



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0110128
(43) 공개일자 2020년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0120852

(22) 출원일자 2019년09월30일

심사청구일자 2019년09월30일

(30) 우선권주장

1020190029845 2019년03월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

장미희

서울특별시 성북구 화랑로14길 5(하월곡동)

전은성

경기도 남양주시 의안로 155, 1801동 204호(평내동, 평내마을신명스카이뷰아파트)

주안나

서울특별시 성북구 화랑로14길 5(하월곡동)

(74) 대리인

리앤티특허법인

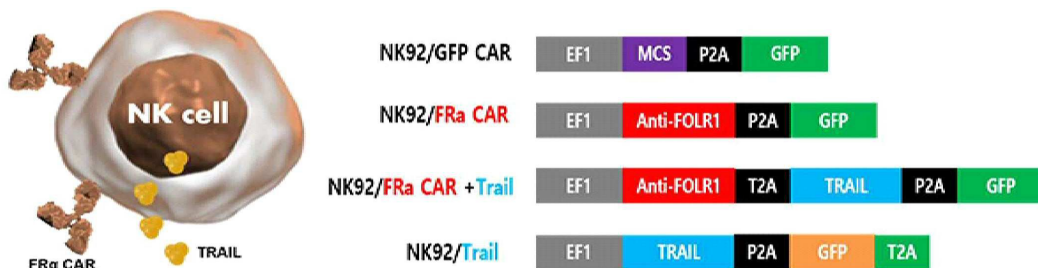
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 암 상살 능력이 향상된 면역세포

(57) 요약

암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현 및/또는 TRAIL을 발현하는 유전적으로 변형된 면역세포, 상기 면역세포를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물, 세포 치료제, 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법, 유전적으로 변형된 면역세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70578 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2740/15041 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2E29360
부처명	한국과학기술연구원 의공학연구소
과제관리(전문)기관명	한국과학기술연구원
연구사업명	한국과학기술연구원 기관고유원천사업
연구과제명	항암백신 개발을 위한 암항원 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2017.01.01 ~ 2019.03.12

명세서

청구범위

청구항 1

암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)을 발현하는 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 면역세포는 암 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 재조합 벡터의 도입에 의한 것인, 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 재조합 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 및 배시니아 바이러스, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티 바이러스 발현 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 면역세포는 대식세포, B 림프구, T 림프구, 비만 세포, 단핵구, 수지상 세포, 호산구, 자연살해세포, 호염기구, 및 호중구로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인 면역세포.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 폴레이트 리셉터 알파(Folate receptor alpha: FOLR1)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 것인, 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 암 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편인 것인 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 항체의 단편은 scFv인 것인 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는 것인, 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 세포내 신호 전달 도메인은 보조자극 도메인(costimulatory domain), CD3z 또는 이들의 조합을 포함하는 것인, 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 10

TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 면역세포는 TRAIL 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 도입에 의한 것인, 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 12

청구항 1 또는 청구항 10의 유전적으로 변형된 면역세포는 암 세포 특이적인 항원을 발현하는 암세포에 대하여 세포독성을 나타내는 것인, 유전적으로 변형된 면역세포.

청구항 13

청구항 1 또는 청구항 10의 유전적으로 변형된 면역세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 암은 폐암, 후두암, 위암, 대장/직장암, 간암, 담낭암, 췌장암, 유방암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 신장암, 상피세포에서 유래하는 암종(carcinoma), 골암, 근육암, 지방암, 결합조직세포에서 유래하는 육종(sarcoma), 백혈병, 림프종, 다발성골수종의 조혈세포에서 유래하는 혈액암, 신경조직에 발생하는 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 약학적 조성물.

청구항 15

청구항 1 또는 청구항 10의 유전적으로 변형된 면역세포를 유효성분으로 포함하는, 세포 치료제.

청구항 16

청구항 1 또는 10의 유전적으로 변형된 면역세포를 개체로부터 분리된 표본과 접촉시키는 단계를 포함하는, 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 17

(1) 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함, (2) TRAIL 유전자를 포함, 또는 (3) 이들의 조합을 포함하는 재조합 백터를 인체에서 분리된 면역세포에 도입시키는 단계를 포함하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현 또는 TRAIL 단백질 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포, 상기 면역세포를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물, 세포 치료제, 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법, 유전적으로 변형된 면역세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 부각되고 있는 암 면역치료법 (cancer immunotherapy) 은 인체 고유의 면역 시스템을 활용하여 정상 세포의 손상을 최소화 하여, 암세포를 보다 특이적으로 제거하는 치료법으로, 여러 세부 분야 (항체 치료법, 면역세포 치료법, 바이러스 면역 치료법, 나노 기술 면역 치료법 등)의 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 중 면역세포 치료는 환자의 혈액에서 얻어진 림프구 (lymphocyte) 중, 자연살해세포 (natural killer cell), 자연살생 T세포 (natural killer T cell), T 세포, B 세포, 수지상 세포 (dendritic cell) 등의 세포 수를 늘리고, 체외 (in vitro) 에서 기능을 강화하여, 이를 다시 환자 몸에 되돌림으로써, 암을 치료하는 방법이다. 이러한 면역세포를 이용한 치료법은 면역반응 조절치료에 좋은 효과를 보이고, 독성 및 안전성 면에서 우수하다고 평가되고 있다.

[0003] 특히 최근들어 면역세포 요법으로 체내의 면역세포를 꺼내서, 강화시키거나 유전공학적으로 변형시켜 다시 넣어서 주는 세포치료 방식에 대한 관심이 높아지고 있다. 이의 대표적인 예로는 종양 침윤 림프구 (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TIL), 키메라 항원 수용체 (Chimeric Antigen Receptor, CAR), T세포 수용체 (T-Cell Receptor, TCR) 기술 등이 있으며, 특히 유전자 재조합 변형을 이용한 인공 수용체인 CAR를 이용한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

[0004] 키메라 항원 수용체 (CAR: chimeric antigen receptor)는 T 세포에 항원 특이성을 전달하도록 설계된 인공 수용체이다. 이들은 T 세포를 활성화하고 특이적 면역성을 제공하도록 선택된 항원 특이적 구성요소, 막관통 구성요소, 및 세포 내 구성요소를 포함한다. 키메라 항원 수용체 발현 T 세포는 암 요법을 포함한 다양한 요법에 사용

될 수 있다.

[0005] 그러나 CAR-T와 같은 치료제는 종양에 대해 효과적이지만, 일부 경우에 이들 치료는 건강한 조직에 부분적으로 비특이적인 공격으로 인한 부작용을 일으켜 왔다. 이를 극복하기 위하여 현재는 3세대 CAR-T에 대한 연구가 진행 중이며, 이는 보조자극신호 역할을 하는 신호도메인 2개와 인공수용체 (Additional engineered receptor)가 추가되어 '암세포 항원 인식 능력'이 높아져 정상세포를 공격하는 부작용을 최소화하려는 것을 특징으로 한다.

[0006] 그럼에도 불구하고 현재의 CAR-T 기술은 암세포에서 발현하는 오직 하나의 단백질을 인지하도록 제조되어 개별적 치료제 개발에 너무 많은 비용이 소모된다는 한계점과 더불어, CAR-T가 한번 주입되면 독성을 가진 T 세포가 암세포들이 제거된 후에도 그 기능이 지속되어 독성을 초래한다는 점, 표적 단백질을 나타내는 정상 세포가 있는 경우 이에 대해서도 비 특이적 공격을 유발하여 치명적인 부작용을 야기하는데 이를 되돌릴 수가 없다는 점의 문제점이 CAR-T 세포 치료제의 개발을 저해하고 있다.

[0007] 이에 NK 세포를 이용한 면역세포치료는 부작용 없이 타인의 면역세포를 이용할 수 있는 유일한 세포치료라는 장점을 가지고 있어 그에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 지난 10 여 년 동안 환자들의 면역 시스템을 이용한 종양 면역 치료가 꾸준히 발전되어 왔고, 이를 이용한 '세포치료제 (cell therapy product)'도 상업화되고 있다. 따라서 최근 환자 맞춤형 치료를 도모하기 위하여 키메라 항원 수용체를 도입한 면역 세포(예를 들면, CAR-NK cell)를 건강한 정상인 혈액으로부터 분리, 배양하여 암환자에게 주입하여 치료하는 세포치료제에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 TRAIL을 발현하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제공한다.

[0009] 일 양상은 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제공한다.

[0010] 일 양상은 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 일 양상은 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 유효성분으로 포함하는, 세포 치료제를 제공한다.

[0012] 또 다른 양상은 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 개체로부터 분리된 표본과 접촉시키는 단계를 포함하는, 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0013] 또 다른 양상은 (1) 암에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함, (2) TRAIL 유전자를 포함, 또는 (3) 이들의 조합을 포함하는 재조합 벡터를 인체에서 분리된 면역세포에 도입시키는 단계를 포함하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제조하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제공한다.

[0015] TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제공한다.

[0016] 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 유효성분으로 포함하는, 세포 치료제를 제공한다.

[0018] 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 개체로부터 분리된 표본과 접촉시키는 단계를 포함하는, 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0019] (1) FOLR1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함, (2) TRAIL 유전자를 포함, 또는 (3) 이들의 조합을 포함하는 재조합 벡터를 인체에서 분리된 면역세포에 도입시키는 단계를 포함하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 일 양상에 따른 유전적으로 변형된 면역세포를 이용하면 FOLR1, DR4, DR5, 또는 이들의 조합을 포함하는 암세포에 대한 우수한 세포 독성이 인정되는바, 항암제로 효과적으로 활용할 수 있다. 따라서, 일 양상에 따라 제조된 유전적으로 변형된 면역세포는 효율 높은 항암 효과가 나타나므로 유전자 치료법에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 채장암 세포주인 PNAC-1, Aspc1 및 Miapaca2와 환자로부터 유래된 암 세포주(Patient-derived cells: PDC)인 SNU213, 410, 2491 및 110621에서 확인한 FOLR1의 발현여부를 확인한 웨스턴블랏팅 실험결과를 나타낸 도이다.

