



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0012203
(43) 공개일자 2025년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2025.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7001390(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년06월28일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7002752
원출원일자(국제) 2018년06월28일
심사청구일자 2021년06월25일
(85) 번역문제출일자 2025년01월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/039917
(87) 국제공개번호 WO 2019/006072
국제공개일자 2019년01월03일
(30) 우선권주장
62/527,556 2017년06월30일 미국(US)

(71) 출원인
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리
프리젠티드 바이 더 세크러테리, 디파트먼트 오브
헬쓰 앤드 휴먼 서비씨즈
미국, 메릴랜드 20892, 베서스다, 엠에스 7788,
스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스
티튜츠 오브 헬스, 오피스 오브 테크놀로지 트랜
스퍼
테네오바이오, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 91320-1799, 싸우전드 옥스, 원
암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
코첸더퍼 제임스 엔
미국 메릴랜드주 20814 베테스다 로즈우드 드라이
브 8500
램 노리스
미국 메릴랜드주 20892 베테스다 센터 드라이브
10 비지 10 알엠 5비05 엠에스씨 1203
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

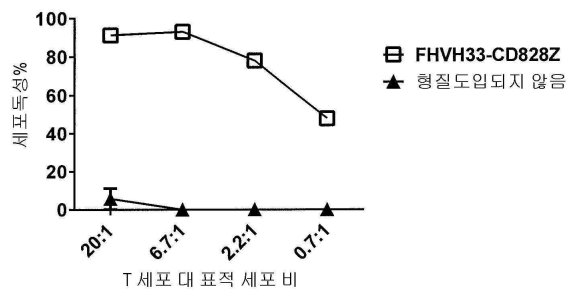
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 인간 도메인을 갖는 항-B 세포 성숙화 항원 키메라성 항원 수용체

(57) 요약

본 발명은 B 세포 성숙화 항원(BCMA)에 대한 항원 특이성을 갖는 키메라성 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 CAR에 관련된 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포 집단 및 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5a



(52) CPC특허분류

C07K 14/70517 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C12N 5/0646 (2025.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

트린클라인 네이션

미국 캘리포니아주 94025 멘로 파크 오브리엔 드라
이브 1490 스위트 디

해리스 캐서린 이

미국 캘리포니아주 94025 멘로 파크 오브리엔 드라
이브 1490 스위트 디

알드레드 셸리 포스

미국 캘리포니아주 94025 멘로 파크 오브리엔 드라
이브 1490 스위트 디

판 스토티넌 빔

미국 캘리포니아주 94025 멘로 파크 오브리엔 드라
이브 1490 스위트 디

명세서

청구범위

청구항 1

조작된(engineered) 세포 집단의 생산 방법으로서, 상기 방법이

제조합 발현 벡터를 단리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 집단으로 도입시키는 단계를 포함하되, 상기 제조합 발현 벡터가, B 세포 성숙화 항원(B-cell maturation antigen, BCMA)에 대한 항원 특이성을 갖는 키메라성 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고,

상기 키메라성 항원 수용체(CAR)가

(1) (a) 서열번호 1의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)1 아미노산 서열, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 CD28 T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(2) (a) 서열번호 4의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 5의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 6의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 CD28 T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(3) (a) 서열번호 7의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 8의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 9의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 CD28 T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(4) (a) 서열번호 10의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 11의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 12의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 CD28 T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(5) (a) 서열번호 1의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 4-1BB T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(6) (a) 서열번호 4의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 5의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 6의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 4-1BB T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(7) (a) 서열번호 7의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 8의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 9의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 4-1BB T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(8) (a) 서열번호 10의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 11의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 12의 중

쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 4-1BB T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(9) (a) 서열번호 1의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 유도성 T 세포 공자극성(ICOS) T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(10) (a) 서열번호 4의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 5의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 6의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 ICOS T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인;

(11) (a) 서열번호 7의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 8의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 9의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 ICOS T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인; 또는

(12) (a) 서열번호 10의 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 11의 중쇄 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 12의 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 인식 도메인;

(b) 인간 CD8 알파 막관통(TM) 도메인; 및

(c) 인간 ICOS T 세포 활성화 도메인 및 인간 CD3-제타 T 세포 활성화 도메인

을 포함하는, 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

키메라성 항원 수용체의 모든 도메인이 인간에서 유래되는, 생산 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

항원 인식 도메인이 8 내지 40개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는 연결기 펩티드를 포함하지 않는, 키메라성 항원 수용체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

CAR이 항체 경쇄 가변 영역을 포함하지 않는, 생산 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

항원 인식 도메인이 (a) 서열번호 13; (b) 서열번호 14; (c) 서열번호 15; 또는 (d) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는, 생산 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

CAR이 서열번호 17 내지 28 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 생산 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

뉴클레오티드 서열이 서열번호 29 내지 40 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 생산 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

단리된 PBMC 집단이 단리된 인간 T 세포 집단인, 생산 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

단리된 PBMC 집단이 단리된 인간 천연 킬러(natural killer) 세포의 집단인, 생산 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,

재조합 발현 벡터가 레트로바이러스 벡터인, 생산 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

레트로바이러스 벡터가 감마-레트로바이러스 벡터인, 생산 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서,

재조합 발현 벡터가 렌티바이러스(lentiviral) 벡터인, 생산 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서,

재조합 발현 벡터가 트랜스포존(transposon) 시스템인, 생산 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서,

재조합 발현 벡터를 단리된 PBMC 집단으로 도입시키는 단계가, 단리된 PBMC 집단을 재조합 발현 벡터로 형질도입(transduce)시키는 것을 포함하는, 생산 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 방법에 의해 생산된 세포 집단을 약학적 조성물 내로 제형화하는 단계를 추가로 포함하는 생산 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 방법에 의해 생산된 세포 집단은 실질적으로 동종성(homogenous) 세포 집단인, 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본원은 2017년 6월 30일자 출원된 미국 가출원 제62/527,556호를 우선권 주장하고, 이의 전체는 본원에 참조로 혼입된다.

[0003] 연방정부 후원된 연구 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 정부가 프로젝트 번호 ZIABC01143905하에 후원하여 미국 국립 보건원(National Institutes of Health), 국립 암 연구소(National Cancer Institute)에 의해 이루어졌다. 정부는 본 발명에 있어서 특정 권리를 갖는다.

[0005] 전자 제출 자료의 참조 포함

[0006] 본원과 동시에 제출되고 다음과 같이 식별된 컴퓨터-관독가능한 뉴클레오타이드/아미노산 서열 목록은 전체가 본원에 참조로 혼입된다: 2018년 6월 25일자 "739534_ST25.TXT"란 명칭의 1개의 67,061 바이트 ASCII(텍스트) 파일.

배경 기술

[0007] 암은 공중 보건학적 관심사이다. 화학요법과 같은 치료에서의 진보에도 불구하고, 많은 암에 대한 예후는 좋지 않을 수 있다. 예를 들어, 다발성 골수종(MM: multiple myeloma)에 대한 치료법은 차도를 일으킬 수 있지만, 많은 환자들은 결국 재발하여 사망한다. 따라서, 암을 위한 추가적인 치료에 대한 필요성이 충족되지 않고 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 하나의 실시태양은 항원 인식 도메인, 막관통(TM: transmembrane) 도메인 및 T 세포 활성화 도메인을 포함하는 키메라성 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor)를 제공하고, 여기서 CAR은 B 세포 성숙화 항원(BCMA: B-cell maturation antigen)에 대한 항원 특이성을 갖고, 항원 인식 도메인은 (a) 서열번호 1 내지 3; (b) 서열번호 4 내지 6; (c) 서열번호 7 내지 9; 또는 (d) 서열번호 10 내지 12의 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 본 발명의 추가의 실시태양은 본 발명의 CAR에 관련된 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포 집단 및 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 추가적인 실시태양은 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는 관련된 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1a 내지 1d는 CD8 α 분자의 힌지 및 막관통 영역, CD28 공자극성 분자의 세포질 부분, 및 CD3 ζ T 세포 활성화 도메인의 세포질 부분과 함께, FHVH74(도 1a), FHVH32(도 1b), FHVH33(도 1c), 또는 FHVH93(도 1d)의 전체-인간 중쇄-단독 항원-인식 도메인을 포함하는 CAR을 도시하는 다이어그램이다.

도 1e 내지 1h는 CD8 α 분자의 힌지 및 막관통 영역, 4-1BB 공자극성 분자의 세포질 부분, 및 CD3 ζ T 세포 활성화 도메인의 세포질 부분과 함께, FHVH74(도 1e), FHVH32(도 1f), FHVH33(도 1g), 또는 FHVH93(도 1h)의 전체-인간 중쇄-단독 항원-인식 도메인을 포함하는 CAR을 도시하는 다이어그램이다.

도 1i 내지 1l은 CD8 α 분자의 힌지 및 막관통 영역, 유도성 T 세포 공자극성 단백질(ICOS)의 세포질 부분, 및 CD3 ζ T 세포 활성화 도메인의 세포질 부분과 함께, FHVH74(도 1i), FHVH32(도 1j), FHVH33(도 1k), 또는 FHVH93(도 1l)의 전체-인간 중쇄-단독 항원-인식 도메인을 포함하는 CAR을 도시하는 다이어그램이다.

도 2는, 실시예 2에 기재된 바와 같이, 제시된 4가지 FHVH CAR이 1차 인간 T 세포에 의해 발현되었음을 나타내는 실험적 데이터를 도시하는 일련의 그래프이다. 형질도입되지 않은(UT: untransduced) T 세포는 음성 대조군으로서 포함되고 11D5-3-CD828Z는 양성 대조군 CAR로서 제공된다. T 세포를 배양 2일째 형질도입시켰고, 세포를 배양 7일째 BCMA-Fc 단백질 시약에 의해 염색시켰다. 도표는 살아있는 림프구에 대해 한정된다. 도표상의 숫자는 CAR을 발현하거나(상부) CAR을 발현하지 않는(하부) CD3 $^{+}$ 세포의 백분율이다.

도 3은 FHVH CAR-발현 T 세포에 의한 BCMA-특이적 탈과립화를 나타내는 실험적 데이터를 도시하는 일련의 그래프이다. 이러한 그래프는 항원-특이적 작용을 평가하기 위한 CD107a 탈과립화 검정에서 4가지 FHVH CAR중 하나가 형질도입된 1차 인간 T 세포에 대한 결과를 보여준다. 각각의 CAR을 발현하는 T 세포는 BCMA⁺ 표적 세포(BCMA-K562)와 함께 배양될 경우 BCMA-음성 표적 세포(NGFR-K562)에 비하여 실시예 3에 기재된 바와 같이 더 큰 정도로 탈과립화되었다. UT 세포는 음성 대조군으로서 포함되고, 11D5-3-CD828Z는 양성 대조군 CAR로서 제공된다. 도표는 CD3⁺ 림프구에 대해 한정된다. 도표상의 숫자는 CD107a를 상향조절하거나(상부) CD107a를 상향조절하지 않는(하부) CD3⁺ 세포의 백분율이다.

도 4a는 11D5-3-CD828Z CAR이 BCMA-특이적 방식으로 증식되었음을 나타내는 실험적 데이터를 도시하는 그래프이다. 도표는 살아있는 CD3⁺ 림프구에 대해 한정된다. 개방 히스토그램은 BCMA-K562(BCMA-발현) 표적 세포에 의해 자극된 CAR⁺ T 세포를 나타내고, 흑색 히스토그램은 NGFR-K562(BCMA-음성) 세포에 의해 자극된 CAR⁺ T 세포를 나타낸다. 모든 결과는 동일한 환자로부터의 세포에 의해 동일한 시간에 생성되었다.

도 4b 내지 4e는 실시예 5에 기재된 바와 같이 FHVH74-CD828Z(도 4b), FHVH32-CD828Z(도 4c), FHVH33-CD828Z(도 4d), 또는 FHVH93-CD828Z(도 4e) CAR이 BCMA-특이적 방식으로 증식되었음을 나타내는 실험적 데이터를 도시하는 그래프이다.

도 4f는 지시된 CAR이 형질도입된 T 세포가 BCMA⁺ 표적 세포와 함께 배양될 경우 CAR⁺ T 세포의 절대적 수가 증가하였음을 나타내는 실험적 데이터를 도시하는 그래프이다. CAR T 세포가 BCMA-K562 세포와 함께 배양되는 경우 CAR⁺ T 세포의 수는 모든 CAR을 발현하는 T 세포에 대해 증가하였다. Y-축은 CAR⁺ T 세포의 수($\times 10^6$)를 나타낸다. X-축은 T 세포가 BCMA⁺ 표적 세포와 함께 배양되는 날짜의 수를 나타낸다.

도 5a는 BCMA⁺ 표적 세포를 살해하는 UT 세포의 능력과 비교하여 BCMA⁺ 표적 세포를 살해하는 FHVH33-CD828Z CAR의 능력을 나타내는 실험적 데이터를 도시하는 그래프이다. FHVH33-CD828Z CAR을 발현하는 T 세포를 RPMI8226 표적 세포와 함께 시험관내에서 4 시간 동안 지시된 효과기 대 표적 비로 배양하였다. 세포독성을 2중으로 결정하였다. 결과는 평균의 \pm 표준 오차로서 표시된다. Y-축은 CAR의 세포독성(%)을 나타낸다. X-축은 T 세포 대 표적 세포 비를 나타낸다.

도 5b는 BCMA⁺ 표적 세포를 살해하는 UT 세포의 능력과 비교하여 BCMA⁺ 표적 세포를 살해하는 FHVH33-CD8BBZ CAR의 능력을 나타내는 실험적 데이터를 도시하는 그래프이다. FHVH33-CD8BBZ CAR을 발현하는 T 세포를 RPMI8226 표적 세포와 함께 시험관내에서 4 시간 동안 지시된 효과기 대 표적 비로 배양하였다. 세포독성을 2중으로 결정하였다. 결과는 평균의 \pm 표준 오차로서 표시된다. Y-축은 CAR의 세포독성(%)을 나타낸다. X-축은 T 세포 대 표적 세포 비를 나타낸다.

도 6은 4-1BB 공자극성 도메인을 갖는 CAR이 1차 인간 T 세포의 표면상에서 발현됨을 나타내는 실험적 데이터를 도시하는 일련의 그래프이고, FHVH33-CD8BBZ가 가장 높은 발현을 보여준다. 도표는 4가지 FHVH CAR의 BCMA-Fc 염색, 11D5-3-CD828Z 대조군 CAR의 염색, 및 UT 세포의 염색을 보여준다. 도표는 살아있는 림프구에 대해 한정된다. 도표상의 숫자는 BCMA-Fc에 의해 염색되거나(상부 숫자) 염색되지 않은(하부 숫자) 세포의 백분율이다.

도 7a 및 7b는 FHVH33-CD8BBZ-발현 T 세포(도 7b)와 비교되는 UT 세포에서의 CAR의 발현(도 7a)을 도시한다. 도표는 살아있는 CD3⁺ 림프구에 대해 한정된다. 도표에서 숫자는 BCMA-PE⁺(상부) 및 BCMA-PE⁻(하부)의 백분율이다.

도 7c 내지 7f는, CD107a 염색에 의해 평가될 경우, FHVH33-CD8BBZ가 형질도입된 T 세포가 BCMA-특이적 방식으로 탈과립화되었음을 나타내는 실험적 데이터를 도시한다. 데이터는 FHVH33+BCMA-K562(도 7e) 및 FHVH33+NGFR-K562 세포(도 7f)에서의 CD107a의 상향조절과 비교하여, UT+BCMA-K562(도 7c) 및 UT+NGFR-K562 세포(도 7d)에서 CD107a의 상향조절을 보여준다. 도 7a 및 7b에 제시된 바와 같은 동일한 T 세포 배양액이 사용되었다. 도표는 살아있는 CD3⁺ 림프구에 대해 한정된다. 도표에서 숫자는 CD107a⁺(상부) 및 CD107a⁻(하부)의 백분율이다.

도 7g는 CAR-발현 T 세포가 IFN γ 를 BCMA-특이적 방식으로 생산하였음을 나타내는 실험적 데이터를 도시한다. T 세포가 BCMA⁺ 세포주 BCMA-K562 및 RPMI8226과 함께 배양될 경우 상당량의 IFN γ 가 방출되었다. Y-축은 IFN

γ 의 양을 pg/ml로 나타낸다. X-축은 실험에 사용되는 표적 세포를 나타낸다.

도 8은 표적 1차 인간 골수종 골수 세포(흑색 막대) 또는 대조군 표적 PBMC(회색 막대)와 함께 공-배양될 경우, 형질도입되지 않은 T 세포(UT), 또는 FHVH33-CD828Z 또는 FHVH33-CD8BBZ CAR이 형질도입된 T 세포에 의해 분비된 IFN γ 의 양(pg/ml)을 보여주는 그래프이다.

도 9a는 마우스에서 FHVH33-CD8BBZ T 세포의 용량 적정을 나타내는 개략도이다. 암컷(F), 7 내지 8 주령(wk)의 NSG 마우스에게 8 밀리온(M)의 RPMI8226 세포를 피내(i.d.) 주사하고, 종양을 10일 동안 성장시켰다. 0일째, 마우스에게 다양한 수의 FHVH33-CD8BBZ-발현 T 세포를 정맥내(IV)로 주입하였다. 종양을 3일마다 한번씩(d) 측정하였다.

도 9b는 도 9a에 제시된 바와 같이 CAR T 세포 주입 후 지시된 날짜에 0.2×10^6 (폐쇄 삼각형), 0.7×10^6 (폐쇄 원형), 또는 2.2×10^6 (개방 원형)개의 FHVH33-CD8BBZ-발현 T 세포에 의해 치료되어진 마우스에서 측정된 종양 부피(mm³)를 보여주는 그래프이다. 치료되지 않은 마우스는 개방 삼각형으로 표시된다.

도 9c는 CAR T 세포 주입 후 지시된 날짜에 0.2×10^6 (폐쇄 삼각형), 0.7×10^6 (폐쇄 원형), 또는 2.2×10^6 (개방 원형)개의 FHVH33-CD8BBZ-발현 T 세포에 의해 치료된 이후의 도 9b에 제시된 마우스의 생존율을 보여주는 그래프이다. 치료되지 않은 마우스는 개방 삼각형으로 표시된다.

도 10a는 CAR T 세포 주입 후 지시된 날짜에 SP6-CD828Z(삼각형), 11D5-3-CD8BBZ(사각형), FHVH33-CD8BBZ(개방 원형), 또는 FHVH33-CD828Z(폐쇄 원형) CAR을 발현하는 T 세포에 의해 치료되어진 마우스에서 측정된 종양 부피(mm³)를 보여주는 그래프이다. 치료되지 않은 마우스는 다이아몬드형으로 표시된다.

도 10b는 CAR T 세포 주입 후 지시된 날짜에 SP6-CD828Z(삼각형), 11D5-3-CD8BBZ(사각형), FHVH33-CD8BBZ(개방 원형), 또는 FHVH33-CD828Z(폐쇄 원형) CAR을 발현하는 T 세포에 의해 치료되어진 마우스의 생존율을 보여주는 그래프이다. 치료되지 않은 마우스는 다이아몬드형으로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012]

본 발명의 하나의 실시태양은 항원 인식 도메인, TM 도메인, 및 T 세포 활성화 도메인을 포함하는, BCMA에 대한 항원 특이성을 갖는 CAR을 제공한다. CAR은 T 세포 신호전달 또는 T 세포 활성화 도메인에 연결된 항체의 항원 인식 도메인을 함유하는, 인공적으로 작성된 혼성 단백질 또는 폴리펩티드이다. CAR은 T 세포 특이성 및 반응성을 선택된 표적을 향해 비-MHC-제한된 방식으로 재인도하여, 단일클론성 항체의 항원-결합 특성을 활용하는 능력을 갖는다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR을 발현하는 T 세포에게 항원 처리와 무관하게 항원을 인식함으로써 종양 탈출의 주요 기작을 우회하는 능력을 제공한다. 게다가, T 세포에서 발현될 경우, CAR은 유리하게는 내생성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 채와 이량체화하지 않는다.

[0013]

본 발명의 CAR은 B 세포 성숙화 항원(BCMA, 또한 CD269로서 공지됨)에 대한 항원 특이성을 갖는다. BCMA는 종양 피사 인자 수용체 상과의 일원이다[툼슨(Thompson) 등의 문헌 "*J. Exp. Medicine*, 192(1): 129-135 (2000)", 및 맥케이(Mackay) 등의 문헌 "*Annu. Rev. Immunol*, 21: 231-264 (2003)" 참조]. BCMA는 B 세포 활성화 인자(BAFF) 및 증식 유도 리간드(APRIL)에 결합한다[예를 들어, 맥케이 등의 상기 문헌, 및 칼레드(Kalled) 등의 문헌 "*Immunological Reviews*, 204: 43-54 (2005) 참조]. 비악성 세포들중, BCMA는 대부분 혈장 세포 및 성숙한 B 세포의 하위집합에서 발현되는 것으로 보고되어 왔다[예를 들어, 라비(Laabi) 등의 문헌 "*EMBO J.*, 11(11): 3897-3904 (1992)"; 라비 등의 문헌 "*Nucleic Acids Res.*, 22(1): 1147-1154 (1994)"; 칼레드 등의 상기 문헌; 오'코너(O'Connor) 등의 문헌 "*J. Exp. Medicine*, 199(1): 91-97 (2004)"; 및 Ng 등의 문헌 "*J. Immunol*, 173(2): 807-817 (2004)" 참조]. BCMA RNA는 보편적으로 다발성 골수종 세포에서 검출되고, BCMA 단백질은 몇몇 조사에 의해 다발성 골수종 환자로부터의 혈장 세포의 표면 상에서 검출되었다[예를 들어, 노박(Novak) 등의 문헌 "*Blood*, 103(2): 689-694 (2004)"; 네리(Neri) 등의 문헌 "*Clinical Cancer Research*, 13(19): 5903-5909 (2007)"; 벨루씨(Bellucci) 등의 문헌 "*Blood*, 105(10): 3945-3950 (2005)"; 및 모록스(Moreaux) 등의 문헌 "*Blood*, 103(8): 3148-3157 (2004)" 참조]. BCMA 발현은 또한 호지킨 림프종 세포의 표면 상에서 검출되었다[예를 들어, 치우(Chiu) 등의 문헌 "*Blood*, 109(2): 729-739 (2007)"]. 인간 BCMA는 서열번호 42의 아미노산 서열을 갖는다.

