(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0118913
(43) 공개일자 2023년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 39/001154 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7023134
(22) 출원일자(국제) 2021년12월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년07월07일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2021/000873
(87) 국제공개번호 WO 2022/123316
국제공개일자 2022년06월16일
(30) 우선권주장
63/123,331 2020년12월09일 미국(US)

(71) 출원인
다케다 야쿠힌 고교 가부시키가이샤
일본 오사까시 쥬오구 도쇼마찌 4-1-1
(72) 발명자
샤피로, 게리
미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40밀레니엄 파마슈티컬스 인코포레이티드 (내)
초우이타르, 조하라
미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40밀레니엄 파마슈티컬스 인코포레이티드 (내)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 항원 결합제의 조성물및 이의 사용 방법**

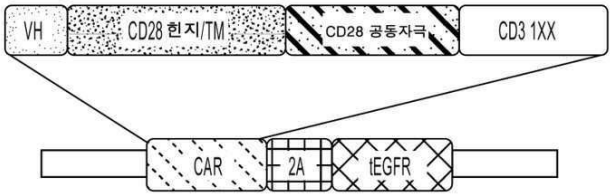
(57) 요 약

구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 및 GCC 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체에 결합하는 항원 결합제 (예컨대, 단일 도메인 항체)를 개시한다. 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 항원 결합 단편, 및 이들 항원 결합제 및 이들의 단편을 포함하는 약학 조성물을 또한 개시한다. 발명은 또한 항체를 활용하는 치료적 방법을 제공하고, 항원-결합 분자가 본원에 제공된다.

대 표 도 - 도1



도 1a



도 1b

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12Y 406/01002 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2023.05)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
(72) 발명자
허, 싱위에
미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40밀레니엄 파마슈티컬스 인코포레이티드 (내)
웅, 메이, 로사
미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40밀레니엄 파마슈티컬스 인코포레이티드 (내)

명 세 서

청구범위

청구항 1

구아닐릴 사이클라제 C (GCC)에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 하나 이상의 세포내 시그널링 도메인을 포함하는, 항-구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인이

HYYWS (HCDR1)(서열번호 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2)(서열번호 11) 및 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3)(서열번호 16)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H);

RYWMS (HCDR1)(서열번호 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2)(서열번호 12) 및 DYTRDV (HCDR3)(서열번호 17)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H);

RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 13) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H);

RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2)(서열번호 14) 및 DYNKDL (HCDR3)(서열번호 19)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H) 또는

RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 15) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H)을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인이 서열번호 1 또는 서열번호 20과 90% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인이

서열번호 21과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역;

서열번호 26과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역;

서열번호 27과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역; 또는

서열번호 28과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인이 면역글로불린 가변 중쇄만 있는 항-GCC 항원 결합 도메인을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포외 항-GCC 항원 결합 도메인 앞에 리더 펩티드를 코딩하는 리더 뉴클레오티드 서열이 있는, 항-GCC CAR.

청구항 7

제28항에 있어서,

상기 리더 펩티드가 서열번호 6, 서열번호 7, 또는 서열번호 42를 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

힌지 도메인을 추가로 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 힌지 도메인이 CD28의 힌지 도메인을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 CD28 힌지 도메인이 서열번호 29를 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 힌지 도메인이 막관통 도메인에 융합되는, 항-GCC CAR.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막관통 도메인이 T-세포 수용체, CD8, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD83, CD86, CD134, CD137, CD154, 및 TNFRSF19의 알파, 베타 또는 제타 쇄로부터 선택된 단백질의 막관통 도메인, 및 이들의 임의의 조합을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 막관통 도메인이 CD28 막관통 도메인을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 CD28 막관통 도메인이 서열번호 30을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 세포내 시그널링 도메인이 공동자극 도메인 및 일차 시그널링 도메인을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 공동자극 도메인이 OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12 및 4-1BB (CD137)의 기능적 시그널링 도메인, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 공동자극 도메인이 CD28의 기능적 시그널링 도메인을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 CD28 공동자극 도메인이 서열번호 32를 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 일차 시그널링 도메인이 CD3 제타 시그널링 도메인을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 CD3 제타 시그널링 도메인이 서열번호 33을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 21

서열번호 47-52로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 항-GCC CAR.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항-GCC CAR을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 23

제22항에 있어서,

표피 성장 인자 수용체 (tEGFR)의 절삭된 서열을 추가로 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 tEGFR이 서열번호 43과 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 tEGFR이 서열번호 43과 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

태그 서열 및 CAR 서열의 동시 바이시스트론 발현을 위해 설계된, 푸린 인식 부위 및 다운스트림 2A 자가-절단 펩티드 서열을 추가로 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 2A 자가-절단 펩티드가 F2A, P2A, E2A 및 T2A로부터 선택되는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 2A 자가-절단 펩티드가 P2A인, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중 어느 한 항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 벡터가 아데노바이러스 벡터, 아데노바이러스-연관된 벡터, DNA 벡터, 렌티바이러스 벡터, 플라스미드, 레트로바이러스 벡터 또는 RNA 벡터인, 벡터.

청구항 31

제29항 또는 제30항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 세포가 T 세포, 동종이계 T 세포, 자가유래 T 세포 또는 종양-침윤 림프구 (TIL)인, 세포.

청구항 33

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항-GCC CAR 또는 제22항 내지 제32항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 세포의 집단.

청구항 34

제33항의 세포의 집단을 포함하는 키트.

청구항 35

제31항 또는 제32항의 세포의 집단을 포함하는 약학 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 집단 내 세포의 70%, 80%, 90% 또는 95% 초과가 항-GCC CAR을 발현하는, 약학 조성물.

청구항 37

치료를 필요로 하는 대상체에 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항-GCC CAR을 포함하는 약학 조성물 또는 세포의 집단을 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 암이 위장관암, 결장직장암, 결장직장 선암종, 결장직장 평활근육종, 결장직장 림프종, 결장직장 흑색종, 결장직장 신경내분비 종양, 전이성 결장암, 위암, 위 선암종, 위 림프종, 위 육종, 식도암, 편평 세포 암종, 식도의 선암종 또는 췌장암으로부터 선택되는, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 암이 위장관암인, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서,

상기 위장관암이 결장암, 결장직장암, 위암 또는 식도암인, 방법.

청구항 41

치료를 필요로 하는 대상체에 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항-GCC CAR을 포함하는 약학 조성물 또는 세포의 집단을 투여하는 단계를 포함하는, 종양 성장 또는 종양 크기를 감소시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차-참조**

[0002] 본 출원은 2020 년 12 월 9 일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 63/123,331에 대한 우선권으로 주장하며, 이는 그 전체가 참조로 본원에 원용된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 이로써 그 전체가 참조로 본원에 원용된다. 2021 년 11 월 19 일에 생성된 상기 ASCII 사본은 MIL-005WO_SL.txt로 명명되고, 140,478 바이트 크기이다.

배 경 기 술

[0005] 구아닐릴 사이클라제 C (GCC)는 장액의 유지, 전해질 항상성 및 세포 증식에서 기능하는 막관통 세포 표면 수용체이며, 예컨대, Carrithers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3018-3020 (2003)을 참고한다. GCC는 소장, 대장 및 직장을 내벽으로 하는(lining) 점막 세포에서 발현된다 (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996)). GCC 발현은 모든 원발성 및 전이성 결장직장 종양에서의 발현과 함께 장 상피 세포의 신생물성 형질전환시 유지된다 (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996); Buc et al. Eur J Cancer 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., Gastroenterology 107: 1653-1661 (1994)). GCC를 표적화하는 신규하고 개선된 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0006] **요약**

[0007] GCC 시그널링 경로의 붕괴는 결장직장암을 비롯한 수많은 위장관 장애와 관련되어 있다. 본 발명은 특히 신규 항-GCC 항원 결합 분자 (예컨대, 단일 도메인 항체 (sdAb)) 및 항-GCC 항원 결합 도메인 (예컨대, sdAb)을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다. 또한, 본 발명은 CAR을 발현하는 숙주 세포 (예컨대, T 세포), 및 CAR 또는 항-GCC 항원 결합 분자를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. CAR 세포는 세포 표면 상에 발현되는 항-GCC CAR 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 생체내에서 고도의 세포용해 및 형질도입된 T 세포 확장 및 지속성과 함께 형질도입된 T 세포 상에서 높은 표면 발현을 나타낸다. 개시된 CAR, 숙주 세포 및 핵산 분자를 사용하는 방법은 예를 들어, 대상체에서 암을 치료하기 위해 또한 제공된다.

[0008] 일 양태에서, 본 발명은 구아닐릴 사이클라제 C (GCC)에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 세포내 시그널링 도메인을 포함하는 항-구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 키메라 항원 수용체 (CAR)을 제공한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 다음을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함한다: HYYWS (HCDR1)(서열번호 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2)(서열번호 11) 및 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3)(서열번호 16)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMS (HCDR1)(서열번호 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2)(서열번호 12) 및 DYTRDV (HCDR3)(서열번호 17)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 13) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역

(CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2)(서열번호 14) 및 DYNKDL (HCDR3)(서열번호 19)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH), 또는 RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 15) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH).

[0010] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR의 항원 결합 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 20과 90% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR의 항원 결합 도메인은 서열번호 21과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역; 서열번호 26과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역; 서열번호 27과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역; 또는 서열번호 28과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR의 항원 결합 도메인은 면역글로불린 가변 중쇄만 있는 항-GCC 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR의 세포외 항-GCC 항원 결합 도메인 앞에 리더 펩티드를 코딩하는 리더 뉴클레오티드 서열이 있다.

[0014] 일부 실시양태에서, 리더 펩티드는 서열번호 6, 서열번호 7, 또는 서열번호 42를 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 힌지 도메인을 추가로 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD28의 힌지 도메인을 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, CD28 힌지 도메인은 서열번호 29를 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 막관통 도메인에 융합된 힌지 도메인을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 T-세포 수용체, CD8, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD83, CD86, CD134, CD137, CD154, 및 TNFRSF19의 알파, 베타 또는 제타 쇄로부터 선택된 단백질의 막관통 도메인, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인을 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 30을 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 시그널링 도메인은 공동자극 도메인 및 일차 시그널링 도메인을 포함한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 공동자극 도메인은 OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12 및 4-1BB (CD137)의 기능적 시그널링 도메인, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 공동자극 도메인은 CD28의 기능적 시그널링 도메인을 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, CD28 공동자극 도메인은 서열번호 32를 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 일차 시그널링 도메인은 CD3 제타 시그널링 도메인을 포함한다.

[0027] 일부 실시양태에서, CD3 제타 시그널링 도메인은 서열번호 33을 포함한다.

[0028] 일 양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 47-52로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 47과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 48과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 49와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 50과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 51과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 52와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GCC CAR을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 표피 성장 인자 수용체 (tEGFR)의 절삭된 서열을 추가로 포함하는, 본원에 기재된 항-GCC CAR을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

[0032] 일부 실시양태에서, tEGFR은 서열번호 43과 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0033] 일부 실시양태에서, tEGFR은 서열번호 43과 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-GCC CAR을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 태그 서열 및 CAR 서열의 동시 바이시스트론 발현을 위해 설계된, 푸린 인식 부위 및 다운스트림 2A 자가-절단 펩티드 서열을 추가로 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 2A 자가-절단 펩티드는 F2A, P2A, E2A 및 T2A로부터 선택된다.

[0036] 일부 실시양태에서, 2A 자가-절단 펩티드는 P2A이다.

[0037] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GCC CAR을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0038] 일부 실시양태에서, 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노바이러스-연관된 벡터, DNA 벡터, 렌티바이러스 벡터, 플라스미드, 레트로바이러스 벡터 또는 RNA 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.

[0039] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GCC CAR을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 세포에 제공한다.

[0040] 일부 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 항-GCC CAR을 발현한다

[0041] 일부 실시양태에서, 세포는 T 세포, 동종이계 T 세포, 자가유래 T 세포 또는 종양-침윤 림프구 (TIL)이다.

[0042] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GCC CAR을 발현하거나 발현할 수 있는 세포의 집단을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 세포의 집단을 포함하며, 여기서 집단 내 세포의 70%, 80%, 90% 또는 95% 초과가 항-GCC CAR을 발현한다.

[0043] 일 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에 본원에 기재된 항-GCC CAR을 포함하는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0044] 일부 실시양태에서, 암은 위장관암, 결장직장암, 결장직장 선암종, 결장직장 평활근육종, 결장직장 림프종, 결장직장 흑색종, 결장직장 신경내분비 종양, 전이성 결장암, 위암, 위 선암종, 위 림프종, 위 육종, 식도암, 편평 세포 암종, 식도의 선암종, 또는 췌장암으로부터 선택된다.

[0045] 일부 실시양태에서, 암은 위장관암이다.

[0046] 일부 실시양태에서, 위장암은 결장암, 결장직장암, 위암 또는 식도암이다.

[0047] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GCC CAR을 포함하는 약학 조성물을 투여함으로써 종양 성장 또는 종양 크기를 감소시키는 방법을 제공한다.

[0048] 일 양태에서, 본 발명은 HYYWS (HCDR1)(서열번호 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2)(서열번호 11) 및 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3)(서열번호 16)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0049] 일 양태에서, 본 발명은 RYWMS (HCDR1)(서열번호 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2)(서열번호 12) 및 DYTRDV (HCDR3)(서열번호 17)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0050] 일 양태에서, 본 발명은 RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 13) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0051] 일 양태에서, 본 발명은 RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2)(서열번호 14) 및 DYNKDL (HCDR3)(서열번호 19)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0052] 일 양태에서, 본 발명은 RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 15) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0053] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 서열번호 1 또는 서열번호 20과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함한다.

[0054] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 서열번호 21과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함한다.

[0055] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 서열번호 26과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함한다.

[0056] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 서열번호 27과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함한다.

[0057] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 서열번호 28과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함한다.

[0058] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 20과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0059] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 21과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0060] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 26과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0061] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 27과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0062] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 28과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함하는 구아닐릴 사이클라제 C (GCC) 결합제를 제공한다.

[0063] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 서열번호 1, 20, 21, 26, 27 또는 28 중 어느 하나와 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함한다.

[0064] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 서열번호 1, 20, 21, 26, 27 또는 28 중 어느 하나와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역을 포함한다.

[0065] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 IgA 항체, IgG 항체, IgE 항체, IgM 항체, 이중- 또는 다중-특이적 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 단리된 CDR 또는 이들의 세트; 단일-쇄 가변 단편 (scFv), 폴리펩티드-Fc 융합, 단일 도메인 항체 (sdAb), VH, 낙타과 항체; 차폐 항체, 소형 모듈식 면역의약품 ("SMIPsTM"), 단일 쇄, 탠덤 디아바디, VHH, 안티칼린, 나노바디, 휴마바디, 미니바디, BiTE, 안키린 반복 단백질, DARPIN, 아비머, DART, TCR-유사 항체, 애드넥틴, 아필린, 트랜스-바디; 아피바디, 트리머X, 마이크로단백질, 파이노머, 센티린; 및 KALBITOR로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0066] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 단일 도메인 항체 (sdAb)이다.

[0067] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 중쇄만 있는 항체 (VH)이다.

[0068] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 약 0.3 나노몰 (nM) 내지 약 10 nM의 KD로 GCC에 결합한다.

[0069] 일부 실시양태에서, GCC 결합제는 약 0.5 nM 내지 약 8 nM의 EC50으로 표적 세포 상의 GCC에 결합한다.

[0070] 일 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에 본원에 기재된 GCC 결합제를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 암은 위장관암, 결장직장암, 결장직장 선암종, 결장직장 평활근육종, 결장직장 림프종, 결장직장 흑색종, 결장직장 신경내분비 종양, 전이성 결장암, 위암, 위 선암종, 위 림프종, 위 육종, 식도암, 편평 세포 암종, 식도의 선암종 또는 췌장암으로부터 선택된다.

[0072] 일부 실시양태에서, 암은 위장관암이다.

[0073] 일부 실시양태에서, 위장관암은 결장암, 결장직장암, 위암 또는 식도암이다.

[0074] 일 양태에서, 본 발명은 GCC 결합제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 여기서 GCC 결합제는 다음을 포함한다: HYYWS (HCDR1)(서열번호 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2)(서열번호 11) 및 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3)(서열번호 16)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMS (HCDR1)(서열번호 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2)(서열번호 12) 및 DYTRDV (HCDR3)(서열번호 17)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 13) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2)(서열번호 14) and DYNKDL (HCDR3)(서열번호 19)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH), 또는 RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 15) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH).

[0075] 일 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에 GCC 결합제를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 GCC 결합제는 다음을 포함한다: HYYWS (HCDR1)(서열번호 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2)(서열번호 11) 및 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3)(서열번호 16)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMS (HCDR1)(서열번호 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2)(서열번호 12) 및 DYTRDV (HCDR3)(서열번호 17)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 13) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH); RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2)(서열번호 14) 및 DYNKDL (HCDR3)(서열번호 19)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH), 또는 RYWMT (HCDR1)(서열번호 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2)(서열번호 15) 및 DYNKDY (HCDR3)(서열번호 18)의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH).

[0076] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 20, 21, 26, 27 또는 28 중 어느 하나와 동일한 VH 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0077] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 20, 21, 26, 27 또는 28 중 어느 하나와 동일한 VH 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0078] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 20, 21, 26, 27 또는 28 중 어느 하나와 동일한 VH 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 단리된 세포를 제공한다.

[0079] 전술한 일반적인 설명 및 다음의 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명을 위한 것이며 청구된 바와 같이 본 발명을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0080] 다음의 도면을 포함하는 본원에 포함된 도면은 제한이 아닌 예시 목적만을 위한 것이다.

도 1a 및 1b는 예시적인 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 묘사한다.

도 2a-2d는 4 개의 종양 세포주를 사용하여 수행된 예시적인 항-GCC CAR-T 생체외 세포독성을 보여준다. HT29-GCC 세포인, GCC를 안정적으로 발현하도록 조작된 인간 결장직장암 세포주 HT29)(도 2a); HT29-VEC (벡터 제어 GCC-음성 세포주)(도 2b); 및 GCC를 내인성으로 발현하는 2 개의 종양 세포주: GSU (도 2c) 및 LS1034 (도 2d). 막대는 3 개의 기술적 반복실험으로부터의 평균+SD 값을 나타낸다. 데이터는 >3 명의 공여자로부터의 항-GCC CAR T 세포로 수행된 >3 개의 독립적인 실험을 나타낸다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 CAR T 세포독성을 결정하였다.

도 3a-3d는 4 개의 종양 세포주를 사용하여 수행된 예시적인 항-GCC CAR-T 세포 생체외 세포독성을 보여준다. HT29-GCC 세포인, GCC를 안정적으로 발현하도록 조작된 인간 결장직장암 세포주 HT29)(도 3a); HT29-VEC (벡터 제어 GCC-음성 세포주)(도 3b; 및 GCC를 내인성으로 발현하는 2 개의 종양 세포주: GSU (도 3c) 및 LS1034 (도 3d) 막대는 3 개의 기술적 반복실험으로부터의 평균+SD 값을 나타낸다. 데이터는 >3 명의 공여자로부터의 항-GCC CAR T 세포로 수행된 >3 개의 독립적인 실험을 나타낸다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 존재 하에 CAR T 세포독성을 결정하였다.

도 4a-4d는 생체외에서 GCC-발현 (HT29-GCC)(도 4a), GSU (도 4c), LS1034 (도 4d) 및 GCC-음성 (HT29-VEC, 도 4b) 종양 세포와 공동-배양된 항-GCC CAR-T 세포에 의한 예시적인 IFN-g 사이토카인 분비를 보여준다. Intellicyt QBeads 인간 PlexScreen 키트 (Sartorius, 90702)를 사용하여 상청액 중 분비된 IFNg를 검출하였다. 막대는 3 개의 기술적 반복실험으로부터의 평균+SD 값을 나타낸다. 데이터는 >3 명의 공여자로부터의 항-GCC CAR T 세포로 수행된 >3 개의 독립적인 실험을 나타낸다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 사이토카인 분비를 결정하였다.

도 5a-5d는 생체외에서 GCC-발현 (HT29-GCC (도 5a), GSU (도 5c), LS1034 (도 5d) 및 GCC-음성 (HT29-VEC, 도 5b) 종양 세포와의 항-GCC CAR-T 공동-배양물에 의한 예시적인 IFN-g 사이토카인 분비를 보여준다. Intellicyt QBeads 인간 PlexScreen 키트 (Sartorius, 90702)를 사용하여 상청액 중 분비된 IFNg를 검출하였다. 막대는 3 개의 기술적 반복실험으로부터의 평균+SD 값을 나타낸다. 데이터는 >3 명의 공여자로부터의 항-GCC CAR T 세포로 수행된 >3 개의 독립적인 실험을 나타낸다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 존재 하에 사이토카인 분비를 결정하였다.

도 6a-6d는 생체외에서 GCC-발현 (HT29-GCC (도 6a), GSU (도 6c), LS1034 (도 6d) 및 GCC-음성 (HT29-VEC, 도 6b) 종양 세포와의 안트(ant)-GCC CAR-T 공동-배양물에 의한 예시적인 IL-2 사이토카인 분비를 보여준다. Intellicyt QBeads 인간 PlexScreen 키트 (Sartorius, 90702)를 사용하여 상청액 중 분비된 IFL-2를 검출하였다. 막대는 3 개의 기술적 반복실험으로부터의 평균+SD 값을 나타낸다. 데이터는 >3 명의 공여자로부터의 항-GCC CAR T 세포로 수행된 >3 개의 독립적인 실험을 나타낸다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 사이토카인 분비를 결정하였다.

도 7a-7d는 생체외에서 GCC-(HT29-GCC (도 7a), GSU (도 7c), LS1034 (도 7d) 및 GCC-음성 (HT29-VEC, 도 7b) 종양 세포와의 항-GCC CAR-T 공동-배양물에 의한 예시적인 IL-2 사이토카인 분비를 보여준다. Intellicyt QBeads 인간 PlexScreen 키트 (Sartorius, 90702)를 사용하여 상청액 중 분비된 IFL-2를 검출하였다. 막대는 3 개의 기술적 반복실험으로부터의 평균+SD 값을 나타낸다. 데이터는 >3 명의 공여자로부터의 항-GCC CAR T 세포로 수행된 >3 개의 독립적인 실험을 나타낸다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 존재 하에 사이토카인 분비를 결정하였다.

도 8a 및 8b는 2 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 8a) 및 D686 (도 8b)으로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델 (내인성으로 발현하는 GCC 발현 결장직장암, GCC H-점수 = 300/300)에서 시간 경과 (40 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 9a-9c는 3 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 9a), D797 (도 9b) 및 D954 (도 9c)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델 (내인성 GCC 발현 결장직장암, GCC H-점수 = 300/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 10a-10c는 3 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 10a), D797 (도 10b) 및 D954 (도 10c)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델 (내인성 GCC 발현 결장직장암, GCC H-점수 = 300/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 존재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 11a-11c는 3 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 11a), D954 (도 11b) 및 D686 (도 11c)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델 (내인성 GCC 발현 결장직장암, GCC H-점수 = 300/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 12a-12c는 3 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 12a), D954 (도 12b) 및 D686 (도 12c)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델 (내인성 GCC 발현 결장직장암, GCC H-점수 = 300/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 존재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 13a 및 13b는 2 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 13a) 및 D954 (도 13b)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세

포로 처리된 GSU 모델 (내인성 GCC 발현 위암, GCC H-점수 = 170/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 14a 및 14b는 2 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 14a) 및 D954 (도 14b)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 GSU 모델 (내인성 GCC 발현 위암, GCC H-점수 = 170/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 존재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 15a-c는 3 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 15a), D954 (도 15b) 및 D686 (도 15c)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 GSU 모델 (내인성 GCC 발현 위암, GCC H-점수 = 170/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 16a-c는 3 개의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 16a), D954 (도 16b) 및 D686 (도 16c)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 GSU 모델 (내인성 GCC 발현 위암, GCC H-점수 = 170/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 17은 건강한 공여자로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 LS1034 모델 (내인성 GCC 발현 결장직장암, GCC H-점수 = 300/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화의 예시적인 항-종양 효험을 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

도 18은 건강한 공여자로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 LS1034 모델 (내인성 GCC 발현 결장직장암, GCC H-점수 = 300/300)에서 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화의 예시적인 항-종양 효과 결과를 보여준다. 절삭된 EGFR (tEGFR)의 존재 하에 항-종양 효과를 결정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081] **정의**

[0082] 본 발명을 보다 용이하게 이해하기 위해, 먼저 특정 용어를 아래에 정의된다. 다음의 용어 및 기타 용어에 대한 추가적인 정의가 본 명세서를 통해 제시된다.

[0083] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "(단수형)"은 문맥상 명백하게 달리 지시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "방법"에 대한 언급은 하나 이상의 방법 및/또는 본원에 기재된 및/또는 본 개시내용 등을 판독할 때 당업자에게 명백해질 유형의 단계를 포함한다.

[0084] ***투여하다***: 본원에 사용된 바와 같이, 대상체에 조성물을 "투여하는 것"은 조성물을 대상체에 부여, 적용 또는 접촉시키는 것을 의미한다. 투여는 예를 들어, 국부, 경구, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내, 척수강내 및 피내와 같은 다수의 경로 중 임의의 것에 의해 달성될 수 있다.

[0085] ***친화도***: 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "친화도"는 결합 상호작용의 강도를 나타내는 결합 모이어티 (예컨대, 항원 결합제 (예컨대, 본원에 기재된 가변 도메인) 및 표적 (예컨대, 항원 (예컨대, GCC) 사이의 결합 상호작용의 특질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 친화도의 척도는 해리 상수 (K_D)로서 표현된다. 일부 실시양태에서, 결합 모이어티는 표적에 대해 높은 친화도 (예컨대, 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-8} M 미만, 또는 약 10^{-9} M 미만의 K_D)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 결합 모이어티는 표적에 대해 낮은 친화도 (예컨대, 약 10^{-7} M 초과, 약 10^{-6} M 초과, 약 10^{-5} M 초과, 또는 약 10^{-4} M 초과의 K_D)를 갖는다.

[0086] ***동물***: 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "동물"은 동물계의 임의의 구성원을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 인간을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 비-인간 동물을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유류 (예컨대, 설치류, 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 및/또는 돼지)이다. 일부 실시양태에서, 동물은 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충 및/또는 벌레를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 동물은 트랜스제닉 동물, 유전자-조작된 동물 및/또는 클론일 수 있다.

[0087] ***자가유래:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "자가유래"는 나중에 개체 내로 재-도입될 동일한 개체로부터 유래된 임의의 재료를 지칭한다.

[0088] ***동종이계:*** "동종이계"는 상이한 개체 또는 개체들에 투여된 하나의 개체로부터 유래된 재료를 지칭한다.

[0089] ***항체 또는 항원 결합제:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체" 또는 "항원 결합제"는 특정 표적 항원에 대한 특이적 결합을 부여하기에 충분한 표준 면역글로불린 서열 요소를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 당업자는 용어가 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체" 또는 "항원 결합제"는 또한 "항체 단편" 또는 "항체 단편들" 또는 "항원 결합 부분"을 지칭하며, 이는 온전한 항체의 일부, 예컨대, 예를 들어, 항체의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다. "항체 단편"의 예는 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편; 트리바디; 테트라바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중-특이적 항체에 포함된 CDR-함유 모이어티를 포함한다. 당업자는 용어 "항체 단편"이 임의의 특정 생성 방식을 암시하지 않으며 이에 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 항체 단편은 온전한 항체의 절단, 화학적 합성, 재조합 생산 등을 비제한적으로 포함하는 임의의 적절한 방법론의 사용을 통해 생산될 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 자연에서 생산된 바와 같은 온전한 항체는 통상적으로 "Y-자형" 구조로서 지칭되는 구조로 서로 회합되는 2 개의 동일한 중쇄 폴리펩티드 (각각 약 50 kD) 및 2 개의 동일한 경쇄 폴리펩티드 (각각 약 25 kD)를 포함하는 대략 150 kD 사합체 약제이다. 각각의 중쇄는 4 개 이상의 도메인 (각각 약 110 개의 아미노산 길이)-아미노-말단 가변 (V_H) 도메인 (Y 구조의 끝에 위치됨)에 이어서, C_H1, C_H2 및 카복시-말단 C_H3 (Y 줄기의 기저에 위치됨)의 3 개의 불변 도메인이 뒤따름-을 포함한다. "스위치"로서 알려진 짧은 영역은 중쇄 가변 영역 및 불변 영역을 연접한다. "힌지"는 C_H2 및 C_H3 도메인을 항체의 나머지 부분에 연접한다. 이 힌지 영역에서의 2 개의 디설파이드 결합은 온전한 항체에서 2 개의 중쇄 폴리펩티드를 서로 연접한다. 각각의 경쇄는 다른 "스위치"에 의해 서로 분리된 2 개의 도메인 - 아미노-말단 가변 (V_L) 도메인에 이어서, 카복시-말단 불변 (C_L) 도메인이 뒤따름 -을 포함한다. 온전한 항체 사합체는 중쇄 및 경쇄가 단일 설파이드 결합에 의해 서로 연결된 2 개의 중쇄-경쇄 이합체를 포함하며; 2 개의 다른 디설파이드 결합은 중쇄 힌지 영역을 서로 연접하여, 이합체가 서로 연접되고 사합체가 형성된다. 자연적으로 생산된 항체는 또한 전형적으로 C_H2 도메인에서 글리코실화된다. 자연 항체에서의 각각의 도메인은 압축된 역평행 베타 배럴에서 서로에 대해 패킹된 2 개의 베타 시트 (예컨대, 3-, 4- 또는 5-가닥 시트)로 형성된 "면역글로불린 폴드(fold)"을 특징으로 하는 구조를 갖는다. 각각의 가변 도메인은 "보체 결정 영역" (CDR1, CDR2 및 CDR3)으로서 알려진 3 개의 초가변 루프, 및 4 개의 다소 불변하는 "프레임워크" 영역 (FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 함유한다. 자연 항체가 폴딩될 때, FR 영역은 도메인에 대한 구조적 프레임워크를 제공하는 베타 시트를 형성하고, 중쇄 및 경쇄 둘 모두로부터의 CDR 루프 영역은 3-차원 공간에서 함께 모여, 이들은 Y 구조의 끝에 위치한 단일 초가변 항원 결합 부위을 생성한다. 항체 폴리펩티드 쇄 간의 아미노산 서열 비교는 2 개의 경쇄 (κ 및 λ) 부류, 몇몇 중쇄 (예컨대, μ, γ, α, ε, δ) 부류 및 특정 중쇄 하위부류 (α1, α2, γ1, γ2, γ3 및 γ4)를 정의하였다. 항체 부류 (IgA [IgA1, IgA2 포함], IgD, IgE, IgG [IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 포함] 및 IgM)는 활용된 중쇄 서열의 부류에 기반하여 정의된다.

[0090] 본 발명의 목적을 위해, 특정 실시양태에서, 자연 항체에서 발견되는 충분한 면역글로불린 도메인 서열을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 복합체는 이러한 폴리펩티드가 자연적으로 생산되는지 (예컨대, 항원에 반응하는 유기체에 의해 생성됨), 또는 재조합 조작, 화학적 합성 또는 기타 인공 시스템 또는 방법론에 의해 생산되는지 여부에 관계없이 "항체" 또는 "항원 결합제"로서 지칭 및/또는 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 단클론 항체이며; 일부 실시양태에서, 항체는 다클론 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 마우스, 토끼, 영장류 또는 인간 항체의 특징인 불변 영역 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 서열 요소는 당업계에 알려진 바와 같이 인간화, 영장류화, 키메라 등이다. 더욱이, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체" 또는 "항원 결합제"는 (달리 언급되지 않거나 문맥상 명백하지 않는 한) 대안적인 제시의 항체 구조적 및 기능적 특징을 포착하기 위한 당업계에 알려진 또는 개발된 작제물 또는 포맷 중 임의의 것을 적절한 실시양태에서 지칭할 수 있음을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 용어는 이중- 또는 다른 다중-특이적 (예컨대, 자이바디 등) 항체, 소형 모듈식 면역의약품 ("SMIPs™"), 단일 쇄 항체, 낙타과 항체 및/또는 항체 단편을 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 자연적으로 생산되는 경우 가질 공유 변형 (예컨대, 글리칸의 부착)이 결여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 공유 변형 (예컨대, 글리칸의 부착, 페이로드 [예컨대, 검출가능한 모이어티, 치료적 모이어티, 촉매적 모이어티 등], 또는 다른 펜던트 그룹 [예컨대, 폴리-에틸렌 글리콜 등])을 함유할 수 있다.