도 2는 암세포주인 PNAC-1, Aspc1, Miapaca2, SNU213, 410, 2491 및 110621에서 확인한 FOLR1, DR4 및 DR5의 발현을 FACS 분석을 통해 나타낸 도이다.

도 3은 형질전환시킨 NK세포와 NK 세포에 도입한 벡터를 모식화하여 나타낸 도이다.

도 4는 제조된 CAR-NK세포에서 FACS 분석(도 4A), α -CD3zeta에 대한 일차 항체를 통해 확인한 웨스턴블랏팅(도 4B), 및 다초점형광현미경(도 4C)을 통하여 CAR의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5a는 제조된 CAR-NK세포를 암 세포주 SNU2491 에 처리하여 세포 사멸 효과를 나타낸 도이다.

도 5b는 제조된 CAR-NK 세포를 SNU2491 및 SNU2469에 처리하여 세포 특이적 사멸 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 제조된 CAR-NK세포를 암 모델 마우스에 투여 이후 18일째에 나타나는 암세포의 부피 감소 효과를 통한 증식 억제능 확인한 결과(도 6A) 및 상기 CAR-NK 세포를 투여한 3, 6, 9, 12, 15 및 18일 후에 측정된 종양 부피를 나타낸 결과(도 6B)를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 일 양상은 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 TRAIL을 발현하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제공한다.

[0023] 상기 면역세포는 대식세포, B 림프구, T 림프구, 비만 세포, 단핵구, 수지상 세포, 호산구, 자연살해세포, 호염기구, 및 호중구로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0024] 상기 "자연살해세포(natural killer cell : NK 세포)"는 선천적인 면역을 담당하는 혈액 속 백혈구의 일종으로 '자연살해세포'라고도 한다. 상기 NK 세포는 바이러스에 감염된 세포나 암세포를 직접 공격해 없애는 것을 주된 기능으로 하고 있다. 특히 NK세포가 암세포를 공격해 암세포의 발생과 증식, 전이를 막는다는 것 외에도 암이 재발하는데 가장 중요한 역할을 하는 암 줄기세포를 효과적으로 제어할 수 있다는 것이 알려져 있고, 학계에서는 이 NK세포를 이용한 항암치료를 계속 연구하고 있으며, 최근 키메라 항원 수용체를 도입한 CAR-NK에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

[0025] 상기 암 세포 항원, 즉, 암 관련 항원의 종류로는 폴레이트 리셉터 알파(Folate receptor alpha: FOLR1), HER2,HER2/neu, NKG2D, PSMA, CEA, IL13Roc2, EphA2, BCMA, CSPG4, CD138, survivin, CD19, CD20, CD22, k light chain, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2 ,ErbB3/4, ErbB dimers, EGFr vIII, carcinoembryonic antigen, EGP2, EGP40, mesothelin, TAG72, PSMA, NKG2D ligands, B7-H6, IL-13 receptor a2, MUC 1, MUC 16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY- ESO- 1, PSCA, folate receptor-a, CD44v6, CD44v7/8, avb6 integrin, 8H9, NCAM, VEGF receptors, 5T4, Baff , GPC2, CD56, Foetal AchR, NKG2D ligands, 또는 CD44v6를 포함할 수 있다.

[0026] 상기 키메라 항원 수용체는 상기에서 언급된 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0027] 일 구체예에 있어서, 키메라 항원 수용체는 폴레이트 리셉터 알파(Folate receptor alpha: FOLR1)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인일 수 있다.

[0028] 상기 FOLR1 단백질은 FOLR1 유전자에 의해 코딩되며, folate receptor (FOLR) 계열의 구성원으로 알려져 있으며, 상기 단백질은 폴산 및 여러 가지 폴산 유도체에 대한 친 화성이 높으며 세포 내부에 5- 메틸테트라히드로폴레이트(5-methyltetrahydrofolate) 전달을 매개하는 것으로 알려져 있다.

[0029] 상기 유전적으로 변형된 면역세포, 예를 들어 자연살해 세포는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 시퀀스를 포함하는 재조합 벡터에 의하여 도입되는 것을 포함한다. 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현

시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 및 배시니아 바이러스, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티 바이러스 발현 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등과 같은 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드, ϕ gt4 ϕ B, ϕ -Charon, ϕ β 및 M13 등과 같은 파지 또는 SV40 등과 같은 바이러스를 조작하여 제작될 수 있다.

[0030] 상기 재조합 벡터에서 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결된다. 용어 "작동적으로 연결된(operatively linked)"은 프로모터 서열과 같은 뉴클레오타이드 발현 조절 서열과 다른 뉴클레오타이드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0031] 상기 재조합 벡터는, 숙주 세포 내에서 안정적으로 상기 융합 단백질을 발현시킬 수 있는, 발현용 벡터일 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0032] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL ϕ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노 바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0033] 상기 세포, 예를 들면, 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 원생동물 (protozoa), 식물, 고등 식물 및 곤충, 또는 양서류의 세포, 또는 CHO, HeLa, HEK293, 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는, 배양된 세포 (인 비트로), 이식된 세포 (graft cell) 및 일차 세포 배양 (인 비트로 및 엑스 비보(ex vivo)), 및 인 비보 (in vivo) 세포, 및 또한 인간을 포함하는 포유동물의 세포 (mammalian cell)일 수 있다. 또한, 상기 유기체는 효모, 곰팡이, 원생동물, 식물, 고등 식물 및 곤충, 양서류, 또는 포유 동물일 수 있다.

[0034] 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 유전적으로 변형된 면역세포, 예를 들어 유전적으로 변형된 자연살해 세포 (이하 "CAR-NK 또는 CAR-자연살해 세포")는 기존의 CAR-T 치료제를 이용한 암 면역치료가 가지고 있는 지속적인 독성에 의한 문제점, 자가면역 질환의 위험, 이종세포 이식에 대한 이식편대숙주질환 (GVHD)의 문제점 및 비표적 독성 문제 등을 반응 개시(on)/중지(off)의 스위치를 통해 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 다양한 암세포를 표적할 수 있도록 하여 범용의 치료제로 활용가능한 장점이 있다. 상기 CAR-NK 세포는 동종이식이 가능하기 때문에 환자 자신의 면역세포를 사용하는 CAR-T에 비해 고효율 세포의 premade가 가능하므로, 치료제의 투여시기를 단축하여 치료효능을 증가시킬 뿐만 아니라 개발 및 치료비용의 절감에 따라 다양한 질환에 대한 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 "항체"는, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 또한 본 명세서에서 항체란 항원 결합능을 보유한 항체의 단편, 예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0036] "키메라 항체"는, 항체 가변영역 (variable region) 또는 이의 상보성 결정 영역 (complementarity determining region, CDR)이 항체의 나머지 부분과 상이한 동물에서 기원된 항체를 말한다.

[0037] 이러한 항체는, 예를 들어, 항체 가변 영역은 인간 이외의 동물 (예를 들면, 마우스, 토끼, 가금류 등)에서 유래하고, 항체 불변영역 (constant region)은 인간에서 유래한 항체일 수 있다. 이러한 키메라 항체는 당업계에 공지된 유전자 재조합 등의 방법으로 제조될 수 있다.

[0038] 상기 "중쇄"는, 항원에 대한 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변영역의 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도

메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체 길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 일컫는다.

- [0039] 본원에서 "경쇄"는, 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변영역의 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체 길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 일컫는다.
- [0040] 일 양상에 따른 키메릭 항원 수용체에 포함된 항원 결합 도메인은 주신호가 전달되는 부위로 세포막 외부에 있으며 특정 항원이 있는 타겟 세포의 세포막 리간드 (수용체에 결합하여 활성화 하는 물질)를 인지하는 부위를 말한다. 구체적인 일양상에서 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 사용하였으며, 상기 항원 결합 도메인은 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편을 사용하였다. 또한 항체의 단편은 scFv일 수 있으며, 상기 항체의 단편은 예컨대 서열번호 1로 표시되는 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 일 양상에 따른 키메릭 항원 수용체는 세포내 신호 전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0042] 키메릭 항원 수용체의 일 구성요소인 세포 내 신호 전달 도메인은 당분야에 알려진 세포 내 신호전달 도메인을 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 상기 세포 내 신호 전달 도메인은 보조자극 도메인 (costimulatory domain), CD3z 또는 이들의 조합일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 보조자극 도메인은 ICOS, CD27, CD28, 4-1BB, 및 OX40로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0043] 일 양상에 따른 키메릭 항원 수용체는 세포 내 신호전달 도메인으로 보조자극 도메인(costimulatory domain), CD3z 또는 이들의 조합을 이용함으로써 NK 세포의 높은 활성화로 암 세포에 대한 사멸효과를 나타낼 수 있다. 상기 CD3z(zeta)는 NK 세포 활성화 도메인으로 기능할 수 있다. 상기 보조자극 도메인 중 CD27은 예컨대 서열번호 2로 표시되는 염기서열일 수 있으며, 또한 CD3z는 예컨대 서열번호 3로 표시되는 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 구체적인 일 양상에 있어서 상기 키메릭 항원 수용체는 예컨대 서열번호 6으로 표시되는 염기서열일 수 있다.
- [0044] 일 양상은 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포를 제공한다.
- [0045] 일 양상에 따른 재조합 벡터는 TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand) 유전자를 더 포함하여, 상기 재조합 벡터가 도입된 세포에 있어서 TRAIL 단백질을 생산하도록 할 수 있다. 또한 상기 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포, 예를 들어 유전적으로 변형된 자연살해 세포는 TRAIL 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 도입에 의한 것일 수 있다. 상기 TRAIL 유전자는 예컨대 서열번호 4로 표시되는 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 일 양상에 따른 유전적으로 변형된 면역세포는 (1) 암 세포 특이적인 항원(예를 들면, FOLR)을 발현, (2) DR4 또는 DR5를 발현, 또는 (3) 이들의 조합을 발현하는 암세포에 대하여 세포독성을 나타내는 것일 수 있다.
- [0047] 일 구체예에서, FOLR1 항체의 단일 사슬 가변 단편 및 TRAIL을 포함하는 재조합 벡터의 도입에 의하여 유전적으로 변형된 면역세포, 예를 들어 유전적으로 변형된 자연살해 세포는 FOLR1 항체의 단일 사슬 가변 단편 또는 TRAIL을 포함하는 재조합 벡터의 다양한 암세포에 대한 항암효과보다 더 우수한 항암효과를 나타내는 것을 확인하였다(실시예 3). 또한 일 양상에 따른 CAR를 발현하는 NK 세포는 FOLR를 발현하는 암세포에 대한 세포 독성 효과가 우수하다.
- [0048] 일 양상은 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0049] 일 양상은 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메릭 항원 수용체 (CAR)을 발현하거나 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포, 예를 들어 유전적으로 변형된 자연살해 세포를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 암의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0050] 용어 "예방"은 암의 병인을 제거하거나 조기 발견하여 해당 질환을 막는 모든 행위를 의미한다.
- [0051] 용어 "치료"는 암에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0052] 용어 '암'이란 정상적인 세포사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하고, 주변 조직으로 침윤할 수 있는 특징을 갖는 질병군을 말한다. 상기 암은 예컨대, 폐암, 후두암, 위암, 대장/직장암, 간암, 담낭암, 췌장암, 유방암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 신장암, 피부암 등의 상피세포 등에서 유래하는 암종(carcinoma), 골암, 근육암, 지방암, 섬유세포암 등의 결합조직세포에서 유래하는 육종(sarcoma), 백혈병, 림프종, 다발성골수종 등의 조혈세포에서 유래하는 혈액암, 신경조직에 발생하는 종양 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종