[0014]

"항원 특이성" 및 "항원-특이적 반응을 유도하는"이라는 구절은, 본원에 사용될 경우, CAR의 항원으로서의 반응이

면역 반응을 유도하도록, CAR이 항원에 특이적으로 결합하고 이를 면역학적으로 인식함을 의미한다.

[0015] 본 발명의 CAR은 임의의 하나 이상의 다양한 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 CAR은 감소된 항-CAR 면역원성을 제공할 수 있다. 비-인간 도메인(예를 들어, 마우스 도메인) 및 인공 연결기 펩티드중 하나 또는 둘 다를 포함하는 CAR은 환자에게 투여될 경우 항-CAR 면역 반응을 유도할 수 있다. 이러한 항-CAR 면역 반응은 CAR-발현 세포의 지속성을 감소시키고, CAR 치료법의 효능을 감소시키거나 제거할 수 있다. 특별한 이론 또는 기작에 얽매려는 것은 아니지만, 본 발명의 CAR의 하기 특징들중 어느 하나 이상은 항-CAR 면역원성의 잠재적 공급원을 감소시키거나 제거할 수 있는 것으로 여겨진다: (i) CAR의 모든 도메인은 인간 유래이고; (ii) CAR은 인공 연결기 펩티드, 예를 들어, 약 10 내지 약 25개 아미노산 잔기의 길이를 갖고 하나 이상의 글리신, 세린, 및 트레오닌으로 구성된 연결기 펩티드를 포함하지 않으며, (iii) CAR은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하지 않고; (iv) 항원 인식 도메인은 단일 항체 중쇄 가변 영역을 1개 이하로 포함한다. 항-CAR 면역원성의 잠재적 공급원을 감소시키거나 제거하는 것은 CAR-발현 세포의 지속성 및 CAR 치료법의 효능을 향상시키는 것으로 여겨진다. 게다가, 전술된 특징 (ii) 내지 (iv)중 어느 하나 이상은 BCMA에 더하여 하나 이상의 상이한 항원(BCMA 이외의 항원)을 표적화하는 CAR의 제조를 용이하게 할 수 있다.

[0016] 본 발명의 CAR은 전통적인 CAR과 비교하여 더 낮은 항-CAR 면역원성을 가질 수 있다. 전통적인 CAR은 다음의 특징들중 어느 하나 이상을 가질 수 있다: (i) 전통적인 CAR의 도메인 모두가 인간 유래는 아니고; (ii) 전통적인 CAR은 인공 연결기 펩티드, 예를 들어, 약 10 내지 약 25개 아미노산 잔기의 길이를 갖고 하나 이상의 글리신, 세린, 및 트레오닌으로 구성된 연결기 펩티드를 포함하며; (iii) 전통적인 CAR은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다(이후, "전통적인 CAR"로서 지칭됨).

[0017] 항-CAR 면역원성은, 본 발명의 CAR에 대한 면역 반응이 전통적인 CAR에 대한 면역 반응과 비교하여 정량적으로 또는 정성적으로 감소될 경우, 본 발명에 따라 감소된다. 항-CAR 면역원성에서의 정량적 감소는 항-CAR 면역 반응의 크기 또는 정도에서의 감소를 포괄한다. 항-CAR 면역원성의 크기 또는 정도는 사이토킨(예를 들어, CAR-특이적 사이토킨) 생산(사이토킨 농도)의 수준에서의 감소, 활성화되거나[예를 들어, 림프구(예를 들어, CAR-특이적 림프구)의 증식] 소집된 림프구의 수에서의 감소, 및/또는 항체(CAR-특이적 항체)의 생산(항체 농도)에서의 감소, CAR-발현 T 세포를 살해하는 숙주(수용체) T 세포의 능력에서의 감소 등과 같은 임의의 수의 공지된 매개변수에 기초하여 측정될 수 있다. 항-CAR 면역원성의 정성적 감소는, CAR의 세포독성 활성의 감소를 중재하는데 있어서 항-CAR 면역 반응을 덜 효과적으로 만드는 항-CAR 면역 반응의 성질에 있어서의 임의의 변화를 포괄한다. 항-CAR 면역원성을 측정하는 방법은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 생산되는 사이토킨의 유형 및 수준을 측정하는 것은 항-CAR 면역원성을 측정할 수 있다. 감소된 항-CAR 면역원성은, 전통적인 CAR에 의해 획득되는 특징과 비교하여, 사이토킨, 예컨대 IFN- γ , TNF- α , 및 그랜자임(granzyme) B중 어느 하나 이상의 생산에서의 감소, 및/또는 세포-중재된 항-CAR 면역 반응의 감소된 자극, 예컨대 본 발명의 CAR에 특이적인 대식세포 및/또는 T 세포의 증식 및 활성화에서의 감소를 특징으로 할 수 있다. 감소된 항-CAR 면역원성은 항-CAR T 세포 자극에서의 감소, 항-CAR T 세포 증식에서의 감소, 항-CAR T 세포 IFN γ 및/또는 그랜자임 B 분비에서의 감소, 및 CAR-발현 T 세포를 살해하는 숙주 T 세포의 능력에서의 감소중 어느 하나 이상을 특징으로 할 수 있다. 항-CAR 면역원성의 정성적 및 정량적 감소는 동시에 일어날 수 있고, 상호 배제적이지 않다. "항-CAR 면역원성"이라는 구절은, 본원에서 사용될 경우, CAR 그 자체에 대한 면역 반응을 지칭하는 것으로, CAR이 제공할 수 있는 표적 항원 BCMA에 대한 면역 반응중 어떠한 양태도 지칭하지 않는다.

[0018] CAR은 항원 인식 도메인을 포함한다. 항원 인식 도메인은 BCMA를 인식하고 이에 결합한다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항원 인식 도메인은 인간 항-BCMA 항체의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 전체 항체는 전형적으로 다음과 같은 4개 폴리펩티드로 구성된다: 중(H)쇄 폴리펩티드의 2개의 동일한 복사물 및 경(L)쇄 폴리펩티드의 2개의 동일한 복사물. 각각의 중쇄는 1개의 N-말단 가변성(VH) 영역 및 3개의 C-말단 불변성(CH1, CH2 및 CH3) 영역을 포함하고, 각각의 경쇄는 1개의 N-말단 가변성(VL) 영역 및 1개의 C-말단 불변성(CL) 영역을 포함한다. VH 및 VL 영역은 동일한 일반적 구조를 갖고, 각각의 영역은 4개의 골격구조 영역을 포함하는데, 이의 서열은 비교적 보존적이다. 골격구조 영역은 3개의 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region), 즉 CDR1, CDR2, 및 CDR3에 의해 연결된다. 그러나, 상기 설명된 바와 같이, 본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하지 않는다. 따라서, 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항원 인식 도메인은 단일 항체 중쇄 가변 영역을 1개 이하로 포함한다.

[0019] 하나의 실시태양에서, 항원 인식 도메인은 인간 항-BCMA 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR1 영역, CDR2 영역, 및 CDR3 영역을 포함한다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항원 인식 도메인은 다음을 포함할 수

있다:

- [0020] (a) 서열번호 1을 포함하는 중쇄 CDR1 영역; 서열번호 2를 포함하는 중쇄 CDR2 영역; 및 서열번호 3을 포함하는 중쇄 CDR3 영역중 하나 이상(FHVV74 중쇄 가변 영역의 CDR 영역);
- [0021] (b) 서열번호 4를 포함하는 중쇄 CDR1 영역; 서열번호 5를 포함하는 중쇄 CDR2 영역; 및 서열번호 6을 포함하는 중쇄 CDR3 영역중 하나 이상(FHVV32 중쇄 가변 영역의 CDR 영역);
- [0022] (c) 서열번호 7을 포함하는 중쇄 CDR1 영역; 서열번호 8을 포함하는 중쇄 CDR2 영역; 및 서열번호 9를 포함하는 중쇄 CDR3 영역중 하나 이상(FHVV33 중쇄 가변 영역의 CDR 영역); 또는
- [0023] (d) 서열번호 10을 포함하는 중쇄 CDR1 영역; 서열번호 11을 포함하는 중쇄 CDR2 영역; 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄 CDR3 영역중 하나 이상(FHVV93 중쇄 가변 영역의 CDR 영역).
- [0024] 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 (a) 서열번호 1 내지 3 모두; (b) 서열번호 4 내지 6 모두; (c) 서열번호 7 내지 9 모두; 또는 (d) 서열번호 10 내지 12 모두의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0025] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항원 인식 도메인은 인간 항-BCMA 항체의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 이와 관련하여, 항원 인식 도메인은 (a) 서열번호 13(FHVV74 중쇄 가변 영역), (b) 서열번호 14(FHVV32 중쇄 가변 영역), (c) 서열번호 15(FHVV33 중쇄 가변 영역), 또는 (d) 서열번호 16(FHVV93 중쇄 가변 영역)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항원 인식 도메인은 연결기 펩티드를 포함하지 않는다. 전통적인 CAR의 항원 인식 도메인은 단일쇄 가변성 단편(scFv)으로 이루어질 수 있다. scFv는, 2개의 도메인이 단일 폴리펩티드쇄로서 합성될 수 있도록 만드는 인공 연결기 펩티드에 의해 연결된 Fv 단편(즉, VL 및 VH)의 2개의 도메인을 포함하는 1가 분자이다. 본 발명의 CAR의 하기 특징들중 어느 하나 이상은 유리하게는 CAR의 상이한 성분들을 연결시키는 잠재적으로 면역원성인 연결부, 예를 들어 연결기 펩티드를 전통적인 CAR에서 이용되는 scFv의 VL 및 VH에 연결시키는 2개의 잠재적으로 면역원성인 연결부를 감소시키거나 제거할 수 있다: (i) 연결기 펩티드, 예컨대 전통적인 CAR에 이용되는 scFv에서 전형적으로 발견되는 펩티드의 부재, (ii) 항체 경쇄 가변 영역(이는 또한 전통적인 CAR에서 이용됨)의 부재, 및 (iii) 단일 항체 중쇄 가변 영역의 1개 이하의 존재. 접합 및 연결기 펩티드는, 이들이 인간에서 정상적으로 발견되지 않은 인공 서열이므로 면역원성일 수 있다. 다르게는 또는 추가적으로, 임의의 하나 이상의 전술된 특징 (i) 내지 (iii)은 펩티드 연결기 및 항체 경쇄 가변 영역중 하나 또는 둘 다에서 임의의 잠재적으로 면역원성인 영역을 제거할 수 있다. 연결기 펩티드의 목적은 일반적으로 2개의 다른 펩티드 또는 단백질 사이(예를 들어, 항체 중쇄와 항체 경쇄 사이)에 가요성 연결을 형성하는 것이다. 연결기 펩티드는 임의의 길이일 수 있고, 많은 펩티드들은 임의의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 연결기 펩티드는 약 5 내지 약 100개의 아미노산 잔기, 약 8 내지 약 75개의 아미노산 잔기, 약 8 내지 약 50개의 아미노산 잔기, 약 10 내지 약 25개의 아미노산 잔기, 약 8 내지 약 30개의 아미노산 잔기, 약 8 내지 약 40개의 아미노산 잔기, 또는 약 8 내지 약 50개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항원 인식 도메인은 약 8 내지 약 40개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는 연결기 펩티드를 포함하지 않는다. 예를 들어, 연결기 펩티드는, 다른 아미노산 잔기의 존재 또는 부재하에, 글리신, 세린, 및 트레오닌중 어느 하나 이상을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항원 인식 도메인은 약 8 내지 약 40개의 아미노산 잔기의 길이를 갖고 글리신, 세린, 및 트레오닌중 어느 하나 이상으로 구성된 연결기 펩티드를 포함하지 않는다.
- [0027] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 CAR은 리더(leader) 도메인을 포함한다. 리더 도메인은 항원 인식 도메인(예를 들어, 항-BCMA 항체의 중쇄 가변 영역)의 아미노 말단에 위치할 수 있다. 리더 도메인은 임의의 적합한 리더 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 리더 도메인은 인간 리더 도메인이다. 하나의 실시태양에서, 리더 도메인은 인간 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 수용체 서열 또는 인간 CD8α 리더 서열이다.
- [0028] 또 다른 실시태양에서, CAR은 힌지 도메인을 포함한다. 당분야의 숙련가라면 힌지 도메인이 항체 가요성을 용이하게 하는 아미노산의 짧은 서열임을 인식할 것이다[예를 들어, 우프(Woof) 등의 문헌 "*Nat. Rev. Immunol*, 4(2): 89-99 (2004)"]. 힌지 도메인은 항원 인식 도메인과 T 세포 활성화 도메인 사이에 위치될 수 있다. 힌지 도메인은 임의의 적합한 분자로부터 유래되거나 수득된 임의의 적합한 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 힌지 도메인은 인간 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 예를 들어, 힌지 도메인은 인간 CD8α 분자 또는 인간 CD28 분자의 일부이다.
- [0029] CAR은 TM 도메인을 포함할 수 있다. TM 도메인은 당분야에 공지된 임의의 분자로부터 유래되거나 수득된 임의

의 TM 도메인일 수 있다. 바람직하게는, TM 도메인은 인간 TM 도메인이다. 예를 들어, TM 도메인은 인간 CD8 α 분자 또는 인간 CD28 분자의 TM 도메인을 포함할 수 있다. CD8은 T 세포 수용체(TCR)를 위한 공-수용체로서 작용하는 TM 당단백질이고, 세포독성 T 세포의 표면 상에서 주로 발현된다. CD8의 가장 흔한 형태는 CD8 α 및 CD8 β 쇄로 이루어진 이량체로서 존재한다. CD28은 T 세포 상에서 발현하여, T 세포 활성화를 위해 필요한 공-자극성 신호를 제공한다. CD28은 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2)을 위한 수용체이다.

[0030] CAR은 T 세포 활성화 도메인을 포함할 수 있다. T 세포 활성화 도메인은 세포내(즉, 세포질) T 세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 세포내 T 세포 신호전달 도메인은 당분야에 공지된 CD28 분자, CD3 제타(ζ) 분자, Fc 수용체 감마(FcR γ) 쇄, CD27 분자, OX40 분자, 4-1BB 분자, 유도성 T 세포 공자극성 단백질(ICOS), 또는 다른 세포내 신호전달 분자로부터 획득되거나 유도되거나, 임의의 상기 단백질의 변형된 형태일 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, CD28은 T 세포 공-자극에서 중요한 T 세포 표지이다. CD3 ζ 는 TCR과 회합되어 신호를 생산하고, 면역수용체 티로신-기반의 활성화 모티프(ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif)를 함유한다. CD137로서도 공지된 4-1BB는 강력한 공자극성 신호를 T 세포에 전송하여, 분화를 촉진시키고 T 림프구의 장기간의 생존을 증진시킨다. ICOS는 활성화된 T 세포 상에서 발현되는 CD28-상과 공자극성 분자이다. 하나의 바람직한 실시태양에서, CD28, CD3 제타, FcR γ , ICOS, 4-1BB, OX40, 및 CD27은 인간에서 유래된다.

[0031] 본 발명의 CAR은 임의의 하나의 전술된 TM 도메인 및 임의의 하나 이상의 전술된 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 임의의 조합으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 CAR은 CD8 α TM 도메인, 및 CD28 및 CD3 제타의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 다르게는, 예를 들어, 본 발명의 CAR은 CD8 α TM 도메인, 및 CD3 제타 및 4-1BB의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 더욱이 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 CAR은 CD8 α TM 도메인, 및 ICOS 및 CD3 제타의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0032] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 CAR은, 아미노 말단에서 카복실 말단으로, 인간 CD8 α 리더 도메인, 인간 항-BCMA 항체 중쇄 가변 영역, 인간 CD8 α 분자의 힌지 및 막관통 영역, 인간 CD28 분자의 세포질 T 세포 신호전달 도메인, 및 인간 CD3 ζ 분자의 세포질 T 세포 신호전달 도메인을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 CAR은, 아미노 말단에서 카복실 말단으로, 인간 CD8 α 리더 도메인, 인간 항-BCMA 항체 중쇄 가변 영역, 인간 CD8 α 분자의 힌지 및 막관통 영역, 인간 4-1BB 분자의 세포질 T 세포 신호전달 도메인, 및 인간 CD3 ζ 분자의 세포질 T 세포 신호전달 도메인을 포함한다. 더욱이 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 CAR은, 아미노 말단에서 카복실 말단으로, 인간 CD8 α 리더 도메인, 인간 항-BCMA 항체 중쇄 가변 영역, 인간 CD8 α 분자의 힌지 및 막관통 영역, 인간 ICOS 분자의 세포질 T 세포 신호전달 도메인, 및 인간 CO3 ζ 분자의 세포질 T 세포 신호전달 도메인을 포함한다. 본 발명의 추가적인 실시태양은 서열번호 17 내지 28중 어느 한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성되는 CAR을 제공한다. 서열번호 17 내지 28의 CAR의 성분은 아래의 표 A에 제시된다.

[0033] [표 A]

CAR (서열번호)	항원 인식 도메인	TM 도메인	T 세포 활성화 도메인
FHVVH74-CD828Z (서열번호 17)	서열번호 13	인간 CD8α	인간 CD28 인간 CD3z
FHVVH32-CD828Z (서열번호 18)	서열번호 14	인간 CD8α	인간 CD28 인간 CD3z
FHVVH33-CD828Z (서열번호 19)	서열번호 15	인간 CD8α	인간 CD28 인간 CD3z
FHVVH93-CD828Z (서열번호 20)	서열번호 16	인간 CD8α	인간 CD28 인간 CD3z
FHVVH74-CD8BBZ (서열번호 21)	서열번호 13	인간 CD8α	인간 4-1BB 인간 CD3z
FHVVH32-CD8BBZ (서열번호 22)	서열번호 14	인간 CD8α	인간 4-1BB 인간 CD3z
FHVVH33-CD8BBZ (서열번호 23)	서열번호 15	인간 CD8α	인간 4-1BB 인간 CD3z
FHVVH93-CD8BBZ (서열번호 24)	서열번호 16	인간 CD8α	인간 4-1BB 인간 CD3z
FHVVH74-CD8ICOSZ (서열번호 25)	서열번호 13	인간 CD8α	인간 ICOS 인간 CD3z
FHVVH32-CD8ICOSZ (서열번호 26)	서열번호 14	인간 CD8α	인간 ICOS 인간 CD3z
FHVVH33-CD8ICOSZ (서열번호 27)	서열번호 15	인간 CD8α	인간 ICOS 인간 CD3z
FHVVH93-CD8ICOSZ (서열번호 28)	서열번호 16	인간 CD8α	인간 ICOS 인간 CD3z

[0034]

[0035]

본 발명의 하나의 실시태양에서, CAR의 모든 도메인은 인간에서 유래된다. 이와 관련하여, 리더 도메인, 힌지 도메인, 항원 인식 도메인, TM 도메인, 및 T 세포 활성화 도메인 모두는 인간에서 유래된다. 따라서, 본 발명의 CAR은, 유리하게는, 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 바와 같이, 비-인간 리더 도메인, 비-인간 힌지 도메인, 비-인간 항원 인식 도메인, 비-인간 TM 도메인, 및 비-인간 T 세포 활성화 도메인중 어느 하나 이상을 포함하는 CAR과 비교하여, 감소된 항-CAR 면역원성을 갖는다.

[0036]

본원에 기재된 본 발명의 CAR의 작용성 부분은 본 발명의 범주내에 포함된다. 용어 "작용성 부분"은, CAR과 관련하여 사용될 경우, 본 발명의 CAR의 임의의 일부분 또는 단편을 지칭하고, 이러한 일부분 또는 단편은 이들의 모체인 CAR(모 CAR)의 생물 활성을 보유한다. 작용성 부분은, 예를 들어, 모 CAR과 유사한 정도로, 동일한 정도로, 또는 더 높은 정도로, 표적 세포를 인식하거나, 질환을 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 보유하는 CAR의 이러한 일부분을 포괄한다. 모 CAR과 관련하여, 작용성 부분은, 예를 들어, 모 CAR의 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

[0037]

작용성 부분은 추가적인 아미노산을 작용성 부분의 아미노 또는 카복시 말단에, 또는 말단 둘 다에 포함할 수 있고, 이러한 추가적인 아미노산은 모 CAR의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게는, 추가적인 아미노산은 작용성 부분의 생물학적 기능에 간섭하지 않고, 이는 예를 들어, 표적 세포를 인식하고, 암을 검출하고, 암을 치료하거나 예방하는 등이다. 더욱 바람직하게는, 추가적인 아미노산은 모 CAR의 생물 활성과 비교하여 생물 활성을 향상시킨다.

[0038]

본원에 기재된 본 발명의 CAR의 작용성 변형체는 본 발명의 범주에 포함된다. 용어 "작용성 변형체"는, 본원에 사용될 경우, 모 CAR과 실질적인 또는 유의적인 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 CAR, 폴리펩티드, 또는 단백질을 지칭하고, 이러한 작용성 변형체는 변형체가 유래되었던 본래의 CAR의 생물 활성을 보유한다. 작용성 변형

체는, 예를 들어, 모 CAR과 유사한 정도로, 동일한 정도로, 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는 본원에 기재된 CAR(모 CAR)의 변형체를 포괄한다. 모 CAR과 관련하여, 작용성 변형체는, 모 CAR에 대하여 아미노산 서열에 있어서, 예를 들어, 적어도 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 80%, 약 90%, 약 98% 또는 그 이상 동일할 수 있다.

[0039] 작용성 변형체는, 예를 들어, 적어도 1개의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다르게는 또는 추가적으로, 작용성 변형체는 적어도 1개의 비-보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 경우에, 비-보존적 아미노산 치환은 작용성 변형체의 생물 활성을 간섭하거나 저해하지 않는 것이 더욱 선호된다. 비-보존적 아미노산 치환은, 작용성 변형체의 생물 활성이 모 CAR과 비교하여 증가되도록, 작용성 변형체의 생물 활성을 향상시킬 수 있다.