[0091] ***대략 또는 약:*** 본원에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 관심 있는 값에 적용된 바와 같은 용어 "대략" 또는 "약"은 언급된 참조 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되거나 달리 내용으로부터 분명하지 않은 한 (이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과할 경우를 제외함), 언급된 참조 값의 어느 한 방향 (초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 이하 이내에 속하는 값의 범위를 지칭한다.

[0092] ***상보성 결정 영역 (CDR):*** 가변 도메인의 "CDR"은 Kabat, Chothia, Kabat 및 Chothia 둘 모두의 누적조항, AbM, 접촉의 정의, 및/또는 입체형태적 정의 또는 당업계에 잘 알려진 임의의 CDR 결정 방법에 따라 식별되는 가변 영역 내의 아미노산 잔기이다. 항체 CDR은 원래 Kabat 등에 의해 정의된 초가변 영역으로서 식별될 수 있다. 예컨대, Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C 참고. CDR의 위치는 또한 원래 Chothia 등에 의해 기재된 구조적 루프 구조로서 식별될 수 있다. 예컨대, Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989 참고. CDR 식별에 대한 다른 접근법은 Kabat 및 Chothia 사이의 절충안이며 Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어 (현재 Accelrys®)를 사용하여 도출되는 "AbM 정의" 또는 MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996에 제시된, 관찰된 항원 접촉에 기반한 CDR의 "접촉 정의"를 포함한다. 본원에서 CDR의 "입체형태적 정의"로서 지칭되는 다른 접근법에서, CDR의 위치는 항원 결합에 대한 엔탈피 기여를 하는 잔기로서 식별될 수 있다. 예컨대, Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283: 1 156-1166, 2008 참고. 또 다른 CDR 경계 정의는 위의 접근법 중 하나를 엄격하게 따르지 않을 수 있지만, 그럼에도 불구하고 Kabat CDR의 적어도 일부와 중첩될 것이며, 이들은 특정 잔기 또는 잔기의 그룹 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 유의한 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 결과에 비추어 단축되거나 길어질 수 있다. 달리 언급하지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이, CDR 정의는 Kabat CDR에 따른다.

[0093] ***이펙터 기능:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이펙터 기능"은 본원에 기재된 항원 결합제에 기인할 수 있는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 다음을 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체의 하향 조절; 및 B 세포 활성화. "감소 또는 최소화된" 항체 이펙터 기능은 야생형 또는 변형되지 않은 항체로부터 50% 이상 (대안적으로 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 감소됨을 의미한다. 항체 이펙터 기능의 결정은 당업자에 의해 용이하게 결정가능하고 측정가능하다. 일부 실시양태에서, 보체 결합, 보체 의존적 세포독성 및 항체 의존적 세포독성의 항체 이펙터 기능이 영향을 받는다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능은 글리코실화를 제거한 불변 영역에서의 돌연변이, 예컨대, "이펙터-없는 돌연변이"를 통해 제거된다. 일 양태에서, 이펙터-없는 돌연변이는 CH2 영역에서의 N297A 또는 DANA 돌연변이 (D265A+N297A)이다. Shields et al., J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604 (2001). 대안적으로, 감소된 또는 제거된 이펙터 기능을 초래하는 추가적인 돌연변이는 다음을 포함한다: K322A 및 L234A/L235A (LALA). 대안적으로, 이펙터 기능은 글리코실화되지 않는 숙주 세포 (예컨대, 대장균)에서의 발현 또는 이펙터 기능을 촉진하는 데 효과가 없거나 덜 효과적인 변경된 글리코실화 패턴을 초래하는 것과 같은 생산 기술을 통해 감소 또는 제거될 수 있다 (예컨대, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278 (5):3466-3473 (2003).

[0094] ***항체-의존적 세포-매개된 세포독성*** 또는 ADCC는 특정 세포독성 세포 (예컨대, 자연 살해 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가 이들 세포독성 이펙터가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합하고 후속적으로 세포독소로 표적 세포를 살해시키는 것을 가능하게 하는 세포독성의 형태를 지칭한다. 항체는 세포독성 세포를 "무장"하고, 이 메커니즘에 의해 표적 세포를 살해시키는 데 필요하다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 Fc 발현은 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)의 464 페이지에서 표 3에 요약되어 있다. 관심 있는 분자의 ADCC 활성을 판정하기 위해, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 것과 같은 생체외 ADCC 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 있는 분자의 ADCC 활성은 예컨대, Clynes et al., PNAS USA 95: 652-656 (1998)에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 생체내에서 판정될 수 있다.

[0095] ***항원:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항원"은 면역 반응을 이끌어내는 약제; 및/또는 유기체에 노출되거나 투여될 때 T 세포 수용체 (예컨대, MHC 분자에 의해 제시될 때) 또는 항체 (예컨대, B 세포에 의해 생산됨)에 의해 결합되는 약제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항원은 유기체에서 체액성 반응 (예컨대, 항원-특이적 항체의 생산을 포함함)을 이끌어내고; 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시양태에서, 항원은 유기체에서 세포성

반응 (예컨대, T-세포의 수용체가 항원과 특이적으로 상호작용하는 T-세포를 수반함)을 이끌어낸다. 특정 항원이 표적 유기체 종의 모든 구성원이 아닌 표적 유기체 (예컨대, 마우스, 토끼, 영장류, 인간)의 하나 또는 여러 구성원에서 면역 반응을 이끌어낼 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 일부 실시양태에서, 항원은 표적 유기체 종의 구성원의 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 면역 반응을 이끌어낸다. 일부 실시양태에서, 항원은 항체 및/또는 T 세포 수용체에 결합하고, 유기체에서 특정 생리학적 반응을 유도할 수 있거나 유도하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 항원은 이러한 상호작용이 생체내에서 발생하는지 여부에 관계없이 생체외에서 항체 및/또는 T 세포 수용체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원은 이종 면역원에 의해 유도된 것들을 포함하는 특이적 체액성 또는 세포성 면역의 생성물과 반응한다. 개시된 조성물 및 방법의 일부 실시양태에서, GCC 단백질은 항원이다.

[0096] ***이와 연관된:*** 2 개의 이벤트 또는 엔티티는 하나의 존재, 수준 및/또는 형태가 다른 것의 존재, 수준 및/또는 형태와 상관되는 경우, 용어가 본원에서 사용된 바와 같이 서로 "연관"된다. 예를 들어, 특정 엔티티 (예컨대, 폴리펩티드)는 이의 존재, 수준 및/또는 형태가 (예컨대, 관련 집단에 걸쳐) 질환, 장애 또는 병태의 발병률 및/또는 감수성과 상관되는 경우, 특정 질환, 장애 또는 병태와 연관되는 것으로 간주된다. 일부 실시양태에서, 2 개 이상의 엔티티는 이들이 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 경우 서로 물리적으로 "회합"되어, 서로 물리적으로 근접해 있고 유지된다. 일부 실시양태에서, 서로 물리적으로 회합된 2 개 이상의 엔티티는 서로 공유적으로 연결되며; 일부 실시양태에서, 물리적으로 서로 회합된 2 개 이상의 엔티티는 서로 공유적으로 연결되지 않고, 예를 들어, 수소 결합, 반 데르 발스 상호작용, 소수성 상호작용, 자성 및 이들의 조합에 의해 비-공유적으로 회합된다.

[0097] ***결합하는:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "결합"은 전형적으로 2 개 이상의 엔티티 사이의 비-공유 회합을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. "직접" 결합은 엔티티 또는 모이어티 간의 물리적 접촉을 포함하며; 간접 결합은 하나 이상의 중간체 엔터티와의 물리적 접촉을 통한 물리적 상호 작용을 포함한다. 2 개 이상의 엔티티 간의 결합은 상호작용하는 엔티티 또는 모이어티가 단리되어 연구되거나 더 복잡한 시스템의 맥락에서 연구되는 경우 (예컨대, 담체 엔티티 및/또는 생물학적 시스템 또는 세포에서 공유적으로 또는 달리 회합되는 동안)를 포함하여 다양한 맥락 중 임의의 것에서 판정될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "K_a"는 결합 모이어티/표적 복합체를 형성하기 위한 특정 결합 모이어티 및 표적의 회합 속도를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "K_d"는 특정 결합 모이어티/표적 복합체의 해리 속도를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "K_D"는 K_d 대 K_a의 비 (즉, K_d/K_a)로부터 수득되는 해리 상수를 지칭하며, 몰 농도 (M)로서 표현된다. K_D 값은 예컨대, 표면 플라즈몬 공명을 사용하거나 Biacore® 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용함으로써 당업계에 잘 확립된 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0098] ***담체:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "담체"는 조성물과 함께 투여되는 희석제, 아쥬반트, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 일부 예시적인 실시양태에서, 담체는 멸균 액체, 예컨대, 예를 들어, 물, 및 예를 들어, 땅콩유, 대두유, 광유 및 참기름 등과 같은 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 오일을 포함하는 오일을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 담체는 하나 이상의 고체 구성요소이거나, 이를 포함한다.

[0099] ***특징적인 부분:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "특징적인 부분"은 가장 넓은 의미에서, 그의 존재 (또는 부재)가 물질의 특정 특징, 속성 또는 활성의 존재 (또는 부재)와 상관되는 물질의 부분을 지칭하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 물질의 특징적인 부분은 특정 특징, 속성 또는 활성을 공유하는 물질 및 관련 물질에서 발견되지만 특정 특징, 속성 또는 활성을 공유하지 않는 것들에서는 발견되지 않는 부분이다.

[0100] ***코돈-최적화된:*** 본원에 사용된 바와 같이, "코돈-최적화된" 핵산 서열은 핵산 서열의 번역 및 생성된 단백질의 발현이 특정 발현 시스템에 대해 최적화되어 개선되도록 변경된 핵산 서열을 지칭한다. "코돈-최적화된" 핵산 서열은 "코돈-최적화된" 핵산 서열이 기반으로 하는 비-최적화된 모 서열과 동일한 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 핵산 서열은 포유동물 세포 (예컨대, CHO 세포, 인간 세포, 마우스 세포 등), 박테리아 세포 (예컨대, 대장균), 곤충 세포, 효모 세포 또는 식물 세포에서 발현을 위해 "코돈-최적화"될 수 있다.

[0101] ***비교가능한:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비교가능한"은 서로 동일하지 않을 수 있지만 이들 사이의 비교를 허용하기에 충분히 유사하여, 관찰된 차이 또는 유사성에 기반하여 결론이 합리적으로 도출될 수 있는 2 개 이상의 약제, 엔티티, 상황, 조건의 세트 등을 지칭한다. 당업자는 2 개 이상의 이러한 약제, 엔티티, 상황, 조건의 세트 등이 비교가능한 것으로 간주되기 위해 임의의 주어진 상황에서 어느 정도의 동일성이 요구되는지를 맥

락에서 이해할 것이다.

[0102] ***이에 상응하는:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "상응하는"은 종종 관심 있는 폴리펩티드에서의 아미노산 잔기의 위치/동일성을 지정하기 위해 사용된다. 당업자는 단순성을 위해, 폴리펩티드 내의 잔기가 종종 참조 관련된 폴리펩티드를 기반으로 하는 표준 넘버링 시스템을 사용하여 지정되어, 예를 들어, 위치 190에서의 잔기에 "상응하는" 아미노산이 실제로 특정 아미노산 쇄의 190번째 아미노산일 필요는 없지만, 참조 폴리펩티드의 190번에서 발견되는 잔기에 상응하다는 것을 용이하게 이해할 것이며; 당업자는 "상응하는" 아미노산을 식별하는 방법을 용이하게 이해한다.

[0103] ***로부터 유래된:*** 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "로부터 유래된" 또는 "지정된 서열에 특이적인" 서열은 예컨대, 지정된 서열의 연속 영역에 상응하는, 즉, 이와 동일한 또는 이에 상보적인 대략 6 개 이상의 뉴클레오티드 또는 2 개 이상의 아미노산, 약 9 개 이상의 뉴클레오티드 또는 3 개 이상의 아미노산, 약 10-12 개 이상의 뉴클레오티드 또는 4 개의 아미노산, 또는 약 15-21 개 이상의 뉴클레오티드 또는 5-7 개의 아미노산의 연속적인 서열을 포함하는 서열을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 서열은 지정된 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 모두를 포함한다. 서열은 당업계에 알려진 기술에 의해 결정된 바와 같은 특정 서열에 고유한 서열 영역에 상보적이거나 (폴리뉴클레오티드 서열의 경우), 이와 동일할 수 있다. 서열이 유래될 수 있는 영역은 특이적 에피토프를 코딩하는 영역, CDR을 코딩하는 영역, 프레임워크 서열을 코딩하는 영역, 불변 도메인 영역을 코딩하는 영역, 가변 도메인 영역을 코딩하는 영역뿐만 아니라 비-번역된 및/또는 비-전사된 영역을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 유래된 서열은 연구 중인 관심 있는 서열로부터 반드시 물리적으로 유래될 것은 아니지만, 폴리뉴클레오티드가 유래되는 영역(들)의 염기의 서열에 의해 제공된 정보에 기반하여, 화학적 합성, 복제, 역전사 또는 전사를 비제한적으로 포함하는 임의의 방식으로 생성될 수 있다. 이와 같이, 이는 원래 폴리뉴클레오티드의 센스 또는 안티센스 배향을 나타낼 수 있다. 또한, 지정된 서열의 영역에 상응하는 영역의 조합은 의도된 용도와 일치하도록 당업계에 알려진 방식으로 변형되거나 조합될 수 있다. 예를 들어, 서열은 지정된 서열의 일부를 각각 포함하고 지정된 서열과 동일하지 않지만 지정된 서열로부터 유래된 서열을 나타내는 영역으로 중단되는 2 개 이상의 연속 서열을 포함할 수 있다. 항체 분자와 관련하여, "그로부터 유래된"은 비교 항체와 기능적으로 또는 구조적으로 관련된 항체 분자를 포함하며, 예컨대, "그로부터 유래된"은 유사한 또는 실질적으로 동일한 서열 또는 구조를 갖는, 예컨대, 동일한 또는 유사한 CDR, 프레임워크 또는 가변 영역을 갖는 항체 분자를 포함한다. 항체에 대한 "그로부터 유래된"은 또한 잔기, 예컨대, 하나 이상의, 예컨대, 2, 3, 4, 5 또는 6 개 이상의 잔기를 포함하며, 이는 인접할 수도 있고 인접하지 않을 수도 있지만, 넘버링 체계 또는 즉, 비교 서열의 CDR 또는 프레임워크 영역 내의 일반적인 항체 구조에 대한 상동성 또는 3-차원 근접성에 따라 정의되거나 식별된다. 용어 "그로부터 유래된"은 그로부터 물리적으로 유래된 것에 제한되지 않고, 임의의 방식, 예컨대, 다른 항체를 설계하기 위해 비교 항체로부터의 서열 정보의 사용에 의한 생성을 포함한다.

[0104] ***결정하다:*** 본원에 기재된 많은 방법론은 "결정" 단계를 포함한다. 본 명세서를 판독하는 당업자는 이러한 "결정"이 예를 들어, 본원에 명시적으로 지칭된 구체적인 기술을 포함하여 당업자가 이용가능한 다양한 기술 중 임의의 것을 활용할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 실시양태에서, 결정은 물리적 샘플의 조작을 수반한다. 일부 실시양태에서, 결정은 예를 들어, 관련 분석을 수행하도록 적응된 컴퓨터 또는 기타 처리 장치를 활용하는 데이터 또는 정보의 고려 및/또는 조작을 수반한다. 일부 실시양태에서, 결정은 공급원으로부터 관련 정보 및/또는 자료를 받는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 결정은 샘플 또는 엔티티의 하나 이상의 특징을 비교가능한 참조와 비교하는 것을 수반한다.

[0105] ***조작된:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조작된"은 사람에 의해 설계 또는 변형된 및/또는 그 존재 및 생산이 인간의 개입 및/또는 활동을 필요로 하는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 세포를 설명한다. 예를 들어, 특정 효과를 이끌어내도록 의도적으로 설계되고 동일한 유형의 자연 발생 세포의 효과와 상이한 조작된 세포. 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 발현한다. 예시적인 조작 방법은 상세한 설명 및 실시예 섹션에 설명되어 있다.

[0106] ***에피토프:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "에피토프"는 전체적으로 또는 부분적으로 면역글로불린 (예컨대, 항체 또는 수용체) 결합 구성요소에 의해 특이적으로 인식되는 임의의 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 항원 내의 복수의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 아미노산 잔기는 항원이 관련된 3-차원 입체형태를 채택할 때 표면-노출된다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기는 항원이 이러한 입체형태를 채택할 때 공간에서 서로 물리적으로 가깝거나 윤곽을 이룬다. 일부 실시양태에서, 아미노산의 적어도 일부는 항원이 대안적인 입체형태를 채택할 때 (예컨대, 선형화됨; 예컨대, 비-선형 에피토프) 서로 물리적으로 분리된

다.

[0107] ***부형제:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "부형제"는 예를 들어, 원하는 점조도 또는 안정화 효과를 제공하거나 이에 기여하기 위해 약학 조성물에 포함될 수 있는 비-치료제를 지칭한다. 적합한 약학적 부형제는 예를 들어, 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 가루(flour), 백악(chalk), 실리카 겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 소듐 클로라이드, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 및 에탄올 등을 포함한다.

[0108] ***발현:*** 용어 "발현" 또는 "발현된"은 본원에서 핵산과 관련하여 사용될 때, 다음의 이벤트 중 하나 이상을 지칭한다: (1) DNA 주형의 RNA 전사물의 생산 (예컨대, 전사에 의해); (2) RNA 전사물의 가공 (예컨대, 스플라이싱, 편집, 5' 캡 형성 및/또는 3' 단부 형성에 의해); (3) RNA의 폴리펩티드로의 번역; 및/또는 (4) 폴리펩티드의 번역-후 변형.

[0109] ***엑스 비보:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "엑스 비보"는 외부 환경, 예컨대, 다중-세포 유기체 외부에서 발생하는 이벤트를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 세포 또는 세포의 집단은 이를 필요로 하는 대상체에 이러한 세포 또는 세포의 집단을 투여하는 전에, 다중-세포 유기체 (예컨대, 포유류, 예컨대, 비-인간 영장류 또는 인간)의 신체 외부에서 변형되어, 본원에 기재된 항-GCC 분자를 발현한다.

[0110] ***융합 단백질:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "융합 단백질"은 2 개의 상이한 (예컨대, 이종) 단백질의 적어도 일부를 코딩하는 핵산 서열로부터 조작된 핵산 서열에 의해 코딩되는 단백질을 지칭한다. 당업자는 의심할 바 없이, 융합 단백질을 생성하기 위해, 핵산 서열을 접합하여, 생성된 리딩 프레임이 내부 정지 코돈을 함유하지 않도록 한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 융합 단백질은 인플루엔자 HA 폴리펩티드 또는 이의 단편을 포함한다.

[0111] ***구아닐릴 사이클라제 C (GCC):*** 본원에 사용된 바와 같이, "STAR", "GUC2C", "GUCY2C" 또는 "ST 수용체" 단백질로서 또한 알려진 "GCC"는 포유동물 GCC, 바람직하게는 인간 GCC 단백질을 지칭한다. 인간 GCC는 GenBank 수탁 번호 NM-004963에 기재된 단백질 및 이의 자연 발생 대립형질 단백질 변이체를 지칭한다. 다른 변이체가 당업계에 알려져 있다. 예컨대, 수탁 번호 Ensp0000261170, Ensembl Database, European Bioinformatics Institute 및 Wellcome Trust Sanger Institute, 미국 특허 출원 번호 20060035852; 또는 GenBank 수탁 번호 AAB 19934 참고. 전형적으로, 자연적으로 발생하는 대립형질 변이체는 서열번호 41의 GCC 서열과 95%, 97% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 전사물은 1073 개의 아미노산의 단백질 생성물을 코딩하고, GenBank 수탁 번호 NM-004963에 설명되어 있다. GCC 단백질은 막관통 세포 표면 수용체 단백질로서 특징지어지며, 장액, 전해질 항상성 및 세포 증식의 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 믿어진다.

[0112] ***숙주:*** 본원에서 용어 "숙주"는 관심 있는 폴리펩티드가 존재하는 시스템 (예컨대, 세포, 유기체 등)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 숙주는 관심 있는 특정 폴리펩티드를 발현하는 시스템이다.

[0113] ***숙주 세포:*** 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "숙주 세포"는 외인성 DNA (재조합 또는 기타)가 도입된 세포를 지칭한다. 예를 들어, 숙주 세포는 표준 재조합 기술에 의해 본원에 기재된 폴리펩티드를 생산하는 데 사용될 수 있다. 본 개시내용을 판독할 때 당업자는 이러한 용어가 특정 대상체 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손을 지칭함을 이해할 것이다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 포함된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 외인성 DNA (예컨대, 재조합 핵산 서열)를 발현하기에 적합한 임의의 원핵 및 진핵 세포를 포함한다. 예시적인 세포는 원핵생물 및 진핵생물 (단일-세포 또는 다중-세포), 박테리아 세포 (예컨대, 대장균, 바실러스 spp., 스트렙토마이세스 spp. 등의 균주), 미코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포 (예컨대, S. 세레비시아에, S. 폼베, P. 파스토리스, P. 메타놀리카 등), 식물 세포, 곤충 세포 (예컨대, SF-9, SF-21, 바큘로바이러스-감염된 곤충 세포, 트리코플루시아 니 등), 비-인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 예를 들어, 하이브리도마 또는 퀴드로마와 같은 세포 융합물의 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 랫트 또는 마우스 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 진핵 세포이고, 다음의 세포로부터 선택된다: CHO (예컨대, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예컨대, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장 (예컨대, HEK293, HEK293T, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예컨대, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (표피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, 세르톨리 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포, 및 전술한 세포로부터 유래된 세포주. 일부 실시양태에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예컨대, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포 (예컨대, PER.C6™세포)를 포함한다.

[0114] ***면역 반응:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 반응"은 B 세포, T 세포, 수지상 세포, 대식세포 또는 다형핵구와 같은 면역계의 세포의, 항원 또는 백신과 같은 자극에 대한 반응을 지칭한다. 면역 반응은 예를 들어, 인터페론 또는 사이토카인을 분비하는 상피 세포를 포함하여 숙주 방어 반응에 관여하는 신체의 임의의 세포를 포함할 수 있다. 면역 반응은 선천적 및/또는 후천적 면역 반응을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같이, 보호 면역 반응은 대상체를 감염으로부터 보호하는 (감염을 예방하거나, 감염과 연관된 질환의 발달을 방지하는) 면역 반응을 지칭한다. 면역 반응을 측정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 림프구 (예컨대, B 또는 T 세포)의 증식 및/또는 활성, 사이토카인 또는 케모카인의 분비, 염증, 및 항체 생산 등을 측정하는 단계를 포함한다.

[0115] ***생체외:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생체외"는 다중-세포 유기체 내에서가 아니라, 인공 환경, 예컨대, 테스트 튜브 또는 반응 용기에서, 세포 배양물 등에서 발생하는 이벤트를 지칭한다.

[0116] ***생체내:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생체내"는 인간 및 비-인간 동물과 같은 다중-세포 유기체 내에서 발생하는 이벤트를 지칭한다. 세포-기반 시스템의 맥락에서, 용어는 살아있는 세포 내에서 발생하는 이벤트를 지칭하는 데 사용될 수 있다 (예를 들어, 생체외 또는 엑스 비보 시스템과 반대).

[0117] ***단리된:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된"은 (1) (자연 및/또는 실험적 환경에 관계없이) 초기에 생산될 때 연관되었된 구성요소 중 적어도 일부로부터 분리되고/되거나, (2) 인간의 개입으로 설계, 생산, 준비 및/또는 제조된 물질 및/또는 엔티티를 지칭한다. 단리된 물질 및/또는 엔티티는 초기에 연관되었던 다른 구성요소의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 초과로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 약제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 초과로 순수하다. 본원에 사용된 바와 같이, 다른 구성요소가 실질적으로 없는 경우 물질은 "순수"하다. 일부 실시양태에서, 당업자에 의해 이해될 것인 바와 같이, 물질은 예를 들어, 하나 이상의 담체 또는 부형제 (예컨대, 완충액, 용매, 물 등)와 같은 특정 다른 구성요소와 조합된 후에도 여전히 "단리된" 또는 심지어 "순수한" 것으로 간주될 수 있으며; 이러한 실시양태에서, 물질의 단리 퍼센트 또는 순도는 이러한 담체 또는 부형제를 포함하지 않고 계산된다. 단지 하나의 예를 제공하기 위해, 일부 실시양태에서, 자연에서 발생하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 생물학적 중합체는 a) 이의 기원 또는 유래의 공급원으로 인해 자연의 천연 상태에서 수반되는 구성요소의 일부 또는 전부와 연관되지 않을 때; b) 자연에서 이것을 생산하는 종으로부터 동일한 종의 다른 폴리펩티드 또는 핵산이 실질적으로 없을 때; c) 자연에서 이것을 생산하는 종이 아닌 세포 또는 다른 발현 시스템으로부터의 구성요소에 의해 발현되거나 이와 달리 관련되어 있을 때, "단리된" 것으로 간주된다. 따라서, 예를 들어, 일부 실시양태에서, 화학적으로 합성되거나 자연에서 이것을 생산하는 세포 시스템과 상이한 세포 시스템에서 합성되는 폴리펩티드는 "단리된" 폴리펩티드인 것으로 간주된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시양태에서, 하나 이상의 정제 기술을 거친 폴리펩티드는 a) 자연에서 연관된; 및/또는 b) 초기에 생산될 때 연관된 다른 구성 요소로부터 분리된 정도까지 "단리된" 폴리펩티드인 것으로 간주될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 다른(olther) 세포로부터 "단리" (예컨대, 정제 또는 분리)될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR을 발현하도록 조작된 유전적으로 변형된 세포는 변형되지 않은 세포로부터 단리될 수 있다.

[0118] ***핵산:*** 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "핵산"은 가장 넓은 의미에서, 올리고뉴클레오티드 쇄에 혼입되거나 혼입될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 포스포디에스테르 연결을 통해 올리고뉴클레오티드 쇄에 혼입되거나 혼입될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 문맥에서 명백할 것인 바와 같이, 일부 실시양태에서, "핵산"은 개별 핵산 잔기 (예컨대, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)를 지칭하며; 일부 실시양태에서, "핵산"은 개별 핵산 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오티드 쇄를 지칭한다. 일부 실시양태에서, "핵산"은 RNA이거나, 이를 포함하며; 일부 실시양태에서, "핵산"은 DNA이거나, 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 자연 핵산 잔기이거나, 이를 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 핵산 유사체이거나, 이를 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 핵산 유사체는 포스포디에스테르 백본을 활용하지 않는다는 점에서 핵산과 상이하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 당업계에 알려져 있고 백본에서 포스포디에스테르 결합 대신에 펩티드 결합을 갖는 핵산은 하나 이상의 "펩티드 핵산"이거나, 이를 포함하거나, 이로 이루어지며, 본 발명의 범주 내에 고려된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시양태에서, 핵산은 포스포디에스테르 결합보다는 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 5'-N-포스포르아미다이트 연결을 갖는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 자연 뉴클레오시드 (예컨대, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 데옥시아데노신, 데옥시티미딘, 데옥시구아노신 및 데옥시시티딘)이거나, 이를

포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 뉴클레오시드 유사체 (예컨대, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-아이오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-데아자아데노신, 7-데아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화된 염기, 삽입된 염기 및 이들의 조합)이거나, 이를 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 핵산은 자연 핵산과 비교하여 하나 이상의 변형된 당 (예컨대, 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-데옥시리보스, 아라비노스 및 헥소스)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 RNA 또는 단백질과 같은 기능적 유전자 생성물을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 인트론을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 자연 공급원으로부터의 단리, 상보적 주형에 기반한 중합에 의한 효소적 합성 (생체내 또는 생체외), 재조합 세포 또는 시스템에서의 재생산, 및 화학적 합성 중 하나 이상에 의해 제조된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 또는 5000 개 이상의 잔기 길이이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 단일 가닥이고; 일부 실시양태에서, 핵산은 이중 가닥이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 폴리펩티드를 코딩하는 또는 이를 코딩하는 서열의 상보체인 하나 이상의 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 효소적 활성을 갖는다.

[0119] ***약학적으로 허용가능한 비히클:*** 본 개시내용에서 유용한 약학적으로 허용가능한 담체 (비히클)는 통상적이다. Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)은 하나 이상의 치료적 조성물 (예컨대, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 포함하는 조성물)의 약학적 전달에 적합한 조성물 및 제형, 및 추가적인 약학적 약제를 설명한다. 일반적으로, 담체의 성질은 사용될 특정 투여 방식에 따라 좌우될 것이다. 예를 들어, 비경구 제형은 일반적으로 비히클로서 물, 생리학적 식염수, 균형된 염 용액, 수성 덱스트로스 또는 글리세롤 등과 같은 약학적으로 및 생리학적으로 허용가능한 유체를 포함하는 주사가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물 (예를 들어, 분말, 알약, 정제 또는 캡슐 형태)의 경우, 종래의 비-독성 고체 담체는 예를 들어, 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 마그네슘 스테아레이트를 포함할 수 있다. 생물학적으로 중성인 담체 이외에, 투여될 약학 조성물은 습윤제 또는 유화제, 보존제 및 pH 완충제 등과 같은 소량의 비-독성 보조 물질, 예를 들어, 소듐 아세테이트 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다.

[0120] ***폴리펩티드:*** "폴리펩티드"는 일반적으로 말하면, 펩티드 결합에 의해 서로 부착된 2 개 이상의 아미노산의 스트링이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 3-5개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 이들 각각은 하나 이상의 펩티드 결합을 통해 다른 것에 부착된다. 당업자는 폴리펩티드가 때때로 "비-자연" 아미노산 또는 그럼에도 불구하고 임의로 폴리펩티드 쇄 내로 통합될 수 있는 다른 엔티티를 포함한다는 것을 인식할 것이다. 일부 실시양태에서, 용어 "폴리펩티드"는 항체, 키메라 항원 수용체 또는 공동자극 도메인 폴리펩티드 등과 같은 폴리펩티드의 특이적인 기능적 부류를 지칭하기 위해 사용된다. 각각의 이러한 부류에 대해, 본 명세서는 부류 내의 알려진 예시적인 폴리펩티드의 아미노산 서열의 여러 예를 제공하고/하거나 당업계는 부류 내의 알려진 예시적인 폴리펩티드의 아미노산 서열의 여러 예를 인식하고 있으며; 일부 실시양태에서, 하나 이상의 이러한 알려진 폴리펩티드는 부류에 대한 참조 폴리펩티드이다. 이러한 실시양태에서, 용어 "폴리펩티드"는 부류에 포함되어야 함을 당업자가 이해할 것인, 관련 참조 폴리펩티드와 충분한 서열 상동성 또는 동일성을 나타내는 부류의 임의의 구성원을 지칭하한다. 많은 실시양태에서, 대표 부류의 구성원은 또한 참조 폴리펩티드와 유의한 활성을 공유한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 구성원 폴리펩티드는 약 30-40% 이상이고, 종종 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상보다 높은 참조 폴리펩티드와의 서열 상동성 또는 동일성의 전반적인 정도를 나타내고/내거나, 종종 90% 초과 또는 심지어 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 매우 높은 서열 동일성을 나타내는 하나 이상의 영역 (즉, 종종 특징적인 서열 요소를 포함하는 보존된 영역)을 포함한다. 이러한 보존된 영역은 일반적으로 3-4 개 이상, 및 종종 최대 20 개 이상의 아미노산을 포함하며; 일부 실시양태에서, 보존된 영역은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 개 이상의 인접 아미노산의 하나 이상의 스트레치를 포함한다.

