



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월11일

(11) 등록번호 10-2588292

(24) 등록일자 2023년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/705 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/705 (2013.01)

A61K 35/17 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2021-7033286

(22) 출원일자(국제) 2020년03월13일

심사청구일자 2023년01월31일

(85) 번역문제출일자 2021년10월14일

(65) 공개번호 10-2021-0141573

(43) 공개일자 2021년11월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2020/022671

(87) 국제공개번호 WO 2020/190737

국제공개일자 2020년09월24일

(30) 우선권주장

62/819,068 2019년03월15일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2016014789 A2*

US20150051266 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

카티전 테라퓨틱스, 인코포레이티드

미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 스위트 210

에이 퀸스 올차드 로드 704

(72) 발명자

장 이

미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 조슈아 트리
플레이스. 11209

스튜어트 씨. 앤드류

미국 21704 메릴랜드주 프레데릭 맥퍼슨
스트리트. 9059

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

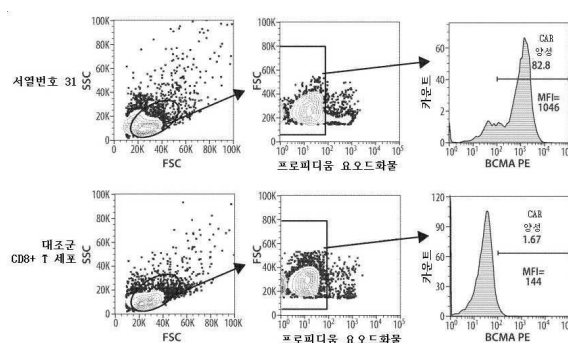
심사관 : 광희찬

(54) 발명의 명칭 항-BCMA 키메라 항원 수용체

(57) 요약

본 발명은 BCMA에의 CAR T 세포 결합성 증가 및 BCMA-발현성 암 세포의 CAR T 세포 사멸성 개선 등의 특성이 개선된, 예를 들어 BCMA에 대한 특이적인, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다. 면역 세포 (예를 들어, T 세포)에서의 CAR의 용도, 조성물 (예를 들어, CAR 및 이를 코딩하는 핵산 구조체) 및 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70517 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C12N 15/90 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

쿠르토글루 메틴

미국 20817 메릴랜드주 베데스다 랑호른 코트.
10110

칼라요글루 무라트 브이.

미국 20910 메릴랜드주 실버 스프링 우드사이드 파
크웨이 1108

싱어 마이클 에스.

미국 02467 메릴랜드주 체스트넛 힐 피. 오. 박스
67327

명세서

청구범위

청구항 1

항원-결합성 영역을 포함하는 단백질로서,

상기 항원-결합성 영역이 하기를 포함하는 항-B 세포 성숙화 항원 (B-Cell Maturation Antigen, BCMA) 결합 도메인인, 단백질:

- 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정부 1 (CDRH1);
- 서열번호 6의 중쇄 상보성 결정부 2 (CDRH2);
- 서열번호 9의 중쇄 상보성 결정부 3 (CDRH3);
- 서열번호 11의 경쇄 상보성 결정부 1 (CDRL1);
- 서열번호 14의 경쇄 상보성 결정부 2 (CDRL2); 및
- 서열번호 17의 경쇄 상보성 결정부 3 (CDRL3).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단백질이 항체 또는 이의 항원-결합성 영역인, 단백질.

청구항 3

항원-결합성 영역을 포함하는 단백질을 단백질을 코딩하는 핵산으로서,

상기 항원-결합성 영역이 하기를 포함하는 항-B 세포 성숙화 항원 (B-Cell Maturation Antigen, BCMA) 결합 도메인인, 핵산:

- 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정부 1 (CDRH1);
- 서열번호 6의 중쇄 상보성 결정부 2 (CDRH2);
- 서열번호 9의 중쇄 상보성 결정부 3 (CDRH3);
- 서열번호 11의 경쇄 상보성 결정부 1 (CDRL1);
- 서열번호 14의 경쇄 상보성 결정부 2 (CDRL2); 및
- 서열번호 17의 경쇄 상보성 결정부 3 (CDRL3).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 단백질이 항체 또는 이의 항원-결합성 영역인, 핵산.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

상기 핵산이 RNA 를 포함하는 것인, 핵산.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서,

상기 핵산이 RNA 인, 핵산.

청구항 7

제3항 또는 제4항에 있어서,
상기 핵산이 DNA 를 포함하는 것인, 핵산.

청구항 8

제3항 또는 제4항에 있어서,
상기 핵산이 DNA 인, 핵산.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] B 세포 성숙화 항원 (BCMA)은 B 세포 계통의 세포 상에서 발현되는 종양 괴사 패밀리 수용체 (TNFR) 구성원이다. BCMA는 최종적으로 분화된 B 세포 상에서 가장 발현 수준이 높다. BCMA는 장기간 체액성 면역을 유지하기 위해 형질세포의 생존을 매개하는데 참여한다. 최근 BCMA의 발현은 다수의 암, 자가면역 장애, 알레르기성 장애 및 감염성 질환들과 연관성이 확인되었다. BCMA의 발현이 증가된 암으로는 다발성 골수종, 호지킨 및 비-호지킨성 림프종, 다양한 백혈병 및 교모세포종과 같은 일부 혈액암 등이 있다. BCMA와 관련있는 자가면역 질환으로는, 비-제한적으로, 중증 근무력증, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 류마티스 관절염, 수포성 피부 질환, 예를 들어, 천포창, 건선, 염증성 장 질환, 복강 스프루, 악성 빈혈, 특발성 혈소판감소증 자반병, 경피증, 그레이브스 질환, 쇼그렌 증후군, 굿파스처 증후군 및 1형 당뇨병 등이 있다. 다수의 자가항체-매개 자가면역 질환에는 현저한 독성을 수반하는 전신 스테로이드 또는 면역억제제를 이용한 장기적인 치료가 요구된다. BCMA와 관련있는 알레르기 장애로는 아나필락시스, 천식, 식품 알레르기, 쏘는 곤충에 대한 알레르기, 약물 알레르기, 알레르기성 비염, 두드러기, 혈관부종, 습진, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염 및 호산성 식도염 등이 있다. 다수의 알레르기성 질환들에는 전신 또는 국소 스테로이드, 면역조절 요법 또는 면역요법을 이용한 장기간의 치료가 요구된다. 환경, 식품, 약물 및 곤충 알레르기에 의해 아픈 환자는 문제가 되는 알레르기원을 회피하기 위해 생활 방식을 바꾸어야 한다.
- [0002] BCMA-관련 병태를 치료하기 위한 유망한 새로운 접근방식은 악성-관련 항원을 인지하도록 유전자 변형된 T 세포의 입양 전달이다. 예를 들어, Kochenderfer의 미국 특허 9,765,342를 참조한다. T 세포는 세포외 항원 인지 모이어티와 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 융합 단백질인 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하기 위해 핵산 구조체를 도입함으로써 유전자 변형될 수 있다. 예를 들어, Eshhar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993;90:720-724 및 Sadellain *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 2009;21:215-223을 참조한다. BCMA를 인지하도록 변형되는 등의 CAR T 세포는 다발성 골수종과 같은 병태를 치료하는데 유익한 것으로 입증되었다. 예를 들어, Ali *et al.*, *Blood*, 2016;128:1688-1700; Brudno *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 2018;36:2267-2280을 참조한다.
- [0003] BCMA를 겨냥하는 CAR 단백질 및 CAR T 세포가 기존에 개시된 바 있다. 예를 들어, Kochenderfer의 미국 특허 9,765,342; Brogdon 등의 미국 특허 10,174,095, 및 Morgan 등의 미국 특허 공개번호 2017/0226216 A1을 참조하며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0004] 항-BCMA CAR T 세포 요법에 대해 기존에 개시된 형태들은 제조 어려움, 준최적의 발현성, 준최적의 표적 결합 및 종양 사멸, 염증성 부작용 및 면역원성 등의 몇가지 문제점을 가지고 있다.
- [0005] 따라서, BCMA-관련 병태들을 치료하기 위한 개선된 CAR 조성물 및 방법들이 요구되고 있다.

발명의 내용

- [0006] 본 발명의 일부 측면들은 적어도 부분적으로 변형된 키메라 항원 수용체를 발현하는 새로운 구조체가 BCMA에의 결합 증가 및 다발성 골수종 세포의 시험관내 및 생체내 사멸 등의 개선된 특성을 나타낸다는 놀라운 발견 사실을 기반으로 한다. 개선의 예로는 CAR T 세포가 BCMA에 더 효과적으로 결합하도록 유발하고 암 세포 사멸에 더 효과적이라도 CDR 서열의 변형; CAR 발현을 개선하는 5' 및 3' 비번역 서열 (UTR); CAR 발현을 개선하는 세포질 도메인; 및 발현을 또한 개선하는 폴리아데닌 (polyA) 꼬리와 같은 기타 개선 등이 있다.
- [0007] 일부 측면들에서, 본 발명은 BCMA에 특이적인 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다. 일부 구현예에서, CAR은 서열번호 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 17 또는 18 중 어느 하나로부터 유래된 하나 이상의 새로운 CDR 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, CAR은 서열번호 2, 6, 9, 11, 14 및 17의 CDR 서열들 (즉, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3)을 포함한다.
- [0008] 일부 구현예에서, CAR은 막관통 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD8 막관통 도메인이다. 그러나, 다른 막관통 도메인도 본 발명에 따라 이용할 수 있다. 일부 구현예에서, CAR은 공동-자극 도메인 및/또는 신호전달 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 공동-자극 도메인은 4-1BB 공동-자극 도메인, CD28

공동-자극 도메인 및/또는 OX40 공동-자극 도메인이다. 일부 구현예에서, CAR은 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 전달 도메인은 CD3 ζ 신호 전달 도메인이다. 일부 구현예에서, CD3 ζ 신호 전달 도메인은 하나 이상의 공동-자극 도메인 (예를 들어, 41BB, CD28 및/또는 OX40 공동-자극 도메인)과 함께 CDR에 포함된다.

[0009] 본 발명의 다른 측면은 전술한 구현예들 중 임의의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 핵산 서열은 CAR의 발현을 개선하는데 유용한 하나 이상의 특징을 포함한다. 예를 들어, 핵산은 5' 비번역 영역 (5' UTR), 3' 비번역 영역 (3' UTR), 폴리아데닌 꼬리 (polyA), 7-메틸구아노신 캡 (m⁷G) 및/또는 오픈 리딩 프레임을 가질 수 있다. 핵산은 내부 리보솜 도입부 (IRES)를 추가로 가질 수 있다.

[0010] 또 다른 측면은, 예를 들어, 전술한 구현예들 중 어느 하나의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 바와 같이, 전기천공에 의해 세포에 도입하기 적합한 mRNA 구조체에 관한 것이다. 본 발명의 다른 측면은 전술한 구현예들 중 어느 하나의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면은 전술한 구현예들 중 어느 하나의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 CAR 및/또는 CAR-코딩 핵산을 포함하는 세포에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 줄기 세포, NK 세포 또는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 측면은 전술한 구현예들 중 어느 하나의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 CAR을 포함하는 세포 (예를 들어, T 세포)를 복수개로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함한다.

[0013] 본 발명의 다른 측면은, 전술한 구현예들 중 어느 하나의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 CAR-코딩 핵산을 복수의 면역 세포에 전기천공, 세포의 물리적 파괴, 예를 들어, 세포 스킨징을 이용함으로써 또는 핵산을 포함하는 나노입자를 이용함으로써 도입하는 것을 포함하는, 복수의 CAR 변형된 세포를 구축하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, mRNA 구조체는 CAR-코딩 핵산을 포함한다.

[0014] 본 발명의 다른 측면은 전술한 구현예들 중 어느 하나의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 핵산을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 복수의 면역 세포에 도입하는 것을 포함하는, 복수의 CAR 변형된 세포를 구축하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 전술한 구현예들 중 어느 하나에 또는 본 발명에 기술된 하나 이상의 핵산을 포함하는 하나 이상의 렌티바이러스 벡터가 제공된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 T 세포이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면은 전술한 구현예들 중 어느 하나의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 바와 같이 CAR을 포함하는 T 세포 또는 전술한 구현예들 중 어느 하나의 구현예에 기술되거나 또는 본 발명에 기술된 방법에 의해 생산된 복수의 세포를 암을 가진 개체 또는 암을 앓을 위험이 있는 개체에 투여하는 것을 포함하는, 암을 가진 개체 또는 암을 앓을 위험이 있는 개체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종이다.

[0016] 또한, 자가면역 질환 또는 알레르기성 장애를 가진 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 또한, 자가면역 질환 또는 알레르기성 장애를 치료하기 위한, 본 발명에 기술된 CAR을 포함하는 하나 이상의 T 세포의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0017] **도 1**은 서열번호 31의 CAR 또는 대조군 (mRNA 비-함유)을 이용해 구축된 CAR T 세포에 의한 세포 생존 능력, CAR 발현 및 BCMA 결합성을 형질감염 후 24시간 경과시 평가한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 서열번호 20, 21 또는 25의 CAR을 이용해 구축된 인간화된 항-BCMA CAR T 세포를 처리한 후 다발성 골수종 MM.1S 세포 종양을 생체내에서 측정된 결과를 나타낸 것이다. CAR T 세포 또는 대조군 (CAR-음성) 세포를 6일에 1회 투여로 투여하였다. 종양 부담을 형광성 종양 세포로부터 유래된 평균 생발광 강도로 나타낸다 (Flux, 광자/초).

도 3은 서열번호 31의 CAR을 발현하기 위해 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템 (Sleeping Beauty transposon system)에 의해 변형된 T 세포에 의한 CAR 발현, 항-BCMA 세포독성 및 인터페론-γ 분비를 측정된 결과를 나타

낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

정의

[0019]

본 발명 및 청구항에서, 단수 형태 ("a", "an" 및 "the")는 명확하게 달리 명시되지 않은 한 단수의 언급과 복수의 언급을 포함한다. 즉, 예를 들어, "물질"은 이러한 물질 하나 및 여러개를 포괄한다.

[0020]

본 발명에서, 용어 "활성화"는 T 세포, NK 세포, 줄기 세포 또는 검출가능한 세포성 증식을 유도하도록 충분히 자극된 기타 세포의 상태를 나타내는 것이다. 또한, 활성화는 유도된 사이토카인 생산 및 검출가능한 작동자 기능과 관련있을 수 있다. 용어 "활성화된 T 세포"는 특히 세포 분열 중인 T 세포를 지칭한다.

[0021]

본 발명에서, 용어 "알레르기" 및 "알레르기성"은 일반적으로 무해한 물질, 즉 알레르기원에 대해 비정상적인 과민성 반응을 수반하는 의학적인 상태를 의미한다. 알레르기성 병태의 예로는 아나필락시스, 천식, 식품 알레르기, 쏘는 곤충의 알레르기, 약물 알레르기, 알레르기성 비염, 두드러기, 혈관부종, 습진, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염 및 호산성 식도염 등이 있다.

[0022]

본 발명에서, 용어 "항체"는 넓게는 4개의 폴리펩타이드쇄, 즉 중(H)쇄 2개와 경(L)쇄 2개로 구성된 임의의 면역글로불린(Ig) 분자, 또는 Ig 분자의 기본적인 에피토프 결합 특징을 보유한 이의 임의의 기능성 단편, 돌연변이, 변이체 또는 유도체를 지칭한다. 이러한 돌연변이, 변이체 또는 유도체 항원 형태는 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 이에 대한 비-제한적인 예는 아래에서 기술된다.

[0023]

전장 항체의 경우, 각각의 중쇄는 중쇄 가변부(본 발명에서 HCVR 또는 VH로 약칭됨)와 중쇄 불변부로 구성된다. 중쇄 불변부는 도메인 3종, 즉 CH1, CH2 및 CH3로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변부(본 발명에서 LCVR 또는 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변부로 구성된다. 경쇄 불변부는 도메인 1종, 즉 CL로 구성된다. VH 영역 및 VL 영역은 더 보존적인 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 영역들 사이에 위치한 상보성 결정부(CDR)로 지칭되는 과변이 영역으로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 CDR 3종 및 FR 4종으로 구성되며, 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 다음과 같은 순서로 정렬된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 면역글로불린 분자는 임의 타입(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다.

[0024]

본 발명에서, 항체의 용어 "항원-결합성 영역"(또는 간단하게 "항체 영역")은 항원(예를 들어, BCMA)에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하고 있는 하나 이상의 항체 단편을 의미한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편들에 의해 수행될 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 항체 구현예들은 또한 이중 특이성, 듀얼 특이성 또는 다중 특이성 형태일 수 있으며; 2종 이상의 서로 다른 항원들에 특이적으로 결합할 수 있다. 다중 특이성, 듀얼 특이성 및 이중 특이성 항체 구조체들이 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, Kontermann (ed.), Bispecific Antibodies, Springer, NY (2011), and Spiess *et al.*, Mol. Immunol. 67(2):96-106 (2015)에 규정되어 있다.

[0025]

항체의 "항원-결합성 영역"이라는 용어에 포함되는 결합 단편에 대한 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 일가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지부에서 이황화 결합에 의해 연결된 Fab 단편 2개를 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 도메인과 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 한쪽 아암의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (v) 단일 가변성 도메인을 포함하는 dAb 단편(Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546, Winter *et al.*, PCT publication WO 90/05144 A1 본 발명에 원용에 의해 포함됨); 및 (vi) 단리된 상보성 결정부(CDR) 등이 있다. 아울러, Fv 단편의 도메인 2종, 즉 VL 및 VH가 별개의 유전자들에 의해 코딩되더라도, 이는 VL 영역과 VH 영역이 쌍을 형성하여 1가 분자(단쇄 Fv(scFv)로 알려짐)를 형성하는 단일 단백질 쇄로서 제조할 수 있는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 이용해 연결할 수 있다(예를 들어, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; 및 Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883을 참조함). 이러한 단쇄 항체는 또한 항체의 용어 "항원-결합성 영역"에 해당되는 것으로 의도된다. 단쇄 항체의 다이아바디와 같은 다른 형태 역시 포괄된다. 다이아바디는, VH 도메인과 VL 도메인이 단일한 폴리펩타이드쇄 상에 발현되지만, 동일한 쇄에서 2개의 도메인들 간에 쌍을 형성하기에는 매우 짧은 링커를 사용해 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 형성하게 만들어 2개의 항원 결합부를 형성하는, 2가 이중 특이성 항체이다(예를 들어, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123을 참조함). 이러한 항체 결합성 영역은 당해 기술 분야에 공지되어 있다(Kontermann

and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

- [0026] 본 발명에서, "항체 중쇄"는 모든 항체 분자들에 존재하는 자연 생성 형태의 2가지 유형의 폴리펩타이드 쇠 중 더 큰 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서, "항체 경쇄"는 모든 항체 분자들에 존재하는 자연 생성 형태의 2가지 유형의 폴리펩타이드 쇠 중 더 작 것을 의미하며, κ 및 λ 경쇄는 2가지 주요 항체 경쇄 이소형이다.
- [0028] 본 발명에서, 용어 "합성 항체"는, 예를 들어, 바이러스 벡터에 의해 발현된 항체와 같이, 재조합 DNA 기법을 이용해 구축된 항체를 지칭한다. 이 용어는 또한 항체를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 구축되고 DNA 분자가 항체 단백질 또는 항체를 특징하는 아미노산 서열을 발현하되 DNA 또는 아미노산 서열이 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며 이용가능한 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기법을 이용해 수득된, 항체를 의미하는 것으로 해석하여야 한다.
- [0029] 일부 구현예에서, 본 발명에서 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 촉발하는 분자로서 정의된다. 이러한 면역 반응은 항체 생산, 특이적인 면역학적 컴피턴트 세포 (immunologically competent cell)의 활성화 또는 이 둘다를 수반할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 사실상 모든 단백질 또는 펩타이드 등의 임의의 거대분자가 항원으로서 작용할 수 있음을, 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 면역 반응을 일으키는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 일부 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가, 따라서, 이 용어가 본 발명에서 사용되는 바와 같이 "항원"을 코딩함을 이해할 것이다. 아울러, 당해 기술 분야의 당업자라면, 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 코딩되어야 하는 것은 아님을 이해할 것이다. 본 발명은, 비-제한적으로, 2 이상의 유전자의 일부 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하며, 이들 뉴클레오티드 서열은 원하는 면역 반응을 끌어내기 위해 다양한 조합으로 정렬됨은 매우 자명하다. 더욱이, 당해 기술 분야의 당업자라면, 필요한 항원이 전혀 "유전자"에 의해 코딩되지 않음을 알 것이다. 항원은 합성하여 구축되거나 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있음은 매우 자명하다. 이러한 생물학적 샘플로는 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서, 용어 "종양 항원"은 다발성 골수종 세포와 같은 암 세포와 관련된 항원을 지칭한다. 종양 항원에 대한 예로는 비-제한적으로 BCMA가 있다.
- [0031] 본 발명에서, 용어 "항-종양 효과"는 종양 체적의 감소, 종양 세포의 수적 감소, 전이 수 감소, 기대 수명 증가 또는 암성 병태와 관련한 다양한 생리학적 증상의 개선에 의해 나타날 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항-종양 효과"는 또한 본 발명의 펩타이드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 1차 발병 부위에서 종양의 발병 예방 능력에 의해 나타날 수 있다.
- [0032] 용어 "자가면역"은 개체의 면역 시스템 또는 이의 구성성분이 개체의 정상적인 신체 조직(들)을 공격하는 질환 또는 병을 의미한다. 자가면역 질환은 자가항체, 즉 개체 자신의 조직(들)의 항원을 인지하는 개체에 의해 생성된 항체에 의해 매개될 수 있다. 자가면역 질환의 예로는 중증 근무력증, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 류마티스 관절염, 수포성 피부 질환, 예를 들어, 천포창, 건선, 염증성 장 질환, 셀리악 스프루, 악성 빈혈, 특발성 혈소판감소증 자반병, 경피증, 그레이브스 질환, 쇼그렌 증후군, 굿파스처 증후군 및 1형 당뇨병 등이 있다.
- [0033] 본 발명에서, "자가 조직성"은 향후 개체에 재도입되게 될 동일 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭하는 것을 의미한다.
- [0034] 본 발명에서, 용어 "동종이계"는 이식편이 동일 종에 속하는 다른 동물로부터 유래되는 것을 의미한다. "이종성"은 이식편이 다른 종의 동물로부터 유래되는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명에서, 용어 "암"은 이상 세포의 빠르고 통제되지 않은 증식을 특징으로 하는 질환으로서 정의된다. 암 세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프 시스템을 통해 신체의 다른 부위로 퍼질 수 있다. 다양한 암에 대한 예로는, 비-제한적으로, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등이 있다. 일부 구현예에서, 암은 BCMA를 발현하는 암이다. BCMA를 발현하는 암의 예로는 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 만성 림프성 백혈병 (CLL) 및 교모세포종 등이 있다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종을 지칭한다. 다발성 골수종은 형질세포의 암이다. 다발성 골수종은 혈액 검사 (혈청 단백질 전기영동, 혈청 유리 카파/람다 경쇄 분석), 골수 검사, 뇨 단백질 전기영동 및/또는 공통적으로 침범되는 뼈의 X선으로 진단할 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 호지킨 림프종 (HL)을 지칭한다. HL은 B 세

포의 암이다.

- [0036] "유효량"은 장애 또는 이의 한가지 이상의 증상의 중증도 및/또는 기간을 줄이거나 또는 개선하거나, 장애의 진행을 예방하거나, 장애의 퇴행을 유발하거나, 장애와 관련된 한가지 이상의 증상의 재발, 발병, 개시 또는 진행을 예방하거나, 장애를 검출하거나 또는 다른 요법 (예를 들어, 예방학적 또는 치료학적 물질)의 예방학적 또는 치료학적 효과(들)를 강화 또는 개선하는데 충분한 요법의 양을 의미한다.
- [0037] 본 발명에서, 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 외부로부터 도입되거나 또는 만들어진 임의의 물질을 지칭한다.
- [0038] "발현 벡터"는 발현될 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작동 인자들을 포함하며; 발현을 위한 다른 인자들도 숙주 세포에 의해 공급되거나 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 통합하는 코스미드, 플라스미드 (예, 네이키드 또는 리포솜에 함유) 및 바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-부속 바이러스)와 같이 당해 기술 분야에 공지된 전체를 포함한다. 발현 벡터는 자기-중복성 RNA에 대해, 예를 들어 RNA 바이러스 벡터에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, U.S.S.N. 12/831,252를 참조한다.
- [0039] 본 발명에서, 용어 "면역글로불린" 또는 "Ig"는 항체로서 기능하는 단백질 클래스로서 정의된다. B 세포에 의해 발현된 항체는 BCR (B 세포 수용체) 또는 항원 수용체로 종종 지칭된다. 이러한 단백질 클래스에 포함되는 구성원 5가지는 IgA, IgG, IgM, IgD 및 IgE이다. IgA는 타입, 눈물, 모유, 위장 분비액 및 호흡기와 비뇨기의 점액 분비물과 같은 체액에 존재하는 1차 항체이다. IgG는 가장 일반적인 순환성 항체이다. IgM은 대부분의 개체들에서 1차 면역 반응에서 만들어지는 주 면역글로불린이다. 이는 응집 반응, 보체 고정 및 기타 항체 반응에서 가장 효과적인 면역글로불린이며, 박테리아와 바이러스를 방어하는데 중요하다. IgD는 공지된 항체 기능은 없지만 항원 수용체로서 제공할 수 있는 면역글로불린이다. IgE는 알레르기원에 노출되었을 때 비만 세포 및 호염구로부터 매개인자의 방출을 유발함으로써 즉각적인 과민증을 매개하는 면역글로불린이다.
- [0040] "단리된"은 자연 상태에서부터 분리되거나 또는 변동되는 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 본래 존재하는 핵산 또는 펩타이드는 "단리된" 것이 아니며, 자연 상태에서 공존하는 물질로부터 일부 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩타이드는 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는 예를 들어, 숙주 세포와 같이 비-천연 환경에 존재할 수 있다.
- [0041] 달리 명시되지 않은 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 핵산"은 동일한 아미노산 서열을 코딩하며 서로 축퇴 버전 (degenerate version)인 모든 뉴클레오타이드 서열을 포괄한다. 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이라는 표현은 또한 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 한에서 인트론을 함유할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, "렌티바이러스"는 레트로비리대 계열의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 비-분열성 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스들 중에서 독특하며; 이는 숙주 세포의 DNA로 상당한 수준의 유전자 정보를 전달할 수 있어, 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법들 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 예이다. 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 상당한 수준의 유전자 전달을 달성하기 위한 수단을 제공해준다.
- [0043] 본 발명에서, 용어 "조절하는"은 치료제 또는 화합물의 부재시 개체에서의 반응 수준과 비교해, 및/또는 무처리된 동일 개체에서의 반응 수준과 비교해, 개체에서 반응 수준의 검출가능한 증가 또는 감소를 매개하는 것을 의미한다. 이 용어는 본래의 신호 또는 반응을 교란하거나 및/또는 영향을 미쳐, 개체, 바람직하게는 인간에서 유의한 치료학적 반응을 매개하는 것을 포괄한다.
- [0044] "코돈-최적화된"은, 특정 아미노산과 관련한 코돈이 대상 유전자의 번역 효율을 위해 최적화되는 것을 의미한다. 코돈 최적화는 전형적으로 대상 유전자 또는 서열을 평가하고, 그 코돈을 특정 세포 또는 종에서 동일 아미노산에 대해 사용되는 더 지배적이거나 또는 흔한 코돈으로 치환하는 것을 수반한다. 코돈 최적화를 조사하기 위해 당해 기술 분야의 당업자들이 이용하는 프로그램으로는 Integrated DNA Technologies, EnCor Biotechnology, Inc., JCat, OptimumGene™ (GenScript USA, Inc., Piscataway, NJ 08854) 등에 의해 제공되는 것이 있다. 본 발명에 기술된 CAR 구현예를 코딩하는 서열은 코돈-최적화하여, 이의 번역 효율을 높일 수 있다.
- [0045] 본 발명에서, 용어 "링커"는 결합 (예를 들어, 공유 결합), 화학 기 또는 2개의 분자 또는 모이어티, 예를 들어

뉴클레아제-비활성 Cas9 도메인과 핵산-편집 도메인 (예, 아데노신 데아미나제)과 같은 융합 단백질의 2개의 도메인을 연결하는 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, 링커는 Cas9 뉴클레아제 도메인 등의 RNA-프로그래밍 가능한 뉴클레아제의 gRNA 결합 도메인과 핵산 편집 단백질의 촉매 도메인을 연결한다. 일부 구현예에서, 링커는 dCas9과 핵산 편집 단백질을 연결한다. 전형적으로, 링커는 2개의 기, 분자 또는 다른 모이어티 사이에 또는 측면에 위치하며, 공유 결합에 통해 서로 연결하여, 2개를 연결한다. 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 또는 복수의 아미노산 (예, 펩타이드 또는 단백질)이다. 일부 구현예에서, 링커는 유기 분자, 기, 폴리머 또는 화학적 모이어티이다. 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 5-100개 길이, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-150, 또는 150-200개 길이이다. 더 길거나 또는 짧은 링커도 고려된다.

[0046] 용어 "작동가능하게 연결된"은 조절 서열이 이종의 핵산 서열과 이후 발현되도록 기능적으로 연결되는 것을 의미한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열에 기능적인 관계로 배치되면, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 준다면, 프로모터가 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열들은 인접하며, 필요에 따라서는 2개의 단백질 코딩 영역은 동일한 리딩 프레임으로 연결된다.

[0047] 용어 "과다 발현된" 또는 "과다 발현"은 조직 또는 장기 유래 정상 세포에서의 발현 수준을 기준으로 질병에 걸린 부위 (예를 들어, 환자의 특정 조직 또는 장기내 고형 종양)의 세포에서 (예를 들어, 종양 항원의) 발현 수준이 비정상적인 것을 의미하는 것으로 의도된다. 종양 항원의 과다 발현을 특징으로 하는 고형 종양 또는 혈액 악성을 가진 환자는 당해 기술 분야에 공지된 표준 분석에 의해 확인할 수 있다.

[0048] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는, 예를 들어, 피하 (s.c), 정맥내 (i.v.), 근육내 (i.m.) 또는 흉골내 주사 또는 주입 기법을 포함한다.

[0049] 용어 "환자", "개체", "개인" 등은 본 발명에서 상호 호환적으로 사용되며, 본 발명에 기술된 방법을 용인할 수 있는 시험관내 또는 인 시추의 임의의 동물 또는 이의 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, 환자, 개체 또는 개인은 인간이다.

[0050] 본 발명에서, 용어 "프로모터"는 폴리뉴클레오티드 서열의 특이적인 전사를 개시하기 위해 필요한, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인지되는 DNA 서열로서 정의된다.

[0051] 본 발명에서, 용어 "프로모터/조절 서열"은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 산물을 발현시키는데 필요한 핵산 서열을 의미한다. 일부 경우에, 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있으며, 다른 경우에 이 서열은 또한 인핸서 서열과 유전자 산물을 발현시키는데 필요한 기타 조절 인자들을 함유할 수 있다. 프로모터/조절 서열은, 예를 들어, 조직 특이적인 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다. "구성적인" 프로모터는, 유전자 산물을 코딩하거나 또는 명시된 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결되었을 때, 세포의 모든 또는 대부분의 생리학적 환경에서 유전자 산물이 세포에서 생산되게 유발하는, 뉴클레오티드 서열이다.

[0052] "유도성" 프로모터는, 유전자 산물을 코딩하거나 또는 명시된 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결되었을 때, 실질적으로 프로모터에 대응하는 유발제가 세포에 존재하는 경우에만 유전자 산물이 세포에서 생산되게 유발하는, 뉴클레오티드 서열이다.

[0053] "조직-특이적인" 프로모터는, 유전자에 의해 코딩되거나 또는 명시된 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결되었을 때, 실질적으로 세포가 프로모터에 해당하는 조직 타입의 세포일 경우에만 유전자 산물이 세포에서 생산되게 유도하는, 뉴클레오티드 서열이다.

[0054] 본 발명에서, 항체 (예, scFv)와 관련하여 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "에 특이적인"은 특이적인 항원을 인지하지만 샘플에서 다른 분자는 실질적으로 인지하지 않거나 또는 결합하지 않는, 항체를 의미한다. 예를 들어, 하나의 종으로부터 유래된 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 하나 이상의 종으로부터 유래된 그 항원에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 종 교차 반응성 자체가 항체의 분류를 특이적으로 바꾸진 않는다. 다른 예로, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 항원의 다른 대립유전자 형태에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 교차 반응성 자체가 항원의 분류를 특이적으로 바꾸진 않는다. 일부 경우에, 용어 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인 결합"은 항체, 단백질 또는 펩타이드와 제2 화학적 종 간의 상호작용을 지칭하는데 사용될 수 있으며, 이는 상호작용이 화학적 종에 특정 구조 (예를 들어, 항원성 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존적이라는 것을 의미하며; 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특이적인 단백질 구조를 인지하여 결합한다. 만일 항체가 에피토프 "A"에 특이적이라면, 표지된 "A"와 항체를 함유한 반응에서 에피토프 A를 함유한 분자 (또는 유

리형의 표지되지 않은 A)의 존재는 항원에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0055] 용어 "개체"는 면역 반응을 일으킬 수 있는 살아있는 유기체 (예, 포유류)를 포괄하는 것으로 의도된다. 개체의 예로는 인간, 개, 고양이, 마우스, 랫 및 이들의 형질전환 종 등이 있다. 일부 구현예에서, 개체는 인간을 제외한 포유류이다. 일부 구현예에서, 개체는 인간을 제외한 영장류이다. 일부 구현예에서, 개체는 설치류이다. 일부 구현예에서, 개체는 양, 염소, 소, 고양이 또는 개이다. 일부 구현예에서, 개체는 척추동물, 양서류, 파충류, 어류, 곤충, 파리 또는 선충이다. 일부 구현예에서, 개체는 연구 동물이다. 일부 구현예에서, 개체는 유전자 조작된, 예를 들어, 인간을 제외한 유전자 조작된 개체이다. 개체는 모든 성별 및 발달 단계의 개체일 수 있다. 일부 구현예에서, 개체는 암 (예를 들어, 다발성 골수종)에 걸린 개체이다. 다른 구현예들에서, 개체는 건강한 지원자이다.

[0056] 본 발명에서, 용어 "치료학적"은 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료학적 효과는 질환 상태의 억제, 관해 또는 근절에 의해 달성된다.

[0057] 본 발명에서, 용어 "치료학적 유효량"은 연구자, 수의학자, 의사 또는 기타 임상가가 추구하고자 하는 조직, 시스템 또는 개체에서 생물학적 또는 의학적 반응을 이끌어내는 대상 화합물의 양을 의미한다. 용어 "치료학적 유효량"은 투여하였을 때 치료 중인 장애 또는 질환의 징후 또는 증상 하나 이상을 어느 정도 완화하거나 또는 발병을 예방하기에 충분한 화합물의 양을 포함한다. 치료학적 유효량은 화합물, 질환 및 이의 중증도, 그리고 치료할 개체의 나이, 체중 등에 따라 달라질 것이다.

[0058] 본 발명에서, 용어 "치료", "치료한다" 및 "치료하는"은 본 발명에 기술된 질환 또는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화하거나, 개시를 지연시키거나 또는 진행을 저해하는 것을 목표로 한 임상적 개입을 의미한다. 일부 구현예에서, 치료는 하나 이상의 증상이 발병되었거나 및/또는 질환이 진단된 후 실시할 수 있다. 다른 구현예에서, 치료는 증상이 없을 때, 예를 들어 증상의 개시를 방지 또는 지연시키거나 또는 질환의 개시 또는 진행을 저해하기 위해 실시할 수 있다. 예를 들어, 치료는 증상 개시 전에 (예를 들어, 증상의 병력 및/또는 유전적 또는 기타 감수성 요인에 비추어) 감수성 개체에게 실시할 수 있다. 또한, 치료는 증상이 해소된 후, 예를 들어, 재발을 방지 또는 지연시키기 위해 계속 실시할 수도 있다.

[0059] 본 발명에서, 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은, 외인성 핵산을 숙주 세포에 형질전달 또는 도입하는 공정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염되었거나, 형질전환되었거나 또는 형질도입된 것이다. 세포는 일차 대상 세포 및 이의 자손을 포괄한다.

[0060] "벡터"는 단리된 핵산을 포함하며 단리된 핵산을 세포 안으로 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질 조성물이다. 비-제한적으로 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친성 화합물과 조합된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스 등의 다수의 벡터들이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "벡터"는 자율적으로 복제하는 플라스미드 또는 바이러스를 포괄한다. 이 용어는 또한 핵산을 세포에 전달하는 것을 촉진하는, 예를 들어 폴리 라이신 화합물, 리포솜 등과 같은 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 벡터에 대한 예로는, 비-제한적으로, 아데노바이러스 벡터, 아데노-부속 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등이 있다.

[0061] 특정 구현예들에 대한 상세한 설명

[0062] 키메라 항원 수용체 (CAR) 기술은 특정 종양 항원을 표적으로 하는 작동자 T 세포를 구축하는 것을 목표로 한다. CAR은 항원-결합 기능과 T 세포-활성화 기능 둘다를 제공하는 재조합 수용체이다. CAR은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 이전에, 예를 들어 Sadelain M., *et al.*, "The basic principles of chimeric antigen receptor (CAR) design" *Cancer Discov.* 2013 Apr; 3(4): 388-398에 기술되어 있으며; 이 문헌의 전체 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 일반적으로, CAR T 세포 (CART 세포 또는 CART로도 언급됨)는 단쇄 Fv (scFv) 항체 모이어티에 기반한 조작된 T 세포이다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체 (CAR) 일부는 항원 결합 도메인 (예를 들어, scFv)과 T 세포의 신호 전달 도메인 (예, CD3 ζ쇄 함유)을 겸비한 수용체 복합체를 포함한다.

[0063] 본 발명에 제공된 바와 같이, 항-B-세포 성숙화 항원 (BCMA) CAR 및 이의 대응되는 핵산 발현 구조체는, 발현 개선, BCMA에의 CAR T 세포 결합성의 개선, 반감기 개선, BCMA-발현 세포 (예, 골수종 세포)의 사멸 개선 및 인간에서 낮은 면역원성 등의 개선된 특성을 부여하도록 조작되었다. 개선된 항-BCMA CAR을 발현하는 핵산 구조체를 구축하기 위해, 하나 이상의 상보성 결정부 (CDR)에 돌연변이를 만들고, 돌연변이를 오픈 리딩 프레임 (OR

F)에 도입하고, 돌연변이를 프레임워크 영역에 도입하고, 얼터너티브 5' 및 3' 비번역 영역 (UTR)을 사용하고, 얼터너티브 공동-자극 도메인들을 사용하고, 얼터너티브 폴리-아데닌 꼬리를 설계하였다. 이러한 개선된 항-BCMA CAR 및 이의 발현 구조체는 Ali *et al.* (2016)의 임상 실험에 사용된 서열번호 19의 CAR과 같이, 기존에 개시된 항-BCMA CAR과 비교해 개선된 특성을 나타낸다.

[0064] 본 발명에 기술된 바와 같이, CAR은 다발성 골수종 (MM) 항원인 BCMA에 결합하는 scFv를 기반으로 조작되었다. 예시적인 CAR은 CD8 신호 펩타이드, 항-BCMA scFv (예, 서열번호 60), CD8 힌지 및 막관통 도메인, 4-1BB 공동-자극 도메인 및 CD3 ζ 신호 전달 도메인으로 구성될 수 있다. CAR T 세포를 구축하기 위해, 건강한 인간 공여 체로부터 성분채집술에 의해 수득한 CD8+ 림프구에 CAR을 발현하는 mRNA 구조체를 형질감염시켰다. 조사한 CAR 단백질들 중 하나를 발현하는 CAR T 세포 (예를 들어, 서열번호 21의 CAR을 발현하는 CAR T 세포)는, BCMA에 대한 결합 증가, BCMA-발현성 골수종 세포의 사멸 증가 및 동물 모델에서 인간 골수종 종양의 증식의 상당한 저해를 나타내었다. 이에, 본 발명의 측면들은 항-BCMA CAR 및 이의 이용 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, CAR은 T 세포에 의해 발현되며, 암을 치료, 예를 들어 다발성 골수종을 치료하는데 유용하다.

[0065] 일부 구현예에서, CAR은 BCMA에 특이적이다. B 세포 성숙화 항원 (BCMA, 또한 BCM, CD269, TNFRSF17 또는 TNFRSF13A로도 알려져 있음)은 B 세포 상에 발현되는 TNFR 슈퍼패밀리의 구성원이다. 예시적인 비-제한적인 인간 BCMA 서열은 아래에 제시된다.

[0066] >gi|23238192|ref|NP_001183.2| 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 17, BCMA [호모 사피엔스]

[0067] MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIIISLAV

[0068] FVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLETVVEECTCEDCIKSKPKVDS

[0069] DHCFLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR (서열번호 121)

[0070] 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 CAR은, 단일한 폴리펩타이드 (예를 들어, 링커에 의해 연결된) 또는 2개의 폴리펩타이드 (예를 들어, 세포에 도입되면 이량체를 형성할 수 있는, 제1 CAR 폴리펩타이드 하나와 제2 CAR 폴리펩타이드 하나) 상에 있을 수 있는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단쇄 Fv (scFv)를 포함한다.

