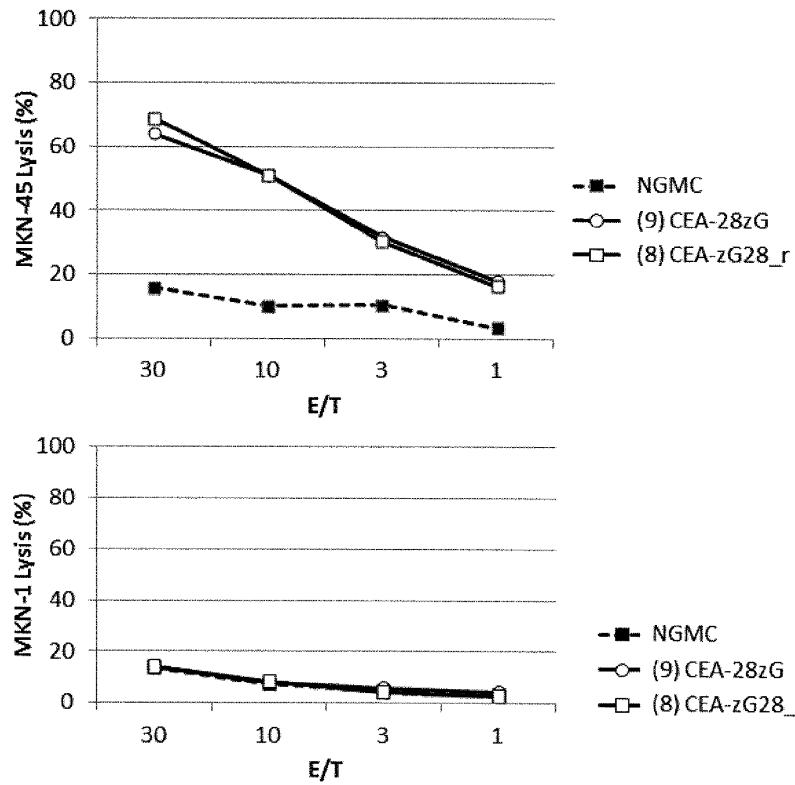
도면8



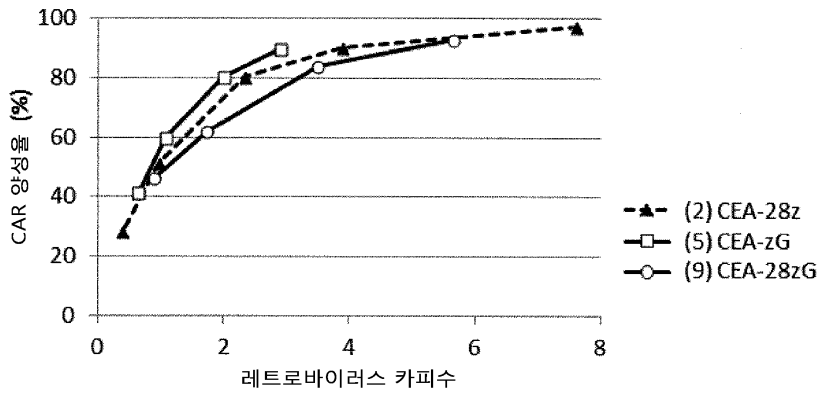
도면9



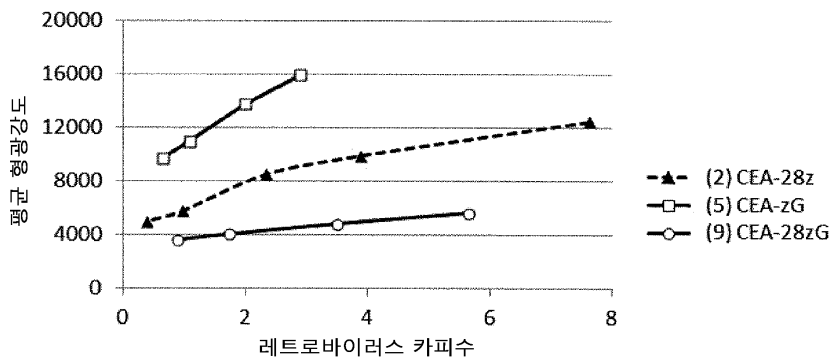
도면10



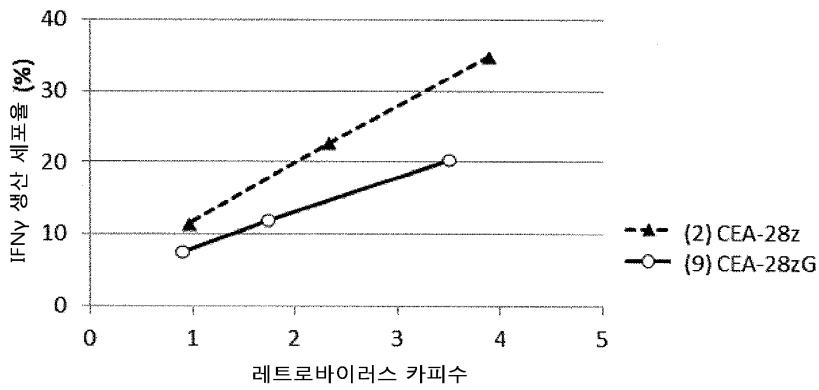
도면11



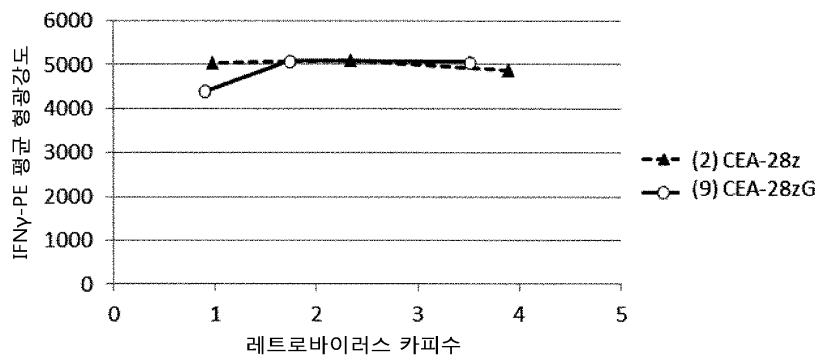
도면12



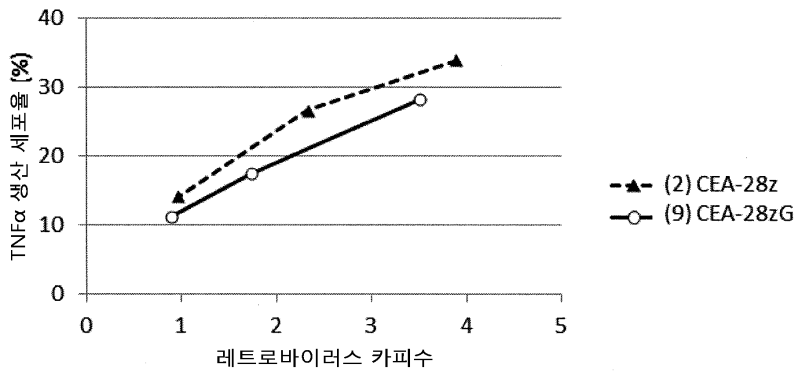
도면13



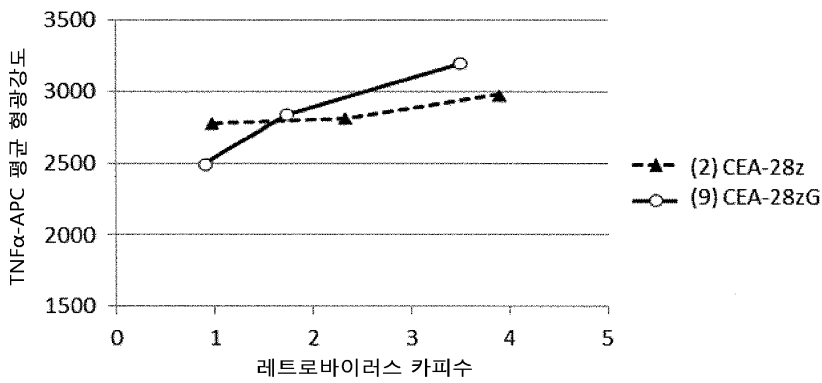
도면14



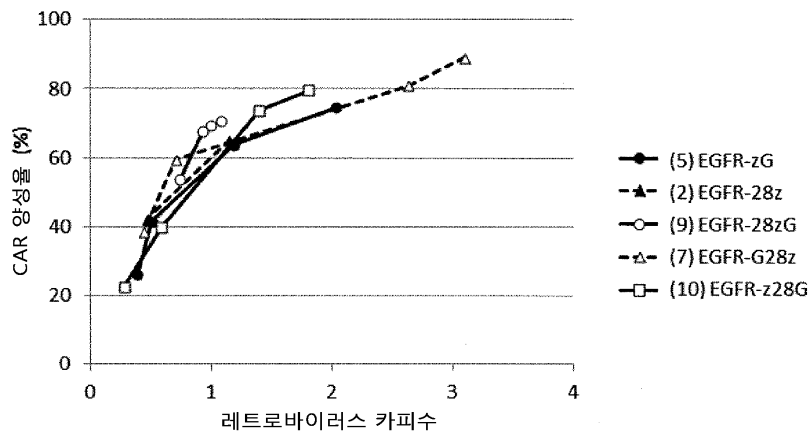
도면15



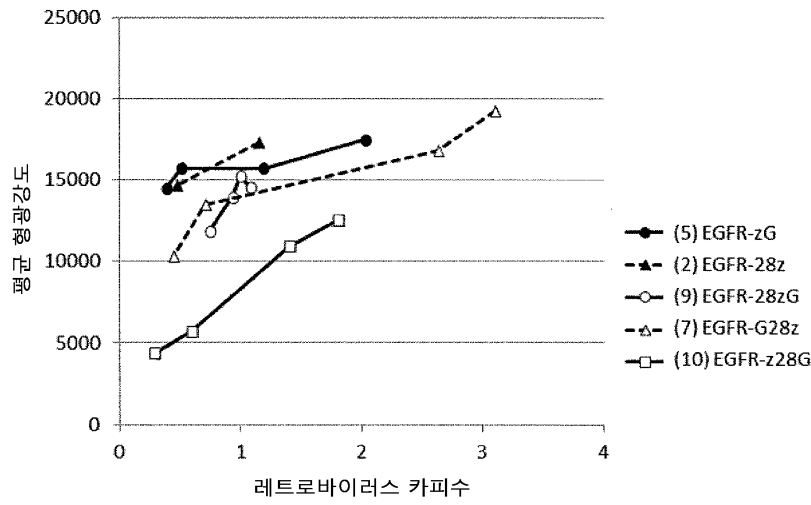
도면16



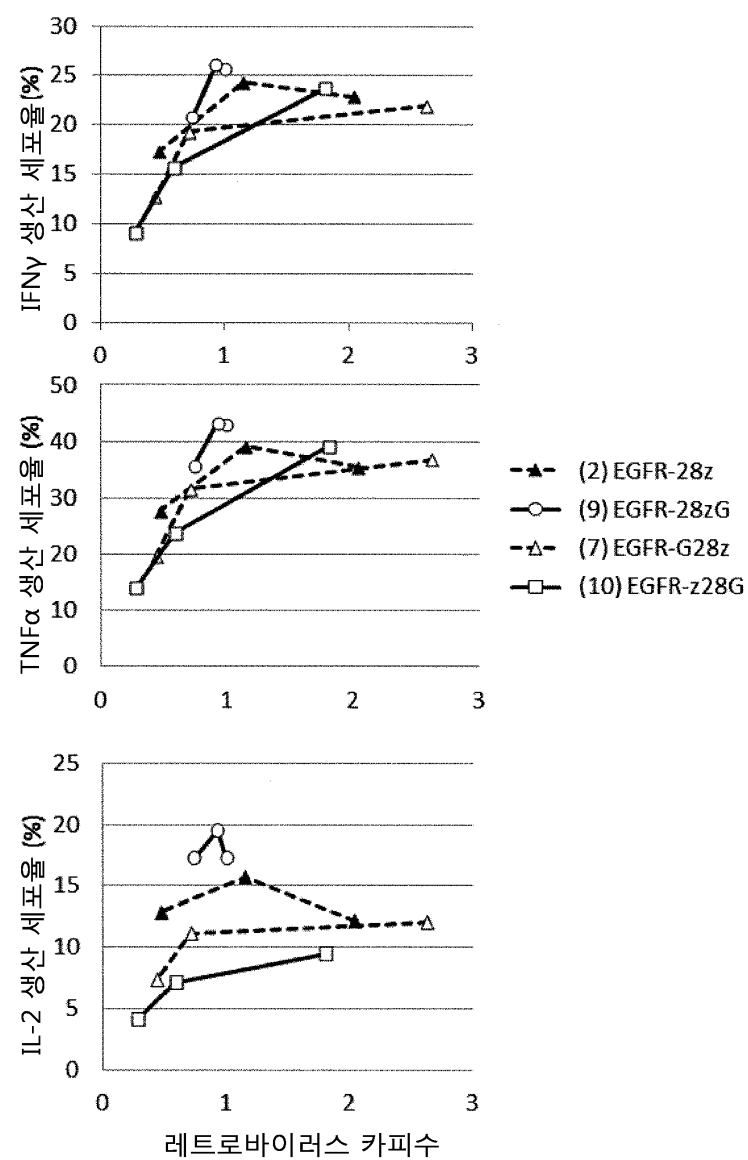
도면17



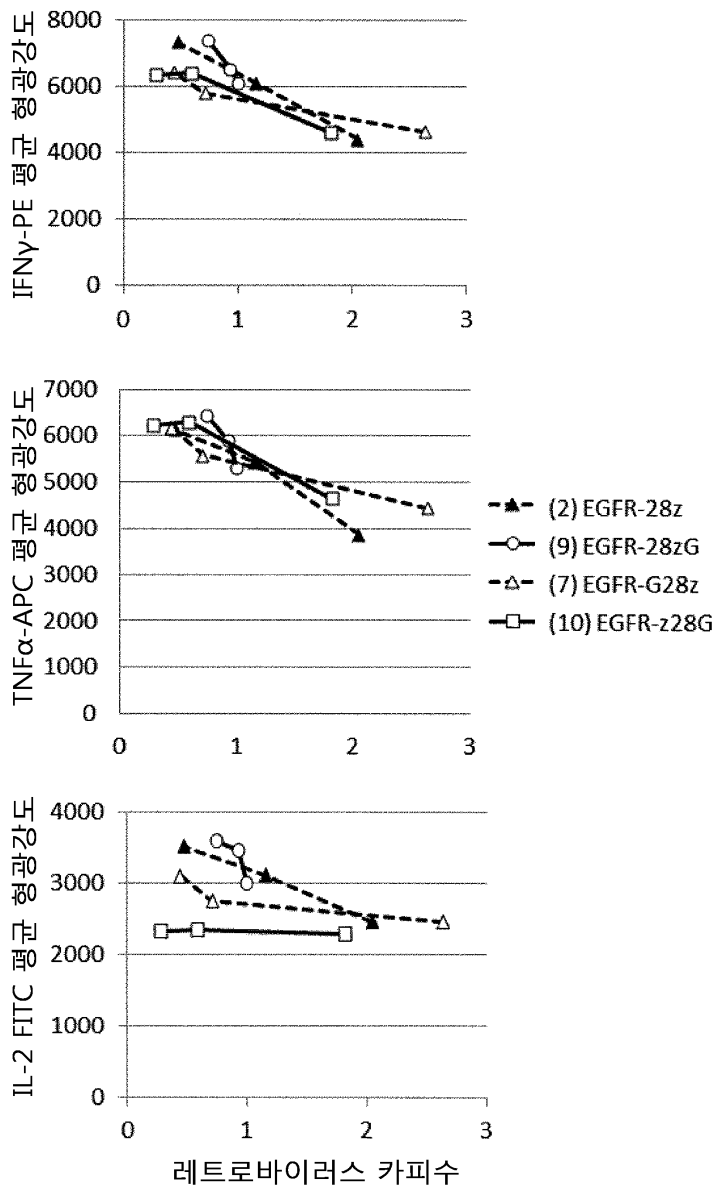
도면18



도면19



도면20



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MIE UNIVERSITY
TAKARA BIO INC.

<120> Chimeric antigen receptor comprising G1TR cytoplasmic domain

<130> 671198

<150> JP 2011-222510

<151> 2011-10-7