[0121] 발명의 항체 및 항원 결합제는 추가적인 보존적 또는 비-필수 아미노산 치환을 가질 수 있으며, 이는 폴리펩티드 기능에 실질적인 영향을 미치지 않는 것으로 이해된다. 특정 치환이 용인될 것이지 여부, 즉, 결합 활성과 같은 원하는 생물학적 특성에 불리하게 영향을 미치지 않을 것인지 여부는 Bowie, J U et al. Science 247:1306-1310 (1990) 또는 Padlan et al. FASEB J. 9:133-139 (1995)에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다. "

보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 정의되어 있다. 이러한 패밀리는 염기성 측쇄 (예컨대, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예컨대, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄 (예컨대, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예컨대, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예컨대, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예컨대, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함하는 아미노산을 포함한다.

[0122] ***예방:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "예방"은 예방, 질환 증후의 회피, 개시의 지연, 및/또는 특정 질환, 장애 또는 병태 (예컨대, 예를 들어, 인플루엔자 바이러스로의 감염)의 하나 이상의 증상의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 예방은 질환, 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상의 발달, 빈도 및/또는 세기의 통계적으로 유의한 감소가 질환, 장애 또는 병태에 감수성인 집단에서 관찰되는 경우, 약제가 특정 질환, 장애 또는 병태를 "예방"하는 것으로 간주되도록 집단 기준으로 판정된다.

[0123] ***순수한:*** 본원에 사용된 바와 같이, 약제 또는 엔티티는 다른 구성요소가 실질적으로 없는 경우 "순수한" 것이다. 예를 들어, 약 90% 초과의 특정 약제 또는 엔티티를 함유하는 제제는 전형적으로 순수 제제인 것으로 간주된다. 일부 실시양태에서, 약제 또는 엔티티는 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 순수하다.

[0124] ***재조합:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "재조합"은 재조합 수단에 의해 설계, 조작, 제조, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드 (예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드), 예컨대, 숙주 세포 내로 형질주입된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 폴리펩티드, 재조합, 조합 폴리펩티드 라이브러리로부터 단리된 폴리펩티드, 또는 선택된 서열 요소를 서로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드를 지칭하는 것으로 의도된다. 일부 실시양태에서, 이러한 선택된 서열 요소 중 하나 이상은 자연에서 발견된다. 일부 실시양태에서, 이러한 선택된 서열 요소 및/또는 이들의 조합 중 하나 이상은 인 실리코로 설계된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는 동일한 폴리펩티드 (예컨대, 2 개의 개별 HA 폴리펩티드로부터의 2 개의 에피토프)에 자연적으로 존재하지 않는 다중 (예컨대, 2 개 이상)의 알려진 서열 요소의 조합으로부터 생성된다.

[0125] ***참조:*** 용어 "참조"는 관심 있는 약제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값을 비교하는, 표준 또는 대조군 약제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값을 설명하기 위해 본원에서 종종 사용된다. 일부 실시양태에서, 참조 약제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심 있는 약제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값의 테스트 또는 결정과 실질적으로 동시에 테스트 및/또는 결정된다. 일부 실시양태에서, 참조 약제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은 임의로 실재하는 매체에서 구현된 역사적 참조이다. 전형적으로, 당업자에 의해 이해될 것인 바와 같이, 참조 약제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심 있는 약제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값을 결정하거나 특성화하는 데 활용되는 것들과 비슷한 조건 하에서 결정되거나 특성화된다.

[0126] ***단일 도메인 항체:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단일 도메인 항체 (sdAb)", "가변 단일 도메인" 또는 "면역글로불린 단일 가변 도메인 (ISV)" "단일 중쇄 가변 도메인 (VH) 항체"는 표적 항원에 결합하는 항체의 단일 가변 단편을 지칭한다. 이들 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. sdAb는 3 개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 갖는 단일 항원-결합 폴리펩티드이다. sdAb 단독은 상응하는 CDR-함유 폴리펩티드와 쌍을 이루지 않고 항원에 결합할 수 있다. VH 단일 도메인 항체는 인간 중쇄 가변 도메인 또는 인간 중쇄 가변 도메인으로부터 유래된 도메인을 갖는 단일 도메인 항체를 지칭한다. 일부 경우에, 단일-도메인 항체는 낙타과 HCAb에서 조작되며, 이들의 중쇄 가변 도메인은 "VHH"로서 지칭된다. 일부 VHH는 나노바디로서 또한 알려져 있을 수 있다. 낙타과 sdAb는 가장 작은 알려진 항원-결합 항체 단편 중 하나이다 (예컨대, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8 (1993); Greenberg et al., Nature 374: 168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013) 참고). 기본 VHH는 N-말단으로부터 C-말단까지 다음의 구조를 갖는다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, 여기서 FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 지칭하고, 여기서 CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3을 지칭한다. 아래에 설명된 바와 같이, 발명의 다양한 양태의 일부 실시양태는 경쇄의 부재 하에 GCC 항원에 결합하는 단일 중쇄 가변 도메인 항체/면역글로불린 중쇄 단일 가변 도메인을 포함하는 결합제에 관한 것이다.

[0127] ***대상체:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 인간을 포함하는 임의의 포유류를 의미한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 대상체는 성인, 청소년 또는 유아이다. 일부 실시양태에서, 용어 "개체" 또는 "환자"가 사용되며, "대상체"와 상호교환가능한 것으로 의도된다. 또한 약학 조성물의 투여 및/또는 자궁-내 치료 방법의 수

행이 본 발명에 의해 고려된다. 예를 들어, 대상체는 암 (예컨대, 위장관 기원의 암), 세포의 적어도 일부가 GCC를 발현하는 암의 증상, 또는 세포의 적어도 일부가 GCC를 발현하는 암에 대한 소인을 갖는 환자 (예컨대, 인간 환자 또는 수의과 환자)일 수 있다. 발명의 용어 "비-인간 동물"은 달리 언급하지 않는 한, 모든 비-인간 척추동물, 예컨대, 비-인간 포유류 및 비-포유류, 예컨대, 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

[0128] ***실질적으로:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로"는 관심 있는 특질 또는 특성의 전체 또는 거의-전체 범위 또는 정도를 나타내는 정성적 조건을 지칭한다. 생물학 기술분야의 당업자라면 생물학 및 화학적 현상은 완성되고/되거나 완전하게 진행되거나 절대적인 결과를 달성하거나 피하는 일이 설사 있다하더라도 극히 드물다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 용어 "실질적으로"는 많은 생물학적 및 화학적 현상에 내재된 완전성의 잠재적 결여를 포착하기 위해 본원에서 사용된다.

[0129] ***치료제:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료제"는 생물학적 활성을 갖는 약제 (예컨대, 항원 결합제)를 지칭한다. 용어는 본원에서 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자 또는 생물학적 재료로부터 만들어진 추출물을 나타내기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 치료제는 항-암제 또는 화학요법제일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항-암제" 또는 "화학요법제"는 인간에서 신생물, 특히, 악성 (암성) 병변, 예컨대, 암종, 육종, 림프종 또는 백혈병의 발달 또는 진행을 억제하는 기능적 특성을 갖는 약제를 지칭한다. 전이 또는 혈관신생의 억제는 종종 항-암제 또는 화학요법제의 특성이다. 화학요법제는 세포독성제 또는 세포증식 억제제일 수 있다. 용어 "세포증식억제제"는 세포 성장 및/또는 세포의 증식을 억제 또는 억압하는 약제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 유전적으로 변형된 세포 또는 항체이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 항-GCC CAR이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 본원에 기재된 GCC CAR을 발현하는 세포 (예컨대, 세포의 집단)이다.

[0130] ***형질전환:*** 본원에 사용된 바와 같이, 외인성 DNA가 숙주 세포 내로 도입되는 임의의 과정을 지칭한다. 형질전환은 당업계에 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 자연적 또는 인공적 조건 하에서 발생할 수 있다. 형질전환은 외래 핵산 서열의 원핵 또는 진핵 숙주 세포로의 삽입을 위한 임의의 알려진 방법에 좌우될 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정 형질전환 방법론은 형질전환될 숙주 세포에 기반하여 선택되며, 바이러스 감염, 전기천공법, 메이팅(mating), 형질주입, 리포펙션을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, "형질전환된" 세포는 삽입된 DNA가 자율적으로 복제하는 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제할 수 있다는 점에서 안정적으로 형질전환된다. 일부 실시양태에서, 형질전환된 세포는 제한된 기간 동안 도입된 핵산을 일시적으로 발현한다.

[0131] ***치료하다 또는 치료:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 대상체, 예컨대, 환자에 대한 항-GCC 항원 결합제 (예컨대, 항-GCC 항체 또는 이의 단편, 항-GCC CAR, 항-GCC CAR을 포함하는 세포 등)의 투여, 또는 예컨대, 적용에 의해 대상체에 반환되는 대상체로부터의 단리된 조직 또는 세포에 대한 투여로서 정의된다. 항-GCC 항원 결합제는 단독으로 또는 제2 약제와 조합하여 투여될 수 있다. 치료는 장애, 장애의 증상 또는 장애, 예컨대, 암에 대한 소인을 치유하거나, 고치거나, 완화시키거나, 경감시키거나, 변경시키거나, 교정하거나, 호전시키거나, 일시적완화시키거나, 개선시키거나 이에 영향을 주는 것일 수 있다. 이론에 얽매이지 않기를 바라면서, 치료는 생체외 또는 생체내에서 세포의 억제, 절제 또는 살해를 유발하거나, 달리 세포, 예컨대, 이상 세포가 장애, 예컨대, 본원에 기재된 장애 (예컨대, 암)를 매개하는 역량을 감소시키는 것으로 믿어진다.

[0132] ***가변 영역 또는 도메인:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 "VH" 및 "VL"로서 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 (동일 부류의 다른 항체에 비해) 항체의 가장 가변적인 부분이며 항원 결합 부위를 함유한다. 중쇄만 있는 항체는 단일 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0133] ***벡터:*** 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 일 유형은 "플라스미드"이며, 이는 추가적인 DNA 절편이 결찰될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 추가적인 DNA 절편이 바이러스 게놈에 결찰될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다 (예컨대, 박테리아 복제 원점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예컨대, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있어, 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.

[0134] **특정 실시양태의 상세한 설명**

[0135] 본 발명은 구아닐릴 사이클라제 C (GCC)에 특이적으로 결합하는 신규한 항원 결합제의 발견 및 치료적 방법에서의 이들의 용도에 기반한다. 본 출원은 항-GCC 단일-도메인 항체 (sdAb) 및 하나 이상의 GCC 결합 모이어티 (예컨대, 항-GCC sdAb)를 포함하는 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다.

[0136] 본 발명은 특정 방법 및 기재된 실험적 조건에 제한되지 않으며, 이러한 방법 및 조건은 다양할 수 있다. 또한 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이며 본 발명의 범주가 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에 명시하지 않는 한 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

[0137] **구아닐릴 사이클라제 C**

[0138] 구아닐릴 사이클라제 C (GCC)(또한 STAR, ST 수용체, GUC2C 및 GUCY2C로서 또한 알려짐)는 장액, 전해질 항상성 및 세포 증식의 유지에서 기능하는 막관통 세포 표면 수용체이다 (Carrithers et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3018-3020 (2003); Mann et al., *Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-466 (1997); Pitari et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2695-2699 (2003)); GenBank Accession No. NM_004963, 이들 각각은 참조로 본원에 원용됨). 이 기능은 구아닐린의 결합을 통해 매개된다 (Wiegand et al. FEBS Lett. 311:150-154 (1992)). GCC는 또한 다른 감염성 유기체뿐만 아니라 대장균에 의해 생산된 펩티드인 열-안정성 장독소 (예컨대, NTFYCCELCCNPACAGCY의 아미노산 서열을 갖는 ST, 서열번호 40)에 대한 수용체이다 (Rao, M. C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93 (1985); Knoop F. C. and Owens, M. J. *Pharmacol. Toxicol. Methods* 28:67-72 (1992)). GCC에 대한 ST의 결합은 장 질환, 예컨대, 설사를 초래하는 신호 캐스케이드를 활성화한다. 인간 GCC에 대한 뉴클레오티드 서열 (GenBank 수탁 번호 NM-004963). 인간 GCC에 대한 아미노산 서열 (GenPept 수탁 번호 NP-004954):

[0139] MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLK
NLEDAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLD
LLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLT
RLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNAL
EASVSYFSHELGFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLKGDR

AVAEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSP
TKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLD
DWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKL
PNDITGRGPQILMIAVFTLTGAVVLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKWSHIPP
ENIFPLETNETNHVSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKRVILKDLKHNDGNFT
EKQKIELNKLLQIDYYNLTKFYGTVKLDTMIFGVIEYCERGSLREVLNDTISYP
DGTFMDWEFKISVLYDIAKGMSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSRMVVKITD
FGCNSILPPKKDLWTAPEHLRQANISQKGDVYSYGIIAQEIILRKETFYTLSCRD
RNEKIFRVENSNGMKPFRPDLFLETAEEKELEVYLLVKNCWEEDPEKRPDFKK
IETTLAKIFGLFHDQKNESYMDTLIRRLQLYSRNLEHLVEERTQLYKAERDRA
DRLNFMLLPRLVVKSLKEKGFVEPELYEEVTIYFSDIVGFTTICKYSTPMEVVD
MLNDIYKSFDHIVDHHDVYKVETIGDAYMVASGLPKRNGNRHAIDIAKMALE
ILSFMGTFELEHLPGLPIWIRIGVHSGPCAAGVVGIKMPRYCLFGDTVNTASRM
ESTGLPLRIHVSGSTIAILKRTECQFLYEVRGETYLKGRGNETTYWLTGMKDQ
KFNLPTPPTVENQQRLQAEFSDMIANSLQKRQAAGIRSQKPRRVASYKKGTLE
YLQLNTTDKESTYF (서열번호 41)

[0140]

[0141] GCC 단백질은 이들 각각이 GCC 분자의 기능에 기여하는 일반적으로 허용되는 일부 도메인을 갖는다. GCC 기능은 단백질을 세포 표면에 지시하는 시그널링, 세포외 리간드 결합, 티로신 키나제 활성 및 구아닐릴 사이클라제 촉매 활성을 포함한다. 정상 인간 조직에서, GCC는 점막 세포, 예컨대, 소장, 대장 및 직장을 내벽으로 하는 정단 솔 가장자리 막(brush border membrane)에서 발현된다 (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). GCC 발현은 모든 원발성 및 전이성 결장직장 종양에서의 발현과 함께 장 상피 세포의 신생물성 형질전환시 유지된다 (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41:

1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994)). 위, 식도 및 위식도 접합부로부터의 신생물 세포는 또한 GCC를 발현한다 (예컨대, 미국 특허 제6,767,704호; Debruyne et al. *Gastroenterology* 130:1191-1206 (2006) 참고). 예컨대, 위장 기원의 암 (예컨대, 결장암, 위암 또는 식도암)과의 조직-특이적 발현 및 연관성은 이 질환에 대한 진단적 마커로서 GCC의 사용을 위해 이용될 수 있다 (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005)).

[0142] 세포 표면 단백질로서, GCC는 또한 수용체 결합 단백질, 예컨대, 항체 또는 리간드에 대한 치료적 표적으로서 작용할 수 있다. 정상 장 조직에서, GCC는 내강 환경 및 혈관 구획 사이에 불침투성 장벽을 형성하는 상피 세포 밀착 연접의 정점 측에서 발현된다 (Almenoff et al., *Mol Microbiol* 8: 865-873); Guarino et al., *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026 (1987)). 이와 같이, GCC-결합 단백질 치료제의 전신 정맥내 투여는 침습성 또는 전이성 결장암 세포, 장외 또는 전이성 결장 종양, 식도 종양 또는 위 종양, 위식도 접합부에서의 선암종을 포함하는 위장계의 신생물 세포에 대한 접근을 가지면서, 장 GCC 수용체에 대한 최소 효과를 가질 것이다. 추가적으로, GCC는 리간드 결합 시 수용체 매개된 엔도사이토시스를 통해 내부화된다 (Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995)).

[0143] GCC의 세포외 도메인에 대해 생성된 다클론 항체 (Nandi et al. *Protein Expr. Purif.* 8:151-159 (1996))는 인간 및 랫트 GCC에 대한 ST 펩티드 결합을 억제할 수 있었고, 인간 GCC에 의한 ST-매개된 cGMP 생산을 억제할 수 있었다.

[0144] GCC는 결장암을 비롯한 암과 관련된 단백질로서 특성화되었다. 또한 Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995) 참고.

[0145] 본원에 기재된 GCC에 대해 지시된 항원 결합 분자 치료제는 GCC-발현 암성 세포를 억제하는 데 사용될 수 있다. 발명의 항-GCC 항원 결합 분자는 인간 GCC에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발명의 항-GCC 항원 결합 분자는 리간드, 예컨대, 구아닐린 또는 열-안정성 장독소의 GCC에 대한 결합을 억제할 수 있다.

[0146] **항원 결합 분자**

[0147] 본 발명은 항-GCC 항원 결합 분자에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GCC 분자는 이가 결합하는 GCC 발현 세포 상에서 GCC에 결합 시 세포성 반응을 유발한다. 일부 실시양태에서, 발명의 항-GCC 항원 결합제는 GCC에 대한 리간드 결합을 차단할 수 있다.

[0148] 자연 발생 포유동물 항체 구조적 유닛은 사합체로 대표된다. 각각의 사합체는 2 쌍의 폴리펩티드 쇄로 구성되며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄" (약 50-70 kDa)를 갖는다. 각각의 쇄의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110 개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각각의 쇄의 카복시-말단 부분은 주로 이펙터 기능을 담당하는 불변 영역을 정의한다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로서 분류될 수 있다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로서 분류될 수 있으며, 항체의 아이소타입은 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로서 정의된다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12 개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 접합되며, 중쇄는 또한 약 10 개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 일반적으로, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))를 참고한다. 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. 항-GCC 항체 분자에 대한 바람직한 아이소타입은 상이한 감마 중쇄를 갖는 4 개의 서브클래스, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 분류될 수 있는 IgG 면역글로불린이다. 대부분의 치료적 항체는 IgG1 유형의 인간, 키메라 또는 인간화된 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-GCC 항체 분자는 IgG1 아이소타입을 갖는다.

[0149] 각각의 중쇄 및 경쇄 쌍의 가변 영역은 항원 결합 부위를 형성한다. 따라서, 온전한 IgG 항체는 동일한 2 개의 결합 부위를 갖는다. 그러나, 이기능적 또는 이중특이적 항체는 2 개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍을 가지고 있어 2 개의 상이한 결합 부위를 생성하는 인공 하이브리드 작제물이다.

[0150] 쇄는 모두 상보성 결정 영역 또는 CDR이라고 또한 불리는 3 개의 초가변 영역에 의해 접합된 상대적으로 보존된 프레임워크 영역 (FR)의 동일한 일반 구조를 나타낸다. 각각의 쌍의 2 개의 쇄로부터의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 정렬되어, 특이적 에피토프에 결합할 수 있다. N-말단으로부터 C-말단까지, 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 지정은 면역학적

관심 있는 단백질의 Kabat 서열 (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 또는 Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989)의 정의에 따른다. 본원에 사용된 바와 같이, CDR은 중쇄 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) 및 경쇄 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) 각각에 대해 Kabat에 따라 지칭된다.

[0151] 항-GCC 항체 분자는 본원에 기재된 항체의 모두, 또는 CDR 또는 중쇄의 항원 결합 서브세트를 포함할 수 있다. 가변 영역 및 CDR을 포함하는 본원에 기재된 항-GCC 항원 결합제의 아미노산 서열은 표 1-3에서 찾아볼 수 있다.

[0152] 따라서, 실시양태에서, 항체 분자는 다음 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다:

[0153] (a) 1, 2, 3 개 또는 항원 결합 수의 인간 항체, 예컨대, 인간 하이브리도마로부터 유래된 항체 또는 뮤린 항체의 경쇄 CDR (LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3) (예컨대, 이의 전체가 참조로 원용되는 US20180355062A1에 기재된 항-GCC 항체의 경쇄). 실시양태에서, CDR(들)은 다음과 같은 LCDR1-3 중 하나 이상 또는 모두의 아미노산 서열을 포함할 수 있다: LCDR1, 또는 1 내지 7 개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR1) LCDR2, 또는 하나 또는 2 개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR2); 또는 LCDR3, 또는 하나 또는 2 개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR3; 및

[0154] (b) 1, 2, 3 개 또는 항원 결합 수의 본원에 기재된 바와 같은 중쇄 CDR (HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3). 실시양태에서, CDR(들)은 다음과 같은 HCDR1-3 중 하나 이상 또는 모두의 아미노산 서열을 포함할 수 있다: HCDR1, 또는 하나 또는 2 개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR1; HCDR2, 또는 1 내지 4 개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR2; 또는 HCDR3, 또는 하나 또는 2 개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR3.

[0155] 일부 실시양태에서, 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC를 발현하는 세포, 예컨대, 종양 세포에 대해 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC)을 이끌어낼 수 있다. IgG1 및 IgG3 아이소타입을 갖는 항체는 Fc 수용체에 결합하는 능력으로 인해 항체-의존적 세포독성 역량에서 이펙터 기능을 이끌어내는 데 유용하다. IgG2 및 IgG4 아이소타입을 갖는 항체는 Fc 수용체에 결합하는 이들의 낮은 능력 때문에 ADCC 반응을 최소화하는 데 유용하다. 관련된 실시양태에서, 예컨대, 변형된 진핵 세포주의 성장에 의한 항체의 글리코실화 조성의 변화 또는 Fc 영역에서의 치환은 항-GCC 항체가 결합하는 세포의 세포독성을 인식하고/하거나, 결합하고/하거나, 매개하는 Fc 수용체의 능력을 향상시키도록 제조될 수 있다 (예컨대, 미국 특허 번호 7,317,091, 5,624,821 및 WO 00/42072, Shields, et al. *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazar et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:4005-4010 (2006), Satoh et al. *Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006)을 포함하는 공개물 참고). 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편 (예컨대, 인간 기원의 항체, 인간 항체)은 기능 (예컨대, 이펙터 기능)을 변경하거나 맞춤화하는 아미노산 치환 또는 대체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 기원의 불변 영역 (예컨대, γ1 불변 영역, γ2 불변 영역)은 보체 활성화 및/또는 Fc 수용체 결합을 감소시키도록 설계될 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 번호 5,648,260 (Winter 등), 미국 특허 번호 5,624,821 (Winter 등) 및 미국 특허 번호 5,834,597 (Tso 등)을 참고하며, 이의 전체 교시는 본원에 참조로 원용된다.) 바람직하게는, 이러한 아미노산 치환 또는 대체를 함유하는 인간 기원의 불변 영역의 아미노산 서열은 인간 기원의 변경되지 않은 불변 영역의 아미노산 서열과 전체 길이에 걸쳐 약 95% 이상 동일하며, 보다 바람직하게는 인간 기원의 변경되지 않은 불변 영역의 아미노산 서열과 전체 길이에 걸쳐 약 99% 이상 동일하다. 추가적인 항-GCC 항원 결합 분자는 이의 전체 교시가 본원에 참조로 원용되는 미국 특허 번호 8,785,600 (Nam 등)에 추가로 기재되어 있다.

[0156] 또 다른 실시양태에서, 이펙터 기능은 또한 항체의 글리코실화 패턴을 조정함으로써 변경될 수 있다. 변경이란 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실하고/하거나, 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것을 의미한다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 결여된 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 향상된 ADCC 활성을 갖는 항체는 미국 특허 출원 공개공보 번호 2003/0157108 (Presta)에 기재되어 있다. 또한 미국 특허 출원 공개공보 번호 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)을 참고한다. Glycofi는 또한 항체의 특이적 글리코형을 생산할 수 있는 효모 세포주를 개발하였다.

[0157] 추가적으로 또는 대안적으로, 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 저푸코실화된 항체 또는 증가된 이등분 GlcNac 구조를 갖는 항체와 같은 변경된 유형의 글리코실화를 갖는 항체가 제조될 수 있다. 이러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어, 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 당업계에 기재되어 있으며, 발명의 재조합 항체를 발현하도록 조작되어 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생

산하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, Hang 등의 EP 1,176,195는, 푸코실 트랜스퍼라제를 코딩하는 기능적으로 붕괴된 FUT8 유전자를 갖는 세포주를 기재하며, 그에 따라 이러한 세포주에서 발현된 항체는 저푸코실화를 나타낸다. Presta의 PCT 공개공보 WO 03/035835는 푸코스를 Asn(297)-연결된 탄수화물에 부착하는 능력이 감소된 Lec13 세포인 변이체 CHO 세포주를 기재하고 있으며, 또한 해당 숙주 세포에서 발현된 항체의 저푸코실화를 초래한다 (또한 Shields, R. L. et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 참고). Umana 등의 PCT 공개공보 WO 99/54342는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제 (예컨대, 베타(1,4)-N 아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 조작된 세포주를 기재하며, 그에 따라 조작된 세포주에서 발현된 항체는 증가된 이등분 GlcNac 구조를 나타내어, 항체의 증가된 ADCC 활성을 초래한다 (또한 Umana et al., 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180 참고).

[0158] 인간화된 항체는 또한 CDR-이식된 접근법을 사용하여 만들 수 있다. 이러한 인간화된 항체의 생성의 기술은 당업계에 알려져 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 GCC에 결합하는 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열을 수득하고, 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열에서 상보적 결정 영역 또는 "CDR"을 식별하고, CDR 핵산 서열을 인간 프레임워크 핵산 서열에 이식함으로써 생산된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 및 5,225,539 참고). CDR 및 프레임워크 잔기의 위치는 결정될 수 있다 (Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 및 Chothia, C. et al. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) 참고).

[0159] 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자는 표 5 및 6에 나열된 CDR을 코딩하는 CDR 아미노산 서열 및 핵산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 표 5 및 6으로부터의 서열은 본원에 기재된 치료적 또는 진단적 방법에 사용하기 위해 GCC를 인식하는 분자에 혼입될 수 있다. 선택된 인간 프레임워크는 생체내 투여에 적합한 것으로, 이는 면역원성을 나타내지 않는다는 것을 의미한다. 예를 들어, 이러한 결정은 이러한 항체의 생체내 사용 및 아미노산 유사성의 연구에 대한 사전 경험에 의해 이루어질 수 있다. 적합한 프레임워크 영역은 공여자 항체, 예컨대, 항-GCC 항체 분자 (예컨대, 3G1)의 등가 부분 (예컨대, 프레임워크 영역)의 아미노산 서열 내의 프레임워크 영역의 길이에 걸쳐 약 65% 이상의 아미노산 서열 동일성, 및 바람직하게는 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 인간 기원의 항체로부터 선택될 수 있다. 기본 매개변수를 사용하여 CLUSTAL W와 같은 적합한 아미노산 서열 정렬 알고리즘을 사용하여 아미노산 서열 동일성을 결정할 수 있다. (Thompson J. D. et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).)

[0160] 인간화될 클로닝된 항체의 CDR 및 FR이 식별되면, CDR을 코딩하는 아미노산 서열이 식별되고, 상응하는 핵산 서열이 선택된 인간 FR에 이식된다. 이는 알려진 프라이머 및 링커를 사용하여 수행될 수 있으며, 이들의 선택은 당업계에 알려져 있다. 특정 인간 항체의 모든 CDR은 비-인간 CDR의 적어도 일부로 대체될 수 있거나, CDR 중 일부만이 비-인간 CDR로 대체될 수 있다. 소정의 항원에 대한 인간화된 항체의 결합에 필요한 CDR의 수만 대체하면 된다. CDR이 선택된 인간 FR에 이식된 후, 생성된 "인간화된" 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열이 발현되어, GCC에 결합하는 인간화된 Fv 또는 인간화된 항체를 생산한다. 바람직하게는, CDR-이식된 (예컨대, 인간화된) 항체는 공여자 항체의 친화도와 유사하거나, 실질적으로 동일하거나, 더 나은 친화도로 GCC 단백질에 결합한다. 전형적으로, 인간화된 가변 중쇄 및 경쇄 서열은 인간 불변 도메인 서열과의 융합 단백질로서 발현되어, GCC에 결합하는 온전한 항체가 수득된다. 그러나, 불변 서열을 함유하지 않는 인간화된 Fv 항체가 생산될 수 있다.

[0161] 특이적 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가된 인간화된 항체가 또한 발명의 범주 내에 있다. 특히, 인간화된 항체는 예컨대, 항원에 대한 결합을 개선하기 위해 프레임워크 영역에서 아미노산 치환을 가질 수 있다. 예를 들어, 인간화된 면역글로불린 쇄의 선택된 소수의 수용자 프레임워크 잔기가 상응하는 공여자 아미노산으로 대체될 수 있다. 치환의 위치는 CDR에 인접하거나 CDR과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기를 포함한다 (예컨대, 미국 특허 번호 5,585,089 또는 5,859,205 참고). 수용자 프레임워크는 성숙한 인간 항체 프레임워크 서열 또는 컨센서스 서열일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "컨센서스 서열"은 관련된 가족 구성원 중 한 영역의 서열에서 가장 빈번하게 발견되는 서열 또는 각각의 위치에서의 가장 공통적인 잔기로부터 고안된 서열을 지칭한다. 인간 가변 영역의 상이한 서브그룹에 대한 컨센서스 서열을 비롯한 다수의 인간 항체 컨센서스 서열이 이용가능하다 (Kabat, E. A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991) 참고). Kabat 데이터베이스 및 이의 적용은 예컨대, 메릴랜드 주 베데스다에 있는 국립 생명공학 정보 센터의 IgBLAST를 통해 온라인에서 자유롭게 이용가능하다 (또한 Johnson, G. and Wu, T. T., *Nucleic Acids Research* 29:205-206 (2001) 참고).

[0162] 특정 실시양태에서, GCC 항체 분자는 인간 항-GCC IgG1 항체이다. 이러한 항체는 GCC 분자에 대해 원하는 결합

을 보유하기 때문에, 이러한 항체 중 어느 하나는 예를 들어, 여전히 동일한 가변 영역 (이는 항체의 특이성 및 친화도를 특정 정도로 정의함)을 보유하면서, 인간 IgG4 아이소타입을 생성하기 위해 용이하게 아이소타입-스위칭될 수 있다. 따라서, 위에 논의된 바와 같이 원하는 "구조적" 속성을 충족시키는 항체 후보가 생성됨에 따라, 이들은 일반적으로 아이소타입 스위칭을 통해 원하는 적어도 특정한 추가적인 "기능적" 속성을 제공받을 수 있다.

[0163] 일부 양태에서, 항체 단편을 포함하는 발명의 CAR 조성물의 일부는 표적 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 유지하면서 인간화된다. 발명의 일 양태에 따르면, 인간화된 항체 및 항체 단편은 모 서열 및 인간화된 서열의 3-차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적 인간화된 생성물의 분석의 과정에 의해 제조된다. 3-차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하며, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 개연성 있는 3-차원 입체형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 예컨대, 표적 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 가능하게 한다.

[0164] 이러한 방식으로, FR 잔기는 원하는 항체 또는 특징적인 항체 단편, 예컨대, 표적 항원에 대한 증가된 친화도가 달성되는 수령자 및 수입 서열(import sequence)로부터 선택되고 조합될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는 데 직접적으로 그리고 가장 실질적으로 관여한다.

[0165] 인간화된 항체 또는 항체 단편은 원래 항체와 유사한 항원성 특이성, 예컨대, 본 발명에서 인간 GCC에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화된 항체 또는 항체 단편은 인간 GCC에 대한 결합의 개선된 친화도 및/또는 특이성을 가질 수 있다.

[0166] 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 표 1에 제공된 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 표 1에 제공된 CDR 1을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 표 1에 제공된 CDR 2를 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 표 1에 제공된 CDR 3을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 표 1에 제공된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 표 1에 제공된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하며, 여기서 상기 CDR은 1, 2, 또는 3 개의 아미노산 치환을 포함한다. 일 실시양태에서, 상기 치환은 이의 표적에 대한 결합제의 결합에 불리하게 영향을 미치지 않는다.