[0071] 조성물

[0072] CAR

[0073] 일부 측면에서, 본 발명은 BCMA에 특이적인 (예를 들어, BCMA에 특이적으로 결합하는) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다. 일부 구현예에서, CAR은 BCMA에 특이적인 항원-결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포질 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 인간화된 항-BCMA 결합 도메인이다. 일부 구현예에서, 세포질 도메인 또는 아니면 세포내 도메인은, BCMA 단백질 (예를 들어, 암 세포의 표면 상에 발현된 BCMA 단백질)에 항-BCMA CAR가 결합하면 세포에서 신호, 예를 들어 T-세포 활성화 신호를 변환할 수 있는, T-세포 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, T-세포 신호전달 도메인은 T-세포 증식 신호, 기억 신호, 세포독성 작동자 기능 신호 또는 사이토카인 생산 신호를 변환할 수 있다. 일부 구현예에서, T-세포 신호전달 도메인은 공동-자극 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포질 도메인은 제타 체 영역을 더 포함한다. 예시적인 T-세포 신호전달 도메인으로서는, 비-제한적으로, CD8- α 단백질, CD28 단백질, CD3 ζ 단백질, FcR γ 단백질, CD27 단백질, OX40 단백질, 41BB 단백질 및 이들의 임의 조합 등이 있다. 그러나, 본 발명에 제공된 T-세포 신호전달 도메인은 예일 뿐이며, 본 발명은 본 발명에 따라 사용할 수 있는 공지된 또는 아직 개시되지 않은 추가적인 T-세포 신호전달 도메인을 고려하는 것으로, 이해하여야 한다.

[0074] 일부 구현예에서, CAR의 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이, 또는 CAR의 세포질 도메인과 막관통 도메인 사이, 또는 BCMA-결합 도메인 사이에, 스페이서 및/또는 힌지 도메인이 병합될 수 있다. 본 발명에서, 용어 "스페이서 도메인"은 일반적으로 막관통 도메인을 폴리펩타이드 체에서 세포외 도메인 또는 세포질 도메인에 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 스페이서 도메인은 아미노산을 최대 300개, 예를 들어, 1-5개, 1 to 10개, 1-20개, 1-40개, 1-60개, 1-100개, 1-150개, 1-200개, 1-250개, 1-300개, 5-10개, 5-20개, 5-40개, 5-60개, 5-100개, 10-20개, 10-40개, 10-60개, 10-100개, 20-40개, 20-60개, 20-100개, 40-60개, 40-100개 또는 60-100개 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서 도메인은 아미노산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 측면들이 이에 제한되지 않으므로, 하나 이상의 스페이서 도메인이 CAR의 다른 영역들에도 함유될 수 있는 것으로, 이해하여야 한다. 스페이서 서열의 예로는, 비-제한적으

로, GGGGS (서열번호 124); GGGSGGGGS (서열번호 125); (GGGGS)₃ (서열번호 126); GSTSGGSGGGSGGGSS (서열번호 127); GSTSGSGKPGSSEGSTKG (서열번호 128); GGGSGGG (서열번호 129) 및 GGGs (서열번호 130) 중 하나 이상을 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 CAR은, 전형적으로 CAR의 세포의 도메인을 세포내 도메인에 연결하는, 힌지부를 포함한다. 일부 구현예에서, 힌지부는 CAR의 BCMA-결합 도메인과 막관통 도메인 사이에, 또는 CAR의 스페이서 도메인과 막관통 도메인 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인이 CAR의 세포의 도메인에, 예를 들어, CAR의 항-BCMA 결합 도메인에 힌지, 예를 들어 인간 단백질 유래 힌지를 경유해 부착될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 힌지는 인간 Ig (면역글로불린) 힌지, 예를 들어, IgG4 힌지, CD8 α 힌지 또는 CD28 힌지로부터 유래할 수 있다. 일부 구현예에서, 힌지는 자연 생성 Ig 분자의 힌지, 예를 들어, IgG4 힌지, CD8 α 힌지 또는 CD28 힌지의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 힌지는 FVPVFLPAKPTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열번호 117)과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 힌지는 서열번호 117의 아미노산 서열을 포함한다. 그러나, 힌지의 예는 제한하고자 하는 것은 아니며, 다른 힌지도 고려되는 것으로 이해하여야 한다. 예를 들어, 힌지는 세포 표면 단백질의 하나 이상의 세포의 도메인을 함유할 수 있었다. 예를 들어, Watanabe *et al.*, "Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency", *Oncoimmunology*. 2016; 5(12): e1253656을 참조하며, 이의 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0076] 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 CAR은 NH₂-[BCMA 결합 도메인]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인]-COOH 구조를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 NH₂-[BCMA 결합 도메인]-[힌지부]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인]-COOH 구조를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 하나 이상의 스페이서 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 각각의 "-["는 선택적인 스페이서 서열의 존재를 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포질 도메인은 CD8-α 단백질, CD28 단백질, CD3 ζ 단백질, FcR γ 단백질, CD27 단백질, OX40 단백질, 41BB 단백질 및 이들의 임의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 CAR은 구조 [BCMA 결합 도메인]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인]; [BCMA 결합 도메인]-[힌지부]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인]; [신호 펩타이드]-[BCMA 결합 도메인]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인]; 또는 [신호 펩타이드]-[BCMA 결합 도메인]-[힌지부]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인]을 포함한다.

[0077] 일부 구현예에서, CAR은 다음과 같은 예시적인 비-제한적인 정렬들 중 하나로부터 선택되는 정렬을 가진 세포질 도메인을 포함한다:

[0078] [CD3 ζ];

[0079] [CD2]-[CD3 ζ];

[0080] [41BB]-[CD3 ζ];

[0081] [OX40]-[CD3 ζ]; 또는

[0082] [41BB]-[OX40]-[CD3 ζ]

[0083] 일부 구현예에서, 전술한 예시적인 비-제한적인 정렬은 좌에서 우측으로, CAR의 N-말단에서 C-말단 방향이다. 일부 구현예에서, 각각의 "-["는 선택적인 스페이서 서열의 존재를 나타낸다.

[0084] 일 측면에서, 본 발명의 CAR의 항-BCMA 결합 도메인, 예를 들어, 인간 또는 인간화된 scFv 영역은 포유류 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 서열을 가진 전이유전자에 의해 코딩된다. 일 측면에서, 본 발명의 전체 CAR 구조체는 전체 서열이 포유류 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 전이유전자에 의해 코딩된다. 코돈 최적화는, 코딩 DNA에서 동의 코돈 (synonymous codon)(즉, 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈)의 출현 빈도가 여러 종들에서 편향성이 있다는 발견 사실을 참조한다. 이러한 코돈 축적되는 동일한 폴리펩타이드를 다양한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩가능하게 해준다. 다양한 코돈 최적화 방법들이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 적어도 미국 특허 5,786,464 및 6,114,148에 기술된 방법을 포함한다.

[0085] 본 발명은 본 발명에 제공된 임의의 분자 (예를 들어, 항-BCMA 결합 단백질, scFv, CAR 및 RNA 구조체)를 코딩하는 핵산 서열을 제공하며, 이는 예를 들어 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리 스크리닝에 의해, 이를 함유한 것으로 공지된 벡터로부터 유전자를 수득함으로써, 또는 표준 기법을 이용해 이를 함유한 세포 및 조직

으로부터 직접 단리함으로써와 같이, 당해 기술 분야에 공지된 재조합 방법을 이용해 수득할 수 있다. 대안적으로, 대상 핵산은 클로닝보다는 합성에 의해 제조할 수 있다.

[0086] 본 발명은 세포에 직접 형질도입될 수 있는 CAR 발현성 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 구조체를 추가로 포함한다.

[0087] 또한, 본 발명은 세포를 직접 형질감염시킬 수 있는 RNA 구조체를 함유한다. 형질감염에 이용하기 위한 mRNA를 구축하는 한가지 방법은 주형을 특수 설계된 프라이머를 사용해 시험관내 전사 (IVT)한 다음, 선택적으로, 폴리 A를 부가하여, 3' 및 5' 비번역 서열 ("UTR"), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 도입부 (IRES), 발현시킬 핵산 및 폴리 A 꼬리를 함유한 구조체, 전형적으로 염기 50-2000개 길이를 제조하는 것을 수반하며, 보다 상세한 내용은 아래에서 기술된다. 이렇게 제조된 RNA는 여러 종류의 세포에 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 일 구현예에서, 주형은 CAR 서열을 함유한다. 일 구현예에서, RNA CAR 벡터는 세포, 예를 들어 T 세포 또는 NK 세포에 전기천공에 의해 형질도입된다.

[0088] 항-BCMA 결합 도메인

[0089] 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 CAR은 항-B 세포 성숙화 항원 (BCMA) 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 CAR은, 다른 공지된 항-BCMA 결합 도메인, 예를 들어 Ali *et al.* (2016)의 임상 실험에서 사용된, 즉 서열번호 19의, CAR 유래된 항-BCMA 결합 도메인보다 더 높은 친화성으로 BCMA에 결합할 수 있는 BCMA 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 임의의 CAR은 종양 세포 상의 BCMA 항원에 특이적으로 결합하는 바람직한 BCMA 결합 모이어티를 조작하는 방법에 의해 대상 종양 항원을 표적화하도록 조작할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 본 발명에 기술된 임의의 CAR의 막관통 도메인 및/또는 세포내 도메인에 대해 N-말단에 위치한다.

[0090] BCMA 결합 도메인은, 비-제한적으로, 단일클론 항체, scFv, 다클론 항체, 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체 및 이들의 항원 결합성 (예를 들어, BCMA-결합성) 단편 등의 BCMA에 결합하는 임의의 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA 결합 도메인은 인간화 (예를 들어, 부분 인간화 또는 완전 인간화)되는 것이 유익하다. 일부 경우에, BCMA 결합 도메인은 CAR이 궁극적으로 사용될 동일한 종으로부터 유래하는 것이 유익하다. 예를 들어, 인간에서 사용하는 경우, CAR의 BCMA 결합 도메인은 인간 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것이 유익할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, BCMA 결합 도메인 영역은 인간 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 인간에서 항체를 생체내 사용하는 경우, 인간 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 완전한 인간 항체는 특히 인간 개체를 치료학적으로 치료하는데 바람직하다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 방법 등의 이들 기술에 대한 개선을 포함한 당해 기술 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조할 수 있다. 또한, 미국 특허 4,444,887 및 4,716,111; PCT 공개공보 WO 98/46645, WO98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO91/10741을 참조하며; 이들 각각의 내용은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 인간 항체는 또한 중쇄 및 경쇄가 하나 이상의 인간 DNA 소스로부터 유래된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 항체일 수 있다. 인간 항체 또는 인간화된 항체는 또한 기능성의 내인성 면역글로불린을 발현하지 못하지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 형질전환 마우스를 이용해 생산할 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체는 무작위로 또는 상동적인 재조합에 의해 마우스 배아 줄기 세포에 도입할 수 있다. 대안적으로, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자와 더불어, 인간 가변부, 불변부 및 다양성 영역을 마우스 배아 줄기 세포에 도입할 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동적인 재조합에 의한 인간 면역글로불린 유전자 좌의 도입과 동시에 또는 별개로 비-기능성이 될 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (JH)의 동형접합 결손시 내인성 항체 생산이 완전히 저해되는 것으로 기술된 바 있다. 변형된 배아 줄기 세포는 증식시켜 배반포에 미세주입하여, 키메라 마우스를 생산한다. 그런 후, 키메라 마우스를 교배하여, 인간 항체를 발현하는 동형접합 자손을 생산한다. 형질전환 마우스는 선택 항체, 예를 들어 본 발명의 폴리펩타이드 전체 또는 일부로 정상적인 방식으로 면역화한다.

[0091] 일 측면에서, 항-BCMA 결합 도메인은 단편, 예를 들어, 항-BCMA 항체로부터 유래된 단쇄 가변성 단편 (scFv) 또는 단편이다. 일 측면에서, 항-BCMA 결합 도메인은 Fv, Fab, (Fab')₂, 또는 2중 기능성 (예, 2중 특이성) 하이브리드 항체 (예를 들어, Lanzavecchia *et al.*, Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))이다. 일 측면에서, 본 발명의 항체 및 이의 단편은 야생형 또는 강화된 친화성으로 BCMA 단백질에 결합한다.

[0092] 일부 경우에, scFv는 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다 (예, Bird *et al.*, (1988) Science 242:423-426 및 Huston *et al.*, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). ScFv 분자는 플렉서블 폴

리펩타이드 링커를 사용해 VH와 VL 영역을 연결함으로써 만들 수 있다. scFv 분자는 최적화된 길이 및/또는 아미노산 조성을 가진 링커 (예를 들어, Ser-Gly 링커)를 포함한다. 링커 길이는 scFv의 가변부가 접히는 (folding) 방식과 상호작용하는 방식에 크게 영향을 미칠 수 있다. 실제, 짧은 폴리펩타이드 링커 (예, 아미노산 5-10개)가 사용된다면, 쇠내 접힘이 방지된다. 또한, 2개의 가변부를 근접시켜 기능성 에피토프 결합부를 형성하기 위해 쇠내 접힘이 필요하다. 링커 방향성 및 크기에 대한 예는, 예를 들어, Hollinger *et al.* 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 및 PCT 공개번호 WO2006/020258 및 WO2007/024715를 참조하며, 이들 문헌 각각의 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0093] scFv는 자체 VH와 VL 영역 사이에 아미노산 잔기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 보다 많은 개수로 된 링커를 포함할 수 있다. 링커 서열은 임의의 자연 생성 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 아미노산 글리신과 세린을 포함한다. 다른 구현예에서, 링커 서열은 글리신과 세린 반복체 세트, 예를 들어 (Gly₄Ser)_n을 포함하며, 여기서 n은 1 이상의 양수이다 (서열번호 131). 일 구현예에서, 링커는 (Gly₄Ser)₄ (서열번호 132) 또는 (Gly₄Ser)₃ (서열번호 133)일 수 있다. 일부 구현예에서, scFv는 GSTSGSGKPGSGEGSTKG (서열번호 108) 또는 GSTSGSGKPGSGEGSTKSGGGSGGG (서열번호 109)의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 108 또는 109의 아미노산 서열을 포함하는 링커를 포함한다.

[0094] 항원 (예를 들어, BCMA)에 대한 항체는 통상적인 하이브리도마 기법을 이용해 면역화된 형질전환 마우스로부터 수득할 수 있다. 형질전환 마우스가 보유한 인간 면역글로불린 전이유전자는 B 세포 분화 중에 재정렬하며, 이후 클래스 스위칭 및 체세포 돌연변이를 거치게 된다. 따라서, 이러한 기법을 이용해, 치료학적으로 유용한, 비-제한적으로, IgG1 (gamma 1) 및 IgG3 등의, IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 제조하는 것이 가능하다. 인간 항체 및 인간 단일클론 항체를 제조하기 위한 이러한 기술과 이러한 항체를 제조하는 프로토콜에 대한 상세한 내용은, 예를 들어, PCT 공개번호 WO2014/055771, WO 98/24893, WO 96/34096 및 WO 96/33735; 미국 특허 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 및 5,939,598을 참조하며, 이들 문헌들 각각은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. "인간화된" 항체는 오리지널 항체와 비슷한 항원 특이성을, 즉 본 발명에서 예를 들어 BCMA에 결합하는 능력을 유지한다.

[0095] 일부 구현예에서, 항체 (예를 들어, BCMA 결합 도메인을 제조하기 위해 사용된 항체)는, 각각 약 25 kDa의 경(L)쇄 2개와 각각 약 50 kDa의 중(H)쇄 2개로 구성된, 테트라머 당화된 단백질이다. 램다 및 카파로 지칭되는 경쇄의 2가지 유형이 항체에서 발견할 수 있다. 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 5가지 주 클래스 A, D, E, G 및 M으로 분류할 수 있으며, 이들 중 몇가지는 하위 클래스(이소형)로, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더욱 세분될 수 있다. 각각의 경쇄는 전형적으로 N-말단 가변성 (V) 도메인 (VL)과 불변 (C) 도메인 (CL)을 함유한다. 각각의 중쇄는 전형적으로 N-말단 V 도메인 (VH), 3개 또는 4개의 C 도메인 (CH1-3) 및 힌지부를 함유한다. VH에 가장 가까이 위치한 CH 도메인은 CH1으로 명명된다. VH 도메인과 VL 도메인은, 과가변성 서열 (상보성 결정부, CDR)로 된 3개의 영역에 대한 스캐폴드를 형성하는, 프레임워크 영역으로 지칭되는 상대적으로 보존된 서열들로 된 4개의 영역들 (FR1, FR2, FR3 및 FR4)로 구성된다. CDR들은 항체와 항원의 특이적인 상호작용을 담당하는 잔기들 대부분을 함유한다. CDR들은 CDR1, CDR2 및 CDR3로 지칭된다. 즉, 중쇄 상의 CDR 구성 요소들은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3로 지칭되는 반면 경쇄 상의 CDR 구성 요소들은 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3로 지칭된다. CDR들은 전형적으로 Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat *et al.*에 기술된 바와 같이, Kabat CDR을 참조한다. 항원 결합부를 특정하는 또 다른 표준은 Chothia에 의해 기술된 과가변성 루프를 참조하는 것이다. 예를 들어, Chothia, D. *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817; 및 Tomlinson *et al.* (1995) EMBO J. 14:4628-4638을 참조한다. 또 다른 표준은 Oxford Molecular's AbM antibody modeling software에서 사용되는 AbM 정의이다. 일반적으로, 예를 들어, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S, and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)을 참조한다. Kabat CDR에 관하여 기술된 구현예들은 대안적으로 Chothia 과가변성 루프 또는 AbM-정의된 루프 또는 이들 방법들의 임의의 조합과 관련하여 유사하게 기술된 관례로 구현될 수 있다.

[0096] 본 발명에 제공된 CAR T 세포는 더 높은 친화성으로 BCMA에 결합할 수 있으며, 및/또는 당해 기술 분야에 공지된 다른 CAR T 세포에 비해, 예를 들어 Ali *et al.* (2016)의 임상 실험에 사용된 CAR T 세포, 즉, 서열번호 19의 CAR에 비해 더 효과적으로 BCMA 발현 세포 (예, 골수종 세포)를 사멸시킨다. 일부 구현예에서, 본 발명에 제

공된 항-BCMA 결합 도메인은 BCMA에 대한 다른 항-BCMA 결합 도메인, 예를 들어, 예를 들어 Ali *et al.* (2016)의 임상 실험에 사용된 CAR로부터 유래된, 즉, 서열번호 19의 BCMA 결합 도메인의 친화성보다 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 140%, 160%, 180%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 또는 1,000% 높은 친화성으로 BCMA에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 항-BCMA 결합 도메인은, T 세포 상에 발현된 CAR에 포함된 경우, 다른 항-BCMA CAR, 예를 들어, 예를 들어 Ali *et al.* (2016)의 임상 실험에 사용된 CAR, 즉, 서열번호 19의 CAR보다 더 효율적으로 (예, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 140%, 160%, 180%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 또는 1,000% 더 효율적으로) 암 세포를 사멸시킬 수 있다. 항-BCMA 결합 도메인에 사용되는 CDR 서열의 예를 하기에 제시한다. 참조 CDR 서열 (즉, 서열번호 1, 4, 7, 10, 12 및 16)과 상이한 아미노산 잔기는 진하게 밑줄로 표시한다.

- [0097] CDRH1:
- [0098] DYSIN (서열번호 1); SYSIN (서열번호 2); SYDIN (서열번호 3)
- [0099] CDRH2:
- [0100] WINTETREPAYAYDFRG (서열번호 4); WINTNTGNPTYAQGFTG (서열번호 5); WINTETREPAYAQGFTG (서열번호 6)
- [0101] CDRH3:
- [0102] DYSYAMDY (서열번호 7); DYTYGMDY (서열번호 8); DYLYSLDF (서열번호 9)
- [0103] CDRL1:
- [0104] RASESVTILGSHLIH (서열번호 10); RASESVSFLGINLIH (서열번호 11)
- [0105] CDRL2:
- [0106] QLASNVQT (서열번호 12); YLASNLET (서열번호 13); YSASNLQS (서열번호 14); NLASNVNT (서열번호 15)
- [0107] CDRL3:
- [0108] LQSRTIPRT (서열번호 16); LQSRTLPRT (서열번호 17); LQSKNFPRT (서열번호 18)
- [0109] 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 17 및 18 중 어느 하나로부터 선택되는 하나 이상의 (예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR 서열) CDR 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 1-3 중 어느 하나의 CDRH1 아미노산 서열 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 4-6 중 어느 하나의 CDRH2 아미노산 서열 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 7-9 중 어느 하나의 CDRH3 아미노산 서열 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 10-11 중 어느 하나의 CDRL1 아미노산 서열 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 12-15 중 어느 하나의 CDRL2 아미노산 서열 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 16-18 중 어느 하나의 CDRL3 아미노산 서열 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 8 또는 9의 CDRH3를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 17 또는 18의 CDRL3를 포함한다.
- [0110] 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은, 표 1에 나타난 scFv 클론들 중 어느 하나에 제공된 바와 같이, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 표 1에 나타난 scFv 클론들 중 어느 하나의 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함한다. 또한, 본 발명은 표 1에 나타난 scFv 클론들 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같이, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3를 포함하는 분자를 코딩하는 임의의 핵산 서열을 함유한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인들은 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화성에 특히 중요한 역할을 수행할 수 있다. 이에, 본 발명의 항-BCMA 결합 도메인은 적어도 표 1에 나타난 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3를 함유할 수 있다. 본 발명의 측면은 BCMA 단백질 (예를 들어, 종양 세포 상의 BCMA 단백질)에 결합하며 6개의 상보성 결정부 (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함하는 항-BCMA 결합 도메인에 관한 것이다.

표 1

[0111]

새로운 scFv	모 프레임워크 서열번호	CDRH 1 서열번호	CDRH 2 서열번호	CDRH 3 서열번호	CDRL 1 서열번호	CDRL 2 서열번호	CDRL 3 서열번호
R1	48	1	4	7	10	12	16
Y32	57	1	4	7	10	12	16
Y37	60	1	4	7	10	12	16
1'	57	3*	4	7	10	12	16
4'	57	1	4	8*	10	12	16
8'	57	1	4	7	11*	14*	17*
9'	57	1	4	7	11*	14*	18*
10'	57	2*	6*	9*	10	12	16
11'	57	3*	5*	8*	10	12	16
12'	57	3*	4	9*	10	12	18*
13'	57	2*	6*	9*	11*	13*	17*
21'	57	1	4	7	10	15*	16
K'	60	2*	6*	9*	11*	14*	17*
R'	60	2*	6*	9*	11*	14*	17*
J'	60	2*	6*	9*	11*	14*	18*
L'	60	2*	6*	9*	11*	14*	18*
O'	60	1	4	8*	10	15*	17*
S'	60	1	4	8*	10	15*	17*

[0112]

표 1 - 본 발명에 제공된 CAR에 사용되는 각각의 scFv에 대한 CDR 서열들 (CDRH 1-3 및 CDRL 1-3)의 조합. 각각의 scFv에 사용된 모 프레임워크 영역은 또한 표시된 서열번호의 모 프레임워크에 의해 표시된다. 각각의 CDR은 서열번호로 표시된다. "*"가 표시된 서열번호는 서열번호 1, 4, 7, 10, 12 및 16의 참조 CDR 서열과 상이한 것이다.

[0113]

일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 6개의 상보성 결정부 (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 순서로 나열된 아래 CDR 그룹들 중 어느 하나를 포함한다:

[0114]

서열번호 3, 4, 7, 10, 12 및 16;

[0115]

서열번호 1, 4, 8, 10, 12 및 16;

[0116]

서열번호 1, 4, 7, 11, 14 및 17;

[0117]

서열번호 1, 4, 7, 11, 14 및 18;

[0118]

서열번호 2, 6, 9, 10, 12 및 16;

[0119]

서열번호 3, 5, 8, 10, 12 및 16;

[0120]

서열번호 3, 4, 9, 10, 12 및 18;

[0121]

서열번호 2, 6, 9, 11, 13 및 17;

[0122]

서열번호 1, 4, 7, 10, 15 및 16;

[0123]

서열번호 2, 6, 9, 11, 14 및 17;

[0124]

서열번호 2, 6, 9, 11, 14 및 18;

[0125]

서열번호 1, 4, 8, 10, 15 및 17; 및

[0126]

서열번호 1, 4, 7, 10, 12 및 16.

[0127]

본 발명은 보존적인 돌연변이를 1, 2 또는 3개 가지지만 3개를 초과하지 않는 본 발명에 제공된 CDR 서열들 (예, 서열번호 1-18) 중 어느 하나를 고려하는 것으로 이해되어야 한다. 이에, 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 CDR 서열, 즉 CDH1, CDH2, CDH3, CDL1, CDL2 또는 CDL3 중 어느 하나, 본 발명에 제공된 CDR 서열

은 보존적인 돌연변이를 1, 2 또는 3개 포함할 수 있다. 본 발명에서, "보존적인 아미노산 치환"은 아미노산 치환이 이루어진 단백질의 상대적인 전하 또는 크기 특징을 바꾸지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 변이체는 방법들이 수록된 참조문헌, 예를 들어 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, *et al.*, eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 또는 *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York에서 확인되는 방법과 같이 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 폴리펩타이드 서열을 변형하는 방법에 따라 제조할 수 있다. 아미노산의 보존적인 치환은 다음과 같은 군에 속하는 아미노산들에서 수행된 치환을 포함한다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D.

[0128] 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 중쇄 가변성 도메인 및/또는 경쇄 가변성 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 48-72 중 어느 하나의 scFv로부터 유래된 중쇄 가변성 도메인 프레임워크 서열과 적어도 75% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%) 동일한 중쇄 가변성 도메인 프레임워크, 또는 서열번호 48-72 중 어느 하나의 scFv로부터 유래된 경쇄 가변성 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상동적인 중쇄 가변성 도메인 프레임워크 서열 및/또는 경쇄 가변성 도메인 프레임워크 서열은 본 발명에 제공된 CDR 서열들 중 임의의 서열에서 달라지지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 서열 변화 수준 (예를 들어, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%)은 본 발명에 제공된 CDR 서열들 중 임의의 서열을 제외한, 중쇄 가변성 서열 및/또는 경쇄 가변성 서열내에서 이루어질 수 있다. 하기 제공된 scFv 아미노산 서열 (서열번호 48-72)에서, 중쇄 가변성 서열은 진하게 표시되고, 경쇄 가변성 서열은 이탤릭체로 표시되고, 링커 서열은 밀줄로 표시된다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 가변성 중쇄 (VH)와 가변성 경쇄 (VL)로 형성된 단쇄 가변성 단편 (scFv)을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-BCMA 결합 도메인은 서열번호 48-72 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0129] 2개의 아미노산 서열의 "동일성 %"는 Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77, 1993에서와 같이 수정된, Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68, 1990의 알고리즘을 이용해 결정한다. 이러한 알고리즘은 Altschul, *et al.* *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990의 BLAST 및 XBLAST 프로그램 (version 2.0)에 통합되어 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 워드 길이=3로 수행하여, 대상 단백질 분자에 상동적인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 2종의 서열 사이에 갭이 존재하는 경우, Gapped BLAST를 Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997에 기술된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 경우, 각 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 이용할 수 있다.

[0130] scFv - R1

[0131] DIVLTQSPPSLMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETS
ASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGSVTVSS (서열번호 48)

[0132] scFv - J1

[0133] DIVMTQSPDSLVSLSGERATINCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPLLLIQLASNVQTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTVKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYSINWVRQAPGQGLEWMGWINTETREPAYAYDFRGRVTMTDTS
ASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMDYWGQGS�TVSS (서열번호 49)

[0134] scFv - J2

[0135] DIVLTQSPASLAVSLGERATISCRASESVSILGSHLLHWYQQKPGQPPLLLIYLASNLQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GQGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYSINWVRQAPGQGLEWMGWINTETREPAYAYDFRGRVTMTDTS
ASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMDYWGQGS�TVSS (서열번호 50)

[0136] scFv - J3

[0137] DIVLTQSPASLAVSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPLLLIYLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GQGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYSINWVRQAPGQGLEWMGWINTETREPAYAYDFRGRVTMTDTS
ASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMDYWGQGS�TVSS (서열번호 51)

[0138] scFv - J4

[0139] DIVMTQSPDSLVSLSGERATINCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPLLLIQLASNVQTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQSRTIPRTF

GGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGAEVKKPGESVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGGGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLDTS
ASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 52)

[0140] scFv - J5

[0141] DIVLTQSPASLAVSLGERATISCRASESVSILGSHYLAWYQQKPGQPPKLLIYLASNLTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDVAVYYCQQRTPRTF
GGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGAEVKKPGESVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGGGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLDTS
ASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 53)

[0142] scFv - Yi1

[0143] DIVLTQSPSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPDDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSLDTS
KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 54)

[0144] scFv - Yi2

[0145] DIQLTQSPSSLASVGDRAITITCRASQSVTILGSHLIHWYQQKPGKAPKLLIQLASNVQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLQSRTIPRTF
GGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGGGLVQPGRSVKLSAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTISRDT
KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 55)

[0146] scFv - Y31

[0147] DIVLTQSPSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTS
KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 56)

[0148] scFv - Y32

[0149] DIVLTQSPSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTS
KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 57)

[0150] scFv - Y33

[0151] DIVLTQSPSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVESGAEVKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSLDTS
KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 58)

[0152] scFv - Y34

[0153] DIVLTQSPSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVESGAEVKKPGGSVKVSKASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFAISAETS
KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 59)

[0154] scFv - Y37

[0155] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDTANYYYCLQSRTIPRTF
GGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTS
KSMAYLQINSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 60)

[0156] scFv - CAS2 (C2)

[0157] DIVLTQSPASLAVSPGQRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTISSLEPEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQITLKESGPTLVKPTQTLTLCKASGYTFTDYSINWVRAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFVSLDTS
VSMAYLQISSLKAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 61)

[0158] scFv - 1'

[0159] DIVLTQSPSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYDINWVRQAPGKGLWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTS
KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 62)

- [0160] scFv - 4'
- [0161] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYTYGMDYWGQGLTVTVSS* (서열번호 63)
- [0162] scFv - 8'
- [0163] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQAPKLLIYSASNLQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTLPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS* (서열번호 64)
- [0164] scFv - 9'
- [0165] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQAPKLLIYSASNLQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSKNFPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS* (서열번호 65)
- [0166] scFv - 10'
- [0167] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYLDSLDFWGQGLTVTVSS* (서열번호 66)
- [0168] scFv - 11'
- [0169] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYDINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYTYGMDYWGQGLTVTVSS* (서열번호 67)
- [0170] scFv - 12'
- [0171] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSKNFPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYDINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYLDSLDFWGQGLTVTVSS* (서열번호 68)
- [0172] scFv - 13'
- [0173] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQAPKLLIYLSANLETGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTLPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYLDSLDFWGQGLTVTVSS* (서열번호 69)
- [0174] scFv - 21'
- [0175] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLINLASNVNTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS* (서열번호 70)
- [0176] scFv - 2'
- [0177] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTLPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS* (서열번호 71)
- [0178] scFv - 3'
- [0179] *DIVLTQSPSSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDVAVYYCLQSRTLPRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQGIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSS* (서열번호 72)
- [0180] 리더 도메인
- [0181] 일부 구현예에서, CAR은 번역된 키메라 단백질을 막으로 향하게 하기 위해 리더 도메인 ("신호 펩타이드"로도

언급됨)이 첨가된 형태로 설계된다. 일부 구현예에서, CAR은 CAR 단백질의 아미노-말단 (N-ter)에 리더 서열을 포함한다. 일 측면에서, CAR은 세포외 BCMA 결합 도메인의 N-말단에 리더 서열을 더 포함하며, 이러한 리더 서열은 CAR이 세포에서 가공되어 세포 막으로 위치되는 동안에 BCMA 결합 도메인 (예, scFv)로부터 선택적으로 절단된다. 리더 도메인은 일반적으로 아미노산 15-30개 범위이다. 리더 도메인에 대한 예로는 CD8a 리더 (아미노산 21개), CD33 리더 (아미노산 17개), CD4 리더 (아미노산 25개), IL-2R (CD25) 리더 (아미노산 21개), 트립 시노젠-2 리더 (아미노산 15개), VEGFR1 리더 (아미노산 26개), EGFR 리더 (아미노산 24개), GMCSFR 리더 (아미노산 22개), IgVL 리더, IgVK 리더 또는 Ig VH 리더 등이 있다. 일부 구현예에서, 리더 서열은 본 발명에 제공된 임의의 리더 도메인에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 것이다. 일부 구현예에서, 리더 서열은 아미노산 서열 MALPVTALLPLALLHAARP (서열번호 110)에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 것이다. 일부 구현예에서, 리더 서열은 서열번호 110의 아미노산 서열을 포함한다.

[0182] 막관통 및 힌지 도메인

[0183] 막관통 도메인과 관련하여, 다양한 구현예들에서, CAR은 CAR의 세포외 도메인에 부착된 막관통 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 막관통 도메인은 막관통 영역에 인접한 하나 이상의 부가적인 아미노산, 예를 들어 막관통 도메인이 유래된 단백질의 세포외 영역과 관련한 하나 이상의 아미노산 (예를 들어, 세포외 영역의 아미노산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개에서 최대 15개) 및/또는 막관통 단백질이 유래된 단백질의 세포내 영역과 관련한 하나 이상의 부가적인 아미노산 (예를 들어, 세포내 영역의 아미노산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개에서 최대 15개)을 함유할 수 있다. 일 측면에서, 막관통 도메인은 사용되는 CAR의 다른 도메인들 중 하나와 연관된 것이다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 동일한 또는 다른 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 이 도메인이 결합하는 것을 방지하도록, 예를 들어 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하도록 선택되거나 또는 이를 위해 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다. 일 측면에서, 막관통 도메인은 CAR-발현성 세포, 예를 들어 CAR T 세포 표면 상의 다른 CAR과 동형이량화될 수 있다. 다른 측면에서, 막관통 도메인의 아미노산 서열은 동일한 CAR-발현 세포, 예를 들어 CAR T 세포에 존재하는 본래의 결합 파트너의 결합 도메인과의 상호작용을 최소화하도록 변형되거나 또는 치환될 수 있다.

[0184] 막관통 도메인은 천연 소스로부터 또는 재조합 소스로부터 유래할 수 있다. 소스가 천연적인 경우, 도메인은 임의의 막-결합된 또는 막관통 단백질로부터 유래할 수 있다. 일 측면에서, 막관통 도메인은 CAR이 표적에 결합할 때마다 세포내 도메인(들)에 신호를 전달할 수 있다. 본 발명에서 구체적으로 사용되는 막관통 도메인은 적어도 예를 들어 T 세포 수용체, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8 (예를 들어, CD8 alpha, CD8 beta), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 알파, 베타 또는 제타 쇄의 막관통 영역(들)을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 적어도 공동-자극 분자, 예를 들어 MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체 단백질, 면역글로불린-유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호전달성 림프구 활성화 분자 (SLAM 단백질), 활성화 NK 세포 수용체, BTLA, Toll 리간드 수용체, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alpha, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alpha, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드의 막관통 영역(들)을 함유할 수 있다. 막관통 도메인은 당해 기술 분야에 공지되거나 또는 본 발명에 언급된 임의의 방법을 이용해, 예를 들어 UniProt 데이터베이스를 이용함으로써 동정할 수 있다.

[0185] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 합성 도메인일 수 있으며, 이 경우, 이는 루신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 현저하게 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린으로 구성된 트리펩타이드 합성 막관통 도메인의 양쪽 말단에서 발견될 것이다. 선택적으로, 짧은 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드 링커, 예를 들어, 아미노산 2-10개 길이의 링커가 CAR의 막관통 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이에 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 더블렛은 예시적인 적합한 링커를 제공해준다.

[0186] 일부 구현예에서, 본 발명의 CAR에서 막관통 도메인은 CD8 막관통 도메인이다. 이러한 목적에서 CD8의 서열은 PCT 공개번호 WO2014/055771에 기술되어 있으며, 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 일부 구현예에서,

CAR에서 막관통 도메인은 CD8a 막관통 도메인이다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 아미노산 서열 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (서열번호 118), IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (서열번호 120), 또는 이와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 막관통 도메인의 일부는 세포외 또는 세포질에 존재할 수 있으며, 예를 들어, 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 LYCNHRN (서열번호 119)의 아미노산을 포함하는 세포질 영역을 포함하는 것으로 이해하여야 한다.

[0187] 일부 구현예에서, 본 발명의 CAR에서 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 전장 막관통 도메인 또는 이의 일부가 세포질 도메인 또는 이의 일부와 함께 구현되는 것으로 이해할 것이다. 전형적으로, 사용되는 막관통 도메인 및 세포질 도메인은 CD28 서열의 인접 영역들일 것이다. 일부 구현예에서, CD28 막관통 도메인은 그 서열을 포함하는 CAR을 세포 막에 고정할 수 있는 단편 또는 이의 일부를 포함한다.

[0188] 일부 경우에, 막관통 도메인은 CAR의 세포외 영역, 예를 들어 CAR의 항원 결합 도메인에 힌지, 예를 들어 인간 단백질로부터 유래된 힌지를 통해 부착된다. 예를 들어, 일 구현예에서, 힌지는 인간 Ig (면역글로불린) 힌지, 예를 들어, IgG4 힌지 또는 CD8a 힌지일 수 있다. 일 구현예에서, 힌지 또는 스페이서는 FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열번호 117)의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다 (예, 이로 구성된다). 일 측면에서, 막관통 및 힌지 도메인은 FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (서열번호 111) 서열을 포함한다 (예, 이로 구성된다).

[0189] 세포질 도메인

[0190] 본 발명의 일부 측면은 세포질 도메인 (세포내 도메인 또는 세포내 신호전달 도메인으로도 지칭됨)을 가진 CAR을 제공한다. 본 발명의 CAR의 세포질 도메인 또는 영역은 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 세포내 신호전달 도메인은 일반적으로 CAR이 도입된 면역 세포의 정상적인 작동자 기능 하나 이상의 활성화를 담당한다. 일부 구현예에서, CAR의 세포질 도메인은 CAR이 도입된 면역 세포의 하나 이상의 정상적인 작동자 기능의 활성화를 담당한다. 용어 "작동자 기능"은 세포의 특화된 기능을 지칭한다. T 세포의 작동자 기능은 예를 들어 사이토카인의 분비를 비롯한 세포분해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 작동자 기능 신호를 변환하여 세포가 특화된 기능을 수행하게 지시하는 단백질의 일부분을 지칭한다. 통상적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 다수의 경우에 전체 도메인을 반드시 사용하여야 하는 것은 아니다. 세포내 신호전달 도메인의 잘린 영역이 사용되는 정도로, 이러한 잘린 영역이 작동자 기능 신호를 변환하는 한 온전한 도메인 대신 이용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 따라서 작동자 기능 신호를 변환하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 잘린 영역을 함유하는 것을 의미한다.

[0191] 본 발명의 CAR에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인에 대한 예로는 T 세포 수용체 (TCR) 및 항원 수용체에 결합한 후 신호 전달을 개시하기 위해 협력하여 작용하는 공동-수용체의 세포질 서열 뿐 아니라 이들 서열에 대한 임의의 유도체 또는 변이체, 및 동일한 기능적 역량을 가진 임의의 재조합 서열 등이 있다.

[0192] TCR 단편을 통해 생성된 신호는 T 세포를 완전히 활성화하기에는 불충분하고, 2차적인 및/또는 공동 자극 신호가 또한 필요한 것으로 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화는 2개의 구분되는 클래스의 세포질 신호전달 서열에 의해 매개되는 것으로 볼 수 있다: TCR을 통한 항원-의존적인 1차 활성화를 개시하는 것 (1차 세포내 신호전달 도메인) 및 2차적인 또는 공동 자극 신호를 제공하기 위해 항원-독립적인 방식으로 작용하는 것 (이차 세포질 도메인, 예를 들어, 공동-자극 도메인).

[0193] 1차 신호전달 도메인은 TCR 복합체의 1차 활성화를 자극 방식으로 또는 저해 방식으로 제어한다. 자극 방식으로 작동하는 1차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반의 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 특정 신호전달 모티프일 수 있다.

[0194] 본 발명에서 특히 사용되는 1차 세포내 신호전달 도메인을 함유한 ITAM의 예로는 TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"라고도 함), Fc.epsilon.RI, DAP10, DAP12 및 CD66d의 ITAM 등이 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 CAR은 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 CD3ζ의 1차 신호전달 도메인을 포함한다. CD3ζ 신호전달 도메인의 예는 아래에 제공된다.