[0040] 본 발명의 CAR의 아미노산 치환은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환이다. 보존적 아미노산 치환은 당분야에 공지되어 있고, 이는 특정한 물리적 및/또는 화학적 특성을 갖는 하나의 아미노산이 동일하거나 유사한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 교체되는 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 또 다른 산성/음성으로 하전된 극성 아미노산에 대해 치환되는 산성/음성으로 하전된 극성 아미노산(예를 들어, Asp 또는 Glu), 비극성 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산에 대해 치환되는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val 등), 또 다른 염기성/양성으로 하전된 극성 아미노산에 대해 치환되는 염기성/양성으로 하전된 극성 아미노산(예를 들어 Lys, His, Arg 등), 극성 측쇄를 갖는 하전되지 않은 또 다른 아미노산에 대해 치환되는 극성 측쇄를 갖는 하전되지 않은 아미노산(예를 들어, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr 등), 베타-분지 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산에 대해 치환되는 베타-분지 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, Ile, Thr, 및 Val), 방향족 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산에 대해 치환되는 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, His, Phe, Trp, 및 Tyr) 등일 수 있다.

[0041] CAR은 다른 성분들, 예를 들어 다른 아미노산이 작용성 변형체의 생물 활성을 실질적으로 바꾸지 않도록, 특정화된 아미노산 서열 또는 본원에 기재된 서열로 본질적으로 구성될 수 있다.

[0042] 본 발명의 실시태양의 CAR(작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 임의의 길이일 수 있고, 즉 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있지만, CAR(또는 이의 작용성 부분 또는 작용성 변형체)은 이들의 생물 활성, 예를 들어, 항원에 특이적으로 결합하거나, 포유동물에서 병에 걸린 세포를 검출하거나, 포유동물에서 질환을 치료 또는 예방하는 능력 등을 보유해야 한다. 예를 들어, CAR은 약 50 내지 약 1000개의 아미노산 길이, 예컨대 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 또는 그 이상의 아미노산 길이일 수 있다.

[0043] 본 발명의 실시태양의 CAR(본 발명의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 1개 이상의 자연-발생 아미노산 대신 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 아미노사이클로헥산 카복실산, 노르로이신, α-아미노 n-데칸산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-하이드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카복시페닐알라닌, β-페닐세린 β-하이드록시페닐알라닌, 페닐글리신, α-나프틸알라닌, 사이클로헥실알라닌, 사이클로헥실글리신, 인돌린-2-카복실산, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N'-벤질-N'-메틸-라이신, N',N'-디벤질-라이신, 6-하이드록시라이신, 오르니틴, α-아미노사이클로펜탄 카복실산, α-아미노사이클로헥산 카복실산, α-아미노사이클로헥탄 카복실산, α-(2-아미노-2-노르보난)-카복실산, α, γ-디아미노부티르산, α, β-디아미노프로피온산, 호모페닐알라닌, 및 α-3급-부틸글리신이 포함된다.

[0044] 본 발명의 실시태양의 CAR(작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 글리코실화, 아미드화, 카복실화, 인산화, 에스테르화, N-아실화되거나, 예를 들어, 디설파이드 가교를 경유하여 환형화되거나, 산 부가 염으로 전환되고/되거나, 임의적으로 이량체화 또는 중합화되거나, 공액될 수 있다.

[0045] 본 발명의 실시태양의 CAR(이의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 당분야에 공지된 방법에 의해 수득될 수 있다. CAR은 폴리펩티드 또는 단백질을 제조하는 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, CAR은 표준 재조합 방법을 사용하여 본원에 기재된 핵산에 의해 재조합적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 그린(Green) 및 샘브룩(Sambrook)의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2012]을 참조한다. 다르게는, 본원에 기재된 CAR(이의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)은 신펩(Synpep)(미국 캘리포니아주 두블린), 펩티드 테크놀로지스 코퍼레이션(Peptide Technologies Corp.)(미국 메릴랜드주 게이터스버그), 및 멀티플 펩티드 시스템스(Multiple Peptide Systems)(미국 캘리포니아주 샌 디에고)와 같은 회사에 의해 상업적으로 합성될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의

CAR은 합성적이거나, 재조합적이거나, 단리되고/되거나 정제될 수 있다.

[0046] 본원에 기재된 임의의 CAR(이의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이 본 발명의 하나의 실시태양에 의해 추가로 제공된다. 본 발명의 핵산은 본원에 기재된 임의의 리더 도메인, 힌지 도메인, 항원 인식 도메인, TM 도메인, 및 T 세포 활성화 도메인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 핵산은 서열번호 29(FHVVH74-CD828Z), 서열번호 30(FHVVH32-CD828Z), 서열번호 31(FHVVH33-CD828Z), 서열번호 32(FHVVH93-CD828Z), 서열번호 33(FHVVH74-CD8BBZ), 서열번호 34(FHVVH32-CD8BBZ), 서열번호 35(FHVVH33-CD8BBZ), 서열번호 36(FHVVH93-CD8BBZ), 서열번호 37(FHVVH74-CD8ICOSZ), 서열번호 38(FHVVH32-CD8ICOSZ), 서열번호 39(FHVVFI33-CD8ICOSZ), 및 서열번호 40(FHVVH93-CD8ICOSZ)중 어느 한 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성될 수 있다.

[0047] "핵산"은, 본원에 사용될 경우, "폴리뉴클레오타이드", "올리고뉴클레오타이드", 및 "핵산 분자"를 포함하고, 일반적으로 DNA 또는 RNA의 중합체를 의미하는데, 이는 단일-가닥 또는 이중-가닥이고, 합성되거나 천연 공급원으로 부터 수득(예를 들어, 단리되고/되거나 정제)될 수 있으며, 이는 천연, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있고, 이는, 변형되지 않은 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 사이에서 발견되는 포스포디에스테르 대신에, 천연, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오타이드간 연결기, 예컨대 포스포로아미데이트 연결기 또는 포스포로티오에이트 연결기를 함유할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 핵산은 삽입, 결실, 역위, 및/또는 치환을 포함하지 않는다. 그러나, 몇몇 경우에, 본원에 논의된 바와 같이, 핵산은 하나 이상의 삽입, 결실, 역위, 및/또는 치환을 포함하는 것이 적합할 수 있다.

[0048] 본 발명의 하나의 실시태양의 핵산은 재조합적일 수 있다. 본원에 사용될 경우, 용어 "재조합"은 (i) 살아있는 세포에서 복제할 수 있는 핵산 분자에 천연 또는 합성 핵산 분절을 접합시킴으로써 살아있는 세포 밖에서 작성되는 분자, 또는 (ii) 상기 (i)에 기재된 분자의 복제로부터 야기되는 분자를 지칭한다. 본원의 목적을 위해, 복제는 시험관내 복제 또는 생체내 복제일 수 있다.

[0049] 재조합 핵산은 자연 발생되지 않는 서열을 갖거나, 서열의 2개의 달리 분리된 분절의 인공적 조합에 의해 제조된 서열을 갖는 핵산일 수 있다. 이러한 인공적 조합은 종종 화학적 합성에 의해, 또는 더욱 흔히하는 핵산의 단리된 분절의 인공적 조작, 예를 들어, 유전자 조작 기법, 예컨대 그린 및 샘브룩의 상기 문헌에 기재된 기법에 의해 달성된다. 핵산은 당분야에 공지된 절차를 사용하여 화학적 합성 및/또는 효소적 절찰 반응에 기반하여 작성될 수 있다. 예를 들어, 그린 및 샘브룩의 상기 문헌을 참조한다. 예를 들어, 핵산은 자연 발생 뉴클레오타이드, 또는 분자의 생물 안정성을 증가시키거나 혼성화시 형성되는 이중물의 물리적 안정성을 증가시키기 위해 고안된 다양하게 변형된 뉴클레오타이드[예를 들어, 포스포로티오에이트 유도체 및 아크리딘(acridine) 치환된 뉴클레오타이드]를 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 핵산을 생성하기 위해 사용될 수 있는 변형된 뉴클레오타이드의 예로는, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포잔틴, 잔틴, 4-아세틸시토신, 5-(카복시하이드록시메틸) 우라실, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오우라딘, 5-카복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, 베타-D-갈락토실케오신, 이노신, N⁶-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N⁶-치환된 아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실케오신, 5'-메톡시카복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N⁶-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산(v), 위부톡소신(wybutoxosine), 슈도(pseudo)우라실, 퀘오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 3-(3-아미노-3-N-2-카복시프로필) 우라실, 및 2,6-디아미노퓨린이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 다르게는, 본 발명의 하나 이상의 핵산은 매크로몰레큘라 리소시스(Macromolecular Resources)(미국 콜로라도주 포트 콜린스) 및 신테겐(Synthegen)(미국 텍사스주 휴스턴)과 같은 회사로부터 구입될 수 있다.

[0050] 핵산은 임의의 CAR, 또는 이의 작용성 부분 또는 작용성 변형체를 인코딩하는 임의의 단리되거나 정제된 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 다르게는, 뉴클레오타이드 서열은 임의의 서열로 퇴행(degenerate)되거나 퇴행 서열의 조합물인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명의 하나의 실시태양은 본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열, 또는 엄격한 조건하에 본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리되거나 정제된 핵산을 제공한다.

[0052] 엄격한 조건하에 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열은 고도로 엄격한 조건하에 혼성화될 수 있다. "고도로 엄격한

조건"은, 뉴클레오타이드 서열이 비-특이적 혼성화에 비해서 더 강하게 검출될 수 있는 양으로 표적 서열(본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오타이드 서열)에 특이적으로 혼성화됨을 의미한다. 고도로 엄격한 조건은 정확한 상보성 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드, 또는 단지 소수의 산발적 부정합만을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 뉴클레오타이드 서열에 정합하는 소수의 작은 영역(예를 들어, 3 내지 10개 염기)을 갖게 된 무작위 서열로부터 구별하는 조건을 포함한다. 상보성의 이러한 작은 영역은 14 내지 17개 또는 그 이상의 염기의 전장 보체에 비해 더욱 쉽게 용융되고, 고도로 엄격한 혼성화는 이들이 쉽게 구별될 수 있도록 만든다. 비교적 고도의 엄격한 조건은, 예를 들어, 약 50 내지 70℃의 온도에서 약 0.02 내지 0.1M NaCl 또는 등가물에 의해 제공되는 바와 같은, 낮은 염 농도 및/또는 높은 온도 조건을 포함할 것이다. 이러한 고도의 엄격한 조건은, 존재하더라도, 뉴클레오타이드 서열 및 주형 또는 표적 가닥 사이의 부정합을 거의 용인하지 않고, 본 발명의 임의의 CAR의 발현을 검출하기 위해 특별히 적합하다. 일반적으로 조건은 증가하는 양의 포름아미드의 첨가에 의해 더욱 엄격해질 수 있는 것으로 인식된다.

[0053] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 핵산에 적어도 약 70% 이상, 예를 들어, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.

[0054] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 핵산은 재조합 발현 벡터내로 혼입될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양은 본 발명의 임의의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 본원의 목적을 위해, 용어 "재조합 발현 벡터"는, 구축물이 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드가 세포내에서 발현되기에 충분한 조건하에 벡터가 숙주 세포와 접촉되는 경우, 숙주 세포에 의한 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드의 발현을 허용하는, 유전자-변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 구축물을 의미한다. 본 발명의 벡터는 전체로서 자연-발생되지 않는다. 그러나, 벡터의 일부분은 자연-발생될 수 있다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 임의의 유형의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 이는 단일-가닥 또는 이중-가닥이고, 합성되거나 천연 공급원으로부터 부분적으로 수득될 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하나, 이에 제한되지 않고, 이는 천연, 비-천연 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 자연-발생 또는 비-자연-발생 뉴클레오타이드간 연결기, 또는 이러한 유형의 연결기 둘 다를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비-자연 발생 또는 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드간 연결기는 벡터의 전사 또는 복제를 방해하지 않는다.

[0055] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있고, 임의의 적합한 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 번식 및 팽창을 위해, 또는 발현을 위해 또는 이들 둘 다를 위해 고안되는 벡터, 예컨대 플라스미드 및 바이러스를 포함한다. 벡터는 pUC 시리즈[페르멘타스 라이프 사이언시스(Fermentas Life Sciences), 미국 메릴랜드주 글렌 부르니에], 피블루스크립트(pBluescript) 시리즈[스트라타젠(Stratagene), 미국 캘리포니아주 라호야], pET 시리즈[노바젠(Novagen), 미국 위스콘신주 매디슨], pGEX 시리즈[파마시아 바이오텍(Pharmacia Biotech), 스웨덴 옉살라], 및 pEX 시리즈[클론텍(Clontech), 미국 캘리포니아주 팔로 알토]로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 박테리오파아지 벡터, 예컨대 λGT10, λGT11, λZapII(스트라타젠), λEMBL4, 및 λNM1149가 또한 사용될 수 있다. 식물 발현 벡터의 예로는 pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19(클론텍)가 포함된다. 동물 발현 벡터의 예로는 pEUK-C1, pMAM, 및 pMAMneo(클론텍)가 포함된다. 재조합 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 감마레트로바이러스 벡터) 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

[0056] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 재조합 발현 벡터는, 예를 들어, 샘브록 및 그린 등의 상기 문헌에 기재된 표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 환형 또는 선형인 발현 벡터의 구축물은 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 작용성인 복제 시스템을 갖도록 제조될 수 있다. 복제 시스템은, 예를 들어, ColE1, 2 μ 플라스미드, λ, SV40, 소 유두종 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다.

[0057] 재조합 발현 벡터는 조절 서열, 예컨대 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 포함할 수 있고, 이는 적절할 경우 벡터가 도입되는 숙주 세포의 유형(예를 들어, 세균, 곰팡이, 식물, 또는 동물)에 특이적이며 벡터가 DNA-기반 인지 RNA-기반인지를 고려한다. 재조합 발현 벡터는 또한 클로닝을 용이하게 하기 위해 제한 자리를 포함할 수 있다. CAR을 인코딩하는 본 발명의 핵산 서열에 더하여, 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 발현 조절 서열, 예컨대 프로모터, 인핸서(enhancer), 폴리아데닐화(polyadenylation) 신호, 전사 종결자, 내부 리보솜 진입 자리(IRES: internal ribosome entry site) 등을 포함하고, 이는 숙주 세포에서 핵산 서열의 발현을 제공한다.

[0058] 재조합 발현 벡터는 하나 이상의 표지 유전자를 포함할 수 있고, 이는 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포의

선택을 허용한다. 표지 유전자는 살생물제 내성, 예를 들어, 항생제, 중금속 등에 대한 내성, 자가영양성(prototrophy)을 제공하기 위한 영양요구성 숙주에서의 상보성 등을 포함한다. 본 발명의 발현 벡터를 위해 적합한 표지 유전자로는, 예를 들어, 네오마이신(neomycin)/G418 내성 유전자, 하이그로마이신(hygromycin) 내성 유전자, 히스티딘올(histidinol) 내성 유전자, 테트라사이클린(tetracycline) 내성 유전자, 및 암피실린(ampicillin) 내성 유전자가 포함된다.

[0059] 제조합 발현 벡터는 CAR(이의 작용성 부분 및 작용성 변형체 포함)을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 또는 CAR을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보성이거나 이에 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되는 고유적 또는 비-고유적 프로모터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 강한, 약한, 유도성, 조직-특이적 및 발달 단계-특이적 프로모터의 선택은 당분야의 통상적인 기술에 속한다. 유사하게, 뉴클레오타이드 서열과 프로모터의 조합 또한 당분야의 통상적인 기술에 속한다. 프로모터는 비-바이러스성 프로모터 또는 바이러스성 프로모터, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터, 또는 뮌헨 줄기 세포 바이러스의 긴-말단 반복부에서 발견되는 프로모터일 수 있다.

[0060] 본 발명의 제조합 발현 벡터는 일시적 발현, 안정한 발현, 또는 이들 둘 다를 위해 고안될 수 있다. 또한, 제조합 발현 벡터는 구성적 발현 또는 유도성 발현을 위해 제조될 수 있다.

[0061] 추가로, 제조합 발현 벡터는 자살 유전자를 포함하도록 제조될 수 있다. 본원에 사용될 경우, 용어 "자살 유전자"는 자살 유전자를 발현하는 세포가 사멸되도록 만드는 유전자를 지칭한다. 자살 유전자는, 이 유전자가 발현되는 세포 상에서 제제, 예를 들어, 약물에 민감성을 부여하여, 세포가 그러한 제제와 접촉되거나 이에 노출될 경우 세포가 사멸하도록 만드는 유전자이다. 자살 유전자는 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 단순 포진 바이러스(HSV) 티미딘 키나아제(TK) 유전자, 시토신 다미나아제(daminase), 퓨린 뉴클레오타이드 포스포릴라아제, 및 니트로리덕타아제(nitroreductase)가 포함된다.

[0062] 본 발명의 하나의 실시태양은 본원에 기재된 임의의 제조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다. 본원에 사용될 경우, 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 제조합 발현 벡터를 함유할 수 있는 임의의 유형의 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어, 식물, 동물, 곰팡이, 또는 조류일 수 있거나, 원핵 세포, 예를 들어, 세균 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 세포 또는 1차 세포, 즉 유기체, 예를 들어, 인간으로부터 직접 분리된 세포일 수 있다. 숙주 세포는 접착성 세포 또는 부유성 세포, 즉 현탁액에서 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, DH5 α 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포, 중국 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HEK293 세포 등이 포함된다. 제조합 발현 벡터를 증폭시키거나 복제하기 위해서, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어, DH5 α 세포일 수 있다. 제조합 CAR 구축물을 생산하기 위해서, 숙주 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 숙주 세포는 인간 세포일 수 있다. 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있고, 임의의 유형의 조직으로부터 기원할 수 있으며, 임의의 발달 단계일 수 있다. 숙주 세포는 말초 혈액 림프구(PBL) 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)일 수 있다.

[0063] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 숙주 세포는 T 세포이다. 본원의 목적을 위해, T 세포는 임의의 T 세포, 예컨대 배양된 T 세포, 예를 들어, 1차 T 세포, 또는 배양된 T 세포주, 예를 들어, 주르캣(Jurkat), SupT1 등으로부터의 T 세포, 또는 포유동물로부터 수득된 T 세포일 수 있다. 포유동물로부터 수득된다면, T 세포는 제한되지 않지만 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 기타 조직 또는 체액을 비롯한 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. T 세포는 또한 강화되거나 정제될 수 있다. T 세포는 인간 T 세포일 수 있다. T 세포는 인간으로부터 분리된 T 세포일 수 있다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있고, 임의의 발달 단계일 수 있으며, 제한되지 않지만, CD4⁺/CD8⁺ 이중 양성 T 세포, CD4⁺ 헬퍼 T 세포, 예를 들어, Th₁ 및 Th₂ 세포, CD8⁺ T 세포(예를 들어, 세포 독성 T 세포), 종양 침윤 세포, 기억 T 세포, 나이브(naive) T 세포 등이 포함된다. T 세포는 CD8⁺ T 세포 또는 CD4⁺ T 세포일 수 있다.

[0064] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 숙주 세포는 천연 킬러(NK: natural killer) 세포이다. NK 세포는 선천성 면역계에서 일정 역할을 담당하는 세포독성 림프구의 한 유형이다. NK 세포는 거대 과립형 림프구로서 정의되고, B 및 T 림프구를 또한 발생시키는 통상적인 림프구 전구체로부터 분화된 세 번째 종류의 세포를 구성한다[예를 들어, 문헌 "*Immunobiology*, 9th ed., Janeway et al., eds., Garland Publishing, New York, NY (2016)" 참조]. NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도 및 흉선에서 분화되고 성숙한다. 성숙화 이후, NK 세포는 특유의 세포독성 과립과 함께 거대 림프구로서 순환계에 진입한다. NK 세포는 몇몇 비정상적 세포, 예컨대, 예를 들어, 몇몇 종양 세포 및 바이러스-감염된 세포를 인식하여 살해할 수 있고, 세포내 병원체에 대항하는 선천성

면역 방어에서 중요한 것으로 고려된다. T 세포에 관하여 상기 기재된 바와 같이, NK 세포는 임의의 NK 세포, 예컨대 배양된 NK 세포, 예를 들어, 1차 NK 세포, 또는 배양된 NK 세포주로부터의 NK 세포, 또는 포유동물로부터 수득된 NK 세포일 수 있다. 포유동물로부터 수득된다면, NK 세포는 제한되지 않지만 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 기타 조직 또는 체액을 비롯한 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. NK 세포는 또한 강화되거나 정제될 수 있다. NK 세포는 바람직하게는 인간 NK 세포일 수 있다(예를 들어, 인간으로부터 단리됨). NK 세포주는, 예를 들어, 미국 종균 협회(ATCC: American Type Culture Collection; 미국 버지니아주 마나사스 소재)로부터 입수가 가능하고, 예를 들어, NK-92 세포(ATCC CRL-2407), NK92MI 세포(ATCC CRL-2408), 및 이의 유도체가 포함된다.

[0065] 또한, 본원에 기재된 적어도 하나의 숙주 세포를 포함하는 세포 집단이 본 발명의 하나의 실시태양에 의해 제공된다. 세포 집단은 기재된 임의의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를, 임의의 재조합 발현 벡터를 포함하지 않는 적어도 1종의 다른 세포, 예를 들어 숙주 세포(예를 들어, T 세포), 또는 T 세포 이외의 세포, 예를 들어 B 세포, 대식세포, 호중구, 적혈구, 간세포, 내피 세포, 상피 세포, 근육 세포, 뇌 세포 등에 더하여 포함하는 이종성 집단일 수 있다. 다르게는, 세포 집단은 실질적으로 동종성 집단일 수 있고, 여기서 집단은 재조합 발현 벡터를 포함하는(예를 들어, 이로 본질적으로 구성되는) 숙주 세포를 주로 포함한다. 또한, 집단은 세포의 클론성 집단일 수 있고, 여기서 집단의 모든 세포는, 집단의 모든 세포가 재조합 발현 벡터를 포함하도록, 재조합 발현 벡터를 포함하는 단일 숙주 세포의 클론이다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 세포 집단은 본원에 기재된 바와 같은 재조합 발현을 포함하는 숙주 세포를 포함하는 클론성 집단이다.