[0167] *표 1. 예시적인 항-GCC CDR 서열*

	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3
V1	HYYWS (서열번호 8)	RIYPSGSTSYNPSLKS (서열번호 11)	DRSTGWSEWNSDL (서열번호 16)
V1-01	HYYWS (서열번호 8)	RIYPSGSTSYNPSLKS (서열번호 11)	DRSTGWSEWNSDL (서열번호 16)
V6	RYWMS (서열번호 9)	KIRHDGGEKYYVDSVKG (서열번호 12)	DYTRDV (서열번호 17)
V36	RYWMT (서열번호 10)	KIKYDGSEKYYADSVKG (서열번호 13)	DYNKDY (서열번호 18)
V48	RYWMT (서열번호 10)	KIRHDGGEKYYPDSVKG (서열번호 14)	DYNKDL (서열번호 19)
V51	RYWMT (서열번호 10)	KIRHDGGEKYYADSVKG (서열번호 15)	DYNKDY (서열번호 18)

[0168]

[0169] 온전한 항체가 아닌 항-GCC 항체가 또한 본 발명에 유용하다. 이러한 항체는 위에 기재된 항체 중 임의의 것으

로부터 유래될 수 있다. 이러한 유형의 유용한 항체 분자는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1 가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2 개의 Fab 단편을 포함하는 2 가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)); (vii) VHH 도메인으로 이루어진 단일 도메인 기능적 중쇄 항체 (나노바디로서 알려짐), 예컨대, Cortez-Retamozo, et al., *Cancer Res.* 64: 2853-2857 (2004), 및 그안에 인용된 참고문헌 참고; 및 (vii) 단리된 CDR, 예컨대, 항원 결합 단편을 제공하기에 충분한 프레임워크를 갖는 하나 이상의 단리된 CDR을 포함한다. 추가로, Fv 단편의 2 개의 도메인인 VL 및 VH는 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1 가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇄로서 만들어지는 것을 가능하게 하는 합성 링커에 의해 접합될 수 있다 (단일 쇄 Fv (scFv)로서 알려짐; 예컨대, Bird et al. *Science* 242:423-426 (1988); 및 Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988). 이러한 단일 쇄 항체는 또한 용어 항체의 "항원-결합 단편" 내에 포함되는 것으로 의도된다. 이들 항체 단편은 당업자에게 알려진 종래의 기술을 사용하여 수득되며, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다. 항체 단편, 예컨대, Fv, $F(ab')_2$ 및 Fab는 온전한 단백질의 절단에 의해, 예컨대, 프로테아제 또는 화학적 절단에 의해 제조될 수 있다.

[0170] ***단일-도메인 항체***

[0171] 단일-도메인 항체 (sdAb)는 단일 단량체 항체 가변 도메인을 가짐으로써 종래의 4-쇄 항체와 상이하다. 예를 들어, 낙타 및 상어는 자연적으로 경쇄가 결여된 중쇄만 있는 항체 (HcAb)라는 명칭의 sdAb를 생산한다. 낙타과의 중쇄만 있는 항체의 각각의 아암에서의 항원-결합 단편은 단일 중쇄 가변 도메인 (VHH)을 가지며, 이는 경쇄의 도움 없이도 항원에 대해 높은 친화도를 가질 수 있다. 낙타과 VHH는 대략 15 kD의 분자량을 갖는 가장 작은 기능적 항원-결합 단편으로서 알려져 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합제는 단일 인간 중쇄 가변 도메인 (VH) 항체이다. 이러한 결합 분자는 또한 휴마바디(Humabody)®라고 하며, 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 휴마바디®는 Crescendo Biologics Ltd.의 등록 상표이다.

[0172] 본 출원의 일 양태는 GCC, 예컨대, 인간 GCC에 특이적으로 결합하는 단리된 단일-도메인 항체 (본원에서 "항-GCC sdAb"로서 지칭됨)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC sdAb는 GCC 활성을 조정한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC sdAb는 길항제 항체이다. 본원에 기재된 항-GCC sdAb 중 어느 하나로부터 유래된 항원-결합 단편, 및 본원에 기재된 항-GCC sdAb 중 어느 하나를 포함하는 항원 결합 단백질이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-GCC sdAb는 표 1에 제공된 1, 2 및/또는 3 개의 CDR 서열을 포함한다. 예시적인 항-GCC sdAb는 표 2 및 3에 나열되어 있다. 일부 실시양태에서, 항-GCC sdAb는 표 2 또는 표 3에 제공된 가변 중쇄를 포함한다.

[0173] 일부 실시양태에서, 중쇄인 CDR 서열의 일부 또는 전부는 다른 항원 결합제, 예컨대, CDR-이식된, 인간화된 또는 키메라 항체 분자에서 사용될 수 있다. 실시양태는 세포 표면 GCC에 대한 결합을 허용하기에 충분한 CDR, 예컨대, 위에 언급된 중쇄 가변 영역 중 하나로부터의 모든 3 개의 CDR을 포함하는 항체 분자를 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, CDR, 예컨대, 모든 HCDR은 인간 또는 인간 유래된 프레임워크 영역(들)에 임베딩된다. 인간 프레임워크 영역의 예는 인간 생식계열 프레임워크 서열, (생체내 또는 생체외에서) 친화도 성숙된 인간 생식계열 서열, 또는 합성 인간 서열, 예컨대, 컨센서스 서열을 포함한다. 실시양태에서, 중쇄 프레임워크는 IgG1 또는 IgG2 프레임워크이다.

[0175] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GCC 항원 결합제는 표 2에 제공된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 단일 도메인의 중쇄만 있는 항체 (예컨대, 면역글로불린 경쇄를 포함하지 않는 항원 결합제)이다.

[0176] *표 2. 예시적인 중쇄 가변 영역 (VH) 아미노산 서열*

설명	VH 아미노산 서열
V1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLK SRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (서열번호 1)
V1-01	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLK SRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (서열번호 20)
V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS (서열번호 21)
V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSS (서열번호 26)
V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSV KGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSS (서열번호 27)
V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSS (서열번호 28)

[0177]

[0178] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GCC 항원 결합제는 표 2에 제공된 VH 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH 항-GCC 항원 결합제 (예컨대, 단일 도메인 항체)는 리더 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH 항-GCC 항원 결합제는 MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (서열번호 6), MELGLSWVFLVAILEGVQC (서열번호 7) 또는 MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (서열번호 42)를 포함하는 리더 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH 항-GCC 항원 결합제는 MALPVTALLLPLALLLHAARP (서열번호 45)를 포함하는 리더 서열을 포함한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GCC 항원 결합제는 표 3에 제공된 VH 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-GCC 항원 결합제는 표 3에 제공된 VH 서열과 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0180] 일부 실시양태에서, VH 항-GCC 항원 결합제 (예컨대, 단일 도메인 항체)는 표 3에서 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상인 제공된 리더 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH 항-GCC 항원 결합제 (예컨대, 단일 도메인 항체)는 표 3에 제공된 리더 서열을 포함한다.

[0181] *표 3. 예시적인 중쇄 가변 영역 (VH) 아미노산 서열*

	리더 서열	VH 서열
V1	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (서열번호 6)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (서열번호 1)
V1-01	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (서열번호 6)	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (서열번호 20)
V5	MELGLSWVFLVAILEGVQC (서열번호 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS (서열번호 21)
V8	MELGLSWVFLVAILEGVQC (서열번호 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDTGVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS (서열번호 22)
V9	MELGLSWVFLVAILEGVQC (서열번호 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS (서열번호 23)
V30	MELGLSWVFLVAILEGVQC (서열번호 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS (서열번호 24)
V31	MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (서열번호 42)	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS (서열번호 25)
V36	MELGLSWVFLVAILEGVQC (서열번호 7)	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSS (서열번호 26)
V48	MELGLSWVFLVAILEGVQC (서열번호 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSS (서열번호 27)
V51	MELGLSWVFLVAILEGVQC (서열번호 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSS (서열번호 28)

[0182]

[0183] 생체내 치료적 또는 진단적 용도를 위한 항체 단편은 혈청 반감기를 개선하는 변형으로부터 이익을 얻을 수 있다. 항체의 생체내 혈청 반감기를 증가시키도록 의도된 적합한 유기 모이어티는 친수성 중합체성 기 (예컨대, 선형 또는 분지형 중합체 (예컨대, 폴리알칸 글리콜, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 및 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 등), 탄수화물 (예컨대, 덱스트란, 셀룰로스 및 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체 (예컨대, 폴리리신 및 폴리아스파르테이트 등), 폴리알칸 옥사이드 및 폴리비닐 피롤리돈), 지방산 기 (예컨대, 모노-카복실산 또는 디-카복실산), 지방산 에스테르 기, 지질 기 (예컨대, 디아실글리세롤 기, 스핑고지질 기 (예컨대, 세라미딜)) 또는 인지질 기 (예컨대, 포스파티딜 에탄올아민 기)로부터 선택된다. 바람직하게는, 유기 모이어티는 유기 모이어티가 비-컨쥬게이션된 항체 모이어티와 비교하여 생성된 면역컨쥬게이트의 기능을 손상시키지 않는 (예컨대, 항원 결합 친화도를 감소시키는) 미리결정된 부위에 결합된다. 유기 모이어티는 약 500 Da 내지 약 50,000 Da, 바람직하게는 약 2000, 5000, 10,000 또는 20,000 Da의 분자량을 가질 수 있다. 유기 모이어티를 이용하여 폴리펩티드, 예컨대, 항체를 변형시키는 예 및 방법은 예를 들어, 미국 특허 번호 4,179,337 및 5,612,460, PCT 공개공보 번호 WO 95/06058 및 WO 00/26256, 및 미국 특허 출원 공개공보 번호 20030026805에서 찾아볼 수 있다.

[0184] ***키메라 항원 수용체***

[0185] 키메라 항원 수용체 (CAR)는 다음의 3 개의 필수 유닛을 포함하는 하이브리드 분자이다: (1) 세포외 항원-결합 모티프, (2) 연결/막관통 모티프, 및 (3) 세포내 T-세포 시그널링 모티프 (Long A H, Haso W M, Orentas R J.

Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. Oncoimmunology. 2013; 2 (4):e23621). 본원에 개시된 GCC-특이적 CAR의 다양한 실시양태에서, 일반적인 도식은 도 1에 제시되어 있다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지, 신호 또는 리더 펩티드, 항원 결합 도메인, 막관통 및/또는 힌지 도메인, 공동자극 도메인 및 세포내 도메인을 포함한다.

[0186] 본 발명은 항-GCC 결합 도메인 (예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 GCC 결합 도메인), 막관통 도메인 및 세포내 시그널링 도메인을 포함하는 CAR (예컨대, CAR 폴리펩티드)를 제공하고, 여기서 상기 항-GCC 결합 도메인은 표 1 또는 8에 나열된 임의의 항-GCC 중쇄 결합 도메인 아미노산 서열의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지, 신호 또는 리더 펩티드, 항-GCC vH, CD28 막관통 및 힌지, CD28 공동자극 도메인, 및 CD3 제타 세포내 도메인을 포함한다.

[0187] 항원 결합 도메인은 비제한적으로 단클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 및 비제한적으로 단일-도메인 항체, 예컨대, 낙타과 유래된 나노바디의 중쇄 가변 도메인 (VH), 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 가변 도메인 (VHH)을 포함하는 이의 기능적 단편을 포함하는 항원에, 및 항원 결합 도메인, 예컨대, 재조합 피브로넥틴 도메인 등으로서 기능하도록 당업계에 알려진 대안적인 스캐폴드에 결합하는 임의의 단백질일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인

[0188] CAR의 항원-결합 모티프는 통상적으로 면역글로불린 (Ig) 분자 또는 단일 도메인 항체의 최소 결합 도메인인 단일 쇄 가변 단편 (ScFv) 뒤에 형성된다 (예를 들어, WO2018/028647A1). 대안적인 항원-결합 모티프, 예컨대, 수용체 리간드 (즉, IL-13은 종양 발현된 IL-13 수용체에 결합하도록 조작됨), 온전한 면역 수용체, 라이브러리-유래된 펩티드 및 선천적 면역계 이펙터 분자 (예컨대, NKG2D)가 또한 조작되었다. CAR 벡터로 형질도입하기 위해 가장 활성인 T-세포 집단을 정의하고, 최적의 배양 및 확장 기술을 결정하고, CAR 단백질 구조 자체의 분자 세부사항을 정의하는 것과 관련하여 유의한 작업이 남아 있다.

[0189] CAR의 연결 모티프는 IgG의 불변 도메인과 같은 비교적 안정한 구조적 도메인이거나, 확장된 가요성 링커가 되도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 결합 도메인 (예컨대, 표 1 또는 표 7에 제공된 서열을 포함하는 폴리펩티드)은 링커, 예컨대, 본원에 기재된 링커를 통해 막관통 도메인에 부착된다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 (Gly4-Ser)n 링커를 포함하며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 (서열번호 72)이다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 RAAA (서열번호 53)를 포함한다.

[0190] 구조적 모티프, 예컨대, IgG 불변 도메인으로부터 유래된 것들은 T-세포 원형질 막 표면으로부터 멀리 ScFv 결합 도메인을 확장하기 위해 사용될 수 있다. 이는 결합 도메인이 특히 종양 세포 표면 막에 가까운 일부 종양 표적에 중요할 수 있다 (예컨대, 디시알로강글리오시드 GD2의 경우; Orentas et al., 미공개된 관찰). 현재까지, CAR에 사용된 시그널링 모티프는 항상 CD3-ζ 쇄를 포함하고 있는데, 왜냐하면 이 핵심 모티프가 T 세포 활성화의 핵심 신호이기 때문이다. 처음으로 보고된 2-세대 CAR은 CD28 시그널링 도메인 및 CD28 막관통 서열을 특징으로 한다. 이 모티프는 CD137 (4-1BB) 시그널링 모티프를 함유하는 3-세대 CAR에서도 사용되었다 (Zhao Y et al. J Immunol. 2009; 183 (9): 5563-74). 새로운 기술의 출현으로, 항-CD3 및 항-CD28 항체에 연결된 비드가 있는 T 세포의 활성화, 및 CD28로부터의 표준 "신호 2"의 존재는 더 이상 CAR 자체에 의해 코딩될 필요가 없다. 비드 활성화를 사용하여, 3-세대 벡터는 생체외 검정에서 2-세대 벡터보다 우월하지 않은 것으로 밝혀졌으며, 이들은 백혈병의 마우스 모델에서 2-세대 벡터에 비해 명확한 이익을 제공하지 않았다 (Haso W, Lee D W, Shah N N, Stetler-Stevenson M, Yuan C M, Pastan I H, Dimitrov D S, Morgan R A, FitzGerald D J, Barrett D M, Wayne A S, Mackall C L, Orentas R J. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, Blood. 2013; 121 (7):1165-74; Kochenderfer J N et al. Blood. 2012; 119 (12):2709-20). 이는 2 세대 CD28/CD3-ζ (Lee D W et al. American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, La.; Dec. 7-10, 2013) 및 CD137/CD3-ζ 시그널링 형식 (Porter D L et al. N Engl J Med. 2011; 365 (8): 725-33)에 있는 CD19-특이적 CAR의 임상적 성공에 의해 확증된다. CD137 외에도, OX40과 같은 다른 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원은 또한 CAR-형질전환된 T 세포에서 중요한 지속성 신호를 제공할 수 있다 (Yvon E et al. Clin Cancer Res. 2009; 15(18):5852-60). 동등하게 중요한 것은 CAR T-세포 집단이 배양된 배양 조건이다.

[0191] T-세포-기반 면역요법은 합성 생물학의 새로운 개척지가 되었으며; 다중 프로모터 및 유전자 산물은 T 세포가 음성 조절 신호를 회피하고 효과적인 종양 살해를 매개할 수 있는 종양 미세환경으로 이러한 매우 강력한 세포를 조종하는 것으로 구상된다. AP1903을 이용한 유도성 카스파제 9 작제물의 약물-유도된 이합체화를 통한 원치

않은 T 세포의 제거는 T-세포 집단을 제어할 수 있는 강력한 스위치가 약리학적으로 개시될 수 있는 한 가지 방법을 보여준다 (Di Stasi A et al. N Engl J Med. 2011; 365(18):1673-83). 따라서, CAR이 내인성 T-세포 수용체와 유사한 방식으로 T-세포 활성화를 촉발할 수 있는 것으로 보이지만, 현재까지 이 기술의 임상적 적용에 대한 주요 장애물은 CAR+ T 세포의 생체내 확장, 주입 후 세포의 빠른 소멸 및 실망스러운 임상적 활동에 제한되어 왔다. 따라서, 전술한 결점 (즉, 높은 독성, 불충분한 효험) 없이 특이적이고 효과적인 항-종양 효과를 나타낼 수 있는 접근법을 사용하여 암을 치료하기 위한 신규 조성물 및 방법을 발견하기 위한 시급하고 오랫동안 느껴온 필요성이 당업계에 존재한다.

[0192] 본 발명은 암 및 기타 질환 및/또는 병태를 치료하는 데 사용될 수 있는 CAR 조성물 및 치료적 방법을 제공함으로써 이러한 요구를 다룬다. 특히, 본원에 개시되고 기재된 바와 같은 본 발명은 GCC의 조절이상된 발현과 연관된 질환, 장애 또는 병태의 치료에 사용될 수 있고 CAR이 형질도입된 T 세포 상에서 높은 표면 발현을 나타내고 높은 정도의 세포용해 및 형질도입된 T 세포 생체내 확장 및 지속성을 나타내는 GCC 항원 결합 도메인을 함유하는 CAR을 제공한다.

[0193] 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 키메라 항원 수용체 (CAR)이다. CAR의 특성은 비-MHC-제한된 방식으로 선택된 표적에 대한 T-세포 특이성 및 반응성을 재지시하고 단클론 항체의 항원-결합 특성을 이용하는 능력을 포함한다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR을 발현하는 T 세포가 항원 처리와 독립적으로 항원을 인식하는 능력을 부여하여, 종양 탈출의 주요 메커니즘을 우회한다. 더욱이, T-세포에서 발현될 때, CAR은 유리하게는 내인성 T 세포 수용체 (TCR) 알파 및 베타 쇄와 이합체화하지 않는다.

[0194] *세포외 도메인*

[0195] 본원에 기재된 바와 같이, CAR은 달리 항원 결합 도메인 또는 모이어티로서 지칭되는 표적-특이적 결합 요소 (예컨대, 항-GCC 항원 결합제의 적어도 일부)를 포함한다. 도메인의 선정은 표적 세포의 표면을 정의하는 리간드의 유형 및 수에 따라 좌우된다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 특정 질환 상태 (예컨대, 암)와 연관된 표적 세포에서 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드 (예컨대, GCC)를 인식하도록 선정될 수 있다. 따라서, CAR에서 항원 결합 도메인에 대한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예는 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염, 자가면역 질환 및 암 세포와 연관된 것들을 포함한다.

[0196] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR의 세포외 도메인은 표 1에 제공된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항원 결합제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR의 세포외 도메인은 표 2 또는 표 3에 제공된 VH 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% 또는 99% 이상 동일한 가변 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR의 세포외 도메인은 표 2에 제공된 가변 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR의 세포외 도메인은 표 3에 제공된 가변 중쇄를 포함한다.

[0197] *막관통 도메인*

[0198] 막관통 도메인과 관련하여, 다양한 실시양태에서, CAR은 CAR의 세포외 도메인 (예컨대, 항-GCC 항원 결합 도메인)에 부착된 막관통 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 막관통 도메인은 막관통 영역에 인접한 하나 이상의 추가적인 아미노산, 예컨대, 막관통이 유래된 단백질의 세포외 영역과 연관된 하나 이상의 아미노산 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 최대 15 개의 세포외 영역의 아미노산) 및/또는 막관통 단백질이 유래된 단백질의 세포내 영역과 연관된 하나 이상의 추가적인 아미노산 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 최대 15 개의 세포내 영역의 아미노산)을 포함할 수 있다.

[0199] 일 양태에서, 막관통 도메인은 사용되는 CAR의 다른 도메인 중 하나와 회합된 도메인이다. 일부 예에서, 막관통 도메인은 예컨대, 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해, 동일한 또는 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 이러한 도메인의 결합을 피하기 위해 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형될 수 있다. 일 양태에서, 막관통 도메인은 CAR-발현 세포, 예컨대, CART 세포 표면 상의 다른 CAR과 동종이합체화할 수 있다. 상이한 양태에서, 막관통 도메인의 아미노산 서열은 동일한 CAR-발현 세포, 예컨대, CART에 존재하는 천연 결합 파트너의 결합 도메인과의 상호작용을 최소화하도록 변형되거나 치환될 수 있다.

[0200] 본원에 기재된 바와 같이, CAR은 막관통 도메인을 포함한다. 막관통 도메인과 관련하여, CAR은 CAR의 세포외 GCC 항원 결합 도메인에 융합된 하나 이상의 막관통 도메인을 포함한다. 막관통 도메인은 자연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 자연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합된 단백질 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다.

[0201] 본원에 기재된 CAR에서 특히 사용되는 막관통 영역은 T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8,

CD9, CD16, CD22, 메조텔린, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 알파, 베타 또는 제타 쇄로부터 유래될 수 있다 (즉, 적어도 이의 막관통 영역(들)을 포함함).

[0202] 막관통 도메인은 자연 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 자연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합된 단백질 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 일 양태에서 막관통 도메인은 CAR이 표적에 결합할 때마다 세포내 도메인(들)에 시그널링할 수 있다. 본 발명에서 특히 사용되는 막관통 도메인은 적어도 예컨대, T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8 (예컨대, CD8 알파, CD8 베타), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 알파, 베타 또는 제타 쇄의 막관통 영역(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 적어도 공동자극 분자, 예컨대, MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체 단백질, 면역글로불린-유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 시그널링 림프구성 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, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, 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 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드의 막관통 영역(들)을 포함할 수 있다.

[0203] 일부 실시양태에서, CAR 분자는 T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154의 알파, 베타 또는 제타 쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막관통 도메인을 포함한다.

[0204] 대안적으로, 막관통 도메인은 합성일 수 있으며, 이 경우 이는 주로 소수성 잔기, 예컨대, 류신 및 발린을 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중항은 합성 막관통 도메인의 각각의 단부에서 발견될 것이다. 임의로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2 내지 10 개의 아미노산 길이가 막관통 도메인 및 CAR의 세포질 시그널링 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 글리신-세린 이중항 또는 삼중 알라닌 링커이다.

[0205] 일부 실시양태에서, 위에 기재된 막관통 도메인에 더하여 CAR의 도메인 중 하나와 자연적으로 회합된 막관통 도메인이 사용된다. 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 동일한 또는 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 이러한 도메인의 결합을 피하기 위해 아미노산 치환에 의해 선택될 수 있다.

[0206] 일부 실시양태에서, 발명의 CAR에서의 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이다. 일부 실시양태에서, CD28 막관통 도메인은 FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV 서열번호 30의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 30의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 서열번호 30의 아미노산 서열의 1, 2 또는 3 개 이상의 변형 (예컨대, 치환)을 갖지만 20, 10 또는 5 개 이하의 변형 (예컨대, 치환)을 갖는 서열, 또는 서열번호 30의 아미노산 서열과 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0207] 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 힌지, 예컨대, 인간 단백질로부터의 힌지를 통해 CAR의 세포외 영역, 예컨대, CAR의 항원 결합 도메인에 부착될 수 있다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 힌지는 인간 Ig (면역글로불린) 힌지, 예컨대, IgG4 힌지 또는 CD8a 힌지일 수 있다.

[0208] CAR에서, 힌지 도메인으로 또한 불리는 스페이서 도메인은 세포외 도메인 및 막관통 도메인 사이, 또는 세포내 도메인 및 막관통 도메인 사이에 배열될 수 있다. 스페이서 도메인은 세포외 도메인과 막관통 도메인 및/또는 세포내 도메인과 막관통 도메인을 연결하는 역할을 하는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 스페이서 도메인은 최대 300 개의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100 개의 아미노산, 및 가장 바람직하게는 25 내지 50 개의 아미노산을 포함한다.

[0209] 여러 실시양태에서, 링커는 존재하는 경우 이펙터 분자 또는 검출가능한 마커, 및 항체 또는 항원 결합 단편 사이의 거리가 증가되도록 링커의 크기를 증가시키는 스페이서 요소를 포함할 수 있다. 예시적인 스페이서는 당업자에게 알려져 있고, 이들 각각이 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 미국 특허 번호 7,964,566 7,498,298,

6,884,869, 6,323,315, 6,239,104, 6,034,065, 5,780,588, 5,665,860, 5,663,149, 5,635,483, 5,599,902, 5,554,725, 5,530,097, 5,521,284, 5,504,191, 5,410,024, 5,138,036, 5,076,973, 4,986,988, 4,978,744, 4,879,278, 4,816,444 및 4,486,414, 뿐만 아니라 미국 특허 공개공보 번호 20110212088 및 20110070248에 나열된 것들을 포함한다.

[0210] 스페이서 도메인은 바람직하게는 항원과 CAR의 결합을 촉진하고, 세포로의 시그널링을 향상시키는 서열을 갖는다. 결합의 촉진이 예상되는 아미노산의 예는 하전된 아미노산인 시스테인, 및 잠재적 글리코실화 부위의 세린 및 트레오닌을 포함하며, 이들 아미노산은 스페이서 도메인을 구성하는 아미노산으로서 사용될 수 있다.

[0211] 일부 실시양태에서, CAR은 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP (서열번호 29)의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 서열번호 29의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 서열번호 29의 아미노산 서열의 1, 2 또는 3 개 이상의 변형 (예컨대, 치환)을 갖지만 20, 10 또는 5 개 이하의 변형 (예컨대, 치환)을 갖는 서열, 또는 서열번호 29의 아미노산 서열과 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0212] 일부 실시양태에서, CAR은 CD8 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서 힌지 도메인은 아미노산 서열 TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열번호 5)를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 CD8 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 아미노산 서열 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (서열번호 2)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 및 막관통 도메인은 동일한 분자로부터 유래된다. 다른 실시양태에서, 힌지 및 막관통 도메인은 상이한 분자 (예컨대, CD28에 융합된 CD8)로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, CAR은 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (서열번호 31)의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 서열번호 31의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 서열번호 31의 아미노산 서열의 1, 2 또는 3 개 이상의 변형 (예컨대, 치환)을 갖지만 20, 10 또는 5 개 이하의 변형 (예컨대, 치환)을 갖는 서열을 포함한다.

[0213] 일 실시양태에서, CAR은 표피 성장 인자 수용체 (tEGFR)의 절삭된 서열을 코딩하는 태그 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, tEGFR 태그는 서열번호 43의 아미노산 서열, 또는 이의 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0214] *세포내 도메인*

[0215] CAR의 세포질 도메인 또는 그렇지 않으면 세포내 시그널링 도메인은 CAR이 배치된 면역 세포의 정상 이펙터 기능 중 하나 이상의 활성화를 담당한다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 특화된 기능을 지칭한다. 예를 들어, T 세포의 이펙터 기능은 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서 용어 "세포내 시그널링 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 특화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 일반적으로 전체 세포내 시그널링 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 쇄를 사용할 필요는 없다. 세포내 시그널링 도메인의 절삭된 부분이 사용되는 한, 이러한 절삭된 부분은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 온전한 쇄 대신에 사용될 수 있다. 따라서 용어 세포내 시그널링 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 시그널링 도메인의 임의의 절삭된 부분을 포함하는 것을 의미한다.

[0216] CAR에서 사용하기 위한 세포내 시그널링 도메인의 예는 T 세포 수용체 (TCR) 및 항원 수용체 인게이지먼트 후 신호 전달을 개시하기 위해 함께 작용하는 공동-수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 역량을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다. TCR만을 통해 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하며, 이차 또는 공동-자극 신호가 또한 필요하다. 따라서, T 세포 활성화는 세포질 시그널링 서열의 2 개의 별개의 부류에 의해 매개된다고 말할 수 있다: TCR (일차 세포질 시그널링 서열)을 통해 항원-의존적 일차 활성화를 개시하는 것들, 및 항원-독립적 방식으로 작용하여 이차 또는 공동-자극 신호 (이차 세포질 시그널링 서열)를 제공하는 것들.

[0217] 일차 세포질 시그널링 서열은 자극 방식 또는 억제 방식으로 TCR 복합체의 일차 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 시그널링 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 알려진 시그널링 모티프를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR 내의 ITAM-함유 도메인은 내인성 TCR 복합체와 독립적으로 일차 TCR의 시그널링을 반복한다. 일 양태에서, 일차 신호는 예를 들어, 펩티드가 로딩된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 개시되며, 이는 비제한적으로 증식, 활성화 및 분화 등을 포함하는 T 세포 반응

의 매개를 야기한다. 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 시그널링 서열 ("일차 시그널링 도메인"으로서 또한 지칭됨)은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 알려진 시그널링 모티프를 함유할 수 있다.

[0218] 본원에 개시된 CAR에서 특히 사용되는 ITAM 함유 일차 세포질 시그널링 서열의 예는 TCR 제타 (CD3 제타), FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. ITAM의 구체적이고 비-제한적인 예는 CD3.제타. (NCBI RefSeq: NP.sub.--932170.1)의 아미노산 번호 51 내지 164, Fc.엡실론.RI.감마. (NCBI RefSeq: NP.sub.--004097.1)의 아미노산 번호 45 내지 86, Fc.엡실론.RI.베타. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000130.1)의 아미노산 번호 201 내지 244, CD3.감마. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000064.1)의 아미노산 번호 139 내지 182, CD3.델타. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000723.1)의 아미노산 번호 128 내지 171, CD3.엡실론. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000724.1)의 아미노산 번호 153 내지 207, CD5 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2)의 아미노산 번호 402 내지 495, 0022 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001762.2)의 아미노산 번호 707 내지 847, CD79a (NCBI RefSeq: NP.sub.--001774.1)의 아미노산 번호 166 내지 226, CD79b (NCBI RefSeq: NP.sub.--000617.1)의 아미노산 번호 182 내지 229, 및 CD66d (NCBI RefSeq: NP.sub.--001806.2)의 아미노산 번호 177 내지 252의 서열을 갖는 펩티드, 및 이들 펩티드가 갖는 기능과 동일한 기능을 갖는 이들의 변이체를 포함한다. 본원에 기재된 NCBI RefSeq ID 또는 GenBank의 아미노산 서열 정보에 기반한 아미노산 번호는 각각의 단백질의 전구체 (신호 펩티드 서열 등을 포함함)의 전체 길이에 기반하여 넘버링된다.

[0219] 실시양태에서, 세포내 신호 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 특화된 기능을 수행하도록 지시한다. 전체 세포내 시그널링 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 쇄를 사용할 필요는 없다. 세포내 시그널링 도메인의 절삭된 부분이 사용되는 한, 이러한 절삭된 부분은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 온전한 쇄 대신에 사용될 수 있다. 따라서, 용어 세포내 시그널링 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 시그널링 도메인의 임의의 절삭된 부분을 포함하는 것을 의미한다.

[0220] 세포내 시그널링 도메인은 CAR 함유 세포, 예컨대, CART 세포의 면역 이펙터 기능을 촉진하는 신호를 생성한다. 예컨대, CART 세포에서 면역 이펙터 기능의 예는 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 및 헬퍼 활성을 포함한다.

[0221] 실시양태에서, 세포내 시그널링 도메인은 일차 세포내 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 일차 세포내 시그널링 도메인은 일차 자극 또는 항원 의존적 시뮬레이션을 담당하는 분자로부터 유래된 것들을 포함한다. 실시양태에서, 세포내 시그널링 도메인은 공동자극 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 공동자극 세포내 시그널링 도메인은 공동자극 신호 또는 항원 독립적 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것들을 포함한다. 예를 들어, CART의 경우, 일차 세포내 시그널링 도메인은 T 세포 수용체의 세포질 서열을 포함할 수 있고, 공동자극 세포내 시그널링 도메인은 공동-수용체 또는 공동자극 분자로부터의 세포질 서열을 포함할 수 있다.

[0222] 일부 실시양태에서, 일차 세포질 시그널링 서열은 CD3 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"로서 또한 알려짐), FceRI, CD66d, DAP10 및 DAP12로부터 유래된 것들을 포함한다. 일 실시양태에서, CAR에서의 세포질 시그널링 분자는 CD3 제타로부터 유래된 세포질 시그널링 서열을 포함한다.

[0223] 일 실시양태에서, 일차 시그널링 도메인은 천연 ITAM 도메인과 비교하여 변경된 (예컨대, 증가 또는 감소된) 활성을 갖는 변형된 ITAM 도메인, 예컨대, 돌연변이된 ITAM 도메인을 포함한다. 일 실시양태에서, 일차 시그널링 도메인은 변형된 ITAM-함유 일차 세포내 시그널링 도메인, 예컨대, 최적화된 및/또는 절삭된 ITAM-함유 일차 세포내 시그널링 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 일차 시그널링 도메인은 1, 2, 3, 4 개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다.