[0195] 일 구현예에서, 1차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM 도메인, 예를 들어, 본래의 ITAM 도메인과 비교해 활성이 변이된 (예, 증가 또는 감소된) 돌연변이된 ITAM 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 1차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM을 함유한 1차 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어, 최적화된 및/또는 잘린 형태의 ITAM-함유성 1차

세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 1차 신호전달 도메인은 ITAM 모티프를 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상 포함한다. 1차 세포내 신호전달 도메인을 함유한 분자에 대한 추가적인 예로는, DAP10, DAP12 및 CD32의 1차 세포내 신호전달 도메인 등이 있다.

[0196] CAR의 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인, 예를 들어, CD3-zeta 신호전달 도메인 자체를 포함할 수 있거나, 또는 본 발명의 CAR 상황에서 이용가능한 임의의 다른 바람직한 세포내 신호전달 도메인(들)과 조합될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인, 예를 들어, CD3 zeta 채 영역 및 하나 이상의 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 공동-자극성 신호전달 도메인은 공동-자극성 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부분을 지칭한다. 공동-자극성 분자는 항원에 대한 림프구의 효과적인 반응을 위해 필요한 항원 수용체 또는 이의 리간드 이외의 다른 세포 표면 분자이다. 이러한 분자에 대한 예로는 MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체 단백질, 면역글로불린-유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호전달성 림프구 활성화 분자 (SLAM 단백질), 활성화 NK 세포 수용체, BTLA, Toll 리간드 수용체, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFTR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alpha, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alpha, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드 등이 있다. 예를 들어, CD27 공동 자극은 인간 CAR T 세포의 시험관내 증폭, 작동자 기능 및 생존을 강화하고 인간 T 세포의 지속성 (persistence) 및 항-종양 활성을 생체내에서 증강하는 것으로 입증된 바 있다 (Song *et al.* Blood. 2012; 119(3):696-706). 본 발명의 CAR의 세포질 영역내 세포내 신호전달 서열은 무작위로 또는 특정한 순서로 서로 연결될 수 있다. 선택적으로, 짧은, 예를 들어 아미노산 2-10개 (예를 들어, 아미노산 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개) 길이의 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드 링커가 세포내 신호전달 서열 간에 연결을 형성할 수 있다. 일 구현예에서, 글리신-세린 더블렛을 적절한 링커로 사용할 수 있다. 일 구현예에서, 신호 아미노산, 예를 들어, 알라닌, 글리신을 적절한 링커로 사용할 수 있다.

[0197] 일 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그보다 많은 수의 공동 자극성 신호전달 도메인들을 포함하도록 설계된다. 공동-자극 도메인의 예는 아래에 제공된다. 일 구현예에서, 2개 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 공동 자극성 신호전달 도메인이 링커 분자에 의해, 예를 들어 본 발명에 기술된 링커 분자에 의해 이격되어 배치된다. 일 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동 자극성 신호전달 도메인 2개를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 분자는 글리신 잔기이다. 일부 구현예에서, 링커는 알라닌 잔기이다.

[0198] 예시적인 CD3 ζ 신호전달 도메인:

[0199] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMGGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 107)

[0200] 예시적인 공동-자극 도메인:

[0201] CD28

[0202] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열번호 100)

[0203] 41BB

[0204] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열번호 101)

[0205] OX40

[0206] RRDQRLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKI (서열번호 102)

[0207] 신호전달 도메인과 공동-자극 도메인의 조합의 예

[0208] CD28-CD3 ζ

[0209] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMGGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 108)

LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 103)

[0210] 41BB-CD3 ζ

[0211] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 104)

[0212] OX40-CD3 ζ

[0213] RRDQRLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 105)

[0214] 41BB-OX40-CD3 ζ

[0215] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRDQRLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 106)

[0216] CAR의 세포질 도메인은 CD3-zeta 신호 전달 도메인을 단독으로 포함하도록 설계될 수 있거나, 또는 본 발명의 CAR과 관련하여 이용가능한 임의의 다른 바람직한 세포질 도메인(들), 예를 들어 4-1BB 도메인, CD28 도메인 및/또는 OX40 도메인과 조합될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포질 도메인은 CD3 zeta쇄 부분과 공동 자극성 신호 전달 영역을 포함할 수 있다. 공동 자극성 신호전달 영역은 공동 자극성 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부분을 의미한다. 즉, 본 발명이 공동 자극성 또는 신호전달 인자(들)로서 주로 4-1BB, CD28 및 OX40을 예시하지만, 다른 부가적인 공동 자극성 또는 신호전달 인자들도 본 발명의 범위에 포함된다. 공동 자극성 및 세포내 도메인의 서열의 예는 본 발명에 제공된다. 그외 예시적인 4-1BB 공동-자극 도메인은 US 특허 공개번호 US20050113564에 기술되어 있으며, 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0217] 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 CAR은 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3 ζ 도메인은 인간으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, CD3 ζ 도메인은 서열번호 107의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3 ζ 도메인은 서열번호 107의 아미노산 서열을 포함한다.

[0218] 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 CAR은 하나 이상의 (예를 들어, 2, 3, 4 또는 5개의) 공동-자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 임의의 CAR은 CD28, 41BB 및/또는 OX40 공동-자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 공동-자극 도메인은 인간으로부터 유래한다. 일부 구현예에서, CAR은 서열번호 100-102 중 어느 하나에 따른 하나 이상의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 임의의 변이체를 포함한다. CAR의 세포질 도메인은 신호전달 도메인 및/또는 세포질 도메인의 임의 조합을 포함할 수 있는 것으로 이해하여야 한다. 예를 들어, 세포질 도메인은 다음과 같은 예시적인 도메인 조합들 중 임의의 것을 포함할 수 있다: CD28-CD3 ζ; 41BB-CD3 ζ; OX40-CD3 ζ; 또는 41BB-OX40-CD3 ζ. 일부 구현예에서, CAR의 세포질 도메인은 서열번호 103-106 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 임의의 변이체를 포함한다.

[0219] 예시적인 전장 CAR

[0220] 본 발명에 제공된 바와 같이, 본 발명은 항-BCMA 결합 도메인 (예를 들어, 본 발명에 기술된 바와 같은 인간 또는 인간화된 BCMA 결합 도메인), 막관통 도메인 및 세포질 도메인을 포함하는 CARx를 고려한다. 본 발명에 제공된 임의의 CAR은 본 발명에 기술된 도메인 또는 펩타이드의 임의 조합을 이용해 제조할 수 있으며, 예를 들어 CAR이 본 발명에 제공된 임의의 항-BCMA 결합 도메인, 막관통, 세포질 도메인, 신호 펩타이드 또는 힌지부를 포함할 수 있는 것으로 이해하여야 한다.

[0221] CAR-R1

[0222] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLMSLGRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYCYLQSRITPRTFGGGKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKMWGWINTEPREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGSTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열

번호 19)

[0223]

CAR-K'

[0224]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQPPKLLIYSASNLQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDTANYCYCLQSRITLPRITFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTSYINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSMAYLQINSLRAEDTAVYYCALDYLISLDFWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 20)

[0225]

CAR-R'

[0226]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQPPKLLIYSASNLQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDTANYCYCLQSRITLPRITFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTSYINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSMAYLQINSLRAEDTAVYYCALDYLISLDFWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열
번호 21)

[0227]

CAR-J'

[0228]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQPPKLLIYSASNLQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDTANYCYCLQSKNFPRTFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTSYINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSMAYLQINSLRAEDTAVYYCALDYLISLDFWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 22)

[0229]

CAR-L'

[0230]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQPPKLLIYSASNLQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDTANYCYCLQSKNFPRTFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTSYINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSMAYLQINSLRAEDTAVYYCALDYLISLDFWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열
번호 23)

[0231]

CAR-O'

[0232]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLINLASNVNTGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDTANYCYCLQSRITLPRITFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAYDFTGRFTFSADTSKSMAYLQINSLRAEDTAVYYCALDYTYGMDYWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 24)

[0233]

CAR-S'

[0234]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLINLASNVNTGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDTANYCYCLQSRITLPRITFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAYDFTGRFTFSADTSKSMAYLQINSLRAEDTAVYYCALDYTYGMDYWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열
번호 25)

[0235]

CAR-II

[0236]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPSSLASVGDRAITISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDVAVYYCYCLQSRITPRITFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG

YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 26)

[0237] CAR-10dU

[0238] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPSSLASVGDRAITSCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDVAVYYCLQSRITPRTFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEG
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 27)

[0239] CAR-17'

[0240] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
VEPEDTANYCYLQSRITPRTFGQGTKEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGKLEWVGWINT
TREPAYAYDFTRGRFTFSADTSKSMAYLQINLSRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEG
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 28)

[0241] 일부 구현예에서, CAR의 전장 아미노산 서열은 서열번호 19-28 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열들 중 어느 하나 또는 본 발명에 제공된 임의의 CAR에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일한 서열이다. 일부 구현예에서, CAR은 서열번호 19-28 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열들 중 어느 하나 또는 본 발명에 제공된 임의의 융합 단백질과 비교해, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50개 또는 그보다 많은 수의 돌연변이를 가진, 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 서열번호 19-28 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열들 중 어느 하나 또는 본 발명에 제공된 임의의 융합 단백질과 비교해, 동일한 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 110, 적어도 120, 적어도 130, 적어도 140, 적어도 150, 적어도 160, 적어도 170, 적어도 200, 적어도 300, 적어도 400 또는 적어도 500개의 인접한 아미노산 잔기들을 가진, 아미노산 서열을 포함한다.

[0242] 핵산 및 벡터

[0243] 일부 구현예에서, 본 발명은 CAR (예를 들어, 본 발명에 제공된 임의의 CAR)을 코딩하는 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA)를 포괄한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 DNA이다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 RNA이다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 CAR의 서열을 포함하되, 그 서열은 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 도메인 중 하나 이상을 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 항원 결합 도메인 (예를 들어, 항-BCMA 결합 도메인)을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 아래 예시적인 비-제한적인 정렬들 중 하나로부터 선택되는 정렬을 가진 CAR을 코딩한다:

[0244] [항원 결합 도메인]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인];

[0245] [항원 결합 도메인]-[힌지부]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인];

[0246] [신호 펩타이드]-[항원결합 도메인]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인]; 또는

[0247] [신호 펩타이드]-[항원 결합 도메인]-[힌지부]-[막관통 도메인]-[세포질 도메인].

[0248] 일부 구현예에서, CAR의 핵산 서열은 아래 예시적인 비-제한적인 정렬들 중 하나로부터 선택되는 정렬을 가진 세포질 도메인을 포함한다.:

[0249] [CD3 ζ];

[0250] [CD2]-[CD3 ζ];

[0251] [41BB]-[CD3 ζ];

[0252] [OX40]-[CD3 ζ]; 또는

[0253] [41BB]-[OX40]-[CD3 ζ]

- [0254] 일부 구현예에서, 상기한 예시적인 비-제한적인 정렬들은 좌에서 우측 방향으로 CAR의 N-말단에서 C-말단 방향이다. 일부 구현예에서, 각각의 "]"-"은 선택적인 스페이스 서열의 존재를 나타낸다.
- [0255] 본 발명에 제공된 임의의 핵산 분자는, 다른 특징, 예를 들어 5' 비번역 영역 (5' UTR), 3' 비번역 영역 (3' UTR), 폴리-아데닌 꼬리 (polyA), 7-메틸구아노신 캡 (m^7G), 내부 리보솜 도입부 (IRES) 및/또는 오픈 리딩 프레임 코딩하거나 또는 함유할 수 있는 것으로 이해하여야 한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 하기 조합 특징을 가진 RNA 또는 이를 코딩하는 DNA를 제공한다:
- [0256] 5'-[5' UTR]-[CAR]-3'
- [0257] 5'-[m^7G cap]-[5' UTR]-[CAR]-3'
- [0258] 5'-[m^7G cap]-[5' UTR]-[CAR]-[polyA]-3'
- [0259] 5'-[CAR]-[3' UTR]-[polyA]-3'
- [0260] 5'-[5' UTR]-[CAR]-[3' UTR]-3'
- [0261] 5'-[5' UTR]-[CAR]-[3' UTR]-[polyA]-3'
- [0262] 5'-[m^7G cap]-[5' UTR]-[CAR]-[3' UTR]-[PolyA]-3'
- [0263] 일부 구현예에서, 본 발명에 제공된 핵산은 안정성 및/또는 번역 효율을 촉진하는 능력을 가진 화학적 구조를 가진다. 일부 구현예에서, RNA는 바람직하게는 5' 및 3' UTR을 가진다. 일 구현예에서, 5' UTR은 뉴클레오타이드 1-300개 길이이다. 코딩 영역에 추가될 5' 및 3' UTR 서열의 길이는, 비-제한적으로, 여러가지 UTR 영역에 어닐링하는 PCR 프라이머 설계를 비롯하여, 다양한 방법으로 변경할 수 있다. 이러한 방식을 이용해, 당해 기술 분야의 당업자는 전사된 RNA의 형질감염 후 최적의 번역 효율을 달성하는데 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 수정할 수 있다.
- [0264] 일부 구현예에서, 5' 및 3' UTR은 대상 핵산에 대한 자연 생성되는 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 대안적으로, 대상 핵산에 내인성이 아닌 UTR 서열은 UTR 서열을 정방향 및 역방향 프라이머에 통합하거나 또는 임의의 그외 주형 변형에 의해 추가할 수 있다. 대상 핵산에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 바꾸는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열내 AU-풍부 인자들이 mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 3' UTR은 당해 기술 분야에 잘 공지된 UTR의 특성에 따라 전사된 RNA의 안정성을 높이도록 선택 또는 설계될 수 있다.
- [0265] 일 구현예에서, 5' UTR은 내인성 핵산의 Kozak 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 대상 핵산에 내인성이 아닌 5' UTR이 전술한 바와 같이 PCR에 의해 추가되는 경우에, 컨센스 Kozak 서열이 5' UTR 부가에 의해 재설계될 수 있다. Kozak 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 높일 수 있지만, 모든 RNA들을 효율적으로 번역시키기 위해 필요한 것으로 보인 않는다. 다수의 mRNA에서 Kozak 서열의 필요성이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 다른 구현예들에서, 5' UTR은 세포에서 안정적인 RNA 계층을 가진 RNA의 5' UTR일 수 있다. 다른 구현예들에서, mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하기 위해 다양한 뉴클레오타이드 유사체들이 3' 또는 5' UTR에서 사용될 수 있다.
- [0266] 일부 구현예에서, 본 발명은 세포 (예를 들어, T 세포)에서 CAR을 발현하는데 특히 유용한 5' 및/또는 3'UTR을 제공한다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 Yi1, IgG, CD8, Myo, CD3, AFP, 액틴, IFNG, ACTBL2, 합성 서열 또는 이들의 변이체로부터 유래된 5' UTR이다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 인간 또는 마우스로부터 유래된다. 예시적인 5' UTR 서열은 아래에 제공된다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 서열번호 73-82 중 어느 하나에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일한 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 서열번호 71-82에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 비교해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개 또는 그보다 많은 개수의 돌연변이를 가진, 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 서열번호 71-82에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 비교해 동일한 인접 뉴클레오타이드 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45 또는 적어도 50개를 가진 핵산 서열을 포함한다.

- [0267] 5' UTR - Yi1
- [0268] GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCTCGCAGTTCGGCGGTCCCGCGGTCTGTCTGTTGCTTCAACAGTGTGTTGGACGGAACAGATCCGGGGACTCTCTCCAGC
C (서열번호 73)
- [0269] 5' UTR - IgG
- [0270] AGACCCAAGCTGGCTAGCTCTAAAGAAGCCCCTGGGAGCACAGCTCATCACC (서열번호 74)
- [0271] 5' UTR - CD8
- [0272] AGACCCAAGCTGGCTAGCAGCTCCTCACCCACCCAGCCGCGACTGTCTCCGCCAGCCCCGGGGCCAGGTGTCCCGGGCGGCCCCG (서열번호
75)
- [0273] 5' UTR - Myo
- [0274] GTGGAACACTTCTGAACCTGCATTTTTATCTGGAATCCAGAAGCAGAATCCTTTGCTAAATAAATCGCAGCC (서열번호 76)
- [0275] 5' UTR - CD3
- [0276] AGAGAAGCAGACATCTTCTAGTTCTCCCCACTCTCTCTTTCCGGTACCTGTGAGTCAGCTAGGGGAGGGCAGCTCTACCCAGGCTGATAGTTCGGTGA
CCTGGCTTTATCTACTGGATGAGTTCGCTGGGAG (서열번호 77)
- [0277] 5' UTR - AFP
- [0278] AGACCCAAGCTGGCTAGCATATTGTGCTTCCACCTGCCAATAACAAAATAACTAGCAACC (서열번호 78)
- [0279] 5' UTR - R1 합성 서열
- [0280] AAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC (서열번호 79)
- [0281] 5' UTR - Actin
- [0282] CGCGTCCGCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCGCCCGTCCACACCCGCCGCGCCAGCTCACC (서열번호 80)
- [0283] 5' UTR - IFNG
- [0284] CACATTGTTCTGATCATCTGAAGATCAGCTATTAGAAGAGAAAGATCAGTTAAGTCCTTTGGACCTGATCAGCTTGATACAAGAACTACTGATTTCAACTTC
TTTGGCTTAATTCTCTCGGAAACG (서열번호 81)
- [0285] 5' UTR - ACTBL2
- [0286] GTGTCTGAAAGCATTTCTGGAGTGTTTTAGGCCTGTTCACCTTTCTCTTACTCACTGTCTATTCACTTGTCTGTTCACTCGTCTGGAAGATCTCAGCCAGCA
CC (서열번호 82)
- [0287] 일부 구현예에서, 본 발명은 세포 (예를 들어, T 세포)에서 CAR을 발현시키기 위해 특히 유용한 3' UTR을 제공
한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 인간 베타 글로빈, IgG, 액틴, AFP, CD3, IFNG, Myo, FoxP3, GAPDH, GATA3,
H2AFV, RORC, SOC2, 마우스 알파 글로빈, GATA3, 또는 이의 변이체로부터 유래된 3' UTR이다. 일부 구현예에서,
3' UTR은 인간 또는 마우스로부터 유래된다. 예시적인 3' UTR 서열은 아래에 제시된다. 일부 구현예에서, 3'
UTR은 서열번호 83-99 중 어느 하나에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도
70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적
어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일한 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 서열번호 83-99 중 어느
하나에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 비교해, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,
17, 18, 19, 20, 21, 22, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개 또는
그보다 많은 개수의 돌연변이를 가진, 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 서열번호 83-99 중 어
느 하나에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 비교해, 동일한 인접한 뉴클레오티드 적어도 5, 적어도 10, 적어
도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45 또는 적어도 50개를 가진, 핵산 서
열을 포함한다.
- [0288] 3' UTR - 인간 베타 글로빈
- [0289] GGGCCCGTTTAAACCGCTGGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCCTTGTTCGTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGGATATTATGAAG
GGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC (서열번호 83)

- [0290] 3' UTR - IgG
- [0291] TGAGTGCACGGCCCGCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCGTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGG
AAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCTGCG (서열번호 84)
- [0292] 3' UTR - 액틴
- [0293] GCGGACTATGACTTAGTTGCGTTACACCCCTTCTTGACAAAACCTAACTTGGCGAGAAAACAAGATGAGATTGGCATGGCTTTATTTGTTTTTTTTGTTTTG
TTTTGGTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTGACTCAGGATTTAAAACTGGAACGGTGAAGGTGACAGCAGTCGGTTGGAGCGAGCATCCCCAAAGTTCTCAATG
TGGCCGAGGACTTTGATTGCACATTGTTGTTTTTAATAGTCATTCCAAATATGAGATGCGTTGTTACAGGAAGTCCCTTGCCATCCTAAAAGCCACCCCA
CTTCTCTCTAAGGAGAATGGCCAGTCTCTCCCAAGTCCACACAGGGGAGGTGATAGCATTGCTTTCGTGTAATATGTAATGCAAAATTTTTTAAATCT
TCGCCTTAATACTTTTTTATTTTGTGTTTTTGAATGATGAGCCTTCGTGCCCCCTTCCCCCTTTTTGTCCCCCAACTTGAGATGTATGAAGGCTTTT
GGTCTCCCTGGGAGTGGGTGGAGGCAGCCAGGGCTTACCTGTACACTGACTTGAGACCAGTTGAATAAAAGTGACACCTT (서열번호 85)
- [0294] 3' UTR - AFP
- [0295] ATTACTTCAGGGGAAGAGATGACAAAACGAGTCTTTCATTGCGGTGTAACCTTTTCTCTTTAATTTAACTGATTTAACACTTTTTGTGAATTAATGAAATGA
TAAAGACTTTTATGTGAGATTTCCTTATCACAGAAATAAATATCTCCAAATGTTTCCTTTTC (서열번호 86)
- [0296] 3' UTR - CD3
- [0297] ACCTGAGACTGGTGGCTTCTAGAAGCAGCCATTACCAACTGTACCTTCCCTTCTTGCTCAGCCAATAAATATATCCTCTTTCACTCAG (서열번호 87)
- [0298] 3' UTR - IFNG
- [0299] TGGTTGTCTGCCTGCAATATTTGAATTTTAAATCTAAATCTATTTATTAATATTTAACATTATTTATATGGGGAATATATTTTAGACTCATCAATCAAAAT
AAGTATTTATAATAGCACTTTTGTGTAATGAAAATGAATATCTATTAATATATGTATTATTTATAATTCCTATATCCTGTGACTGTCTCACTTAATCCTTT
GTTTTCTGACTAATTAGGCAAGGCTATGTGATTACAAGGCTTTATCTCAGGGGCAACTAGGCAGCCAACCTAAGCAAGATCCCATGGGTGTGTGTTTATT
TCACTTGATGATACAATGAACACTTATAAGTGAAGTGATACTATCCAGTTACTGCCGTTTGAAAATATGCCTGCAATCTGAGCCAGTGCTTTAATGGCATG
TCAGACAGAAGTGAATGTGTGAGGTGACCTGATGAAAACATAGCATCTCAGGAGATTTTCATGCCTGGTGCTTCCAAATATTGTTGACAAGTGTGACTGTA
CCCAATGGAAGTAAGTCAATTTGTTAAAATTATCAATATCTAATATATATGAATAAAGTGAAGTTCACAAC (서열번호 88)
- [0300] 3' UTR - Myo
- [0301] ACACACCTGCCTGATGCTATCAAGAGGCTGAAGAAAGCGCCAAATGTGCTATTTTTTGGTCACTTGCTTTATGACGTTTATTTTCCTGTAAAGCTGAATAA
ATAAAAACTACAGTAAATGTA (서열번호 89)
- [0302] 3' UTR - FoxP3
- [0303] CCTCAAGATCAAGGAAAGGAGGATGGACGAACAGGGGCCAACTGGTGGGAGGCAGAGGTGGTGGGGCAGGGATGATAGGCCTGGATGTGCCACAGGGA
CCAAGAAGTGAGGTTTCCACTGTCTTGCTGCCAGGGCCCTGTTCCTCCGCTGGCAGCCACCCCTCCCCATCATATCCTTTGCCCCAAGGCTGCTCAGA
GGGGCCCCGTCTGGCCCCAGCCCCACCTCCGCCACAGACACACCCCAAGTTCGAGCCCTGCAGCCAAACAGAGCCTTACAACCAGCCACACAGAGCCT
GCCTCAGCTGCTCGCACAGATTACTTCAGGGCTGGAAAAGTCACACAGACACACAAAATGTACAAATCCTGTCCCTCACTCAACACAAACCCCAACACAG
AGAGCCTGCCTCAGTACACTCAAACAACCTCAAAGCTGCATCATCACACAATCACACACAAGCACAGCCCTGACAACCCACACACCCCAAGGCACGACCCA
CAGCCAGCCTCAGGGCCACAGGGGCTGTCAACACAGGGGTGTGCCAGAGGCTACACAGAAGCAGCGTCAGTACCCTCAGGATCTGAGGTCCCAACAC
GTGCTCGCTCACACACACGGCCTGTTAGAATTCACCTGTGTATCTCACGCATATGCACACGCACAGCCCCCAGTGGGTCTCTTGAGTCCCGTGCAGACACA
CACAGCCACACACACTGCCTTGCCAAAAATACCCCGTGTCTCCCTGCCACTCACCTCACTCCCATTCCCTGAGCCCTGATCCATGCCTCAGCTTAGACTGC
AGAGGAACTACTCATTTATTTGGGATCCAAGGCCCCCAACCCACAGTACCGTCCCCAATAAACTGCAGCCGAGCTCCCCAC (서열번호 90)
- [0304] 3' UTR - GAPDH
- [0305] GAAGTCTGTTCTGTCTCCCTGTGCAGGGTATCCTGTAGGGTGACCTGGAATTCGAATTCTGTTTCCCTTGTAATAATTTGTCTGTCTTTTTTT (서
열번호 91)
- [0306] 3' UTR - GATA3 (ORF 서열)
- [0307] CTATGAAGAAGGAAGGCATCCAGACCAGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAATCCAAAAAGTGCAAAAAGTGCATGACTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACA
GCTCGTTTAAACCGGCCGCCCTTCCAGACACATGTCTCCCTGAGCCACATCTCGCCCTCAGCCACTCCAGCCACATGCTGACCACGCCACGCCGATGC
ACCCGCCATCCAGC (서열번호 92)
- [0308] 3' UTR - H2AFV

- [0309] AGGGATGCTTTAACCAACCCCTCTTCCTCCCGTCATTGTACTGTAAGTGGGACAGAGAAATAATGGGGATATGTGGAATTTTAAACAACAGTTAAATGGAA
AAGCATAGACAATTACTGTAGACATGATAAAAGAAACATTGTATGTTCTTAGACTCGAAGTTTGATAAAAGTACCTTTTCATGTGGTGACAGTTGTGTGT
GATTGGCTAGGTTTCTCCCGTGTGTTTATACAAAAATGGAATTGATAAAACATTTTACAAAAATTAATTTGTCTCAAACTGTTCTGTTCATGATGTATT
AGAAATATTTTACTCAGACTTTAAATATTTTAAATCTCAGATTGGTTATTAGAGTAACCTTAGAACAGAAATGGGAATATATCTTTACAATGATTGATAC
CATGGTATATTGACTCTTAGATGCTATTGATCTGTAGCACCATTTTTACAAACGACTAAGGAAAAACCTGCCAATTAATCATGATATGCCATCAATTAT
GAGACATCCCAATTTGAGAGATGTAGATTATAGAAAAGTATGCATTTATGACTGAAATGGTAGTGGAATTTTGAATTTCTACCAAGCACTTACCATGT
GCCAGGCCCTTTGCAGAGTGCTCTACTGACCAAGAAAGTTGTTGCTGCCACATTATAGATGTGGAGCCTAAGGGTCACAGAAATTTGTGTCTATGCCAAAA
ACATTGAACTGGTAGATAGAAAATGACAGAGCTAGGATTCAAACCTAGATCTGGCTGACTCCAGAGCCTAGTTTACCTGGAATTGATGTTTCAAGTTTATCAA
AGGTTTCTCCTTTTGTTTAAATCCCAATTTTGGCCTGGCATTGTGGTTTACGCCTGTAATCCCAACAC (서열번호 93)
- [0310] 3' UTR - RORC
- [0311] CCTGGAAGAGGGACTCCTTGCCCTCTCCCTATGGCCTGTGGCCACCTCCCTGGACCCCGTTCCACCCTCACCCTTTTCCTTTCCCATGAACCTGGAGGGT
GGTCCCCACCAGCTCTTTGGAAGTGAGCAGATGCTGCGGCTGGCTTTCTGTGACAGGCCCGCCTGGCAGTGGGACAATCGCCAGAGGGTGGGGCTGGCAGA
ACACCATCTCCAGCCTCAGCTTTGACCTGTCTCATTTCCTATATTCCTTCACACCCAGCTTCTGGAAGGCATGGGGTGGCTGGGATTAAGGACTTCTGGGG
GACCAAGACATCCTCAAGAAAACAGGGGCATCCAGGGCTCCCTGGATGAATAGAATGCAATTCATTGAGAAGCTCAGAAGCTAAGAATAAGCCTTTGAAATA
CCTCATTGCATTTCCCTTTGGGCTTCGGCTTGGGGAGATGGATCAAGCTCAGAGACTGGCAGTGAGAGCCAGAGGACCTGTATAAAATGAATCTGGAGCT
TTACATTTCTGCCTCTGCCTCCTCCAGCTCAGCAAGGAAGTATTGGGCACCCTACCCTTTACCT (서열번호 94)
- [0312] 3' UTR - SOD2
- [0313] ACCACGATCGTTATGCTGATCATACCCTAATGATCCAGCAAGATAATGTCTGTCTCTAAGATGTGCATCAAGCCTGGTACATACTGAAAACCTTATAAG
GTCCTGGATAATTTTGTGTTGATTATTCATTGAAGAAACATTTATTTTCCAATTGTGTGAAGTTTGTGACTGTTAATAAAAGAATCTGTCAACCATCAAAGA
GGTCTGCATTATGCTTGCATGTCAAAAACCTTTAAAAATCCTATAATCTTC (서열번호 95)
- [0314] 3' UTR - 마우스 알파 글로불린
- [0315] GCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAG
TAGGAAGTCTAG (서열번호 96)
- [0316] 3' UTR - GATA3 (전장)
- [0317] GCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCCAGCGAGAGTCCCTGCAGTCCCTTTCGACTTGCATTTTTCAGGAGCAGTATCATGAAGCCTAAACGCGATGGATA
TATGTTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATATGTTTGCCACTTTGCAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCTGTGTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAA
TAAGCCATTCTGACTCATATCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGCTGTGAAAAAATATGCTGAACATTGCATATAACTTATATTGTAAGAAATACTGTGTA
CAATGACTTTATTGCATCTGGGTAGCTGTAAGGCATGAAGGATGCCAAGAAGTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTGGAATTAAGAAGAACTAGGTCT
GATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTGTTCCTTTCTACTGGCCACAGTTGTTTGTGATGCATTAAGAGAAATAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAA
AAAAGAAAAAGTTGTAGCGAATCATTTGTCAAAGCTGTTGGCCTCTGCAAGGAAATACCAGTTCTGGGCAATCAGTGTACCGTTACCAGTTGCCGT
TGAGGGTTTCAGAGAGCCTTTTCTAGGCCTACATGCTTTGTGAACAAGTCCCTGTAATTGTTGTTGTATGTATAATTCAAAGCACCAAAATAAGAAAAGA
TGTAGATTTATTTATCATATATTACAGACCGAAGTGTGTATAAAATTTACTGCTAGTCTTAAGAACTGCTTTCTTTTCGTTTGTGTTTCAATATTT
TCCTTCTCTCAATTTTGGTTGAATAAACTAGATTACATTCAGTTGGCCTAAGGTGGTTGTGCTCGGAGGGTTCTGTGTTCTTTTCCATTTTGTGTTTGT
GATGATATTTATTAATAGCTTCTAAGAGTCCGGCGGCATCTGTCTTGCCCTATTCTGCAGCCTGTGCTGAGGGTAGCAGTGTATGAGCTACCAGCGTGC
ATGTCAGCGACCTGGCCCGACAGGCCAGTCTGCAATCGGCCGGCTGCCTTCTGCCCTGTCGTGTTCTGTGTTAGTGATCACTGCCTTAATACAGTC
TGTTGGAATAATATTATAAGCATAATAATAAAGTAAAAATTTTAAAACTACAA (서열번호 97)
- [0318] 3' UTR - GATA3 (제1 절반)
- [0319] GCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCCAGCGAGAGTCCCTGCAGTCCCTTTCGACTTGCATTTTTCAGGAGCAGTATCATGAAGCCTAAACGCGATGGATA
TATGTTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATATGTTTGCCACTTTGCAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCTGTGTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAA
TAAGCCATTCTGACTCATATCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGCTGTGAAAAAATATGCTGAACATTGCATATAACTTATATTGTAAGAAATACTGTGTA
CAATGACTTTATTGCATCTGGGTAGCTGTAAGGCATGAAGGATGCCAAGAAGTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTGGAATTAAGAAGAACTAGGTCT
GATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTGTTCCTTTCTACTGGCCACAGTTGTTTGTGATGCATTAAGAGAAATAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAA
AAAAGAAAAA (서열번호 98)
- [0320] 3' UTR - GATA3 (제2 절반)
- [0321] GTTGTAGGCGAATCATTTGTTCAAAGCTGTTGGCCTCTGCAAAGGAAATACCAGTTCTGGGCAATCAGTGTACCGTTACCAGTTGCCGTGAGGGTTTCA
GAGAGCCTTTTCTAGGCCTACATGCTTTGTGAACAAGTCCCTGTAATTGTTGTTTGTATGTATAATTCAAAGCACCAAAATAAGAAAAGATGTAGATTTAT

TTCATCATATTATACAGACCGAACTGTTGTATAAAATTTATTTACTGCTAGTCTTAAGAACTGCTTTCTTCGTTTGTGTTTCAATATTTTCCTTCTCTCT
CAATTTTGTGTTGAATAAAGTAGATTACATTTCAGTTGGCCTAAGGTGGTGTGCTCGGAGGGTTTCTTGTTCCTTTCCATTTTGTGTTTGGATGATATTTA
TTAAATAGCTTCTAAGAGTCCGGCGGCATCTGTCTTGTCCTATTCCTGCAGCCTGTGCTGAGGGTAGCAGTGTATGAGCTACCAGCGTGCATGTCAGCGAC
CCTGGCCGACAGGCCACGTCCTGCAATCGGCCGGCTGCCTCTTCGCCCTGTCGTGTTCTGTGTTAGTGATCACTGCCTTAATACAGCTGTGTTGAATAA
TATTATAAGCATAATAATAAAGTGAAAAATATTTAAACTACAA (서열번호 99)

[0322] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 제공된 CAR 하나 이상을 각각 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 이러한 CAR을 코딩하는 핵산 서열의 예는 서열번호 29-47로 제공된다. 그러나, 본 발명에 제공된 서열의 변이체들 역시 고려되는 것으로 이해하여야 한다. 일부 구현예에서, CAR은 서열번호 29-47 중 어느 하나에 나타난 핵산 서열 어느 하나에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일한 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 구현예에서, CAR은 서열번호 29-47에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 비교해, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개 또는 그 보다 많은 개수의 돌연변이 (예를 들어, 적어도 50, 100, 200, 300, 400, 500 또는 600개)를 가진 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 구현예에서, CAR을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 29-47에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 비교해 동일한 인접 뉴클레오티드 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 110, 적어도 120, 적어도 130, 적어도 140, 적어도 150, 적어도 160, 적어도 170, 적어도 200, 적어도 300, 적어도 400, 적어도 500, 적어도 600, 적어도 700, 적어도 800, 적어도 900, 적어도 1000, 적어도 1100, 적어도 1200, 적어도 1300, 적어도 1400, 적어도 1500, 적어도 1600 또는 적어도 1700개를 가진 핵산 서열을 포함한다.

[0323] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 제공된 오픈 리딩 프레임 (ORF) 하나 이상을 각각 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. ORF를 코딩하는 핵산 서열의 예는 서열번호 112-116, 122 및 123에 제시된다. 그러나, 본 발명에 제공된 ORF 서열의 변이체 역시 고려되는 것으로 이해하여야 한다. 일부 구현예에서, ORF는 서열번호 112-116, 122 및 123 중 어느 하나에 나타난 핵산 서열 어느 하나에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일한 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 구현예에서, ORF는 서열번호 112-116, 122 및 123에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 비교해, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개 또는 그 보다 많은 개수의 돌연변이 (예를 들어, 적어도 50, 100, 200, 300, 400, 500 또는 600)를 가진 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 구현예에서, ORF를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 112-116, 122 및 123에 나타난 핵산 서열들 중 어느 하나와 비교해, 동일한 인접 뉴클레오티드 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 110, 적어도 120, 적어도 130, 적어도 140, 적어도 150, 적어도 160, 적어도 170, 적어도 200, 적어도 300, 적어도 400, 적어도 500, 적어도 600, 적어도 700, 적어도 800, 적어도 900, 적어도 1000, 적어도 1100, 적어도 1200, 적어도 1300, 적어도 1400, 적어도 1500, 적어도 1600 또는 적어도 1700개를 가진 핵산 서열을 포함한다.

[0324] 유전자 클로닝하지 않고 DNA 주형으로부터 RNA를 합성할 수 있도록 하기 위해, 전사할 서열의 DNA 주형 상류에 전사 프로모터가 연결되어야 한다. RNA 중합효소에 대한 프로모터로서 기능하는 서열이 정방향 프라이머의 5' 말단에 부가되면, RNA 중합효소 프로모터는 전사할 오픈 리딩 프레임의 PCR 산물 상류에 통합되게 된다. 바람직한 일 구현예에서, 프로모터는 본 발명의 도처에 기술된 바와 같이 T7 중합효소 프로모터이다. 그외 이용가능한 프로모터는, 비-제한적으로, T3 및 SP6 RNA 중합효소 프로모터이다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오티드 서열들이 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

[0325] 바람직한 구현예에서, mRNA는 리보솜 결합, 번역 개시 및 세포에서의 mRNA 안정성을 결정하는 5' 말단 및 3' 폴리A 꼬리 양쪽에 캡 (cap)을 가진다.

[0326] DNA 주형에 폴리A/T 가닥을 통합하는 통상적인 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA에 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 유발할 수 있으며, 이는 박테리아 세포로부터 수득된 플라스미드 DNA 주형에 결손 및 기타 이상이 빈번하게 발생하는 원인이다. 그래서, 클로닝 공정은 힘들고 시간 소모적이게 만들 뿐 아니라 신뢰성이 떨어지게 된다. 이는 클로닝하지 않고 폴리 A/T 가닥을 가진 DNA 주형을 구축하는 방법이 매우

바람직한 이유이다.

- [0327] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 세그먼트는 폴리T 꼬리, 예를 들어 100T 꼬리 (크기는 50-5000 T일 수 있음)를 함유한 리버스 프라이머를 이용함으로써 PCR 중에, 또는 비-제한적으로, 효소적 부가, DNA 라이게이션 또는 시험관내 재조합 등의 임의의 다른 방법에 의해 PCR 이후에 제조할 수 있다. 폴리A 꼬리는 또한 RNA에 안정성을 제공하며, 이의 분해를 줄인다. 일반적으로, 폴리A 꼬리의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양의 상관 관계를 나타낸다. 일 구현예에서, 폴리A 꼬리는 아데노신 100-5000개이다. 일부 구현예에서, 폴리A 꼬리는 아데노신 적어도 150개 (예를 들어, 적어도 150, 180, 또는 200개)이다. 일부 구현예에서, 폴리A 꼬리는 아데노신 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-600, 100-700, 100-800, 100-900, 100-1000, 200-300, 200-400, 200-500, 200-600, 200-700, 200-800, 200-900, 200-1000, 300-400, 300-500, 300-600, 300-700, 300-800, 300-900, 300-1000, 400 to 500, 400-600, 400-700, 400-800, 400-900 400-1000, 500-600 500-700, 500-800, 500-900, 500-1000, 600-700, 600-800, 600-900, 600-1000, 700-800, 700-900, 700-1000, 800 to 900, 800-1000 또는 900-1000개이다.
- [0328] RNA의 폴리A 꼬리는 E. coli 폴리A 중합효소 (E-PAP)와 같은 폴리A 중합효소를 이용한 시험관내 전사에 의해 추가로 연장할 수 있다. 아울러, 3' 말단에 여러가지 화학적 기들의 부착이 mRNA 안정성을 높일 수 있다. 이러한 부착은 변형된/인공적인 뉴클레오타이드, 앵타머 및 기타 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, ATP 유사체를 폴리A 중합효소를 이용해 폴리A 꼬리에 병합시킬 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 추가로 높일 수 있다.
- [0329] 5' 캡 역시 RNA 분자에 안정성을 제공해준다. 바람직한 구현예에서, 본 발명에 기술된 방법에 의해 제조된 RNA는 5' 캡을 함유한다. 5' 캡은 당해 기술 분야에 공지된 방법 및 본 발명에 기술된 방법을 이용해 제공된다 (Cougot, *et al.*, Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, *et al.*, RNA, 7:1468-95 (2001) Elango, *et al.*, Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).
- [0330] 본 발명에 제공되는 RNA는 또한 내부 리보솜 도입부 (IRES) 서열을 함유할 수 있다. IRES 서열은 캡-독립적으로 mRNA에의 리보솜 결합을 개시하여 번역 개시를 촉진하는, 임의의 바이러스성, 염색체의 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 당, 펩타이드, 지질, 단백질, 항산화제 및 계면활성제와 같이 세포 투과성 및 생존성을 촉진하는 인자를 함유할 수 있는, 세포 전기천공에 적합한 임의의 용질이 포함될 수 있다.
- [0331] 원하는 분자 (예, CAR)를 코딩하는 핵산 서열은 예를 들어 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리 스크리닝에 의해, 이를 함유한 것으로 공지된 벡터로부터 유전자 수득에 의해, 또는 이를 함유한 세포 및 조직으로부터 표준 기법에 의한 직접 단리에 의해서 등의, 당해 기술 분야에 공지된 재조합 방법을 이용해 입수할 수 있다. 대안적으로, 대상 유전자는 클로닝보다는 합성에 의해 제조할 수 있다. 벡터의 예로는, 비-제한적으로, 본 발명에 제공된 임의의 핵산이 통합된 코스미드, 플라스미드 (예를 들어, 네이키드 또는 림포솜 함유 플라스미드), 레트로트랜스포존 (예, 피기백 (piggyback), 슬리핑 뷰티) 및 바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-부속 바이러스) 등이 있다.
- [0332] 또한, 본 발명은, 본 발명의 DNA가 삽입된 벡터를 제공한다. 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스로부터 유래된 벡터는, 전이유전자의 장기간의 안정적인 통합 및 딸 세포에서의 이의 증폭을 허용하므로, 장기간 유전자 전달을 달성하기에 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는, 간 세포와 같이 비-증식성 세포를 형질도입할 수 있다는 점에서, 무라인 백혈병 바이러스와 같은 온코-레트로바이러스로부터 유래된 벡터를 능가하는 추가적인 이점을 가지고 있다. 이는, 또한, 면역원성이 낮은 추가적인 이점을 가지고 있다. 다른 구현예에서, 원하는 CAR은 트랜스포존을 이용해 세포에서 발현시킬 수 있다. 다른 구현예에서, 원하는 CAR은 상동적인 재조합을 이용해 세포에서 발현시킬 수 있다.
- [0333] 벡터는 복제 및 진핵생물에 통합하는데 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열 및 원하는 핵산 서열의 발현을 제어하는데 이용가능한 프로모터를 함유한다. 본 발명의 발현 구조체는 또한 핵산 번역화 및 유전자 요법에 표준적인 유전자 전달 프로토콜을 이용해 이용할 수 있다. 유전자 전달 방법들은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466을 참조하며, 이의 전체 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 다른 구현예에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다. 핵산은 다양한 유형의 벡터에 클로닝할 수 있다. 예를 들어, 핵산은, 비-제한적으로, 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드 등의 벡터에 클로닝할 수 있다. 특히 흥미로운 벡터로는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생산 벡터 및 서열분석 벡터 등이 있다.
- [0334] 나아가, 발현 벡터는 바이러스 벡터 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기법은 당해 기술 분야에 잘

알려져 있으며, 예를 들어, Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), 및 기타 바이러스 및 분자 생물학 매뉴얼에 기술되어 있다. 벡터로서 사용가능한 바이러스로는, 비-제한적으로, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티바이러스 등이 있다. 일반적으로, 적합한 벡터는 하나 이상의 유기체에서 기능하는 복제 오리진, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선별가능한 마커를 함유한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 6,326,193).