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 3MSCV5 primer
 <400> 1
 tacctcgagc gataaaataa aagatTTTTat ttag 34
 <210> 2
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 3MSCV3 primer
 <400> 2
 tacgaattcg attgaatccg tcgactgaaa gacccccgct gacgg 45
 <210> 3
 <211> 1515
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Anti CEA-28z-CAR fragment sequence
 <400> 3
 atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctttctgcat ctgtgggaga cactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaacatttat agttatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaggcct tatcagaagg tgtgccgtca 240
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ggatcaacag cctgcagcct 300
 gaagatTTtg gggattatta ctgtcaacat cattataatt ctcccttatac gttcggaggg 360
 gggaccaaac tggaaataaa gggttctacc tctggttctg gtaaactctc tgaaggtaaa 420
 ggtcagatcc agttggtgca gtctggacct gagctgaaga agcctggaga gacagtcaag 480
 atctctgca aggcttctg tttatccttc acaaacgatg gaataaactg ggtgaagcag 540
 gctccaggaa agggTTTTaa gtacatgggc tggataaaca ccatcactgg agagccaaca 600
 tatactgaag acttcaaggg gcggtttgcc ttctctttgg aaacctctgc cagcactgcc 660
 tatttgcaga tcaacaacct caaagatgag gacacggcta catTTTTctg tgcaaagggg 720

actgggacga ggccttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc aactagtctg 780
 agcaactcca tcatgtactt cagccacttc gtgccgtctt tcctgccagc gaagcccacc 840
 acgacgccag cggcgcgacc accaacaccg gcgcccacca tcgcgtcgca gccctgtcc 900
 ctgcgccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac 960
 tctagatfff ggggtctggt ggtggttggg ggagtcttgg cttgctatag cttgctagta 1020