이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0053] 일 양상에 따른 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하거나 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포, 예를 들어 유전적으로 변형된 자연살해 세포를 포함하는 약학적 조성물은 (1) 암 세포 특이적인 항원(예를 들면, FOLR)을 발현, (2) DR4 또는 DR5를 발현, 또는 (3) 이들의 조합을 발현하는 암세포에 대하여 우수한 암세포 사멸효과를 나타낸다.
- [0054] 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하거나 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체 즉 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린 용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및/또는 운반제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적정한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제 또는 흡입제로 제제화하는 것이 바람직하다.
- [0055] 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여방법은 특별히 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 정맥내, 피하, 복강 내, 흡입 또는 국소적용과 같이 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 치료를 필요로 하는 개체에 투여됨으로서 경감된 질병 상태에 대한 치료에 충분한 일 양상에 따른 치료용 물질의 양을 의미한다. 치료용 물질의 효과적인 양은 특정 화합물, 질병 상태 및 그의 심각도, 치료를 필요로 하는 개체에 따라 달라지며, 이는 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다. 비제한적 예로서, 일 양상에 따른 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있다. 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때 예를 들어 약 1,000~10,000 세포/회, 1,000~100,000세포/회, 1,000~1000,000 세포/회, 1,000~10,000,000, 1,000~100,000,000 세포/회, 1,000~1,000,000,000 세포/회, 1,000~10,000,000,000 세포/회로, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있고, 일정 시간 간격으로 여러 번 투여할 수 있다.
- [0056] '개체'란 암, 혈관질환, 또는 염증질환의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0057] 일 양상에 따른 약학적 조성물은 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하거나 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 또한 상기 면역세포를 유효성분으로 포함하면 암의 치료 및 예방을 위한 세포 치료제로 활용할 수 있다. 상기 약학적 조성물, 또는 세포 치료제는 암의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0058] 일 양상은 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 유효성분으로 포함하는, 세포 치료제를 제공한다.
- [0059] 용어 "세포치료제"는 조직의 기능을 복원하기 위하여 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 이용한 치료제로, 암의 억제에 위해 사용되는 치료제를 의미한다. 상기 면역세포, 예를 들어 유전적으로 변형된 자연살해 세포를 유효성분으로 포함하면 암의 치료 및 예방을 위한 세포 치료제로 활용할 수 있다.
- [0060] 상기 세포치료제는 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 예컨대 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, HSA(Human serum albumin) 및 이들 성분 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [0061] 또한 상기 세포치료제는 그 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 함황(含硫)환원제, 산화방지제 등을 적절히 첨가할 수 있다. 상기 현탁제의 예로는, 메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 히드록시에틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트라칸트말, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트 등을 들 수 있다.
- [0062] 용액보조제로는, 폴리옥시에틸렌경화피마자유, 폴리소르베이트 80, 니코틴산아미드, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트, 메크로콜, 피마자유지방산에틸에스테르 등을 들 수 있다. 안정화제로는, 덱스트란 40, 메틸셀룰로

오스, 젤라틴, 아황산나트륨, 메타황산나트륨 등을 들 수 있다.

[0063] 등장화제로는, 예를 들어 D-만니톨, 소르비톨 등을 들 수 있다.

[0064] 보존제로는, 예를 들어 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산에틸, 소르브산, 페놀, 크레졸, 클로로크레졸 등을 들 수 있다.

[0065] 흡착방지제로는, 예를 들어 인간혈청알부민, 레시틴, 텍스트란, 에틸렌옥사이드프로필렌옥사이드 공중합체, 히드록시프로필셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 폴리에틸렌글리콜 등을 들 수 있다.

[0066] 함황환원제로는, 예를 들어 N-아세틸시스테인, N-아세틸호모시스테인, 티옥토산, 티오디글리콜, 티오에탄올아민, 티오글리세롤, 티오소르비톨, 티오글리콜산 및 그 염, 티오황산나트륨, 글루타티온, 탄소원자 수 1~7 의티오알칸산 등의 술폰히드릴기를 갖는 것 등을 들 수 있다.

[0067] 산화방지제로는, 예를 들어 에리소르브산, 디부틸히드록시톨루엔, 부틸히드록시아니솔, α-토코페롤, 아세트산 토코페롤, L-아스코르브산 및 그 염, L-아스코르브산팔미테이트, L-아스코르브산스테아레이트, 아황산수소나트륨, 아황산나트륨, 갈릭산트리아밀, 갈릭산프로필 또는 에틸렌디아민테트라아세트산나트륨 (EDTA), 피로인산나트륨, 메타인산나트륨 등의 킬레이트제를 들 수 있다.

[0068] 또한 상기 세포치료제는 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 예를 들어 약 1,000~10,000 세포/회, 1,000~100,000세포/회, 1,000~1000,000 세포/회, 1,000~10,000,000, 1,000~100,000,000 세포/회, 1,000~1,000,000,000 세포/회, 1,000~10,000,000,000 세포/회로, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있고, 일정 시간 간격으로 여러 번 투여할 수 있다.

[0069] 본 발명에 따른 주사제품은 환자의 체질 및 결합의 종류에 따라 당 업계에 통상적으로 알려진 분량을 취하여 충전된 주사의 형태로 제조될 수 있다.

[0070] 용어 "치료제" 또는 "약학적 조성물"는, 대상체로의 투여 시에 몇몇 유리한 효과를 부여하는 분자 또는 화합물을 지칭한다. 유리한 효과는 진단적 결정을 가능하게 하는 것; 질병, 증상, 장애 또는 병태의 개선; 질병, 증상, 장애 또는 질환의 발병의 감소 또는 예방; 및 일반적으로 질병, 증상, 장애 또는 병태의 대응을 포함한다.

[0071] 본원에 사용되는 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는" 또는 "완화하는" 또는 "개선하는"은 상호교환가능하게 사용된다. 이들 용어는 치료 이익 및/또는 예방 이익을 포함하나 이들에 한정되지 않는 유리한 또는 요망되는 결과를 수득하는 방법을 지칭한다. 치료 이익은 치료 하의 하나 이상의 질병, 질환 또는 증상의 임의의 치료적으로 유의미한 개선 또는 그에 대한 효과를 의미한다. 예방 이익에 있어서, 조성물은 특정 질병, 질환 또는 증상이 발생할 위험이 있는 대상체에게 또는 질병, 질환 또는 증상이 아직 나타나지 않을지라도, 질병의 하나 이상의 생리학적 증상을 보고하는 대상체에게 투여될 수 있다.

[0072] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 유리한 또는 요망되는 결과를 야기하기에 충분한 작용제의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 치료되는 대상체 및 병태, 대상체의 체중 및 연령, 병태의 중증도, 투여 방식 등 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 상기 용어는 본원에 기술된 영상화 방법 중 임의의 것에 의한 검출을 위한 이미지를 제공할 용량에 적용된다. 특정 용량은 선택된 특정 작용제, 뒤따르는 투여 요법, 그것이 다른 화합물과 병용하여 투여되는지 여부, 투여 시기, 영상화되는 조직 및 그것을 운반하는 신체 전달 시스템 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있다.

[0073] 일 구체예에 있어서, 상기 CAR-NK를 발현하는 유전적으로 변형된 면역세포는 TRAIL과 병용 투여 시 상승적 효과를 갖는다.

[0074] 또 다른 양상은 상기 유전적으로 변형된 면역세포를 개체로부터 분리된 표본과 접촉시키는 단계를 포함하는, 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0075] 또한 다른 하나의 양태는 일 양상에 따른 폴레이트 리셉터 알파(Folate receptor alpha: FOLR1)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하거나 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포 면역세포, 예를 들어 유전적으로 변형된 자연살해 세포를 포함하는 암의 진단용 조성물 및 암 진단용 키트이다. 본 발명의 다른 하나의 양태는 일 양상의 폴레이트 리셉터 알파(Folate receptor alpha: FOLR1)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)을 발현하거나 TRAIL 단백질을 생산하는 유전적으로 변형된 면역세포를 포함하는 조성물을 개체로부터 분리된 샘플과 접촉시키

는 단계를 포함하는, 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법이다.