[0335] 다수의 바이러스를 이용한 시스템들이 포유류 세포에서 유전자 전달을 목적으로 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템에 편리한 플랫폼을 제공해준다. 선택된 유전자는 당해 기술 분야에 공지된 기법을 이용해 벡터에 삽입하여 레트로바이러스 입자에 패키징할 수 있다. 그런 후, 제조할 바이러스를 단리하여 생체 내 또는 생체외에서 개체의 세포에 전달할 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템들이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 레트로바이러스 벡터들이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스가 사용된다.

[0336] 부가적인 프로모터 요소, 예를 들어, 인핸서는 전사 개시의 빈도를 제어한다. 전형적으로, 이는 개시 부위의 30-110 bp 상류 영역에 위치하나, 최근 다수의 프로모터들이 개시 부위의 하류에 기능성 요소들을 물론 함유하고 있는 것으로 입증되었다. 프로모터 요소들 사이의 공간은, 이들 요소들이 반대로 뒤집히거나 또는 서로 멀리 떨어지는 경우에도 프로모터 기능이 보존되도록, 유연성을 가진다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터의 경우, 프로모터 요소들 간의 공간은, 활성이 떨어지기 시작하는 지점으로부터 50 bp 앞까지 늘어날 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소들이 협력하거나 또는 독립적으로 작용해 전사를 활성화하는 것으로 보인다.

[0337] 적합한 프로모터에 대한 일 예는 극초기 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 이에 작동가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드가 높은 수준으로 발현되도록 구동할 수 있는 강력한 구성적인 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터에 대한 다른 예는 연장 인자 (Elongation Factor) - 1a (EF-1a)이다. 그러나, 비-제한적으로, 시미안 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV)의 긴 말단 반복체 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, Epstein-Barr 바이러스의 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터 뿐 아니라 인간 유전자 프로모터, 예를 들어, 비-제한적으로, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터 등의, 다른 구성적인 프로모터 서열도 이용할 수 있다. 나아가, 본 발명은 구성적인 프로모터의 사용으로 제한되어서는 안된다. 유도성 프로모터 역시 본 발명의 일부로 고려된다. 유도성 프로모터의 사용으로, 발현이 요망되는 경우에는 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 작동시킬 수 있거나 또는 발현이 요망되지 않은 경우에는 발현을 중단시킬 수 있는, 분자 스위치가 제공된다. 유도성 프로모터에 대한 예로는, 비-제한적으로, 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터 등이 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 EF-1a 프로모터이다.

[0338] CAR 폴리펩타이드 또는 이의 일부의 발현을 분석하기 위해, 세포에 도입할 발현 벡터(들)는 선별가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 이 둘다를 함유하여, 바이러스 벡터를 통해 형질감염 또는 감염시키고자 하는 세포 집단으로부터 발현 세포를 동정 및 선별을 용이하게 할 수 있다. 다른 측면에서, 선별가능한 마커는 DNA 개별 조각 상에 탑재될 수 있으며, 공동-형질감염 공정으로 이용할 수 있다. 선별가능한 마커 및 리포터 유전자 둘다 숙주 세포에서 발현가능하도록 적절한 조절 서열이 측면에 위치할 수 있다. 이용가능한 선별가능한 마커로는, 예를 들어, neo 등의 항생제 내성 유전자를 포함한다. 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 동정하고 조절 서열의 기능성을 평가하기 위해 이용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 또는 이에 의해 발현되지 않으며, 일부 용이하게 검출가능한 특성, 예를 들어 효소 활성, 항생제 내성 또는 형광성에 의해 발현이 드러나는 폴리펩타이드를 코딩하는, 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 수용자 세포에 DNA가 도입된 후 적정 시간에 분석한다. 적합한 리포터 유전자로는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 방출된 알칼라인 포스파타제 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 코딩하는 유전자 등이 있을 수 있다 (예를 들어, Ui-Tei *et al.*, 2000 FEBS Letters 479: 79-82). 적합한 발현 시스템들이 잘 알려져 있으며, 공지된 기법을 이용해 제조하거나 또는 상업적으로 입수할 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자를 최고 수준으로 발현하는 것으로 보이는 최소 5' 측면 영역을 가진 구조체는 프로모터로서 식별된다. 이러한 프로모터 영역들은 리포터 유전자에 연결될 수 있으며, 프로모터-구동되는 전사를 조절하는 능력에 대해 물질을 평가하기 위해 이용할 수 있다.

[0339] 유전자를 세포에 도입하여 발현시키는 방법들이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 발현 벡터(들)의 경우, 벡터(들)는 숙주 세포, 예를 들어, 포유류, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포에 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법

에 의해 쉽게 도입할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터(들)는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 전달할 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 T 세포이다. 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하기 위한 물리적 방법으로는 전기천공, 기계적 막 파괴 (예, 세포 스퀴징 또는 나노입자를 이용한 전달), 칼슘 포스페이트 침강, 리포펙션, 입자 충돌 (particle bombardment), 미세주입법 등이 있다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 제조하는 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)을 참조한다. 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하는 바람직한 방법은 전기천공이다.

[0340] 대상 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하는 생물학적 방법으로는 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터들이 유전자를 포유류 세포, 예를 들어 인간 세포에 삽입하기 위한 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터들은 렌티바이러스 폭스바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-부속 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0341] 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하는 화학적 수단으로는 콜로이드 분산 시스템, 예를 들어 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드 및 지질-기반의 시스템, 예를 들어, 수중유 에멀전, 마이셀, 혼성 마이셀 및 리포솜 등이 있다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로서 이용하기 위한 콜로이드형 시스템의 예는 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소낭)이다.

[0342] 비-바이러스성 전달 시스템을 이용하는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제형의 사용은 핵산을 숙주 세포 (시험관내, 생체외, 생체내)에 도입하는 경우에 고려된다. 다른 측면에서, 핵산은 지질과 조합될 수 있다. 지질과 조합된 핵산은 리포솜의 내부 수성 환경 안에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 안에 배치되거나, 리포솜과 올리고뉴클레오타이드 둘다와 조합된 연결성 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜 안에 포집되거나, 리포솜과 복합체를 형성하거나, 지질이 함유된 용액 안에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질내 현탁물로서 함유되거나, 마이셀에 함유 또는 마이셀로 복합체를 형성하거나, 또는 지질과 조합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 관련 조성물은 용액 중의 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이는 마이셀로서 이중층 구조 안에 존재하거나 또는 "붕괴된" 구조와 함께 존재할 수 있다. 이는 또한 단순히 용액에 섞여, 잠재적으로 크기 또는 형태가 일정하지 않은 응집물을 형성할 수 있다. 지질은 자연 생성 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 자연적으로 생성되는 지방 액적뿐 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 이의 유도체, 예를 들어 지방산, 알코올, 아민, 아미노알코올 및 알데하이드를 함유한 화합물 클래스를 포함한다.

[0343] 사용하기 적합한 지질은 상업적인 소스로부터 취득할 수 있다. 예를 들어, Sigma, St. Louis, MO로부터 다이미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")을 입수할 수 있으며; K & K Laboratories (Plainview, NY)로부터 다이세틸 포스페이트 ("DCP")를 입수할 수 있으며; Calbiochem-Behring으로부터 콜레스테롤 ("Choi")을 입수할 수 있으며; Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)로부터 다이미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 기타 지질을 입수할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질 원액은 약 -20°C에서 보관할 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 더 쉽게 증발하므로, 유일한 용매로 사용된다. "리포솜"은 봉입된 지질 이중층 또는 응집물의 구축을 통해 형성된 다양한 단일 또는 다중층 지질 비히클들을 망라하는 일반 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막과 내부 수성 매질을 가진 소낭 구조를 특징으로 할 수 있다. 다중층 리포솜은 수성 매질에 의해 이격된 복수의 지질 층들을 가진다. 이는 과량의 수성 용액에 인지질을 현탁할 경우에 자발적으로 형성된다. 지질 구성성분들은 자가-재배열을 거쳐 밀봉된 구조를 형성하고, 지질 이중층들 사이에는 물과 용해된 용질이 포획된다 (Ghosh *et al.*, 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). 그러나, 용액 중에 정상적인 소낭 구조와는 다른 구조를 가진 조성물도 포괄한다. 예를 들어, 지질은 마이셀 구조로 추정되거나 또는 주로 지질 분자들로 된 비-균일한 응집물로서 존재할 수 있다. 또한, 리포펙타민-핵산 복합체도 포괄한다.

[0344] 외인성 핵산을 숙주 세포에 도입하거나 또는 세포를 본 발명의 저해제에 노출시키기 위해 사용되는 방법과 상관 없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 검증하기 위해, 다양한 분석들을 수행할 수 있다. 이러한 분석으로는, 예를 들어, 노던 및 서든 블롯팅, RT-PCR 및 PCR과 같이 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려진 "분자 생물학" 분석; 특정 펩타이드의 존재 또는 부재를, 예를 들어 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯) 또는 본 발명에 언급된 본 발명의 범위에 포함되는 물질을 동정하기 위한 분석에 의해 검출하는 등의 "생화학적" 분석 등이 있다.

[0345] RNA 형질감염

- [0346] 일부 구현예에서, 본 발명의 변형된 T 세포는 RNA의 도입을 통해 변형된다 (예를 들어, mRNA는 본 발명에 기술된 바와 같이 CAR을 코딩하는 서열을 포함함). 일부 구현예에서, 시험관내 전사된 RNA CAR을 일시적인 형질감염 형태로서 세포에 도입할 수 있다. RNA는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 제조된 주형을 이용해 시험관내 전사에 의해 제조된다. 임의 소스로부터 유래된 대상 DNA는 적절한 프라이머와 RNA 중합효소를 이용한 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 PCR에 의해 직접 변환할 수 있다. DNA 소스는, 예를 들어, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 임의의 다른 적절한 DNA 소스일 수 있다. 시험관내 전산에 적합한 주형은 본 발명의 CAR이다.
- [0347] RNA는 여러가지 다양한 방법들 중 임의 방법, 예를 들어, 비-제한적으로, 전기천공 (Amaxa® Nucleofector-II® (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) 또는 Gene Pulser II® (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator® (Eppendorf, Hamburg Germany), 기계적 막 파괴 (예를 들어, 세포 스퀀링, 미국 특허 공개번호 2014/287509A1 참조), 리포펙션을 이용한 양이온성 리포좀 매개 형질감염, 폴리머 캡슐화, 펩타이드 매개 형질감염 또는 "유전자 총"과 같은 바이올리스틱 입자 전달 시스템 (예를 들어, Nishikawa, *et al.* Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001) 참조) 등의 상업적으로 이용가능한 방법을 이용하여 표적 세포에 도입할 수 있다.
- [0348] 본 발명은 시험관내 전사된 RNA CAR을 제조하는 방법을 개시한다. 또한, 본 발명은 세포에 직접 형질감염시킬 수 있는 CAR 코딩 RNA 구조체를 포함한다. 형질감염에 사용하기 위한 mRNA 구축 방법은 주형을 특수 설계된 프라이머를 사용해 시험관내 전사 (IVT)한 다음 폴리A를 추가하고, 3' 및 5' 비번역 서열 ("UTR"), 5' cap 및/또는 내부 리보솜 도입부 (IRES), 발현시킬 핵산 및 전형적으로 염기 50-400개, 50-2000개, 150-400개 또는 150-2000개 길이의 폴리A 꼬리를 가진 구조체를 생산하는 것을 수반할 수 있다. 이렇게 제조된 RNA는 다양한 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 일 측면에서, 주형은 CAR에 대한 서열을 포함한다.
- [0349] 일 측면에서, 항-BCMA CAR은 메신저 RNA (mRNA)에 의해 코딩된다. 일 측면에서, CAR-발현 세포 (예를 들어, CAR T 세포 또는 CAR-발현성 NK 세포)를 제조하기 위해, 항-BCMA CAR을 코딩하는 mRNA를 번역 작동자 세포, 예를 들어 T 세포 또는 NK 세포에 도입한다.
- [0350] 일 구현예에서, 시험관내 전사된 RNA CAR를 일시적인 형질감염의 형태로서 세포에 도입할 수 있다. RNA는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)-제조된 주형을 이용한 시험관내 전사에 의해 제조된다. 임의 소스로부터 유래된 대상 DNA는 PCR에 의해 직접 적절한 프라이머와 RNA 중합효소를 이용한 시험관내 mRNA 합성의 주형으로 변환할 수 있다. DNA 소스는, 예를 들어, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 임의의 기타 적절한 DNA 소스일 수 있다. 시험관내 전사에 바람직한 주형은 본 발명의 CAR이다. 예를 들어, RNA CAR에 대한 주형은 항-종양 항체의 단쇄 가변성 도메인을 포함하는 세포외 영역, 힌지부, 막관통 도메인 (예를 들어, CD8a의 막관통 도메인); 및 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 CD3ζ의 신호전달 도메인 및/또는 CD28, 41BB 및/또는 OX40의 신호전달 도메인을 포함하는, 세포질 영역을 포함한다.
- [0351] 일 구현예에서, PCR에서 이용할 DNA는 오픈 리딩 프레임에 함유한다. DNA는 유기체의 게놈으로부터 유래된 자연 생성 DNA 서열로부터 유래할 수 있다. 일 구현예에서, 핵산은 5' 및/또는 3' 비번역 영역 (UTR) 중 일부 또는 전부, 예를 들어, 본 발명에 제공된 임의의 비번역 영역을 함유할 수 있다. 핵산은 엑손과 인트론을 함유할 수 있다. 일 구현예에서, PCR에 사용되는 DNA는 인간 핵산 서열이다. 다른 구현예에서, PCR에서 이용할 DNA는 5' 및 3' UTR을 함유한 인간 핵산 서열이다. DNA는 대안적으로 자연 생성 유기체에서 정상적으로 발현되지 않은 인공 RNA 서열일 수 있다. 예시적인 인공 DNA 서열은 라이게이션하여 융합 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 형성하는 유전자들의 일부분을 함유한 것이다. 서로 라이게이션되는 DNA의 부분들은 하나의 유기체로부터 또는 2종 이상의 유기체로부터 유래할 수 있다.
- [0352] 형질감염에 사용되는 mRNA를 시험관내 전사하기 위한 주형은 PCR을 이용해 만든다. PCR 수행 방법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. PCR에 사용되는 프라이머는 PCR의 주형으로서 사용될 DNA 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 가지도록 설계된다. 본 발명에서, "실질적으로 상보적인"은, 프라이머 서열의 염기 대부분 또는 전체가 상보적이거나 또는 하나 이상의 염기가 비-상보적이거나, 또는 미스매칭된, 서열을 지칭한다. 실질적으로 상보적인 서열은 PCR에서 적용되는 어닐링 조건 하에 의도한 DNA 표적에 어닐링 또는 혼성화할 수 있다. 프라이머는 DNA 주형의 임의 부분에 실질적으로 상보적이도록 설계할 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 5' 및 3' UTR을 비롯하여 세포에서 정상적으로 전사되는 (오픈 리딩 프레임) 핵산의 영역을 증폭시키도록 설계할 수 있다. 프라이머는 또한 대상 특정 도메인을 코딩하는 핵산의 일부분을 증폭하도록 설계할 수 있다. 일 구현예에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR 전체 또는 일부를 비롯하여 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭시키도록 설계된다. PCR에서 이용

가능한 프라이머는 당해 기술 분야에 잘 알려진 합성 방법으로 제조할 수 있다. "정방향 프라이머"는 증폭시킬 DNA 서열의 상류에 위치한 DNA 주형 상의 뉴클레오티드에 대해 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 영역을 함유한 프라이머이다. "상류"는 본 발명에서 코딩 가닥을 기준으로 증폭시킬 DNA에 대해 5' 방향에 위치하는 것을 지칭하기 위해 사용된다. "역방향 프라이머"는 증폭시킬 DNA 서열의 하류에 위치한 이중 가닥 DNA 주형에 대해 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 영역을 함유한 프라이머이다. "하류"는 본 발명에서 코딩 가닥을 기준으로 증폭시킬 DNA에 대해 3' 방향에 위치하는 것을 지칭하기 위해 사용된다.

[0353] PCR에서 이용가능한 임의의 고-충실성 DNA 증합효소는 본 발명에 기술된 방법에서 이용할 수 있다. 시약 및 증합효소는 다양한 소스로부터 상업적으로 입수가능하다.

[0354] 유전자 변형된 면역 세포

[0355] 일부 구현예에서, CAR 서열(들) (예를 들어, 본 발명에 기술된 CAR을 코딩하는 핵산 서열(들))을 세포 (예를 들어, T 세포, 줄기 세포 또는 NK 세포)에 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터를 사용해 전달한다. CAR-발현성 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터는 캡슐화된, 결합된 또는 네이키드 벡터의 담체 또는 세포-프리 국소 또는 전신 전달로서 형질도입된 세포를 이용해 다양한 유형의 진핵생물 세포뿐 아니라 조직 및 완전한 유기체로 전달할 수 있다. 사용 방법은 안정적인 발현이 요구되거나 또는 충분한 임의의 목적을 위한 것일 수 있다.

[0356] 다른 구현예에서, 원하는 CAR은 트랜스포존을 이용해 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)에서 발현시킬 수 있다.

[0357] 본 발명에 개시된 방법은, 유전자 변형된 T 세포 또는 NK 세포가 표적 세포, 예를 들어 표적 암 세포를 살상하는 능력을 평가하는 등의, 암, 줄기 세포, 급성 및 만성 감염 및 자가면역 질환 분야에서, 기초 연구 및 요법에서 면역 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)의 활성 조절에 활용될 수 있다. 벡터, 발현 수준을 각각 제어할 수 있게 함. 예를 들어, 동일 세포에서 복수의 키메라 수용체 상의 여러가지 세포내 작동자/공동 자극 도메인들을 다양하게 사용해 수용체 조합들의 구조를 결정할 수 있으며, 이는 복수의 항원 표적에 대한 최고 수준의 세포독성과 동시에 정상 세포에 대한 최저 세포독성을 평가한다.

[0358] 세포 클로닝은, 전체 림프구 집단을 안정적으로 균일하게 변형시킬 수 있는 렌티바이러스 벡터 또는 온코-레트로바이러스 벡터를 이용한 CAR의 형질도입 효율로 인해, 필수인 것은 아니다.

[0359] 면역 세포의 소스

[0360] 본 발명의 면역 세포 (예를 들어, T 세포)의 증폭 및 유전자 변형하기에 앞서, 면역 세포 (예를 들어, T 세포)의 소스를 개체로부터 수득한다. 면역 세포 (예를 들어, T 세포)는 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터 유래된 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양 등의 다양한 소스로부터 수득할 수 있다. 또한, 면역 세포 (예를 들어, T 세포)는 유도된 만능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포로부터 제조될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 당해 기술 분야에서 이용가능한, 비-제한적으로, T 세포 및 NK 세포 등의 임의의 개수의 면역 세포주를 이용할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 면역 세포 (예를 들어, T 세포)는 Ficoll™ 분리 등의 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 개수의 기법을 이용해 개체로부터 채혈한 혈액 유닛으로부터 수득할 수 있다. 일부 구현예에서, 개체의 순환 혈액으로부터 유래된 세포는 성분채집술에 의해 수득한다. 성분채집술 산물은 전형적으로 림프구, 예로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, NK 세포, 기타 유핵 백혈구 세포, 적혈구 세포 및 혈소판을 함유한다. 일부 구현예에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포는 세척하여 혈장 분획을 제거하고 세포를 후속 가공 단계를 위한 적절한 완충제 또는 매질 중에 배치한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 세포는 포스페이이트 완충화된 염수 (PBS)로 행군다. 대안적인 구현예에서, 세척액에는 칼슘이 결핍되며, 마그네슘이 결핍되거나 또는 모든 2가 양이온이 전부가 아니더라도 다수 결핍될 수 있다. 제차, 놀랍게도, 칼슘 부재 하의 초기 활성화 단계는 활성화 확대로 이어진다. 당해 기술 분야의 당업자라면 세척 단계가 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 방법을 이용해, 예를 들어 반-자동화된 "플로우-스루" 원심분리 (예를 들어, Cobe®2991 세포 가공기, Baxter® CytoMate® 또는 Haemonetics®Cell Saver 5®)를 제조사의 지침에 따라 사용함으로써 달성할 수 있음을 쉽게 알 것이다. 세포는, 세척 후, 예를 들어, Ca²⁺-프리, Mg²⁺-프리 PBS, PlasmaLyte A 또는 그외 완충제 함유 또는 비함유 식염수와 같은 다양한 생체적합한 완충제에 재현탁할 수 있다. 대안적으로, 성분채집술 샘플의 바람직하지 않은 구성성분들을 제거하고, 세포를 배양 배지에 직접 재현탁할 수 있다.

[0361] 다른 구현예에서, 면역 세포 (예를 들어, T 세포)는 적혈구 세포를 세포용해하고 단핵구를 고갈시킴으로써, 예

를 들어 PERCOLL™ 농도구배를 통한 원심분리 또는 역류 원심세정에 의해 말초혈 림프구로부터 분리한다. $CD3^+$, $CD28^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$ 및 $CD45RO^+$ T 세포와 같은 T 세포의 특정 아집단은, 양성 또는 음성 선별 기법에 의해 추가로 분리할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, T 세포는 항-CD3/항-CD28 (즉, 3x28)-접합 비드, 예를 들어 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와 바람직한 T 세포를 양성 선별하기에 충분한 기간 동안 인큐베이션함으로써, 분리한다. 일부 구현예에서, 그 기간은 약 30분이다. 추가적인 구현예에서, 그 기간은 30분에서 36시간 이상, 그리고 그 사이 모든 정수 값 범위이다. 추가적인 구현예에서, 그 기간은 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 또는 6시간이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 그 기간은 10-24시간이다. 바람직한 일 구현예에서, 인큐베이션 기간은 24시간이다. 백혈병 환자로부터 T 세포를 분리하는 경우에는, 인큐베이션 시간을 더 길게, 예를 들어 24시간으로 적용하면 세포 수율이 증가할 수 있다. 더 긴 인큐베이션 기간을 적용해, 종양 조직 또는 면역-억제 개체로부터 종양 침윤성 림프구 (TIL)를 분리하는 등의 다른 세포 타입과 비교해, T 세포 수가 적은 임의 상황에서 T 세포를 분리할 수 있다. 나아가, 더 긴 인큐베이션 시간을 적용해 $CD8^+$ T 세포의 포획 효율을 높일 수 있다. 따라서, 그 기간을 단순히 줄이거나 또는 늘림으로써, T 세포를 CD3/CD28 비드에 결합하게 하거나 및/또는 (본 발명에 기술된 바와 같이) 비드 : T 세포의 비율을 늘리거나 또는 줄임으로써 T 세포 아집단을 공정 중에 배양 개시시 또는 다른 시점에 선호적으로 선별하거나 또는 도태시킬 수 있다. 아울러, 비드 또는 기타 표면 상에 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비율을 높이거나 또는 낮춤으로써, T 세포 아집단들을 배양 개시시 또는 다른 원하는 시점에 선호적으로 선별하거나 또는 도태시킬 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 여러번의 선별을 본 발명의 맥락에서 이용할 수도 있음을, 알 것이다. 특정 구현예에서, 선별 공정을 수행하고, 활성화 및 증폭 과정에서 "비선별된" 세포를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. "비선별된" 세포는 또한 추가적인 선별 회차를 거칠 수 있다.

[0362] 음성 선별에 의한 T 세포 집단의 농화는 음성 선별된 세포에 고유한 표면 마커에 대한 항체 조합을 이용해 달성할 수 있다. 한가지 방법은 네거티브 자기 면역부착 또는 음성 선별된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단일 클론 항체 카테일을 이용하는 유세포 측정을 통한 세포 분류 및/또는 선별이다. 예를 들어, 음성 선별에 의해 $CD4^+$ 세포를 농화하기 위해, 단일클론 항체 카테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체들을 함유한다. 특정 구현예에서, 전형적으로 $CD4^+$, $CD25^+$, $CD62L^{hi}$, $GITR^+$ 및 $FoxP3^+$ 를 발현하는 조절성 T 세포를 농화하거나 또는 이를 양성 선별하는 것이 바람직할 수 있다.

[0363] 대안적으로, 특정 구현예들에서, 조절성 T 세포는 항-CD25 접합 비드 또는 그와 유사한 선별 방법에 의해 고갈시킨다.

[0364] 양성 또는 음성 선별에 의해 원하는 세포 집단을 분리하는 경우, 세포 농도 및 표면 (예를 들어, 비드와 같은 입자)은 다양할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포와 비드의 접촉을 최대화하기 위해 비드와 세포를 함께 혼합하여 부피를 현저하게 줄이는 것이 (즉, 세포의 농도를 높이는 것이) 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포 20억개/ml의 농도를 사용한다. 일부 구현예에서, 세포 10억개/ml의 농도를 사용한다. 추가적인 구현예에서, 세포 1억/ml를 초과하는 농도를 사용한다. 추가적인 구현예에서, ml 당 세포 10,000,000개, 15,000,000개, 20,000,000개, 25,000,000개, 30,000,000개, 35,000,000개, 40,000,000개, 45,000,000개 또는 50,000,000개의 세포 농도를 사용한다. 또 다른 구현예에서, ml 당 세포 75,000,000개, 80,000,000개, 85,000,000개, 90,000,000개, 95,000,000개 또는 100,000,000개의 세포 농도를 사용한다. 추가적인 구현예들에서, ml 당 세포 125,000,000 또는 150,000,000개의 농도로 사용할 수 있다. 고 농도로 이용해, 세포 수율 증가, 세포 활성화 증가 및 세포 증폭 증가를 달성할 수 있다. 나아가, 세포를 고 농도로 사용하면, CD28-음성 T 세포와 같은 대상 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포를, 또는 다수의 종양 세포가 존재하는 세포 (예를 들어, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터 보다 효과적으로 포획할 수 있게 한다. 이러한 세포 집단은 치료학적 가치를 가질 수 있으며, 수득하기 바람직할 것이다. 예를 들어, 세포의 고 농도 사용은, 정상적으로 CD28을 약하게 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 보다 효과적으로 선별할 수 있게 한다.

[0365] 관련 구현예에서, 세포를 더 낮은 농도를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포 및 표면 (예를 들어, 비드와 같은 입자)의 혼합물을 현저하게 희석함으로써, 입자와 세포 간의 상호작용을 최소화한다. 입자에 결합시키고자 요망하는 항원을 다량 발현하는 세포를 선별한다. 예를 들어, $CD4^+$ T 세포는 CD28을 높은 수준으로 발현하고, 희석 농도에서 $CD8^+$ T 세포보다 더 효과적으로 포획된다. 일부 구현예에서, 사용되는 세포의 농도는 5×10^6 /ml이다. 다른 구현예들에서, 사용되는 농도는 약 1×10^5 /ml 내지 1×10^6 /ml, 그리고 그 사이의 모든 정수 값일

수 있다.

- [0366] 다른 구현예들에서, 세포는 2-10℃ 또는 실온에서 다양한 속도로 다양한 기간 동안 회전 장치 (rotator)에서 인 큐베이션할 수 있다.
- [0367] 자극하기 위한 T 세포는 세척 단계 후 또한 냉동할 수 있다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 냉동 및 후속적인 해동 단계는 과립구와 어느 정도의 단핵구를 세포 집단에서 제거함으로써 보다 균일한 산물을 제공 해준다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포는 냉동 용액에 현탁할 수 있다. 여러가지 냉동 용액 및 파라미터들이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며 본 맥락에서 이용가능할 것이나, 한가지 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유한 PBS, 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO를 함유한 배양 배지, 또는 31.25% Plasmalyte-A, 31.25% 텍스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO 또는 예를 들어 Hespan 및 PlasmaLyte A를 함유한 기타 적합한 세포 냉동 매질의 사용을 수반하며, 세포는 이후 -80℃에서 분당 1℃의 속도로 냉동시켜, 액체 질소 보관 탱크의 기체 상에서 보관한다. 그외 조절성 냉동하는 방법들뿐 아니라 -20℃ 또는 액체 질소에서 즉시 비-조절성 냉동법들을 이용할 수 있다. 특정 구현예에서, 냉동보존된 세포는 본 발명에 기술된 바와 같이 해동 및 세척하고, 본 발명의 방법으로 활성화하기 전에 실온에서 1시간 동안 휴지시킨다.
- [0368] 또한, 본 발명의 맥락에서, 본 발명에 기술된 바와 같이 증폭된 세포가 필요할 수 있기 전 소정의 시점에 개체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집술 산물의 수집이 고려된다. 이와 같이, 증폭시킬 세포의 소스는 필요한 임의의 시점에서 수집할 수 있으며, T 세포와 같이 요망하는 세포를 분리하여, 본 발명에 기술된 요법과 같은 T 세포 요법이 유익할 여러가지 질환 또는 병태에 대한 T 세포 요법에 향후 사용하기 위해 냉동할 수 있다. 일부 구현예에서, 혈액 샘플 또는 성분채집술 산물은 전반적으로 건강한 개체로부터 취한다. 특정 구현예에서, 혈액 샘플 또는 성분채집술 산물은 질병 발병 위험이 있지만 아직 질환이 발병하지 않은 전반적으로 건강한 개체에서 취하며, 대상 세포를 분리해 향후 사용을 위해 냉동한다. 특정 구현예에서, T 세포는 증폭, 냉동하여 향후 사용할 수 있다. 특정 구현예에서, 샘플은 본 발명에 기술된 특정 질환으로 진단된 직후이나 어떠한 치료도 수행하기 전에 환자로부터 수집된다. 추가적인 구현예에서, 세포는, 비-제한적으로, 제제, 예를 들어, 나탈리주맵 (natalizumab), 에팔리주맵 (efalizumab), 항바이러스제, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예를 들어 사이클로스포린 (cyclosporin), 아자티오프린 (azathioprine), 메토트렉세이트 (methotrexate), 미코페놀레이트 (mycophenolate) 및 FK506, 항체, 또는 기타 면역제거제 (immunoablative agent), 예를 들어 CAMPATH®, 항-CD3 항체, 사이토산 (Cytosan), 플루다라빈 (fludarabine), 사이클로스포린 (cyclosporin), FK506, 라파마이신 (rapamycin), 미코페놀산 (mycophenolic acid), 스테로이드, FR901228 및 방사선을 이용한 치료 등의, 몇가지 적절한 치료 용법을 수행하기 전에 개체로부터 성분채집술로부터 또는 혈액 샘플로부터 분리된다. 이들 약물은 칼슘 의존적인 포스파타제 칼시뉴린 (사이클로스포린 및 FK506)을 저해하거나, 또는 성장인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 저해한다 (라파마이신) (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). 추가적인 구현예에서, 세포는 환자를 위해 분리하여, 골수 또는 줄기 세포 이식, 플루다라빈, 외부 빔 조사 요법 (XRT), 사이클로포스파미드와 같은 화학요법제, 또는 OKT3 또는 CAMPATH®와 같은 항체를 이용한 T 세포 제거 요법 (ablative therapy)과 조합하여 (예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 향후 사용하기 위해 냉동된다. 다른 구현예에서, 세포는 CD20과 반응하는 물질, 예를 들어, RITUXAN® 등의 B 세포 제거 요법 후 향후 치료에 사용하기 위해 그 전에 분리하여, 냉동할 수 있다.
- [0369] 본 발명의 추가적인 구현예에서, T 세포는 치료 후 바로 환자로부터 수득한다. 이와 관련하여, 특정 암 치료 후, 특히 면역 시스템을 손상시키는 약물로 치료한 후, 환자가 정상적으로 치료로부터 회복되는 기간 동안 치료 직후에, 수득된 T 세포의 품질이 최적일 수 있거나 또는 생체의 증폭 능력이 향상될 수 있는 것으로 관찰된 바 있다. 마찬가지로, 본 발명에 기술된 방법을 이용한 생체의 조작 후, 이들 세포는 생체 및 생체내 증폭 강화를 위해 바람직한 상태에 있을 수 있다. 따라서, 본 발명의 맥락에서, T 세포, 수지상 세포 또는 조혈 계통의 다른 세포 등의 혈액 세포를 회복 기간 동안에 수집하는 것이 고려된다. 나아가, 특정 구현예들에서, 동원 (예, GM-CSF를 이용한 동원) 및 컨디셔닝 용법을 이용해, 특히 요법 후 지정된 시간 범위 동안에 특정 세포 타입의 재순환, 재생 및/또는 증폭이 선호되는 상태를 개체에서 구축할 수 있다. 세포 타입의 예로는 T 세포, B 세포, 수지상 세포 및 면역 시스템의 다른 세포 등이 있다.
- [0370] T 세포의 활성화 및 증폭
- [0371] 요망한 CAR를 발현하도록 T 세포를 유전자 변형시키기 전 또는 변형시킨 후, T 세포는, 일반적으로, 예를 들어,

미국 특허 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 특허 출원 공개번호 20060121005에 기술된 방법을 이용하여 활성화 및 증폭시킬 수 있다.

[0372] 일반적으로, 본 발명의 T 세포는, CD3/TCR 복합체 관련 신호를 자극하는 물질 및 T 세포의 표면 상의 공동 자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해, 증폭된다. 특히, T 세포 집단은, 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 표면에 고정된 항-CD2 항체와 접촉시킴으로써, 또는 단백질 키나제 C 활성화자 (예, 브리오타틴 (bryostatin))을 칼슘 이오노포어와 함께 사용하여 접촉시킴으로써와 같이, 본 발명에 기술된 바와 같이 자극할 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자를 공동 자극하기 위해, 이 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포 집단을 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 T 세포의 증식을 자극하기에 적합한 조건 하에 접촉시킬 수 있다. CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체. 항-CD28 항체에 대한 예로는 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besancon, France) 등이 있으며, 이는 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 다른 방법에서와 같이 사용할 수 있다 (Berg *et al.*, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garland *et al.*, J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[0373] 특정 구현예에서, T 세포에 대한 1차 자극 신호 및 공동 자극 신호는 여러가지 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각 신호를 제공하는 물질은 용액 형태이거나 또는 표면에 커플링될 수 있다. 표면에 커플링되는 경우, 물질들은 동일한 표면 (즉, "시스" 포맷) 또는 별개의 표면 (즉, "트랜스" 포맷)에 커플링될 수 있다. 대안적으로, 한가지 물질은 표면에 커플링되고, 다른 물질은 용액 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 공동 자극 신호를 제공하는 물질은 세포 표면에 결합되고, 1차 활성화 신호를 제공하는 물질은 용액 형태이거나 또는 표면에 커플링된다. 특정 구현예에서, 물질 2종 모두 용액 형태일 수 있다. 다른 구현예에서, 물질들은 가용성 형태일 수 있으며, 이후 Fc 수용체 또는 항체 또는 그 물질에 결합하게 될 기타 결합제를 발현하는 세포 등의 표면에 가교될 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개번호 20040101519 및 20060034810에서, 본 발명에서 T 세포를 활성화 및 증폭시키는데 이용하는 것으로 고려하는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)를 참조한다.

[0374] 일부 구현예에서, 2가지 물질은 비드에, 동일한 비드, 즉 "시스"로, 또는 별개의 비드, 즉 "트랜스"로 고정된다. 예를 들어, 1차 활성화 신호를 제공하는 물질은 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 공동 자극 신호를 제공하는 물질은 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편이며; 이들 2가지 물질 모두 등가의 분자량으로 동일한 비드에 공동 고정된다. 일부 구현예에서, CD4⁺ T 세포 증폭 및 T 세포 증식을 위해 비드에 결합되는 각각의 항체는 1:1 비율로 사용된다. 본 발명의 특정 측면에서, 비드에 결합되는 항-CD3:CD28 항체의 비율은 1:1 비율을 이용한 경우에 관찰된 증폭과 비교해 T 세포 증폭 증가가 관찰되는 비율로 사용된다. 일 특정 구현예에서, 1:1 비율에서 관찰되는 증폭과 비교해 약 1 내지 약 3배 증가가 관찰된다. 일부 구현예에서, 비드에 결합되는 CD3:CD28 항체의 비율은 100:1 내지 1:100 범위 및 그 범위에 속하는 모든 정수 값이다. 본 발명의 일 측면에서, 항-CD28 항체는 항-CD3 항체보다 더 많이 입자에 결합되며, 즉 CD3:CD28의 비율은 1 미만이다. 본 발명의 특정 구현예에서, 비드에 결합된 항-CD28 항체 : 항-CD3 항체의 비율은 >2:1이다. 일 특정 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체 비율은 1:100로 사용된다. 다른 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체 비율은 1:75로 사용된다. 추가적인 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체 비율은 1:50으로 사용된다. 다른 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체 비율은 1:30으로 사용된다. 바람직한 일 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체 비율은 1:10으로 사용된다. 다른 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체 비율은 1:3으로 사용된다. 또 다른 구현예에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체 비율은 3:1로 사용된다.

[0375] 1:500 내지 500:1 및 이 범위에 속하는 임의 정수 값의 입자: 세포 비율을 적용하여, T 세포 또는 기타 표적 세포를 자극할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 입자:세포의 비율이 표적 세포에 대한 입자 크기에 따라 결정될 수 있음을 쉽게 알 수 있다. 예를 들어, 작은 크기의 비드는 세포가 몇개만 결합할 수 있지만, 더 큰 비드는 더 많이 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 1:100 내지 100:1 및 이 범위에 속하는 임의 정수 값, 추가적인 구현예에서, 1:9 내지 9:1 및 이 범위에 속하는 임의 정수 값을 포함하는 세포 : 입자의 비율을 적용해, T 세포를 자극할 수 있다. T 세포 자극을 달성하는 항-CD3-커플링된 입자 및 항-CD28-커플링된 입자 : T 세포의 비율로는, 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 및 15:1을 포함하며, 바람직한 한가지 비율은 적어도 1:1의 입자:T 세포이다. 일부 구현예에서, 입자:세포 비율 1:1 이하가 적용된다. 일 특정 구현예에서, 바람직한 입자:세포의 비율은 1:5이다. 추가적인 구현예들에서, 입자:세포의 비율은 자극 일에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 일부 구

현예에서, 입자:세포의 비율은 첫째날 1:1 내지 10:1이고, 그후 매일 또는 2일 간격으로 최대 10일간 입자를 세포에 추가하며, 최종 비율은 1:1 내지 1:10 (첨가한 날의 세포 수 기준)이다. 일 특정 구현예에서, 입자:세포의 비율은 자극 첫째날 1:1이고, 자극 3일차 및 5일차에는 1:5로 조정된다. 다른 구현예에서, 입자는 매일 또는 2일 간격으로, 자극 첫째날 최종 비율 1:1, 그리고 자극 3일차 및 5일차에 1:5로 첨가된다. 다른 구현예에서, 입자:세포의 비율은 자극 첫째날 2:1이고, 자극 3일차 및 5일차에는 1:10으로 조정된다. 다른 구현예에서, 입자는 매일 또는 2일 간격으로, 자극 첫째날 최종 비율 1:1로, 3일차 및 5일차에는 1:10이 되도록 첨가된다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 그외 다양한 비율들이 본 발명에 사용하기 적합할 수 있음을 알 것이다. 특히, 비율은 입자 크기와 세포 크기 및 타입에 따라 달라질 것이다.