 acagtggcct ttattatfff ctgggtgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac 1080
 tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg cccaccgca agcattacca gcctatgcc 1140

ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 1200
 gcccccggt accagcaggg ccagaaccag cttataacg agtcaatct aggacgaaga 1260
 gaggagtacg atgttttggg caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 1320
 cagagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaaga taagatggcg 1380
 gaggcctaca gtgagattgg gatgaaagc gagcggcga ggggcaaggg gcacgatggc 1440
 ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccctca catgcaggcc 1500
 ctgccccctc gctaa 1515

<210> 4

<211> 1515

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Anti CEA-z28-CAR fragment sequence

<400> 4

atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctttctgcat ctgtgggaga cactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaacatttat agttatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctgagctcct ggtctataat gcaaaggcct tatcagaagg tgtgccgtca 240
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ggatcaacag cctgcagcct 300
 gaagatfff gggattatta ctgtcaacat cattataatt ctccttatac gttcggaggg 360

gggaccaaac tggaaataaa gggttctacc tctggttctg gtaaactctc tgaaggtaaa 420
 ggtcagatcc agttggtgca gtctggacct gagctgaaga agcctggaga gacagtcaag 480
 atctctgca aggcttctgg ttattccttc acaaacgatg gaataaactg ggtgaagcag 540
 gctccaggaa agggttttta gtacatgggc tggataaaca ccatcactgg agagccaaca 600
 tatactgaag acttcaaggg gcggtttgcc ttctctttgg aaacctctgc cagcactgcc 660
 tatttgcaga tcaacaacct caaagatgag gacacggcta catffffctg tgcaaagggg 720