- [0076] 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성 (susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후 (prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스 (therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [0077] 또 다른 양상은 (1) 암 세포에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함, (2) TRAIL 유전자를 포함, 또는 (3) 이들의 조합을 포함하는 재조합 벡터를 인체에서 분리된 면역세포에 도입시키는 단계를 포함하는 유전적으로 변형된 면역세포, 예를 들어 유전적으로 변형된 자연살해 세포는 를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0078] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0079] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예 기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0080] **실시예 1. 암세포 특이적 표적항원의 확인**
- [0081] 다양한 종류의 암세포에서 공통적으로 발현하는 표적항원을 선택하기 위하여 췌장암 세포주인 PNAC-1, Aspc1 및 Miapaca2와 환자로부터 유래된 암 세포주(Patient-derived cells: PDC)인 SNU213, 410, 2491 및 110621에서 발현하는 마커들을 확인하는 실험을 웨스턴블롯팅(western blotting)과 형광표지세포분류기(fluorescence activated cell sorter: FACS) 분석을 통하여 수행하였다.
- [0082] 췌장암 세포주인 PNAC-1, Aspc1 및 Miapaca2와 환자로부터 유래된 암 세포주(Patient-derived cells: PDC)인 SNU213, 410, 2491 및 110621을 분석을 위한 전처리 후, 프로테아제 억제제(Thermo Scientific)가 보충된 RIPA 용해 완충액 (Sigma)을 첨가하여 용해시켰다. 총 50 μ g의 단백질을 면역 블롯팅을 위해 분석하였고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 항온 배양하여 FOLR1에 특이적인 1차 항체(ABcam)를 사용하여 검출하였고, 이후 horseradish 퍼옥시다제-결합 2차 항체로 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션시켰다. 단백질을 웨스턴 ECL 기질 (Bio-Rad)을 사용하여 화학 발광에 의해 가시화되었고, 상기 수득한 발광 이미지를 LAS-3000 (Fujifilm)으로 분석하였다. 밴드 강도를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하여 결과를 확인하였고, 이 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0083] 이후, 염색된 세포를 Guava easyCyte 흐름 세포측정기(Merck Millipore)를 사용하여 수집하고 FlowJo 버전 10.2 (TreeStar)로 분석하였다. FOLR1, DR4 및 DR5는 각각 APC-접합된 항-인간 FOLR1, APC-결합된 항-인간 DR4, 및 PE-결합된 항-인간 DR5 항체에 의해 검출하여 FACS 분석을 수행하고 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0084] 도 1에 나타난 바와 같이, 췌장암 세포주 라인인 PNAC-1, Aspc1 및 PDC인 SNU410 및 110621은 FOLR1이 거의 나타나지 않음을 확인하였다. 이외 Miapaca2에서는 α -FOLR1가 약한 정도로 나타났으나, 환자들로부터 유래한 암 세포주 SNU2491 및 SNU213에서는 α -FOLR1가 강한 정도로 나타나는 것이 확인되었다.
- [0085] 또한 도 2에서 확인한 바와 같이, 암세포주인 PNAC-1, Aspc1, Miapaca2, SNU213, 410, 2491 및 110621에서 확인한 결과, 일부 암세포에서 FOLR1가 발현된 것과 달리 TRAIL receptor인 DR4 및 DR5는 상기 7개의 암세포주에서 모두 다량으로 발현되는 것을 확인하였다.
- [0086] 종합해보면, FOLR1는 췌장암 일부 세포주에서만 발현되는 것이 확인되었으나, TRAIL receptor인 DR4 및 DR5는 다양한 종류의 암세포주에서 나타나는 것이 확인되었다. 이에, 췌장암 세포주 특이적인 타겟팅을 위하여 FOLR1을 사용할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 보다 다양한 종류의 암세포를 타겟팅하기 위한 암세포 특이적인 표적 항원마커로는 DR4 및 DR5를 활용할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0087] **실시예 2. 키메릭 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor : CAR)-NK 세포의 생산**
- [0088] 상기 실시예 1에서 확인한 FOLR1에 특이적인 키메릭 항원 수용체를 발현하는 CAR-NK 세포를 제조하는 경우 암세포 특이적인 사멸효과가 나타날 수 있는지를 확인하기 위하여 실험을 설계하였다. 또한 다양한 암세포에서 마커로 확인되는 DR4 및 DR5는 TRAIL receptor로 알려져 있는바, 암세포에 대한 세포 독성을 나타내어 항암효과를 나타낼 수 있는 NK세포에서 TRAIL을 발현하는 경우와 FOLR1 특이적 키메릭 항원 수용체를 발현하는 CAR-NK와 함께 TRAIL을 발현하는 NK 세포를 제조하는 경우 다양한 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있음을 확인하기 위하여 CAR-NK를 생산하기 위한 실험을 설계하였다.
- [0089] FOLR1 항체의 단일 사슬 가변 단편 (scFv)과 CD27 및 CD3z로 구성된 신호 전달 영역으로 구성된 융합 단백질을

발현하는 2 세대 CAR 벡터를 구축하였다. FOLR1의 scFv, CD27 및 CD3z을 포함하는 FOLR1-CAR DNA는 Creative biolabs (USA)에서 구입하였다. pLVXPuro (Cat. #632164)를 포함하는 렌티 바이러스성 발현 벡터(Lentiviral expression vectors)는 Addgene으로부터 입수하였다. GFP-발현 CAR-NK direct 플레이트 수용체의 생성을 위해, P2A 시퀀스 이하에 GFP를 포함하는 DNA 단편을 삽입하여 CAR 벡터 시퀀스를 제조하였다. 이후 TRAIL 유전자를 상기 FOLR1에 대한 단일 사슬 가변 단편을 도입한 벡터에 더 도입한 벡터를 제조하였으며, 이외 TRAIL 유전자만을 발현하도록 하는 벡터를 제조하여 GFP-발현 CAR-NK 또는 NK 세포에 삽입하였으며, 상기 형질전환시킨 NK세포와 NK 세포에 도입한 벡터를 각각 도 3에 나타내었다.

[0090] 실험방법은 구체적으로 다음과 같다 : 293T 세포를 Invitrogen 리포펙타민(Lipofectamin) 3000 시약 (Invitrogen, L3000-015)-매개 형질전환 방법을 통해 렌티바이러스-발현 벡터와 viral power lentiviral packaging MIX (Invitrogen, 44-2050)를 이용하여 형질전환 시켰다. 48시간 후, 배양 배지를 수확하고 1300rpm 에서 5 분간 원심분리 하였다. 원심 분리된 상등액을 0.45 μ m 필터에 통과시키고, 이후 이를 IL-2 200 IU/ml을 보충한 용액과 8 μ g/ml의 폴리브렌(santa cruz, sc-134220)을 1 : 1의 부피비로 첨가한 용액에 첨가하여, 2×10^5 개의 NK-92 세포를 렌티 바이러스 벡터와 함께 배양시켰다. 세포를 2 μ g/ml 농도의 푸로마이신(Sigma-Aldrich, USA)을 첨가하고, 2주 동안 배양하고 이를 이후에 선별하였다. 이후 상기 선별의 과정을 통하여 제조된 CAR-NK세포에서 형광표지세포분류기(fluorescence activated cell sorter: FACS) 분석, α -CD3zeta에 대한 일차 항체를 통해 확인한 웨스턴블랏팅(western blotting), 및 다초점형광현미경을 통하여 CAR의 발현을 확인하였으며, 구체적인 실험방법은 하기와 같다.

[0091] CAR로 형질 감염시킨 NK 세포주의 발현을 Guava easyCyte Flow cytometer (Merck Millipore)를 사용하여 평가하였고, FlowJo 버전 10.2 (TreeStar)로 분석하였다. 2×10^5 세포를 분석하고 GFP 발현 세포를 FL1 채널로 계수하였다. 또한, CAR가 형질도입된 3×10^4 개의 NK 세포를 IVID 접시에 접종하고 다초점형광현미경(Carl-zeiss, Germany)으로 발현을 확인하였다. 상기 CAR가 형질 도입된 3×10^4 개의 NK 세포를 프로테아제 억제제 (Thermo Scientific)가 보충된 RIPA 용해 완충액 (Sigma)을 사용하여 용해시켰다. 총 40 μ g의 단백질을 면역 블롯팅을 위해 분석하였고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 항온 배양하여 CD3ZETA (Santa cruz, 1 : 1000)를 사용하여 검출하였고, 이후 horseradish 퍼옥시다제-결합 2차 항체(Bethy Laboratories, 1 : 5000)로 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션시켰다. 이후 반응시킨 단백질을 웨스턴 ECL 기질 (Bio-Rad)을 사용하여 화학 발광에 의해 가시화하고, 상기 가시화한 발광 이미지를 LAS-3000 (Fujifilm)으로 분석하고, 측정된 밴드 강도를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였고, 이의 결과를 도 4A, 4B 및 4C로 나타내었다

[0092] 도 4A 이는 도 4B 및 도 4C에서 확인한 바와 같이, 키메릭 항원 수용체가 도입된 NK 세포는 본 발명의 키메릭 항원 수용체를 발현하고, TRAIL이 도입된 NK세포 역시 상기 물질을 분비하는 것을 확인하였는바, 본 실시예에 의하여 제조된 벡터는 효과적으로 CAR-NK 세포를 유전적으로 변형할 수 있음을 확인하였다.

[0093] 실시예 3. 제조된 CAR-NK세포를 통한 암세포주의 세포독성 효과의 확인

[0094] 상기 실시예 2에서 제조된 CAR-NK 세포가 다양한 세포주에서도 실제적인 항암효과를 나타낼 수 있는지 확인하기 위한 세포독성 확인 실험을 수행하였다. CAR가 형질도입된 NK-92 세포를 환자로부터 유래된 암 세포주 SNU2491 및 SNU2469인 표적 암세포 (2×10^5 cells)와 2.5:1 및 5:1의 비율로 첨가하여 4시간 동안 배양배지에서 공동 배양하였다. SNU2491 세포는 FOLR1의 발현이 높은 암세포주이다. 이후 상기 NK 세포를 시각화하기 위하여, FITC가 접합된 CD56 (Biolegend)로 라벨링하였다. 암세포의 사멸 효과를 평가하기 위해, 표적 세포를 분리하고, 세포 독성 분석에서 사멸된 세포 및 괴사 표적 세포를 표지하는 적색 형광 프로브인 7-아미노엑티노마이신D (7-AAD)로 염색하고, 이를 FACS를 사용하여 분석하였다. FITC-CD56-표지된 세포를 FL1 채널에서 측정하고 7-AAD 염색된 세포를 FL3 채널에서 측정하였고, 상기 결과를 도 5a에 나타내었다.