[0376] 본 발명의 추가적인 구현예들에서, T 세포와 같은 세포는 물질로 코팅된 비드와 조합하고, 비드와 세포를 이후 분리한 다음 세포를 배양한다. 대안적인 구현예에서, 배양하기 전, 물질로 코팅된 비드와 세포는 분리하지 않고 함께 배양한다. 추가적인 구현예에서, 비드와 세포를 먼저 자기력과 같은 힘을 가하여 농축하여, 세포 표면 마커의 라이게이션을 높여 세포 자극을 유도한다.

[0377] 예를 들어, 세포 표면 단백질은, T 세포와 접촉하기 위해 항-CD3 및 항-CD28이 상자성 비드 (3x28 비드)에 부착되게 허용함으로써, 라이게이션할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, 10^4 내지 10^9 T 세포)와 비드 (예를 들어, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드, 비율 1:1)는 완충제, 바람직하게는 PBS (칼슘 및 마그네슘과 같은 1가 양이온이 없는) 중에서 조합한다. 재차, 당해 기술 분야의 당업자라면 임의의 세포 농도를 이용할 수 있음을 쉽게 알 것이다. 예를 들어, 표적 세포는 샘플내에 매우 적을 수 있으며, 샘플의 단 0.01%에 불과하거나, 또는 샘플 전체 (즉, 100%)가 대상 표적 세포일 수 있다. 이에, 임의의 세포 수가 본 발명의 맥락에서 포함된다. 특정 구현예에서, 세포와 입자의 최대 접촉을 확보하기 위해, 입자 및 세포를 함께 혼합하는 부피는 현저하게 줄이는 것이 (즉, 세포의 농도 증가) 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포 약 20억개/ml의 농도를 사용한다. 다른 구현예에서, 세포 1억개/ml을 초과하는 농도로 사용된다. 추가적인 구현예에서, 10,000,000, 15,000,000, 20,000,000, 25,000,000, 30,000,000, 35,000,000, 40,000,000, 45,000,000 또는 50,000,000개/ml의 농도로 사용된다. 또 다른 구현예에서, 세포 75,000,000, 80,000,000, 85,000,000, 90,000,000, 95,000,000 또는 100,000,000개/ml의 농도로 사용된다. 추가적인 구현예들에서, 세포 125,000,000 또는 150,000,000개/ml의 농도로 사용될 수 있다. 고 농도의 사용은 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 증폭의 증가를 달성할 수 있다. 나아가, 세포 고 농도로의 사용은 CD28-음성 T 세포와 같은 대상 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포를 보다 효과적으로 포획할 수 있게 한다. 이러한 세포 집단은 치료학적 가치가 있을 수 있으며, 특정 구현예에서 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 세포를 고 농도로 사용함으로써, CD28을 정상적으로 더 약하게 발현하는 CD8+ T 세포를 보다 효과적으로 선별할 수 있다.

[0378] 본 발명의 일부 구현예에서, 혼합물은 수시간 (약 3시간) 내지 약 14일 또는 이들 범위에 속하는 임의의 매 시간 동안 배양할 수 있다. 다른 구현예에서, 혼합물은 21일 동안 배양할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 비드와 T 세포는 약 8일 동안 함께 배양한다. 다른 구현예에서, 비드와 T 세포는 약 2-3일 동안 함께 배양한다. 또한, T 세포의 배양 시간이 60일 이상일 수 있도록 자극 사이클을 수회 수행하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포 배양에 적합한 조건은, 혈청 (예를 들어, 소 태아 혈청 또는 인간 혈청), 인터루킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF- β 및 TNF- α 또는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 세포 증식을 위한 임의의 기타 첨가제를 비롯하여, 증식 및 생존에 필수적인 인자를 함유할 수 있는 적정 배지 (예, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 X-vivo 15, (Lonza))를 포함한다. 세포 증식을 위한 기타 첨가제로는, 비-제한적으로, 계면활성제, 플라스마네이트 (plasmanate) 및 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올과 같은 환원제 등이 있다. 배지는, 아미노산, 소듐 피루베이트 및 비타민이 첨가되고, 무-혈청성 또는 적량의 혈청 (또는 혈장)이 또는 지정된 세트의 호르몬 및/또는 T 세포의 증식 및 증폭에 충분한 소정량의 사이토카인(들)이 보충된, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 및 X-Vivo 20, Optimizer를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어, 페니실린 및 스트렙토마이신이 실험 배양물에 유일하게 함유되고, 개체에 주입할 세포 배양물에는 함유되지 않는다. 표적 세포는 증식을 유지하는데 필요한 온도, 예를 들어 적절한 온도 (예, 37°C) 및 분위기 (예를 들어, 공기 + 5% CO₂)에서 유지한다.

[0379] 다양한 자극 시간 동안 노출된 T 세포는 여러가지 특징들을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 성분채집술을 거친 말초혈 단핵 세포 산물은 헬퍼 T 세포 집단 (¼, CD4+)이 세포독성 또는 억제자 T 세포 집단 (Tc, CD8+)보다 더 많이 존재한다. CD3 및 CD28 수용체로의 자극에 의한 T 세포의 생체의 증폭시, 약 8-9일 전에는, 주로 ¼ 세포로 구성된 T 세포 집단이 생성되고, 약 8-9일 후에는, T 세포 집단은 점점 증가된 Tc 세포 집단을 포함한다. 이에, 치료 목적에 따라, 주로 TH 세포를 포함하는 T 세포 집단을 개체에 주입하는 것이 유익

할 수 있다. 마찬가지로, Tc 세포의 항원-특이적인 서브세트가 단리된다면, 이 서브세트를 더 높은 정도로 증폭시키는 것이 유익할 수 있다.

[0380] 나아가, CD4 및 CD8 마커 외에도, 다른 표현형 마커도 현저하게 다르지만, 대부분 세포 증폭 공정 중에 재현가능하다. 따라서, 이러한 재현성은 특정 목적에 맞게 활성화된 T 세포를 조정할 수 있게 한다.

[0381] 치료학적 적용

[0382] 일부 구현예에서, 본 발명은 항원 인지 도메인 (예를 들어, BCMA에 특이적인 scFv), 막관통 도메인 (예를 들어, CD8 막관통 도메인) 및 세포질 도메인 (예를 들어, CD3-zeta, CD28, OX40, 4-1BB의 세포내 도메인 또는 이들의 임의 조합)을 겸비한 CAR을 발현하도록 변형된 세포 (예, T 세포)를 포함한다. 따라서, 일부 경우에, 형질도입된 면역 세포 (예를 들어, T 세포)는 CAR-매개 면역 (예를 들어, T-세포) 반응을 끌어낼 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명은 종양 항원에 대한 1차 T 세포의 특이성을 재지시하기 위한 CAR의 용도를 제공한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명은 또한 포유류에 CAR을 발현하는 T 세포를 투여하는 단계를 포함하며; 상기 CAR이 미리 결정된 표적 (예, BCMA)과 특이적으로 상호작용하는 결합 모이어티, 예를 들어 인간 CD3ζ의 세포내 도메인을 포함하는 ζ쇄 부분 및 공동 자극 신호전달 영역을 포함하는, 포유류에서 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 T 세포가 CAR을 발현하도록 유전자 변형되고 그 CAR T 세포가 이를 필요로 하는 수용자에게 주입되는, 일종의 세포 요법을 포함한다. 주입된 세포는 수용자에서 종양 세포를 사멸시킬 수 있다. CAR T 세포는, 항체 요법과는 다르게, 생체내에서 복제할 수 있어, 지속적인 종양 방제를 유도할 수 있는 장기간의 존속성이 달성된다.

[0383] 임의의 특정 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, CAR-변형된 T 세포에 의해 발생된 항-종양 면역 반응은 능동 또는 수동 면역 반응일 수 있다. 또한, CAR 매개 면역 반응은, CAR-변형된 T 세포가 CAR에서 항원 결합 모이어티에 특이적인 면역 반응을 유도하는, 입양 면역요법 방식의 일부일 수 있다. 예를 들어, BCMA-특이적인 CAR T 세포는 BCMA를 발현하는 세포에 대해 면역 반응을 발생시킨다. 본 발명에 기술된 데이터는 항-BCMA scFv, CD8 막관통 도메인, 및 41BB, CD28 및 CD3ζ의 신호전달 도메인을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 언급하지만, 본 발명은 본 발명의 도처에 기술된 바와 같은 구조체의 구성성분들 각각에 대한 몇가지 변형들을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 본 발명은 항원 결합 모이어티에 특이적인 CAR-매개 T 세포 반응을 구축하기 위한 CAR에서의 임의의 항원 결합 모이어티의 용도를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 CAR에서 항원 결합 모이어티는 암을 치료하기 위한 목적으로 종양 항원을 표적화할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CAR의 항원 결합 모이어티 부분은 다발성 골수종과 같은 특정 암을 치료하도록 설계된다.

[0384] 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 또한 포유류에서 생체의 면역화 및/또는 생체내 요법을 위한 일종의 백신으로서 제공할 수 있다, 바람직하게는, 포유류는 인간이다.

[0385] 생체의 면역화와 관련하여, 세포를 포유류에 투여하기 전에 하기 중 한가지 이상이 시험관내에서 이루어진다: i) 세포의 증폭, ii) CAR 코딩 핵산의 세포로의 도입, 및/또는 iii) 세포의 냉동보존. 생체의 공정들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 아래에서 보다 상세히 기술된다. 간략하게는, 포유류 (바람직하게는, 인간)로부터 세포를 단리하고, 본 발명에 기술된 CAR을 발현하는 벡터로 유전자 변형 (예를 들어, 시험관내 형질도입 또는 형질감염)을 수행한다. CAR-변형된 세포는 포유류 수용자에게 투여하여, 치료학적 이점을 제공할 수 있다. 포유류 수용자는 인간일 수 있으며, CAR-변형된 세포는 수용자의 자가의 것일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수용자에 대해 동종이게, 동계 또는 이종일 수 있다.

[0386] 조혈 줄기 및 전구 세포의 생체의 증폭 공정은 미국 특허 5,199,942에 기술되어 있으며, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함되며, 본 발명의 세포에 적용할 수 있다. 다른 적합한 방법들이 당해 기술 분야에 공지되어 있으므로, 따라서 본 발명은 임의의 특정한 생체의 세포 증폭 방법으로 제한되진 않는다. 간략하게는, T 세포의 생체의 배양 및 증폭은, (1) 포유류의 말초혈 수확물 또는 골수 외식편으로부터 CD34+ 조혈 줄기 세포 및 전구 세포를 수집하고; (2) 이 세포를 생체의 증폭시키는 것을 포함한다. 미국 특허 5,199,942에 기술된 세포 성장인자 외에도, flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드와 같은 다른 인자들도 세포 배양 및 증폭을 위해 이용할 수 있다. 생체의 면역화 측면에서 세포-기반의 백신을 이용하는 것 외에도, 본 발명은 또한 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 발생시키기 위한 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0387] 일반적으로, 본 발명에 기술된 바와 같이 활성화 및 증폭된 세포는 암에 걸린 개체와 같이 면역약화 개체에서 발생하는 질환을 치료 및 예방하는데 유용할 수 있다. 특히, 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 다발성 골수종을 치료하는데 이용된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 세포는 다발성 골수종 발병 위험이 있는 환자를 치료하는데

이용된다.

- [0388] 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포 (예를 들어, CAR T 세포) 또는 이를 포함하는 조성물은, 필요한 개체에 사용하거나 또는 투여하여, 항-종양 면역을 제공하거나; 암을 치료 또는 예방하거나 또는 자가면역성 병태를 치료 또는 예방하거나; 알레르기성 병태를 치료 또는 예방할 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병 또는 교모세포종이다. 일부 구현예에서, 자가면역성 병태는 중증 근무력증, 전신성 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 천포창, 건선, 염증성 장 질환, 셀리악 스프루, 악성 빈혈, 특발성 혈소판감소증 자반병, 경피증, 그레이브스 질환, 쇼그렌 증후군, 굿파스처 증후군 또는 1형 당뇨병이다. 일부 구현예에서, 알레르기성 병태는 아나필락시스, 천식, 식품 알레르기, 쏘는 곤충의 알레르기, 약물 알레르기, 알레르기성 비염, 두드러기, 혈관부종, 습진, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염 및 호산성 식도염이다.
- [0389] 본 발명의 CAR-변형된 면역 세포 (예를 들어, CAR T 세포)는 단독으로 또는 희석제 및/또는 IL-2 또는 기타 사이토카인 또는 세포 집단과 같은 다른 구성성분들과 조합하여 조성물 (예를 들어, 약학적 조성물)로서 투여할 수 있다. 간략하게는, 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명에 기술된 표적 세포 집단을 하나 이상의 약제학적 또는 생리화적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 중성의 완충화된 염수, 포스페이트 완충화된 염수 등의 완충제, 글루코스, 만노스, 슈크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 만니톨 단백질; 폴리펩타이드 또는 아미노산, 예컨대 글리신 항산화제; 킬레이트제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온 보강제 (예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드); 및 보존제를 포함할 수 있다.
- [0390] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여 용도로 제형화된다.
- [0391] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 (또는 예방할) 질환에 적절한 방식으로 투여할 수 있다. 적절한 투여량은 임상 실험을 통해 정할 수 있지만, 투여 양 및 투여 빈도는 환자의 상태 및 환자 질환의 유형과 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.
- [0392] "면역학적 유효량", "항-종양 유효량", "종양-저해 유효량" 또는 "치료학적 양"이 언급되는 경우에, 투여할 본 발명의 조성물의 정확한 양은 의사가 환자 (개체)의 나이, 체중, 종양 크기, 감염 정도 또는 전이 및 상태를 고려하여 결정할 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 기술된 CAR-변형된 면역 세포 (예를 들어, CAR T 세포)를 포함하는 약학적 조성물은 투여량 범위에 속하는 모든 정수 값을 비롯하여, 10^4 내지 10^9 세포/체중 kg, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 세포/체중 kg의 투여량으로 투여할 수 있는 것으로, 일반적으로 언급할 수 있다. T 세포 조성물은 또한 이 투여량으로 여러 번 투여할 수 있다. 세포는 면역요법에서 통상적으로 공지된 주입 기법을 이용해 투여할 수 있다 (예를 들어, Rosenberg *et al.*, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988 참조). 특정 환자에 대한 최적의 투여량과 치료 용법은 의학 기술 분야의 당업자가 질환의 징후를 환자에서 모니터링하고 그에 따라 치료를 적정함으로써 쉽게 결정할 수 있다.
- [0393] 특정 구현예에서, 개체에 활성화된 면역 (예, T 세포)를 투여한 다음 혈액을 재조정하고 (또는 성분채집술을 수행하고), 본 발명에 따라 이로부터 T 세포를 활성화하고, 이러한 활성화 및 증폭된 T 세포를 환자에게 다시 주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 과정은 수주마다 수회 수행할 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 10cc 내지 400cc의 혈액 채혈물로부터 활성화할 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 혈액 채혈물 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc 또는 100cc로부터 활성화된다. 이론으로 결부되는 것은 아니지만, 이러한 여러 번의 혈액 채혈/수회 재주입 프로토콜을 이용해 T 세포의 특정 집단을 선별할 수 있다.
- [0394] 본 조성물의 투여는, 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, T 세포, 주입, 생착 또는 이식 등의 임의의 편리한 방식으로 수행할 수 있다. 본 발명에 기술된 조성물은 환자에게 피하, 진피내, 종양내, 림프절내, 수질내, 근육내, 정맥내 (i.v.) 주사 또는 복막내로 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 면역 세포 (예를 들어, T 세포) 조성물은 환자에게 진피내 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 면역 세포 (예를 들어, T 세포) 조성물은 바람직하게는 i.v. 주사에 의해 투여된다. 면역 세포 (예를 들어, T 세포) 조성물은 종양, 림프종 또는 질병 부위에 직접 주사할 수 있다.
- [0395] 본 발명의 특정 구현예에서, 본 발명에 기술된 방법 또는 그외 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용해 활성화 및 증폭된 세포는, T 세포가 치료학적 수준까지 증폭되면, 환자에게, 비-제한적으로, 항바이러스 요법, 시도포비르 (cidofovir) 및 인터루킨-2, MS 환자에 대한 시타라빈 (ARA-C라고도 함) 또는 나탈리주맙 (natalizumab) 치료 또는 건선 환자에 대한 에팔리주맙 (efalizumab) 치료 또는 PML 환자에 대한 기타 치료 등의 제제를 이용한 치료를 비롯하여, 여러가지 적절한 치료 용법과 조합하여 (예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에게 투여한다. 추가적인 구현예들에서, 본 발명의 T 세포는 화학요법, 방사선, 사이클로스포린, 아자티오프린,

메토트렉세이트, 미코페놀레이트 및 FK506과 같은 면역억제제, 항체, 또는 기타 면역제거제, 예를 들어, CAMPATH (알렘투주맵), 항-CD3 항체 또는 기타 항체 요법, 사이토카인, 플루다리빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 사이토카인 및 방사선 조사와 조합하여, 이용할 수 있다. 이들 약물은 칼슘 의존적인 포스파타제 칼시뉴린 (사이클로스포린 및 FK506)을 저해하거나, 또는 성장인자 유도된 신호 전달에 중요한 p70S6 키나제를 저해한다 (라파마이신). 추가적인 구현예에서, 본 발명의 세포 조성물은, 골수 이식, 플루다리빈, 외부 빔 조사 요법 (XRT), 사이클로포스파미드와 같은 화학요법제를 이용한 T 세포 제거 요법 또는 OKT3 또는 CAMPATH®와 같은 항체와 조합하여 (예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 세포 조성물은 CD20과 반응하는 물질, 예를 들어, RITUXAN 등의 B 세포 제거 요법 후 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 개체는 고용량의 화학요법으로 표준 치료를 시술받은 다음 말초혈 줄기 세포 이식을 수행할 수 있다. 특정 구현예에서, 개체는 이식한 후, 본 발명의 증폭된 면역 세포를 주입받는다. 부가적인 구현예에서, 증폭된 세포는 수술 전 또는 수술 후 투여된다.

[0396] 인간 투여를 위한 투여량 조정은 당해 기술 분야에서 허용되는 실무에 따라 수행할 수 있다. 예를 들어, CAMPATH의 투여량은 일반적으로 성인 환자에 대해 1 내지 약 100 mg 범위일 것이며, 통상적으로 1-30일 동안 매일 투여된다. 일일 투여량은, 일부 경우에 1일 당 최대 40 mg의 더 고용량 (미국 특허 번호 6,120,766)이 사용될 수도 있지만, 바람직한 일일 투여량은 1-10 mg이다. CAR T 세포의 투여 및 일정 전략은 개시된 바 있다 (Ertl *et al.*, 2011, Cancer Res, 71:3175-81; Junghans, 2010, Journal of Translational Medicine, 8:55).

[0397] 당해 기술 분야의 당업자는, 추가적인 노력없이도, 전술한 내용을 토대로 본 발명은 최대 범위로 활용할 수 있는 것으로 간주된다. 따라서, 후술한 특정 구현예들은 단순 예로 해석되어야 하며, 본 발명의 내용들은 어떠한 방식으로든 제한하지 않는 것으로 해석되어야 한다. 본 발명에 언급된 모든 간행물들은 본 발명에 언급된 목적 또는 내용에 대해 원용에 의해 포함된다.

[0398] **실시예**

[0399] 본 발명에 기술된 본 발명이 보다 충분히 이해될 수 있도록, 후술한 실시예들을 제공한다. 본 발명에 기술된 합성 예들은 본 발명에 제공된 화합물과 방법을 예시하기 위해 제공되는 것일 뿐 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0400] 달리 정의되지 않은 한, 본 발명에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들이 통상적으로 이해하는 의미와 동일한 의미를 가진다. 본 발명에 기술된 내용과 유사하거나 또는 등가인 임의의 방법 및 물질은 본 발명을 검사하기 위한 실무에 사용할 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법은 본 발명에 기술된다. 본 발명을 기술 및 주장함에 있어, 하기 용어가 사용될 것이다.

[0401] **실시예 1: 본 발명의 mRNA 구조체로부터 기능성 CAR T 세포의 제조.**

[0402] 본 발명의 CAR 단백질을 코딩하는 본 발명의 mRNA 구조체를 이용해 인간 CAR T 세포를 생산하였다. CAR T 세포는 생존가능하고, BCMA에 결합하고, BCMA+ 종양 세포를 살상하는 것으로 관찰되었다.

[0403] 서열번호 31의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 본 발명의 mRNA 구조체를 DNA 플라스미드로부터 시험관내 전사에 의해 구축하였다. 시험관내 전사는 선형화된 플라스미드 주형으로부터 T7 RNA 중합효소에 의해 수행하였으며, 아데닌 뉴클레오타이드 약 150개로 된 폴리아데닌 꼬리를 효소를 통해 추가하였다. mRNA 공동-전사 합성 중에 mRNA의 5' 말단에 7-메틸구아노신 캡을 부착하였다.

[0404] 본 발명의 mRNA 구조체는, 5'에서 3' 방향으로, 5' 캡, 서열번호 74에 나타난 5' UTR, 서열번호 112에 나타난 오픈 리딩 프레임 (ORF), 서열번호 92에 나타난 3' UTR 및 아데닌 150개 이상으로 된 3' 폴리아데닌 꼬리로 구성되었다. 이 ORF는 본 발명의 CAR 단백질을 서열번호 21의 아미노산 서열로 코딩한다.

[0405] mRNA 구조체로부터 CAR T 세포를 제조하기 위해, 건강한 인간 공여자로부터 성분채집술을 통해 림프구를 수득하였다. 이 림프구로부터, CD8+ T 세포를 항-CD8 항체가 접합된 상자성 미세비드를 사용해 양성 선별하였다. 이로써, 95%가 CD8+ T 세포이고 95%가 생존 가능한 세포가 수득되었다. 이러한 농화된 CD8+ T 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 항-CD3 항체 (클론 OKT3)의 존재 하에 약 14일간 인큐베이션하여, 증폭시켰다. 이들 세포를 P3 형질감염 완충제 (Lonza)에 재현탁하고, mRNA 구조체를 전기전공 (4D Nucleofector®, Lonza)에 의해 제조사의 지침에 따라 수행하여 형질감염시켰다. 그런 후, 세포를 다시 회수하여 IL-15가 함유된 표준 배지에서 약 8시간 동안 배양하였다.

[0406] 상기한 공정으로부터 수득한 CAR T 세포에서 생존성, CAR 단백질 발현, BCMA 결합 및 세포독성, 즉 BCMA+ 골수

중 (종양) 세포를 사멸시키는 능력에 대해 조사하였다. 생존 능력, CAR 발현 및 BCMA 결합성을 GUAVA® EASYCYTE®12HT 유세포 측정기 (EMD Millipore)에서 유세포 측정에 의해 측정하였다. 생존 능력을 조사하기 위해, CAR T 세포의 샘플을 프로피듐 아이오다이드와 혼합하고, 근적외선 채널에서 형광성에 대해 전기적 게이팅으로 유세포 측정기를 운영하였다. CAR 단백질 발현 및 BCMA 결합성을 조사하기 위해, CAR T 세포의 샘플을 0.4 µg/mL 피코에리트린 (PE)-접합된 BCMA (재조합 인간 TNFRSF17 단백질, Fc/His-태그, R-PE 표지됨; Creative Biomart, Shirley, NY)와 인큐베이션하였다. CAR 발현은, CAR-양성 및 CAR-음성 세포에서 BCMA-PE로부터 방출의 존재 또는 부재를 검출하기 위해 노란색 채널에서 형광성에 대해 전기적 게이팅을 이용해 유세포 측정기에서 분석하였다. 표지된 CAR-양성 세포에 결합된 BCMA-PE의 상대적인 양을 확인하기 위해 노란색 채널에서 형광 세기를 측정하여 BCMA 결합성을 결정하였다. 생존 능력, 발현 및 BCMA 결합성 분석에서는, mRNA 없이 전기천공한 CD8+ T 세포 (CAR-음성 T 세포)를 병렬 대조군으로 조사하였다.

[0407] CAR T 세포가 BCMA+ 골수종 세포를 살상하는 능력을 조사하기 위해, CAR T 세포를 녹색 형광 단백질 (MM.1S-GFP)을 발현하는 BCMA+ 골수종 세포주와 함께 인큐베이션하였다. 50,000 MM.1S-GFP 종양 세포의 분액을 96웰 플레이트의 웰들에 첨가하였다. CAR T 세포 약 2500-50,000개를 각 세포에 첨가하여, 약 1:1에서 1:20의 다양한 작동자:표적 비율 (즉, CAR T 세포 : BCMA+ 골수종 세포의 비율)을 구축하였다. 밤새 인큐베이션한 후, 프로피듐 아이오다이드를 사용해 죽은 세포를 염색하였다. 생존가능한 표적 세포를 식별하여, 세포 밀도로 유세포 측정을 통해 결정하였다. CAR T 세포에 의한 골수종 세포의 사멸 정도는, CAR T 세포를 함유하지 않은 동시적인 대조군 웰에서 웰내 골수종 세포의 수와 비교하여 계산하였다. 그 결과는, 세포 생존 능력, CAR 발현, 형질감염 후 24시간 경과시 서열번호 31의 CAR을 이용해 구축된 CAR T 세포 또는 대조군 (mRNA 무처리)에 의한 BCMA 결합성 뿐만 아니라 BCMA+ 골수종 (종양) 세포의 사멸 %를 나타낸, 도 1 및 표 2에 기술한다.

표 2

[0408]	생존 능력*	CAR+ 세포 (%) *	BCMA 결합성 (MFI) *	사멸 % **
CAR T 세포	83.9	86.6	1333	94.4
대조군 CD8+ T 세포 (mRNA 없이 전기천공)	90.9	1.8	20	0

[0409] 표 2 - 세포 생존 능력, CAR 발현, 서열번호 31의 CAR을 이용해 구축된 CAR T 세포에 의한 BCMA 결합성 및 CMA+ 골수종 (종양) 세포의 사멸 %에 대한 분석. * 형질감염 후 4시간 경과시 측정. ** 사멸 분석에서 작동자:표적 비율 1:10 (사멸 분석은 4일 동안 인큐베이션함).

[0410] 결론적으로, mRNA 구조체를 이용해 CAR T 세포를 제조하였다. mRNA 구조체는 본 발명의 CAR 단백질을 코딩하였다. CAR T 세포는 높은 생존 능력, CAR 단백질 발현, BCMA 결합성 및 BCMA+ 골수종 (종양) 세포의 사멸을 나타내었다. mRNA 구조체 없이 전기천공한 CD8+ T 세포는 본질적으로 CAR을 발현하지 않으며, 본질적으로 BCMA에 결합하지 않으며, 종양 세포를 살상하지 않았다.

[0411] 실시예 2: CAR 상보성 결정부의 아미노산 치환.

[0412] 특성이 개선된 CAR을 구축하기 위해, 항-BCMA CAR의 상보성 결정부 (CDR)에 다양한 아미노산 치환을 도입하였다. 우연히도, 이러한 변형들이 BCMA 결합성 및 CAR T 세포에 의한 종양 사멸을 Ali *et al.* (2016)의 임상 실험에 사용된 각각의, 즉 서열번호 19의 CAR 및 CAR T 세포와 비교해 실질적으로 개선시켰다.

[0413] 기준 서열로서 서열번호 29를 사용해 다수의 CAR-코딩 mRNA 구조체를 제조하였다. 새로운 구조체들은 하나 이상의 CDR내 하나 이상의 아미노산 잔기들에 있어 다양하였다.

[0414] 이하, 표 3은 본 실시예에서 언급되는 mRNA 구조체를 제공한다. 표 3은 중쇄 CDR 3종 및 경쇄 CDR 3종 각각에 함유된 서열 단편 및 해당 모 서열을 표시한다: CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3. CAR의 scFv에 대응되거나 또는 실질적으로 대응되는 CAR 영역들은 표 3에서 "새로운 scFv 서열"로 언급된다.

표 3

[0415]		중쇄			경쇄		
새로운 scFv 서열	scFv 프레임워크의 모 서열	CDRH 1	CDRH 2	CDRH 3	CDRL 1	CDRL 2	CDRL 3
48	48	1	4	7	10	12	16

57	57	1	4	7	10	12	16
60	60	1	4	7	10	12	16
62	57	3*	4	7	10	12	16
63	57	1	4	8*	10	12	16
64	57	1	4	7	11*	14*	17*
65	57	1	4	7	11*	14*	18*
66	57	2*	6*	9*	10	12	16
67	57	3*	5*	8*	10	12	16
68	57	3*	4	9*	10	12	18*
69	57	2*	6*	9*	11*	13*	17*
70	57	1	4	7	10	15*	16

[0416] 표 3 - 모 서열과 대응되는 CDR 서열을 비롯한 "새로운 scFv" 서열에 대한, 서열 식별 번호(서열번호) 목록. 별표 (*)는 모 서열에 대한 아미노산 치환을 표시하며, 서열 ID의 일부가 아니다.

[0417] 각각의 mRNA 구조체에 대해, 실시예 1에 기술된 바와 같이, 인간 CD8+ 세포에 형질감염시켜 CAR T 세포를 제조하였다. 각 mRNA 구조체로부터 제조된 CAR T 세포는, 전기천공 후 3일차에 BCMA 결합성 및 종양 사멸에 대해 실시예 1에 기술된 바와 같이 조사하였다. 결과는 아래 나타낸 표 4에 요약 개시한다.

표 4

새로운 scFv 서열	BCMA 결합성 (임의 단위)	사멸* (사멸 %)
서열번호 48	100 (기준 표준)	46%
서열번호 57	343	85%
서열번호 60	381	83%
서열번호 62	189	3%
서열번호 63	439	78%
서열번호 64	496	26%
서열번호 65	173	86%
서열번호 66	269	81%
서열번호 67	310	0%
서열번호 68	446	7%
서열번호 69	230	77%
서열번호 70	404	83%

[0419] 표 4 - 대응되는 scFv 영역을 발현하는 CAR T 세포를 이용한 BCMA 결합성 결과 및 인간 골수종 세포의 사멸 %.
* 작동자:표적 비율 1:2.

[0420] 따라서, CDR을 변형하고자 하는 몇가지 시도들은, BCMA 결합성을 저하하여, 실패하였다. 그러나, 특정 CAR, 예를 들어 서열번호 57, 서열번호 60, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 69 및 서열번호 70의 서열을 포함하는 것들은 서열번호 19의 최초 CAR과 비교해 CDR 잔기들을 실질적으로 변형시킬 뿐 아니라 CAR 발현 및 인간 골수종 세포의 사멸 능력이 상당히 우수하였다.

[0421] 실시예 3. CAR scFv 프레임워크 영역에서 아미노산 치환에 의한 인간화.

[0422] CAR을 인간화하기 위해 CAR의 scFv 프레임워크 영역에 다양한 아미노산 치환을 도입하였다. 우연히도, 이러한 변형들이 CAR T 세포의 BCMA 결합성 및 종양 사멸성을 Ali et al (2016)의 임상 실험에 사용된 비-인간화된 CAR 즉 서열번호 19의 CAR의 CAR T 세포와 비교해 실질적으로 개선하였다.

[0423] (서열번호 10의 CAR을 코딩하며 서열번호 48의 scFv 서열을 포함하는) 서열번호 29의 mRNA 구조체를 출발 지점으로 하여, 다양한 CAR을 코딩하는 mRNA 구조체들을 제조하였다. 이들 구조체들은 scFv 상보성 결정부 (CDR)에 동일한 또는 실질적으로 동일한 아미노산 잔기를 코딩하지만, scFv 프레임워크 영역에서는 아미노산 잔기가 다양하였다. 이러한 변형의 제조에서, 실험자들은 CAR을 발현하는 CAR T 세포의 BCMA 결합성 및 종양-사멸 특성을 감소시키지 않으면서 scFv 프레임워크 영역을 인간화하고자 하였다. 각각의 mRNA 구조체에 대해, 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 인간 CD8+ 세포로 형질감염시켜 CAR T 세포를 제조하였다. 각각의 mRNA 구조체로부터

터 제조된 CAR T 세포는 전기천공 후 3일차에 BCMA 결합성 및/또는 종양 사멸성을 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 조사하였다.

[0424] 1차 반복 실험에서, CAR의 scFv 프레임워크 잔기에 다양한 변형을 수행하였으며, 그 결과는 표 5에 나타낸다.

표 5

[0425]

scFv 서열	BCMA 결합성 (서열번호 48 기준)
서열번호 48	100 (참조 기준)
서열번호 54	141
서열번호 49	76
서열번호 50	51
서열번호 51	54
서열번호 52	82
서열번호 53	103
서열번호 55	12

[0426] 표 5 - 프레임워크 잔기에 변형을 가진 대응되는 scFv 서열을 발현하는 CAR T 세포를 이용한 BCMA 결합 결과.

[0427] 따라서, scFv 프레임워크를 인간화하고자 하는 몇가지 시도들은 BCMA 결합성의 저하로 인해 실패하였다. 그러나, 서열번호 54의 scFv를 포함하는 CAR은 서열번호 48의 참조 scFv를 포함하는 비교 CAR에 대해 CAR T 세포의 BCMA 결합성이 41% 개선되었다. 따라서, 서열번호 54의 scFv를 추가로 최적화하기 위한 리드로서 선정하였다. 2차 반복 실험에서, CAR의 scFv 프레임워크 잔기에 추가로 다양한 변형을 수행하였으며, BCMA 결합성에 대한 결과는 하기 표 6에 나타낸다.

표 6

[0428]

scFv 서열	BCMA 결합성 (서열번호 54 기준)
서열번호 54	100 (참조 기준)
서열번호 56	58
서열번호 57	124
서열번호 58	40
서열번호 59	79

[0429] 표 6 - 프레임워크 잔기에 추가적인 변형을 가진 대응되는 scFv 서열을 발현하는 CAR T 세포를 이용한 BCMA 결합성 결과.

[0430] scFv 프레임워크를 인간화하고자 하는 몇가지 시도들은 BCMA 결합성의 저하로 인해 실패하였다. 그러나, 서열번호 57의 scFv는 서열번호 54의 scFv에 대해 CAR T 세포의 BCMA 결합성이 24%로 추가로 개선되었다. 따라서, 서열번호 57의 scFv를 포함하는 CAR은 추가로 최적화하기 위한 리드로서 선정하였다.

[0431] 3차 반복 실험에서, 서열번호 57의 scFv를 포함하는 CAR을, (1) 서열번호 48의 최초 scFv를 포함하는 CAR; (2) 서열번호 57에서 추가로 변형된 서열번호 60의 scFv; 및 (3) 서열번호 48의 scFv로부터 독립적인 방법에 의해 개발된, 서열번호 61의 scFv와 비교하였다 (Antibody Humanization by a Single Cycle of CDR-Grafting, Hu *et al.* in Ricin Toxin; Bentham Science Publishers Eds. JW Cherwonwogrodzky). 표 7에 나타낸 하기 결과는 BCMA 결합성 및 종양 사멸을 제시한다.

표 7

[0432]

scFv 서열	BCMA 결합성*	사멸성** (사멸 %)
서열번호 48	100 (참조 기준)	46%
서열번호 57	460	85%
서열번호 60	382	83%
서열번호 61	34	조사하지 않음

[0433] 표 7 - 대응되는 scFv 영역들을 발현하는 CAR T 세포를 이용한 BCMA 결합성 및 인간 골수종 세포의 사멸 %

결과. ** 작동자:표적 비율 = 1:10.

[0434] 마지막으로, 달성된 인간화 수준을 측정하기 위해, 전술한 서열들 각각의 scFv의 프레임워크 영역내 아미노산을 Immunogenetics Database (IMGT)(IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. Lefranc M-P *et al.*, Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43:D413-22)에서 서열들로부터 동정된 서열의 가장 근접한 생식계열 이웃과 비교하였다. 가장 근접한 생식계열 이웃에 대한 평균 아미노산 동일성은 서열번호 48이 78%, 서열번호 57이 84%, 서열번호 60이 88%이었다. 따라서, 일련의 서열 변형 및 분석의 결론으로서, 서열번호 57 및 서열번호 60의 scFv를 함유한 CAR은 서열번호 19의 최초 CAR과 비교해 scFv 프레임작기에서 실질적으로 인간화되었을 뿐 아니라 BCMA 결합성 및 종양 사멸이 현저하게 개선되었다.

[0435] 실시예 4. 인간화된 프레임워크 및 CDR 영역을 함유한 CAR 조합.

[0436] 실시예 2 및 3에 나타난 CDR 서열 및 인간화된 scFv 프레임워크로 된 다양한 조합들을 조사하기 위한 실험을 수행하였다. 목적은 다양한 조합들 중 어느 것이 우수한 BCMA 결합성 및 종양 사멸성을 제공하는 지를 확인하는 것이었다. 본 실시예의 서열들에 대한 참조 표를 아래에 제시한다. 표에 나타난 각각의 조합에서, CAR T 세포는 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하여 검사하였다. 비교하기 위해, Ali *et al* (2016)의 것, 즉 서열번호 19의 것에 대응되는 CAR 단백질을 이용해 CAR T 세포를 제조하였다.

[0437] 표 8은 중쇄 CDR 3개 및 경쇄 CDR 3개 각각에 함유된 서열 단편 및 해당 모 서열을 표시한다: CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3.

표 8

[0438]

전장 CAR 서열	scFv 프레임워크의 모 서열	중쇄			경쇄		
		CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
19	48	1	4	7	10	12	16
28	60	1	4	7	10	12	16
20	60	2*	6*	9*	11*	14*	17*
21	60	2*	6*	9*	11*	14*	17*
22	60	2*	6*	9*	11*	14*	18*
23	60	2*	6*	9*	11*	14*	18*
24	60	1	4	8*	10	15*	17*
25	60	1	4	8*	10	15*	17*

[0439] 표 8 - scFv 프레임워크의 모 서열과 대응되는 CDR 서열을 비롯한 "전장 CAR" 서열에 대한, 서열 식별 번호(서열번호) 목록. 별표 (*)는 모 서열에 대한 아미노산 치환을 표시하며, 서열 ID의 일부가 아니다. 서열번호 21, 23 및 25의 CAR 서열은 각각 서열번호 20, 22 및 24에서 41BB 세포내 공동-자극 도메인이 추가된 버전이다.

[0440] 각 mRNA 구조체로부터 제조된 CAR T 세포는 전기천공 후 약 3일차에 BCMA 결합성 및 종양 사멸성에 대해 조사하였다. 그 결과는 표 9에 나타난다.

표 9

[0441]

CAR 서열	BCMA 결합성*	사멸성** (사멸 %)
서열번호 19	100 (참조 기준)	46% (이전 실험)
서열번호 28	377	83%
서열번호 20	189	84%
서열번호 21	439	69%
서열번호 22	496	73%
서열번호 23	173	67%
서열번호 24	269	74%
서열번호 25	310	60%

[0442] 표 9 - 대응되는 CAR 영역들을 발현하는 CAR T 세포를 이용한 BCMA 결합성 및 인간 골수종 세포 사멸 % 결과.

[0443] 따라서, 서열번호 28, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 및 서열번호 25의 인

간화된 구조체들은, 서열번호 19와 비교해, BCMA 결합성 및 인간 골수종 세포에 대한 사멸성이 우수한 CAR T 세포를 제공해주었다.

[0444] 이들 구조체의 scFv에서 조합된 프레임워크와 CDR 영역의 인간화 정도를 Lazar (A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization, Lazar GA. *et al.* Molecular Immunology (2007) 44:1986) 방법을 이용해 측정하여, 인간 가닥 함유율 (Human String Content) 및 퍼펙트 9mer 스코어 (Perfect 9mer score)를 결정하였다. 그 결과는 표 10에 요약 개시한다.

표 10

서열	인간 가닥 함유율	퍼펙트 9mer 스코어
서열번호 19	72%	13
서열번호 28	81%	69
서열번호 20	86%	92
서열번호 21	86%	92
서열번호 22	87%	96
서열번호 23	87%	96
서열번호 24	81%	69
서열번호 25	81%	69

[0446] 표 10 - 인간 가닥 함유율 및 퍼펙트 9mer 스코어를 비롯한, 각각의 지정된 CAR 아미노산 서열에 대한 인간화 정도.

[0447] 인간 가닥 함유율 및 퍼펙트 9mer 스코어에 따르면, 모 서열의 성공적인 인간화가 달성된 것으로 확인되었다. 결론적으로, CAR의 scFv 영역들에 대한 광범위한 일련의 반복적인 실험적인 잔기 변형을 거쳐, 서열번호 CAR에 더해 scFv 영역에서 인간화되었을 뿐 아니라 BCMA 결합성과 골수종 세포의 사멸성이 현저하게 개선된 수개의 CAR이 확보되었다.