[0066] CAR을 인코딩하는 본 발명의 재조합 발현 벡터는 "형질감염", "형질전환", 또는 "형질도입"에 의해 세포내로 도입될 수 있다. "형질감염", "형질전환", 또는 "형질도입"은, 본원에서 사용될 경우, 물리적 또는 화학적 방법에 의해 하나 이상의 외래성 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포내로 도입함을 지칭한다. 많은 형질감염 기법은 당 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 인산 칼슘 DNA 공-침전; DEAE-텍스트란; 전기천공; 양이온성 리포솜-중재된 형질감염; 텅스텐 입자-촉진된 미세 입자 폭발; 및 인산 스트론튬 DNA 공-침전이 포함된다. 파아지 또는 바이러스 벡터는, 적합한 패키지 세포에서 감염성 입자의 성장 이후 숙주 세포내로 도입될 수 있고, 이중 대부분은 상업적으로 입수가 가능하다.

[0067] 본 발명의 임의의 CAR(이의 임의의 작용성 부분 또는 변형체 포함), 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 또는 숙주 세포 집단을 포함하는 컨주게이트, 예를 들어 바이오컨주게이트는 본 발명의 범주내에 포함된다. 컨주게이트, 뿐만 아니라 컨주게이트를 합성하는 방법은 일반적으로 당분야에 공지되어 있다.

[0068] CAR(이의 작용성 부분 및 변형체 포함), 핵산, 재조합 발현 벡터, 및 숙주 세포(이의 집단 포함)[이들 모두는 이후 "본 발명의 CAR 물질"로서 집합적으로 지칭됨]는 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 용어 "단리된"은, 본원에 사용될 경우, 그의 자연 환경으로부터 제거되어짐을 의미한다. 용어 "정제된" 또는 "단리된"은 절대적인 순도 또는 단리를 요구하는 것이 아니고; 오히려 이는 상대적인 용어로서 의도된다. 이와 같이, 예를 들어, 정제된(또는 단리된) 숙주 세포 제조물은, 숙주 세포가 신체내에서 그의 자연 환경에 있는 세포에 비해 더욱 순수한 제조물이다. 이러한 숙주 세포는, 예를 들어, 표준 정제 기법에 의해 생산될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 숙주 세포의 제조물은 제조물의 전체 세포 함량의 적어도 약 50%, 예를 들어 적어도 약 70%를 나타내도록 정제된다. 예를 들어, 순도는 적어도 약 50%일 수 있거나, 약 60%, 약 70% 또는 약 80%를 초과할 수 있거나, 약 100%일 수 있다.

[0069] 본 발명의 CAR 물질은 조성물, 예컨대 약학 조성물로 제형화될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양은 CAR, 작용성 부분, 작용성 변형체, 핵산, 발현 벡터, 또는 숙주 세포(이의 집단 포함) 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 임의의 CAR 물질을 포함하는 본 발명의 약학 조성물은 1개 보다 많은 본 발명의 CAR 물질, 예를 들어, CAR 및 핵산, 또는 2개 이상의 상이한 CAR을 포함할 수 있다. 다르게는, 약학 조성물은 본 발명의 CAR 물질을 다른 약학적 활성 제제 또는 약물, 예컨대 화학치료제, 예를 들어, 아스파라기나아제(asparaginase), 부설판(busulfan), 카보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 플루오로우라실, 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아, 메토트렉세이트(methotrexate), 파클리탁셀(paclitaxel), 리툭시맵(rituximab), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine) 등과 함께 포함할 수 있다. 하나의 바람직한 실시태양에서, 약학 조성물은 본 발명의 숙주 세포 또는 이의 집단을 포함한다.

[0070] 바람직하게는, 담체는 약학적으로 허용가능한 담체이다. 약학 조성물에 관하여, 담체는 고려되는 특별한 본 발명의 CAR 물질에 대해 통상적으로 사용되는 임의의 담체일 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체는 당

분야의 숙련가에게 잘 알려져 있고, 일반인이 쉽게 입수할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 사용 조건하에 해로운 부작용이나 독성이 없는 담체인 것이 바람직하다.

[0071] 담체의 선택은 특별한 본 발명의 CAR 물질, 뿐만 아니라 본 발명의 CAR 물질을 투여하기 위해 사용되는 특별한 방법에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 하나의 바람직한 실시태양에서, CAR은 숙주 세포에 의해 발현되고, 이는 바람직하게는 T 세포 또는 N 세포이고, CAR을 발현하는 숙주 세포는 환자에게 투여된다. 이들 세포는 세포의 수용자와 관련하여 자가유래성(autologous)이거나 동종이계(allogeneic)일 수 있다. CAR을 인코딩하는 핵산은, 제한되는 것은 아니지만 감마-레트로바이러스, 렌티바이러스, 또는 트랜스포존(transposon) 시스템에 의한 형질도입을 비롯한 임의의 다양한 유전자 변형 방법에 의해 세포로 도입될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 다양한 적합한 제형이 존재한다. 적합한 제형은 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 종양내, 동맥내, 척수강내, 또는 복강내 투여를 위한 임의의 제형을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR 물질을 투여하기 위해 1가지 보다 많은 투여 경로가 사용될 수 있고, 특정 경우에, 특별한 경로는 또 다른 경로에 비해 더욱 즉각적이고 더욱 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

[0072] 바람직하게는, 본 발명의 CAR 물질은 주사에 의해, 예를 들어, 정맥내로 투여된다. 본 발명의 CAR 물질이 본 발명의 CAR(또는 이의 작용성 변형체)을 발현하는 숙주 세포인 경우, 주사를 위해 세포에 대해 약학적으로 허용가능한 담체로는, 예를 들어, 정상 식염수(수중 약 0.90(w/v)%의 NaCl, 수중 약 300 mOsm/l의 NaCl, 또는 물 1 L 당 약 9.0 g의 NaCl), 노르모솔(NORMOSOL) R 전해질 용액[애보트(Abbott), 미국 일리노이주 시카고], 플라스마-라이트(PLASMA-LYTE) A[박스터(Baxter), 미국 일리노이주 디어필드], 수중 약 5% 텍스트로스, 또는 링거(Ringer)의 락테이트와 같은 임의의 등장성 담체가 포함될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 약학적으로 허용가능한 담체는 인간 혈청 알부민으로 보충된다.

[0073] 조성물은, 본 발명의 조성물의 전달이 치료되는 자리의 감각화를 일으키기 이전에 및 충분한 시간에 의해 일어나도록, 시간-방출, 지연-방출, 및 지속 방출 전달 시스템을 이용할 수 있다. 많은 유형의 방출 전달 시스템이 이용가능하고 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 이러한 시스템은 조성물의 반복되는 투여를 방지할 수 있고, 이로써 피험자 및 담당의사의 편의성을 증가시키고, 본 발명의 특정 조성물 실시태양에 적합할 수 있다.

[0074] 특별한 이론 또는 기작에 얽매려는 것은 아니지만, BCMA에 대한 항원-특이적 반응을 유도함으로써, 본 발명의 CAR은 다음중 하나 이상을 제공하는 것으로 여겨진다: BCMA-발현 암 세포의 표적화 및 파괴, 암 세포의 감소 또는 제거, 면역 세포의 종양 자리로의 침윤 촉진, 및 항암 반응의 증진/연장.

[0075] 본 발명의 CAR 물질은, 예를 들어 암과 같은 질환을 포유동물에서 치료하거나 예방하는 방법에 사용될 수 있는 것으로 간주된다. 특별한 이론 또는 기작에 얽매려는 것은 아니지만, 본 발명의 CAR은 생물 활성, 예를 들어, BCMA와 같은 항원을 인식하는 능력을 가져서, CAR은 세포에 의해 발현될 경우 CAR이 특이적인 항원, 예를 들어, BCMA를 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 중재할 수 있도록 한다. 이와 관련하여, 본 발명의 하나의 실시태양은 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하기에 효과적인 양으로 본 발명의 임의의 CAR, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포 집단, 및/또는 약학 조성물을 포유동물에게 투여함을 포함하는, 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 하나의 바람직한 실시태양에서, 방법은 본 발명의 CAR이 형질도입된 숙주 세포를 포유동물에게 주입함을 포함한다.

[0076] 본원에 기재된 본 발명의 BCMA CAR을 발현하는 하나 이상의 단리된 숙주 세포는 BCMA를 생체외, 생체내, 또는 시험관내에서 발현하는 암 세포 집단과 접촉될 수 있다. "생체외"는 천연 조건의 최소한의 변경하에 유기체 밖의 인공적 환경에서 세포 또는 조직내에서 또는 그 위에서 수행되는 방법을 지칭한다. 대조적으로, 용어 "생체내"는 살아있는 유기체의 정상적인 온전한 상태에서 이러한 유기체내에서 수행되는 방법을 지칭하는 반면, "시험관내" 방법은 유기체의 일상적 생물 환경으로부터 단리되어진 유기체의 성분을 사용하여 수행된다. 본 발명의 방법은 바람직하게는 생체외 및 생체내 성분을 포함한다. 이와 관련하여, 예를 들어, 상기 기재된 단리된 숙주 세포는 본 발명의 항-BCMA CAR을 발현하는 조건하에 생체외에서 배양되고, 이어서 BCMA-양성 암, 예를 들어, 다발성 골수종을 앓는 포유동물(바람직하게는 인간)내로 직접 전달될 수 있다. 이러한 세포 전달 방법은 "입양 세포 전달(ACT: adoptive cell transfer)"로서 당분야에 지칭되고, 여기서 면역-유래된 세포는 수용자내로 전달되어 면역-유래된 세포의 작용성을 숙주에 전달한다. 면역-유래된 세포는 수용자 또는 또 다른 개체로부터 기원될 수 있다. 입양 세포 전달 방법은 혈액학적 암, 예컨대 골수종을 비롯한 다양한 유형의 암을 치료한다.

[0077] 본 발명의 CAR-인코딩 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 CAR-인코딩 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물이 일단 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여되면, CAR의 생물 활성은 당분야에 공지된 임의

의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 본 발명의 방법에 따라서, CAR은 암 위의 BCMA에 결합하고, 암 세포는 파괴된다. 암 세포 표면 상에서의 BCMA로의 CAR의 결합은, 예를 들어, 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay) 및 유세포 분석을 비롯하여 당분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 분석될 수 있다. 세포를 파괴하는 CAR의 능력은, 예를 들어, 코헨데르퍼(Kochenderfer) 등의 문헌[J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)], 및 헤르만(Herman) 등의 문헌[J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기재된 세포독성 검정과 같은 당분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 측정될 수 있다. CAR의 생물 활성은 CD107a, IFN γ , IL-2, 및 TNF와 같은 특정 사이토킨의 발현을 분석함으로써 측정될 수 있다.

[0078] 본 발명의 하나의 실시태양은 본 발명의 CAR 물질을 투여하기 이전에 포유 동물로부터 림프구제거(lymphodepletion)를 수행함을 추가로 포함한다. 림프구제거의 예로는 비골수과괴성(nonmyeloablative) 림프구제거 화학요법, 골수과괴성(myeloablative) 림프구제거 화학요법, 전신 방사선 조사 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0079] 숙주 세포 또는 세포 집단이 투여되는 본 발명의 방법의 목적을 위해, 세포는 포유동물에 대해 동종이형이거나 자가유래성인 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 포유동물에 대해 자가유래성이다.

[0080] "효과량" 또는 "치료에 효과적인 양"은 개별체에서 암을 예방하거나 치료하기에 적절한 용량을 지칭한다. 치료학적 또는 예방학적 사용을 위해 효과적인 양은, 예를 들어, 치료될 질환 또는 질병의 단계 및 위중성, 환자의 연령, 체중, 및 건강의 일반적 상태, 및 담당 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 용량의 크기는 또한 선택되는 특정 CAR 물질, 투여 방법, 투여의 시기 및 빈도, 특정 CAR 물질의 투여와 동반될 지도 모르는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도, 및 원하는 생리학적 효과에 의해 결정될 것이다. 당분야의 숙련가라면, 다양한 질환 또는 질병(예를 들어, 염)이, 아마도 각각의 또는 다양한 회차의 투여로 본 발명의 CAR 물질을 사용하는 다중 투여를 비롯하여 장기간의 치료를 필요로 할 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니고 예로서, 본 발명의 CAR 물질의 용량은 1일당 치료되는 피험체의 체중 1 kg당 약 0.001 내지 약 1000 mg, 약 0.01 내지 약 10 mg/kg 체중/일, 약 0.01 mg 내지 약 1 mg/kg 체중/일일 수 있다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 용량은 체중 1 kg당 약 1×10^4 내지 약 1×10^{10} 개의 본 발명의 CAR 발현 세포일 수 있다. 본 발명의 CAR 물질이 숙주 세포인 경우, 숙주 세포의 예시적 용량은 최소한 100만 세포(1 mg 세포/용량)일 수 있고, 예를 들어, 체중 1 kg당 1×10^9 개의 세포이다. 본 발명의 CAR 물질이 바이러스에 패키징된 핵산인 경우, 바이러스의 예시적인 용량은 1 ng/용량일 수 있다.

[0081] 본 발명의 목적을 위해, 투여되는 본 발명의 CAR 물질의 양 또는 용량은 합리적인 시간대에 걸쳐 피험체 또는 동물에서 치료학적 또는 예방학적 반응에 영향을 주기에 충분해야 한다. 예를 들어, 본 발명의 CAR 물질의 용량은, 투여 시점으로부터 약 2 시간 또는 그 이상, 예를 들어, 약 12 내지 약 24 시간 또는 그 이상의 기간에 항원에 결합하거나, 질환을 검출하거나 치료하거나 예방하기에 충분해야 한다. 특정 실시태양에서, 시간 기간은 심지어 더 길 수 있다. 용량은 특별한 본 발명의 CAR 물질 및 동물(예를 들어, 인간)의 증상, 뿐만 아니라 치료되는 동물(예를 들어, 인간)의 체중에 의해 결정될 것이다.

[0082] 본 발명의 목적을 위해, 예를 들어, 상이한 용량의 T 세포가 각각 제공된 포유동물 세트중에서, 포유동물에게 소정의 용량의 T 세포를 투여할 경우, 본 발명의 CAR을 발현하는 T 세포에 의해 표적 세포가 용해되고/되거나 IFN- γ 가 분비되는 정도를 비교함을 포함하는 검정은, 포유동물에게 투여되는 출발 용량을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 특정 용량의 투여시에 표적 세포가 용해되고/되거나 IFN- γ 가 분비되는 정도는 당분야에 공지된 방법에 의해 분석될 수 있다.

[0083] 본 발명의 CAR 물질이 1종 이상의 추가적인 치료제와 함께 투여되는 경우, 1종 이상의 추가적인 치료제는 포유동물에 공투여될 수 있다. "공투여"는, 본 발명의 CAR 물질이 1종 이상의 추가적인 치료제의 효과를 증진시킬 수 있거나, 이의 반대이도록, 1종 이상의 추가적인 치료제 및 본 발명의 CAR 물질을 충분히 가까운 시간대에 투여함을 의미한다. 이와 관련하여, 본 발명의 CAR 물질이 먼저 투여되고 1종 이상의 추가적인 치료제가 두 번째로 투여될 수 있거나, 그 반대일 수 있다. 다르게는, 본 발명의 CAR 물질 및 1종 이상의 추가적인 치료제는 동시에 투여될 수 있다. CAR 물질과 공투여될 수 있는 예시적인 치료제는 IL-2이다. IL-2는 본 발명의 CAR 물질의 치료학적 효과를 증진시키는 것으로 여겨진다. 특별한 이론 또는 기작에 얽매려는 것은 아니지만, IL-2가 본 발명의 CAR을 발현하는 세포의 수의 생체내 팽창을 증진시킴으로써 치료법을 향상시키는 것으로 여겨진다.

[0084] 본원에 언급된 포유동물은 임의의 포유동물일 수 있다. 본원에 사용될 경우, 용어 "포유동물"은 임의의 포유동

물을 지칭하고, 설치목(Rodentia)의 포유동물, 예컨대 마우스 및 햄스터, 및 중치목(Logomorpha)의 포유동물, 예컨대 토끼를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 포유동물은 식육목(Carnivora), 예컨대 고양이과(Feline)(고양이) 및 개과(Canine)(개)로부터일 수 있다. 포유동물은 우제목(Artiodactyla), 예컨대 소과(소) 및 돼지과(돼지), 또는 기제목(Perissodactyla), 예컨대 말속(말)으로부터일 수 있다. 포유동물은 영장류(Primate), 세보이드(Ceboid), 또는 시모이드(Simoid)(원숭이) 또는 진원류(인간 및 유인원) 목으로부터일 수 있다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0085] 본 발명의 치료 방법에 관하여, 암은 임의의 암일 수 있다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 암은 BCMA-발현 암이다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 암은 다발성 골수종 또는 호지킨(Hodgkin)의 림프종이다.

[0086] 본원에 논의된 바와 같이, 혈장 세포 골수종 또는 칼러(Kahler)의 질환으로서도 공지된 다발성 골수종은 보통 항체의 생산에 대해 책임이 있는 백혈구의 한 유형인 혈장 세포의 암이다[라브(Raab) 등의 문헌 "*Lancet*, 374: 324-329 (2009)"]. 다발성 골수종은 매년 100,000명중 1 내지 4명에서 발병된다. 이러한 질환은 남성에서 더욱 흔하고, 아직 알려지지 않은 원인으로 인해 백인계 미국인의 경우에 비해 아프리카계 미국인에서 2배 더 발병된다. 다발성 골수종은 가장 소수의 혈액학적 악성종양이고(14%), 모든 암의 1%를 구성한다(상기 라브의 문헌). 다발성 골수종의 치료는 전형적으로 조혈 모세포 이식(동종이계 또는 자가유래성)이 수반되는 고선량 화학요법을 포함하지만; 이러한 치료를 겪은 다발성 골수종 환자에서 높은 재발률은 흔하다. 상기 논의된 바와 같이, BCMA는 다발성 골수종 세포에 의해 높게 발현된다[예를 들어, 노박(Novak) 등의 상기 문헌; 네리(Neri) 등의 상기 문헌; 벨루씨(Bellucci) 등의 상기 문헌; 및 모룩스(Moreaux) 등의 상기 문헌 참조].

[0087] 호지킨 림프종(이전에 호지킨의 질환으로서 공지됨)은 리드-스텐버그(Reed-Sternberg) 세포로서 지칭되는 다핵화된 세포 유형의 존재에 의해 표시되는 면역계의 암이다. 호지킨 림프종의 2가지 주된 유형으로는 고전적 호지킨 림프종 및 결절성 림프구-우세 호지킨 림프종이 포함된다. 호지킨 림프종은 현재 방사선 치료법, 화학요법, 또는 조혈 모세포 이식에 의해 치료되고 있는데, 치료의 선택은 환자의 연령 및 성별, 질환의 단계, 크기, 및 병력의 하위 유형에 좌우된다. BCMA 발현은 호지킨 림프종 세포의 표면 상에서 검출되어 왔다[예를 들어, 치우(Chiu) 등의 문헌 "*Blood*, 109(2): 729-739 (2007)"].

[0088] 용어 "치료하는" 및 "예방하는" 뿐만 아니라 이들로부터 유래된 단어들은, 본원에 사용될 경우, 반드시 100% 또는 완전한 치료 또는 예방을 의미할 필요는 없다. 오히려, 당분야의 숙련가가 잠재적 이점 또는 치료학적 효과를 갖는 것으로서 인식하는 다양한 정도의 치료 또는 예방이 존재한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 포유동물에서 임의의 수준의 암의 치료 또는 예방의 임의의 양을 제공할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은 치료되거나 예방되는 질환, 예를 들어, 암의 하나 이상의 증상 또는 증후의 치료 또는 예방을 포함할 수 있다. 또한, 본원의 목적을 위해, "예방"은 질환, 예를 들어 암의 개시, 또는 이의 증후 또는 증상을 지연시킴을 포괄할 수 있다.

[0089] 본 발명의 또 다른 실시태양은 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는 방법에 사용하기 위하여 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 CAR, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포 집단, 및/또는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 또 다른 실시태양은 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 약제를 제조하는데 있어서의, 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 CAR, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포 집단, 및/또는 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0090] 하기 실시예는 추가로 본 발명을 예시하지만, 물론 그의 범주를 임의의 방식으로 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0091] 실시예

[0092] 실시예 1 내지 10에서 이용된 재료 및 방법은 아래에 제공된다.

[0093] 세포주 및 1차 세포

[0094] 다발성 골수종 BCMA⁺ 세포주 H929, U266, 및 RPMI8226을 ATCC로부터 획득하였다. BCMA-음성 폐암 세포주 A549를 ATCC로부터 획득하였다. BCMA-음성 육종 세포주를 ATCC로부터 획득하였다.

[0095] 하기 실험 이전에 실험실에서 ATCC로부터의 BCMA-K562 및 K562 세포를 전장 BCMA용 유전자에 의해 형질도입시켰다. 하기 실험 이전에 실험실에서 NGFR-K562 및 K562 세포를 저-친화도 신경 성장 인자용 유전자에 의해 형질도입시켰다. 동일한 감마레트로바이러스 벡터 및 방법을 사용하여 BCMA-K562 및 NGFR-K562 세포를 형질도입시켰다.