[0224] 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 그 자체로 CD3-제타 시그널링 도메인을 포함하거나 CAR의 맥락에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합되도록 설계될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포내 도메인은 CD3 제타 쇄 부분 및 공동자극 시그널링 영역을 포함할 수 있다. 공동자극 시그널링 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 이들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 공동자극 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동자극 도메인은 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 시그널링 도메인을 포함한다.

[0225] 이러한 공동자극 분자의 구체적이고 비제한적인 예는 CD2 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001758.2)의 아미노산 번호 236 내지 351, CD4 (NCBI RefSeq: NP.sub.--000607.1)의 아미노산 번호 421 내지 458, CD5 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2)의 아미노산 번호 402 내지 495, CD8.alpha. (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3)의 아미노산 번호 207 내지 235, CD83 (GenBank: AAA35664.1)의 아미노산 번호 196 내지 210, CD28 (NCBI RefSeq: NP.sub.--006130.1)의 아미노산 번호 181 내지 220, CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP.sub.--001552.2)의 아미노산 번호 214 내지 255, CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP.sub.--003318.1)의 아미노산 번호 241 내지 277, 및 ICOS (NCBI RefSeq: NP.sub.--036224.1)의 아미노산 번호 166 내지 199의 서열을 갖는 펩티드, 및 이들 펩티드가 갖는 기능과 동일한 기능을 갖는 이들의 변이체를 포함한다. 따라서, 본원의 개시내용은 공동-자극 시그널링 요소로서 주로 4-1BB로 예시되지만, 다른 공동자극 요소는 개시내용의 범주 내에 있다.

[0226] CAR의 세포내 시그널링 도메인은 일차 시그널링 도메인, 예컨대, CD3-제타 시그널링 도메인을 그 자체로 포함할 수 있거나, 이는 발명의 CAR의 맥락에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포내 시그널링 도메인(들)과 조합될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포내 시그널링 도메인은 일차 시그널링 도메인, 예컨대, CD3 제타 쇄 부분 및 공동자극 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. 공동자극 시그널링 도메인은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 이의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예는 MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체 단백질, 면역글로불린-유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 시그널링 림프구성 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, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, GG AC, 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 CD83 등과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다. 예를 들어, CD27 공동자극은 생체외에서 인간 CART 세포의 확장, 이펙터 기능 및 생존을 향상시키고 생체내에서 인간 T 세포 지속성 및 항종양 활성을 증대시키는 것으로 입증되었다 (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706). 발명의 CAR의 세포질 부분 내의 세포내 시그널링 서열은 무작위 또는 특이적 순서로 서로 연결될 수 있다.

[0227] CAR의 세포질 시그널링 부분 내의 세포질 시그널링 서열은 무작위 또는 특이적 순서로 서로 연결될 수 있다. 임의로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2 내지 10 개의 아미노산 길이가 연결을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 글리신-세린 이중항 또는 삼중 알라닌 링커이다.

[0228] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD28 공동자극 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (서열번호 32)와 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0229] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3-제타의 시그널링 도메인 및 CD28의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 하나 이상의 변형된 면역수용체 티로신 기반-활성화 모티프 (ITAM)를 갖는 CD3-제타를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 3 개의 면역수용체 티로신 기반-활성화 모티프 (ITAM) 중 첫 번째가 변형되지 않고 두 번째 및 세 번째 ITAM이 변경된 "1XX"로 명명된 CD3-제타를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFD ALHMQALPPR (서열번호 33)과 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0230] 다른 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3-제타의 시그널링 도메인 및 4-1BB의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다. 또 다른 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3-제타의 시그널링 도메인 및 CD28 및 4-1BB의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다.

[0231] 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 4-1BB의 시그널링 도메인 및 CD3-제타의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계되며, 여기서 4-1BB의 시그널링 도메인은 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열번호 3)을 포함하고, CD3-제타의 시그널링 도메인은 RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD

ALHMQALPPR (서열번호 4) 또는 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR (서열번호 71)에 제시된 핵산 서열을 포함한다.

[0232] 일부 실시양태에서, CAR 도메인은 폴리펩티드 링커에 의해 연결된다. 예를 들어, 폴리펩티드 링커는 2 내지 10 개의 아미노산 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 개의 아미노산) 길이일 수 있고 세포내 시그널링 서열 사이의 연결을 형성할 수 있다. 일 실시양태에서, 글리신-세린 이중항은 적합한 링커로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 아미노산, 예컨대, 알라닌, 글리신은 적합한 링커로서 사용될 수 있다.

[0233] 일 양태에서, 세포내 시그널링 도메인은 2 개 이상, 예컨대, 2, 3, 4, 5 개 이상의 공동자극 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다. 실시양태에서, 2 개 이상. 예컨대, 2, 3, 4, 5 개 이상의 공동자극 시그널링 도메인은 링커 분자, 예컨대, 본원에 기재된 링커 분자에 의해 분리된다. 일 실시양태에서, 세포내 시그널링 도메인은 2 개의 공동자극 시그널링 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 분자는 글리신 잔기이다. 일부 실시양태에서, 링커는 알라닌 잔기이다.

[0234] 일 양태에서, 세포내 시그널링 도메인은 CD3-제타의 시그널링 도메인 및 CD28의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다. 일 양태에서, 세포내 시그널링 도메인은 CD3-제타의 시그널링 도메인 및 4-1BB의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다.

[0235] 일 양태에서, 세포내 시그널링 도메인은 CD3-제타의 시그널링 도메인 및 CD27의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다. 일 양태에서, 세포내는 CD3-제타의 시그널링 도메인 및 CD28의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다. 일 양태에서, 세포내는 CD3-제타의 시그널링 도메인 및 ICOS의 시그널링 도메인을 포함하도록 설계된다.

[0236] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 표 4에 제공된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0237] *표 4. 예시적인 항-GCC CAR의 아미노산 서열*

CAR	서열
V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVA MSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPS PLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (서열번호 48)
V6 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (서열번호 49)
V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (서열번호 50)
V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRF TVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (서열번호 51)
V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (서열번호 52)
V1	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVA

[0238]

CAR	서열
CAR	MSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPS PLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTAT KDTFDALHMQALPPR (서열번호 47)

[0239]

[0240] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 47과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0241] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 48과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0242] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 49와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0243] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 50과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0244] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 51과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0245] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 서열번호 52와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0246] *CAR의 기능적 특징*

[0247] 또한 본원에 개시된 CAR의 기능적 부분이 본 발명의 범주 내에 명시적으로 포함된다. CAR과 관련하여 사용될 때 용어 "기능적 부분"은 본원에 개시된 CAR 중 하나 이상의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하며, 이 부분 또는 단편은 이것이 속한 CAR (모 CAR)의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 부분은 예를 들어, 모 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하거나, 질환을 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 보유하는 CAR의 부분을 포함한다. 모 CAR과 관련하여, 기능적 부분은 예를 들어, 모 CAR의 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% 이상을 포함할 수 있다.

[0248] 기능적 부분은 부분의 아미노 또는 카복시 말단, 또는 두 말단 모두에서 추가적인 아미노산을 포함할 수 있으며, 추가적인 아미노산은 모 CAR의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게는, 추가적인 아미노산은 기능적 부분의 생물학적 기능, 예컨대, 표적 세포의 인식, 암의 검출, 암의 치료 또는 예방 등을 방해하지 않는다. 보다 바람직하게는, 추가적인 아미노산은 모 CAR의 생물학적 활성과 비교하여 생물학적 활성을 향상시킨다.

[0249] 개시내용의 범주에는 본원에 개시된 CAR의 기능적 변이체가 포함된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "기능적 변이체"는 모 CAR과 상당한 또는 유의한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 CAR, 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭하며, 이 기능적 변이체는 변이체가 속한 CAR의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 변이체는 예를 들어, 모 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는 본원에 기재된 CAR (모 CAR)의 변이체를 포함한다. 모 CAR과 관련하여, 기능적 변이체는 예를 들어, 모 CAR과 아미노산 서열이 적어도 약 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 98% 이상 동일할 수 있다.

[0250] 기능적 변이체는 예를 들어, 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 기능적 변이체는 하나 이상의 비-보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이 경우, 비-보존적 아미노산 치환이 기능적 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 비-보존적 아미노산 치환은 기능적 변이체의 생물학적 활성을 향상시켜, 기능적 변이체의 생물학적 활성이 모 CAR과 비교하여 증가되도록 할 수 있다.

[0251] CAR의 아미노산 치환은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환이다. 보존적 아미노산 치환은 당업계에 알려져 있고, 특정 물리적 및/또는 화학적 특성을 갖는 하나의 아미노산이 동일한 또는 유사한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 교환되는 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 다른 산성/음으로 하전된 극성 아미노산 (예컨대, Asp 또는 Glu)으로 치환된 산성/음으로 하전된 극성 아미노산, 비극성 측쇄를 갖는 다른 아미노산 (예컨대, Ala, Gly, Val, He, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val 등)으로 치환된 비극성 측쇄를 갖는 아미노산, 다른 염기성/양으로 하전된 극성 아미노산 (예컨대, Lys, His, Arg 등)으로 치환된 염기성/양으로 하전된 극성 아미노산, 극성 측쇄를 갖는 다른 비하전된 아미노산 (예컨대, Asn, Gin, Ser, Thr, Tyr 등)으로 치환된 극성 측쇄를 갖는 비하전된 아미노산, 베타-분지형 측쇄를 갖는 다른 아미노산 (예컨대, He, Thr 및 Val)으로 치환된 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산, 방향족 측쇄를 갖는 다른 아미노산 (예컨대, His, Phe, Trp 및 Tyr)으로 치환된 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 등일 수 있다.

[0252] CAR은 다른 구성요소, 예컨대, 다른 아미노산이 기능적 변이체의 생물학적 활성을 실질적으로 바꾸지 않도록 본원에 기재된 명시된 아미노산 서열 또는 서열들로 본질적으로 이루어질 수 있다.

[0253] CAR (기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 임의의 길이일 수 있으며, 즉, CAR (또는 이의 기능적 부분 또는 기능적 변이체)이 이들의 생물학적 활성, 예컨대, 항원에 특이적으로 결합하거나, 포유류에서의 질환이 있는 세포를 검출하거나, 포유류에서의 질환을 치료 또는 예방하는 능력 등을 보유한다면, 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR은 약 50 내지 약 5000 개의 아미노산 길이, 예컨대, 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 개 이상의 아미노산 길이일 수 있다.

[0254] CAR (발명의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 하나 이상의 자연-발생 아미노산 대신 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, 아미노사이클로헥산 카복실산, 노르류신, -아미노 n-데칸산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-하이드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카복시페닐알라닌, β-페닐세린 β-하이드록시페닐알라닌, 페닐글리신, a-나프틸알라닌, 사이클로헥실알라닌, 사이클로헥실글리신, 인돌린-2-카복실산,

1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N'-벤질-N'-메틸-리신, N',N'-디벤질-리신, 6-하이드록시리신, 오미틴, -아미노사이클로펜탄 카복실산, a-아미노사이클로헥산 카복실산, a-아미노사이클로헵탄 카복실산, a-(2-아미노-2-노르보르난)-카복실산, γ-디아미노부티르산, β-디아미노프로피온산, 호모페닐알라닌 및 a-tert-부틸글리신을 포함한다.

[0255] CAR (기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 글리코실화되거나, 아미드화되거나, 카복실화되거나, 인산화되거나, 에스테르화되거나, N-아실화되거나, 예컨대, 디설파이드 브릿지를 통해 고리화되거나, 산 부가염으로 전환되고/되거나, 임의로 이합체화 또는 중합체화 또는 컨쥬게이션화될 수 있다.

[0256] *치환 및 변이체*

[0257] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 핵산 서열에 적절한 변형을 도입함으로써 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실 및/또는 이로 삽입 및/또는 이의 치환을 포함한다. 최종 작제물이 원하는 특질, 예컨대, 항원-결합을 보유한다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합은 최종 작제물에 도달하도록 이루어질 수 있다.

[0258] a) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0259] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환적 돌연변이유발에 대한 관심 있는 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 아미노산 측쇄 부류와 관련하여 아래에 추가로 기재된 바와 같다. 아미노산 치환은 관심 있는 항체에 도입될 수 있고, 생성물은 원하는 활성, 예컨대, 유지된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0260] 아미노산은 통상적인 측쇄 특성에 따라 그룹화될 수 있다:

[0261] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0262] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0263] (3) 산성: Asp, Glu;

[0264] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0265] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0266] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0267] 비-보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0268] 일부 양태에서, 항원 결합 도메인은 인간화된다. 비-인간 항체는 인간화되며, 여기서 항체의 특이적 서열 또는 영역은 인간 또는 이의 단편에서 자연적으로 생산된 항체에 대한 유사성을 증가시키기 위해 변형된다. 일 양태에서, 항원 결합 도메인은 인간화된다. 인간화된 항체 (또는 항원 결합 단편)는 비제한적으로 CDR-이식 (예컨대, 유럽 특허 번호 EP 239,400; 국제 공개공보 번호 WO 91/09967; 및 미국 특허 번호 5,225,539, 5,530,101 및 5,585,089를 참고하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 원용됨), 베니어링(veneering) 또는 재표면화 (예컨대, 유럽 특허 번호 EP 592,106 및 EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; 및 Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973을 참고하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 원용됨), 쇄 셔플링 (예컨대, 미국 특허 번호 5,565,332를 참고하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 원용됨), 및 예컨대, 이들 각각이 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 미국 특허 출원 공개공보 번호 US2005/0042664, 미국 특허 출원 공개공보 번호 US2005/0048617, 미국 특허 번호 6,407,213, 미국 특허 번호 5,766,886, 국제 공개공보 번호 WO 9317105, Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002), Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16): 10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994), 및 Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)에 개시된 기술을 포함하는 당업계에 알려진 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 종종, 프레임워크 영역에서의 프레임워크 잔기는 항원 결합을 변경, 예를 들어, 개선하기 위해 CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환될 것이다. 이러한 프레임워크 치환, 예컨대, 보존적 치환

은 당업계에 잘 알려진 방법에 의해, 예컨대, 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 식별하기 위한 CDR 및 프레임워크 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서 특이한 프레임워크 잔기를 식별하기 위한 서열 비교에 의해 식별된다. (예컨대, Queen et al., 미국 특허 번호 5,585,089; 및 Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323을 참고하며, 이들은 그 전체가 본원에 참조로 원용됨.)

[0269] 인간화된 항체 또는 항체 단편은 비인간 공급원으로부터 그 안에 남아 있는 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비인간 아미노산 잔기는 종종 "수입" 잔기로서 지칭되며, 이는 전형적으로 "수입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 본원에 제공된 바와 같이, 인간화된 항체 또는 항체 단편은 비인간 면역글로불린 분자 및 프레임워크 영역으로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하며, 여기서 프레임워크를 포함하는 아미노산 잔기는 완전히 또는 대부분 인간 생식계열로부터 유래된다. 항체 또는 항체 단편의 인간화를 위한 다중 기술은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0270] 일 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예컨대, 인간화된 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 결과 변이체(들)는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예컨대, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)에서 변형 (예컨대, 개선)을 가질 것이고/이거나, 실질적으로 모 항체의 특정 생물학적 특성을 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예컨대, 본원에 기재된 것들과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 요약하면, 하나 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체가 파지에 디스플레이되고, 특정 생물학적 활성 (예컨대, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0271] 예컨대, 항체 친화도를 개선하기 위해 HVR에서 변경 (예컨대, 치환)이 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟", 즉, 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 코딩된 잔기 (예컨대, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179-196 (2008) 참고), 및/또는 SDR (a-CDR)에서 이루어질 수 있으며, 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대해 테스트된다. 이차 라이브러리로부터의 작제 및 재선택에 의한 친화도 성숙은 예컨대, Hoogenboom et al. Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O' Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)에 기재되어 있다 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양한 방법 (예컨대, 오류가 발생하기 쉬운 PCR, 쇄 셔플링 또는 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이유발) 중 임의의 것에 의해 성숙에 대해 선정된 가변 유전자에 다양성이 도입된다. 그런 다음, 이차 라이브러리가 생성된다. 이어서, 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 식별하기 위해 라이브러리가 스크리닝된다. 다양성을 도입하는 다른 방법은 여러 HVR 잔기 (예컨대, 한 번에 4-6 개의 잔기)가 무작위화되는 HVR-지시된 접근법을 포함한다. 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기는 예컨대, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 식별될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3은 종종 표적화된다.

[0272] 일부 실시양태에서, 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 치환, 삽입 또는 결실은 하나 이상의 HVR 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예컨대, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 CDR 외부에 있을 수 있다. 위에 제공된 변이체 VH 서열의 일부 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나 1, 2 또는 3 개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0273] 돌연변이유발에 대해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 식별하는 유용한 방법은 Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기 그룹 (예컨대, 하전된 잔기, 예컨대, Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)을 식별하고, 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예컨대, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하여, 항체와 항원의 상호작용이 영향을 받는지 여부를 결정한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감도를 나타내는 아미노산 위치에 추가 치환이 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항체 및 항원 사이의 접촉 지점을 식별하기 위한 항원-항체 복합체의 결정 구조. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 치환 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 원하는 특성을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 변이체를 스크리닝할 수 있다.

[0274] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기로부터 100 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 (예컨대, ADEPT용) 또는 폴리펩티드에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합을 포함한다.

[0275] b) 글리코실화 변이체

[0276] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 첨가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0277] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-연결에 의해 일반적으로 부착된 분지형, 바이안테너리 올리고당을 포함한다. 예컨대, Wright et al. TIBTECH 15: 26-32 (1997)를 참고한다. 올리고당은 다양한 탄수화물, 예컨대, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산뿐만 아니라 바이안테너리 올리고당 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 본 출원의 항체에서 올리고당의 변형이 이루어질 수 있다.

[0278] 일부 실시양태에서, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어, WO 2008/077546에 기재된 바와 같은 MALDI-TOF 질량 분광법에 의해 측정된 바와 같이 Asn 297에 부착된 모든 글리코구조 (예컨대, 복합, 하이브리드 및 고 만노스 구조)의 합과 비교하여, Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정된다. Asn297은 Fc 영역에서 거의 위치 297 (Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하나; Asn297은 또한 항체에서의 사소한 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ±3 개의 아미노산 업스트림 또는 다운스트림, 즉, 위치 294 내지 300에 위치될 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예컨대, 미국 특허 공개공보 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)을 참고한다. "탈푸코실화된" 또는 "푸코스-결핍된" 항체 변이체와 관련된 공개물의 예는 다음을 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). 탈푸코실된 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); US Patent Application No. US 2003/0157108 A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams et al.,), 및 녹아웃 세포주, 예컨대, 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예컨대, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94 (4):680-688 (2006); 및 WO2003/085107 참고)를 포함한다.

[0279] 예컨대, 항체의 Fc 영역에 부착된 바이안테너리 올리고당이 GlcNAc에 의해 이등분된 이등분된 올리고당을 갖는 항체 변이체가 추가로 제공된다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예는 예컨대, WO 2003/011878 (Jean-Mairet 등); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana 등); 및 US 2005/0123546 (Umana 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예컨대, WO 1997/30087 (Patel 등); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0280] CAR (이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 당업계에 알려진 방법에 의해 수득될 수 있다. CAR은 폴리펩티드 또는 단백질을 만드는 임의의 적합한 방법에 의해 만들어질 수 있다. 폴리펩티드 및 단백질을 데 노보 합성하는 적합한 방법은 참고문헌, 예컨대, Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001; 및 미국 특허 번호 5,449,752에 기재되어 있다. 또한, 폴리펩티드 및 단백질은 표준 재조합 방법을 사용하여 본원에 기재된 핵산을 사용하여 재조합적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, N Y, 1994를 참고한다. 추가로, CAR (이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함) 중 일부는 공급원, 예컨대, 식물, 박테리움, 곤충, 포유류, 예컨대, 랫트, 인간 등으로부터 단리 및/또는 정제될 수 있다. 단리 및 정제의 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 CAR (이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 회사에 의해 상업적으로 합성될 수 있다. 이와 관련하여, CAR은 합성, 재조합, 단리 및/또는 정제될 수 있다.

[0281] ***검출가능한 마커 및 태그***

[0282] 본원에 개시된 항원 중 하나 이상에 특이적인, CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 단클론 항체, 이의 항원 결합 단편은 또한 태그 단백질과 함께 발현 (예컨대, 공동-발현)될 수 있다. 일부 실시양태에서, 태그 서열 및 CAR 서열의 동시 바이시스트론 발현을 위해 설계된, 푸린 인식 부위 및 다운스트림 2A 자가-절단 펩티드 서열. 일부 실시양태에서, 2A 서열은 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP 서열번호 44의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 푸린 및 P2A 서열은 서열번호 44의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, P2A 태그는 서열번호 44의 아미노산 서열, 또는 이의 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0283] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항원 중 하나 이상에 특이적인, CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 단클론 항체, 이의 항원 결합 단편은 또한 EGFR로 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항원 중 하나 이상에 특이적인, CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 단클론 항체, 이의 항원 결합 단편은 절삭된 EGFR (tEGFR)과 함께 발현된다 (예컨대, 공동-발현됨). 일부 실시양태에서, tEGFR은 서열번호 43과 95% 이상 동일한, 96% 이상 동일한, 97% 이상 동일한, 98% 이상 동일한, 99% 이상 동일한 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0284] tEGFR:

[0285] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPEN
RTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGC
WGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVC
HLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM (서열번호 43)

[0286] 본원에 개시된 항원 중 하나 이상에 특이적인, CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 단클론 항체, 이의 항원 결합 단편은 또한 검출가능한 마커; 예를 들어, ELISA, 분광광도법, 유세포 분석법, 현미경 또는 진단적 영상 기술 (예컨대, 컴퓨터 단층촬영 (CT), 컴퓨터 축 단층촬영 (CAT) 스캔, 자기 공명 영상 (MRI), 핵 자기 공명 영상 NMRI), 자기 공명 단층촬영 (MTR), 초음파, 광섬유 검사, 및 복강경 검사)로 검출할 수 있는 검출가능한 마커와 컨쥬게이션될 수 있다. 검출가능한 마커의 구체적이고 비-제한적인 예는 형광단, 화학발광제, 효소적 연결, 방사성 동위원소 및 중금속 또는 화합물 (예를 들어, MRI에 의한 검출을 위한 초상자성 철 옥사이드 나노결정)을 포함한다. 예를 들어, 유용한 검출가능한 마커는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 피코에리트린, 및 란타나이드 인광체 등을 포함하는 형광 화합물을 포함한다. 생물발광 마커, 예컨대, 루시퍼라제, 녹색 형광 단백질 (GFP), 황색 형광 단백질 (YFP)이 또한 사용된다. CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 또한 검출에 유용한 효소, 예컨대, 홀스래디쉬 퍼옥시다제, β-갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리성 포스파타제, 및 글루코스 옥시다제 등과 컨쥬게이션될 수 있다. CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 검출가능한 효소와 컨쥬게이션될 때, 효소가 분별할 수 있는 반응 생성물을 생산하기 위해 사용하는 추가적인 시약을 첨가함으로써 검출될 수 있다. 예를 들어, 홀스래디쉬 퍼옥시다제 약제가 존재할 때, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가는 시각적으로 검출가능한 유색 반응 생성물이 생성된다. CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 또한 비오틴과 컨쥬게이션될 수 있고, 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접 측정을 통해 검출될 수 있다. 아비딘 자체가 효소 또는 형광 표지와 컨쥬게이션될 수 있다는 점에 주목해야 한다.

[0287] CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 상자성 약제, 예컨대, 가돌리늄과 컨쥬게이션될 수 있다. 상자성 약제, 예컨대, 초상자성 철 옥사이드가 또한 표지로서 사용된다. 항체는 또한 란타나이드 (예컨대, 유로퓸 및 디스프로슘) 및 망간과 컨쥬게이션될 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편은 또한 이차 리포터 (예컨대, 류신 지퍼 쌍 서열, 이차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인식되는 미리결정된 폴리펩티드 에피토프로 표지될 수 있다.

[0288] CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 또한 방사성표지된 아미노산과 컨쥬게이션될 수 있다. 방사성표지는 진단적 및 치료적 목적 둘 모두에 사용될 수 있다. 예를 들어, 방사성표지는 x-선, 방출 스펙트럼 또는 기타 진단적 기술에 의해 본원에 개시된 항원 중 하나 이상 및 항원 발현 세포를 검출하는 데 사용될 수 있다. 추가로, 방사성표지는 예를 들어, 신경아세포종의 치료를 위해 대상체에서 종양의 치료를 위한 독소로서 치료적으로 사용될 수 있다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예는 다음의 방사성 동위원소 또는 방사성 뉴클레오티드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다: ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I.

[0289] 이러한 검출가능한 마커를 검출하는 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 따라서, 예를 들어, 방사성표지는 사진

필름 또는 신틸레이션 계수기를 사용하여 검출될 수 있고, 형광 마커는 방출된 조사를 검출하기 위해 광검출기를 사용하여 검출될 수 있다. 효소적 표지는 전형적으로 효소에 기질을 제공하고, 기질에 대한 효소의 작용에 의해 생산된 반응 생성물을 검출함으로써 검출되고, 비색 표지는 단순히 유색 표지를 시각화함으로써 검출된다.

[0290] **핵산, 발현 벡터 및 숙주 세포**

[0291] 본원에 기재된 CAR, 항체 또는 이의 항원 결합 부분 (이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함) 중 임의의 것을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산이 발명의 실시양태에 의해 추가로 제공된다. 발명의 핵산은 본원에 기재된 리더 서열, 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및/또는 세포내 T 세포 시그널링 도메인 중 임의의 것을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0292] 일 양태에서, 본 발명은 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 핵산 작제물을 포함하며, 여기서 핵산 분자는 세포내 시그널링 도메인을 코딩하는 핵산 서열과 인접하고 이와 동일한 리딩 프레임 내에 있는, 예컨대, 본원에 기재된 항-GCC 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. CAR에 사용될 수 있는 예시적인 세포내 시그널링 도메인은 예컨대, CD3-제타, CD28 및 4-1BB 등의 하나 이상의 세포내 시그널링 도메인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, CAR은 CD3-제타, CD28 및 4-IBB 등의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0293] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 CAR 작제물을 코딩하는 핵산과 적어도 약 70% 이상, 예컨대, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.

[0294] 일부 실시양태에서, 핵산은 표 1-3 또는 표 7에 제공된 항-GCC VH 서열로부터 선택된 항-GCC 결합 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 61-70 중 어느 하나와 적어도 약 70% 이상, 예컨대, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 61-70 중 어느 하나와 동일한 서열을 포함한다.

[0295] 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 서열은 코돈-변형될 수 있다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화는 mRNA 전사물의 번역 효율을 증가시키는 것으로 여겨진다. 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화는 동일한 아미노산을 코딩하지만 세포 내에서 보다 용이하게 이용가능한 tRNA에 의해 번역될 수 있어, 번역 효율을 증가시키는 다른 코돈으로 천연 코돈을 치환하는 것을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 서열의 최적화는 또한 번역을 방해할 것인 이차 mRNA 구조를 감소시켜, 번역 효율을 증가시킬 수 있다.

[0296] 발명의 실시양태에서, 핵산은 본 발명의 CAR의 항원 결합 도메인을 코딩하는 코돈-변형된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 발명의 다른 실시양태에서, 핵산은 본원에 기재된 CAR (이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함) 중 임의의 것을 코딩하는 코돈-변형된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0297] 일 양태 양태에서, 발명은 본원에 기재된 핵산 분자, 예컨대, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0298] 일 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일 실시양태에서, 벡터는 프로모터를 추가로 포함한다. 일 실시양태에서, 프로모터는 EF-1 프로모터이다.

[0299] 발현 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 코스미드, YAC, 및 EBV 유래된 에피솜 등을 포함한다. 편리한 벡터는 임의의 VH 또는 VL 서열이 쉽게 삽입되고 발현될 수 있도록 조작된 적절한 제한 부위와 함께 기능적으로 완전한 인간 CH 또는 CL 면역글로불린 서열을 코딩하는 것이다. 이러한 벡터에서, 스플라이싱은 일반적으로 삽입된 J 영역의 스플라이스 공여자 부위 및 인간 C 영역 앞의 스플라이스 수용자 부위 사이에서 발생하며, 인간 CH 엑손 내에서 발생하는 스플라이스 영역에서도 발생한다. 적합한 발현 벡터는 다수의 구성요소, 예를 들어, 복제 원점, 선택가능한 마커 유전자, 하나 이상의 발현 제어 요소, 예컨대, 전사 제어 요소 (예컨대, 프로모터, 인핸서 또는 종결자) 및/또는 하나 이상의 번역 신호, 및 신호 서열 또는 리더 서열 등을 함유할 수 있다. 폴리아데닐화 및 전사 종결은 코딩 영역의 다운스트림의 천연 염색체 부위에서 발생한다. 생성된 키메라 항체는 임의의 강력한 프로모터에 접합될 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 벡터의 예는 포유동물 숙주에 적합하고 바이러스 복제 시스템에 기반한 것들, 예컨대, 시미안 바이러스 40 (SV40), 라우스 육종 바이러스 (RSV), 아데노바이러스 2, 소 유두종 바이러스 (BPV), 파포바바이러스 BK 돌연변이체 (BKV), 또는 마우스 및 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV) 및 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV), 천연 Ig 프로모터 등을 포함한다. 단일 카피 또는 다중 카피로 유지되거나, 예컨대, LTR을 통해 또는 다중 통합 부위로 조작된 인공 염색체를 통해 숙주 세포 염색체로 통합되는 벡터를 비롯한 다양한 적합한 벡터가 당업계에 알려져 있다 (Lindenbaum et al. *Nucleic Acids Res.*

32:e172 (2004), Kennard et al. *Biotechnol. Bioeng.* Online May 20, 2009). 적합한 벡터의 추가적인 예는 이후 섹션에 나열된다.

[0300] 본 발명은 또한 세포 내로 직접 형질주입될 수 있는 RNA 작제물을 포함한다. 형질주입에 사용하기 위한 mRNA의 생성 방법은 특이적으로 설계된 프라이머를 이용한 주형의 생체외 전사 (IVT)를 포함하고, 이어서 폴리A를 첨가하여, 전형적으로 50-2000 개의 염기의 길이인 3' 및 5' 비번역 서열 ("UTR"), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES), 발현될 핵산, 및 폴리A 꼬리를 함유하는 작제물을 생산한다. 이렇게 생산된 RNA는 상이한 종류의 세포를 효율적으로 형질주입시킬 수 있다. 일 실시양태에서, 주형은 CAR에 대한 서열을 포함한다. 실시양태에서, RNA CAR 벡터는 전기천공에 의해 세포, 예컨대, T 세포 또는 NK 세포로 형질도입된다.

[0301] 따라서, 발명은 항체, 항체의 항원-결합 단편 (예컨대, 인간, 인간화된, 키메라 항체 또는 전술한 것 중 임의의 것의 항원-결합 단편), 항체 쇄 (예컨대, 중쇄, 경쇄) 또는 GCC 단백질에 결합하는 항체 쇄의 항원-결합 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0302] 진핵 숙주 세포에서의 발현은 이러한 세포가 원핵 세포보다 적절하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 조립하고 분비할 가능성이 더 높기 때문에 유용하다. 그러나, 부적절한 폴딩으로 인해 비활성화된 생산된 임의의 항체는 알려진 방법에 따라 재생가능할 수 있다 (Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, pp. 459-89 (1982)). 숙주 세포는 또한 본 발명에 따른 항체 동족체인 경쇄 이합체 또는 중쇄 이합체와 같은 온전한 항체의 일부를 생산할 것이다.

[0303] 실시양태에서, 핵산은 재조합 발현 벡터 내로 혼입될 수 있다. 이와 관련하여, 실시양태는 핵산 중 임의의 것을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 본원의 목적을 위해, 용어 "재조합 발현 벡터"는 작제물이 mRNA, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 때 숙주 세포에 의한 mRNA, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 발현을 허용하는 유전적으로 변형된 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 작제물을 의미하며, 벡터는 mRNA, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드가 세포 내에서 발현되기에 충분한 조건 하에서 세포와 접촉된다. 벡터는 전체적으로 자연적으로 발생하지 않는다.