[0448] 실시예 5: CAR 공동-자극 도메인에서 아미노산 치환.

[0449] CAR 단백질에서 특정 세포내 공동-자극 도메인의 포함 또는 변형이 CAR 단백질의 발현을 개선하고 대응되는 CAR T 세포에 의한 종양 사멸과 BCMA 결합성을 개선하는지를 조사하기 위해 대조 실험을 수행하였다.

[0450] 복수의 mRNA 구조체들을 제조하였는데, 발현되는 CAR 단백질들은 동일한 신호 펩타이드, scFv, stalk 및 막관통 도메인을 포함하지만 공동-자극 도메인에는 하나 이상의 아미노산 차이를 가지고 있다. mRNA 구조체들 각각에 대해, 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 인간 CD8+ 세포에 형질감염시켜 CAR T 세포를 제조하였다. 각 mRNA 구조체로부터 구축된 CAR T 세포는 전기천공 후 약 24시간 경과시 CAR 발현 및 항-종양성 세포독성을 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 조사하였다. Ali et al (2016)의 임상 실험에 사용된 mRNA 구조체를 대조군 (서열번호 29)으로 조사하였다. mRNA 구조체들과 이들의 발현 결과는 아래 표 11에 나타낸다. 각각의 공동-자극 도메인에 대해 서열번호와 본래의 서열 소스를 나타낸다.

표 11

서열	공동-자극 도메인에 대한 유전자 소스	상대적인 발현	사멸* (사멸 %)
서열번호 29	CD28-CD3z	100 (참조 기준)	50%
서열번호 103	CD28-CD3z	136	52%
서열번호 107	CD3z	206	64%
서열번호 104	41BB-CD3z	197	58%
서열번호 105	OX40-CD3z	214	46%
서열번호 106	41BB-OX40-CD3z	217	43%

[0452] 표 11 - 대응되는 CAR 공동-자극 도메인을 발현하는 CAR T 세포를 이용한 상대적인 발현 및 인간 골수종 세포의 사멸 %. * 작동자:표적 비율 = 1:10.

[0453] CD28-CD3z 도메인을 포함하는 구조체와 비교해, CD3z 단독, 41BB-CD3z, OX40-CD3z 또는 41BB-OX40-CD3z를 포함하는 구조체들이 더 우수한 발현성을 나타내었다. 이러한 결과는, 자연 생성 공동-자극 도메인을 다른 것으로

치환하면 정상적으로는 단백질 발현에 영향을 있을 것이라고 예상되지 않으므로, 예상치 못하였다.

[0454] CD3z 단독 또는 41BB-CD3z인 공동-자극 도메인을 포함하는 구조체들 역시 보다 우수한 BCMA+ 종양 세포 사멸성을 나타내었다. 이들의 상당한 발현에도 불구하고, OX40-CD3z 또는 41BB-OX40-CD3z를 포함하는 구조체들은 CD28-CD3z 도메인을 포함하는 구조체에 비해 열등한 종양 사멸성을 나타내었다.

[0455] 따라서, 공동 자극 영역에서의 변형을 조사한 대조 실험에서, 서열번호 107 및 서열번호 104의 구조체들이 우수한 발현성과 종양 사멸성을 겸비하였다. 발현 개선이 사멸 개선과 반드시 동반되는 것은 아니었다.

[0456] **실시예 6: CAR-코딩하는 mRNA 구조체에서 비번역 영역의 치환.**

[0457] CAR-코딩하는 mRNA 구조체의 5' 및/또는 3' 비번역 영역에서 변형이 인간 T 세포에서 CAR 발현에 어떻게 영향을 미치는 지를 조사하기 위한 실험을 수행하였다.

[0458] 동일한 CAR 단백질 (즉, 서열번호 59의 단백질)을 코딩하지만 5' 및/또는 3' 비번역 영역 (UTR)의 뉴클레오타이드 서열은 상이한 여러가지 mRNA 구조체들을 제조하였다. 이들 구조체들은, 예를 들어, 5' 캡 및 폴리아데닌 꼬리 영역은 동일하였다. 하나 이상의 인간 유전자, 예를 들어 CD3D 및 CD8B2 유전자에서 자연적으로 생성되는 서로 다른 5' 및 3' 서열을 통합한 수종의 구조체들을 비교하고자 하였다.

[0459] 한가지 구조체의 경우, 3' UTR이 아닌 *GATA3* 유전자 (즉, 서열번호 92)의 ORF에서 발생하는 뉴클레오타이드 218개 영역을 3' UTR로 사용하였으며, 특히 잘 작동하였다.

[0460] mRNA 구조체 각각에서, 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 CAR T 세포를 구축하였다. 형질감염한지 약 24 시간 후, 각 mRNA 구조체로부터 제조된 CAR T 세포들에서 실질적으로 실시예 1에 기술된 방법을 통해 CAR 발현 수준을 조사하였다. mRNA 구조체 및 이의 발현 결과를 아래 표 12에 나타낸다. 각 구조체에 대해 해당 서열번호와 서열의 천연 소스를 표기한다.

표 12

[0461]

구조체	5' UTR 서열 (천연 소스)	CAR ORF 서열	3'UTR 서열 (천연 소스)	상대적인 발현*
A	서열번호 77 (CD3D)	서열번호 59	서열번호 87 (CD3D)	100
B	서열번호 75 (CD8B2)	서열번호 59	서열번호 87 (CD3D)	146
C	서열번호 75 (CD8B2)	서열번호 59	서열번호 89 (MYH8)	63
D	서열번호 74 (IgG)	서열번호 59	서열번호 86 (AFP)	103
E	서열번호 74 (IgG)	서열번호 59	서열번호 87 (CD3D)	165
F	서열번호 74 (IgG)	서열번호 59	서열번호 92 (GATA3 ORF)	264
G	서열번호 74 (IgG)	서열번호 59	서열번호 84 (IgG)	136
H	서열번호 74 (IgG)	서열번호 59	서열번호 89 (MYH8)	70

[0462] 표 12 - 지정된 5' 및 3' UTR 서열 조합을 이용한 서열번호 59 (Y34)의 CAR의 상대적인 발현. GATA3의 오픈 리딩 프레임 (ORF)인 서열번호 92의 서열은 특히 잘 작동하여, 발현이 개선되었다. * 구조체 A = 100에 대해 표준화한 평균 형광 강도. IgG = IgG 중쇄, 14번 염색체.

[0463] 5' UTR의 경우, 서열번호 74는 (구조체 A, B 및 E와 비교하여) 최대 발현이 달성되었다. 3' UTR의 경우, 서열번호 92가 (구조체 E 및 F와 비교하여) 최대 발현이 달성되었다.

[0464] 결론적으로, CAR-코딩하는 mRNA 구조체의 5' 및/또는 3' UTR 비번역 영역에서의 변형이 인간 T 세포에서의 CAR 발현에 어떻게 영향을 미치는지를 실험에서 조사하였다. 이전에 동일하게 합리적으로 보이는 수종의 대안들 중에서, 구조체 F가 다른 구조체 7종의 평균 발현과 비교해 2.6배 더 우수한 최상의 발현성을 보였다. 구조체 F의 탁월한 성능은 서열번호 74의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' UTR과 서열번호 92의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' UTR의 함유가 그 이유였다.

[0465] 이러한 결과는, 서열번호 92가 자연 생성 UTR이 아니라는 점에서, 놀라웠다. 구조체 F에 함유된 서열번호 92는 CAR 발현을 증가시키기보다는 오히려 감소시킬 것으로 예상되었다.

[0466] **실시예 7: CAR-코딩하는 mRNA 구조체에 대한 개선된 폴리아데닌 꼬리.**

[0467] CAR-코딩하는 mRNA 구조체에 특정 3' 폴리아데닌 꼬리의 부가를 조사하기 위해 대조 실험을 수행하였다.

[0468] 항-BCMA CAR 단백질을 코딩하는 동일한 5' UTR, 오픈 리딩 프레임 및 3' UTR을 포함하지만 뉴클레오타이드 78개 이상으로 된 3' 폴리아데닌 꼬리를 함유하거나 또는 함유하지 않는, 여러가지 mRNA 구조체들을 제조하였다. 각각의 구조체는 정확하게는 서열번호 46, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44 또는 서열번호 45로부터 선택되는 하나의 mRNA 서열을 포함하였다. 각 구조체에서, 폴리아데닌 꼬리는 실시예 2에 기술된 3' UTR과 같이 3' UTR에 대해 3'에 위치하였다. 서열번호 36의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 mRNA 구조체에 효소적으로 폴리아데닐화를 추가로 수행하여, 폴리아데닌 꼬리가 뉴클레오타이드 150개 이상으로 구성된 동일한 mRNA 구조체들을 제조하였다. 각 mRNA 구조체에 대해, 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 인간 CD8+ 세포로 형질감염시켜 CAR T 세포를 제조하였다. 형질감염한지 약 24시간 후, CAR T 세포는 실질적으로 실시예 1에 기술된 방법을 통해 CAR 발현 수준을 조사하였다. 2가지 실험의 결과들은 아래 표 13 및 14에 나타난다.

표 13

구조체	상대적인 발현*		
	폴리A 비함유	78-mer PolyA	개선 배수
서열번호 46	100	578	5.8
서열번호 41	99	310	3.1
서열번호 42	50	210	4.2
서열번호 43	105	222	2.1
서열번호 44	106	335	3.2
서열번호 45	57	425	7.5
평균	86	347	4.3 (p < 0.001)

[0470] 표 13 - 폴리A 꼬리가 없는 CAR 대비, 78-mer 폴리A 꼬리를 가진 전장 CAR들의 상대적인 발현성. 각 CAR 구조체에 대해 발현의 개선 배수가 제공된다. * PolyA가 없는 서열번호 46 = 100에 대해 표준화한 평균 형광 강도.

표 14

구조체	상대적인 발현*		
	78-mer PolyA	>150-mer PolyA	개선 배수
서열번호 36	100	243	2.4

[0472] 표 14 - 78-mer 폴리A 꼬리 또는 A 잔기가 >150개인 폴리A 꼬리를 가진 서열번호 36의 CAR의 발현의 개선 배수. 서열번호 36의 CAR 구조체에 대해 발현의 개선 배수가 제공된다. * 폴리A가 없는 서열번호 46 = 100으로 하여 표준화한 평균 형광 강도. * 78-mer 폴리A를 가진 서열번호 36 = 100으로 하여 표준화한 평균 형광 강도.

[0473] 따라서, 직접적인 실험 비교에서, mRNA 구조체에 78-mer 폴리아데닌 꼬리의 함유가 본 발명의 CAR 단백질의 발현을 4.3배 개선하는 것으로 확인되었다 (p < 0.001). 78-mer와 비교해, >150-mer 폴리아데닌 꼬리의 함유는 CAR 발현을 2.4배까지 추가로 개선하였다.

[0474] 실시예8: CAR-코딩하는 mRNA 구조체에서 뉴클레오타이드의 동의 치환.

[0475] CAR-코딩하는 mRNA 구조체의 ORF에 특정 뉴클레오타이드 동의 치환이 항-BCMA CAR T 세포를 구축하는지를 조사하기 위한 대조 실험을 수행하였다.

[0476] ORF가 서열번호 26의 동일한 CAR 단백질을 코딩하지만, ORF의 뉴클레오타이드 서열은 상이한, 즉 뉴클레오타이드 동의 치환의 도입에 의해 상이한, 복수의 mRNA 구조체들을 제조하였다. 서열번호 116의 ORF 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 구조체를 대조군으로 사용하였다. 각 mRNA 구조체에 대해, 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 mRNA를 인간 CD8+ 세포로 형질감염시켜 CAR T 세포를 제조하였다. 형질감염한지 약 24시간 후, CAR T 세포는 실시예 1에 기술된 바와 같이 BCMA 결합성을 조사하였다.

[0477] 서열번호 116의 구조체와 비교해, 서열번호 122의 구조체 (II 새로운 코돈 최적화) 및 서열번호 123 (II dU)은, BCMA 결합성이 각각 1.65배 및 3.43배 높은 CAR T 세포를 생성하였다. 이는, 뉴클레오타이드 동의 치환이 CAR 단백질 서열을 변형한 것은 아니었으므로, 놀라웠다. 결론적으로, CAR-코딩하는 mRNA 구조체의 ORF에 특정 뉴클레오타이드 동의 치환이 CAR T 세포의 BCMA 결합 특성을 개선하였다.

[0478] 실시예 9: CAR 특이성 및 교차-반응성 검사.

[0479] 서열번호 31의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 본 발명의 mRNA 구조체로부터 구축된 CAR T 세포에서, 5528종의 인간 원형질막 단백질 및 세포-표면-고정된 인간 분비형 단백질을 함유한 세포 마이크로어레이 라이브러리 (Retrogenix, High Peak, UK)를 사용해 CAR 상호작용을 조사하였다. mRNA 구조체가 서열번호 35 또는 서열번호 40인 다른 비교 CAR T 세포는, 확증 목적으로 더 소규모 단백질 서브세트에서 조사하였다. CAR가 결핍된 다른 비교 T 세포는 non-CAR-특이적인 상호작용을 조사하는데 이용하였다. 서열번호 31, 서열번호 35 및 서열번호 40의 CAR들 각각은 인간 BCMA와 특이적으로 상호작용하였지만, CAR와 임의의 다른 단백질 간의 상호작용은 관찰되지 않았다. 결론적으로, 본 발명의 CAR 3종은 BCMA에 특이적으로 결합하지만, 다른 항원에는 교차 반응하지 않았다.

[0480] 실시예 10: CAR T 세포 항-종양 활성에 대한 생체내 평가

[0481] 서열번호 30, 서열번호 31 및 서열번호 35의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 본 발명의 mRNA 구조체들로부터 구축된 CAR T 세포를, 인간 골수종 종양 세포의 증식을 동물에서 측정하는 동물 모델에서 검사하였다. 이들 mRNA 구조체들은 각각 서열번호 20, 서열번호 21 및 서열번호 25의 서열을 포함하는 CAR 단백질을 코딩하였다.

[0482] mRNA CAR 구조체를 실시예 1에 기술된 바와 같이 인간 CD8+ 세포에 형질감염시켜, CAR T 세포를 구축하였다. 본 실험에 사용된 음성 대조군은 (1) 비-변형된 CD8+ 세포와 (2) 비히클 단백을 포함하였다. NOD-*scid*-*gamma* (NSG) 마우스에 MM.1S-fluc 인간 골수종 종양 세포 2억개를 접종하였다. 종양의 증식을 일련의 생발광 영상 측정으로 모니터링하였다. 6일차에, 마우스는 비히클, 비-변형된 CD8+ T 세포 또는 서열번호 20, 서열번호 21 또는 서열번호 25의 CAR을 발현하도록 형질감염된 CAR T 세포를 투여하는 것으로 무작위 할당하였다. 도 2는 종양 측정 결과를 도시한다. 11일까지, 종양은 비히클 또는 변형된 CD8+ T 세포 처리 마우스에서 광범위하게 증식하였다. 반면, 서열번호 20 ($p=0.006$), 서열번호 21 ($p=0.01$) 또는 서열번호 25 ($p=0.004$)의 CAR을 발현하도록 형질감염된 CAR T 세포는 종양 증식을 현저하게 저해하였다. 본 발명의 3가지 예, 즉 항-BCMA CAR-코딩하는 mRNA 구조체로부터 구축된 CAR T 세포들은 동물 모델에서 인간 골수종 종양의 증식을 현저하게 저해하였다.

[0483] 실시예 11: CAR T 세포 생존에 대한 mRNA의 효과

[0484] 골수종 환자 2명으로부터 기증받은 세포로부터 구축된 CAR T 세포의 생존에 대한 CAR-코딩하는 mRNA의 효과를 평가하기 위해 대조 실험을 수행하였다. 골수종 환자 2명의 세포로부터 서열번호 31의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 본 발명의 mRNA 구조체를 사용해 각각 구축된 CAR T 세포 lot 2개를, 같은 골수종 환자 2명의 세포로부터 서열번호 29의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 참조 mRNA 구조체를 사용해 각각 구축된 대응되는 CAR T 세포 lot 2개를 비교하였다. 본 발명에 언급된 것을 제외하고는, 각각의 CAR T 세포 lot는 실질적으로 실시예 1에 기술된 방법으로 제조하였다. 세포는 mRNA 전기천공 후 12시간 동안 배양하였으며, 세포를 회수하여 생존 능력을 평가하였다. 결과는 아래에 나타내었다:

표 15

[0485]

		생존성 (%)
서열번호 31	환자 1	90
	환자 2	81
서열번호 29	환자 1	83
	환자 2	67

[0486] 서열번호 29의 CAR T 세포의 생존 능력은 서열번호 31의 CAR T 세포와 비교해 실질적으로 낮았다. 결론적으로, 서열번호 31의 본 발명의 mRNA 구조체는 서열번호 29의 비교 mRNA 구조체보다 CAR T 세포에 더 높은 생존 능력을 부여하였다.

[0487] 실시예 12: 본 발명의 키메라 항원 수용체를 발현하는 영구적으로 변형된 CAR T 세포를 만들기 위한 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템의 이용

[0488] 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템을 사용해 본 발명의 키메라 항원 수용체를 발현하는 영구적으로 변형된 CAR T 세포를 제조하였다.

[0489] EF1a 프로모터, IgG 5'UTR, 서열번호 21의 아미노산 서열을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 및 폴리A 꼬리 요소들을 포함하되, 이들 요소들이 전체로서 슬리핑 뷰티 트랜스포존의 인버티드 말단 리피트들 사이에 위치한, 제1 플라

스미드를 구축하였다 ("Seq-21 트랜스포존 플라스미드"). EF1a 프로모터, IgG 5'UTR, Kozak 컨센서스 서열, SB11을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 및 폴리A 꼬리를 포함하는 제2 플라스미드를 구축하였다 ("SB11 플라스미드").

[0490] 정상적인 인간 공여체로부터 유래된 말초혈 단핵 세포를 행군 후 Seq-21 트랜스포존 플라스미드 단독의 존재 하 또는 Seq-21 트랜스포존 플라스미드와 SB11 플라스미드 둘다 존재하는 조건 하에 완충제 (Lonza)에 재현탁하였다. 세포를 전기천공 (4D Nucleofector®, Lonza)하여, 플라스미드(들)를 세포에 도입하였다. 그런 후, 세포는 CD3/CD28 Dynabeads® (ThermoFisher)를 포함하는 자극 배양물로 옮겼다. 증폭기 동안에, CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 BCMA-PE 시약으로 염색하고 실시예 1에 기술된 바와 같이 유세포 측정을 이용해 CAR 발현을 분석하였다. 14일차까지 T 세포는 30배 증폭되었다. B11 및 Seq-21 트랜스포존 플라스미드 둘다로 변형된 세포에서는 BCMA-PE에 반응성인 세포가 5-10%로 관찰되었다 (도 3A). Seq-21 트랜스포존 플라스미드 단독으로 형질감염한 후 증폭시킨 세포에서는 반응성이 관찰되지 않았다. 살아있는 총 세포에 기반한 세포수에 따라 여러가지 작동자:표적 비율에서, 실시예 1에 기술된 바와 같이, 다발성 골수종 표적 세포주 MM1S-GFP를 이용한 세포독성 분석으로, 기능성 CAR T 세포 활성을 평가하였다. 사이토카인 (인터페론- γ) 생산 역시 작동자:표적 4:1 비율의 공배양 상층물에서 ELISA에 의해 평가하였다. 도 3B는, 특이적인 세포독성 및 인터페론- γ 생산이 Seq-21 트랜스포존 플라스미드 및 SB11 플라스미드에 의해 전달된 항-BCMA CAR을 이용한 영구적인 변형에 부여되지만, Seq-21 트랜스포존 플라스미드 단독에 의해서는 부여되지 않음을 보여주는 9일차 세포 데이터를 나타낸다.

[0491] 따라서, 슬라이핑 뷰티 트랜스포존 시스템을 이용하여 본 발명의 항-BCMA CAR을 발현하는 CAR T 세포를 구축하는데 성공하였다. 이들 세포는 항-BCMA 세포독성 및 사이토카인 분비를 나타내었다. 이들은 CAR을 영구적으로 발현할 것으로 예상된다.

[0492] 본 발명, 예를 들어 배경기술, 요약, 상세한 설명, 실시예 및/또는 참조 섹션에서 언급된 모든 간행물, 특허, 특허 출원, 공개공보 및 데이터 엔트리 (예, 서열 데이터베이스 엔트리)는, 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원, 공개공보 및 데이터베이스 엔트리가 구체적으로 개별적으로 원용에 의해 본 명세서에 포함되는 것과 같이 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 상충될 경우, 본 발명의 임의 정의를 비롯한 본 출원의 내용이 우선할 것이다.

[0493] **균등물 및 범위**

[0494] 당해 기술 분야의 당업자라면, 본 발명에 기술된 구현예들에 대한 여러가지 균등물을 인지하거나 또는 일상적인 수준의 실험을 통해 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 전술한 내용으로 한정되는 것으로 의도되지 않으며, 오히려 첨부된 청구항에 기술된 바와 같다.

[0495] 관사 ("a", "an" 및 "the")는 반대되는 의미이거나 또는 문맥상 명백하지 않은 한 하나 또는 하나 보다 많은 것을 의미할 수 있다. 일 군의 2가지 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 넣어 기술된 청구항 또는 설명은, 반대되는 의미이거나 또는 문맥상 명백하지 않은 한, 그 군에 속하는 구성원들 중 하나, 하나보다 많은 수 또는 전체가 존재한다면, 충족되는 것으로 간주된다. 일 군에서 그 구성원들 2 이상 사이에 "또는" 넣어 기재한 기술은 그 군의 하나의 구성원이 틀림없이 존재하는 구현예, 그 군의 구성원 2개 이상이 존재하는 구현예 및 그 군에 속하는 구성원들이 모두 존재하는 구현예를 나타낸다. 간결하게 기술하기 위해, 이들 구현예들은 본 발명에 개별적으로 기술되진 않았지만, 이들 구현예들 각각이 본 발명에 제공되고 구체적으로 청구되거나 또는 청구되지 않을 수 있는 것으로, 이해될 것이다.

[0496] 본 발명은, 하나 이상의 청구항으로부터 또는 본 발명의 하나 이상의 관련 부분으로부터 하나 이상의 제한, 요소, 절 및 기술 용어가 다른 청구항에 도입되는, 변형, 조합 및 순열을 모두 망라하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 다른 청구항에 대한 종속항은 동일한 기본 청구항에 대한 임의의 다른 종속항에서 확인되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 수정할 수 있다. 아울러, 청구항들이 조성물을 언급할 경우, 달리 지시되거나 또는 모순 또는 불일치가 발생할 것임이 당해 기술 분야의 당업자에게 명백하지 않은 한, 본 발명에 기술된 제조 또는 이용하는 임의 방법에 따라 또는 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 조성물을 제조 또는 이용하는 방법이 있다면 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0497] 요소들이 목록으로, 예를 들어 마쿠쉬 군 형태로 제시된다면, 이들 요소들의 모든 가능한 하위군들 역시 기술되고, 그 군에서 요소들 중 임의 요소 또는 이의 하위군이 제외될 수 있는 것으로, 이해되어야 한다. 또한, 용어 "포함하는"은 열린 의미이며, 부가적인 요소 또는 단계의 포함을 허용하는 것임에 유념한다. 일반적으로, 구현예, 생산물 또는 방법이 특정 요소, 특징 또는 단계를 포함하는 것으로 언급된 경우, 그러한 요소들, 특징들 또

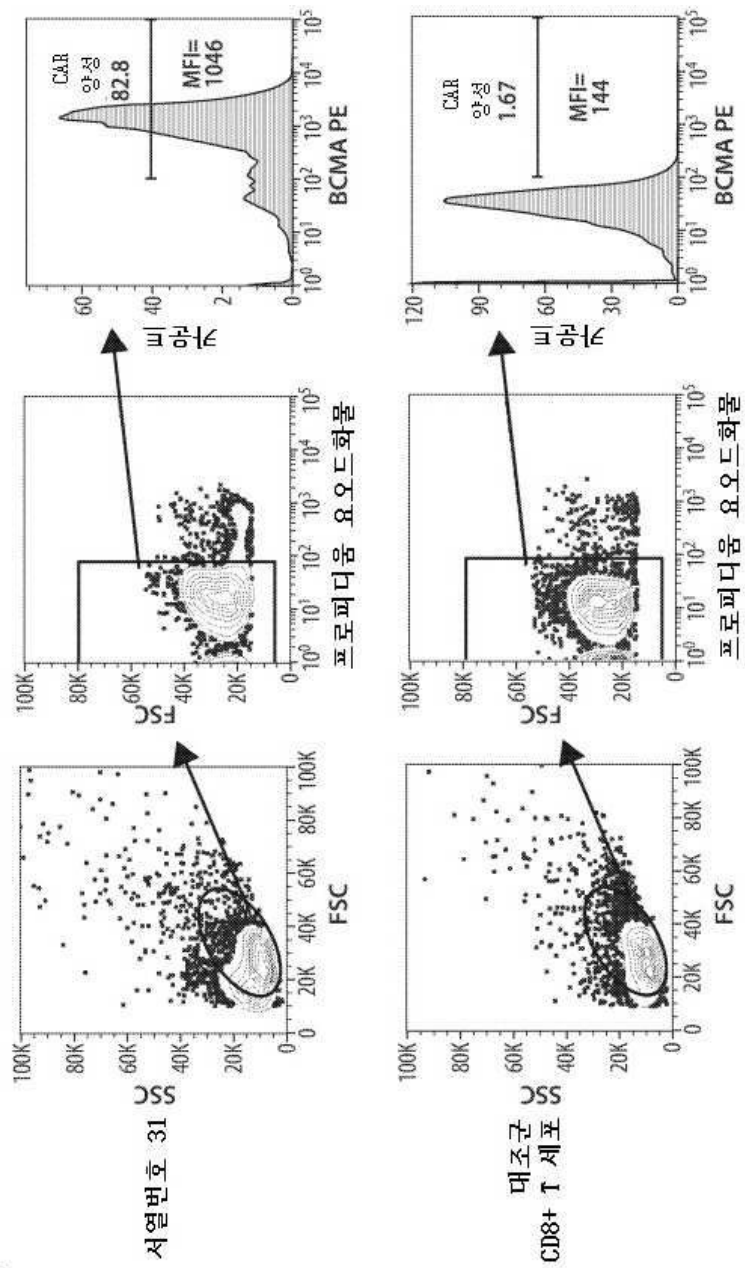
는 단계로 구성 또는 필수적으로 구성된 구현예들, 생산물들 또는 방법들 역시 제공되는 것으로 이해하여야 한다. 간결하게 기술하기 위해, 이들 구현예들은 본 발명에 개별적으로 기술되지 않지만, 이들 구현예들 각각이 본 발명에 제공되고 구체적으로 청구되거나 또는 청구되지 않을 수 있는 것으로, 이해될 것이다.

[0498] 범위들이 제시된 경우, 양쪽 말단이 포함된다. 아울러, 달리 지시되거나 또는 문맥상 명백하지 않거나 및/또는 당해 기술 분야의 당업자들이 이해하는 바로부터 명백하지 않은 한, 범위로 표현된 값들은 일부 구현예에서 문맥상 명확하게 달리 지시되지 않은 한 그 범위의 하한 단위의 1/10까지, 언급된 범위에 속하는 임의의 특정 값을 지칭할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 간결하게 기술하기 위해, 각 범위의 값들이 본 발명에 개별적으로 기술되지 않지만, 이들 값들 각각이 본 발명에 제공되고 구체적으로 청구되거나 또는 청구되지 않을 수 있는 것으로, 이해될 것이다. 또한, 달리 지칭되거나 또는 문맥상 자명하거나 및/또는 당해 기술 분야의 당업자가 이해하는 바로부터 자명하지 않은 한, 범위로 표현된 값들은 해당 범위에 속하는 모든 하위 범위를 지칭할 수 있으며, 하위 범위의 말단들이 그 범위의 하한 단위의 1/10과 같은 동일한 정확도로 표현되는 것으로 이해하여야 한다.

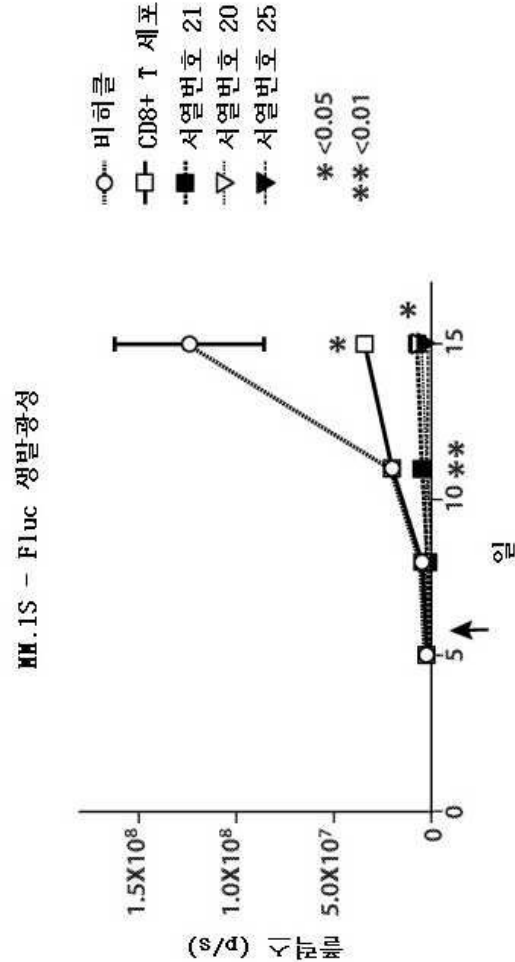
[0499] 또한, 본 발명의 임의의 특정 구현예는 하나 이상의 임의의 청구항으로부터 명백하게 제외될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 범위가 제시된 경우, 그 범위에 속하는 임의 값은 하나 이상의 임의의 청구항으로부터 명백하게 제외될 수 있다. 본 발명의 조성물 및/또는 방법에 대한 임의의 구현예, 요소, 특징, 용도 또는 측면은 하나 이상의 임의의 청구항에서 제외될 수 있다. 간결하게 기술하기 위해, 하나 이상의 요소, 특징, 목적 또는 측면이 제외된 구현예들 모두를 본 발명에 명확하게 나타내진 않는다.

도면

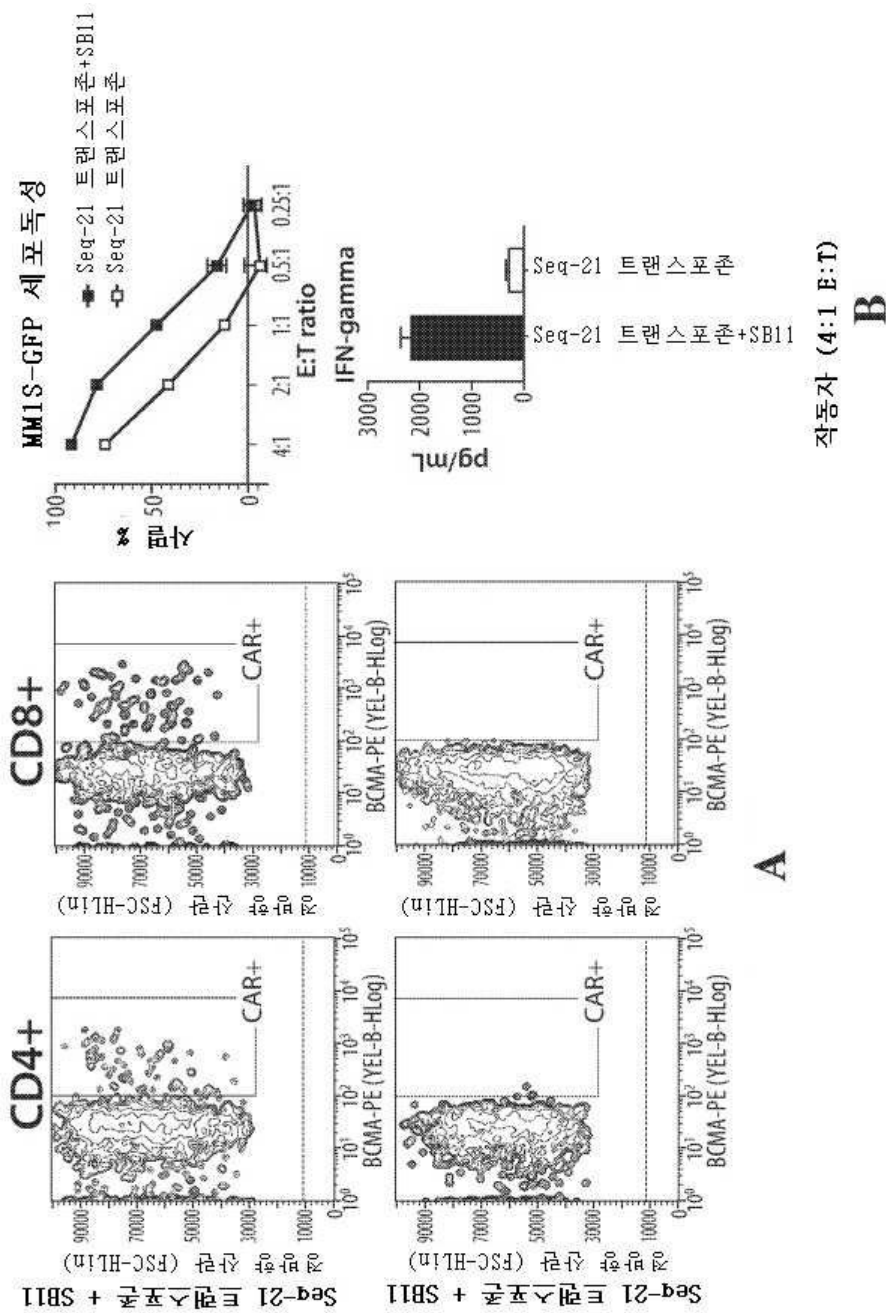
도면1



도면2



도면3



서열목록

- <110> Cartesian Therapeutics, Inc.
- <120> ANTI-BCMA CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS
- <130> C1540.70001W000
- <150> US 62/819,068
- <151> 2019-03-15
- <160> 133
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 1

Asp Tyr Ser Ile Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 2

Ser Tyr Ser Ile Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 3

Ser Tyr Asp Ile Asn

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 4

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 5

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 6

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Gln Gly Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 7

Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 8

Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 9

Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe

1 5

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 10

Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 11

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 12

Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr

1 5

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 13

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 14

Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5
 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 15

Asn Leu Ala Ser Asn Val Asn Thr

1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 16

Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr

1 5
 <210> 17
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 17
 Leu Gln Ser Arg Thr Leu Pro Arg Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 18
 Leu Gln Ser Lys Asn Phe Pro Arg Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide

<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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
 20 25 30
 Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
 35 40 45
 Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
 65 70 75 80
 Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
 85 90 95

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

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

 225 230 235 240
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
 260 265 270
 Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 305 310 315 320
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser
 340 345 350

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 355 360 365
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 370 375 380
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 405 410 415
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 420 425 430
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 435 440 445
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 450 455 460
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 465 470 475 480
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 485 490 495
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500
 <210> 20
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> Synthetic Polypeptide
 <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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 20 25 30
 Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
 35 40 45

Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60

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

 130 135 140
 Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 165 170 175
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
 195 200 205

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

 275 280 285
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys

290 295 300
 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 305 310 315 320
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val
 340 345 350

 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 355 360 365
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 370 375 380
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 385 390 395 400
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 405 410 415
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg

 420 425 430
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 435 440 445
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460
 <210> 21
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 20 25 30
 Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu

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

 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Leu Gln Ser Arg Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
 130 135 140
 Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
 145 150 155 160

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

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

290 295 300
 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 305 310 315 320
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Lys Arg
 340 345 350
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 355 360 365
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu

 370 375 380
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 385 390 395 400
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 405 410 415
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 420 425 430
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 435 440 445

 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 450 455 460
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 465 470 475 480
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 485 490 495
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500
 <210> 22
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu

20 25 30

Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu

35 40 45

Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr

100 105 110

Cys Leu Gln Ser Lys Asn Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

115 120 125

Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly

165 170 175

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
 260 265 270
 Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300
 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 305 310 315 320
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val
 340 345 350
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 355 360 365
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 370 375 380
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 385 390 395 400
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 405 410 415
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 420 425 430
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 435 440 445
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460
 <210> 23
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
20 25 30

Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45

Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr
100 105 110

Cys Leu Gln Ser Lys Asn Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140

Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160

Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205

Ala Tyr Ala Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr
210 215 220

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

225 230 235 240
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
 260 265 270
 Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

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

 370 375 380
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 385 390 395 400
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 405 410 415
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 420 425 430
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 435 440 445

 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 450 455 460
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 465 470 475 480
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu

485 490 495

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

500

<210> 24

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu

20 25 30

Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr

100 105 110

Cys Leu Gln Ser Arg Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

115 120 125

Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly

165 170 175

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

180	185	190
Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro		
195	200	205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr		
210	215	220
Ser Lys Ser Met Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
225	230	235
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr		
245	250	255
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe		
260	265	270
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro		
275	280	285
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys		
290	295	300
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala		
305	310	315
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu		
325	330	335
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val		
340	345	350
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn		
355	360	365
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val		
370	375	380
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg		
385	390	395
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys		
405	410	415
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg		
420	425	430

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

435 440 445

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

450 455 460

<210> 25

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu

20 25 30

Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr

100 105 110

Cys Leu Gln Ser Arg Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

115 120 125

Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly

165 170 175

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

 225 230 235 240
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
 260 265 270
 Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

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

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

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
435 440 445

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
450 455 460

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
465 470 475 480

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
485 490 495

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500

<210> 26

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45

Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly

130

135

140

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

145

150

155

160

Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly

165

170

175

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

180

185

190

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

195

200

205

Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

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

420 425 430
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 435 440 445
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

<210> 27
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
 35 40 45
 Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
 65 70 75 80
 Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

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

115	120	125	
Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr	Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly		
130	135	140	
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu			
145	150	155	160
Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly			
165	170	175	
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
180	185	190	
Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro			
195	200	205	
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr			
210	215	220	
Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
225	230	235	240
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr			
245	250	255	
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe			
260	265	270	
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro			
275	280	285	
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys			
290	295	300	
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala			
305	310	315	320
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu			
325	330	335	
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val			
340	345	350	
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn			
355	360	365	

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

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

450

455

460

<210> 28

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu

20

25

30

Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85

90

95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr

100	105	110	
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys			
115	120	125	
Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly			
130	135	140	
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu			
145	150	155	160
Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly			
165	170	175	
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
180	185	190	
Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro			
195	200	205	
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr			
210	215	220	
Ser Lys Ser Met Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
225	230	235	240
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr			
245	250	255	
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe			
260	265	270	
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro			
275	280	285	
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys			
290	295	300	
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala			
305	310	315	320
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu			
325	330	335	
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val			
340	345	350	

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 355 360 365
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 370 375 380
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 385 390 395 400