- [0096] 다발성 골수종을 앓는 6명의 환자로부터의 조직 샘플 또는 말초 혈액 단핵 세포(PMBC)를 골수종 환자 1 내지 6 으로 지정하였다. 흑색종을 앓는 3명의 피험체로부터의 PMBC를 사용하였고, 공여자를 공여자 A, 공여자 B, 및 공여자 C로서 표지화하였다. 3명의 건강한 공여자로부터의 1차 CD34⁺ 조혈 세포를 또한 수득하였다. 사용된 모든 인간 샘플을 국립 암 연구소에서 기관 감사 위원회(Institutional Review Board) 승인된 임상 시험에 등록된 환자로부터 수득하였다.
- [0097] 전체-인간 중쇄-단독(FHVVH) CAR의 작성
- [0098] 전체 인간 중쇄-단독 항원-인식(FHVVH) 도메인을 함유하는 일련의 CAR을 제조하였다. 각각의 CAR의 서열은 5' 단부에서 3' 단부까지 다음과 같은 패턴을 따랐다: CD8 α 리더 서열, 4개의 단일 중쇄 가변 영역 도메인중 1개, 및 인간 CD8 α 분자의 힌지 및 막관통 영역. 이어서, CD28, 4-1BB, 또는 유도성 T 세포 공자극성(ICOS) 분자의 세포질 부분을 첨가하였고, CO3 ζ 분자의 세포질 부분이 수반되었다. 이들 CAR의 전체 아미노산 서열은 서열번호 17 내지 28에 제공된다.
- [0099] 4개의 전체-인간 중쇄-단독 CAR 항원-인식 도메인을 도 1a 내지 11에 제시된 바와 같이 FHVVH 74, 32, 33, 및 93 으로서 지정하였다. CAR 명칭은 또한 CD8 α 힌지 및 막관통 도메인, 포함된 공자극성 도메인, 및 CD3 ζ 도메인을 포함한다. 예를 들어, FHVVH74-CD828Z는 FHVVH74 항원-인식 도메인, CD8 α 로부터의 힌지 및 막관통 도메인, CD28 공자극성 도메인, 및 CD3 ζ T 세포 활성화 도메인을 갖는다. 11D5-3-CD828Z 항-BCMA CAR은 양성 대조군 으로서 사용되었다.
- [0100] 이들 CAR을 작성하고, CAR 뉴클레오타이드 서열을 MSGV 감마레트로바이러스 벡터 주쇄내로 표준 방법에 의해 결합 시켰다. CAR의 전체 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 29 내지 40에 제공된다. BCMA-특이적 가변성 중쇄 서열을 GBLOCK 단편[인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지스(IDT: Integrated DNA Technologies), 미국 일리노이주 스코키]으로서 합성하였다. 각각의 합성된 단편은 GTC 트리뉴클레오타이드, NcoI 자리, CD8 α 리더 서열, FHVVH 서열, CD8 α 힌지 및 막관통 도메인의 일부, BlnI 자리, 및 TATCGT 핵사뉴클레오타이드(서열번호 41로서 제공됨)를 함유하였다. GTC 및 TATCGT(서열번호 41) 뉴클레오타이드를 첨가하여 NcoI 및 BlnI에 의한 완전한 단부 분할을 확보하였다. 단편을 BlnI 및 NCOI-HF[뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 미국 매사추세츠주 입스위치]에 의해 2 시간 동안 37°C에서 소화시켰다. 이어서 쿼릭(QIAQUICK) PCR 정제 키트[쿼릭(Qiagen)]를 사용하여 소화된 단편을 정제하였다. GBLOCK[인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지스(IDT), 미국 일리노이주 스코키] 단편에 포함되지 않은 CAR의 다른 성분들을 또한 포함하고 있는, BlnI/NcoI-HF 소화되고 겔-정제된 MSGV 벡터 주쇄내로 상기 단편을 결합시켰다.
- [0101] MSGV 벡터 주쇄에 포함된 CAR 성분은 다음과 같았다: GBLOCK[인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지스(IDT), 미국 일리노이주 스코키] 단편에 포함되지 않은 CD8 α 도메인의 나머지 부분, 공자극성 도메인을 인코딩하는 서열, CD28 또는 4-1BB 또는 ICOS, 및 CD3 ζ 도메인. 각각의 GBLOCK[인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지스(IDT), 미국 일리노이주 스코키] CAR 단편 및 MSGV 벡터 주쇄 단편의 결합을 급속 DNA 결합 키트(Rapid DNA Ligation Kit)[로슈 어플라이드 사이언시즈(Roche Applied Sciences)]에 의해 실행하였다.
- [0102] T 세포 상에서의 CAR 검출
- [0103] CAR 벡터중 하나가 형질도입된 T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포를 세척하고 파이코에리트린(phycoerythrin)이 표지화된 BCMA-Fc 단백질로 염색시켜서 세포-표면 CAR 분자를 검출하였다. 5십만개의 T 세포를 50 ml의 염색 완충액에 현탁시키고, 적정된 양의 BCMA-Fc-PE 시약을 첨가하였다. CD3, CD4, 및 CD8을 위한 염색을 또한 표준 방법에 의해 수행하였다. 7-AAD[7-아미노-악티노마이신(actinomycin) 염료; 비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences)]를 사용하여 사멸 세포를 배제하였다.
- [0104] T 세포 배양
- [0105] PMBC를 해동시키고 AIM V 배지[인비트로젠(Invitrogen), 미국 매사추세츠주 왈탐] + 5% AB 혈청[밸리 바이오메디칼(Valley Biomedical), 미국 버지니아주 윈체스터], 100 U/ml의 페니실린, 및 100 μ g/ml의 스트렙토마이신이 함유된 T 세포 배지에서 세척하였다. 형질도입 이전에, PMBC를 T 세포 배지 + 50 ng/ml의 항-CD3 단일클론성 항체 OKT3[오르토(Ortho), 미국 뉴저지주 브릿지워터], 및 300 IU/ml의 IL-2중에서 1×10^6 세포/ml의 농도로 현탁시켰다. 형질도입 이후, T 세포를 T 세포 배지 + IL-2에 유지시켰다.
- [0106] 감마레트로바이러스 형질도입

- [0107] 복제-불능 감마레트로바이러스를 생산하기 위해, RD114 외피 단백질을 인코딩하는 플라스미드와 함께 CAR을 인코딩하는 플라스미드에 의해 패키징 세포를 형질감염시켰다. T 세포의 감마레트로바이러스 형질도입을 T 세포 배양 개시 후 2일째 수행하였다.
- [0108] 인터페론- γ 및 종양 괴사 인자 알파 ELISA
- [0109] 96웰 환저 플레이트의 2중 웰에서 200 μ l의 AIM-V 배지 + 5% 인간 혈청중에서 10만개의 BCMA⁺ 또는 BCMA-음성 표적 세포를 100,000개의 CAR-형질도입된 T 세포와 합하였다. 플레이트를 37°C에서 18 내지 20 시간 동안 항온 처리하였다. 항온처리 이후, 인터페론 감마(INF γ)에 대한 ELISA를 표준 방법[피어스(Pierce)]에 의해 수행하였다. 종양 괴사 인자 알파(TNF) ELISA를 표준 방법[알앤디(R&D)]에 의해 수행하였다.
- [0110] CD107a 검정
- [0111] 시험되는 각각의 T 세포 배양을 위해, 2개의 시험관을 제조하였다. 1개의 시험관은 BCMA-K562 세포를 함유하였고, 나머지 시험관은 NGFR-K562 세포를 함유하였다. 양쪽 시험관 모두 CAR-형질도입된 T 세포, 1 ml의 AIM-V 배지 + 5% 인간 AB 혈청, 적정된 농도의 항-CD107a 항체[이바이오사이언스(eBioscience), 클론 eBioH4A3] 및 1 μ l의 골기 스탱(GOLGI STOP)[모네신(monesin), 비디 바이오사이언시스, 미국 캘리포니아주 새너제이]을 함유하였다. 모든 시험관을 37°C에서 4 시간 동안 항온처리한 다음, CD3, CD4, 및 CD8에 대하여 염색시켰다.
- [0112] 유세포 분석
- [0113] 항-BCMA 염색을 위해, 세포를 다중클론성 비오틴-표지화된 염소-항-인간 BCMA 항체[알앤디 시스템스(R&D Systems), 카탈로그 번호 BAF 193]에 의해 염색시키고, 이후 스트렙타비딘(streptavidin)(BD)으로 염색시켰다. 골수 세포를 또한 항-CD38(이바이오사이언스)로 염색시켰다. 골수 세포를 또한 항-CD38(이바이오사이언스) 및 항-CD56(BD)으로 염색시켰다. 모든 실험에 대한 유세포 분석을 플로우조(FLOWJO) 소프트웨어[트리 스타 인코포레이티드(Tree Star, Inc.), 미국 오리건주]에 의해 수행하였다.
- [0114] 증식 검정
- [0115] 공배양을 24-웰 플레이트에서 착수하였다. 공배양물에 포함된 표적 세포는 0.5×10^6 개의 방사선 조사된 BCMA-K562 세포 또는 0.5×10^6 개의 방사선 조사된 NGFR-K562 세포였다. 공배양물은 또한 항-bcma2 또는 SP6 이 형질도입된 배양물로부터의 1×10^6 개의 T 세포를 포함하였다. T 세포를 이전에 기재된 바와 같이 카복시 플루오레세인 디아세테이트 석신이미딜 에스테르(CFSE: carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, 인비트로젠)에 의해 표지화하였다. 공배양에 사용된 배지는 AIM V + 5% 인간 AB 혈청이었다. IL-2를 배지에 첨가하지 않았다. 개시한 후 4일째, 사멸 세포를 배제하기 위해 트립판 블루(trypan blue)를 사용하여 각각의 공배양물중 살아있는 세포를 계수하고, 유세포 분석을 수행하였다.
- [0116] 세포독성 검정
- [0117] 음성-대조군 CCRF-CEM 세포의 생존에 대하여 BCMA⁺ 표적 세포의 생존을 비교함으로써 세포독성을 측정하였다. 이들 두 세포 유형을 동일한 시험관에서 CAR-형질도입된 T 세포와 합하였다. CCRF-CEM 음성 대조군 세포를 형광 염료 5-(및-6)-(((4-클로로메틸)벤조일)아미노) 테트라메틸로다민(CMTMR)(인비트로젠)에 의해 표지화하고, BCMA⁺ 표적 세포를 CFSE에 의해 표지화하였다. 공배양을 멸균 5 ml의 시험관(BD)에서 2중으로 다수의 T 세포 대 표적 세포 비로 착수하였다. 시험관에 함유된 표적 세포는 50,000개의 CCRF-CEM 음성-대조군 세포와 함께 50,000개의 BCMA⁺ 표적 세포였다. 배양물을 4 시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 항온처리 직후에, 7AAD(7-아미노-악티노마이신 D)(BD)를 첨가하고, 유세포 분석 획득을 수행하였다. 각각의 T 세포 + 표적-세포 배양액에 대하여, 살아있는 BCMA⁺ 세포의 퍼센트를 살아있는 CCRF-CEM 음성 대조군 세포의 퍼센트로 나눔으로써 BCMA⁺ 표적 세포의 생존율을 결정하였다. 효과기 T 세포없이 BCMA⁺ 표적 세포 및 CCRF-CEM 세포만을 함유한 시험관에서 각각의 T 세포 + 표적 세포 배양물중 BCMA⁺ 표적 세포의 생존율을 살아있는 BCMA⁺ 세포의 퍼센트 대 살아있는 CCRF-CEM 음성 대조군 세포의 퍼센트 비로 나눔으로써 BCMA⁺ 표적 세포의 보정된 생존율을 계산하였다. 이러한 보정은 출발 세포 수에서의 변화 및 자발적 표적 세포 사멸을 설명하기 위해 필수적이다. 세포독성을 다음과 같이 계산하였다: BCMA⁺ 표적 세포의 세포독성(%) = 100 - BCMA⁺ 표적 세포의 보정된 생존율.

[0118] 생체내 무관 모델 치료 실험

[0119] 더 잭슨 래보레이토리(The Jackson Laboratory)로부터의 NSG 마우스(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)를 사용하였다. 마우스에게 RPMI8226 세포를 피내로 주사하였다. 종양을 10일 동안 성장시켰다. 이어서, 실시예 9(도 9b 및 9c) 또는 실시예 10에 지시된 CAR이 형질도입되거나, 형질도입되지 않은 채로 남아있는 인간 T 세포를 실시예 9(도 9b 및 9c) 또는 실시예 10에 주지된 용량으로 마우스에게 정맥내로 주입하였다. 종양을 3일마다 캘리퍼스(calipers)에 의해 측정하였다. 가장 긴 길이 및 가장 긴 길이에 수직인 길이를 곱하여 종양 크기(면적)를 mm²로 측정하였다. 가장 긴 길이가 15 mm에 도달될 경우, 마우스를 희생시켰다. 동물 연구는 국립 암 연구소 동물 실험 윤리 위원회(Animal Care and Use Committee)에 의해 승인되었다.

[0120] 실시예 1

[0121] 본 실시예는 중쇄-단독 항원 인식 도메인을 갖는 CAR의 고안을 보여준다.

[0122] 전체-인간 중쇄-단독 항원 인식 도메인을 갖는 12개의 CAR을 도 1a 내지 1i에 제시된 바와 같이 고안하였다. N-말단에서 C-말단까지 이들 CAR의 일반적인 고안은 다음을 포함한다: CD8 α 리더 서열, 전체-인간 중쇄 가변 영역, CD8 α 힌지 및 막관통 도메인, 3개의 공자극성 도메인중 하나의 세포질 부분, CD3 ζ 활성화 도메인의 세포질 부분. 시험된 3개의 공자극성 도메인은 CD28, 4-1BB, 및 유도성 T 세포 공자극성(ICOS) 도메인이었다. 본 실시예는 첫 번째 CAR이 중쇄-단독 항원 인식 도메인을 갖는 것으로 보고되었음을 나타낸다.

[0123] 실시예 2

[0124] 본 실시예는 중쇄-단독 CAR이 T 세포의 표면 상에서 발현되었음을 보여준다.

[0125] 실험을 실행하기 위해, 다발성 골수종(MM) 환자로부터의 1차 인간 T 세포를 도 2에 제시된 중쇄-단독 CAR에 의해 형질도입시켰다. 세포를 BCMA-Fc 시약으로 염색시킨 후 유세포 분석을 수행하여 CAR 표면 발현을 평가하였다(도 2). 모든 4가지 FHVH CAR은 도 2에 제시된 바와 같이 T 세포의 표면 상에서 지속적으로 발현되었다. 알려지지 않은 이유로 인해 염색의 중간 형광 강도는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 둘 다를 함유한 11D5-3-CD828Z 대조군 CAR의 경우 다소 더 높았다.

[0126] 실시예 3

[0127] 본 실시예는 중쇄-단독 CAR이 BCMA-특이적 방식으로 탈과립화되었음을 보여준다.

[0128] 도 3에 제시된 4가지 FHVH CAR 각각 및 11D5-3-CD828Z CAR을 발현하는 T 세포의 BCMA-특이적 탈과립화를 측정하였다. 각각의 FHVH CAR이 형질도입된 T 세포는, 도 3에 제시된 바와 같이 BCMA-음성 표적 세포가 아닌 BCMA-발현 표적 세포에 의한 자극에 반응하여 CD107a를 특이적으로 상향조절하였다. 11D5-3을 발현하는 T 세포는 CD107a를 상향조절하였다(도 3). CD107a의 상향조절은 T 세포의 BCMA-특이적 탈과립화를 보여주고, 이는 퍼포린(perforin)-중재된 세포독성 과정의 일부이다.

[0129] 실시예 4

[0130] 본 실시예는 중쇄-단독 CAR을 발현하는 T 세포가 사이토킨을 BCMA-특이적 방식으로 방출하였음을 보여준다.

[0131] MM 환자로부터의 1차 인간 T 세포를, 다양한 표적 세포주와 함께 시험관내에서 배양될 경우 인터페론 감마(IFN γ) 및 종양 괴사 인자 알파(TNF)를 방출하는 이들의 능력에 대해 평가하였다. 표 1 내지 3에 제시된 모든 FHVH CAR은, 각각 표 1 내지 3에 나타난 바와 같이, 이들 사이토킨을 매우 BCMA-특이적 방식으로 방출하는 것으로 밝혀졌다.

[0132] [표 1]

[0133] 인터페론-감마 ELISA

	BCMA-K 562	RPMI-8 226	NGFR-K 562	CCRF-C EM	293GP	T-세포 단독	% CAR ⁺
형질도입되지 않음	39.1	44.4	37.7	17.0	17.0	16.0	0.6
11D5-3-CD828 Z	36260.4	1598.7	57.1	28.6	20.0	21.8	68.4
FHVB74-CD82 8Z	35717.6	2683.3	52.3	21.0	17.8	15.5	61.3
FHVB32-CD82 8Z	37876.2	3060.9	66.9	29.4	17.3	16.4	55.7
FHVB33-CD82 8Z	31323.4	4059.5	78.3	17.5	18.5	15.4	60.5
FHVB93-CD82 8Z	31288.2	3786.0	48.9	20.6	14.7	15.9	52.2

[0134]

[0135] 표 1에 있어서, 배양된 T 세포를 지시된 CAR에 의해 형질도입시키고, 지시된 표적 세포(상부 가로열)와 함께 하룻밤 배양하였다. 하룻밤 항온처리한 후, 표준 ELISA 검정을 배양 상청액에서 수행하였다. BCMA-K562 및 RPMI8226은 BCMA⁺이다. NGFR-K562, CCRF-CEM, 및 293GP는 BCMA-음성이다. 지시된 CAR을 발현하는 T 세포의 백분율을 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색시킨 후 유세포 분석함으로써 결정하였다. % CAR⁺은 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색된 각각의 CAR이 형질도입된 CD3⁺ 세포의 백분율에서 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색된 형질도입되지 않은 CD3⁺ 림프구의 백분율을 차감한 값과 동일하다. % CAR⁺ 세로열을 제외하고, 모든 숫자는 인터페론-감마의 pg/ml이다.

[0136] [표 2]

[0137] 종양-괴사 인자-알파 ELISA

	BCMA-K 562	RPMI-8 226	NGFR-K 562	CCRF-C EM	293GP	T-세포 단독	% CAR ⁺
형질도입되지 않음	8.8	6.1	8.2	5.7	8.1	6.1	0.6
11D5-3-CD828 Z	2219.2	67.6	10.2	7.7	7.1	6.4	68.4
FHVB74-CD82 8Z	2344.1	107.8	9.3	6.6	9.1	6.1	61.3
FHVB32-CD82 8Z	2261.6	113.8	9.9	7.0	9.5	6.8	55.7
FHVB33-CD82 8Z	2161.9	209.9	10.4	6.4	10.2	5.7	60.5
FHVB93-CD82 8Z	1868.2	200.9	10.0	7.1	8.4	6.2	52.2

[0138]

[0139] 표 2에 있어서, 배양된 T 세포를 지시된 CAR에 의해 형질도입시키고, 지시된 표적 세포(상부 가로열)와 함께 하룻밤 배양하였다. 하룻밤 항온처리한 후, 표준 ELISA 검정을 배양 상청액에서 수행하였다. BCMA-K562는 BCMA⁺이다. 다른 모든 표적은 BCMA-음성이다. 지시된 CAR을 발현하는 T 세포의 백분율을 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색시킨 후 유세포 분석함으로써 결정하였다. % CAR⁺은 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색된 각각의 CAR이 형질도입된 CD3⁺ 세포의 백분율에서 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색된 형질도입되지 않은 CD3⁺ 림프구의 백분율을 차감한 값과 동일하다. % CAR⁺ 세로열을 제외하고, 모든 숫자는 인터페론-감마의 pg/ml이다.

[0140] 표 1 및 2의 결과는 지시된 CAR이 BCMA⁺ 표적 세포를 특이적으로 인식함을 보여준다.

[0141] [표 3]

[0142] BCMA⁺ 표적 세포의 인식

	BCMA-K562	A549	TC71	MDA-231	COLO	HEPG2	293GP	T-세포 단독	%CAR+
형질도입되지 않음	115.1	116.7	65.1	118.8	32.7	46.9	79.0	91.2	0.073
FHVH74-CD8 28Z	42485.2	103.2	123.1	120.3	16.7	52.7	43.1	49.5	45.7
FHVH33-CD8 28Z	26994.1	223.2	181.2	407.6	45.2	109.2	81.8	94.4	32.2

[0143]

[0144] 표 3에 있어서, 배양된 T 세포를 지시된 CAR에 의해 형질도입시키고, 지시된 표적 세포(상부 가로열)와 함께 하룻밤 배양하였다. 하룻밤 항온처리한 후, 표준 ELISA 검정을 배양 상청액에서 수행하였다. BCMA-K562는 BCMA⁺이다. 다른 모든 표적은 BCMA-음성이다. 지시된 CAR을 발현하는 T 세포의 백분율을 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색시킨 후 유세포 분석함으로써 결정하였다. % CAR⁺은 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색된 각각의 CAR이 형질도입된 CD3⁺ 세포의 백분율에서 BCMA-Fc-PE 시약에 의해 염색된 형질도입되지 않은 CD3⁺ 림프구의 백분율을 차감한 값과 동일하다. % CAR⁺ 세포열을 제외하고, 모든 숫자는 인터페론-감마의 pg/ml이다.

[0145] 표 3의 결과는 FHVH-CD828Z 또는 FHVH-CD828Z를 발현하는 T 세포가 BCMA⁺ 표적 세포를 특이적으로 인식함을 보여준다.

[0146] 실시예 5

[0147] 본 실시예는 중쇄-단독 CAR을 발현하는 T 세포가 시험관내에서 BCMA-특이적 방식으로 증식하였음을 보여준다.

[0148] MM 환자로부터의 CFSE-표지화된 CAR-발현 1차 T 세포를 방사선 조사된 BCMA⁺ 또는 BCMA-음성 표적 세포와 함께 배양하였다. 도 4b 내지 4e에 제시된 모든 4가지 FHVH CAR은 도 4b 내지 4e에 제시된 바와 같이 BCMA-특이적 방식으로 증식하였다. 11D5-3-CD828Z CAR을 발현하는 T 세포는 또한 BCMA-특이적 방식으로 증식하였다(도 4a). CFSE의 회석에 의해 BCMA-특이적 증식을 기록한 것에 더하여, BCMA-특이적 증식을 또한 BCMA⁺ 표적 세포와 함께 배양된 CAR-발현 T 세포의 절대적 수의 증가에 의해 나타내었다. CAR⁺ T 세포의 절대적 수는, 도 4f에 제시된 바와 같이 T 세포가 BCMA⁺ 표적 세포와 함께 배양될 경우 증가하였다.

[0149] 실시예 6

[0150] 본 실시예는 중쇄-단독 CAR을 발현하는 T 세포가 BCMA⁺ 표적 세포를 살해함을 보여준다.