[0304] 그러나, 벡터의 일부는 자연-발생적일 수 있다. 재조합 발현 벡터는 단일-가닥 또는 이중-가닥이거나, 합성되거나, 부분적으로 자연 공급원으로부터 수득될 수 있고, 자연, 비-자연 또는 변경된 뉴클레오티드를 함유할 수 있는 DNA 및 RNA를 비제한적으로 포함하는 임의의 유형의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 자연-발생 또는 비-자연 발생 뉴클레오티드간 연결, 또는 두 유형 모두의 연결을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비-자연 발생 또는 변경된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드간 연결은 벡터의 전사 또는 복제를 방해하지 않는다.

[0305] 실시양태에서, 재조합 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있고, 임의의 적합한 숙주 세포를 형질전환 또는 형질주입하는 데 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 전파 및 확장을 위해 또는 발현을 위해 또는 둘 모두를 위해 설계된 것들, 예컨대, 플라스미드 및 바이러스를 포함한다. 벡터는 pUC 시리즈 (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Md.), pBluescript 시리즈 (Stratagene, LaJolla, Calif.), pET 시리즈 (Novagen, Madison, Wis.), pGEX 시리즈 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 및 pEX 시리즈 (Clontech, Palo Alto, Calif.)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0306] 박테리오파지 벡터, 예컨대, λ, λZapII (Stratagene), EMBL4 및 λNMI 149가 또한 사용될 수 있다. 식물 발현 벡터의 예는 pBI01, pBI101.2, pBH01.3, pBI121 및 pBIN19 (Clontech)를 포함한다. 동물 발현 벡터의 예는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo (Clontech)를 포함한다. 재조합 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 특히 Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)에 제공된 바와 같은 자가-비활성화 렌티바이러스 벡터를 포함하여 렌티바이러스 게놈의 적어도 일부로부터 유래된 벡터이다. 임상에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는 예를 들어, 제한 없이, Oxford BioMedica plc로부터의 LENTIVECTOR® 유전자 전달 기술, 및 Lentigen으로부터의 LENTIMAX™ 벡터 시스템 등을 포함한다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터가 또한 이용가능하며, 당업자에게 알려져 있을 것이다.

[0307] 다수의 형질주입 기술은 일반적으로 당업계에 알려져 있다 (예컨대, Graham et al., Virology, 52: 456-467 (1973); 위의 Sambrook et al.; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); 및 Chu et al, Gene, 13: 97 (1981) 참고.

[0308] 형질주입 방법은 칼슘 포스페이트 공동-침전 (예컨대, 위의 Graham et al. 참고), 배양된 세포로의 직접 마이크

로 주사 (예컨대, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980) 참고), 전기천공법 (예컨대, Shigekawa et al., BioTechniques, 6: 742-751 (1988) 참고), 리포솜 매개된 유전자 전달 (예컨대, Mannino et al., BioTechniques, 6: 682-690 (1988) 참고), 지질 매개된 형질도입 (예컨대, Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987) 참고), 및 고속 마이크로분사물(microprojectile)을 사용하는 핵산 전달 (예컨대, Klein et al, Nature, 327: 70-73 (1987) 참고)을 포함한다.

[0309] 실시양태에서, 재조합 발현 벡터는 예를 들어, 위의 Sambrook et al., 및 위의 Ausubel et al.에 기재된 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 원형 또는 선형인 발현 벡터의 작제물은 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 기능적인 복제 시스템을 함유하도록 제조될 수 있다. 복제 시스템은 예컨대, ColE1, 2μ 플라스미드, λ, SV40, 및 소 유두종 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다.

[0310] 재조합 발현 벡터는, 벡터가 DNA- 또는 RNA-기반인지 여부를 고려하여 그리고 벡터가 도입될 숙주 세포의 유형(예컨대, 박테리움, 진균, 식물 또는 동물)에 적절하게 특이적인, 조절 서열, 예컨대, 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 클로닝을 용이하게 하기 위한 제한 부위를 포함할 수 있다.

[0311] 재조합 발현 벡터는 형질전환된 또는 형질주입된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커 유전자를 포함할 수 있다. 마커 유전자는 살생물제 저항성, 예컨대, 항생제, 중금속 등에 대한 저항성, 및 독립영양성을 제공하기 위한 영양요구성 숙주에서의 보완 등을 포함한다. 본 발명의 발현 벡터에 적합한 마커 유전자는 예를 들어, 네오마이신/G418 저항성 유전자, 하이그로마이신 저항성 유전자, 히스티디놀 저항성 유전자, 테트라사이클린 저항성 유전자 및 암피실린 저항성 유전자를 포함한다.

[0312] 재조합 발현 벡터는 CAR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (기능적 부분 및 기능적 변이체 포함), 또는 CAR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보적이거나 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 천연 또는 비천연 프로모터를 포함할 수 있다. 프로모터, 예컨대, 강한, 약한, 유도성, 조직-특이적 및 발달-특이적 프로모터의 선택은 당업자의 통상적인 기술 내에 있다. 유사하게, 프로모터와 뉴클레오티드 서열의 조합이 또한 당업자의 기술 내에 있다. 프로모터는 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 예컨대, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 또는 뮤린 줄기 세포 바이러스의 긴-말단 반복부에서 발견되는 프로모터일 수 있다.

[0313] 재조합 발현 벡터는 일시적인 발현, 안정한 발현 또는 둘 모두를 위해 설계될 수 있다. 또한, 재조합 발현 벡터는 구성적 발현 또는 유도성 발현을 위해 만들어질 수 있다.

[0314] 추가로, 재조합 발현 벡터는 자살 유전자를 포함하도록 만들어질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "자살 유전자"는 자살 유전자를 발현하는 세포를 죽게 만드는 유전자를 지칭한다. 자살 유전자는 유전자가 발현되는 세포에 대해 약제, 예컨대, 약물에 대한 민감도를 부여하고 세포가 약제와 접촉하거나 이에 노출될 때 세포를 죽게 만드는 유전자일 수 있다. 자살 유전자는 당업계에 알려져 있고 (예를 들어, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004 참고), 예를 들어, 단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 티미딘 키나제 (TK) 유전자, 시토신 다미나제, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 및 니트로환원효소를 포함한다.

[0315] 실시양태는 본원에 기재된 재조합 발현 벡터 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 재조합 발현 벡터를 함유할 수 있는 임의의 유형의 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 진핵 세포, 예컨대, 식물, 동물, 진균 또는 조류일 수 있거나, 원핵 세포, 예컨대, 박테리아 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 세포 또는 일차 세포, 즉, 유기체, 예컨대, 인간으로부터 직접 단리된 세포일 수 있다. 숙주 세포는 부착 세포 또는 현탁 세포, 즉, 현탁 상태에서 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, DH5a 대장균 세포, 차이니즈 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HEK293 세포, 및 HEK293T 세포 등을 포함한다. 재조합 발현 벡터를 증폭 또는 복제하기 위한 목적을 위해, 숙주 세포는 원핵 세포, 예컨대, DH5a 세포일 수 있다. 재조합 CAR을 생산하기 위한 목적을 위해, 숙주 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 숙주 세포는 인간 세포일 수 있다. 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있고, 임의의 유형의 조직으로부터 기원할 수 있으며, 임의의 발달 단계일 수 있지만, 숙주 세포는 말초 혈액 림프구 (PBL) 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)일 수 있다. 숙주 세포는 T 세포일 수 있다.

[0316] 본원의 목적을 위해, T 세포는 임의의 T 세포, 예컨대, 배양된 T 세포, 예컨대, 일차 T 세포, 또는 배양된 T 세포주, 예컨대, Jurkat, SupT1 등으로부터의 T 세포, 또는 포유류로부터 수득된 T 세포일 수 있다. 포유류로부터

수득된 경우, T 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 기타 조직 또는 유체를 비제한적으로 포함하는 다양한 공급원으로부터 수득될 수 있다. T 세포는 또한 강화되거나 정제될 수 있다. T 세포는 인간 T 세포일 수 있다. T 세포는 인간으로부터 단리된 T 세포일 수 있다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있고, CD4+/CD8+ 이중 양성 T 세포, CD4+ 헬퍼 T 세포, 예컨대, Th1 및 Th2 세포, CD8+ T 세포 (예컨대, 세포독성 T 세포), 종양 침윤 세포, 기억 T 세포, 기억 줄기 세포, 즉, Tscm, 및 나이브 T 세포 등을 비제한적으로 포함하는 임의의 발달 단계일 수 있다. T 세포는 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포일 수 있다.

[0317] 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CAR은 적합한 비-T 세포에 사용될 수 있다. 이러한 세포는 면역-이펙터 기능을 갖는 세포, 예컨대, 예를 들어, 전분화능 줄기 세포로부터 생성된 T-유사 세포 및 NK 세포이다.

[0318] 본 출원의 일 양태는 본원에 기재된 CAR 중 어느 하나, 또는 위에 기재된 단리된 핵산 중 어느 하나, 또는 위에 기재된 벡터 중 어느 하나를 포함하는, 조작된 면역 이펙터 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포, NK 세포, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 조혈 줄기 세포, 전분화능 줄기 세포 또는 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포이다.

[0319] 또한 본원에 기재된 하나 이상의 숙주 세포를 포함하는, 세포의 집단이 실시양태에 의해 제공된다. 세포의 집단은 재조합 발현 벡터 중 임의의 것을 포함하지 않는 하나 이상의 다른 세포, 예컨대, 숙주 세포 (예컨대, T 세포), 또는 T 세포 이외의 세포, 예컨대, B 세포, 대식세포, 호중구, 적혈구, 간세포, 내피 세포, 상피 세포, 근육 세포, 뇌 세포 등에 더하여, 기재된 재조합 발현 벡터 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포를 포함하는 이종 집단일 수 있다. 대안적으로, 세포의 집단은 재조합 발현 벡터를 포함하는 (예컨대, 본질적으로 이로 이루어진) 숙주 세포를 주로 포함하는 실질적으로 균질한 집단일 수 있다. 집단은 또한 집단의 모든 세포가 재조합 발현 벡터를 포함하는 단일 숙주 세포의 클론이어서, 집단의 모든 세포가 재조합 발현 벡터를 포함하는 세포의 클론 집단일 수 있다. 발명의 일 실시양태에서, 세포의 집단은 본원에 기재된 바와 같은 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 클론 집단이다.

[0320] CAR (이의 기능적 부분 및 변이체 포함), 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포 (이의 집단 포함) 및 항체 (이의 항원 결합 부분 포함)는 단리 및/또는 정제될 수 있다. 예를 들어, 정제된 (또는 단리된) 숙주 세포 제제는 숙주 세포가 신체 내의 자연 환경의 세포보다 더 순수한 것이다. 이러한 숙주 세포는 예를 들어, 표준 정제 기술에 의해 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포의 제제는 숙주 세포가 제제의 총 세포 함량의 약 50% 이상, 예를 들어, 약 70% 이상을 나타내도록 정제된다. 예를 들어, 순도는 약 50% 이상일 수 있거나, 약 60%, 약 70% 또는 약 80% 초과일 수 있거나, 약 100%일 수 있다.

[0321] 원하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 당업계에 알려진 재조합 방법을 사용하여, 예컨대, 예를 들어, 표준 기술을 사용하여, 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝하거나, 이를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 유전자를 도출하거나, 이를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 수득될 수 있다.

[0322] 대안적으로, 관심 있는 유전자는 클로닝보다는 합성적으로 생산될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 DNA가 삽입된 벡터를 제공한다. 레트로바이러스, 예컨대, 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 트랜스진의 장기간의 안정한 통합 및 딸 세포에서의 이의 전파를 허용하기 때문에 장기간 유전자 전달을 달성하는 데 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 비증식 세포, 예컨대, 간세포를 형질도입할 수 있다는 점에서 종양-레트로바이러스, 예컨대, 뮤린 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 부가적인 이점을 갖는다. 이들은 또한 낮은 면역원성의 부가적인 이점을 갖는다.

[0323] CAR을 코딩하는 자연 또는 합성 핵산의 발현은 CAR 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 프로모터에 작동가능하게 연결하고, 작제물을 발현 벡터 내로 혼입함으로써 달성될 수 있다. 벡터는 복제 및 통합 진핵생물에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 원하는 핵산 서열의 발현의 조절에 유용한 전사 및 번역 종결자, 개시 서열 및 프로모터를 함유한다.

[0324] 본 발명의 발현 작제물은 또한 표준 유전자 전달 프로토콜을 사용하여 핵산 면역화 및 유전자 요법에 사용될 수 있다. 유전자 전달을 위한 방법은 당업계에 알려져 있다. 예컨대, 이들 전체가 본원에 참조로 원용된 미국 특허 번호 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466을 참고한다. 다른 실시양태에서, 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.

[0325] 핵산은 다수의 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 빔스(vims) 및 코스미드를 비제한적으로 포함하는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특정 관심 있는 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터 및 시퀀싱 벡터를 포함한다. 추가로, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다.

[0326] 바이러스 벡터 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 및 기타 바이러스학 및 분자생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티빔스(lentivimses)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 하나 이상의 유기체에서 기능적인 복제 원점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선택가능한 마커를 함유한다 (예컨대, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193).

[0327] 포유동물 세포로의 유전자 전달을 위해 다수의 바이러스 기반 시스템이 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 당업계에 알려진 기술을 사용하여 벡터에 삽입되고 레트로바이러스 입자에 패키징될 수 있다. 그런 다음, 재조합 빔스(vims)는 단리되고, 생체내 또는 엑스 비보에서 대상체의 세포로 전달될 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 당업계에 알려져 있다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 당업계에 알려져 있다. 일 실시양태에서, 렌티빔스(lentivims) 벡터가 사용된다.

[0328] 추가적인 프로모터 요소, 예컨대, 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 출발 부위의 30-110 bp 업스트림 영역에 위치하지만, 최근에는 다수의 프로모터가 출발 부위의 다운스트림에도 기능적 요소를 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터 요소 사이의 간격은 종종 가요성이므로, 요소가 반전되거나 서로 상대적으로 이동할 때 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감퇴하기 시작하기 전에 50 bp 간격으로 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소가 협력적으로 또는 독립적으로 기능하여, 전사를 활성화할 수 있는 것으로 보인다.

[0329] 적합한 프로모터의 일 예는 즉시 초기 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 구동할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다.

[0330] 적합한 프로모터의 다른 예는 신장 성장 인자-1a (EF-1a)이다. 그러나, 비제한적으로 시미안 빔스(vims) 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 빔스(vims) (HIV) 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 빔스(vims) 프로모터, 엡스타인-바 빔스(vims) 즉시 초기 프로모터, 라우스 육종 빔스(vims) 프로모터뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터, 예컨대, 비제한적으로 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나제 프로모터를 포함하는 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 추가로, 발명은 구성적 프로모터의 사용에 제한되지 않아야 한다. 유도성 프로모터가 또한 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 이러한 발현을 원하는 경우 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켜거나, 발현을 원하지 않는 경우 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0331] CAR 폴리펩티드 또는 이의 일부의 발현을 판정하기 위해, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 선택가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 또한 함유하여, 바이러스 벡터를 통해 형질주입 또는 감염시키려는 세포의 집단으로부터의 발현 세포의 식별 및 선택을 용이하게 할 수 있다. 다른 양태에서, 선택가능한 마커는 별도의 DNA의 조각으로 운반될 수 있고, 공동-형질주입 절차에 사용될 수 있다.

[0332] 선택가능한 마커 및 리포터 유전자 둘 모두는 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열과 측접될 수 있다. 유용한 선택가능한 마커는 예를 들어, 항생제-저항성 유전자, 예컨대, neo 등을 포함한다. 리포터 유전자는 잠재적으로 형질주입된 세포를 식별하고 조절 서열의 기능을 평가하는 데 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수령자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되지 않으며 발현이 쉽게 검출가능한 일부 특성, 예컨대, 효소적 활성에 의해 현현되는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수령자 세포 내로 도입된 후 적합한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시퍼라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다 (예컨대, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). 적합한 발현 시스템은 잘 알려져 있고, 알려진 기술을 사용하여 제조되거나 상업적으로 수득될 수 있다. 일반적으로, 가장 높은 수준의 리포터 유전자의 발현을 나타내는 최소 5' 플랭킹 영역을 갖는 작제물이 프로모터로서 식별된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고, 프로모터-구동된 전사를 조정하는 능력에 대해 약제를 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0333] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현시키는 방법은 당업계에 알려져 있다. 발현 벡터의 맥락에서, 벡터는 당업계

의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예컨대, 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포 내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 칼슘 포스페이트 침전, 리포펙션, 입자 충격, 마이크로주사, 및 전기천공법 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)를 참고한다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 바람직한 방법은 칼슘 포스페이트 형질주입이다.

[0334] 관심 있는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터는 포유동물, 예컨대, 인간 세포 내로 유전자를 삽입하는 데 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 헤르페스 빔스(vims) I, 아데노바이러스 및 아데노-연관된 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참고한다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드성 분산 시스템, 예컨대, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드, 및 수-중-유 에멀젼, 미셀, 혼합된 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다.

[0335] 생체외 및 생체내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜 (예컨대, 인공 막 소포)이다. 비-바이러스 전달 시스템이 활용되는 경우에, 예시적인 전달 비히클은 나노입자, 예컨대, 리포솜 또는 다른 적합한 서브-미크론 크기의 전달 시스템이다. (생체외, 엑스 비보 또는 생체내에서) 핵산을 숙주 세포 내로 도입하기 위해 지질 제형의 사용이 고려된다. 다른 양태에서, 핵산은 지질과 회합될 수 있다. 지질과 회합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포좀의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 모두와 회합된 연결 분자를 통해 리포좀에 부착되거나, 리포좀에 포획되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 중 현탁액으로서 함유되거나, 미셀에 함유 또는 이와 복합체화되거나, 달리 지질과 회합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 연관된 조성물은 용액 중 임의의 특정 구조에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중층 구조에서, 미셀로서 또는 "접힌(collapsed)" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액에 산재되어, 아마도 크기 또는 모양이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜 및 알데히드와 같은 장-쇄 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체를 함유하는 화합물의 종류뿐만 아니라 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 액적을 포함한다.

[0336] 사용하기에 적합한 지질은 상업적 공급원으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 Sigma, St. Louis, MO로부터 수득될 수 있고; 디세틸 포스페이트 ("DCP")는 K & K Laboratories (Plainview, NY)로부터 수득될 수 있고; 콜레스테롤 ("Choi")은 Calbiochem-Behring으로부터 수득될 수 있으며; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 기타 지질은 Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)로부터 수득될 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중 지질의 스톡 용액은 약 -20℃에서 저장될 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 보다 용이하게 증발되기 때문에 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 에워싸는 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다중라멜라 지질 비히클을 포괄하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것으로서 특징지어질 수 있다. 다중라멜라 리포솜은 수성 매질로 분리된 다중 지질 층을 갖는다. 이들은 인지질이 과량의 수용액에 현탁될 때 자발적으로 형성된다. 지질 구성요소는 폐쇄된 구조의 형성 전에 자가-재배열을 거치고, 지질 이중층 사이에 물 및 용해된 용질을 포획한다 (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10).

[0337] 그러나, 정상적인 소포 구조와 용액에서 상이한 구조를 갖는 조성물이 또한 포함된다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조를 가정하거나, 단순히 지질 분자의 불균일한 응집체로서 존재할 수 있다. 리포펙타민핵산 복합체가 또한 고려된다. 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 데 사용된 방법 또는 달리 본 발명의 억제제에 세포를 노출시키는 데 사용된 방법과 상관없이, 숙주 세포에서의 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해, 다양한 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정은 예를 들어, 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR과 같은 당업자에게 잘 알려진 "분자 생물학적" 검정; 예컨대, 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 발명의 범주 내에 속하는 약제를 식별하기 위한 본원에 기재된 검정에 의해 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것과 같은 "생화학적" 검정을 포함한다.

[0338] 본 발명은 CAR 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 일 양태에서, CAR 벡터는 세포, 예컨대, T 세포 내로 직접 형질도입될 수 있다. 일 양태에서, 벡터는 클로닝 또는 발현 벡터, 예컨대, 비제한적으로 하나 이상의 플라스미드 (예컨대, 발현 플라스미드, 클로닝 벡터, 미니서클, 미니벡터, 이중 미소 염색체), 레트로바

이러스 및 렌티바이러스 벡터 작제물을 포함하는 벡터이다. 일 양태에서, 벡터는 포유동물 T 세포에서 CAR 작제물을 발현할 수 있다. 일 양태에서, 포유동물 T 세포는 인간 T 세포이다.

[0339] 일부 양태에서, 비-바이러스 방법을 사용하여, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산을 세포 또는 조직 또는 대상체 내로 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-바이러스 방법은 트랜스포존 (또한 전위가능한 요소라고 함)의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 트랜스포존은 게놈의 위치에서 스스로를 삽입할 수 있는 DNA의 조각, 예를 들어, 자가-복제가 가능하고 이의 카피를 게놈 내로 삽입할 수 있는 DNA의 조각, 또는 더 긴 핵산에서 스플라이싱되고 게놈의 다른 위치 내로 삽입될 수 있는 DNA의 조각이다.

[0340] 추가적이고 예시적인 트랜스포존 및 비-바이러스 전달 방법은 2016 년 4 월 8 일에 출원된 국제 출원 WO 2016/164731의 페이지 196-198에 기재되어 있으며, 이는 이의 전체가 참조로 원용된다.

[0341] T 세포의 공급원

[0342] 예컨대, 본원에 기재된 CAR을 발현하기 위한 확장 및 유전자 변형 전에, 세포의 공급원, 예컨대, T 세포 또는 NK 세포는 대상체로부터 수득될 수 있다. 용어 "대상체"는 면역 반응을 이끌어 내 수 있는 살아있는 유기체 (예컨대, 포유류)를 포함하는 것으로 의도된다. 대상체의 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 랫트 및 이들의 트랜스제닉 종을 포함한다.

[0343] 실시양태에서, 면역 이펙터 세포 (예컨대, 면역 이펙터 세포의 집단), 예컨대, T 세포는 줄기 세포, 예컨대, 배아 줄기 세포 또는 전분화능 줄기 세포, 예컨대, 유도된 전분화능 줄기 세포 (iPSC)로부터 유래된다 (예컨대, 분화된다). 실시양태에서, 세포는 자가유래 또는 동종이계이다. 세포가 동종이계인 실시양태에서, 예컨대, 줄기 세포 (예컨대, iPSC)로부터 유래된 세포는 이들의 동종이계반응성을 감소시키도록 변형된다. 예를 들어, 세포는 예컨대, 이들의 T 세포 수용체를 변형함 (예컨대, 붕괴시킴)으로써 동종이계반응성을 감소시키도록 변형될 수 있다. 실시양태에서, 부위 특이적 뉴클레아제는 예컨대, T-세포 분화 후 T 세포 수용체를 붕괴시키는 데 사용될 수 있다. 다른 예에서, 세포, 예컨대, iPSC로부터 유래된 T 세포는 병원체-유래된 항원을 인식하기 때문에 이식편-대-숙주 질환을 유발할 가능성이 적은 바이러스-특이적 T 세포로부터 생성될 수 있다. 또 다른 예에서, 동종이계반응성은 공통 HLA 일배체형으로부터 iPSC를 생성함으로써 감소, 예컨대, 최소화될 수 있고, 그에 따라 이들은 매칭되고 관련이 없는 수량자 대상체와 조직적합가능하다.

[0344] 또 다른 예에서, 동종이계반응성은 유전자 변형을 통해 HLA 발현을 억압함으로써 감소, 예컨대, 최소화될 수 있다. 예를 들어, iPSC로부터 유래된 T 세포는 예컨대, 본원에 참조로 원용된 Themeli et al. Nat. Biotechnol. 31.10(2013):928-35에 기재된 바와 같이 가공될 수 있다. 일부 예에서, 면역 이펙터 세포, 예컨대, 줄기 세포로부터 유래된 T 세포는 본원에 참조로 원용된 WO2014/165707에 기재된 방법을 사용하여 가공/생성될 수 있다.

[0345] T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염의 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 본 개시내용의 특정 양태에서, 당업계에서 이용가능한 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 개시내용의 특정 양태에서, T 세포는 당업자에게 알려진 임의의 수의 기술, 예컨대, Ficoll™ 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액의 유닛으로부터 수득될 수 있다. 하나의 바람직한 양태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집술에 의해 수득된다. 성분채집 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함하는 림프구를 함유한다. 일 양태에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고 후속 가공 단계를 위해 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 넣기 위해 세척될 수 있다. 발명의 일 양태에서, 세포는 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)로 세척된다. 대안적인 양태에서, 세척 용액은 칼슘이 결여되어 있고, 마그네슘이 결여될 수 있거나 전부는 아니지만 많은 2가 양이온이 결여될 수 있다.

[0346] 칼슘의 부재 하에 초기 활성화 단계는 확대된 활성화로 이어질 수 있다. 당업자는 세척 단계가 제조업체의 지침에 따라 당업자에게 알려진 방법에 의해, 예컨대, 반-자동화된 "유동식" 원심분리기 (예를 들어, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter CytoMate 또는 Haemonetics Cell Saver 5)를 사용함으로써 달성될 수 있음을 용이하게 이해할 것이다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충액, 예컨대, 예를 들어, Ca-무함유, Mg-무함유 PBS, PlasmaLyte A, 또는 완충액이 있거나 없는 다른 식염수에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 성분채집 샘플의 바람직하지 않은 구성요소가 제거될 수 있고, 세포는 배양 배지에 직접 재현탁될 수 있다.

[0347] 적용의 방법은 5% 이하, 예를 들어, 2% 인간 AB 혈청을 포함하는 배양 배지 조건을 활용하고, 알려진 배양 배지 조건 및 조성물, 예를 들어, Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" Clinical & Translational

Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31에 기재된 것들을 이용할 수 있음이 인식된다.

[0348] 일 양태에서, T 세포는 예를 들어, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심분리 용출에 의해 적혈구를 용해시키고 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 단리된다. CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및 CD45RO+T 세포와 같은 T 세포의 특이적 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 단리될 수 있다. 예를 들어, 일 양태에서, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택에 충분한 기간 동안, 항-CD3/항-CD28 (예컨대, 3x28)-컨쥬게이션된 비드, 예컨대, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와 함께 항온처리함으로써 단리된다. 일 양태에서, 기간은 약 30 분이다. 추가 양태에서, 기간은 30 분 내지 36 시간 이상 및 그 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 추가 양태에서, 기간은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 시간 이상이다. 또 다른 바람직한 양태에서, 기간은 10 내지 24 시간이다. 일 양태에서, 항온처리 기간은 24 시간이다. 더 긴 항온처리 시간은 종양 조직 또는 면역손상된 개체로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)를 단리하는 것과 같이 다른 세포 유형에 비해 T 세포가 거의 없는 임의의 상황에서 T 세포를 단리하는 데 사용될 수 있다. 추가로, 더 긴 항온처리 시간의 사용은 CD8+ T 세포의 포착의 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 허용되는 시간을 단순히 단축하거나 길게 함으로써 및/또는 (본원에 추가로 기재된 바와 같은) T 세포에 대한 비드의 비율을 증가 또는 감소시킴으로써, T 세포의 하위집단은 배양 개시 시 또는 공정 동안의 다른 시점에 대해 또는 이에 대하여 우선적으로 선택될 수 있다. 추가적으로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비율을 증가시키거나 감소시킴으로써, T 세포의 하위집단은 배양 개시 시 또는 다른 원하는 시점에 대해 또는 이에 대하여 우선적으로 선택될 수 있다. 당업자는 본 발명의 맥락에서 다중 선택 라운드가 또한 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 특정 양태에서, 선택 절차를 수행하고 활성화 및 확장 공정에서 "선택되지 않은" 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "선택되지 않은" 세포가 또한 추가의 선택 라운드를 거칠 수 있다.

[0349] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 강화는 음성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합으로 달성될 수 있다. 한 가지 방법은 음성으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 단클론 항체의 칵테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유세포 분석법을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 강화시키기 위해, 단클론 항체 칵테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 양태에서, CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ 및 FoxP3+를 전형적으로 발현하는 조절 T 세포를 강화시키거나 양으로 선택하는 것이 바람직할 수 있다.

[0350] 대안적으로, 특정 양태에서, T 조절 세포는 항-C25 컨쥬게이션된 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다. 본원에 기재된 방법은, 예컨대, 본원에 기재된 예컨대, 음성 선택 기술을 사용하여, 예컨대, T 조절 세포-고갈된 집단, CD25+ 고갈된 세포인 면역 이펙터 세포, 예컨대, T 세포의 특이적 하위집단의 선택을 포함할 수 있다. 바람직하게는, T 조절 고갈된 세포의 집단은 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포를 함유한다.

[0351] 일 실시양태에서, T 조절 세포, 예컨대, CD25+ T 세포는 항-CD25 항체 또는 이의 단편, 또는 CD25-결합 리간드, IL-2를 사용하여 집단으로부터 제거된다. 일 실시양태에서, 항-CD25 항체, 또는 이의 단편, 또는 CD25-결합 리간드는 기질, 예컨대, 비드에 컨쥬게이션되거나, 그렇지 않으면 기질, 예컨대, 비드 상에 코팅된다. 일 실시양태에서, 항-CD25 항체 또는 이의 단편은 본원에 기재된 바와 같이 기질에 컨쥬게이션된다.

[0352] 일 실시양태에서, T 조절 세포, 예컨대, CD25+ T 세포는 Miltenyi™으로부터의 CD25 고갈 시약을 사용하여 집단으로부터 제거된다. 일 실시양태에서, 세포 대 CD25 고갈 시약의 비율은 1e7 개의 세포 대 20 uL, 또는 1e7 개의 세포 대 15 uL, 또는 1e7 개의 세포 대 10 uL, 또는 1e7 개의 세포 대 5 uL, 또는 1e7 개의 세포 대 2.5 uL, 또는 1e7 개의 세포 대 1.25 uL이다. 일 실시양태에서, 예컨대, T 조절 세포, 예컨대, CD25+ 고갈을 위해, 5억 개 초과의 세포/ml가 사용된다. 추가 양태에서, 6억, 7억, 8억 또는 9억 개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 일 실시양태에서, 고갈될 면역 이펙터 세포의 집단은 약 6 x 109 개의 CD25+ T 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 고갈될 면역 이펙터 세포의 집단은 약 1 x 109 내지 1 x 10 10 개의 CD25+ T 세포, 및 그 사이의 임의의 정수 값을 포함한다. 일 실시양태에서, 생성된 집단의 T 조절 고갈된 세포는 2 x 109 개 이하의 T 조절 세포, 예컨대, CD25+ 세포 (예컨대, 1 x 109, 5 x 108, 1 x 108, 5 x 107, 또는 1 x 107 이하의 CD25+ 세포)를 갖는다.

[0353] 일 실시양태에서, T 조절 세포, 예컨대, CD25+ 세포는 예컨대, 튜빙 162-01과 같은 고갈 튜빙 세트와 함께 CliniMAC 시스템을 사용하여 집단으로부터 제거된다. 일 실시양태에서, CliniMAC 시스템은 예컨대, DEPLETION2.1과 같은 고갈 설정에서 실행된다.

[0354] 특정 이론에 얽매이지 않고, 성분채집술 전 또는 CAR-발현 세포 생성물의 제조 동안 대상체에서 면역 세포의 음

성 조절자의 수준을 감소시키는 것 (예컨대, 원치 않는 면역 세포, 예컨대, TREG 세포의 수를 감소시키는 것)은 대상체 재발의 위험을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, TREG 세포를 고갈시키는 방법은 당업계에 알려져 있다. TREG 세포를 감소시키는 방법은 사이클로포스파미드, 항-GITR 항체 (본원에 기재된 항-GITR 항체), CD25-고갈 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0355] 일부 실시양태에서, 제조 방법은 CAR-발현 세포의 제조 전에 TREG 세포의 수를 감소시키는 단계 (예컨대, 고갈시키는 단계)를 포함한다. 예를 들어, 제조 방법은 샘플, 예컨대, 성분채집 샘플을 항-GITR 항체 및/또는 항-CD25 항체 (또는 이의 단편, 또는 CD25-결합 리간드)와 접촉시켜, 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, T 세포, NK 세포) 생성물의 제조 전에 TREG 세포를 고갈시키는 단계를 포함한다.