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

<210> 29

<211> 1753

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 29

aggaaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccaccatg gccctgcccg 60
 tgacagctct gctgctccct ctggctctgc tgtgcacgc tgccagaccc gacatcgtgc 120
 tgacacaaag cccccctagc ctggccatga gcttgggcaa gagggccaca atctcctgca 180
 gggccagcga gtccgtgacc atcctgggca gccacctgat ccacttggtac cagcagaagc 240
 ctggccagcc cctaccctg ctgatccagc tggcctccaa cgtgcagaca ggagtgcccg 300
 ctaggttctc cggtccggc agcagaaccg actttaccct gaccatcgac cccgtcgagg 360

aggacgacgt ggctgtctac tattgcctgc agagcaggac catccccagg accttcggag 420
 gcggcacaaa gctggagatc aagggcagca ccagcggctc cggaaagcct ggcagcggag 480
 aaggctccac caaggacag attcagctgg tgcagagcgg acccgagctg aagaagcccc 540
 gcgaaacagt caagatcagc tgcaaagctt ccggctacac cttcacagac tacagcatca 600
 actgggtgaa aagggccccc ggcaagggcc tgaaatggat gggctggatc aacaccgaga 660
 ccaggagacc cgcctacgcc tacgacttta ggggcagggt cgccttcagc ctggagacat 720

ccgctagcac cgcttacctg caaattaata acctgaagta cgaggacacc gccacctatt	780
tttgtgccct ggactacagc tacgcaatgg actattgggg acagggaacc tccgtgaccg	840
tgagcagctt tgtgcccgtg ttccctgcccg ccaaaccac caccacacct getcctagc	900
cccctacacc tgcccctacc atcgcttccc agcccctgag cctcagacct gaagcctgca	960
gacctgtgc tggaggcgcc gtccacacaa ggggactgga cttcgctgt gacatctaca	1020
tctgggctcc tctcgccggc acctgtggag tctgtctgt gtccttggtc atcacctgt	1080
actgcaacca caggaacagg agcaagaggt ccaggctgt gcatagcgac tacatgaaca	1140
tgacccccag aaggcccga cccaccagga agcactacca gccctacgcc cccctagg	1200
atgttgctgc ctacaggtcc agagtgaagt tcagcagatc cgctgatgcc cctgcctatc	1260
agcagggccca gaaccaactc tacaacgagc tgaacctggg aaggaggag gactacgacg	1320
tgctcgacaa gagaaggga agggatcctg aaatggcgcg caagcccagg agaaagaacc	1380
ctcaggaggg cctgtacaac gaactgcaga aggataagat ggccgaggcc tacagcgaaa	1440
tcggcatgaa aggcgagaga aggagaggca agggccacga cggactgtac cagggcctgt	1500
ccaccgccac caaagacacc tacgatgcc tgcacatgca ggccctgccc cccaggtgag	1560
cggccgctta attaatctgc cttctcggg gcttgccttc tggccatgcc cttcttctct	1620
cccttgacc tgtacctctt ggtctttgaa taaagcctga gtaggaagtc tagaaaaaa	1680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1740
aaaaaaaaa aaa	1753
<210> 30	
<211> 1660	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 30	
agaccaagc tgctagctc taaagaagc cctgggagca cagctcatca ccatggcact	60
gccagtaca gactgtgc tgccactggc actgtgtctc cagccgcca gaccgacat	120
cgctgtgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac	180
atgcagagcc agcgagtccg tgtcttctc gggcatcaac ctgatccact ggtaccagca	240
gaagcccga cagccacca aactgtgat ctactccgc agcaacctgc agtcaggcgt	300
gccagccaga ttcagcgga gggcagcgg aaccgactic acctgacaa tcagtcagt	360
ggaaccagaa gacaccgca actactactg cctgcagagc agaaccctgc ccagaacctt	420

cggccaaggc accaaggtcg aaatcaaggg ctccacaagc ggcagcggaa agcccggaag 480
 cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggcccg aactgaagaa 540

 acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca ctcctacag 600
 catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac 660
 cgagacaaga gagcccgctt acgcccaggg ctccacaggc agattcacct tcagcgcaga 720
 cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt 780
 ctactactgc gccctggact acctctactc cctggacttc tggggccagg gcaccctcgt 840
 gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttctt gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc 900
 cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc 960

 atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat 1020
 ctacatctgg gcacactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcatcac 1080
 cctgtactgc aaccaccgga acagagtga gttcagcaga tccgccgacg caccagccta 1140
 ccagcaggga cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga 1200
 cgtgctggat aagcggagag gcagagaccg tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa 1260
 cccacaagag ggctgtaca acgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga 1320
 gatcggaatg aagggcgagc gcagaagagg caagggacac gacggactgt accagggcct 1380

 gagcacagcc accaaggata cctacgatgc cctgcacatg caggccctgc caccaagatg 1440
 actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaag 1500
 tgcaaaaag tgcatgactc actggaggac ttccccaaga acagctcgtt taaccgggcc 1560
 gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctcgc ccttcagcca ctccagccac 1620
 atgctgacca cggccacgcc gatgcaccg ccatccagca 1660

 <210> 31
 <211> 1786
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <
 400> 31
 agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
 gccagtaca gcaactgtgc tgccactggc actgtgtctc cacgccgcca gaccgacat 120
 cgtgtgtaca cagagccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac 180
 atgcagagcc agcaggtccg tgtcttctt gggcatcaac ctgatccact ggtaccagca 240

gaagcccga cagccacca aactgctgat ctactcgc agcaacctgc agtcaggcgt	300
gccagccaga ttcagcgga gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt	360
ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaacctgc ccagaacctt	420
cggccaaggc accaaggtcg aaatcaaggg ctccacaagc ggccagcgga agcccgaag	480
cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcgccccg aactgaagaa	540
acccggcgga agcgtgaaaa tctctgcaa ggccagcggc tacaccttca ctcctacag	600
catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac	660
cgagacaaga gagccccct acgcccaggg cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga	720
cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt	780
ctactactgc gccctggact acctctactc cctggacttc tggggccagg gcacctcgt	840
gacctgttc agcttcgtgc ccgtgttct gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc	900
cagaccacca acaccagcac caacaatgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc	960
atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat	1020
ctacatctgg gcacctagg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcatcac	1080
cctgtactgc aaccaccgga acaaacgcgg gaaaaaaag ctctctaca tcttcaagca	1140
accattcatg cggccagtc aaaccacaca ggaggaagac ggatgcagct gcaggttccc	1200
cgaagaggag gaaggcgat gcgagctcag agtgaagttc agcagatccg ccgacgcacc	1260
agcctaccag caggacaga accagctgta caacgagctg aacctgggga gaagagaaga	1320
gtacgacgtg ctggataagc ggagaggcag agaccctgag atggcgcgca agcccagacg	1380
gaagaacca caagagggcc tgtacaacga gctgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta	1440
cagcgagatc ggaatgaagg gcgagcgag aagaggcaag ggacacgacg gactgtacca	1500
gggcctgagc acagccacca aggataccta cgtgccttg cacatgcagg cctgccacc	1560
aagatgacta tgaagaagga aggcattcag accagaaacc gaaaaatgtc tagcaaatcc	1620
aaaaagtga aaaaagtga tgactcactg gaggacttcc ccaagaacag ctggtttaac	1680
ccggccgcc tctccagaca catgtcctcc ctgagccaca tctcgccctt cagccactcc	1740
agccacatgc tgaccacgcc cagccgatg caccgccat ccagca	1786
<210> 32	
<211> 1660	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 32

agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact	60
gccagtaca gcaactgtgc tgccactggc actgctgtc cagccgcca gacccgacat	120
cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac	180
atgcagagcc agcgagtcg tgtcttctt gggcatcaac ctgatccact ggtaccagca	240
gaagcccga cagccacca aactgtgat ctactccgc agcaacctgc agtcaggcgt	300
gccagccaga ttcagcgga gcggcagcgg aaccgacttc accctgaca tcagctcagt	360
ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc aagaacttcc ccagaacctt	420
cggccaaggc accaaggctg aaatcaaggg ctccacaagc ggccagcgga agcccgaag	480
cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctgggtcag agcggccccg aactgaagaa	540
acccggcgga agcgtgaaaa tctctgcaa ggccagcggc tacaccttca cctctacag	600
catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac	660
cgagacaaga gagcccgct acgcccaggg cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga	720
cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt	780
ctactactgc gccctggact acctctactc cctggacttc tggggccagg gcaccctcgt	840
gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttct gccagccaag ccaaccaca caccagcacc	900
cagaccacca acaccagcac caacaatgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc	960
atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat	1020
ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcatcac	1080
cctgtactgc aaccaccgga acagagtga gttcagcaga tccgccgacg caccagccta	1140
ccagcaggga cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga	1200
cgtgctggat aagcggagag gcagagacc tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa	1260
cccacaagag ggctgtaca acgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga	1320
gatcggaatg aaggcgagc gcagaagagg caaggacac gacggactgt accagggcct	1380
gagcacagcc accaaggata cctacgatgc cctgcacatg caggccctgc caccaagatg	1440
actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaag	1500
tgcaaaaaag tgcatgactc actggaggac tccccaga acagctcgtt taaccggcc	1560
gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctgc ccttcagcca ctccagccac	1620
atgtgacca cggccagcc gatgcaccg ccatccagca	1660

<210> 33

<211> 1786

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 33

agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact	60
gccagtcaca gcaactgctgc tgccactggc actgctgctc cacgccgcca gacccgacat	120
cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac	180
atgcagagcc agcaggtccg tgtcttctct gggcatcaac ctgatccact ggtaccagca	240
gaagcccgga cagccacca aactgctgat ctactccgcc agcaacctgc agtcaggcgt	300
gccagccaga ttcagcggca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt	360
ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc aagaacttcc ccagaacctt	420
cggccaaggc accaaggtcg aaatcaaggg ctccacaagc ggagcggaa agcccggaag	480
cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccg aactgaagaa	540
acccggcgga agcgtgaaaa tctctgcaa ggccagcggc tacaccttca cctcctacag	600
catcaactgg gtgcgccagg cccagggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac	660
cgagacaaga gagcccgctt acgcccaggg cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga	720
cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt	780
ctactactgc gccctggact acctctactc cctggacttc tggggccagg gcaccctcgt	840
gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttctt gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc	900
cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc	960
atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat	1020
ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcatcac	1080
cctgtactgc aaccaccgga acaaacgcgg gaaaaaaag ctctcttaca tcttcaagca	1140
accattcatg cggccagtc aaaccacaca ggaggaagac ggatgcagct gcaggttccc	1200
cgaagaggag gaaggcgat gcgagctcag agtgaagttc agcagatccg ccgacgcacc	1260
agcctaccag caggacaga accagctgta caacgagctg aacctgggga gaagagaaga	1320
gtacgacgtg ctggataagc ggagaggcag agaccctgag atgggcggca agcccagacg	1380
gaagaaccca caagagggcc tgtacaacga gctgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta	1440
cagcgagatc ggaatgaagg gcgagcgag aagaggcaag ggacacgacg gactgtacca	1500
gggcctgagc acagccacca aggataccta cgatgccctg cacatgcagg ccctgccacc	1560
aagatgacta tgaagaagga aggcattccag accagaaacc gaaaaatgtc tagcaaatcc	1620

aaaaagtgc aaaaagtgc tgactcactg gaggacttcc ccaagaacag ctcgtttaac	1680
ccggccgccc tctccagaca catgtcctcc ctgagccaca tctcgccctt cagccactcc	1740
 agccacatgc tgaccacgcc cagccgatg caccgcgat ccagca	1786
<210> 34	
<211> 1660	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 34	
agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact	60
gccagtaca gcaactgtgc tgccactggc actgctgtc cagccgcca gaccgacat	120
ctgtctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac	180
atgcagagcc agcgagtccg tgacaatcct gggctccac ctgatccact ggtaccagca	240
 gaagcccga cagccacca aactgtgat caacctggcc agcaactga acacaggcgt	300
gccagccaga ttcagcgcca gcggcagcgg aaccgacttc accctgaca tcagctcagt	360
ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaaactgc ccagaacctt	420
cggccaagc accaaggtcg aaatcaagg ctcacaagc ggccagcgaa agcccgaag	480
cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggcccg aactgaagaa	540
acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca ccgactacag	600
catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac	660
 cgagacaaga gagccgcct acgcctacga cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga	720
cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt	780
ctactactgc gccctggact acacctacgg catggactac tggggccagg gcacctcgt	840
gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttct gccagccaag ccaaccaca caccagcacc	900
cagaccacca acaccagcac caacaatgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc	960
atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat	1020
ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgtg ctgctgagcc tggatcatcac	1080
 cctgtactgc aaccaccgga acagagtga gttcagcaga tccgccgacg caccagccta	1140
ccagcaggga cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga	1200
ctgtctggat aagcggagag gcagagacc tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa	1260
cccacaagag ggctgtaca acgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga	1320

gatcggaatg aagggcgagc gcagaagagg caagggacac gacggactgt accagggcct	1380
gagcacagcc accaaggata cctacgatgc cctgcacatg caggccctgc caccaagatg	1440
actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag	1500
tgcaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttccccaaga acagctcgtt taaccgggcc	1560
gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctcgc ccttcagcca ctccagccac	1620
atgtgacca cgcccacgcc gatgcaccgc ccatccagca	1660
<210> 35	
<211> 1786	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 35	
agaccaaacg tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact	60
gccagtccca gcaatgtctc tgccactggc actgtctctc cagcccgcca gaccgacat	120
cgctgtgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac	180
atgcagagcc agcgagtccg tgacaatcct gggtctccac ctgatccact ggtaccagca	240
gaagcccga cagccacca aactgtgat caacctggcc agcaacgtga acacaggcgt	300
gccagccaga ttacagcgca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt	360
ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaacactgc ccagaacctt	420
cggccaaggc accaaggtcg aaatcaaggc ctccacaagc ggacgaggaa agcccgaag	480
cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccc aactgaagaa	540
acccggcgga agcgtgaaaa tctctgcaa ggccagcggc tacaccttca cagactacag	600
catcaactgg gtgcgccagg cccagggcaa ggccctggaa tgggtcggct ggatcaacac	660
cgagacaaga gagcccgctt acgctacga cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga	720
cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt	780
ctactactgc gccctggact acacctacgg catggactac tggggccagg gcaccctcgt	840
gaccgtgtcc agcttctgtc ccgtgttctt gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc	900
cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc	960
atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat	1020
ctacatctgg gcaccaatgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgtgagcc tggatcatcac	1080
cctgtactgc aaccaccgga acaaacgcgg gagaaaaaag ctctcttaca tcttcaagca	1140

accattcatg cgcccagtc aaaccacaca ggaggaagac ggatgcagct gcaggttccc 1200
cgaagaggag gaaggcggat gcgagctcag agtgaagttc agcagatccg ccgacgcacc 1260
agcctaccag cagggacaga accagctgta caacgagctg aacctgggga gaagagaaga 1320
gtacgacgtg ctggataagc ggagaggcag agaccctgag atgggcggca agcccagacg 1380

gaagaaccca caagagggcc tgtacaacga gctgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta 1440
cagcgagatc ggaatgaagg gcgagcgcag aagaggcaag ggacacgacg gactgtacca 1500
gggcctgagc acagccacca aggataccta cgatgccctg cacatgcagg ccctgccacc 1560
aagatgacta tgaagaagga aggcattccag accagaaacc gaaaaatgtc tagcaaatcc 1620
aaaaagtga aaaaagtga tgactcactg gaggacttcc ccaagaacag ctcgtttaac 1680
ccggccgcc tctccagaca catgtcctcc ctgagccaca tctcgccctt cagccactcc 1740
agccacatgc tgaccacgcc cagccgatg caccgccat ccagca 1786

<210> 36

<211> 1739

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 36

agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggctct 60
gccgtaaca gccttcttc tccgcttgc cctcctcttg cacgtgctc ggccagatat 120
tgtctcaca cagagccgt cctcactttc agcgagcgtc ggggaccgag ctaccatcag 180
ttgtcgagcc agtgaagcg tcaatttct ggggagccac cttatacatt ggtatcaaca 240
aaagccaggc caggcccca aactgctgat tcagctcgca tctaattgtc agactggagt 300

gcctgcaagg tttagcggtg gtgggtcagg gacagatttc acctgacca ttagctcagt 360
tgagcctgaa gatgtggcgg tttattactg cctccaaagc cgcactatac ctggacatt 420
cggccaggga acaaaggtgg agattaaggg tagtacctca ggtagtgga agccaggag 480
cggcgagggg tctacaaagg gtcaaattca attggtgcag tccggaccag aactgaaaa 540
accggcgagg agcgtcaaga tttctgtgc agcatcaggc tatacattta ctgattacag 600
tattaactgg gtgagacaag cgcctgaaa gggccttgag tgggtgggtt ggattaacac 660
ggagactaga gaaccgcgt acgcctacga ttttagaggc cggttcactt tctccgccga 720

tacaagtaaa tccacagcat atctccaaat gaatagcctt agagcggagg ataccgccgt 780
gtattattgc gcgtcgact attcttacgc aatggactac tgggggcagg gtactctcgt 840

caccgtatcc tcatttgttc ccgtatTTTT gcccgcCaag ccgaccacta ctccggcccc	900
tcgacctccg acccctgctc cgactattgc gagtcaacca ttgagccttc ggctgaggc	960
atgtagaccg gcagctggtg gcgcagtcca tacacgaggg cttgattttg cgtgcgacat	1020
ctatatatgg gcgccattgg ctgggacgtg cggcgtcctt ctcttgtcac tcgtgataac	1080
tctgtactgc aatcacagaa accgcgtgaa gttttccaga agcgcggacg cgcggccta	1140
tcaacaaggg cagaatcagc tgtacaacga actcaatttg gggcgaaggg aggagtatga	1200
tgTTTTggac aaaaggcgag gccgcgaccc tgaatgggc ggtaagccac gcagaaaaaa	1260
cccccaagag ggattgtaca atgaactgca aaaagacaag atggctgagg catacagtga	1320
gataggaatg aaaggtgaac ggcccgggg aaaaggacat gacgggttg accagggtct	1380
tagcactgca acgaaagata cctatgacgc cctgcacatg caagcattgc cccacgggtg	1440
actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag	1500
tgcaaaaaag tgcattgact actggaggac ttcccaaga acagctcgtt taaccggcc	1560
gccctctcca gacacatgct ctccctgagc cacatctgc cttcagcca ctccagccac	1620
atgctgacca cgcaccgcc gatgcaccgc ccatccagca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1739
<210> 37	
<211> 1529	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 37	
agaccaagc tgctagctc taaagaagc cctgggagca cagctcatca ccatggcact	60
gccggtaca gcgtctctc tccgctcgc cctctctc cagcagcac ggccagacat	120
ctctctaca cagagcccg gcagcctcag cgcgagcgtc ggggaccgca caaccatcag	180
ctgccgagc agcgaagcg tcacaatct cgggagccac ctgataact ggtaccaaca	240
aaagccaggc caggcccca aactgtgat ccagctcga agcaacgtcc agacaggagt	300
gccagcaagg ttcagcgaa gcgggagcgg aacagacttc accctacca tcagcagct	360
cgagccagaa gatgtggcg tctactactg cctccaaagc cgcacaatac cacggacctt	420
cggccaggga acaaaggtg agatcaaggg aagcaccagc ggaagcggca agccaggag	480
cggcgagggg agcacaaggg gacaaatcca actcgtcag agcggaccag aactgaaaa	540
gccggcgga agcgtcaaga tcagctcgc agcaagcggc tacacattca cagactacag	600

catcaactgg gtgagacaag cgccaggaaa gggcctcgaa tgggtgggat ggatcaacac	660
ggagacaaga gaacccgcat acgcctacga cttcagaggc cggttcacat tcagcgccga	720
cacaagcaag agcacagcat acctccaaat gaacagcctc agagcggagg acaccgccgt	780
gtactactgc gcgtcgcact acagctacgc aatggactac tggggacagg gaacactcgt	840
caccgtaagc agcttcgtac ccgtattcct ccccgccaag ccgaccacaa caccggcccc	900
acgaccacca acaccagccc cgacaatcgc gagccaacca ctcagcctcc ggccagaggc	960
gtgcagaccg gcagcaggag gcgcagtgca cacacagga ctcgacttcg cgtgcgacat	1020
atacatctgg gcaccactcg caggaaactg cggcgtcttc ctctcagcc tcgtgataac	1080
actgtactgc aaccacagaa accgcgtgaa gttcagcaga agcgcggacg cggcgcccta	1140
ccaacaagga cagaaccagc tgtacaacga actcaacctc ggacgaaggg aggagtacga	1200
cgctctgcac aaaaggcgag gccgcgaccc agaaatgggc ggaaagccac gcagaaaaaa	1260
cccccaagag ggactctaca acgaactgca aaaggacaag atggcagagg catacagcga	1320
gataggaatg aaaggagaac ggcgcggggg aaaaggacac gacgggctct accagggact	1380
cagcacagca acgaaagaca cctacgacgc cctgcacatg caagcactcc cccacggtg	1440
aacctgagac tgggtggcttc tagaagcagc cattaccaac tgtaccttc cttcttgctc	1500
agccaataaa tatatctctt ttcactcag	1529
<210> 38	
<211> 1724	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 38	
gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcggtctgt ctgttgcttc	60
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcac tgctgttac	120
agctctgtg ctgcctctgg cactgctgt tcatgccgc agacctgaca ttgtttctgac	180
acagtccct tctagtttga gcgcgagtg tggcgaccga gctacgataa gctgtcgagc	240
tagcgaaagc gtgacgatcc tgggttccca cttattcat tggatatcaac agaaaccagg	300
gcaggctcct aaactttca tacagttggc cagcaatgtt caaaccggtg tgcccgcacg	360
cttcagcgga tcagggtcag gaaccgattt cacgctcaca attagcagtg tggagcctga	420
tgacgtagcc gtgtactact gtctgcaaag ccgcaccatc ccgagaacgt ttgggggcgg	480
cacgaaattg gaaattaaag gaagcacttc cgggagtggg aagcctggga gtggcgaagg	540

gtcaacaaag gggcagatac agttgggtcca gagcggggccc gagttgaaaa agccagggtg 600
atcagttaaa atttcttgtg ctgcgtccgg atatactttt actgactatt ctatcaactg 660
ggtaacaa gctcccggta aaggattgga atgggtcgga tggataaaca ctgaaacccg 720
cgagcctgct tatgcttacg attttcgagg tagattcacc ttctcacttg atacatccaa 780
aagtacggct tacctgcaaa tgaactcact gagagcagaa gataccgccg ttactattg 840
tgccctcgac tatagttacg ccatggatta ttggggacaa gggactctcg tgaccgtaag 900
tagctttgtg ccigtgttcc tgcctgccaa gcctaccaca acaccagctc ctagacctcc 960

aactcctgct cctacaatcg cctctcagcc actgtctctg aggcctgaag ctgttagacc 1020
tgctgctggc ggagccgtgc ataccagagg actggatttc gcctgcgaca tctacatctg 1080
ggctcctctg gctggaacat gtggcgtgct gctgctgagc ctggatca cctgtactg 1140
caaccaccgg aacagagtga agttcagcag atccgccgat gctcctgcct accagcaggg 1200
acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct ggggagaaga gaagagtacg acgtgctgga 1260
taagcggaga ggcagagatc ctgagatggg cggcaagccc agacggaaga atcctcaaga 1320
gggcctgtat aatgagctgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggaat 1380

gaaggcgag cgagaagag gcaagggaca cgatggactg taccagggcc tgagcacagc 1440
caccaaggat acctatgatg cctgcacat gcaggccctg cctccaagat gagggccctg 1500
ttaaacccgc tggtcgtctt tcttctgtc caatttctat taaaggttcc ttgttccgt 1560
aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
ataaaaaaca tttattttca ttgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1724

<210> 39

<211> 1660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 39

agaccaagc tggttagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggctct 60
gccggtaaca gcgtttcttc tcccgcttgc cctcctcttg cacgtgctc ggccagacat 120
agtattgacg caatcccccg cctctctcgc agtctctccc ggacaacggg ccactataac 180
ttgcagggca agtgagagtg tgacaatcct gggatcacac ctgatacatt ggtatcagca 240
aaagccgggt caaccacctc agttgctgat acaactggca tctaattgtac aaacgggagt 300

ccccgcacgg ttctctgggt ctggttcttg cactgacttc acattgacaa tctcaagtgt	360
tgaacctgag gacacagcca attattattg cttgcaatct cgaacaattc ctgcacttt	420
cggtcagggc acgaaggttg aaattaaagg tagtacctca ggtagtgga agccagggag	480
cggcgagggg tctacaaagg gtcaaatcca gcttgtgcaa tctggccccg agctgaaaaa	540
acccggtgga tctgtgaaaa ttagctgcaa agcgtcagga tatacattca cagactatag	600
catcaactgg gtccggcagg cacccggtta gggtctggaa tgggttggtt ggattaacac	660
tgagaccctg gagcccgctt atgcatacga ttttacggga cggtttactt tcagcgccga	720
cacgagcaag agcatggcgt acctccagat taacagtctg agggcggagg acacagccgt	780
ctactattgc gcgttggatt atagctacgc gatggactac tgggggcaag gtacacttgt	840
cacggtgtca tcttttgctt ccgtattttt gcccgccaag ccgaccacta ctccggcccc	900
tcgacctccg acccctgctc cgactattgc gagtcaacca ttgagccttc ggcctgaggc	960
atgtagaccg gcagctggtg gcgcagtgca tacacgaggg cttgattttg cgtgcgacat	1020
ctatatatgg gcgccattgg ctgggacgtg cggcgctcctt ctcttgtcac tcgtgataac	1080
tctgtactgc aatcacagaa accgcgtgaa gttttccaga agcgcggagc cgccggccta	1140
tcaacaaggg cagaatcagc tgtacaacga actcaatttg gggcgaaggg aggagtatga	1200
tgttttggac aaaaggcgag gccgcgacc tgaatgggc ggtaagccac gcagaaaaaa	1260
cccccaagag ggattgtaca atgaactgca aaaagacaag atggctgagg catacagtga	1320
gataggaatg aaaggtgaac ggcgcggggg aaaaggacat gacgggttgt accagggtct	1380
tagcactgca acgaaagata cctatgacgc cctgcacatg caagcattgc ccccacggtg	1440
actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag	1500
tgcaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttcccaaga acagctcgtt taaccgggcc	1560
gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctgc ccttcagcca ctccagccac	1620
atgtgacca cgcccacgcc gatgcacccg ccatccagca	1660
<210> 40	
<211> 1660	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 40	
agaccaagc tggttagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact	60
gccagtcaca gcactgtgc tgccactggc actgtgtctc cagcccgcca gaccgacat	120

cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac	180
atgcagagcc agcaggtccg tgacaatcct gggctccac ctgatccact ggtaccagca	240
gaagcccga cagccacca aactgctgat ccagctggcc agcaactgc agacaggcgt	300
gccagccaga ttcagcgga gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt	360
ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaacaatcc ccagaacctt	420
cggccaaggc accaaggctg aaatcaaggg ctccacaagc ggccagcgga agcccgaag	480
cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggcgcag agcggccccg aactgaagaa	540
acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca ccgactacag	600
catcaactgg gtgcgccagg cccagggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac	660
cgagacaaga gagcccgct acgcctacga cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga	720
cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt	780
ctactactgc gccttgact acagctacgc catggactac tggggccagg gcacctcgt	840
gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttct gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc	900
cagaccacca acaccagcac caacaatgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc	960
atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat	1020
ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcac	1080
cctgtactgc aaccaccgga acagagtga gttcagcaga tccgccgacg caccagccta	1140
ccagcaggga cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga	1200
cgtgctggat aagcggagag gcagagacc tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa	1260
cccacaagag ggctgtaca acgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga	1320
gatcggaatg aaggcgagc gcagaagagg caaggacac gacggactgt accaggcct	1380
gagcacagcc accaaggata cctacgatgc cctgcacatg caggccctgc caccaagatg	1440
actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaag	1500
tgcaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttcccaaga acagctcgtt taaccggcc	1560
gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctgc ccttcagcca ctccagccac	1620
atgtgacca cggccagcc gatgcaccg ccatccagca	1660
<210> 41	
<211> 1644	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 41

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc	60
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggctc tgcccgtaac	120
cgccctgctc ctgccactcg cactcctcct gcatgcggct aggccggata ttgtaatgac	180
gcaatccctt gactcactga gtgtgtcctt gggagagaga gccacgataa attgtcgggc	240
ctccgagtca gtcactatac tcggttctca cctgatccac tggtagcaac aaaagcctgg	300
gcagccaccg aaacttttga tacagttggc ctccaatgtc caaactgggg ttcccagaccg	360
cttttagcga agcgggagcg gtaccgattt taccctcacc atatcatcac tccaagctga	420
ggacgtggcc gtttactact gtctccagtc aaggacaata ccgcgaacat tcggtggagg	480
tactaaagtt gaaataaaag gttccacaag tggtcaggg aagccaggga gtggtgaggg	540
aagcacaaaa ggccaaatac aactggtgca gtctggagca gaagtcaaga agccaggtgc	600
ctccgttaag atttcttgta aagcttccgg ctataccttt accgattaca gcattaattg	660
ggtccgccag gcccctgggc agggccttga gtggatgggc tggataaata cagagactag	720
agaacccgcg tatgcatacg attttcgagg ccgggtgact atgacgcgcg acacctccgc	780
gtctactgca tacttgcaga tcagtagcct gaaagccgaa gataccgccg tttacttctg	840
cgccctcgac tattcttacg caatggacta ctggggacaa ggttctctcg ttactgtatc	900
tagctttgtt ccagtgttcc tcccggcgaa acccaccact accccagccc ctgceccacc	960
gactccggcg ccgacgattg ccagtcagcc gttgagcctc cgaccggagg cgtgtcgccc	1020
cgcggcagga ggggcctgac atactagggg acttgatttt gcctgtgaca tatatatatg	1080
ggcccttttg gccggtacct gtggtgtcct gctgcttagt ttggtgataa cactctattg	1140
taaccatcgc aatcgagtta agttcagtcg gtcagctgat gctccggctt accagcaagg	1200
ccagaatcag ctgtacaatg agctcaacct gggtcggcga gaagagtatg atgtactgga	1260
caaacggaga ggtcgggac ccaaatggg gggtaaacca cgcaggaaga acccacaaga	1320
ggggttgtac aatgaactgc agaaagataa gatggccgag gcttacagtg aaatcgggat	1380
gaaaggagaa cggagacgag gtaaggggca cgacggactc tatcaaggac tcagcaccgc	1440
tacaaaggat acctatgatg cactccatat gcaagccctt cccccaaggt aggggcccgt	1500
ttaaaccgcg tggtcgcctt tcttctgtc caatttctat taaaggttcc ttgtttccgt	1560
aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta	1620
ataaaaaaca tttattttca ttgc	1644

<210> 42

<211> 1644

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<

400> 42

```

gggagaccca agctggctag cctcgagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc      60
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcgc tcccagttac      120
agccttggtt ttgcccttgg ccctccttct ccacgtgca cggccggaca tagttttgac      180
ccagagccct gcaagtttgg ctgtcagttc tggagagcga gctacaatta gtgacagagc      240
gtctgaaagc gtctccatat tgggcagtca ccttttgac tggtagcaac agaagccagg      300
acagccacca aagctgctta ttacctcgc ctccaatttg caaactggag taccggctcg      360
attctccgga tctggttctg gaacagactt cacccttacg atatcaagtc tggaggctga      420

```

```

ggatgtcgcg gtttactact gcctccaatc acgaacaata ccgagaacgt tcggccaggg      480
gactaaactt gaaatcaagg gtagtacgag tggaagtggg aaacctgggt ctggtgaggg      540
gtctacgaaa ggacaaatac agctgggttca atcaggcgcc gaagtaaaaa aaccgggggc      600
atctgtgaaa atatcctgca aagcgtctgg atacacattt acagactatt ccatcaactg      660
ggtcgccag gccccggcc aaggtctgga atggatgggc tggatcaaca cagaaacccg      720
ggaacctgca tacgcttacg attttcgagg ccgggtcact atgaccgcg atacaagtgc      780
ctccaccgca tatctcaaa tctcatcttt gaaggcagaa gatacagccg tctacttttg      840

```

```

tgcaactggac tatagctatg cgatggatta ctgggggtcaa ggcagccttg ttactgtgtc      900
cagcttttgt cccgtatttc tcccgccaa gccaaactact acccctgccc cgcgaccgcc      960
aacgccagcg cctaccattg cgagtaacc actctcactg cggccagaag cctgccgacc      1020
tgccgccggg ggggcagtac aactcgcgg tcttgatttt gcttgcgaca tatatatctg      1080
ggccccactg gctgggacgt gtggcgtttt gctgcttagt ttggtcataa ccctctattg      1140
caaccacaga aatcgctta aatttagcag aagtgtgac gcacctgcat accagcaagg      1200
tcagaaccaa ctgtataatg aactgaattt gggacgcagg gaagagtatg acgtcttgga      1260

```

```

taaaagaaga ggacgcgatc cggagatggg tgggaaacct cgccgaaaga accccaaga      1320
aggtttgtat aatgaactcc agaaggacaa aatggcggag gcgtatagcg agattggaat      1380
gaagggggaa agacgacgcg gcaaagggtca tgacggattg tatcagggcc tctctacggc      1440
tactaaagat acttatgatg ctctccatat gcaggcgttg ccaccaaggt gagggcccgt      1500
ttaaacccgc tggtcgtctt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc ttgttccgt      1560
aagtcgaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta      1620

```

ataaaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 43
 <211> 1644
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 43

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
 aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggctc tgcccgtaac 120
 cgcactgctt ctgccactcg ctctgttgct ccacgccgt agacctgaca tcgtgctgac 180
 gcaaagcccc gcgtcactcg ccgttagttt gggaaaacgg gcgacaatat ctgttagagc 240
 ttctgaaagc gtcactatcc tgggttcaca tctgatacac tggtagcagg agaagccagg 300

acagccaccc aaactgctga tatactttgc ttctaattga caaacaggcg taccagcccc 360
 ctacagcgtt tccgggtctg gtacagattt tactttgacc atatccagtt tggaggtga 420
 ggacgttgcc gtctactact gtctccaaag tcggactata ccgaggacct ttggtcaggg 480
 gacaaagctt gagataaaag ggtccacatc cgggtcagga aaacctggaa gtggggaggg 540
 atctacaaaa gggcaggtac aactgggtcca gtccggggcg gaagtaaaaa aacccggggc 600
 ctctgtaaaa atttctgtga aggcctctgg ttacacgttt accgactaca gtatcaattg 660
 ggtgcggcaa gccccgggcc aagggttga atggatgggt tggataaata ctgagacacg 720

ggaaccagca tacgcctacg attttcgggg tcgagtcaca atgacgagag atacttctgc 780
 cagtactgct tatctccaga tcagttccct caaagcggaa gacaccgcag tatacttctg 840
 tgccctcgac tattcatacg caatggatta ttgggggtcaa ggctcacttg tgacggtgag 900
 ttcttctgc cccgtcttct tgccggcgaa gccactact acgccggcac cacgcccccc 960
 cactctgcg ccaactatag ctccacaacc ctgagcctg aggcctgagg cgtgtaggcc 1020
 agcagcaggt ggggcagtgc aactagggg cctcgatttt gcctgcgata tctatatttg 1080
 ggcaccgctc gcgggtacgt gcggcgttct ttgtttgtcc ttggtcatca cactgtactg 1140

taaccatcgg aatcgcgtaa aattcagccg gagtgccgat gcaccggcgt accagcaagg 1200
 tcaaaaccag ctctacaatg agctgaatct gggaagacgc gaagagtatg acgttcttga 1260
 taagaggaga ggccgagacc ccgaaatggg ggggaagccc aggcgaaaga atccccagga 1320
 gggttttgtac aatgagcttc aaaaagacaa gatggcagag gcctactccg aaatagggat 1380
 gaaaggggaa agacggagag gcaaggggtca tgacggactc tatcagggtc ttagcaccgc 1440

cacgaaggac acatacgatg cccctcatat gcaagcactc ccccttagat gagggcccgt	1500
ttaaaccgcg tggtcgcgtt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc ttgttccgt	1560
aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta	1620
ataaaaaaca ttatttttca ttgc	1644
<210> 44	
<211> 1644	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 44	
gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc	60
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcgc ttccagtcac	120
cgctctcctt ttgccgctcg cactgcttct gcatgcggcc cgccccgata tcgttatgac	180
ccagtctcct gacagtctga gtgtcagttc cggagagcgg gcaacgatta attgtcgcgc	240
ctccgaaagc gttaccatac tcgggagcca tcttatccat tggtagcaac aaaagccagg	300
tcagcctcct aagtgttga ttcaacttgc tagcaacgtg caaacgggcg ttccagacag	360
gtttagcgga tcggaagcg gaacagactt cactctgacg atatcaagtt tgcaagcgga	420
ggacgtagcg gtttactact gccttcagag taggacaatc cctagaacat tcggcggcgg	480
gacaaaggtg gaaataaagg gatccaccag tggaagcggg aagccgggta gcggtgaagg	540
cagcactaag ggacaaatcc aactcgtaca gagtggggca gaggtgaaga aacctgggga	600
gagtgtaaaa atttcttgca aagcctcagg ctacacattc acggattata gcattaattg	660
ggtgcgacag gcgcccggtc aaggacttaa gtggatgggc tggatcaaca cggaaacgcg	720
cgaaccggcg tatgcctatg actttcgagg aaggttcgca ttcagccttg acacgtccgc	780
atcaaccgcc taccttcaga tcagttcact caaagctgaa gatacggctg tgtatttttg	840
cgcacttgat tatagctatg ccatggacta ctggggtcag ggaaccttgg ttactgtatc	900
ttctttcgta ccagtttttt tgccggctaa accgactacc acgccggcac cacggcccc	960
gacaccgcct ccaacaatag cgtcccaacc cctttcactt aggccggagg cctgcagacc	1020
tgctgctggg ggagctgtcc atactcgggg acttgacttc gcgtgcgaca tatacatctg	1080
ggcgctcttt gccggcacct gtggtgtatt gttgttgtct cttgttatca ctctgtactg	1140
taaccaccgc aacagggtta agttcagccg ctccgcagat gctcctgcct accagcaggg	1200
acaaaatcaa ctttataacg aattgaacct tgggcgaagg gaggaatatg atgttcttga	1260

caaaaggcgc ggcaggatc cggagatggg aggtaagcca cgcaggaaga atccgcagga 1320
gggcttgtat aacgaactcc agaaagataa aatggcagaa gcctattccg agataggaat 1380
gaagggggag cgaagacggg gaaaagggtca cgaatgggctg tatcagggcc tctctaccgc 1440

cactaaggac acttatgacg cattgcacat gcaggcgttg ccaccacggt gagggcccgt 1500
ttaaaccgcg tggtcgcgtt tcttgcgtgc caatttctat taaaggttcc ttgtttccgt 1560
aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
ataaaaaaca ttatttttca ttgc 1644

<210> 45
<211> 1644
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<400> 45

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60

aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcac tcccagttac 120
ggctttgttg ctcccgtcgc cgttgttgct gcatgctgct cgcccagaca tcgtcctcac 180
gcaaagtccc gcaagtctcg ccgtctcatt gggcgaaaga gcgacaatat cctgtcgagc 240
gtcagagtct gttagtatcc ttggcagcca ctatctggct tggatcagc agaaaccagg 300
gcagcctccc aagctgctga ttatctcgc gagcaatctc cagacagggtg tcccagcacg 360
cttcagtggg tctggcagcg gaacagattt tacactcacg atttcttccc tggaggctga 420
agatgtggca gtgtactatt gtcaacagag cagaactatc ccgagaacat ttgggcaggg 480

cactaaactt gaaatcaaag ggagtacgag tggtagtgga aaaccgggat ccggcgaagg 540
ctccacaaag gggcaaatac agctgggtcca gtctggagct gaggtgaaaa agcccgggtga 600
gtctgtaaaag atttctgca aggcaagtgg ttacactttt acggattact caatcaattg 660
ggttcggcaa gcacctggac agggtttgaa gtggatggga tggataaata cagaaacaag 720
ggaacctgcc tatgcctatg actttcgggg tagattcgcc ttctcacttg acacaagtgc 780
cagtacgcc tatcttcaga tttaagcct gaaggcggaa gatacggccg tctatttttg 840
tgcgcttgac tatagttatg cgaatggatta ttggggccaa ggcacactgg tcacagttag 900

ctcttttgtc cctgttttcc tcccagcaaa accaacaact acaccgcgcg cgaggccgcc 960
caccctgcc cctaccatcg cctcacagcc attgagcctc cgccccgagg catgcagacc 1020
ggcagctgga ggtgccgtac acactcgagg gctcgacttc gcatgtgata ttatatctg 1080

ggcgccattg gcgggtactt gcggtgtgct gtccttagc cttgtcataa ccctctactg 1140
 caatcatcgc aataggggtca aattttcaag gtcagcagat gtcccggcgt atcagcaggg 1200
 gcaaaaccaa ctttacaatg agctcaacct gggtagacgc gaggagtacg acgtgctcga 1260
 caaaaggagg ggtcgggatc cggaatggg gggcaaacc cgcaggaaga acccacagga 1320

aggactgtat aatgagctcc agaaagacaa aatggcagag gcatattctg agataggaat 1380
 gaaaggcgag cggagaagag gtaaagggca cgacggactt tatcagggtc tttcaacagc 1440
 gactaaggat acatatgacg cattgcacat gcaagctctc ccacctagat gagggcccgt 1500
 ttaaaccgcg tggctcgctt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc ttgtttccgt 1560
 aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
 ataaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 46
 <211> 1644
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 46