actgggacga gcgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc aactagtctg 780

agcaactcca tcatgtactt cagccacttc gtgccgtctt tcctgccagc gaagcccacc 840

acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca tcgcgtcgca gccctgtcc 900

ctgcgccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac 960

tctagatfff ggggtgctggt ggtggttggg ggagtctctg cttgctatag cttgctagta 1020

acagtggcct ttattatfff ctgggtgagg ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 1080

gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 1140

gaggagtacg atgttttggg caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 1200

cagagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg 1260

gaggcctaca gtgagattgg gatgaaagc gagcgcggga ggggcaaggg gcacgatggc 1320

ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc 1380

ctgccccctc gcagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc 1440

cgccgccccg ggcccaccg caagcattac cagccctatg ccccaccag cgacttcgca 1500

gcctatcgct cctaa 1515

<210> 5

<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> G1TR transmembrane region and cytoplasmic domain coding sequence

<400> 5

ccgcttgggt ggctgaccgt cgtctctctg gccgtggccg cctgcgtcct cctcctgacc 60

tcggcccagc ttggactgca catctggcag ctgaggagtc agtgcattgt gccccgagag 120

accagctgc tgctggaggt gccgccgtcg accgaagacg ccagaagctg ccagttcccc 180

gaggaagagc ggggcgagcg atcggcagag gagaaggggc ggctgggaga cctgtgggtg 240

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 28TM-G-F primer

<400> 6

atcttctggg tgaggaggag tcagtgcattg tggcc 35

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> G-z-R primer
 <400> 7
 gaacttcact ctcagcaccc acaggtctcc cagcc 35
 <210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> z-G-F primer
 <400> 8
 gccctgcccc ctgcaggag tcagtgcatg tggcc 35
 <210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> G-MC-R primer
 <400> 9
 ttatcgctcg agttacacc acaggtctcc cagcc 35
 <210>
 > 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 28SD-G-F primer
 <400> 10
 gcagcctatc gctccaggag tcagtgcatg tggcc 35
 <210> 11
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> hinge-G-F primer
 <400> 11

acgagggggc tggacccgct tgggtggctg accgt 35
 <210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> G-28SD-R primer
 <400> 12
 actgtgcagg agcctcaccc acaggtctcc cagcc 35

 <210> 13
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> G-28SD-R2 primer
 <400> 13
 cctgctctc ttactcaccc acaggtctcc cagcc 35
 <210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 28TM-R primer
 <400> 14
 cctcaccag aaaataataa aggccac 27
 <210> 15
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> z-F primer
 <400> 15
 ctgagagtga agttc 15

 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> z-R primer
 <400> 16
 gcgagggggc agggcctgca 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> END-MC-F primer
 <400> 17
 taactcgagc gataaaataa 20
 <210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 28SD-R primer
 <400> 18
 ggagcgatag gctgc 15

 <210> 19
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> hinge-R primer
 <400> 19
 gtccagcccc ctcgt 15
 <210> 20
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 28SD-F primer
 <400> 20
 agtaagagga gcagg 15
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 28SD-F2 primer

<400> 21

agtaagagga gcaggctcct

20

<210> 22

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Anti CEA scFv

<400> 22

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr

 100 105 110

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly Gln Ile Gln

 130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Asp Gly Ile Asn

 165 170 175

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Tyr Met Gly Trp Ile

180 185 190

Asn Thr Ile Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe Lys Gly Arg

195 200 205

Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile

210 215 220

Asn Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ala Lys Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

Ala

<210> 23

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human CD8 alpha chain hinge domain

<400> 23

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

1 5 10 15

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

20 25 30

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

35 40 45

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

50 55 60

<210> 24

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human CD28 transmembrane domain

<400> 24

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
 20 25

<210> 25

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human CD28 cytoplasmic domain

<400> 25

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> 26

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223>

> Human CD3 zeta chain cytoplasmic domain

<400> 26

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

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

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

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

50 55 60

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

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 85 90 95
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 100 105 110
 Pro Arg