[0356] 실시양태에서, 대상체는 CAR-발현 세포 생성물 제조를 위한 세포의 수집 전에 TREG 세포를 감소시키는 하나 이상의 요법으로 전-처리되어, 대상체가 CAR-발현 세포 치료로 재발할 위험을 감소시킨다. 실시양태에서, TREG 세포를 감소시키는 방법은 사이클로포스파미드, 항-GITR 항체, CD25-고갈 또는 이들의 조합 중 하나 이상의 대상체에 대한 투여를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 사이클로포스파미드, 항-GITR 항체, CD25-고갈 또는 이들의 조합 중 하나 이상의 투여는 CAR발현 세포 생성물의 주입 전, 주입 동안 또는 주입 후에 발생할 수 있다.

[0357] 실시양태에서, 대상체는 CAR-발현 세포 생성물 제조를 위한 세포의 수집 전에 사이클로포스파미드로 전-처리되어, 대상체가 CAR-발현 세포 치료로 재발할 위험을 감소시킨다. 실시양태에서, 대상체는 CAR-발현 세포 생성물 제조를 위한 세포의 수집 전에 항-GITR 항체로 전-처리되어, 대상체가 CAR-발현 세포 치료로 재발할 위험을 감소시킨다.

[0358] 일 실시양태에서, 제거될 세포의 집단은 조절 T 세포도 종양 세포도 아니라, 달리 CART 세포의 확장 및/또는 기능에 부정적인 영향을 미치는 세포, 예컨대, CD14, CD11b, CD33, CD15, 또는 잠재적으로 면역 억압 세포에 의해 발현되는 다른 마커를 발현하는 세포이다. 일 실시양태에서, 이러한 세포는 조절 T 세포 및/또는 종양 세포와 병행하여, 또는 상기 고갈 후에 또는 다른 순서로 제거되는 것으로 구상된다.

[0359] 본원에 기재된 방법은 하나 초과의 선택 단계, 예컨대, 하나 초과의 고갈 단계를 포함할 수 있다. 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 강화는 예컨대, 음성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대해 지시된 항체의 조합으로 달성될 수 있다. 한 가지 방법은 음성으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 지시된 단클론 항체의 칵테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유세포 분석법을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 강화시키 위해, 단클론 항체 칵테일은 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함할 수 있다.

[0360] 본원에 기재된 방법은 종양 항원, 예컨대, CD25를 포함하지 않는 종양 항원, 예컨대, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 또는 CD11b를 발현하는 집단으로부터 세포를 제거하여, CAR, 예컨대, 본원에 기재된 CAR의 발현에 적합한 T 조절 고갈된, 예컨대, CD25+ 고갈된 및 종양 항원 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 종양 항원 발현 세포는 T 조절, 예컨대, CD25+ 세포와 동시에 제거된다. 예를 들어, 항-CD25 항체 또는 이의 단편, 및 항-종양 항원 항체 또는 이의 단편은 세포를 제거하는 데 사용될 수 있는 동일한 기질, 예컨대, 비드에 부착될 수 있거나, 항-CD25 항체 또는 이의 단편, 또는 항-종양 항원 항체 또는 이의 단편은 별도의 비드에 부착될 수 있으며, 이들의 혼합물은 세포를 제거하는 데 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, T 조절 세포, 예컨대, CD25+ 세포의 제거 및 종양 항원 발현 세포의 제거는 순차적이고, 예컨대, 어느 순서로든 발생할 수 있다.

[0361] 또한, 체크 포인트 억제제, 예컨대, 본원에 기재된 체크 포인트 억제제를 발현하는 집단으로부터의 세포, 예컨대, PD1+ 세포, FAG3+ 세포 및 TIM3+ 세포 중 하나 이상을 제거하여, T 조절 고갈된, 예컨대, CD25+ 고갈된 세포 및 체크 포인트 억제제 고갈된 세포, 예컨대, PD1+, FAG3+ 및/또는 TIM3+ 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 예시적인 체크 포인트 억제제는 B7-H1, B7-1, CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM (예컨대, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM 5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA 및 LAIR1을 포함한다. 일 실시양태에서, 체크 포인트 억제제 발현 세포는 T 조절, 예컨대, CD25+ 세포와 동시에 제거된다. 예를 들어, 항-CD25 항체 또는 이의 단편, 및 항-체크 포인트 억제제 항체 또는 이의 단편은 세포를 제거하는 데 사용될 수 있는 동일한 비드에 부착될 수 있거나, 항-CD25 항체 또는 이의 단편, 및 항-체크 포인트 억제제 항체 또는 이들 단편은 별도의 비드에 부착될 수 있으며, 이들의 혼합물은 세포를 제거하는 데 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, T 조절 세포, 예컨대, CD25+ 세포의 제거 및 체크 포인트 억제제 발현 세포의 제거는 순차적이고, 예컨대, 어느 순서로든 발생할 수 있다.

[0362] 일 실시양태에서, IFN-g, TNFa, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, 그랜자임 B 및 퍼포린, 또는 다른 적절한 분자, 예컨대, 다른 사이토카인 중 하나 이상을 발현하는 T 세포 집단이 선택될 수 있다. 세포 발현에 대한 스크리닝 방법은 예컨대, PCT 공개공보 번호: WO 2013/126712에 기재된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0363] 양성 또는 음성 선택에 의한 원하는 세포 집단의 단리를 위해, 세포 및 표면 (예컨대, 입자, 예컨대, 비드)의 농도는 다양할 수 있다. 특정 양태에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해, 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 것 (예컨대, 세포의 농도를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일 양태에서, 20억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 일 양태에서, 10억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가 양태에서, 1억개 초과의 세포/ml가 사용된다. 추가 양태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 5천만 개의 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 일 양태에서, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 1억 개의 세포/ml로부터의 세포 농도가 사용된다. 추가 양태에서, 1억 2500만 또는 1억 5000만 개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다.

[0364] 고 농도를 사용하는 것은 증가된 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장을 초래할 수 있다. 추가로, 높은 세포 농도의 사용은 관심 있는 표적 항원, 예컨대, CD28-음성 T 세포를 약하게 발현할 수 있는 세포 또는 많은 종양 세포가 존재하는 샘플 (예컨대, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터의 세포의 보다 효율적인 포착을 허용한다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고, 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고 농도의 세포를 사용하는 것은 일반적으로 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T 세포의 보다 효율적인 선택을 허용한다.

[0365] 관련된 양태에서, 더 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포 및 표면 (예컨대, 입자, 예컨대, 비드)의 혼합물을 유의하게 희석함으로써, 입자 및 세포 간의 상호작용이 최소화된다. 이는 입자에 결합될 원하는 항원을 다량으로 발현하는 세포를 선택한다. 예를 들어, CD4+ T 세포는 더 높은 수준의 CD28을 발현하고, 희석 농도에서 CD8+ T 세포보다 보다 효율적으로 포착된다.

[0366] 일 양태에서, 사용되는 세포의 농도는 5 X 10e6/ml이다. 다른 양태에서, 사용되는 농도는 약 1 X 105/ml 내지 1 X 106/ml, 및 그 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.

[0367] 다른 양태에서, 세포는 2-10℃ 또는 실온에서 다양한 속도로 다양한 길이의 시간 동안 회전기에서 항온처리될 수 있다. 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후에 냉동될 수 있다. 이론에 얽매이지 않기를 바라며, 냉동 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도의 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포를 냉동 용액에 현탁할 수 있다. 많은 냉동 용액 및 매개변수가 당업계에 알려져 있고 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 한 가지 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10% 덱스트란 40 및 5% 덱스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO 또는 31.25% Plasmalyte-A, 31.25% 덱스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 덱스트란 40 및 5% 덱스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO를 함유하는 배양 배지, 또는 예를 들어, Hespan 및 PlasmaLyte A를 함유하는 기타 적합한 세포 냉동 배지를 사용하는 단계를 포함하며, 이어서 세포는 분당 1° 의 속도로 -80℃로 냉동되고 액체 질소 저장 탱크의 증기 상태로 저장된다. -20℃에서 또는 액체 질소에서 즉시 제어되지 않은 냉동뿐만 아니라 제어된 냉동의 다른 방법이 사용될 수 있다.

[0368] 특정 양태에서, 동결보존된 세포는 본원에 기재된 바와 같이 해동되고 세척되며, 본 개시내용의 방법을 사용하여 활성화하기 전에 실온에서 1 시간 동안 휴지되도록 한다.

[0369] 또한 발명의 맥락에서 본원에 기재된 바와 같은 확장된 세포가 필요할 수 있는 시기 이전의 기간에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집 생성물의 수집이 고려된다. 이와 같이, 확장될 세포의 공급원은 필요한 임의의 시점에 수집될 수 있으며, 원하는 세포, 예컨대, T 세포는 본원에 기재된 것들과 같은 T 세포 요법로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 수의 질환 또는 병태에 대한 T 세포 요법에서 나중에 사용하기 위해 단리 및 냉동된다.

[0370] 일 양태에서 혈액 샘플 또는 성분채집술은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취된다. 특정 양태에서, 질환이 발달할 위험이 있지만 아직 질환이 발달하지 않은 일반적으로 건강한 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집술을 취하고, 관심 있는 세포를 단리하고 나중에 사용하기 위해 냉동하였다. 특정 양태에서, T 세포는 확장되고, 냉동되고, 나중에 사용될 수 있다. 특정 양태에서, 샘플은 본원에 기재된 바와 같은 특정 질환의 진단 직후 그러나 임의의 치료 전에 환자로부터 수집된다.

[0371] 추가 양태에서, 세포는 약제, 예컨대, 나탈리주맙, 에팔리주맙, 항바이러스제, 화학요법, 방사선, 면역억압제, 예컨대, 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트 및 FK506, 항체 또는 기타 면역절제제, 예컨대, CAMPATH, 항-CD3 항체, 싸이톡산, 플루다라빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코

페놀산, 스테로이드, FR901228, 및 조사를 이용한 치료를 비제한적으로 포함하는 임의의 수의 관련된 치료 방식에 앞서 대상체로부터의 혈액 샘플 또는 성분채집술로부터 단리된다.

[0372] 본 개시내용의 추가 양태에서, T 세포는 대상체에 기능적 T 세포를 남기는 치료 직후에 환자로부터 수득된다. 이와 관련하여, 특정 암 치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물을 이용한 치료 후 환자가 정상적으로 치료로부터 회복되는 기간 동안 치료 직후에, 수득된 T 세포의 품질이 엑스 비보에서 확장하는 능력에 대해 최적이거나 개선될 수 있다는 것이 관찰되었다.

[0373] 마찬가지로, 본원에 기재된 방법을 사용한 엑스 비보 조작 후, 이들 세포는 향상된 생착 및 생체내 확장을 위한 바람직한 상태에 있을 수 있다. 따라서, 이 회복 단계 동안, T 세포, 수지상 세포, 또는 조혈 계통의 다른 세포를 포함하는 혈액 세포를 수집하는 것이 본 개시내용의 맥락 내에서 고려된다. 추가로, 특정 양태에서, 동원(예를 들어, GM-CSF를 이용한 동원) 및 컨디셔닝 양생법은 특히 요법 후 정의된 시간의 윈도우 동안에, 특정 세포 유형의 재증식, 재순환, 재생 및/또는 확장이 선호되는 대상체에서의 조건을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형은 T 세포, B 세포, 수지상 세포 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.

[0374] 일부 실시양태에서, T 세포 집단은 디아글리세롤 키나제 (DGK)-결핍이다. DGK 결핍 세포는 DGK RNA 또는 단백질을 발현하지 않거나 감소된 또는 억제된 DGK 활성을 갖는 세포를 포함한다. DGK-결핍 세포는 DGK 발현을 감소시키거나 방지하기 위해 예컨대, RNA-간섭제, 예컨대, siRNA, shRNA, miRNA를 투여하는 유전적 접근법에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, DGK-결핍 세포는 본원에 기재된 DGK 억제제를 이용한 처리에 의해 생성될 수 있다.

[0375] 일 실시양태에서, T 세포 집단은 이카로스-결핍이다. 이카로스-결핍 세포는 이카로스 RNA 또는 단백질을 발현하지 않거나 감소된 또는 억제된 이카로스 활성을 갖는 세포를 포함하며, 이카로스-결핍 세포는 이카로스 발현을 감소시키거나 방지하기 위해 예컨대, RNA간섭제, 예컨대, siRNA, shRNA, miRNA를 투여하는 유전적 접근법에 의해 생성될 수 있다.

[0376] 대안적으로, 이카로스-결핍 세포는 이카로스 억제제, 예컨대, 레날리도마이드를 이용한 처리에 의해 생성될 수 있다. 실시양태에서, T 세포 집단은 DGK-결핍 및 이카로스-결핍이고, 예컨대, DGK 및 이카로스를 발현하지 않거나 감소된 또는 억제된 DGK 및 이카로스 활성을 갖는다. 이러한 DGK 및 이카로스-결핍 세포는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 의해 생성될 수 있다. 실시양태에서, NK 세포는 대상체로부터 수득된다. 다른 실시양태에서, NK 세포는 NK 세포주, 예컨대, NK-92 세포주 (Conkwest)이다.

[0377] 동종이계 CAR 면역 이펙터 세포

[0378] 본원에 기재된 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 동종이계 면역 이펙터 세포, 예컨대, T 세포 또는 NK 세포일 수 있다. 예를 들어, 세포는 동종이계 T 세포, 예컨대, 기능적 T 세포 수용체 (TCR) 및/또는 인간 백혈구 항원 (HLA), 예컨대, HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II의 발현이 결여된 동종이계 T 세포일 수 있다.

[0379] 기능적 TCR이 결여된 T 세포는, 예컨대, 이의 표면 상에 임의의 기능적 TCR을 발현하지 않도록 조작되거나, 기능적 TCR을 포함하는 하나 이상의 서브유닛을 발현하지 않도록 조작되거나, 이의 표면 상에 매우 적은 기능적 TCR을 생산하도록 조작될 수 있다. 대안적으로, T 세포는 예컨대, TCR의 서브유닛 중 하나 이상의 돌연변이된 또는 절삭된 형태의 발현에 의해 실질적으로 손상된 TCR을 발현할 수 있다. 용어 "실질적으로 손상된 TCR"은 이 TCR이 숙주에서 불리한 면역 반응을 이끌어 내지 않을 것임을 의미한다.

[0380] 본원에 기재된 T 세포는 예컨대, 이의 표면 상의 기능적 HLA를 발현하지 않도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 T 세포는 세포 표면 발현 HLA, 예컨대, HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II가 하향조절되도록 조작될 수 있다.

[0381] 일부 실시양태에서, T 세포는 기능적 TCR 및 기능적 HLA, 예컨대, HLA 클래스 I 및/또는 HLA 클래스 II가 결여될 수 있다. 기능적 TCR 및/또는 HLA의 발현이 결여된 변형된 T 세포는 TCR 또는 HLA의 하나 이상의 서브유닛의 녹아웃 또는 녹다운을 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 siRNA, shRNA, 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복부 (CRISPR) 전사활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN) 또는 징크 핑거 엔도뉴클레아제 (ZFN)를 사용하여 TCR 및/또는 HLA의 녹다운을 포함할 수 있다.

[0382] 일부 실시양태에서, 동종이계 세포는 예컨대, 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 억제 분자를 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현하는 세포일 수 있다. 예를 들어, 세포는 예컨대, 면역 이펙터 반응을 시작하는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있는 억제 분자를 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현하는 세포일 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3

(CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, GAL9 및 아데노신을 포함한다. 예컨대, DNA, RNA 또는 단백질 수준에서의 억제에 의한 억제 분자의 억제는 CAR-발현 세포 성능을 최적화할 수 있다. 실시양태에서, 예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 억제 핵산, 예컨대, 억제 핵산, 예컨대, dsRNA, 예컨대, siRNA 또는 shRNA, 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복부 (CRISPR), 전사-활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 또는 징크 핑거 엔도뉴클레아제 (ZFN)가 사용될 수 있다.

[0383] TCR 또는 HLA를 억제하는 siRNA 및 shRNA

[0384] 일부 실시양태에서, TCR 발현 및/또는 HLA 발현은 세포, 예컨대, T 세포에서 TCR 및/또는 HLA를 코딩하는 핵산, 및/또는 억제 분자 (예컨대, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예컨대, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, GAL9 및 아데노신)를 표적화하는 siRNA 또는 shRNA를 사용하여 억제될 수 있다.

[0385] siRNA 및 shRNA, 및 예시적인 shRNA에 대한 발현 시스템은 예컨대, 그 전체가 참조로 원용되는 2015 년 3 월 13 일자로 출원된 국제 공개공보 WO2015/142675의 단락 649 및 650에 기재되어 있다.

[0386] TCR 또는 HLA를 억제하는 CRISPR

[0387] 본원에 사용된 바와 같은 "CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하기 위한 CRISPR"은 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복부의 세트, 또는 이러한 반복부의 세트를 포함하는 시스템을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "Cas"는 CRISPR-회합된 단백질을 지칭한다.

[0388] "CRISPR/Cas" 시스템은 세포, 예컨대, T 세포에서 TCR 및/또는 HLA 유전자 및/또는 억제 분자 (예컨대, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예컨대, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, GAL9 및 아데노신)를 침묵시키거나 돌연변이시키는 데 사용될 수 있는 CRISPR 및 CAS로부터 유래된 시스템을 지칭한다. CRISPR/Cas 시스템 및 이의 용도는 예컨대, 그 전체가 참조로 원용되는 2015 년 3 월 13 일자로 출원된 국제 공개공보 WO2015/142675의 단락 651-658에 기재되어 있다.

[0389] TCR 및/또는 HLA를 억제하는 TALEN

[0390] "TALEN" 또는 "HLA 및/또는 TCR에 대한 TALEN" 또는 "HLA 및/또는 TCR을 억제하는 TALEN"은 세포, 예컨대, T 세포에서 HLA 및/또는 TCR 유전자, 및/또는 억제 분자 (예컨대, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예컨대, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, GAL9 및 아데노신)를 편집하는 데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제를 지칭한다.

[0391] TALEN 및 이의 용도는 예컨대, 그 전체가 참조로 원용되는 2015 년 3 월 13 일자로 출원된 국제 공개공보 WO2015/142675의 단락 659-665에 기재되어 있다.

[0392] HLA 및/또는 TCR을 억제하는 징크 핑거 뉴클레아제

[0393] "ZFN" 또는 "징크 핑거 뉴클레아제" 또는 "HLA 및/또는 TCR에 대한 ZFN" 또는 "HLA 및/또는 TCR을 억제하는 ZFN"은 세포, 예컨대, T 세포에서 HLA 및/또는 TCR 유전자, 및/또는 억제 분자 (예컨대, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예컨대, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, GAL9, 및 아데노신)를 편집하는 데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 징크 핑거 뉴클레아제를 지칭한다.

[0394] ZFN 및 이의 용도는 예컨대, 그 전체가 참조로 원용되는 2015 년 3 월 13 일자로 출원된 국제 공개공보 WO2015/142675의 단락 666-671에 기재되어 있다.

[0395] 텔로머라제 발현

[0396] 어떤 특정한 이론에 얽매이기를 바라지는 않지만, 일부 실시양태에서, 치료적 T 세포는 T 세포에서 단축된 텔로미어로 인해 환자에서 단기 지속성을 가지며; 따라서, 텔로머라제 유전자로의 형질주입은 T 세포의 텔로미어를 길게 만들 수 있고 환자에서 T 세포의 지속성을 개선시킬 수 있다. Carl June, "Adoptive T cell therapy for

cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007) 참고. 따라서, 실시양태에서, 면역 이펙터 세포, 예컨대, T 세포는 텔로머라제 서브유닛, 예컨대, 텔로머라제의 촉매적 서브유닛, 예컨대, TERT, 예컨대, hTERT를 이소적으로 발현한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 텔로머라제 서브유닛, 예컨대, 텔로머라제의 촉매적 서브유닛, 예컨대, TERT, 예컨대, hTERT를 코딩하는 핵산과 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, CAR-발현 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 세포는 CAR을 코딩하는 작제물과 접촉하기 전, 접촉과 동시에 또는 접촉 후에 핵산과 접촉될 수 있다.

[0397] 일 양태에서, 개시내용은 면역 이펙터 세포 (예컨대, T 세포, NK 세포)의 집단을 만드는 방법을 특징으로 한다. 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포 (예컨대, T 세포 또는 NK 세포)의 집단을 제공하고, 면역 이펙터 세포의 집단을 CAR을 코딩하는 핵산과 접촉시키는 단계; 및 CAR 및 텔로머라제 발현을 허용하는 조건 하에서 면역 이펙터 세포의 집단을 텔로머라제 서브유닛, 예컨대, hTERT를 코딩하는 핵산과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0398] 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 핵산은 DNA이다. 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 핵산은 텔로머라제 서브유닛 AAC5 1724.1의 발현을 구동할 수 있는 프로모터를 포함한다 (Meyerson et ah, "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795).

[0399] **치료의 방법**

[0400] 본 발명은 대상체에 항-GCC 항원 결합 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항-GCC CAR 및 항원 결합 분자는 포유류에서 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 실시양태는 포유류에서 암을 치료 또는 예방하는 데 효과적인 양으로 CAR, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 항체 및/또는 이의 항원 결합 부분, 및/또는 약학 조성물을 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 발명은 또한 질환의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항원 결합 분자 (예컨대, sdAb 또는 CAR)에 관한 것이다. 발명은 또한 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항원 결합 분자 (예컨대, sdAb 또는 CAR)에 관한 것이다. 발명은 또한 암의 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항원 결합 분자 (예컨대, sdAb 또는 CAR)에 관한 것이다.

[0401] 본원에 기재된 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 착상 또는 이식을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 동맥경유, 피하, 피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내 (i.v.) 주사 또는 복강내로 환자에 투여될 수 있다. 일 실시양태에서, 예컨대, CAR-발현 세포를 포함하는 본원에 기재된 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에 투여된다. 일 실시양태에서, 예컨대, CAR-발현 세포를 포함하는 본원에 기재된 조성물은 i.v. 주사에 의해 투여된다. 예컨대, CAR-발현 세포를 포함하는 본원에 기재된 조성물은 종양, 림프절 또는 감염의 부위에 직접 주사될 수 있다.

[0402] 일반적으로 본원에 기재된 면역 이펙터 세포를 포함하는 약학 조성물은 이들 범위 내의 모든 정수 값을 포함하여, 104 내지 109 개의 세포/체중 kg, 일부 경우에는 105 내지 106 개의 세포/체중 kg의 투여량으로 투여될 수 있다고 언급할 수 있다. 면역 이펙터 세포 조성물은 또한 이러한 투여량으로 다중 회 투여될 수 있다. 면역요법에서 통상적으로 알려진 주입 기술을 사용함으로써 세포가 투여될 수 있다 (예컨대, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988 참고).

[0403] 특정 양태에서, 대상체에 활성화된 면역 이펙터 세포를 투여한 다음, 후속적으로 혈액을 재채취고 (또는 성분채집술을 수행하고), 본 발명에 따라 그로부터 세포를 활성화하고, 이들 활성화된 및 확장된 세포를 환자에 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이 공정은 몇 주마다 다중 회 수행될 수 있다. 특정 양태에서, 세포는 10cc 내지 400cc의 채혈로부터 활성화될 수 있다. 특정 양태에서, 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc 또는 100cc의 채혈로부터 활성화된다.

[0404] 일부 실시양태에서, 항-GCC CAR은 공여자 세포 상에 발현된다. 일부 실시양태에서, T 세포 요법에 사용하기 위한 공여자 T 세포는 (예컨대, 자가유래 T 세포 요법을 위한) 환자로부터 수득된다. 다른 실시양태에서, T 세포 요법에 사용하기 위한 공여자 T 세포는 환자가 아닌 대상체로부터 수득된다 (예컨대, 동종이계 T 세포 요법). CAR+ T 세포는 치료적 유효량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, T 세포의 치료적 유효량은 약 10^4 개 이상의 세포, 약 10^5개 이상의 세포, 약 10^6개 이상의 세포, 약 10^7개 이상의 세포, 약 10^8개 이상의 세포, 약 10^9개 이상, 또는 약 10^{10} 이상일 수 있다.

[0405] 일부 실시양태에서, T 세포의 치료적 유효량은 약 10^4 개의 세포, 약 10^5 개의 세포, 약 10^6 개의 세포, 약 10^7 개의 세포, 또는 약 10^8 개의 세포이다. 일부 실시양태에서, CAR T 세포의 치료적 유효량은 약 2 X 10^6 개의 세포/kg, 약 3 X 10^6 개의 세포/kg, 약 4 X 10^6 개의 세포/kg, 약 5 X 10^6 개의 세포/kg, 약 6 X 10^6 개의 세포/kg, 약 7 X 10^6 개의 세포/kg, 약 8 X 10^6 개의 세포/kg, 약 9 X 10^6 개의 세포/kg, 약 1 X 10^7 개의 세포/kg, 약 2 X 10^7 개의 세포/kg, 약 3 X 10^7 개의 세포/kg, 약 4 X 10^7 개의 세포/kg, 약 5 X 10^7 개의 세포/kg, 약 6 X 10^7 개의 세포/kg, 약 7 X 10^7 개의 세포/kg, 약 8 X 10^7 개의 세포/kg, 또는 약 9 X 10^7 개의 세포/kg이다. 일부 실시양태에서, CAR-양성 생존가능한 T 세포의 치료적 유효량은 체중 kg당 약 1 X 10^6 내지 약 2 X 10^6 개의 CAR-양성 생존가능한 T 세포에서 약 1 x 10^8 개의 최대 용량의 CAR-양성 생존가능한 T 세포까지이다

[0406] 일부 실시양태에서, CAR-양성 생존가능한 T 세포의 치료적 유효량은 약 0.25 X 10^6 내지 2 X 10^6개이다. 일부 실시양태에서, CAR-양성 생존가능한 T 세포의 치료적 유효량은 약 0.25 x 10^6, 0.3 x 10^6, 0.4 x 10^6, 약 0.5 x 10^6, 약 0.6 x 10^6, 약 0.7 x 10^6, 약 0.8 x 10^6, 약 0.9 x 10^6, 약 1.0 x 10^6, 약 1.1 x 10^6, 약 1.2 x 10^6, 약 1.3 x 10^6, 약 1.4 x 10^6, 약 1.5 x 10^6, 약 1.6 x 10^6, 약 1.7 x 10^6, 약 1.8 x 10^6, 약 1.9 x 10^6, 또는 약 2.0 x 10^6 개의 CAR-양성 생존가능한 T 세포이다.

[0407] 일부 실시양태에서, CAR-양성 생존가능한 T 세포의 치료적 유효량은 약 0.4 x 10^8 내지 약 2 x 10^8 개의 CAR-양성 생존가능한 T 세포이다. 일부 실시양태에서, CAR-양성 생존가능한 T 세포의 치료적 유효량은 약 0.4 x 10^8, 약 0.5 x 10^8, 약 0.6 x 10^8, 약 0.7 x 10^8, 약 0.8 x 10^8, 약 0.9 x 10^8, 약 1.0 x 10^8, 약 1.1 x 10^8, 약 1.2 x 10^8, 약 1.3 x 10^8, 약 1.4 x 10^8, 약 1.5 x 10^8, 약 1.6 x 10^8, 약 1.7 x 10^8, 약 1.8 x 10^8, 약 1.9 x 10^8, 또는 약 2.0 x 10^8 개의 CAR-양성 생존가능한 T 세포이다.

[0408] 일부 실시양태에서, CAR-발현 세포 (예컨대, 본원에 기재된 CAR-발현 세포, 예컨대, 본원에 기재된 GCC CAR-발현 세포)의 용량은 약 1 x 106 개의 세포/m2 내지 약 1 x 109 개의 세포/m2, 예컨대, 약 1 x 107 개의 세포/m2 내지 약 5 x 108 개의 세포/m2, 예컨대, 약 1.5 x 107 개의 세포/m2, 약 2 x 107 개의 세포/m2, 약 4.5 x 107 개의 세포/m2, 약 108 개의 세포/m2, 약 1.2 x 108 개의 세포/m2, 또는 약 2 x 108 개의 세포/m2을 포함한다.

[0409] 개시내용은 (특히) T 세포가 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형되고 CAR T 세포가 이를 필요로 하는 수령자에 주입되는 세포 요법의 유형을 포함한다. 주입된 세포는 수령자의 종양 세포를 살해시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR-변형된 T 세포는 생체내에서 복제할 수 있어, 지속적인 종양 제어로 이어질 수 있는 장기 지속성을 초래한다. 다양한 양태에서, 환자에 투여된 T 세포는 환자에 T 세포의 투여 후 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월, 12 개월, 13 개월, 14 개월, 15 개월, 16 개월, 17 개월, 18 개월, 19 개월, 20 개월, 21 개월, 22 개월, 23 개월, 2 년, 3 년, 4 년 또는 5 년 이상 동안 환자에서 지속된다.

[0410] 일부 실시양태에서, GCC CAR-발현 세포는 복수의 용량, 예컨대, 제1 용량, 제2 용량 및 임의로 제3 용량으로 투여된다. 실시양태에서, 방법은 암 (예컨대, 결장직장암)을 갖는 대상체 (예컨대, 성인 대상체)를 치료하는 단계를 포함하며, 이는 제1 용량, 제2 용량 및 임의로 하나 이상의 추가적인 용량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 각각의 용량은 CAR 분자, 예컨대, GCC CAR 분자, 예컨대, 표 7에 제공된 CAR 분자를 발현하는 면역 이펙터 세포를 포함한다.

[0411] 일부 실시양태에서, 방법은 2-5x10^6 개의 생존가능한 CAR발현 세포/kg의 용량을 투여하는 단계이되, 여기서 대상체는 50 kg 미만의 체질량을 갖는, 단계를 포함하거나; 1.0 - 2.5 x10^8 개의 생존가능한 CAR-발현 세포의 용량을 투여하는 단계이되, 여기서 대상체는 50 kg 이상의 체질량을 갖는, 단계를 포함한다.

[0412] 실시양태에서, 대상체, 예컨대, 소아 또는 성인 대상체에 단일 용량이 투여된다.

[0413] 실시양태에서, 용량은 순차적인 날에 투여되며, 예컨대, 제1 용량은 1 일차에 투여되고, 제2 용량은 2 일차에

투여되고, 임의로 제3 용량 (투여되는 경우)은 3 일차에 투여된다.

[0414] 실시양태에서, 제4, 제5 또는 제6 용량 또는 그 초과의 용량이 투여된다.

[0415] 실시양태에서, 제1 용량은 총 용량의 약 10%를 포함하고, 제2 용량은 총 용량의 약 30%를 포함하고, 제3 용량은 총 용량의 약 60%를 포함하며, 여기서 전술한 백분율은 100%의 합계를 갖는다. 실시양태에서, 제1 용량은 총 용량의 약 9-11%, 8-12%, 7-13% 또는 5-15%를 포함한다. 실시양태에서, 제2 용량은 총 용량의 약 29-31%, 28-32%, 27-33%, 26-34%, 25-35%, 24-36%, 23-37%, 22-38%, 21-39% 또는 20-40%를 포함한다. 실시양태에서, 제3 용량은 총 용량의 약 55-65%, 50-70%, 45-75%, 또는 40-80%를 포함한다. 실시양태에서, 총 용량은 1 주, 2 주, 3 주 또는 4 주의 과정에 걸쳐 투여된 생존가능한 CAR-발현 세포의 총 수를 지칭한다. 2 회 용량이 투여되는 일부 실시양태에서, 총 용량은 제1 용량 및 제2 용량으로 대상체에 투여된 생존가능한 CAR-발현 세포의 수의 합을 지칭한다. 3 회 용량이 투여되는 일부 실시양태에서, 총 용량은 제1, 제2 및 제3 용량으로 대상체에 투여된 생존가능한 CAR-발현 세포의 수의 합계를 지칭한다.

[0416] 실시양태에서, 용량은 그 안의 생존가능한 CAR-발현 세포의 수에 따라 측정된다. CAR 발현은 예컨대, CAR 분자 및 검출가능한 표지에 결합하는 항체 분자를 사용하는 유세포 분석법에 의해 측정될 수 있다. 생존력은 예컨대, Cellometer에 의해 측정될 수 있다.