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
 aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcac tgcctgttac 120
 agctctgctg ctgcctctgg cactgctgct tcatgccgcc agacctgaca ttgttctgac 180
 acagtccctt tctagtttga gcgcgagtgt tggcgaccga gctacgataa gctgtcgagc 240
 tagcgaaagc gtgacgatcc tgggttccca ccttattcat tgggtatcaac agaaaccagg 300
 gcaggtcctt aaacttctca tacagttggc cagcaatgtt caaaccggtg tgcccgcacg 360

cttcagcgga tcagggtcag gaaccgattt cacgctcaca attagcagtg tggagcctga 420
 tgacgtagcc gtgtactact gtctgcaaag ccgcaccatc ccgagaacgt ttgggggcgg 480
 cacgaaattg gaaattaaag gaagcacttc cgggagtggg aagcctggga gtggcgaagg 540
 gtcaacaaag gggcagatac agtttggtcca gagcgggccc gagttgaaaa agccaggtgg 600
 atcagttaaa atttcttgtg ctgcgtccgg atatactttt actgactatt ctatcaactg 660
 ggtcaacaaa gctcccggta aaggattgga atgggtcggg tggataaaca ctgaaacccg 720
 cgagcctgct tatgcttacg attttcgagg tagattcacc ttctcacttg atacatcaa 780

aagtacggct tacctgcaaa tgaactcact gagagcagaa gataccgccg ttactatttg 840
 tgccctcgac tatagttacg ccatggatta ttggggacaa gggactctcg tgaccgtaag 900

tagctttgtg cctgtgttcc tgcctgcca gcctaccaca acaccagctc ctagacctcc	960
aactcctgct cctacaatcg cctctcagcc actgtctctg aggcctgaag cttgttagacc	1020
tgtgtctggc ggagccgtgc ataccagagg actggatttc gcctgcgaca tctacatctg	1080
ggctcctctg gctggaacat gtggcgtgct gctgtgagc ctggcatca ccctgtactg	1140
caaccaccgg aacagagtga agttcagcag atccgccgat gctcctgcct accagcaggg	1200
acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct ggggagaaga gaagagtacg acgtgctgga	1260
taagcggaga ggcagagatc ctgagatggg cggcaagccc agacggaaga atcctcaaga	1320
gggcctgtat aatgagctgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggaat	1380
gaaggcgag cgcagaagag gcaagggaca cgtggactg taccagggcc tgagcacagc	1440
caccaaggat acctatgatg ccctgcacat gcaggccctg cctccaagat gagggcccgt	1500
ttaaaccgcg tggtcgtt tcttctgtc caatttctat taaaggttcc ttgttccgt	1560
aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta	1620
ataaaaaaca tttattttca ttgc	1644
<210> 47	
<211> 1644	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 47	
gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcggctccc gcgggtctgt ctgttgcttc	60
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcac tgcctgttac	120
agctctgctg ctgcctctgg cactgctgct tcatgccgcc agacctgata tacaactcac	180
acaatcacct tcttctctta gcgcatacgt cggggatcgg gttaccatta ctgtcgcgc	240
atcacagtcc gtaacgatac tcgggtccca tctgatccat tggatcagc aaaaaccagg	300
caaagcacc aagctcttga tccaattggc aagcaacgtg caaactggag tcccttctcg	360
gttttccgga agtggctctg gcactgactt tacgttgacc attagtagcc tccaacctga	420
ggatgttgcc acttattatt gtcttcagtc cagaaccatt ccgcgcacat tcggacaggg	480
tactaagttg gaaataaagg gctcaacgtc aggctctggt aagccgggta gcggggaggg	540
atcaacaaa ggtcaagttc agctggtaca aagtgggtgt ggacttgtgc aacctggcag	600
gtctgtgaaa ctctcctgtg ccgctagcgg gtacactttt actgactaca gtataaactg	660
ggtgagacaa gctccaggca aaggactcga atgggttggg tggataaata cagagactag	720

agagccggcc tacgcatacg acttcagggg aaggttcacc atcagtcggg acatttcaaa 780
 gaatacggcg taccttcaaa tgaatagttt gagagcagag gacacagctg tgtattattg 840
 tgcgcgcgac tactcctatg ctatggacta ctgggggcaa ggaaccttgg tgactgtcag 900
 tagcttttgt cctgtgttcc tgccctgcaa gcctaccaca acaccagctc ctagacctcc 960
 aactcctgct cctacaatcg cctctcagcc actgtctctg aggcctgaag cttgtagacc 1020
 tgctgtggc ggagccgtgc ataccagagg actggatttc gcctgcgaca tctacatctg 1080

ggctcctctg gctggaacat gtggcgtgct gctgctgagc ctggatca cctgtactg 1140
 caaccaccgg aacagagtga agttcagcag atccgccgat gctcctgcct accagcaggg 1200
 acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct ggggagaaga gaagagtacg acgtgctgga 1260
 taagcggaga ggcagagatc ctgagatggg cggcaagccc agacggaaga atcctcaaga 1320
 gggcctgtat aatgagctgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggaat 1380
 gaaggcgag cgcagaagag gcaagggaca cgtggactg taccagggcc tgagcacagc 1440
 caccaagat acctatgatg ccctgcacat gcaggccctg cctccaagat gagggcccgt 1500

ttaaaccgc tggtcgtctt tcttctgtc caatttctat taaaggttcc ttgttccgt 1560
 aagtccaact actaaactgg gggatattat gaaggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
 ataaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 48

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 48

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

1 5 10 15

Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Ser Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 49

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 49

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

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

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

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

 115 120 125
 Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 130 135 140
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
 180 185 190

 Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala
 195 200 205
 Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 50
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 50

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala

195 200 205

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

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser

225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 51
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 51
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30
 Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95

 Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 130 135 140
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 52

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140
 Glu Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp
 165 170 175
 Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
 180 185 190

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

245

<210> 53
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 53
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Leu
 20 25 30
 Gly Ser His Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80
 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

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

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

210 215 220
 Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 54
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 54

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30

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

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

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

 165 170 175
 Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
 180 185 190
 Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
 195 200 205
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 55

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Arg Ser Val Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Cys Ala Arg Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 56

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220
Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240
Leu Val Thr Val Ser Ser

245
<210> 57
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 57

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

20 25 30
Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
85 90 95

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

145 150 155 160
Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

 165 170 175
Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

 180 185 190
Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

 195 200 205
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

 210 215 220
Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 58

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110
Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125
Gly Gln Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

130 135 140
Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160
Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175
Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190
Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220
Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240
Leu Val Thr Val Ser Ser

245
<210> 59

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 59
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30
Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45
Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

 65 70 75 80
 Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

 85 90 95
 Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

 100 105 110
 Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

 115 120 125
 Gly Gln Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

 130 135 140

 Gly Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

 165 170 175
 Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

 180 185 190
 Phe Arg Gly Arg Phe Ala Ile Ser Ala Glu Thr Ser Lys Ser Thr Ala

 195 200 205
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

 210 215 220
 Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser

 245

 <210> 60
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 60
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly

1	5	10	15
Gln Arg Ala Thr	Ile Thr Cys Arg Ala Ser	Glu Ser Val Thr	Ile Leu
20	25	30	
Gly Ser His Leu	Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	Gly Gln Pro Pro	
35	40	45	
Lys Leu Leu Ile	Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr	Gly Val Pro Ala	
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser	
65	70	75	80
Ser Val Glu Pro	Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Leu	Gln Ser Arg	
85	90	95	
Thr Ile Pro Arg	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu	Ile Lys Gly	
100	105	110	
Ser Thr Ser Gly	Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly	Ser Thr Lys	
115	120	125	
Gly Gln Ile Gln	Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys	Lys Pro Gly	
130	135	140	
Gly Ser Val Lys	Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr	Phe Thr Asp	
145	150	155	160
Tyr Ser Ile Asn	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp	
165	170	175	
Val Gly Trp Ile	Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr	Ala Tyr Asp	
180	185	190	
Phe Thr Gly Arg	Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys	Ser Met Ala	
195	200	205	
Tyr Leu Gln Ile	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr	
210	215	220	
Cys Ala Leu Asp	Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr	
225	230	235	240
Leu Val Thr Val	Ser Ser		
245			

<210> 61

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gln Thr Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Met Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 62
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide

 <400> 62
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30
 Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

 65 70 75 80
 Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly
 130 135 140

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

Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
 180 185 190
 Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
 195 200 205
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 63
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 63
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30
 Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 64
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 64

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

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu
20 25 30

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
85 90 95
Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110
Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly
130 135 140
Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
145 150 155 160
Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175
Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
180 185 190
Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
195 200 205
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220
Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240
Leu Val Thr Val Ser Ser
245
<210> 65
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 65
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu
 20 25 30
 Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys
 85 90 95
 Asn Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly
 130 135 140
 Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
 180 185 190
 Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
 195 200 205
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 66
 <211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Gln Gly

180 185 190

Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

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

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 67

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly
180 185 190

Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 68

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 68

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

Asn Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
195 200 205

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

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 69

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 69

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

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu

20 25 30

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

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

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

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

Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

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

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Gln Gly
180 185 190

Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 70

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 70

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Asn Leu Ala Ser Asn Val Asn Thr Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 71
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

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

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 72
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 72
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30
 Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95

 Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly
 130 135 140
 Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180	185	190	
Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala			
195	200	205	
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
210	215	220	
Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
225	230	235	240
Leu Val Thr Val Ser Ser			
245			
<210>	73		
<211>	103		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic Polynucleotide		
<400>	73		
gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc		60	
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gcc		103	
<210>	74		
<211>	52		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic Polynucleotide		
<400>	74		
agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca cc		52	
<210>	75		
<211>	89		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic Polynucleotide		
<400>	75		
agaccaagc tggctagcag ctcttcaccc acccagccg cgactgtctc cgccgagccc		60	
ccggggccag gtgtcccggg cgcgccccg		89	
<210>	76		

<211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 76
 gtggaacact tctgaacctg catttttatac tggaactcca gaagcagaat cctttgctaa 60
 ataaatcgca gcc 73

<210> 77
 <211> 137
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 77
 agagaagcag acatcttcta gttctctccc cactctcttc tttccggtac ctgtgagtaa 60
 gctaggggag ggcagctctc acccaggctg atagttcggg gacctggctt tatctactgg 120
 atgagttccg ctgggag 137

<210> 78
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 78
 agaccaagc tggttagcat attgtgcttc caccactgcc aataacaaaa taactagcaa 60
 cc 62

<210> 79
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 79
 aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc cacc 44

<210> 80
 <211> 73

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 80
 cgcgctccgcc ccgcgagcac agagcctcgc ctttgccgat ccgccgccg tccacaccg 60
 ccgccagctc acc 73

<210> 81
 <211> 126
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 81
 cacattgttc tgatcatctg aagatcagct attagaagag aaagatcagt taagtccttt 60
 ggacctgatac agcttgatac aagaactact gatttcaact tctttggctt aattctctcg 120
 gaaacg 126

<210> 82
 <211> 104
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 82
 gtgtctgaaa gcatttctgg agtgttttag gcctgttcac tttctcttac tcactgtcta 60

ttcacttgtc ctgttcactc gtctggaaga tctcagccag cacc 104

<210> 83
 <211> 152
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 83
 gggcccgttt aaacccgctg gctcgtttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt 60
 tgttcgtaa gtccaactac taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat 120
 tctgcctaataaaaaacatt tattttcatt gc 152

<210> 84

<211> 137
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 84
 tgagtgcgac ggccggcaag cccccgctcc cgggctctc gcggtcgac gaggatgctt 60
 ggcacgtacc ccgtgtacat acttcccggg cgcccagcat ggaaataaag caccagcgc 120
 tgccctgggc ccctgcg 137

<210> 85
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 85
 gcggactatg acttagttgc gttacaccct ttcttgacaa aacctaactt gcgcagaaaa 60
 caagatgaga ttggcatggc tttatttgtt tttttgttt tgttttggtt ttttttttt 120
 tttggcttga ctcaggattt aaaaactgga acggtgaagg tgacagcagt cggttggagc 180
 gagcatcccc caaagtctc aatgtggccg aggactttga ttgcacattg ttgtttttt 240
 aatagtcatt ccaaatatga gatgcgttgt tacaggaagt cccttgccat cctaaaagcc 300
 accccacttc tcctaaagga gaatggccca gtcctctccc aagtcacac aggggaggtg 360
 atagcattgc tttcgtgtaa attatgtaat gcaaaatttt ttaaatcttc gccttaatac 420
 ttttttattt tgttttattt tgaatgatga gccttcgtgc ccccccttc cccttttttg 480
 tcccccaact tgagatgtat gaaggctttt ggtctccctg ggagtgggtg gaggcagcca 540

gggcttacct gtacactgac ttgagaccag ttgaataaaa gtgcacacct t 591

<210> 86
 <211> 165
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 86
 attacttcag gggaagagat gacaaaacga gtctttcatt cgggtgtaac ttttctcttt 60
 aattttaact gatttaacac tttttgtgaa ttaatgaaat gataaagact tttatgtgag 120

atttccttat cacagaaata aaatatctcc aaatgtttcc ttttc	165
<210> 87	
<211> 88	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 87	
acctgagact ggtggcttct agaagcagcc attaccaact gtaccttccc ttcttgctca	60
gccaataaat atatcctctt tcactcag	88
<210> 88	
<211> 583	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 88	
tggttgtcct gcctgcaata tttgaatttt aaatctaaat ctatttatta atatttaaca	60
ttatttatat ggggaatata ttttagact catcaatcaa ataagtattt ataatagcaa	120
cttttgtgta atgaaaatga atatctatta atatatgtat tatttataat tcctatatcc	180
tgtgactgtc tcacttaate ctttgttttc tgactaatta ggcaaggcta tgtgattaca	240
aggctttatc tcaggggcca actaggcagc caacctaagc aagatcccat gggttgtgtg	300
tttatttcac ttgatgatac aatgaacact tataagtga gtgatactat ccagttactg	360
ccggtttgaa aatatgcctg caatctgagc cagtgttta atggcatgtc agacagaact	420
tgaatgtgtc aggtgacct gatgaaaaca tagcatctca ggagatttca tgcctggtgc	480
ttccaaatat tgttgacaac tgtgactgta cccaaatgga aagtaactca ttgttataaa	540
ttatcaatat ctaatatata tgaataaagt gtaagttcac aac	583
<210> 89	
<211> 123	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 89	
acacacctgc ctgatgctat caagaggctg aagaaagcgc caaatgtgct attttttgg	60

cacttgcttt atgacgttta ttttctgtt aaagctgaat aaataaaaac tacagtaa	120
gta	123
<210> 90	
<211> 897	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 90	
cctcaagatc aaggaaagga ggatggacga acaggggcc aactggtggg aggcagaggt	60
ggtaggggca gggatgatag gccctggatg tgcccacagg gaccaagaag tgaggtttcc	120
actgtcttgc ctgccagggc cctgtttccc ccgttgccag ccacccctc ccccatcata	180
tcctttgccc caaggctgct cagagggggc ccggtcctgg cccagcccc cacctccgcc	240
ccagacacac ccccgatcg agccctgcag ccaaacagag cttcacaac cagccacaca	300
gagcctgcct cagctgctcg cacagattac ttccaggctg gaaaagtcac acagacacac	360
aaaatgtcac aatcctgtcc ctactcaac acaaaccca aaacacagag agcctgcctc	420
agtacactca aacaacctca aagctgcac atcacacaat cacacacaag cacagccctg	480
acaaccaca caccacaagg cagcaccca cagccagcct cagggccac aggggcactg	540
tcaacacagg ggtgtgccc gaggcctaca cagaagcagc gtcagtacc tcaggatctg	600
aggtcccaac acgtgctgc tcacacacac ggctgttag aattcacctg tgtatctcac	660
gcatatgcac acgcacagcc ccccgatggg tctcttgagt cccgtgcaga cacacacagc	720
cacacacact gccttgccaa aaataccccg tgtctccct gccactcacc tccctccat	780
tcctgagcc ctgatccatg cctcagctta gactgcagag gaactactca tttatttggg	840
atccaaggcc cccaaccac agtacgtcc ccaataaact gcagccgagc tccccac	897
<210> 91	
<211> 97	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 91	
gaagtctgtt cctgtctcc ctgtgcaggg taccctgtag ggtgacctgg aattcgaatt	60
ctgtttccct tgtaaaatat ttgtctgtct cttttt	97
<210> 92	

<211> 218
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 92
 ctatgaagaa ggaaggcatc cagaccagaa accgaaaaat gtctagcaaa tccaaaaagt 60
 gcaaaaaagt gcatgactca ctggaggact tcccaagaa cagctcgttt aaccggccg 120

 ccctctccag acacatgtcc tccctgagcc acatctcgcc cttcagccac tccagccaca 180
 tgctgaccac gccacgccc atgcacccgc catccagc 218
 <210> 93
 <211> 887
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 93
 agggatgctt taaccaaccc tcttctccc cgtcattgta ctgtaactgg gacagaagaa 60
 ataatgggga tatgtggaat ttttaacaac agttaaatgg aaaagcatag acaattactg 120
 tagacatgat aaaagaaaca tttgtatgtt cttagactcg aagtttgata aaagtacctt 180

 ttcattggtt gacagttgtg tgttgattgg ctaggtttct cccgtgtgtt ttatacaaaa 240
 atggaattga taaaccattt tttaaaaaat taatttgtct caaaactgtt ctgttcatga 300
 tgtattagaa atattttact cagactttaa atattttaaa tctcagattg gttattcaga 360
 gtaaccttag aacagaaatt gggaatatat ctttacaatg attgatacca tggatatattg 420
 actcttagat gctattgac tgtagacca ttttttaca acgactaagg aaaaaacctg 480
 ccaattaaat catgatatgc catcaattat gagacatccc aatttgagag atgttagatt 540
 atagaaaagt atgcatttat gactgaaatg gtagtggaat tatttgaatt ctacaccaag 600

 cacttaccat gtgccaggcc ctttcagag tgctctactg accaagaaag ttgttgctgc 660
 cacattatag atgtggagcc taagggtcac agaaattgtg tgctatgcca aaaaacattg 720
 aactggtaga tagaaaatga cagagctagg attcaaacct agatctggct gactccagag 780
 cctagtttta cctggaattg atgttcagtt tatcaaaggt ttctcctttt ggttttaaatt 840
 cccaattttt ggctggcat tgtggtttac gcctgtaac ccaacac 887
 <210> 94
 <211> 578

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400>
 > 94
 cctggaagag ggactccttg cctctcccta tggcctgctg gcccacctcc ctggaccccg 60
 ttccaccctc acccttttcc ttteccatga accctggagg gtggtcccca ccagctcttt 120
 ggaagtgagc agatgctgcg gctggctttc tgtcagcagg ccggcctggc agtgggacaa 180
 tcgccagagg gtggggctgg cagaacacca tctccagcct cagctttgac ctgtctcatt 240
 tcccatattc cttcacaccc agcttctgga aggcattggg tggtctggat ttaaggactt 300
 ctgggggacc aagacatcct caagaaaaca ggggcattcca gggctccctg gatgaataga 360
 atgcaattca ttcagaagct cagaagctaa gaataagcct ttgaaatacc tcattgcatt 420

 tccctttggg cticggcttg gggagatgga tcaagctcag agactggcag tgagagccca 480
 gaaggacctg tataaaatga atctggagct ttacattttc tgcctctgcc ttcctcccag 540
 ctcagcaagg aagtatttgg gcacctacc ctttacct 578
 <210> 95
 <211> 254
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 95
 accacgatcg ttatgctgat cataccctaa tgatcccagc aagataatgt cctgtcctct 60
 aagatgtgca tcaagcctgg tacatactga aaacctata aggtcctgga taatttttgt 120

 ttgattattc attgaagaaa catttatttt ccaattgtgt gaagtttttg actgttaata 180
 aaagaatctg tcaaccatca aagaggtctg cattatgctt gcatgtcaaa aactttaaaa 240
 atcctataat cttc 254
 <210> 96
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 96
 gcggccgctt aattaagctg ctttctgcgg ggcttgcctt ctggccatgc ctttctctc 60

tcccttgac ctgtacctct tggcttttga ataaagcctg agtaggaagt ctag 114

<210> 97

<211> 1177

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 97

gccctgctcg atgctcacag ggccccagc gagagtcctt gcagtcctt tcgacttgca 60

tttttgcagg agcagtatca tgaagcctaa acgcgatgga tataatgttt tgaaggcaga 120

aagcaaaatt atgtttgcca ctttgcaaag gagctcactg tgggtgtctgt gttccaacca 180

ctgaatctgg accccatctg tgaataagcc attctgactc atatccccta tttaacaggg 240

tctctagtgc tgtgaaaaaa aaaatgctga acattgcata taacttatat tgtaagaaat 300

actgtacaat gactttattg catctgggta gctgtaaggc atgaaggatg ccaagaagtt 360

taaggaatat gggagaaata gtgtggaaat taagaagaaa ctaggtctga tattcaaatg 420

gacaaactgc cagttttgtt tcctttcact ggccacagtt gtttgatgca ttaaaagaaa 480

ataaaaaaaaa gaaaaaagag aaaagaaaaa aaaagaaaaa agttgtaggc gaatcattt 540

ttcaaagctg ttggcctctg caaaggaaat accagttctg ggcaatcagt gttaccgttc 600

accagttgcc gttgagggtt tcagagagcc tttttctagg cctacatgct ttgtgaacaa 660

gtccctgtaa ttgtgtttg tatgtataat tcaaagcacc aaaataagaa aagatgtaga 720

tttatttcat catattatac agaccgaact gttgtataaa tttatttact gctagtctta 780

agaactgctt tctttcgttt gtttgtttca atattttcct tctctctcaa tttttggttg 840

aataaactag attacattca gttggcctaa ggtgggtgtg ctcgagggtt ttcttgtttc 900

ttttccattt tgtttttgga tgatatttat taaatagctt ctaagagtcc ggccggcatct 960

gtcttgctcc tattctgca gctgtgctg agggtagcag tgtatgagct accagcgtgc 1020

atgtcagcga cctggcccg acaggccacg tctgcaatc ggcccggtg cctcttcgcc 1080

ctgtcgtgtt ctgtgttagt gatcactgcc ttaatacag tctgttgga taatattata 1140

agcataataa taaagtgaat atattttaaa actacaa 1177

<210> 98

<211> 521

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 98

gccctgctcg atgctcacag ggccccagc gagagtcctt gcagtcctt tcgacttgca 60

tttttcagg agcagtatca tgaagcctaa acgcgatgga tataatgttt tgaaggcaga 120

aagcaaaatt atgtttgcca ctttgcaaag gagctcactg tgggtgtctgt gttccaacca 180

ctgaatctgg accccatctg tgaataagcc attctgactc atatccccta tttaacaggg 240

tctctagtgc tgtgaaaaa aaaatgctga acattgcata taacttatat tgtaagaaat 300

actgtacaat gactttatg catctgggta gctgtaaggc atgaaggatg ccaagaagtt 360

taaggaatat gggagaaata gtgtggaaat taagaagaaa ctaggtctga tattcaaatg 420

gacaaactgc cagttttgtt tcctttcact ggccacagtt gtttgatgca ttaaaagaaa 480

ataaaaaaaa gaaaaaagag aaaagaaaaa aaaagaaaaa a 521

<210> 99

<211> 656

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400>

> 99

gttgtaggcg aatcatttgt tcaaagctgt tggcctctgc aaaggaaata ccagtctcgg 60

gcaatcagtg ttaccgttca ccagttgccg ttgagggttt cagagagcct ttttctaggc 120

ctacatgctt tgtgaacaag tccctgtaat tgttgtttgt atgtataatt caaagcacca 180

aaataagaaa agatgtagat ttatttcac atattatata gaccgaactg ttgtataaat 240

ttatttactg ctagtcttaa gaactgcttt ctttcgtttg tttgtttcaa tattttcctt 300

ctctctcaat ttttggttga ataaactaga ttacattcag ttggcctaag gtggttgtgc 360

tcggagggtt tcttgtttct ttccatttt gtttttggat gatatttatt aaatagcttc 420

taagagtccg gcggcatctg tcttgtccct attcctgcag cctgtgctga gggtagcagt 480

glatgagcta ccagcgtgca tgtcagcgac cctggcccga caggccacgt cctgcaatcg 540

gcccgtctgc ctcttcgcc tgtcgtgttc tgtgttagtg atcactgcct ttaatacagt 600

ctgttggaat aatattataa gcataataat aaagtgaaaa tattttaaaa ctacaa 656

<210> 100

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 100

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 101

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 101

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 102

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 102

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
35

<210> 103

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 103

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln

85 90 95

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

100 105 110

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp

115 120 125

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

130 135 140

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

145 150

<210> 104

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 104

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

1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg

35 40 45
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn

50 55 60
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg

65 70 75 80
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

145 150

<210> 105

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

50 55 60
 Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
 65 70 75 80
 Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 85 90 95
 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 100 105 110
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 115 120 125
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln

 130 135 140
 Ala Leu Pro Pro Arg
 145
 <210> 106
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 106
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu

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

100 105 110
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 115 120 125
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 130 135 140
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 145 150 155 160
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 165 170 175
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 180 185 190
 <210> 107
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 107
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 108

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 108

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 109

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 109

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

20 25

<210> 110

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 110

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

20

<210> 111

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 111

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

1	5	10	15
Arg Pro Pro Thr	Pro Ala Pro Thr	Ile Ala Ser Gln	Pro Leu Ser Leu
20	25	30	
Arg Pro Glu Ala	Cys Arg Pro Ala	Ala Gly Gly Ala	Val His Thr Arg
35	40	45	
Gly Leu Asp Phe	Ala Cys Asp Ile	Tyr Ile Trp Ala	Pro Leu Ala Gly
50	55	60	
Thr Cys Gly Val	Leu Leu Leu Ser	Leu Val Ile Thr	Leu Tyr Cys Asn
65	70	75	80

His Arg Asn

<210> 112

<211> 1515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 112

atggcactgc cagtcacagc actgctgctg ccactggcac tgctgctcca cgccgccaga	60
cccgacatcg tgctgacaca gagcccagca agcctggccg tgagcccagg ccagagagcc	120
acaatcacat gcagagccag cgagtcctg tccttctctg gcatcaacct gatccactgg	180
taccagcaga agcccggaca gccacccaaa ctgctgatct actccgccag caacctgcag	240
tcaggcgtgc cagccagatt cagcggcagc ggagcgggaa ccgacttcac cctgacaatc	300
agctcagtgg aaccagaaga caccgccaac tactactgcc tgcagagcag aacctgccc	360
agaaccttcg gccaaaggcac caaggtcgaa atcaagggt ccacaagcgg cagcggaaag	420
cccgggaagc gcgaggggaa caccaagggc cagatccagc tggcgcagag cggccccgaa	480
ctgaagaaac ccggcggaag cgtgaaaatc tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc	540
tcctacagca tcaactgggt gcgccaggcc ccaggcaagg gcctggaatg ggtcggctgg	600
atcaacaccg agacaagaga gcccgctac gccaggggt tcacaggcag attcaccttc	660

agcgcagaca caagcaagag catggcctac ctgcagatca actccctgag agcagaggac	720
accgccgtct actactgcgc cctggactac ctctactccc tggacttctg gggccagggc	780
accctcgtga ccgtgtccag ctctgtgcc gtgttcctgc cagccaagcc aaccacaaca	840
ccagcaccca gaccaccaac accagcacca acaatcgcca gccagccact gtccctgagg	900
ccagaggcat gcagaccagc agcaggcgga gccgtgcaca ccagaggact ggacttcgcc	960
tgcgacatct acatctgggc accactggcc ggaacatgcg gcgtgctgct gctgagcctg	1020
gtcatcacc tgiactgcaa ccaccggaac aaacgcggga gaaaaagct cctctacatc	1080
ttcaagcaac cattcatgcg ccaggtccaa accacacagg aggaagacgg atgcagctgc	1140
aggttccccg aagaggagga aggcggatgc gagctcagag tgaagttcag cagatccgcc	1200
gacgcaccag cctaccagca gggacagaac cagctgtaca acgagctgaa cctggggaga	1260
agagaagagt acgagctgct ggataagcgg agaggcagag accctgagat gggcggaag	1320
cccagacgga agaaccaca agaggccctg tacaacgagc tgcagaaaga caagatggcc	1380
gaggcctaca gcgagatcgg aatgaagggc gagcgcagaa gaggaagg acacgacgga	1440
ctgtaccagg gcctgagcac agccaccaag gatacctacg atgccctgca catgcaggcc	1500
ctgccaccaa gatga	1515
<210> 113	
<211> 1515	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 113	
atggcactgc cagtcacagc actgctgctg cactggcac tctgctcca cggcccgaga	60
cccgacatcg tctgacaca gagcccagca agcctggccg tgagcccagg ccagagagcc	120
acaatcacat gcagagccag cgagtcctg acaatcctgg gctccacct gatccactgg	180
taccagcaga agcccgga gcccacaaa ctgctgatca acctggccag caacgtgaac	240
acaggcgtgc cagccagatt cagcggcagc ggagcggaa ccgacttcac cctgacaatc	300
agctcagtgg aaccagaaga caccgccaac tactactgcc tgcagagcag aacactgccc	360
agaaccttcg gccaaaggcac caaggtcgaa atcaagggt ccacaagcgg cagcggaaag	420
cccgaagcg gcgagggaag caccaagggc cagatccagc tgggtgcagag cggccccgaa	480
ctgaagaaac ccggcggaag cgtgaaaatc tctgcaagg ccagcggcta caccttcacc	540
gactacagca tcaactgggt gcgccaggcc ccaggcaagg gcctggaatg ggtcggtg	600

atcaacaccg agacaagaga gcccgcctac gcctacgact tcacaggcag attcaccttc 660
agcgagaca caagcaagag catggcctac ctgcagatca actccctgag agcagaggac 720

accgcegtct actactgcgc cctggactac acctacggca tggactactg gggccagggc 780
accctcgtga ccgtgtccag cttcgtgccc gtgttcctgc cagccaagcc aaccacaaca 840
ccagcaccca gaccaccaac accagcacca acaatcgcca gccagccact gtccctgagg 900
ccagaggcat gcagaccagc agcaggcgga gccgtgcaca ccagaggact ggacttcgcc 960
tgcgacatct acatctgggc accactggcc ggaacatgcg gcgtgctgct gctgagcctg 1020
gtcatcacc tgtactgcaa ccaccggaac aaacgcggga gaaaaaagct cctctacatc 1080
ttcaagcaac cattcatgcg cccagtccaa accacacagg aggaagacgg atgcagctgc 1140

aggttccccg aagaggagga aggcggatgc gagctcagag tgaagttcag cagatccgcc 1200
gacgcaccag cctaccagca gggacagaac cagctgtaca acgagctgaa cctggggaga 1260
agagaagagt acgacgtgct ggataagcgg agaggcagag accctgagat gggcggcaag 1320
cccagacgga agaaccaca agagggcctg tacaacgagc tgcagaaaga caagatggcc 1380
gaggcctaca gcgagatcgg aatgaagggc gagcgagaa gaggcaaggg acacgacgga 1440
ctgtaccagg gcctgagcac agccaccaag gatacctacg atgcctgca catgcaggcc 1500
ctgccaccaa gatga 1515

<210> 114

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 114

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 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65			70					75					80					
Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe			
				85							90						95	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr			
				100							105						110	
Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
				115							120						125	
Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly			
				130							135						140	
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu			
				145							150						155	
Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly			
				165							170						175	
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly			
				180							185						190	
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro			
				195							200						205	
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Ala	Glu	Thr			
				210							215						220	
Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp			
				225							230						235	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr			
				245							250						255	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe			
				260							265						270	
Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro			
				275							280						285	
Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys			
				290							295						300	
Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala			
				305							310						315	
Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu			

325	330	335	
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val			
340	345	350	
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn			
355	360	365	
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val			
370	375	380	
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg			
385	390	395	400
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys			
405	410	415	
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg			
420	425	430	
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys			
435	440	445	
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
450	455	460	
<210>	115		
<211>	1389		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic Polynucleotide		
<400>	115		
atggcactgc ctgttaccgc gctgtctctc ccccttgctc tctgtcttca cgcagcgagg			60
cttgacatcg tactcaccca gtctccgagt agcctgtctg caagtgtcgg cgacagggcg			120
acgataagtt gcagagccag cgaaagcgtc acaattttgg gttctcactt gattcactgg			180
tatcagcaga aaccgggcca ggcgccaaaa cttttgattc agctcgcttc aaatgttcag			240
accgggggtcc cagctcggtt ctacaggtcc gggttcaggaa cggacttcac tcttaccatc			300
tcatccgtgg agcctgagga tgttgctgtg tattattgtt tgcagtccag aactatccca			360
cgcacttttg gccaaaggcac caaagtggag ataaaaggat caacatcagg aagcggcaag			420
cctggttccg gcgaaggctc aactaaaggt cagatccaat tggtcgagtc aggtgcagag			480

gttaaaaagc ccggcgggtc tgtgaagggt agttgtaagg catccgggta cacttttacg 540
gactatagca tcaattgggt gcgacaggcc cccgaaaag gtcttgaatg ggtgggttgg 600
attaataccg aaacgcggga accggcctat gcctatgact ttagaggctg cttcgtctatt 660
tcagcagaaa cctcaaagtc cactgcgtat ctgcagatga acagtctccg ggccgaggac 720
accgccgttt actactgcgc cttggattat agctacgcaa tggactattg gggtcaggga 780
accctgggtga ctgttagcag cttcgttcca gtgtttctgc ccgctaagcc cacaaccact 840
cctgcaccgc gaccacccac acctgcgcct acaattgcgt cacagcccct gaggccttca 900

ccggaagcct gtcggccagc cgcaggcggg gcggtccata ctaggggact ggactttgct 960
tgtgatattt acatctgggc tccccttgcc ggaacgtgtg gcgttttctg cttttctctg 1020
gtaataacc tgaattgcaa tcaccggaat cgagtgaagt tctccagaag gcccgatgca 1080
cccgctatc aacagggtca aaatcaattg tataacgaac ttaaccttgg gaggcgcgag 1140
gagtacgatg tactcgacaa aagacgcgga agggaccccg aaatgggcgg caagccgcgg 1200
aggaaaaacc cgcaagaggg actctataac gaacttcaga aggataagat ggcagaagcc 1260
tactcagaga ttggaatgaa gggtagcgcg cgcaggggga agggtcacga tggctctgtat 1320

caaggactgt ctacggcaac caaagacacg tatgacgcat tgcacatgca agccttgcct 1380
ccccggtga 1389

<210> 116

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 116

atggctctgc cggtaacagc gctttcttc ccgcttggcc tcctcttgca cgctgctcgg 60
ccagatattg tcctcacaca gagcccgctc tcaacttcag cgagcgctcg ggaccgcgct 120
accatcagtt gtcgagccag tgaaagcgtc actattcttg ggagccacct tatacattgg 180

tatcaacaaa agccaggcca ggccccaaa ctgctgattc agctcgcatc taatgttcag 240
actggagtgc ctgcaagggt tagcggtagt gggtcaggga cagatttcac cttgaccatt 300
agctcagttg agcctgaaga tgtggccgtt tattactgcc tccaaagccg cactatacct 360
cggaccttcg gccagggaac aaaggtggag attaagggtg gtacctcagg tagtggcaag 420
ccaggagcgc gcgaggggtc taaaaagggt caaattcaat tgggtcgatc cggaccagaa 480
ctgaaaaaac cgggcggggg cgtcaagatt tcctgtgcag catcaggcta tacatttact 540

gattacagta ttaactgggt gagacaagcg cctggaaagg gccttgagtg ggtgggttgg 600

attaacacgg agactagaga acccgcgtac gcctacgatt ttagaggccg gttcactttc 660

tccgcgata caagtaaate cacagcatat ctccaaatga atagccttag agcggaggat 720

accgccgtgt attattgcgc gctcgactat tcttacgcaa tggactactg ggggcagggt 780

actctcgtea ccgtatcctc atttgttccc gtatttttgc ccgccaagcc gaccactact 840

ccggccctc gacctccgac ccctgctccg actattgca gteaaccatt gagccttcgg 900

cctgaggcat gtagaccggc agctgggtggc gcagtccata cacgagggtc tgattttgcg 960

tgcgacatct atatatgggc gccattggct gggacgtcgc gcgtccttct cttgtcactc 1020

gtgataactc tgiactgcaa tcacagaaac cgcgtgaagt tttccagaag cgcggacgcg 1080

ccggcctatc aacaagggca gaatcagctg tacaacgaac tcaatttggg gcgaaggag 1140

gagtatgatg ttttggacaa aaggcgaggc cgcgacctg aaatgggcgg taagccacgc 1200

agaaaaaacc ccaagaggg attgtacaat gaactgcaaa aagacaagat ggctgaggca 1260

tacagtgaga taggaatgaa aggtgaacgg cgccggggaa aaggacatga cgggttgtag 1320

cagggtctta gcaactgaac gaaagatacc tatgacgcc tgcacatgca agcattgccc 1380

ccacggtga 1389

<210> 117

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

50

55

<210> 118

<211> 21

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 118
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ile Thr
 20

<210> 119
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 119
 Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn
 1 5

<210> 120
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 120
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn
 20 25

<210> 121
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 121
 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

<210> 122

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 122

atggcactgc ctgttacagc tctgtgctg cctctggcac tgctgcttca tgccgccaga 60

cctgacatcg tgetgacaca gtctccttcc agcctgagcg catctgtcgg cgacagagcc 120

acaatcagct gcagagccag cgagtctgtg acaatcctgg gctctcacct gatccactgg 180

tatcagcaga agcccgaca ggcacctaaa ctgctgatcc agctggcctc taatgtgcag 240
acaggcgtgc cagccagatt ttctggcagc ggcagcggaa cgcacttcac cctgacaatc 300
agctcagtgg aaccagaaga tgtggccgtg tactactgcc tgcagagcag aacaatcccc 360
agaacctttg gccaaaggcac caaggctgaa atcaagggtc ctacaagcgg cagcggaaag 420
cctggatctg gcgagggatc taccaagggc cagattcagc tgggtgcagtc tggccccgaa 480
ctgaagaaac ctggcgggaag cgtgaaaatc tcctgctcag ccagcggcta caccttcacc 540

gactacagca tcaactgggt tcgccaggcc cctggcaagg gcctggaatg ggtcggctgg 600
atcaacaccg agactagaga gccgcctac gcctacgact tcagaggcag attcaccttc 660
agcgcagaca caagcaagag cacagcctac ctgcagatga actccctgag agcagaggac 720
accgccgtct actattgcgc cctggattac agctacgcca tggattattg gggccagggc 780
accctcgtga ccgtgtcatc ttttgtgcct gtgttcctgc ctgccaagcc taccacaaca 840
ccagctccta gacctccaac tcctgctcct acaatgcct ctgagccact gtctctgagg 900
cctgaggcat gtagacctgc tgctggcgga gccgtgcata ccagaggact ggatttcgcc 960

tgcgacatct acatctgggc tcctctggct ggaacatgtg gcgtgctgct gctgagcctg 1020
gtcatcacc tgactgcaa ccaccggaac agagtgaagt tcagcagatc cgccgatgct 1080
cctgcctacc agcagggaca gaaccagctg tacaacgagc tgaacctggg gagaagagaa 1140
gagtacgacg tgctggataa gcggagaggc agagatcctg agatgggcgg caagcccaga 1200
cggaagaatc ctcaagaggc cctgtataat gagctgcaga aagacaagat ggccgaggcc 1260
tacagcgaga tcggaatgaa gggcgagcgc agaagaggca agggacacga tggactgtac 1320
cagggcctga gcacagccac caaggatacc tatgatgccc tgcacatgca ggccctgcct 1380

ccaagatga 1389

<210> 123

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 123

atggcactgc cggtaacagc gctcctcctc ccgctcggcc tcctcctcca cgcagcacgg 60
ccagacatcg tcctcacaca gagcccgagc agcctcagcg cgagcgtcgg ggaccgcgca 120
accatcagct gccgagccag cgaaagcgtc acaatcctcg ggagccacct gataactgg 180
taccaacaaa agccaggcca ggcccccaaa ctgctgatcc agctcgcaag caacgtccag 240

acaggagtgc cagcaaggtt cagcggaagc gggagcggaa cagacttcac cctcaccatc 300
 agcagcgctc agccagaaga tgtggccgtc tactactgcc tccaaagccg cacaatacca 360
 cggaccttcg gccagggaac aaaggtggag atcaaggga gcaccagcgg aagcggcaag 420
 ccaggagcgc gcgaggggag cacaaaggga caaatccaac tcgtgcagag cggaccagaa 480
 ctgaaaaagc cgggcggaag cgtcaagatc agctgcgcag caagcggcta cacattcaca 540
 gactacagca tcaactgggt gagacaagcg ccaggaaagg gcctcgaatg ggtgggatgg 600
 atcaacacgg agacaagaga acccgcatat gcctacgact tcagaggccg gttcacattc 660

agcgccgaca caagcaagag cacagcatat ctccaaatga acagcctcag agcggaggac 720
 accgccgtgt actactgcgc gctcgactac agctacgcaa tggactactg gggacaggga 780
 acactcgtca ccgtaagcag ctctgtaccg gtattcctcc ccgccaagcc gaccacaaca 840
 ccggccccac gaccaccaac accagccccg acaatcgca gccaaacct cagcctccgg 900
 ccagaggcgt gcagaccggc agcaggaggc gcagtccaca cacgaggact cgacttcgcg 960
 tgcgacatat acatctgggc accactcgca ggaacgtgcg gcgtcctcct cctcagcctc 1020
 gtgataacac tgtactgcaa ccacagaaac cgcgtgaagt tcagcagaag cgcggacgcg 1080

ccggcctacc aacaaggaca gaaccagctg tacaacgaac tcaacctcgg acgaaggag 1140
 gagtacgacg tcctcgacaa aaggcgaggc cgcgaccag aaatgggcgg aaagccacgc 1200
 agaaaaaac ccgaaggagg actctacaac gaactgcaaa aggacaagat ggcagaggca 1260
 tacagcgaga taggaatgaa aggagaacgg cgcgggggaa aaggacacga cgggctctac 1320
 cagggactca gcacagcaac gaaagacacc tacgacgcc tgcacatgca agcaactccc 1380
 ccacggtga 1389

<210> 124

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 124

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 126

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

1 5 10 15

<210> 127

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 127

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 128

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 128

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 129

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 129

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5

<210> 130
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 130

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 131

Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg
 1 5 10 15

<210> 132
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 132

Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly
 1 5 10 15
 Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu
 20 25 30

Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr

35 40 45

Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg

50 55 60

<210> 133

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 133

Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly

1 5 10 15

Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu

20 25 30

Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg

35 40 45