[0095] 또한, 특이적 세포 용해(specific cell lysis)를 FOLR1, DR4/5의 발현이 낮은 암세포주(SNU2469) 및 FOLR1, DR4/5의 발현이 높은 암세포주(SNU2491)에 대하여 확인하였고, 이를 도 5b에 나타내었다.

[0096] 도 5a에서 확인한 바와 같이, FOLR1, DR4/5 발현이 높은 SNU2491 암세포주에서는 GFP만을 발현하는 대조군 대비 Fra GFP CAR 및 TRAIL 을 발현하는 NK 세포를 공배양한 경우 보다 높은 정도의 세포 독성을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, FOLR1 항체의 단일 사슬 가변 단편을 포함하는 군(NK-Fra CAR)와 TRAIL을 발현하는 군(NK-TRAIL)이 더 우수한 세포 사멸 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히, Fra와 TRAIL의 조합을 발현하는 NK 세포(NK-Combi)는 향상된 시너지 효과가 나타나는데 특히 이는 Fra GFP 군의 세포 사멸효과보다 약 2배 이상

의 우수한 세포 사멸 효과를 나타나는 것임이 확인되었다.

[0097] 또한, 도 5b에 나타난 바와 같이, 낮은 FOLR1, DR4/5 발현이 나타나는 SNU2469에서는 대조군(GFP)과 Fra GFP CAR를 발현하는 군 사이에 차이가 거의 존재하지 않음을 확인하였다. 이에 반해, FOLR1, DR4/5의 발현이 높은 SNU2491 암세포주에서는 Fra와 TRAIL의 조합을 발현하는 NK 세포(NK-Combi)의 경우에는 상기 Fra와 TRAIL을 각각 발현하는 세포에 비해 약 2배 정도의 상승적인 세포 사멸 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0098] 종합적으로, CAR-NK세포에 있어서는 Fra GFP 벡터가 도입된 CAR-NK 세포, TRAIL-GFP 벡터가 도입된 CAR-NK 세포, Fra와 TRAIL의 조합을 발현하는 NK 세포(Fra-TRAIL-GFP)순으로 암세포에 대한 세포독성 효과가 우수하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 처리 대상이 되는 암세포 주에 있어서, 본 실시예에 의하여 제조된 CAR-NK세포는 FOLR1 과 DR4 및 5의 발현이 높은 암세포 주에서 세포 사멸효과가 더 우수하게 나타날 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0099] 실시예 4. 제조된 CAR-NK세포를 통한 동물 세포에서 암세포주 증식 억제 효과의 확인

[0100] 4.1 동물 세포에서 암세포 크기 감소 효과의 확인

[0101] 상기 실시예 2에서 제조된 CAR로 형질 감염시킨 CAR-NK 세포가 암세포의 증식억제를 효과적으로 할 수 있는지 확인하기 위하여, 암 질환 모델 마우스에 상기 CAR-NK 세포를 주입시키고 질환 모델 마우스의 암세포 부피를 측정하는 실험을 수행하였다.

[0102] 암 질환 모델 마우스를 제조하기 위하여, SNU2491 암세포 1.5×10^7 개를 50 %의 매트릭셀 용액(BD Biosciences)을 혼합된 배지에 배양시킨 이후, 이후 암컷 NSG (NOD / SCID / IL-2R γ null) 마우스의 왼쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 이후, 상기 마우스의 종양의 크기가 0.1 cm^3 에 도달하면 상기 실시예 2에서 제조한 배양된 NK 세포를 5×10^6 세포의 밀도로 3 일 간격으로 3 회 정맥 내 투여하였다. 각각의 개별 종양 부피를 3 일마다 측정하여, 총 18일 동안 상기 종양의 부피를 모니터링하고, 상기 종양의 부피를 $V = (A \times B^2) / 2$ 의 식에 의해 결정하였다. 상기 식에서 A는 종양에서 가장 큰 직경이고 B는 종양에서 가장 짧은 직경을 의미한다. 투여 후 28일째에 마우스를 희생시키고, 종양을 추가 조사하기 위하여 마우스를 해부하였고, 상기 CAR-NK 세포를 투여한 군의 암세포의 부피를 확인한 결과를 도 6A에, 상기 CAR-NK 세포를 투여한 3, 6, 9, 12, 15 및 18일 후에 측정한 종양 부피를 나타낸 결과를 도 6B에 나타내었다. Mock은 음성대조군으로 NK 세포를 미처리한 군에 관한 것이다.

[0103] 도 6A에 나타난 바와 같이, 대조군인 Mock 대비 GFP 및 TRAIL을 도입한 NK 세포를 투여한 군에서는 암 세포의 부피가 작아진 것을 확인하였다. Fra GFP CAR 을 투여한 군과 Fra GFP + TRAIL을 발현하는 군은 암세포의 부피가 현저하게 대조군인 Mock 대비 작아진 것을 확인할 수 있었다. 또한 도 6B에서 확인한 바와 같이, GFP, TRAIL 및 Fra GFP CAR 을 도입한 NK 세포군을 투입한 경우에는 NK 세포를 투여 후 18일을 경과한 경우 최초 암세포의 부피보다 약 20% 정도 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히 Fra GFP + TRAIL을 도입한 군은 형질 도입한 초기부터 현저하게 암세포의 부피가 줄어들었으며, 투여 후 18일이 경과한 경우에 초기 암세포의 부피보다 약 60% 감소한 것을 확인하였다.

[0104] 4.2 동물 세포에서 암세포 살상 효과의 확인

[0105] 상기 실시예 2에서 제조된 CAR로 형질 감염시킨 CAR-NK 세포가 암세포의 증식억제를 효과적으로 할 수 있는지 확인하기 위하여, 동물모델에서의 CAR-NK 세포의 투여를 통한 암세포 조직 세포 사멸 또는 괴사 정도를 확인하기 위한 TUNEL 염색 및 헤마톡실린-에오신 (H&E) 염색을 수행하였다.

[0106] 생체 내 암조직의 세포 사멸을 평가하기 위하여, 실시예 4.1에서 제조된 동물모델에서 마우스의 종양의 크기가 0.1 cm^3 에 도달하면 상기 실시예 2에서 제조한 배양된 NK 세포를 5×10^6 세포의 밀도로 3 일 간격으로 3 회 정맥 내 투여하였다. NK 세포 투여 후 28일째에 마우스를 희생시키고, 종양을 추가 조사하기 위하여 마우스를 해부하고, TUNEL 염색을 제조사의 지시에 따라 in situ 세포 사멸 검출 키트 (Roche)를 사용하여 수행하였다. 종양 조직 절편을 4 % 파라 포름 알데하이드로 고정시키고, 0.1 % Triton X-100 및 0.1 % 시트르산 나트륨으로 투과(permeabilize)시켰다. 이어서 종양 절편을 습기가 있는 대기상태에서 TUNEL 반응 혼합물과 함께 37 °C에서 1시간 동안 암실에서 배양하였다. PBS로 3회 세척한 후, 슬라이드를 DAPI 실장 배지 (Vector Laboratories)로 장착하고 Zeiss LSM 700 공 초점 현미경으로 확인하고 상기 확인한 결과를 도 6C에 나타내었다. Mock은 음성대

조군으로 NK 세포를 미처리한 군에 관한 것이다.

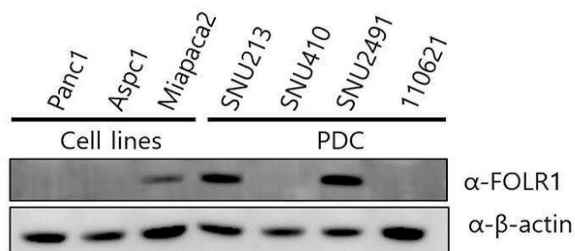
[0107] 또한 NK 세포 투여 후 28일째에 H&E 염색도 수행하였다. 종양을 4 % 파라 포름 알데히드에서 하룻밤 동안 고정시키고, 파라핀에 내장시킨 후, 마이크로톰 (Leica)을 이용하여 종양 절편이 6 μ m 단면을 갖도록 슬라이스하였다. 상기 제조된 절편을 크실렌으로 탈-파라핀화하고 등급화된 에탄올 세척을 사용하여 절편을 재수화시켰다. 종양 절편은 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색한 후 광학 현미경 (Olympus) 하에서 관찰하였고, 상기 결과들도 6D에 나타내었다. Mock은 음성대조군으로 NK 세포를 미처리한 군에 관한 것이다.

[0108] 도 6C에 나타난 바와 같이, TUNEL 염색에서는 SNU2491 암세포를 보유 마우스에서 GFP, Fra CAR, 및 TRAIL 각각을 투여한 군에서도 세포사멸이 나타나는 것이 확인되었으나, Fra GFP + TRAIL을 함께 투여한 결합 치료군 (Combi)에서는 암세포의 세포사멸 정도가 유의하게 검출되는 것을 확인하였다. 또한 도 6D에 나타난 바와 같이, H&E 염색을 수행한 경우에도 GFP, Fra CAR, 및 TRAIL 각각을 투여한 군보다 FRa와 TRAIL을 함께 병용하여 투여한 군(Combi)에서 암세포의 괴사가 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었다.