<210> 27

<211> 31

<212>

> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human GTR transmembrane domain

<400> 27

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys Val
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu
 20 25 30

<210> 28

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human GTR cytoplasmic domain

<400> 28

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

Val

<210> 29

<211> 513

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Anti CEA-zG-CAR sequence

<400> 29

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

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

 20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

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

 50 55 60
Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Ala Leu Ser Glu Gly Val Pro Ser

65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Asn

 85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr

 100 105 110
Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

 115 120 125
Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly Gln Ile Gln

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

145 150 155 160
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Asp Gly Ile Asn

 165 170 175
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Tyr Met Gly Trp Ile

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

 195 200 205
Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile

 210 215 220

145 150 155 160
 Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Asp Gly Ile Asn
 165 170 175
 Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Tyr Met Gly Trp Ile

 180 185 190
 Asn Thr Ile Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe Lys Gly Arg
 195 200 205
 Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
 210 215 220
 Asn Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ala Lys Gly
 225 230 235 240
 Thr Gly Thr Ser Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

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

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

 370 375 380
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 385 390 395 400

Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 405 410 415

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 420 425 430

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 435 440 445

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val
 465 470 475 480

Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu
 485 490 495

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

500 505 510
 Val Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 515 520 525

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 530 535 540

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 545 550

<210> 31

<211> 1545

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti EGFR-LC-z-CAR coding sequence

<400> 31

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
 tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt agtagttact actggggctg gatccgccag 180
 cccccagga aggggctgga gtggattggg agtatctatt atagtgggag cacctactac 240
 aaccctccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
 ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacttctc 360

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti EGFR monoclonal antibody scFv sequence

<400> 33

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

210 215 220
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr

225 230 235 240
 Lys Leu Thr Val Leu

245

<210> 34

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG CL sequence

<400> 34

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

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

35

40

45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 35

<211> 554

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti EGFR-28z-CAR sequence

<400> 35

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

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

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

 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Val Leu
 145 150 155 160
 Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile
 165 170 175

 Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln
 180 185 190
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp
 195 200 205
 Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
 210 215 220
 Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
 225 230 235 240

 Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly
 245 250 255

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

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

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

 Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 435 440 445
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 450 455 460
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 465 470 475 480
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro
 485 490 495

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

145 150 155 160
 Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile
 165 170 175
 Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln

 180 185 190
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp
 195 200 205
 Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
 210 215 220
 Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly

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

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

 370 375 380
 Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 385 390 395 400

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 405 410 415
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 420 425 430
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 435 440 445
 Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 450 455 460
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 465 470 475 480
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 485 490 495
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 500 505 510
 Pro Arg Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu
 515 520 525
 Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu
 530 535 540
 Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp
 545 550 555 560
 Leu Trp Val

<210> 37

<211> 603

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti EGFR-28zG-CAR sequence

<400> 37

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

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Val Leu
 145 150 155 160
 Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile
 165 170 175
 Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln
 180 185 190
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp
 195 200 205
 Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
 210 215 220
 Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly
 245 250 255
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
 260 265 270
 Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 530 535 540
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ser Gln Cys Met Trp
 545 550 555 560
 Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp
 565 570 575
 Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala
 580 585 590
 Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val
 595 600
 <210> 38
 <211> 603
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti EGFR-z28G-CAR sequence
 <400> 38
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr
 115 120 125

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

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

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

 Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala
 275 280 285
 Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val
 290 295 300
 Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
 305 310 315 320
 Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
 325 330 335

 Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
 340 345 350
 Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
 355 360 365
 Cys Ser Thr Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti EGFR-G28z-CAR sequence

<400> 39

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

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly
 245 250 255
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
 260 265 270
 Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala
 275 280 285
 Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val
 290 295 300
 Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
 305 310 315 320
 Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
 325 330 335
 Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
 340 345 350
 Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
 355 360 365
 Cys Ser Thr Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
 370 375 380
 Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 385 390 395 400
 Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val
 405 410 415
 Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu
 420 425 430
 Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp
 435 440 445
 Val Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 450 455 460
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