[0151] BCMA⁺ 표적 세포를 살해하는 FHVH CAR T 세포의 능력을 평가하였다. FHVH33-CD828Z 및 FHVH33-CD8BBZ는, 도 5a 및 5b에 제시된 바와 같이, UT 세포와 비교하여 BCMA⁺ RPMI226 세포를 살해하는 능력을 갖는 것으로 나타났다.

[0152] 실시예 7

[0153] 본 실시예는 4-1BB 공자극성 도메인을 갖는 중쇄-단독 CAR이 발현되고 작용성임을 보여준다.

[0154] 4-1BB 공자극성 도메인을 갖는, 도 6에 제시된 4가지의 전체-인간 중쇄-단독 CAR을 작성하고 평가하였다. 이들 4가지 모든 CAR은 1차 인간 T 세포의 표면 상에서 발현되었지만, FHVH33-CD8BBZ는 지속적으로 가장 높은 발현을 나타내었고(도 6), 따라서 추가의 연구를 위해 선택되었다. FHVH33-CD8BBZ의 작용성 평가로부터의 결과는 도 7a 내지 7f에 제시된다. 이들 CAR-발현 T 세포는 IFN γ 를 생산하였고, BCMA-특이적 방식으로 탈과립화되었다.

[0155] 실시예 8

[0156] 본 실시예는 항-BCMA CAR-형질도입된 T 세포가 1차 다발성 골수종 세포를 인식함을 보여준다.

[0157] 형질도입되지 않은 T 세포, 또는 FHVH33-CD828Z 또는 FHVH33-CD8BBZ CAR을 발현하는 T 세포를 자가유래 골수종 세포(90% 순도)와 함께 4 시간 동안 항온처리하였다. CD107a의 상향 조절을 T 세포 탈과립화의 표지로서 측정하였고, CD8 또는 CD4의 공-발현을 또한 측정하였다. 지시된 표현형을 갖는 세포의 백분율은 표 4에 제

시된다. 표 4에 제시된 바와 같이, FHVH33-CD828Z 또는 FHVH33-CD8BBZ CAR이 형질도입된 T 세포는 표적 골수 골수종 세포와 함께 공-배양된 후 CD107a 발현을 상향조절하였다.

[표 4]

	형질도입되지 않음	FHVH33-CD828Z	FHVH33-CD8BBZ
CD107a+/CD4+	2.3	13.0	50.7
CD107a-/CD4-	0.0	0.0	0.0
CD107a+/CD4-	0.0	0.0	0.0
CD107a-/CD4+	97.7	87.0	49.3
CD107a+/CD8+	4.8	27.6	40.0
CD107a-/CD8-	0.0	0.0	0.0
CD107a+/CD8-	0.0	0.0	0.0
CD107a-/CD8+	95.2	72.4	60.0

형질도입되지 않은 T 세포(UT), 또는 FHVH33-CD828Z 또는 FHVH33-CD8BBZ CAR을 발현하는 T 세포를 자가유래 골수 골수종 세포(90% 순도) 또는 대조군 PBMC와 함께 하룻밤 항온처리하였다. 인터페론-감마 방출을 표준 ELISA 검정에 의해 측정하였다. 결과는 도 8에 제시된다. 도 8에 제시된 바와 같이, FHVH33-CD828Z 또는 FHVH33-CD8BBZ CAR이 형질도입된 세포는 표적 골수 골수종 세포와 함께 공-배양된 이후 IFN- γ 를 분비하였다.

실시예 9

본 실시예는 마우스에서 FHVH33-CD8BBZ-발현 T 세포의 용량 적정을 보여준다.

도 9a에 제시된 바와 같이, NSG 마우스에게 RPMI8226 세포를 피내로 주사하였다. 종양을 10일 동안 성장시켰다. 0일째, 마우스에게 지시된 수의 FHVH33-CD8BBZ-발현 T 세포를 정맥내 주입하였다. FHVH33-CD8BBZ CAR T 세포의 3가지 상이한 용량중 하나를 마우스에게 제공하고, 마우스의 또 다른 군을 치료하지 않고 남겨두었다. 모든 마우스는 T 세포 주입시 종양을 확립하였다.

도 9b에 제시된 바와 같이, 2.2×10^6 개의 FHVH33-CD8BBZ T 세포는 모든 마우스로부터의 종양을 근절시킬 수 있었고, FHVH33-CD8BBZ CAR T 세포의 효능은 용량-의존적 방식으로 감소하였다. 치료되지 않은 채로 남은 모든 마우스에서 이들의 종양은 점진적으로 확대되었다(그룹당 n = 5마리의 마우스).

마우스의 생존은 도 9c에 제시된다. 2.2×10^6 개의 FHVH33-CD8BBZ-발현 T 세포가 제공된 모든 마우스는 생존하였고, 실험 동안에 건강하였다.

실시예 10

본 실시예는 NSG 마우스에서의 BCMA⁺ 종양의 근절을 보여준다.

마우스에게 RPMI8226 세포를 피내로 주사하였다. 종양을 10일 동안 성장시켰다. 0일째, SP6-CD828Z, 11D5-3-CD8BBZ, FHVH33-CD8BBZ, 또는 FHVH33-CD828Z CAR을 발현하는 1×10^6 개의 T 세포를 마우스에게 정맥내 주입하거나, 마우스를 치료하지 않은 채로 두었다.

도 10a에 제시된 바와 같이, 음성-대조군 SP6-CD828Z CAR을 발현하는 T 세포를 마우스에게 주입하였고, 치료되지 않은 마우스는 점진적인 종양 성장을 나타내었다. 11D5-3-CD8BBZ, FHVH33-CD8BBZ, 또는 FHVH33-CD828Z CAR을 발현하는 T 세포를 공급받은 마우스는 종양의 근절을 나타내었다.

마우스의 생존은 도 10b에 제시된다. 11D5-3-CD8BBZ, FHVH33-CD8BBZ, 또는 FHVH33-CD828Z CAR을 발현하는 T 세포를 공급받은 마우스는 생존하였다.

실시예 11

본 실시예는 중쇄-단독 CAR을 발현하는 T 세포가 BCMA-특이적 방식으로 IFN-감마를 방출함을 보여준다.

효과기 T 세포를 표 5에 지시된 표적 세포와 함께 하룻밤 배양하였다. 효과기 T 세포는 형질도입되지 않은 T 세포, FHVH33-CD828Z를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 형질도입된 T 세포, 또는 FHVH33-CD8BBZ를 인코딩하는

뉴클레오티드 서열이 형질도입된 T 세포였다. T 세포는 모두 동일한 인간 공여자로부터 유래되었다. FHVH33-CD828Z-형질도입된 T 세포는 71%의 CAR 발현을 제공하였다. FHVH33-CD8BBZ-형질도입된 T 세포는 80%의 CAR 발현을 제공하였다.

[0174] BCMA⁺ 표적 세포는 BCMA-K562 및 RPMI8226이었다. BCMA-음성 표적 세포는 Panc10.05, U251, 293GP, 1차 정상 인간 기관지 상피 세포(NHBE), 1차 인간 미소혈관 내피 세포(HMVEC), 1차 인간 장 상피 세포(InEpC)였다.

[0175] 인터페론(IFN)-감마 ELISA를 수행하였다. 결과는 표 5에 제시된다. 효과기 T 세포 단독에 의한 인터페론 감마 생산은 또한 표 5에 제시된다. 표 5에서 모든 값은 IFN-감마의 pg/ml이다.

[0176] [표 5]

		효과기 T 세포		
		형질도입되지 않음	FHVH33-828Z	FHVH33-8BBZ
BCMA ⁺	BCMA-K562	179	38548	70216
	RPMI-8226	406	13855	33465
BCMA-음성	Panc10.05	76	37	306
	U251	41	24	360
	293GP	92	40	238
	NHBE	54	43	423
	HMVEC	54	25	610
	InEpC	33	18	500
대조군	T-세포 단독	25	14	367

[0177]

[0178] 표 5에 제시된 바와 같이, CAR T 세포는 BCMA⁺ 표적의 존재하에 훨씬 더 많은 인터페론 감마를 생산하였다.

[0179] 본원에 혼입된 출판물, 특허 출원, 및 특허를 비롯한 모든 참고문헌은, 각각의 참고문헌이 참조로 혼입되도록 개별적으로 및 구체적으로 지시되고 그의 전체가 본원에 제시되는 것과 동일한 정도로, 본원에 참조로 혼입되어 있다.

[0180] 본 발명을 기재함에 있어서(특히 하기 청구범위와 관련하여) "하나의", "그" 및 "적어도 하나의"라는 용어의 사용 및 유사한 언급은, 달리 본원에 지시되거나 문맥상 명확히 모순되지 않는 한, 단수형 및 복수형 둘 다를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 하나 이상의 항목에 대한 열거가 수반되는 "적어도 하나의"라는 용어(예를 들어, "A 및 B중 적어도 하나")의 사용은, 달리 본원에 지시되거나 문맥상 명확히 모순되지 않는 한, 열거된 항목으로부터 선택된 하나의 항목(A 또는 B) 또는 열거된 항목 중 둘 이상의 임의의 조합(A 및 B)을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "포함하는", "갖는", "포함되는" 및 "함유하는"이라는 용어는, 달리 주지되지 않는 한, 확장가능한 용어(즉, "제한되지 않고 포함함"을 의미함)인 것으로 이해되어야 한다. 본원에서 값들의 범위에 대한 언급은, 달리 본원에 지시되지 않는 한, 단지 그 범위내에 속하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 지칭하는 속기 방법으로서 작용하고자 할 뿐이고, 각각의 별도의 값은 이것이 개별적으로 본원에 언급되는 것과 마찬가지로 본 명세서에 혼입된다. 본원에 기재된 모든 방법은, 달리 본원에 지시되거나 문맥상 명확히 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 및 모든 예, 또는 예시적인 표현(예를 들어, "예컨대")의 사용은, 단지 본 발명을 좀 더 잘 설명하려는 것이고, 달리 청구되지 않는 한, 본 발명의 범주에 제한을 두는 것이 아니다. 본 명세서에서 어떠한 표현도 임의의 청구되지 않은 요소가 본 발명의 실행에 필수적임을 지시하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[0181] 본 발명의 바람직한 실시태양, 예컨대 본 발명을 실행하기 위해 발명자들에게 공지된 최적의 방식이 본원에 기재되어 있다. 이들 바람직한 실시태양의 변경은 상기 기재내용을 살펴볼 경우 당분야의 숙련가에게 분명할 것이다. 본 발명자들은 숙련가라면 적절한 경우 이러한 변경을 이용할 것으로 기대하고, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 구체적으로 기재된 것과 다르게 실행될 수 있을 것으로 생각한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법률에 의해 허용될 경우 본원에 첨부된 청구범위에서 인용된 대상의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 게다가, 이의 모든 가능한 변경에서 상기 기재된 요소의 임의의 조합은, 달리 본원에 지시되거나 문맥상 명확히 모순되지 않는 한, 본 발명에 의해 포괄된다.