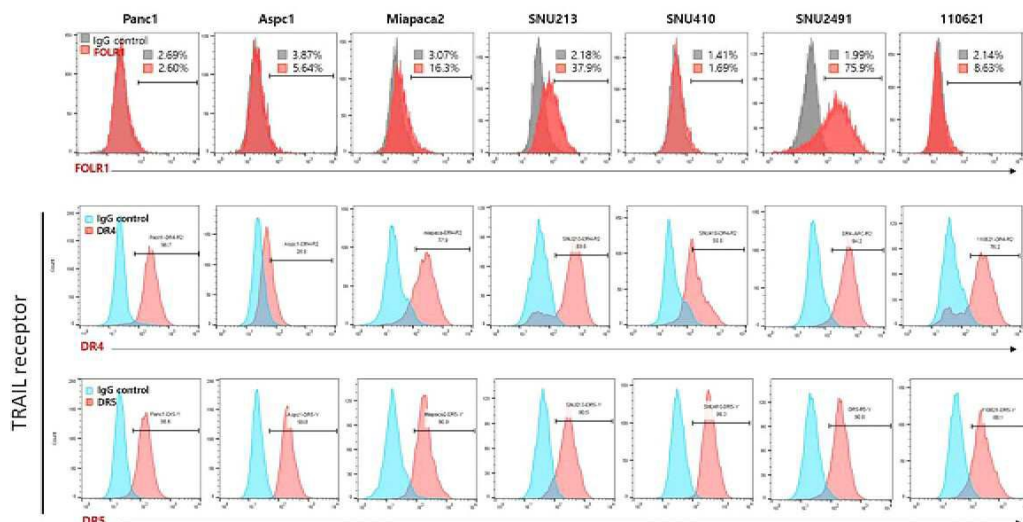
[0109] 따라서, 본 발명의 CAR와 TRAIL 유전자를 동시에 도입시켜 발현시키는 경우 Fra GFP CAR 을 도입한 NK 세포군에서 발생하는 나타나는 암세포 증식 억제 효과 보다 큰 상승효과가 발생하여 현저한 항암효과가 나타날 수 있음을 질환 마우스를 통하여 확인하였다.

도면

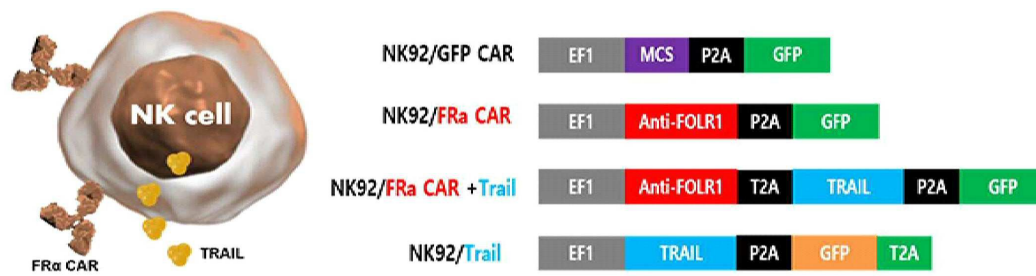
도면1



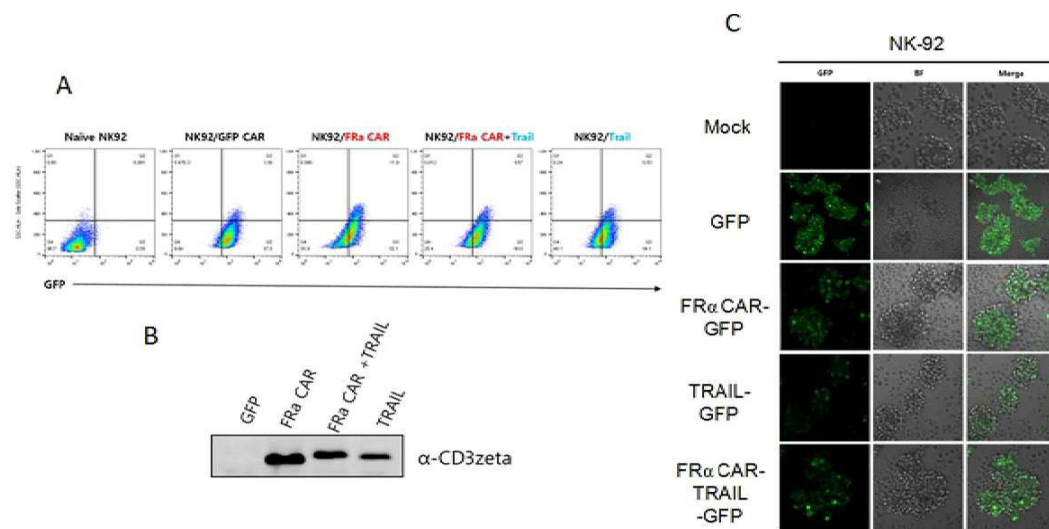
도면2



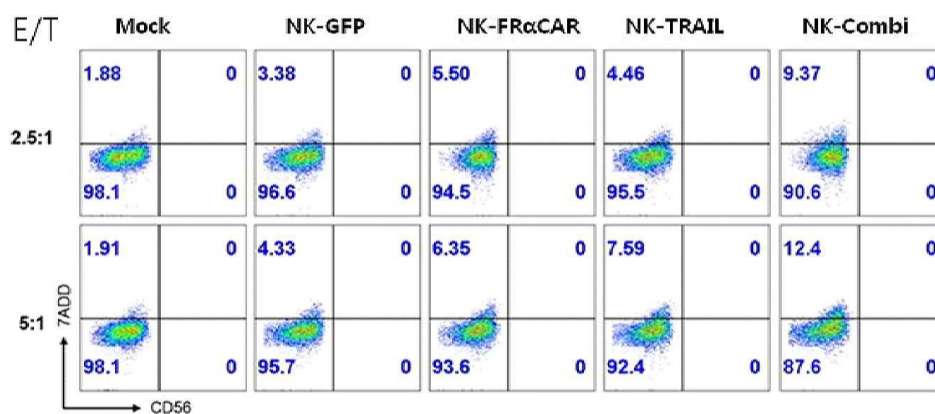
도면3



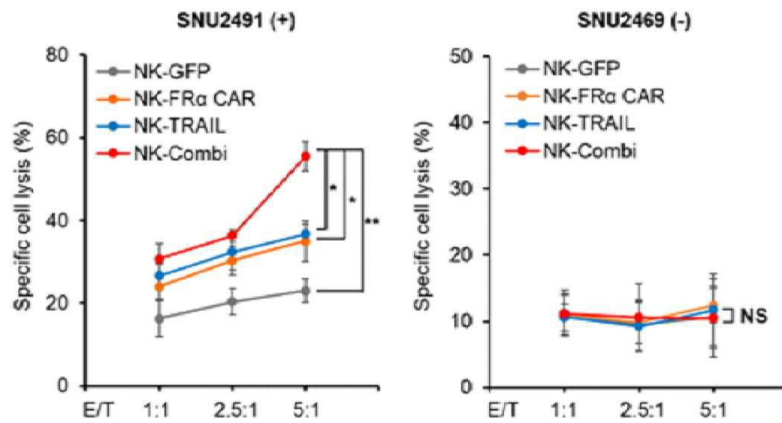
도면4



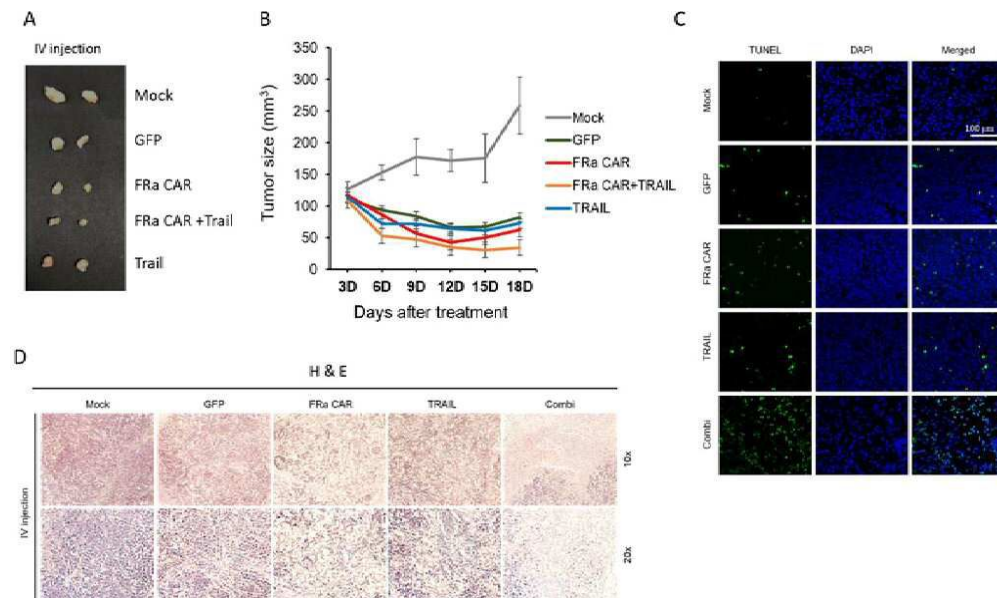
도면5a



도면5b



도면6



서열 목록

- <110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- THE ASAN FOUNDATION
- University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Immunocytes with improved cancer-fighting ability
- <130> PN129191
- <150> KR 10-2019-0029845
- <151> 2019-03-15
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 792