도면

도면1a



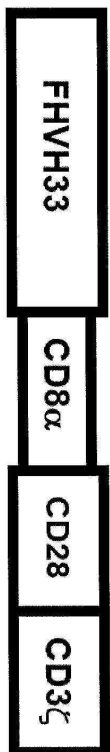
도면1b

FHVH32-CD828Z

FHVH32	CD8 α	CD28	CD3 ζ
--------	--------------	------	-------------

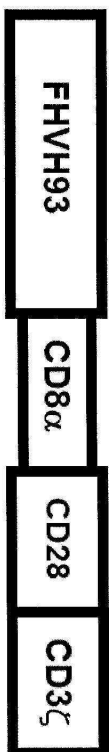
도면1c

FHVH33-CD828Z



도면1d

FHVH93-CD828Z



도면1e

FHVH74-CD8BBZ



도면1f

FHVH32-CD8BBZ

FHVH32	CD8 α	4-1BB	CD3 ζ
--------	--------------	-------	-------------

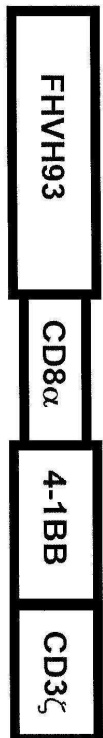
도면1g

FHVH33-CD8BBZ

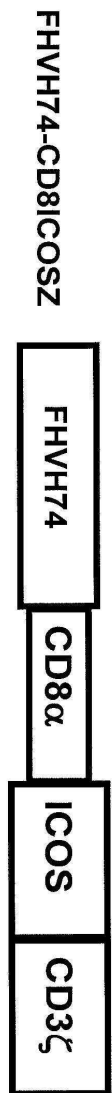


도면 1h

FHVH93-CD8BBZ

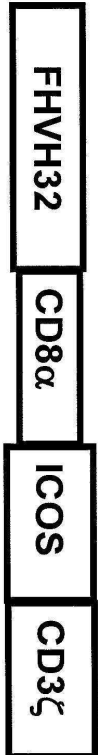


도면1i



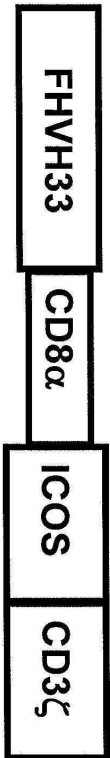
도면1j

FHVH32-CD8ICOSZ

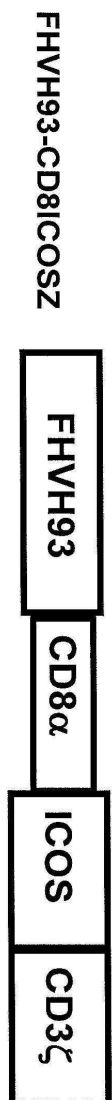


도면1k

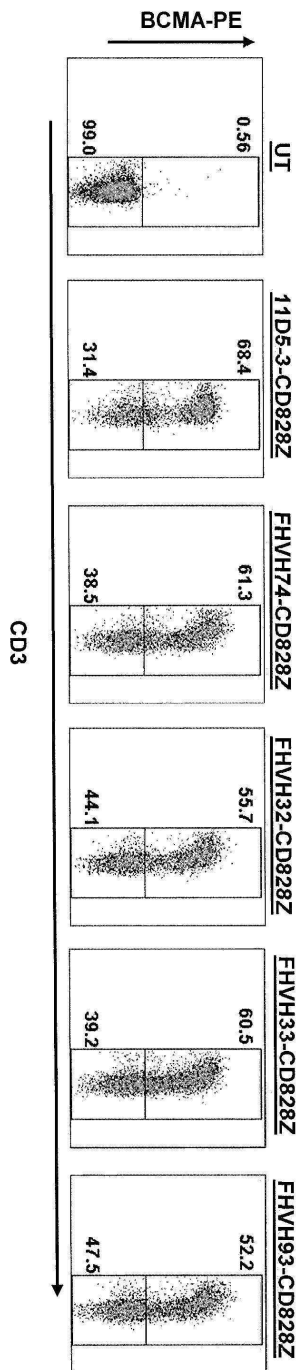
FHVVH33-CD8ICOSZ



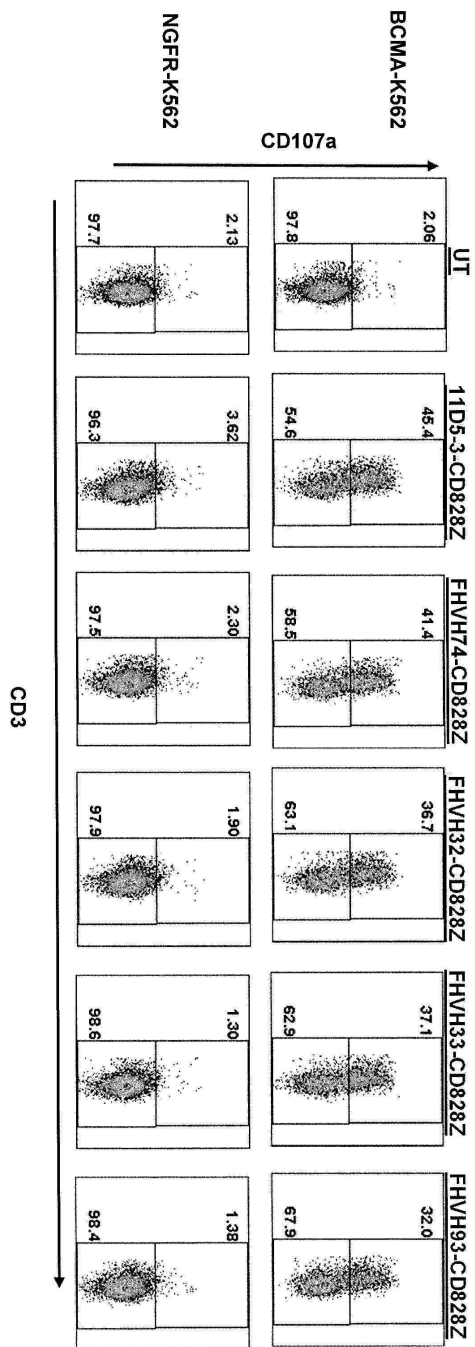
도면11



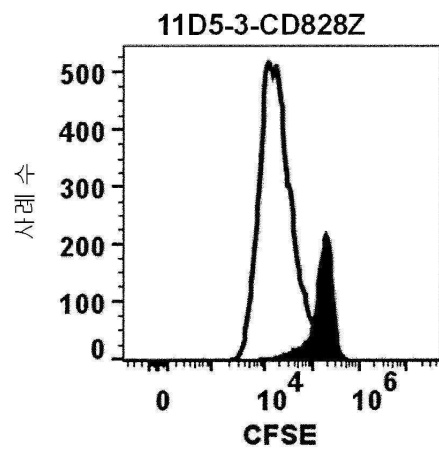
도면2



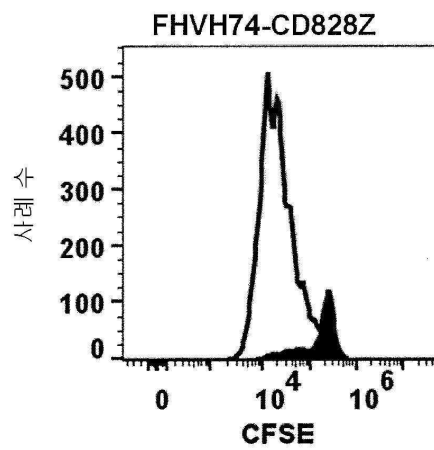
도면3



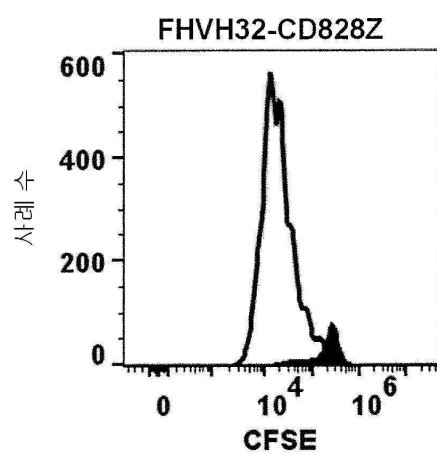
도면4a



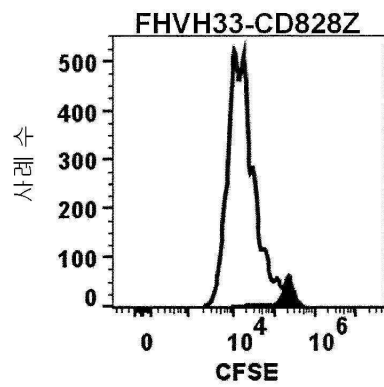
도면4b



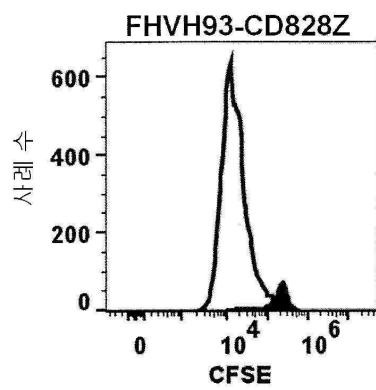
도면4c



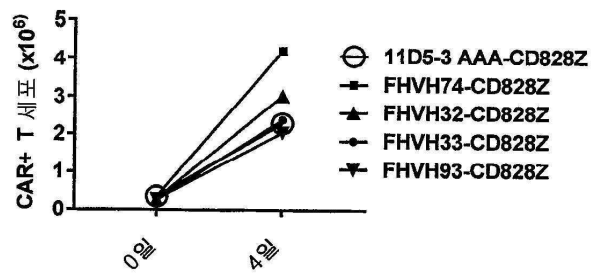
도면4d



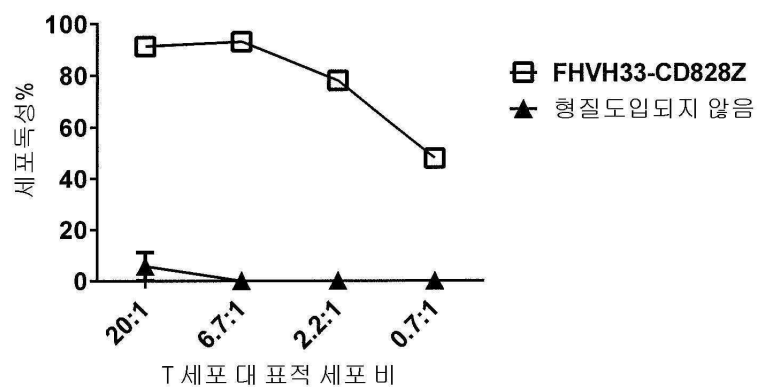
도면4e



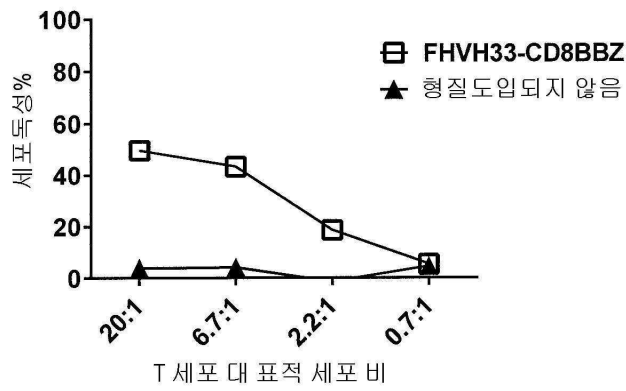
도면4f



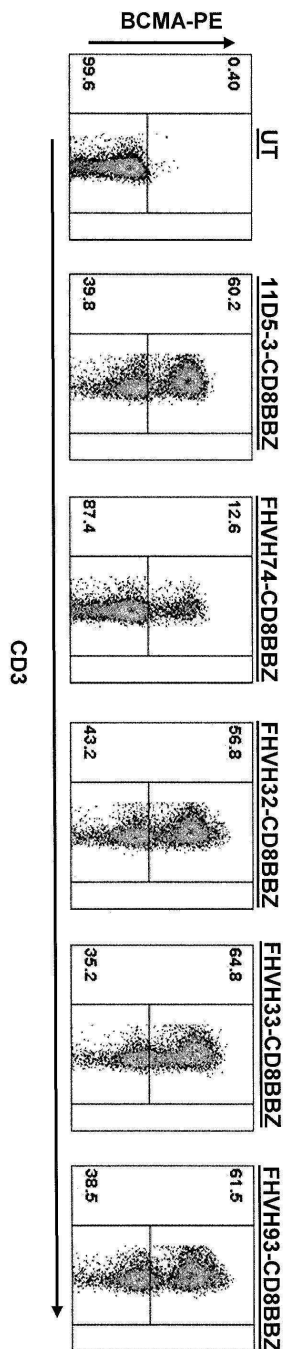
도면5a



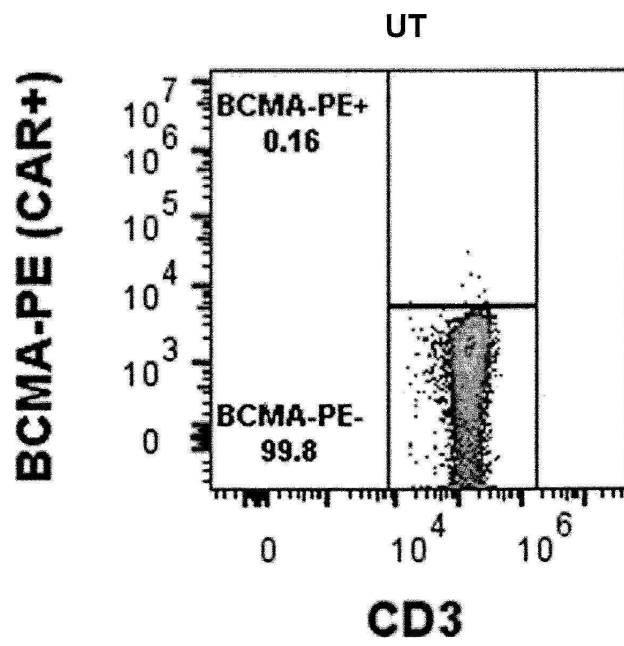
도면5b



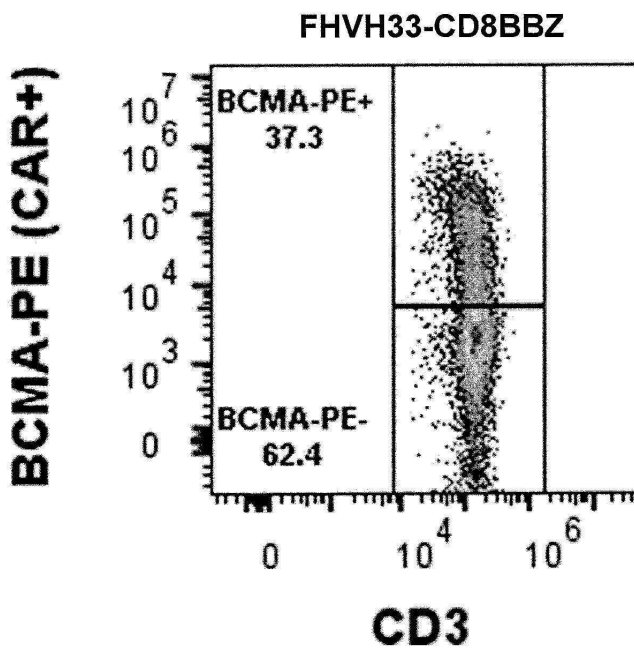
도면6



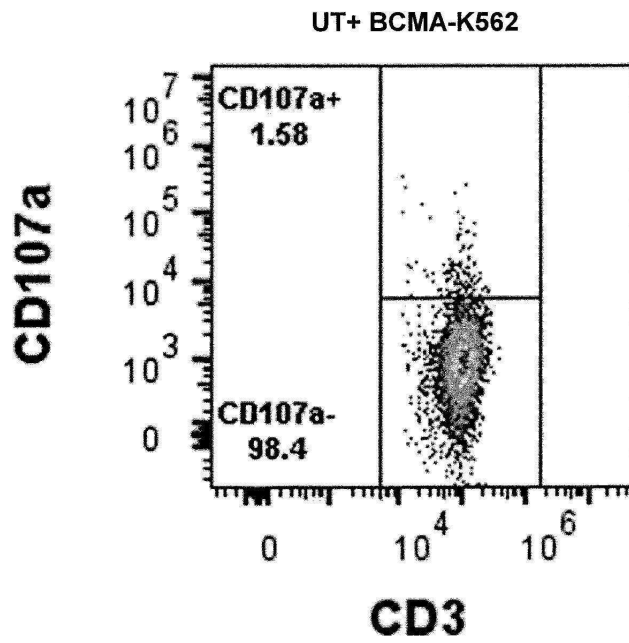
도면7a



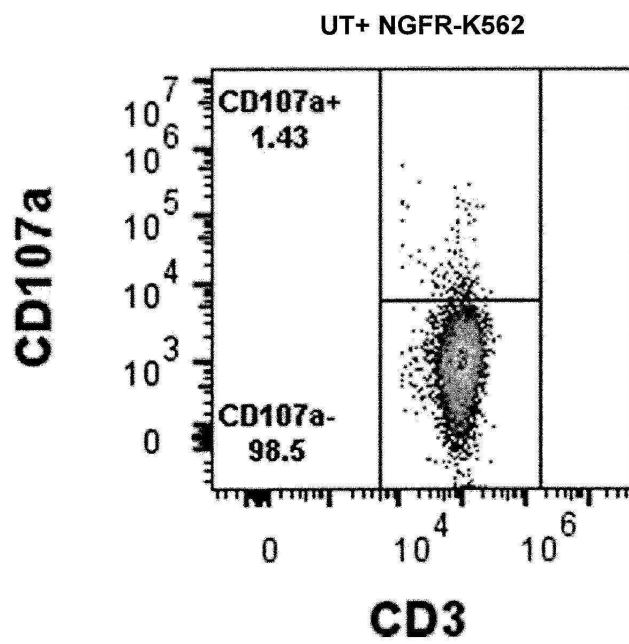
도면7b



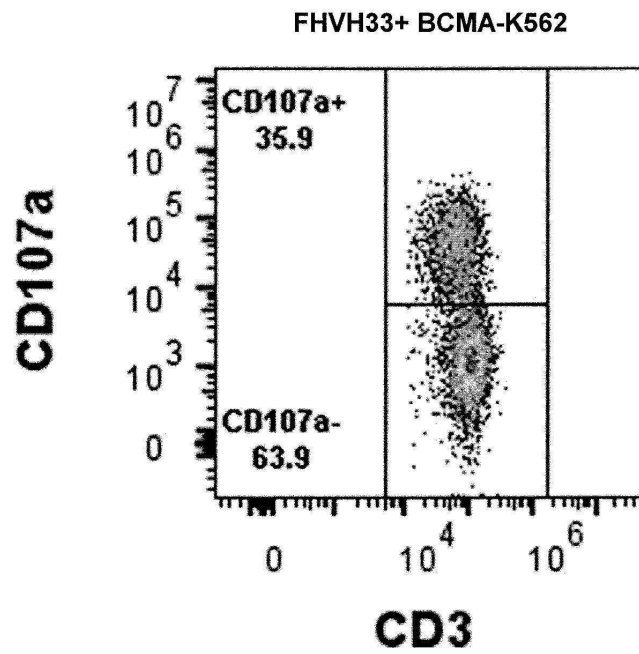
도면7c



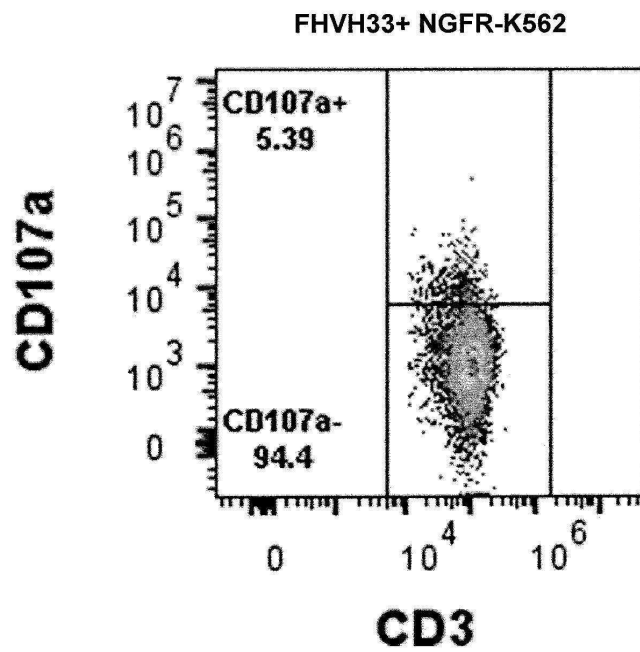
도면7d



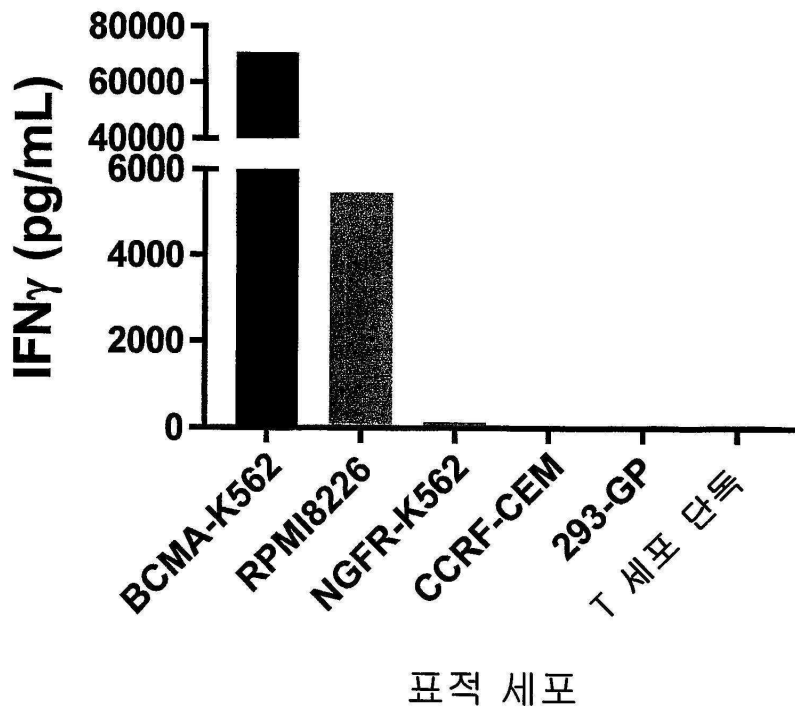
도면7e



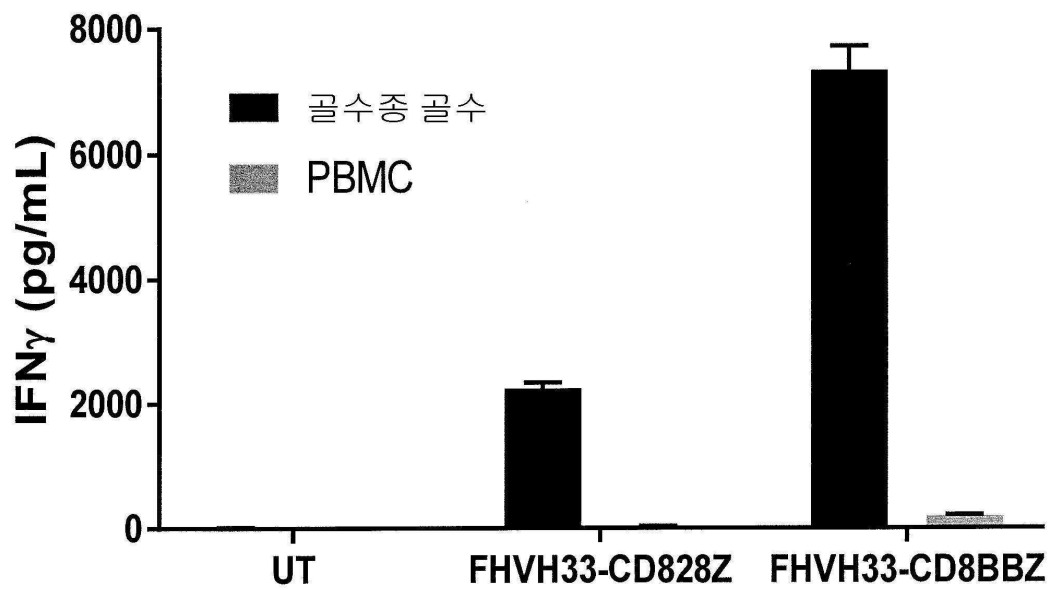
도면7f



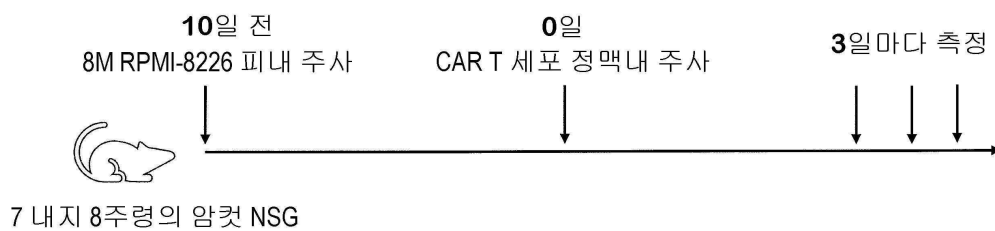
도면7g



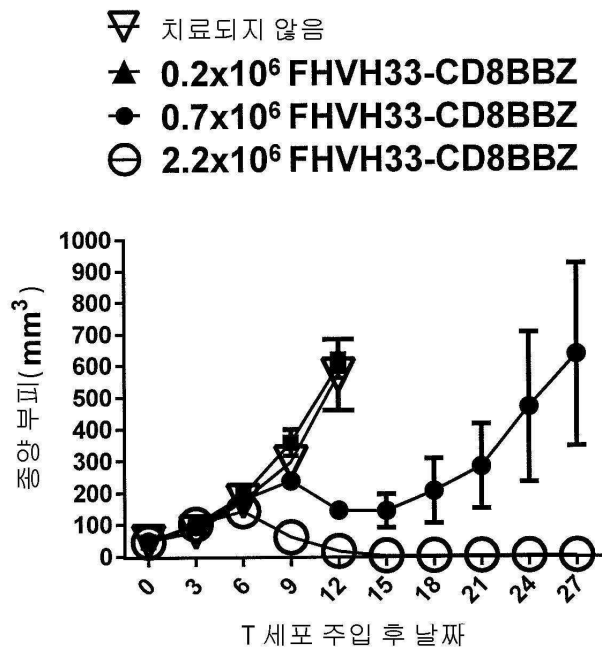
도면8



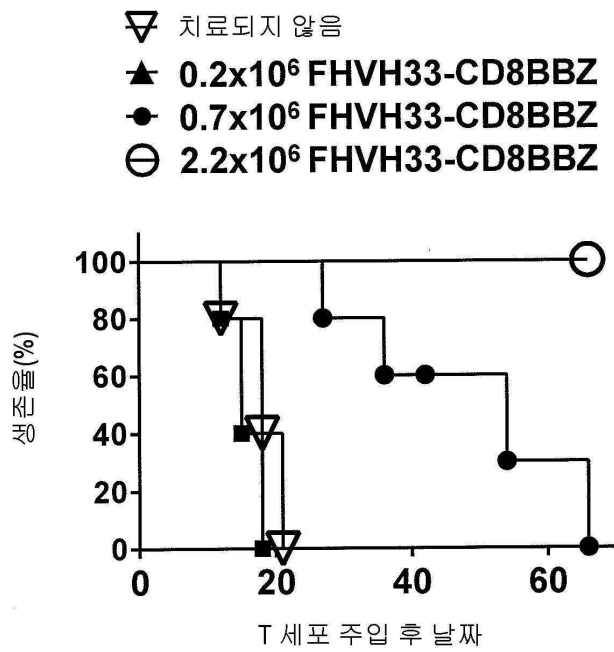
도면9a



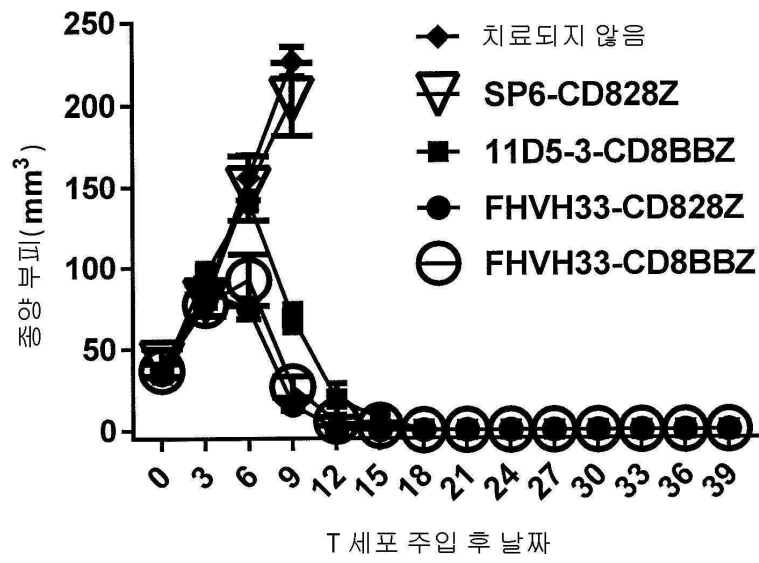
도면9b



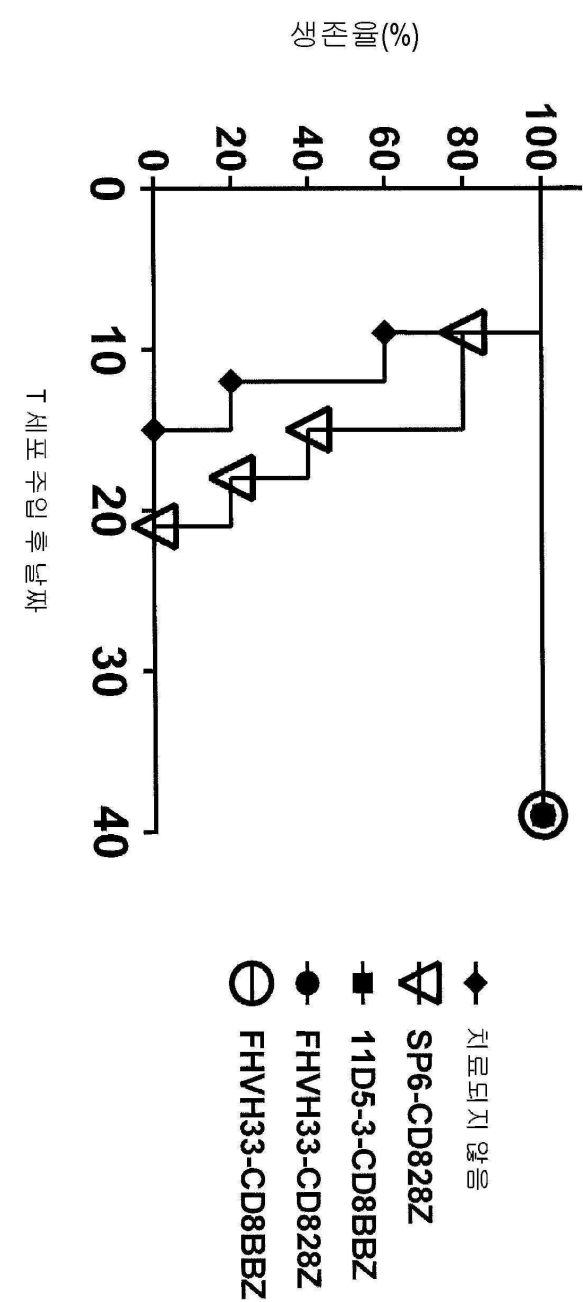
도면9c



도면10a



도면10b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
TENEOBIO, INC.
- <120> ANTI-B-CELL MATURATION ANTIGEN CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS WITH
HUMAN DOMAINS
- <130> 739534

<140> PCT/US2018/039917

<141> 2018-06-28

<150> US 62/527,556

<151> 2017-06-30

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Thr Asn His Ala

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Ser Gly Asn Gly Arg Thr Thr

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Lys Asp Gly Gly Glu Thr Leu Val Asp Ser

1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Ala

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Phe Thr

1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Ile

1 5

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Ala

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr

1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Lys Asp Glu Asp Gly Gly Ser Leu Leu Gly His

1 5 10

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn His

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Gly Asn Gly Arg Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Gly Gly Glu Thr Leu Val Asp Ser Arg Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Phe Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Glu Asp Gly Gly Ser Leu Leu Gly Tyr Arg Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His

20 25 30

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Glu Asp Gly Gly Ser Leu Leu Gly His Arg Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 375

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

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

35 40 45
 Thr Phe Thr Asn His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

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

100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Gly Gly Glu Thr Leu Val Asp Ser
 115 120 125
 Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe

130 135 140
 Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys

 165 170 175
 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 180 185 190
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 195 200 205
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser
 210 215 220
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg

 225 230 235 240
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 245 250 255
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 260 265 270
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 275 280 285
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg

 290 295 300
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 305 310 315 320
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 325 330 335
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 340 345 350
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His

 355 360 365
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 370 375

<210> 18

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Ser His Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Phe Thr His

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asn Thr Val Ser Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Glu Asp Gly Gly Ser Leu Leu Gly

115 120 125

Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val

130 135 140

Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val

195 200 205

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg
 210 215 220
 Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro

 225 230 235 240
 Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 245 250 255
 Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 260 265 270
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 275 280 285
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly

 290 295 300
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 305 310 315 320
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 325 330 335
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 340 345 350
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu

 355 360 365
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 370 375
 <210> 19
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 19
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

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

115 120 125

Ala Asp Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val

130 135 140

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg

290 295 300
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
305 310 315 320
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
325 330 335
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
340 345 350
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp

355 360 365
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

370 375
<210> 20
<211> 376
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 20

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

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

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

 Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
 165 170 175
 Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
 180 185 190
 Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 195 200 205
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg
 210 215 220

 Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
 225 230 235 240
 Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 245 250 255
 Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 260 265 270
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 275 280 285

 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 290 295 300
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 305 310 315 320
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 325 330 335
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly

				340						345					350				
Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu				
		355					360					365							
His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg												
	370					375													
<210>	21																		
<211>	376																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	Synthetic																		
<400>	21																		
Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu				
1			5					10					15						
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu				
			20					25					30						
Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe				
		35					40					45							
Thr	Phe	Thr	Asn	His	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys				
	50					55						60							
Gly	Leu	Glu	Leu	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Asn	Gly	Arg	Thr	Thr	Tyr				
65				70						75					80				
Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser				
			85						90					95					
Lys	Asn	Thr	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr				
		100						105					110						
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp	Gly	Gly	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ser				
		115						120					125						
Arg	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe				
	130						135					140							
Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro				
145				150						155					160				

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
165 170 175
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
180 185 190
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
195 200 205
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Lys Arg
210 215 220

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
225 230 235 240
Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
245 250 255
Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
260 265 270
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
275 280 285

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
290 295 300
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
305 310 315 320
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
325 330 335
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
340 345 350

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
355 360 365
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
370 375

<210> 22

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Ser His Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Phe Thr His

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asn Thr Val Ser Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Glu Asp Gly Gly Ser Leu Leu Gly

115 120 125

Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val

130 135 140

Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val

195 200 205

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Lys

210 215 220

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

225 230 235 240
 Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
 245 250 255
 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 260 265 270
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 275 280 285

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 290 295 300
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 305 310 315 320
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 340 345 350

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 355 360 365
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 370 375

<210> 23

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

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

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

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

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 305 310 315 320
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 325 330 335
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 340 345 350

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 355 360 365
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 370 375

<210> 24

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu

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

85 90 95
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Glu Asp Gly Gly Ser Leu Leu Gly
 115 120 125

His Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val
 130 135 140
 Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

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

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

 275 280 285
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 290 295 300
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 305 310 315 320
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp

 340 345 350
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 355 360 365
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

370 375

<210> 25

<211> 372

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Thr Asn His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Leu Val Ser Ser Ile Ser Gly Asn Gly Arg Thr Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asn Thr Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu

195 200 205
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Cys Trp
 210 215 220
 Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu
 225 230 235 240
 Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr
 245 250 255
 Asp Val Thr Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 260 265 270

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

 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 340 345 350
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 355 360 365
 Leu Pro Pro Arg
 370
 <210> 26
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 26
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Ser His Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Phe Thr His
65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Asn Thr Val Ser Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Glu Asp Gly Gly Ser Leu Leu Gly
115 120 125

Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val
130 135 140

Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
180 185 190

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
195 200 205

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Cys
210 215 220

Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly
225 230 235 240

Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu
245 250 255

Thr Asp Val Thr Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro

260 265 270

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
275 280 285

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
290 295 300

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
305 310 315 320

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
325 330 335

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
340 345 350

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
355 360 365

Ala Leu Pro Pro Arg
370

<210> 27

<211> 375

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr
65 70 75 80

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

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

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

 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 275 280 285
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 290 295 300
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 305 310 315 320
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu

					325											330														335
Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu															
			340						345						350															
Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His															
		355						360						365																
Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg																								
	370					375																								
<210>	28																													
<211>	373																													
<212>	PRT																													
<213>	Artificial Sequence																													
<220><223>	Synthetic																													
<400>	28																													
Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu															
1			5					10							15															
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu															
			20					25						30																
Ile	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe															
		35						40					45																	
Thr	Phe	Ser	Ser	His	Ala	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys															
	50					55							60																	
Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Tyr	Thr	His															
65					70					75				80																
Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser															
			85						90					95																
Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Ser															
			100						105					110																
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Le																	

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

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

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

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 340 345 350
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 355 360 365

Ala Leu Pro Pro Arg
 370

<210> 29

<211> 1128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

atggccctgc ctgttacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga	60
cctcaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccttgaga	120
ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt accaaccatg ccatgagttg ggtccgccag	180
gctccaggga aggggctgga gttggtctca agtattagt gtaatggtcg taccacatac	240
tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acatttccaa gaacacgctg	300
gatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagat	360
gggggcgaaa ctctagttag ctccagaggc cagggcaccc tgggtcacctg ctctcattc	420
gtgccctgtg tcttgcctgc caagcctaca acaaccctg ctcttagacc tcctacacca	480
gtcctacaa tgcagcca gcctctgtct ctgaggcctg aagctttag acctgtgtgt	540
ggcggagccg tgcataccag aggactggat ttgcctgcg acatctacat ctgggccct	600
ctggctggaa catgtggcgt tttgtctgtg agcctctgta tcacctgta ctgcaaccac	660
cggacagaa gcaagcggag ccggtctgtg cacagcgact acatgaacat gacccccaga	720
cggcctggcc ccaccagaaa gcactaccag cttacgccc ctccagaga ctctgcgcc	780
taccggtcca gagtgaagtt cagcagaagc gccgacgccc ctgcctatca gcagggccag	840
aaccagctgt acaacgagct gaacctgggc agacgggaag agtacgatgt gctggacaaa	900
agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc	960
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa	1020
ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc aggttctcag tacagccacc	1080
aaggacacct acgacgcct tcacatgcag gcctgcccc ctcgctaa	1128

<210> 30

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

atggccctgc ctgttacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga	60
cctcaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccttgaga	120

ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagccatg ccatgacctg ggtccgccag 180

gctccgggga aggggctgga gtgggtcgca gctattagtg gcagtgggtga tttcacacac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacggtg 300

tctctgcaaa tgaacaacct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagat 360

gaggatgggt ggagcttgct tggctacaga ggccagggca ccctgggtcac cgtctcctca 420

ttcgtgcccc tgttctctgc tgccaagcct acaacaaccc ctgctcctag acctcctaca 480

ccagctccta caatcgccag ccagcctctg tctctgaggg ctgaagcttg tagacctgct 540

gctggcggag ccgtgcatac cagaggactg gatttcgcct gcgacatcta catctggggc 600

cctctggctg gaacatgtgg cgttttgctg ctgagcctcg tgatcacctt gtactgcaac 660

caccggaaca gaagcaagcg gagccggctg ctgcacagcg actacatgaa catgaccccc 720

agacggcctg gccccaccag aaagcactac cagccttacg cccctcccag agacttcgcc 780

gcctaccggt ccagagtga gttcagcaga agcgccgacg cccctgccta tcagcagggc 840

cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg ggccagacggg aagagtacga tgtgctggac 900

aaaagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 960

ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg 1020

aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc 1080

accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta a 1131

<210> 31

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

atggccctgc ctgttacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga 60

cctgagggtg agctgttga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga 120

ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagctatg ccatgagctg ggtccgccag 180

gctccaggga aggggctgga gtgggtctca tctattagtg gtagtgggtga ttacatatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acatatccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagaa 360

ggtacgggtg ccaacagcag ctgggcagac tacagaggcc agggcaccct ggtcaccgtc 420

tcctcattcg tgcccgtgtt cctgcctgcc aagcctacaa caaccctgc tcctagacct 480

cctacaccag ctctacaat cgccagccag cctctgtctc tgaggcctga agctttaga 540
cctgtctgtg gcggagccgt gcataccaga ggactggatt tcgctgcga catctacatc 600
tgggccccctc tggttggaac atgtggcggtt ttgtctgtga gcctcgtgat caccctgtac 660

tgcaaccacc ggaacagaag caagcggagc cggctgtctg acagcgacta catgaacatg 720
acccccagac ggcctggccc caccagaaag cactaccagc cttacgcccc tcccagagac 780
ttcgccgcct accggtccag agtgaagttc agcagaagcg ccgacgcccc tgcctatcag 840
cagggccaga accagctgta caacgagctg aacctgggca gacgggaaga gtacgatgtg 900
ctggacaaaa gacgtggccg ggacctgag atggggggaa agccgagaag gaagaacctt 960
caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagttagatt 1020
gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggcttcagt 1080

acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg cctgcccc tcgctaa 1137

<210> 32
<211> 1131
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 32

atggccctgc ctgttacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga 60
cctgaggtgc agctgttga gtctgggggg ggtttgatac agcctggggg gtccctgaga 120
ctctctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagccatg ccatgacctg ggtccgccag 180
gctccgggga aggggttga gtgggtctca gctattagtg gtagtggtga ttacacacac 240
tacgcagact ccgtgaaggg tcggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacggtg 300

tatctccaaa tgaacagtct gagagccgag gactcggccg tatattactg tgcgaaagat 360
gaggatggtg ggagcctcct ggggcacaga ggccagggca ccttggtcac cgtctcctca 420
ttcgtgcccc tgttcttccc tgccaagcct acaacaacce ctgctcctag acctctaca 480
ccagctccta caatgccag ccagcctctg tctctgaggc ctgaagcttg tagacctgct 540
gctggcgag ccgtgcatac cagaggactg gatttcgctt gcgacatcta catctgggcc 600
cctctggctg gaacatgtgg cgttttgtct ctgagcctcg tgatcacctt gtactgcaac 660
caccggaaca gaagcaagcg gagccggctg ctgcacagcg actacatgaa catgaccccc 720

agacggcctg gccccaccag aaagcactac cagccttacg cccctcccag agacttcgcc 780
gcctaccggt ccagagtga gttcagcaga agcgccgacg cccctgccta tcagcagggc 840

cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg ggacagcggg aagagtacga tgtgctggac 900
 aaaagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 960
 ggctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcgaggg cctacagtga gattgggatg 1020
 aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accaggtct cagtacagcc 1080
 accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc cccctcgcta a 1131

<210> 33

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

atggccctgc ctgttacgc tctgctgctg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga 60
 cctcaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga 120
 ctctctgtg cagcctctgg attcaccttt accaaccatg ccatgagttg ggtccgccag 180
 gctccaggga aggggctgga gttggtctca agtattagt gtaatggtcg taccacatac 240
 tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acatttcaa gaacacgctg 300
 gatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagat 360

gggggcgaaa ctctagtga ctccagaggc cagggcaccc tggtcaccgt ctctcattc 420
 gtgccctgt tctgctgc caagcctaca acaaccctg ctctagacc tctacacca 480
 gctctacaa tcgccagcca gcctctgtct ctgaggcctg aagctttag acctgtgct 540
 ggcgagccg tgcataccag aggactggat ttgcctgcg acatctacat ctgggccct 600
 ctggctggaa catgtggcgt tttgtgctg agcctcgtga tcacctgta ctgcaaccac 660
 cggaacaagc ggggcagaaa gaagctgctg tacatcttca agcagccctt catgcggccc 720
 gtgcagacca cccaggaaga ggacggctgc tctgcagat tccccgagga agaagaaggc 780

ggctgcgagc tgagagtga gttcagcaga agcgccgacg ccctgccta tcagcagggc 840
 cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg ggacagcggg aagagtacga tgtgctggac 900
 aaaagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 960
 ggctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcgaggg cctacagtga gattgggatg 1020
 aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accaggtct cagtacagcc 1080
 accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc cccctcgcta a 1131

<210> 34

<211> 1134

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

```
atggccctgc ctgttacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga      60
cctcagggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga      120
ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagccatg ccatgacctg ggtccgccag      180
gctccgggga aggggctgga gtgggtcgca gctattagtg gcagtgggtga tttcacacac      240
tacgcagact cctgaaggg cgggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacggtg      300
tctctgcaaa tgaacaacct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagat      360
gaggatggtg ggagcttgct tggctacaga ggccagggca ccttggtcac cgtctcctca      420
```

```
ttcgtgcccc tgttcctgcc tgccaagcct acaacaaccc ctgctcctag acctcctaca      480
ccagctccta caatgccag ccagcctctg tctctgaggc ctgaagcttg tagacctgct      540
gctggcgagg cctgcatatc cagaggactg gatttcgcct gcgacatcta catctgggcc      600
cctctggctg gaacatgtgg cgttttgcct ctgagcctcg tgatcacctt gtactgcaac      660
caccggaaca agcggggcag aaagaagctg ctgtacatct tcaagcagcc cttcatgcgg      720
cccgtgcaga ccaccagga agaggacggc tgctcctgca gattccccga ggaagaagaa      780
ggcggctgcg agctgagagt gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctatcagcag      840
```

```
ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagac gggaagagta cgatgtgctg      900
gacaaaagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag      960
gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg      1020
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cagcatggcc tttaccaggg tctcagtaca      1080
gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaa          1134
```

<210> 35

<211> 1140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

```
atggccctgc ctgttacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga      60
cctgagggtgc agctgttgga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga      120
```

ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagctatg ccatgagctg ggtccgccag 180
gctccaggga aggggctgga gtgggtctca tctattagtg gtagtggtga ttacatatac 240
tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acatatccaa gaacacgctg 300
tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagaa 360
ggtacgggtg ccaacagcag cttggcagac tacagaggcc agggcacctt ggtcacctgc 420
tcctcattcg tgcccgtgtt cctgcctgcc aagcctacaa caaccctgc tcctagacct 480

cctacaccag ctctacaat cgccagccag cctctgtctc tgaggcctga agctttaga 540
cctgtgctgt ggggagccgt gcataccaga ggactggatt tcgcctgcga catctacatc 600
tgggccctc tggttggaac atgtggcgtt ttgctgctga gcctcgtgat caccctgtac 660
tgcaaccacc ggaacaagcg gggcagaaag aagctgctgt acatcttcaa gcagcccttc 720
atgcggcccc tgcagaccac ccaggaagag gacggctgct cctgcagatt ccccgaggaa 780
gaagaaggcg gctgcgagct gagagtgaag ttcagcagaa gcgccgacgc ccctgcctat 840
cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gcagacggga agagtacgat 900

gtgctggaca aaagacgtgg ccgggacctt gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 960
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag 1020
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1080
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgctaa 1140

<210> 36

<211> 1134

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

atggccctgc ctgttacagc tctgtgctg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga 60
cctgaggtgc agctgttgga gtctgggggg ggcttgatac agcctggggg gtcctgaga 120

ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagccatg ccatgacctg ggtccgccag 180
gctccgggga aggggctgga gtgggtctca gctattagtg gtagtggtga ttacacacac 240
tacgcagact ccgtgaaggg tcggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacggtg 300
tatctccaaa tgaacagtct gagagccgag gactcggccg tatattactg tgcgaaagat 360
gaggatgggt ggagcctcct ggggcacaga ggccagggca ccctgggtcac cgtctcctca 420
ttcgtgcccc tgttcctgcc tgccaagcct acaacaaccc ctgctcctag acctcctaca 480

ccagctccta caatgccag ccagcctctg tctctgaggc ctgaagcttg tagacctgct 540

gctggcggag ccgtgcatac cagaggactg gatttcgcct gcgacatcta catctgggcc 600

cctctggctg gaacatgtgg cgttttgctg ctgagcctcg tgatcaccct gtactgcaac 660

caccggaaca agcggggcag aaagaagctg ctgtacatct tcaagcagcc cttcatgcgg 720

cccgtgcaga ccacccagga agaggacggc tgctcctgca gattccccga ggaagaagaa 780

ggcggctgcg agctgagagt gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctatcagcag 840

ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagac gggaagagta cgatgtgctg 900

gacaaaagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 960

gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 1020

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 1080

gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaa 1134

<210> 37

<211> 1119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

atggccctgc ctgttacgc tctgtgctg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga 60

cctcaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga 120

ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt accaaccatg ccatgagttg ggtccgccag 180

gctccaggga aggggctgga gttggtctca agtattagtg gtaatggtcg taccacatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acatttccaa gaacacgctg 300

gatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagat 360

gggggcgaaa ctctagtga ctccagaggc cagggcaccc tggtcaccgt ctctcattc 420

gtgccctgt tectgectgc caagcctaca acaaccctg ctctagacc tectacacca 480

gtcctacaa tcgccagcca gcctctgtct ctgaggcctg aagctttag acctgtgct 540

ggcggagccg tgcataccag aggactggat ttgcctgcg acatctacat ctgggccct 600

ctggctgga caigtggcgt tttgtgctg agcctctga tcacctgta ctgcaaccac 660

cggaactgct ggctgaccaa gaagaagtac agcagcagcg tgcacgaccc caacggcgag 720

tacatgttca tgagggccgt gaacaccgcc aagaagagca ggctgaccga cgtgaccctg 780

agagtgaagt tcagcagatc cgccgatgcc cctgcctacc agcagggccca gaaccagctg 840

tacaacgagc tgaacctggg cagacgggaa gactacgatg tgctggacaa aagacgtggc 900

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat 960

gaactgcaga aagataagat ggccgaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1020

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1080

tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaa 1119

<210> 38

<211> 1122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

atggccctgc ctgttacgc tctgctgctg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga 60

cctcaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga 120

ctctctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagccatg ccatgacctg ggtccgccag 180

gtccgggga aggggctgga gtgggtcgca gctattagtg gcagtgggtga tttcacacac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacggtg 300

tctctgcaaa tgaacaacct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagat 360

gaggatggtg ggagcttctg tggctacaga ggccagggca ccctgggtcac cgtctcctca 420

ttcgtgcccc tgttctctgc tgccaagcct acaacaaccc ctgctcctag acctcctaca 480

ccagctccta caatcgccag ccagcctctg tctctgaggc ctgaagcttg tagacctgct 540

gctggcggag ccgtgcatac cagaggactg gatttcgcct gcgacatcta catctgggcc 600

cctctggctg gaacatgtgg cgttttgctg ctgagcctcg tgatcacctt gtactgcaac 660

caccggaact gctggctgac caagaagaag tacagcagca gcgtgcacga ccccaacggc 720

gagtacatgt tcatgagggc cgtgaacacc gccaagaaga gcaggctgac cgacgtgacc 780

ctgagagtga agttcagcag atccgccgat gcccctgcct accagcaggg ccagaaccag 840

ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg gaagagtacg atgtgctgga caaaagacgt 900

ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 960

aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 1020

cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 1080

acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgct aa 1122

<210> 39

<211> 1128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

atggccctgc ctgttacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga	60
cctgaggtgc agctgttggg gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga	120
ctctctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagctatg ccatgagctg ggtccgccag	180
gctccaggga aggggctgga gtgggtctca tctattagt gtagtggtga ttacatatac	240
tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acatatccaa gaacacgctg	300
tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgaaagaa	360
ggtaggggtg ccaacagcag cttggcagac tacagaggcc agggcaccct ggtcacctgc	420
tcctcattcg tgcccgtgtt cctgcctgcc aagcctacaa caaccctgc tcctagacct	480
cctacaccag ctcttacaat cgccagccag cctctgtctc tgaggcctga agcttgtaga	540
cctgtctgtg gcggagccgt gcataccaga ggactggatt tcgcctgcga catctacatc	600
tgggcccctc tggttgaac atgtggcggt ttgctgtgta gcctcgtgat caccctgtac	660
tgcaaccacc ggaactgctg gctgaccaag aagaagtaca gcagcagcgt gcacgacccc	720
aacggcgagt acatgttcat gagggccgtg aacaccgcca agaagagcag gctgaccgac	780
gtgaccctga gagtgaagtt cagcagatcc gccgatgccc ctgcctacca gcagggccag	840
aaccagctgt acaacgagct gaacctgggc agacgggaag agtacgatgt gctggacaaa	900
agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc	960
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa	1020
ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcttttacc aggggtctcag tacagccacc	1080
aaggacacct acgacgcctt tcacatgcag gcctgcccc ctcgctaa	1128

<210> 40

<211> 1122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

atggccctgc ctgttacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga	60
cctgaggtgc agctgttggg gtctgggggg ggcttgatac agcctggggg gtccctgaga	120

ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagccatg ccatgacctg ggtccgccag 180
gctccgggga aggggctgga gtgggtctca gctattagtg gtagtgggtga ttacacacac 240
tacgcagact ccgtgaaggg tcggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacggtg 300
tatctccaaa tgaacagtct gagagccgag gactcggccg tatattactg tgcgaaagat 360

gaggatggtg ggagcctcct ggggcacaga ggccagggca ccctgggtcac cgtctcctca 420
ttcgtgcccc tgttctctgc tgccaagcct acaacaaccc ctgctcctag acctcctaca 480
ccagctccta caatcgccag ccagcctctg tctctgaggg ctgaagcttg tagacctgct 540
gctggcggag ccgtgcatac cagaggactg gatttcgctt gcgacatcta catctgggcc 600
cctctggctg gaacatgtgg cgttttgcct ctgagcctcg tgatcaccct gtactgcaac 660
caccggaact gctggctgac caagaagaag tacagcagca gcgtgcacga cccaacggc 720
gagtacatgt tcatgagggc cgtgaacacc gccaagaaga gcaggctgac cgacgtgacc 780

ctgagagtga agttcagcag atccgccgat gcccctgcct accagcaggg ccagaaccag 840
ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg gaagagtacg atgtgctgga caaaagacgt 900
ggccggggacc ctgagatggg gggaaaagccg agaaggaaga acctcagga aggcctgtac 960
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 1020
cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 1080
acctacgacg ccttccat gcaggccctg cccctcgt aa 1122

<210> 41

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

tatcgt

6

<210> 42

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

20 25 30
 Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser

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

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

 165 170 175
 Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
 180