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv domain against FOLR

<400> 1

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgttgctc ttctgtcca gccgctcgg 60

ccccagctgg ttgaatctgg cggaggactg gtgcagcctg gcagatctct gagactgagc 120

tgtaccacca gcggcttcac cttcggcgac tacgccatga ttggggccag acaggccctt 180

ggcaaaggcc tggaatgggt gtccagcatc agcagcagct ccagctacat ctactacgcc 240

gacagcgtga agggcagatt caccatcagc cgggacaacg ccaagaacag cctgtacctg 300

cagatgaact ccctgagagc cgaggacacc gccgtgtact attgcgccag agagagatac 360

gacttttggg gcggcatgga cgtgtggggc aagggcacaa cagtgcagct ctcttctggc 420

ggcggaggaa gcggaggcgg aggttctgtt ggatctgtct ggagtgtctt gacacagcct 480

gcctccgtgt ctggatctcc tggccagagc atcacaatca gctgtaccgg caccagctcc 540

gacgtgggca gctacaatct ggtgtcctgg taccagcaac accccggcaa gggccctaag 600

ctgatgatct acgagggcag caaaagacc agcggcgtgt ccaatagatt cagcggcagc 660

aagtctggca acgccgcctc tctgacaatc agcggactgc aggtgagga cgaggccgat 720

tactactgcc agagctacga cagcagcctg agcgtggtgt ttggcggagg caccaaactg 780

acagtgtctg ga 792

<210> 2

<211> 207

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD27

<400> 2

atccttgtga tcttctctgg aatgttcctt gttttcaccc tggccggggc cctgttcctc 60

catcaacgaa ggaatatag atcaaacaaa ggagaaagtc ctgtggagcc tgcagagcct 120

tgtcattaca gctgccccag ggaggaggag ggcagcacca tccccatcca ggaggattac 180

cgaaaaccgg agcctgcctg ctcccc 207

<210> 3

<211> 337

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3zeta

<400> 3

cgcgtgaaat tcagccgcag cgcagatgct ccagcctaca agcaggggca gaaccagctc 60

tacaacgaac tcaatcttgg tcggagagag gactacgacg tgctggacaa gcggagagga 120

cgggaccag aaatgggcgg gaagccgcgc agaaagaatc cccaagaggg cctgtacaac 180

gagctccaaa aggataagat ggcagaagcc tatagcgaga ttggtatgaa aggggaacgc 240

agaagaggca aaggccacga cggactgtac cagggactca gcaccgccac caaggacacc 300

tatgacgctc ttcacatgca ggccctgccg cctcggg 337

<210> 4

<211> 843

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAIL gene sequence

<400> 4

atggctatga tggaggtcca ggggggaccc agcctgggac agacctgcgt gctgatcgtg 60

atcttcacag tgctcctgca gtctctctgt gtggctgtaa cttacgtgta ctttaccac 120

gagctgaagc agatgcagga caagtactcc aaaagtggca ttgcttggtt cttaaaagaa 180

gatgacagtt attgggaccc caatgacgaa gagagtatga acagcccctg ctggcaagtc 240

aagtggcaac tccgtcagct cgttagaaag atgattttga gaacctctga ggaaaccatt 300

tctacagttc aagaaaagca acaaaatatt tctcccctag tgagagaaag aggtcctcag 360

agagtagcag ctacataac tgggaccaga ggaagaagca acacattgtc ttctccaaac 420

tccaagaatg aaaaggtctt gggccgcaaa ataaactcct gggaatcatc aaggagtggg 480

cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg aatggtgaac tggatcatca tgaaaaaggg 540

ttttactaca tctattccca aacatacttt cgatttcagg aggaataaaa agaaaacaca 600

aagaacgaca acaaatgggt ccaatatatt tacaataca caagttatcc tgacctata 660

ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt tggctctaaag atgcagaata tggactctat 720

tccatctatc aagggggaat atttgactt aaggaaaatg acagaatttt tgtttctgta 780

acaaatgagc acttgataga catggacat gaagccagtt ttttcggggc ctttttagtt 840

ggc 843

<210> 5

<211> 687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP sequence

<400> 5

atggagagcg acgagagcgg cctgcccgcc atggagatcg agtgccgcat caccggcacc	60
ctgaacggcg tggagttcga gctggtgggc ggcgagagg gcaccccaa gcaggccgc	120
atgaccaaca agatgaagag caccaaaggc gccctgacct tcagccccta cctgctgagc	180
cacgtgatgg gctacggctt ctaccattc ggacactacc ccagcggcta cgagaacccc	240
ttctgcacg ccatcaaca cggcggctac accaacaccc gcatcgagaa gtacaggac	300
ggcggcgtgc tgcacgtgag cttcagctac cgctacgagg ccggccgct gatcggcgac	360
ttcaagtggt tgggcaccgg cttccccgag gacagcgtga tcttcaccga caagatcatc	420
cgcagcaacg ccaccgtgga gcacctgcac cccatgggcg ataacgtgct ggtgggcagc	480
ttcggccga cttcagcct gcgcgacggc ggctactaca gcttcgtggt ggacagccac	540
atgcacttca agagcgccat ccaccccagc atcctgcaga acggggggccc catgttcgcc	600
ttccggcgcg tggaggagct gcacagcaac accgagctgg gcatcgtgga gtaccagcac	660
gccttcaaga ccccatgtc cttcgcc	687

<210> 6

<211> 11395

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic FOLR-CAR DNA sequence

<400> 6

tggaagggtc aattcactcc caaagaagac aagatatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccaggggtc agatatccac	120
tgacctttgg atggtgttac aagctagtac cagttgagcc agataaggta gaagaggcca	180
ataaaggaga gaacaccagc ttgttacacc ctgtgagcct gcatgggatg gatgacccgg	240
agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcacac gtggcccag	300
agctgcatcc ggagtacttc aagaactgct gatatcgagc ttgctacaag ggactttccg	360
ctggggactt tcaggagg cgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
cctgcatata agcagctgct ttttgctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
gcctgggagc tctctggcta actaggggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgctt	540
tgagtgttc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc	600

agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag	660
cgaaaggga accagaggag ctctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg	720
caagaggcga gggcgccga ctggtagta cgccaaaaat ttgactagc ggaggctaga	780
aggagagaga tgggtgcgag agcgtcagta ttaagcgggg gagaattaga tcgcgatggg	840
aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaaga aaaaatataa attaaaacat atagtatggg	900
caagcaggga gctagaacga ttgcagtta atcctggcct gttagaaaca tcagaaggct	960
glagacaaat actgggacag ctacaacat cccttcagac aggatcagaa gaacttagat	1020
cattatataa tacagtagca accctctatt gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca	1080
ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag agcaaaacaa aagtaagacc accgcacagc	1140
aagcgcccg ccgctgatct tcagacctgg aggaggagat atgagggaca attggagaag	1200
tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc	1260
aaagagaaga gtgggtgcaga gagaaaaaag agcagtggga ataggagctt tgttccttgg	1320
gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg cgacgcgtca atgacgctga cggtagcaggc	1380
cagacaatta ttgtctggtg tagtgcagca gcagaacaat ttgctgaggg ctattgaggc	1440
gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg gggcatcaag cagctccagg caagaatcct	1500
ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca gctcctgggg atttggggtt gctctggaaa	1560
actcatttgc accactgctg tgccttggaa tgctagtgg agtaataaat ctctggaaca	1620
gatttgaat cacacgacct ggatggagtg ggacagagaa attaacaatt acacaagctt	1680
aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa ccagcaagaa aagaatgaac aagaattatt	1740
ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa ttggtttaac ataacaaatt ggctgtggtg	1800
tataaaatta ttcataatga tagtaggagg cttagtaggt ttaagaatag tttttgctgt	1860
actttctata gtgaatagag ttaggcaggg atattcacca ttatcgtttc agaccacct	1920
ccaaccccc aggggacccg acaggccccga aggaatagaa gaagaagtg gagagagaga	1980
cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg atctcgacgg tatcgctttt aaaagaaaag	2040
gggggattgg ggggtacagt gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac	2100
aaactaaaga attacaaaa caaattacaa aaattcaaaa ttttcgggtt tattacaggg	2160
acagcagaga tccagtttat cgatgagtaa ttcatacaaa aggactcgcc cctgccttgg	2220
ggaatcccag ggaccgtcgt taaactccca ctacgtaga acccagagat cgctgcgttc	2280
ccgccccctc acccgccccg tctcgtcatc actgaggtgg agaagagcat gcgtgaggct	2340

ccggtgcccc tcagtgggca gagcgacat cggccacagt ccccgagaag ttggggggag	2400
gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcg ggtaaacctgg gaaagtgatg	2460
tcgtgtactg gctccgcctt ttcccgagg gtgggggaga accgtatata agtgcagtag	2520
tcgccgtgaa cgttctttt cgcaacgggt ttcccgccag aacacaggta agtgccgtgt	2580
gtggttcccc cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactt	2640
ccacgccctt ggctgcagta cgtgattctt gatcccgagc ttccgggttg aagtgggtgg	2700
gagagtcca ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg	2760
cttgggcgct ggggcgcgcg cgtgcgaatc tggtggcacc ttgcgcctg tctcgtgct	2820
ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacct tttttctgg	2880
caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc	2940
gcgggcgcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga	3000
gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtcct	3060
ggcctcgcgc cgcctgtgat cggccgccc tgggcggcaa ggctggccc gtcggcacca	3120
gttgctgag cggaaagatg gccgttccc ggccctctg caggagctc aaaatggagg	3180
acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag taccacac aaaggaaaag ggcctttccg	3240
tcctcagccg tcgttcatg tgactccacg gactaccggg cgcctccag gcacctgat	3300
tagttctga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg	3360
gagtttccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgca cttgatgaa	3420
ttctccttgg aatttgcctt tttttagttt ggatcttgg tcatctcaa gcctcagaca	3480
gtggttcaaa gttttttct tccatttcag gtgtcgtgat tcgaattcgc caccatggcc	3540
ctccctgtca ccgcctgct gcttcgctg gctcttctgc tccacgccgc tcggccccag	3600
ctggttgaat ctggcggagg actggtgcag cctggcagat ctctgagact gagctgtacc	3660
accagcggt tcacctcgg cgactacgcc atgatttggg ccagacaggc ccctggcaaa	3720
ggcctggaat ggtgtccag catcagcagc agctccagct acatctacta cgccgacagc	3780
gtgaagggca gattcacat cagccgggac aacccaaga acagcctgta cctgcagatg	3840
aactccctga gagccgagga caccgccgtg tactattgcg ccagagagag atacacttt	3900
tggagcgga tggactgtg gggcaagggc acaacagtga cagtctcttc tggcgcgga	3960
ggaagcgag gcgagggtt tgggtgatct gcttggagt ctctgacaca gcctgcctcc	4020
gtgtctggat ctcttgcca gagcatcaca atcagctgta ccggcaccag ctccgacgtg	4080

ggcagctaca atctggtgtc ctggtatcag caacaccccg gcaaggcccc taagctgatg	4140
atctacgagg gcagcaaaag acccagcggc gtgtccaata gattcagcgg cagcaagtct	4200
ggcaacgccg cctctctgac aatcagcggg ctgcaggctg aggacgaggc cgattactac	4260
tgccagagct acgacagcag cctgagcgtg gtgtttggcg gaggcaccaa actgacagtg	4320
ctgggaatcc ttgtgatctt ctctggaatg ttctttgttt tcaccctggc cggggccctg	4380
ttctccatc aacgaaggaa atatagatca aacaaaggag aaagtctgt ggagcctgca	4440
gagccttgct attacagctg ccccagggag gaggagggca gcaccatccc catccaggag	4500
gattaccgaa aaccggagcc tgctgtctcc cccgcgtga aattcagccg cagcgcagat	4560
gtccagcct acaagcagg gcagaaccag ctctacaacg aactcaatct tggtcggaga	4620
gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga ggacgggacc cagaaatggg cgggaagccg	4680
cgcagaaaga atccccaaga gggcctgtac aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa	4740
gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg	4800
taccaggac tcagcaccgc caccaaggac acctatgacg ctcttcacat gcaggccctg	4860
ccgcctcggg gatccgtcga cggcagtgga gagggcagag gaagtctgct aacatgcggt	4920
gacgtcgagg agaatcctgg cccaatggct atgatggagg tccagggggg acccagcctg	4980
ggacagacct gcgtgctgat cgtgatcttc acagtgtcc tgcagtctct ctgtgtggct	5040
gtaacttacg tgtactttac caacgagctg aagcagatgc aggacaagta ctccaaaagt	5100
ggcattgctt gtttcttaaa agaagatgac agttattggg accccaatga cgaagagagt	5160
atgaacagcc cctgctggca agtcaagtgg caactccgtc agctcgtag aaagatgatt	5220
ttgagaacct ctgaggaaac catttctaca gttcaagaaa agcaacaaaa tatttctccc	5280
ctagtgagag aaagaggtcc tcagagagta gcagctcaca taactgggac cagaggaaga	5340
agcaacacat tgtttctcc aaactccaag aatgaaaagg ctctgggccc caaaataaac	5400
tcctgggaat catcaaggag tgggcattca ttctgagca acttgacctt gaggaatggt	5460
gaactggtea tccatgaaaa agggttttac tacatctatt cccaacata ctttcgattt	5520
caggaggaaa taaaagaaaa cacaagaac gacaaacaaa tggccaata tatttacaaa	5580
tacacaagtt atcctgaccc tataattgtt atgaaaagtg ctagaaatag ttgttggtct	5640
aaagatgcag aatatggact ctattccatc tatcaagggg gaatatattga gcttaaggaa	5700
aatgacagaa tttttgttc tgtaacaaat gagcactga tagacatgga ccatgaagcc	5760
agttttttcg gggccttttt agttggccgc gaccatatga agcttggaag cggagctact	5820
aacttcagcc tgetgaagca ggctggagac gtggaggaga acctggacc tatggagagc	5880
gacgagagcg gcctgccgc catggagatc gagtgccgca tcaccggcac cctgaacggc	5940

gtggagttcg agctggtggg cggcggagag ggcaccccca agcagggcgc catgaccaac	6000
aagatgaaga gcaccaaagg cgccctgacc ttcagccctt acctgctgag ccacgtgatg	6060
ggctacggct tctaccactt cggcacctac cccagcggct acgagaaccc cttcctgcac	6120
gccatcaaca acggcggcta caccaacacc cgcctcgaga agtacgagga cggcggcgtg	6180
ctgcacgtga gcttcagcta ccgctacgag gccggccgcg tgatcggcga cttcaaggtg	6240
gtgggcaccg gcttccccga ggacagcgtg atcttcaccg acaagatcat ccgcagcaac	6300
gccaccgtgg agcacctgca ccccatgggc gataacgtgc tggtaggcag cttcgccgc	6360
accttcagcc tgcgcgacgg cggctactac agcttcgtgg tggacagcca catgcacttc	6420
aagagcgcca tccaccccag catcctgcag aacgggggcc ccatgttcgc cttccgccgc	6480
gtggaggagc tgcacagcaa caccgagctg ggcatcgtgg agtaccagca cgccttcaag	6540
acccccattg cttcgccag atcccgcgt cagtcgtcca attctgccgt ggacggcacc	6600
gccggacccg gctccaccgg atctcgcgtc gacggcagtg gagagggcag aggaagtctg	6660
ctaacatgcg gtgacgtcga ggagaatcct ggcccaatga ccgagtaca gcccacggtg	6720
cgcctcgcca cccgcgacga cgtccccagg gccgtacgca cctcgccgc cgcgttcgcc	6780
gactaccccc ccacgcgcca caccgtgat ccggaccgcc acatcgagcg ggtcaccgag	6840
ctgaagaac tcttctcac gcgcgtcggg ctgcacatcg gcaaggtgtg ggtcgcggac	6900
gacggcgccg cggtagcggt ctggaccacg ccggagagcg tcgaagcggg ggcgggtttc	6960
gccgagatcg gcccgcgat ggccgagttg agcggttccc ggctggccgc gcagcaacag	7020
atggaaggcc tcttggcgcc gcaccggccc aaggagcccg cgtggttcct ggccaccgtc	7080
ggcgtctcgc ccgaccacca gggcaagggt ctgggcagcg ccgtcgtgct ccccgagtg	7140
gaggcggccg agcgcgccgg ggtgccccgc ttcctggaga cctccgcgcc ccgcaacctc	7200
cccttctacg agcggctcgg cttcaccgtc accgccgacg tcgaggtgcc cgaaggaccg	7260
cgcacctggt gcatgaccg caagcccgtt gcctgatcta gaccgcgtct ggaacaatca	7320
acctctggat taaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttaactatg ttgctccttt	7380
tacgtatgt ggatacgtg ctttaatgcc tttgtatcat gctattgctt cccgtatggc	7440
tttcattttc tctccttgt ataaatcctg gttgtgtct ctttatgagg agttgtggcc	7500
cgttgtcagg caacgtggcg tgggtgtcac tgtgtttgt gacgcaaccc ccaactggtg	7560
gggcattgcc accacctgtc agctcctttc cgggactttc gctttcccc tccctattgc	7620
cacggcgga ctcacgcgc cctgccttgc ccgtctgtgg acaggggctc ggctgttggg	7680
cactgacaat tccgtggtgt tgtcggggaa gctgacgtcc tttccatggc tgctcgccgtg	7740
tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc cttctgtac gtccttcgg cctcaatcc	7800

agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgcgg cctcttccgc gtcttcgcct	7860
tcgccctcag acgagtcgga tctccctttg ggccgcctcc ccgcctggaa ttaattctgc	7920
agtcgagacc tagaaaaaca tggagcaatc acaagtagca atacagcagc taccaatgct	7980
gattgtgcct ggctagaagc acaagaggag gaggaggtgg gttttccagt cacacctcag	8040
gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc ttagccactt tttaaaagaa	8100
aagaggggac tggaagggtt aattcactcc caacgaagac aagatatacct tgatctgtgg	8160
atctaccaca cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccaggggtc	8220
agatatccac tgacctttgg atggtgctac aagctagtag cagttgagcc agataaggta	8280
gaagaggcca ataaaggaga gaacaccagc ttgttacacc ctgtgagcct gcatgggatg	8340
gatgaccceg agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac	8400
gtggcccgag agctgcaccc ggagtacttc aagaactgct gatatcgagc ttgttacaag	8460
ggactttccg ctggggactt tccagggagg cgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga	8520
gccctcagat cctgcatata agcagctgct ttttgccctgt actgggtctc tctggttaga	8580
ccagatctga gctggggagc tctctggcta actaggaac ccactgctta agcctcaata	8640
aagcttgcct tgagtgtctc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta	8700
gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtagta gttcattgtca	8760
tcttattatt cagtatttat aacttgcaaa gaaatgaata tcagagagtg agaggccttg	8820
acattgctag cgttttaccg tcgacctcta gctagagctt ggcgtaatca tggatcatagc	8880
tgtttcctgt gtgaaattgt tatecgctca caattccaca caacatacga gccggaagca	8940
taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct	9000
cactgccgcg tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac	9060
gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttccgc ttctctgctc actgactcgc	9120
tgcgctcggg cggtcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg	9180
tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	9240
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc cccctgacg	9300
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	9360
accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgtctctc tgttccgacc ctgccgtta	9420
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	9480
gtaggatatc cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	9540

ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa	9600
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	9660
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag	9720
tatttgggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	9780
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	9840
cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc cttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	9900
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca	9960
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa	10020
cttggcttga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	10080
ttcgttcac ctagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct	10140
taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcacg gctccagatt	10200
tatcagcaat aaaccagcca gccgaaggg ccgagcgag aagtggctct gcaactttat	10260
ccgcctccat ccagtctatt aattgttgc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta	10320
atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg	10380
glatggcttc attcagctcc ggttccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	10440
tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg	10500
cagtggtatc actcatggtt atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccaatcg	10560
taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	10620
ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa	10680
ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac	10740
cgctgttag atccagttcg atgtaacca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt	10800
ttactttcac cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg	10860
gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa	10920
gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	10980
aacaaatagg ggttcgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gacggatcgg	11040
gagatcaact tgttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat	11100
ttcacaata aagcattttt ttacttgcac tctagtgtg gtttgcacaa actcatcaat	11160
gtatcttacc atgtctggat caactggata actcaagcta accaaaatca tcccaaactt	11220
cccaccccat accctattac cactgccaat tacctgtggg ttcatctact ctaaactgt	11280
gattcctctg aattattttc attttaaaga aattgtatct gttaaatatg tactacaaac	11340
ttagtagttt ttaaagaaat tgtatttggt aaatatgtac tacaactta gtagt	11395