[0417] 발명은 또한 면역 이펙터 세포, 예컨대, NK 세포 또는 T 세포가 예컨대, 생체외 전사된 RNA에 의해 변형되어, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 일시적으로 발현하고 CAR-발현 (예컨대, CART) 세포가 이를 필요로 하는 수령자에 주입되는 세포 요법의 유형을 포함한다. 주입된 세포는 수령자의 암 세포를 살해시킬 수 있다. 따라서, 다양한 양태에서, 환자에 투여된 CAR-발현 세포, 예컨대, T 세포는 환자에 CAR 발현 세포, 예컨대, T 세포의 1 개월 미만, 예컨대, 3 주, 2 주, 1 주 동안 존재한다.

[0418] 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, CAR-변형된 T 세포에 의해 이끌어낸 항-암 면역 반응은 능동 또는 수동 면역 반응일 수 있거나, 대안적으로 직접 대 간접 면역 반응으로 인한 것일 수 있다. 일 양태에서, CAR (예컨대, GCC-CAR) 형질도입된 T 세포는 표적 항원 (예컨대, GCC)을 발현하는 인간 암 세포에 반응하여 특이적인 전염증성 사이토카인 분비 및 강력한 세포용해 활성을 나타내고, 가용성 표적 항원 억제에 저지하고, 방관자 살해를 매개하고, 확립된 인간 암의 퇴행을 매개한다. 예를 들어, 표적 항원-발현 암의 이질적 분야 내의 항원-없는 암 세포는 사전에 인접한 항원-양성 암 세포에 대해 반응한 표적 항원-재지시된 T 세포에 의해 간접적인 파괴에 감수성일 수 있다.

[0419] 일 양태에서, 개시내용은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 방법은 대상체에서 암이 치료되도록 CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포)를 투여하는 단계를 포함하는 요법을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포)의 요법은 CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포)의 개선된 또는 증가된 항-종양 활성; CAR-발현 세포의 증가된 증식 또는 지속성; CAR-발현 세포의 개선된 또는 증가된 침윤; 종양 진행의 개선된 억제; 종양 진행의 지연; 암 세포 증식의 억제 또는 감소; 및/또는 종양 부담, 예컨대, 종양 부피 또는 크기의 감소 중 하나 이상을 초래한다. 일 실시양태에서, 요법은 CAR-발현 세포의 증가된 지속성 및/또는 CAR-발현 세포의 증가된 지속성 및 더 낮은, 예컨대, 감소된 재발 위험을 초래한다.

[0420] 본 발명은 항원-발현 (예컨대, GCC-발현) 세포 집단의 증식을 억제하거나 감소시키는 방법을 제공한다. 일 실시양태에서, 방법은 CAR 요법 (예컨대, CAR 발현 세포 집단)을 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 상이한 암 요법으로 치료된 대상체에서 세포 및/또는 암 세포의 수량, 갯수, 양 또는 백분율과 비교하여, 항원 (예컨대, GCC) 또는 항원-발현 (예컨대, GCC-발현) 세포와 회합된 다른 암을 갖는 대상체 또는 이의 동물 모델에서 세포 및/또는 암 세포의 수량, 갯수, 양 또는 백분율을 적어도 5% 이상, 10%, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 감소시킨다. 일 실시양태에서, 대상체는 포유류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0421] 발명은 또한 장애, 예컨대, 항원-발현 세포 (예컨대, GCC-발현 세포)와 연관된 장애 (예컨대, 본원에 기재된 암)를 예방, 치료 및/또는 관리하는 방법을 제공하며, 방법은 CAR 발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포, CAR-발현 세포의 집단)를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일 양태에서, 대상체는 인간이다.

[0422] 일 양태에서, 발명은 암 세포를 본원에 기재된 CAR-발현 (예컨대, GCC CAR 발현) 세포, 예컨대, GCC CART 세포와 접촉시켜, CART가 항원에 반응하여 활성화되고 암 세포를 표적화하도록 하는 단계를 포함하는, 암 세포 (예

컨대, 항원-발현, 예컨대, GCC-발현 암 세포)의 성장을 억제시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 암의 성장이 억제된다.

[0423] 본 개시내용은 또한 질환, 예컨대, 항원-발현 (예컨대, GCC-발현) 세포와 연관된 질환 (예컨대, 항원, 예컨대, GCC을 발현하는 암)을 예방, 치료 및/또는 관리하는 방법을 제공하며, 방법은 항원-발현 세포에 결합하는 CAR-발현 (예컨대, GCC CAR-발현) 세포를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0424] 본 개시내용은 또한 항원-발현 (예컨대, GCC-발현) 세포와 연관된 질환을 예방, 치료 및/또는 관리하는 방법을 제공하며, 방법은 항원-발현 (예컨대, GCC-발현) 세포에 결합하는 발명의 CART 세포 (예컨대, 항-GCC CART 세포)를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일 양태에서, 대상체는 인간이다.

[0425] 본 개시내용은 또한 예컨대, 항원-발현 (예컨대, GCC-발현) 세포와 연관된 암의 재발을 예방하는 방법을 제공하며, 방법은 항원-발현 (예컨대, GCC-발현) 세포에 결합하는 발명의 CART 세포 (예컨대, 항-GCC CART 세포)를 항원-발현 (예컨대, GCC-발현) 세포와 연관된 암의 재발의 예방을 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일 양태에서, 방법은 유효량의 다른 요법과 조합하여 항원 발현 (예컨대, GCC-발현) 세포에 결합하는 본원에 기재된 유효량의 CART 세포 (예컨대, 항-GCC CART 세포)를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0426] 실시양태는 본원에 개시된 CAR을 투여하기 전에 포유류를 림프구고갈시키는 단계를 추가로 포함한다. 림프구고갈의 예는 비골수절제 림프구고갈 화학요법, 골수절제 림프구고갈 화학요법, 전신 방사선조사 등을 포함하나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0427] 특정 예시적 양태에서, 대상체는 백혈구성분채집술을 거칠 수 있으며, 여기서 백혈구는 관심 있는 세포, 예컨대, T 세포를 선택 및/또는 단리하기 위해 엑스 비보에서 수집, 강화 또는 고갈된다. 이들 T 세포 단리물은 당업계에 알려진 방법에 의해 확장될 수 있고, 발명의 하나 이상의 CAR 작제물이 도입되어, 발명의 CAR T 세포를 생성할 수 있도록 처리된다. 이를 필요로 하는 대상체는 후속적으로 고 용량 화학요법에 이어 말초 혈액 줄기 세포 이식을 포함하는 표준 치료를 겪을 수 있다. 특정 양태에서, 이식 후 또는 이식과 병행하여, 대상체는 본 발명의 확장된 CAR 발현 세포의 주입을 받는다. 추가적인 양태에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.

[0428] 숙주 세포 또는 세포의 집단이 투여되는 방법의 목적을 위해, 세포는 포유류에 대해 동종이계 또는 자가유래인 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 포유류에 대해 자가유래이다. 본원에 사용된 바와 같이, 동종이계는 재료가 도입된 개체와 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 임의의 재료를 의미한다. 2 명 이상의 개체는 하나 이상의 유전자좌의 유전자가 동일하지 않을 때 서로 동종이계라고 한다. 일부 양태에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종이계 재료는 항원적으로 상호작용하기에 유전적으로 충분히 다를 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "자가유래"는 나중에 개체 내로 재-도입될 동일한 개체로부터 유래된 임의의 재료를 의미한다.

[0429] 본원에 지칭된 포유류는 임의의 포유류일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포유류"는 마우스 및 햄스터와 같은 설치류 목의 포유류, 및 토끼와 같은 로고모르파 목의 포유류를 비제한적으로 포함하는 임의의 포유류를 지칭한다. 포유류는 고양이과 (고양이) 및 개과 (개)를 포함하는 식육 목으로부터 유래될 수 있다. 포유류는 소과 (소) 및 돼지과 (돼지)를 포함하는 우제 목 (order Artiodactyla)으로부터 유래될 수 있거나, 말과 (말)을 포함하는 기제 목 (order Perssodactyla)일 수 있다. 포유류는 영장류, 세보이드, 또는 시모이드 목 (원숭이)일 수 있거나, 진원아 목 (인간 및 유인원)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유류는 인간이다.

[0430] 방법과 관련하여, 암은 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 횡문근 육종, 방광암 (예컨대, 방광 암종), 골암, 뇌암 (예컨대, 수모세포종), 유방암, 항문, 항문관 또는 항문직장의 암, 눈의 암, 간내 담관의 암, 관절의 암, 경부, 담낭 또는 흉막의 암, 코, 비강 또는 중이의 암, 구강의 암, 외음부의 암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 섬유육종, 위장 카르시노이드 종양, 두경부암 (예컨대, 두경부 편평 세포 암종), 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 백혈병, 액체 종양, 간암, 폐암 (예컨대, 비-소 세포 폐 암종 및 폐 선암종), 림프종, 중피종, 비만세포종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두 암, 비-호지킨 림프종, B-만성 림프구성 백혈병, 모세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 버킷 림프종, 난소암, 췌장암, 복막, 대망 및 장간막 암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신장암, 피부암, 소장암, 연조직암, 고형암, 윤활막 육종, 위암, 고환암, 갑상선암 및 요관암 중 임의의 것을 포함하는 임의의 암일 수 있다.

[0431] 특정 실시양태에서, 암은 위장관 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 위암이다. 일부 실시양태에서, 암은 결장직

장암이다. 일부 실시양태에서, 암은 결장암이다. 일부 실시양태에서, 암은 GCC의 비정상적인 발현을 갖는다.

[0432] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "치료하다" 및 "예방하다" 뿐만 아니라 그로부터 파생된 단어는 반드시 100% 또는 완전한 치료 또는 예방을 암시하는 것은 아니다. 오히려, 당업자가 잠재적 이익 또는 치료적 효과를 갖는 것으로서 인식하는 다양한 정도의 치료 또는 예방이 있다. 이와 관련하여, 방법은 포유류에서 임의의 양 또는 임의의 수준의 암의 치료 또는 예방을 제공할 수 있다.

[0433] 추가로, 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은 치료 또는 예방될 질환, 예컨대, 암의 하나 이상의 병태 또는 증상의 치료 또는 예방을 포함할 수 있다. 또한, 본원의 목적을 위해, "예방"은 질환, 또는 이의 증상 또는 병태의 개시를 지연시키는 것을 포함할 수 있다.

[0434] 다른 실시양태는 다음을 포함하는, 포유류에서 암의 존재를 검출하는 방법을 제공한다: (a) 포유류로부터의 하나 이상의 세포를 포함하는 샘플을 CAR, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 항체 및/또는 이의 항원 결합 부분, 또는 약학 조성물과 접촉시켜, 이에 의해 복합체를 형성하는 단계, (b) 복합체를 검출하는 단계이되, 여기서 복합체의 검출이 포유류에서 암의 존재를 나타내는, 단계. 일부 실시양태에서, 접촉은 포유류에 대해 생체외 또는 생체내에서 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 접촉은 생체외이다.

[0435] 샘플은 임의의 적합한 방법, 예컨대, 생검 또는 부검에 의해 수득될 수 있다. 생검은 개체로부터의 조직 및/또는 세포의 제거이다. 이러한 제거는 제거된 조직 및/또는 세포에 대한 실험을 수행하기 위해 개체로부터 조직 및/또는 세포를 수집하는 것일 수 있다. 이 실험은 개체가 특정 병태 또는 질환-상태를 갖고/갖거나 이를 앓고 있는지 여부를 결정하기 위한 실험을 포함할 수 있다. 병태 또는 질환은 예컨대, 암일 수 있다.

[0436] 포유류에서 증식성 장애, 예컨대, 암의 존재를 검출하는 방법의 실시양태와 관련하여, 포유류의 세포를 포함하는 샘플은 전체 세포, 이의 용해물 또는 전체 세포 용해물의 분획, 예컨대, 핵 또는 세포질 분획, 전체 단백질 분획 또는 핵산 분획을 포함하는 샘플일 수 있다. 샘플이 전체 세포를 포함하는 경우, 세포는 포유류의 임의의 세포, 예컨대, 혈액 세포 또는 내피 세포를 포함하는 임의의 장기 또는 조직의 세포일 수 있다.

[0437] 또한, 복합체의 검출은 당업계에 알려진 임의의 수의 방법을 통해 발생할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 CAR, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 또는 항체, 또는 본원에 기재된 이의 항원 결합 부분은 예를 들어, 방사성동위원소, 형광단 (예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), 피코에리트린 (PE)), 효소 (예컨대, 알칼리성 포스파타제, 홀스래디쉬 퍼옥시다제), 및 위에 개시된 바와 같은 원소 입자 (예컨대, 금 입자)와 같은 검출가능한 표지로 표지될 수 있다.

[0438] 표적 세포를 인식하는 능력 및 항원 특이성에 대해 CAR을 테스트하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Clay et al., J. Immunol, 163: 507-513 (1999)은 사이토카인 (예컨대, 인터페론-γ, 과립구/단핵구 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 종양 괴사 인자 a (TNF-α) 또는 인터류킨 2 (IL-2))의 방출을 측정하는 방법을 교시한다. 또한, CAR 기능은 Zhao et al, J. Immunol, 174: 4415-4423 (2005)에 기재된 바와 같이 세포성 세포독성의 측정에 의해 평가될 수 있다.

[0439] 다른 실시양태는 포유류에서 증식성 장애, 예컨대, 암의 치료 또는 예방을 위한, CAR, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 집단, 항체 또는 이의 항원 결합 부분 및/또는 발명의 약학 조성물의 사용을 제공한다. 암은 본원에 기재된 암 중 임의의 것일 수 있다.

[0440] 국소 및 전신 투여를 포함하는 임의의 투여 방법이 개시된 치료제에 대해 사용될 수 있다. 예를 들어, 국부, 경구, 혈관내, 예컨대, 정맥내, 근육내, 복강내, 비강내, 피내, 척수강내 및 피하 투여가 사용될 수 있다. 특정 투여 방식 및 투여량 양생법은 사례의 자세한 내용 (예를 들어, 대상체, 질환, 관련된 질환 상태 및 치료가 예방적인지 여부)을 고려하여 담당 임상의에 의해 선택될 것이다. 하나 초과의 약제 또는 조성물이 투여될 경우, 하나 이상의 투여 경로가 사용될 수 있으며; 예를 들어, 화학요법제는 경구 투여될 수 있고 항체 또는 항원 결합 단편 또는 컨쥬게이트 또는 조성물은 정맥내 투여될 수 있다. 투여 방법은 CAR, CAR T 세포, 컨쥬게이트, 항체, 항원 결합 단편, 또는 조성물이 비독성의 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대, 물, 식염수, 링거 용액, 덱스트로스 용액, 5% 인간 혈청 알부민, 고정 오일, 에틸 올레이트 또는 리포솜에 제공되는 주사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개시된 화합물의 국소 투여는 예를 들어, 종양이 제거된 조직의 영역 또는 종양 발달의 경향이 있는 것으로 의심되는 영역에 항체 또는 항원 결합 단편을 적용함으로써 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료적 유효량의 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 약학 제제의 지속적인 종양-내 (또는 종양-근처) 방출이 유익할 수 있다. 다른 예에서, 컨쥬게이트는 각막에 국부적으로 점안액으로서 적용되거나, 눈에 유리체내로 적용된다.

[0441] 개시된 치료제는 정확한 투여량의 개별 투여에 적합한 유닛 투여량 형태로 제형화될 수 있다. 또한, 개시된 치료제는 단일 용량 또는 다중 용량 일정으로 투여될 수 있다. 다중 투약 일정은 일차 치료의 과정이 1 회 초과의 개별 투약, 예를 들어, 1-10 회의 투약 후, 조성물의 작용을 유지하거나 보강하기 위해 필요에 따라 후속 시간 간격으로 주어지는 다른 투약일 수 있는 것이다. 치료는 며칠 내지 몇 달 또는 심지어 몇 년의 기간에 걸쳐 화합물(들)의 매일 또는 다중-일 투약을 포함할 수 있다. 따라서, 투여량 양생법은 또한 적어도 부분적으로 치료될 대상체의 특정 필요에 기반하여 결정될 것이며, 투여 의사의 판단에 좌우될 것이다.

[0442] 일 실시양태에서, CAR은 예컨대, 생체외 전사를 사용하여 면역 이펙터 세포 내로 도입되고, 대상체 (예컨대, 인간)는 발명의 CAR-발현 세포의 초기 투여 및 발명의 CAR-발현 세포의 하나 이상의 후속 투여를 받으며, 여기서 하나 이상의 후속 투여는 사전 투여 후 15 일 미만, 예컨대, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2 일에 투여된다. 일 실시양태에서, 발명의 CAR-발현 세포의 1 회 초과의 투여는 매주 대상체 (예컨대, 인간)에 투여되고, 예컨대, 발명의 CAR발현 세포의 2, 3 또는 4 회의 투여가 매주 투여된다. 일 실시양태에서, 대상체 (예컨대, 인간 대상체)는 주당 1 회 초과의 CAR-발현 세포의 투여 (예컨대, 주당 2, 3 또는 4 회의 투여)(또한 본원에서 주기로서 지칭됨)를 받은 후, 1 주일은 CAR-발현 세포 투여를 받지 않고, 이어서 CAR-발현 세포의 1 회 이상의 추가적인 투여 (예컨대, 주당 1 회 초과의 CAR-발현 세포의 투여)가 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 대상체 (예컨대, 인간 대상체)는 1 회 초과의 주기의 CAR-발현 세포를 받고, 각각의 주기 사이의 시간은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 또는 3 일 미만이다. 일 실시양태에서, CAR-발현 세포는 주당 3 회의 투여를 위해 격일로 투여된다. 일 실시양태에서, 발명의 CAR발현 세포는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 주 이상 동안 투여된다.

[0443] 항체 또는 컨쥬게이트의 전형적인 투여량은 약 0.01 내지 약 30 mg/kg, 예컨대, 약 0.1 내지 약 10 mg/kg의 범위일 수 있다.

[0444] 특정 예에서, 대상체에 컨쥬게이트, 항체, 조성물, CAR, CAR T 세포 또는 추가적인 약제 중 하나 이상을 포함하는 치료적 조성물이 다중 일일 투약 일정, 예컨대, 적어도 연속 2 일, 및 연속 10 일 등에, 예를 들어, 몇 주, 몇 달 또는 몇 년의 기간 동안 투여된다. 일 예에서, 대상체에 컨쥬게이트, 항체, 조성물 또는 추가적인 약제가 30 일 이상의 기간, 예컨대, 2 개월 이상, 4 개월 이상, 6 개월 이상, 12 개월 이상, 24 개월 이상 또는 36 개월 이상 동안 투여된다.

[0445] 일부 실시양태에서, 개시된 방법은 개시된 항체, 항원 결합 단편, 컨쥬게이트, CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포와 조합하여 (예를 들어, 순차적으로, 실질적으로 동시에 또는 동시에) 대상체에 수술, 방사선 요법 및/또는 화학요법제를 제공하는 단계를 포함한다. 이러한 약제 및 치료의 방법 및 치료적 투여량은 당업자에게 알려져 있고, 숙련된 임상의에 의해 결정될 수 있다. 추가적인 약제에 대한 제조 및 투약 일정은 제조업체의 지침에 따라 또는 숙련된 의료인이 경험적으로 결정한 바와 같이 사용될 수 있다. 이러한 화학요법을 위한 제조 및 투약 일정은 또한 Chemotherapy Service, (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md에 기재되어 있다.

[0446] 일부 실시양태에서, 병용 요법은 대상체에 추가적인 암 억제제의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 병용 요법과 함께 사용될 수 있는 추가적인 치료제의 비-제한적인 예는 미세소관 결합제, DNA 인터칼레이터 또는 가교제, DNA 합성 억제제, DNA 및 RNA 전사 억제제, 항체, 효소, 효소 억제제, 유전자 조절자 및 혈관신생 억제제를 포함한다. 이들 약제 (이는 치료적 유효량으로 투여됨) 및 치료는 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 임의의 적합한 항-암제 또는 항-혈관신생제는 본원에 개시된 CARS, CAR-T 세포, 항체, 항원 결합 단편 또는 컨쥬게이트와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 약제의 방법 및 치료적 투여량은 당업자에게 알려져 있고, 숙련된 임상의에 의해 결정될 수 있다.

[0447] 추가적인 화학요법제는 알킬화제, 예컨대, 질소 머스타드 (예를 들어, 클로람부실, 클로르메틴, 사이클로포스파미드, 이포스파미드 및 멜팔란), 니트로소우레아 (예를 들어, 카르무스틴, 포테무스틴, 로무스틴 및 스트렙토조신), 백금 화합물 (예를 들어, 카보플라틴, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 BBR3464), 부설판, 다카르바진, 메클로레타민, 프로카르바진, 테모졸로마이드, 티오테파 및 우라무스틴; 항대사물질, 예컨대, 엽산 (예를 들어, 메토트렉세이트, 페메트렉세드 및 랄티트렉세드), 퓨린 (예를 들어, 클라드리빈, 클로파라빈, 플루다라빈, 머캅토퓨린 및 티오구아닌), 피리미딘 (예를 들어, 카페시타빈), 시타라빈, 플루오로우라실 및 젬시타빈; 식물 알칼로이드, 예컨대, 포도필룸 (예를 들어, 에토포시드 및 테니포시드), 탁산 (예를 들어, 도세탁셀 및 파클리탁셀), 빈카 (예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈); 세포독성/항종양 항생제, 예컨대, 안트라사이클린 패밀리 구성원 (예를 들어, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미톡산트론 및 발루비

신), 블레오마이신, 리팜피신, 하이드록시우레아 및 미토마이신; 토포아이소머라제 억제제, 예컨대, 토포테칸 및 이리노테칸; 단클론 항체, 예컨대, 알렘투주맙, 베바시주맙, 세툭시맙, 젬투주맙, 리툭시맙, 파니투무맙, 페르투주맙 및 트라스투주맙; 광감작제, 예컨대, 아미노레불린산, 메틸 아미노레불리네이트, 포르피머 소듐 및 베르테포르핀; 및 기타 약제, 예컨대, 알리트레티노인, 알트레타민, 암사크린, 아나그렐리드, 삼산화비소, 아스파라기나제, 악시티닙, 벡사로텐, 베바시주맙, 보르테조밉, 셀레콕시브, 데닐류킨 디프티톡스, 에를로티닙, 에스트라무스틴, 제피티닙, 하이드록시카바마이드, 이마티닙, 라파티닙, 파조파닙, 펨토스타틴, 마소프로콜, 미토탄, 페가스파르가제, 타목시펜, 소라페닙, 수니티닙, 베무라피닙, 반데타닙 및 트레티노인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 약제의 선택 및 치료적 투여량은 당업자에게 알려져 있고, 숙련된 임상의에 의해 결정될 수 있다.

[0448] 병용 요법에 사용하기 위해 고려되는 일반 화학요법제는 아나스트로졸 (아리미덱스®), 비칼루타미드 (카소덱스®), 블레오마이신 설페이트 (블레녹세인®), 부설판 (밀레란®), 부설판 주사 (부설펙스®), 카페시타빈 (크셀로다®), N4-펜톡시카보닐-5-데옥시-5-플루오로시티딘, 카보플라틴 (파라플라틴®), 카무스틴 (BiCNU®), 클로람부실 (류케란®), 시스플라틴 (플라티놀®), 클라드리빈 (류스타틴®), 사이클로포스파미드 (사이톡산® 또는 네오사르®), 시타라빈, 시토신 아라비노사이드 (사이토사르-U®), 시타라빈 리포좀 주사제 (데포시트®), 다카르바진 (DTIC-Dome®), 닥티노마이신 (악티노마이신 D, Cosmegan), 다우놈비신 하이드로클로라이드 (셈비딘®), 다우놈비신 시트레이트 리포좀 주사제 (다우노좀®), 덱사메타손, 도세탁셀 (탁소테레®), 독소루비신 하이드로클로라이드 (아드리아마이신®, 루벡스®), 에토포사이드 (베페시드®), 플루다라빈 포스페이트 (플루다라®), 5-플루오로우라실 (아드루실®, 에퓨덱스®), 플루타미드 (유렉신®), 테자시티빈, 젬시타빈 (디플루오로데옥시시티딘), 하이드록시우레아 (하이드레아®), 이다루비신 (이다마이신®), 이포스파미드 (IFEX®), 이리노테칸 (캄프토사르®), L-아스파라기나제 (ELSPAR®), 류코보린 칼슘, 멜팔란 (알케란®), 6-머캅토퓨린 (퓨리네톨®), 메토트렉세이트 (Folex®), 미톡산트론 (노반트론®), 마일로탁, 파클리탁셀 (탁솔®), 피닉스 (이트륨90/MX-DTPA), 펨토스타틴, 폴리페프로산 20과 카르무스틴 임플란트 (글리아델®), 타목시펜 시트레이트 (놀바덱스®), 테니포사이드 (부몬®), 6-티오구아닌, 티오테파, 티라파자민 (티라존®), 주사용 토포테칸 하이드로클로라이드 (히캄틴®), 빈블라스틴 (벨반®), 빈크리스틴 (온코빈®) 및 비노렐빈 (나벨빈®)을 포함한다.

[0449] 예시적인 알킬화제는 그 전체가 참조로 원용되는 2016 년 4 월 8 일자로 출원된 국제 출원 WO 2016/164731의 270-271 페이지에 개시되어 있다. 추가의 예는 제한 없이, 질소 머스타드, 에틸렌이민 유도체, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아 및 트리아젠): 우라실 머스타드 (아미노우라실 머스타드®, 클로레타미나실®, 디메틸도판®, 데스메틸도판®, 헤만타민®, 노르도판®, 우라실 질소 머스타드®, 우라실로스트®, 우라실모스타자®, 우라무스틴®, 우라무스틴®), 클로르메틴 (머스타르겐®), 사이클로포스파미드 (사이톡산®, 네오사르®, 클라펜®, 엔독산®, 프로사이톡스®, 레비뮨™), 이포스파미드 (미톡사나®), 멜팔란 (알케란®), 클로람부실 (루케란®), 피포브로만 (아메델®, 베르사이트®), 트리에틸렌멜라민 (헤멜®, 헥사렌®, 헥사스타트®), 트리에틸렌티오포스포라민, 테모졸로미드 (테모다르®), 티오테파 (티오플렉스®), 부설판 (부실벡스®, 밀레란®), 카무스틴 (BiCNU®), 로무스틴 (CeeNU®), 스트렙토조신 (자노사르®), 및 다카르바진 (DTIC-돔®)을 포함한다 포함한다. 추가적인 예시적인 알킬화제는 제한 없이, 옥살리플라틴 (엘록사틴®); 테모졸로미드 (테모다르® 및 테모달®); 닥티노마이신 (악티노마이신-D, 코스메젠®으로서 또한 알려짐); 멜파란 (L-PAM, L-사르콜리신, 및 페닐알라닌 머스타드, 알케란®으로서 또한 알려짐); 알트레타민 (헥사메틸멜라민 (HMM), 헥사렌®으로서 또한 알려짐); 카무스틴 (BiCNU®); 벤다무스틴 (트레안다®); 부설판 (부설펙스® 및 마이레란®); 카보플라틴 (파라플라틴®); 로무스틴 (CCNU, CeeNU®로서 또한 알려짐); 시스플라틴 (CDDP, 플라티놀® 및 플라티놀®-AQ로서 또한 알려짐); 클로람부실 (류케란®); 사이클로포스파미드 (사이톡산® 및 네오사르®); 다카르바진 (DTIC, DIC 및 이미다졸 카복사미드, DTIC-돔®으로서 또한 알려짐); 알트레타민 (헥사메틸멜라민 (HMM), 헥사렌®으로서 또한 알려짐); 이포스파미드 (아이펙스®); 프레드누무스틴; 프로카바진 (마툴란®); 메클로레타민 (질소 머스타드, 무스틴 및 메클로레타민 하이드로클로라이드, 무스타르겐®으로서 또한 알려짐); 스트렙토조신 (자노사르®); 티오테파 (티오포스포아미드, TESPA 및 TSPA, 티오플렉스®로서 또한 알려짐); 사이클로포스파미드 (엔독산®, 사이톡산®, 네오사르®, 프로사이톡스®, 레비뮨®); 및 벤다무스틴 HC1 (트레안다®)을 포함한다.

[0450] 예시적인 백금계 약제는 제한 없이, 카보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라틴을 포함한다.

[0451] 예시적인 혈관신생 억제제는 제한 없이, A6 (Angstrom Pharmacueticals), ABT-510 (Abbott Laboratories), ABT-627 (아트라센탄)(Abbott Laboratories/Xinlay), ABT-869 (Abbott Laboratories), 악티미드 (CC4047, 포말리도미드)(Celgene Corporation), AdGVPEDF.11D (GenVec), ADH-1 (엑스헤린)(Adherex Technologies), AEE788

(Novartis), AG-013736 (악시티닙)(Pfizer), AG3340 (프리노마스타트)(Agouron Pharmaceuticals), AGX1053 (AngioGenex), AGX51 (AngioGenex), ALN-VSP (ALN-VSP 02)(Alnylam Pharmaceuticals), AMG 386 (Amgen), AMG706 (Amgen), 아파티닙 (YN968D1)(Jiangsu Hengrui Medicine), AP23573 (리다포롤리무스/MK8669)(Ariad Pharmaceuticals), AQ4N (노바베아), ARQ 197 (ArQule), ASA404 (Novartis/Antisoma), 아티프리모드 (Callisto Pharmaceuticals), ATN-161 (Attenuon), AV-412 (Aveo Pharmaceuticals), AV-951 (Aveo Pharmaceuticals), 아바스틴 (베바시주맙)(Genentech), AZD2171 (세디라닙/레센틴)(AstraZeneca), BAY 57-9352 (텔라티닙)(Bayer), BEZ235 (Novartis), BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb), BMS-582664 (브리바닙)(Bristol-Myers Squibb), BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb), 칼시트리올, CCI-779 (토리셀)(Wyeth), CDP-791 (ImClone Systems), 세플라토닌 (호모해링토닌/HHT)(ChemGenex Therapeutics), 세레브렉스 (세레콕시브)(Pfizer), CEP-7055 (Cephalon/Sanofi), CHIR-265 (Chiron Corporation), NGR-TNF, COL-3 (메타스타트)(Collagenex Pharaceuticals), 콤브레타스타틴 (Oxigene), CP-751, 87 1(피기투무맙)(Pfizer), CP-547,632 (Pfizer), CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma), CT-322 (안지오셉트)(Adnexus), 커큐민, 달테파린 (프라그민)(Pfizer), 디설피람 (안타부스), E7820 (Eisai Limited), E7080 (Eisai Limited), EMD 121974(실렌지티드)(EMD Pharmaceuticals), ENMD-1198 (EntreMed), ENMD-2076 (EntreMed), 엔도스타 (Simcere), 에르비툭스 (ImClone/Bristol-Myers Squibb), EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals), EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals), GC1008 (Genzyme), 게니스테인, GSK1363089(포레티닙)(GlaxoSmithKline), GW786034 (파조파닙)(GlaxoSmithKline), GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.), IMC－1121B (라무시루맙)(ImClone Systems), IMC-18F1 (ImClone Systems), IMC-3G3 (ImClone LLC), INCB007839 (Incyte Corporation), INGN 241 (Introgen Therapeutics), 이레사 (ZD1839/게피티닙), LBH589 (파리닥/파노비노스타트)(Novartis), 라니비주맙 (라니비주맙)(Genentech/Novartis), LY3 17615 (엔자스타우린)(Eli Lilly and Company), 마쿠겐 (페갑타닙)(Pfizer), MED1522 (아베그린)(Medlmmune), MLN518(탄두티닙)(Millennium), 네오바스타트 (AE941/베네핀)(Aeterna Zentaris), 넥사바르 (Bayer/Onyx), NM-3 (Genzyme Corporation), 노스카핀 (Cougar Biotechnology), NPT2358 (Nereus Pharmaceuticals), OSI-930 (OSI), 팔로미드 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.), 판젬 캡슐 (2ME2)(EntreMed), 판젬 NCD (2ME2)(EntreMed), PF-02341066 (Pfizer), PF-04554878 (Pfizer), PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology), PKC412 (Novartis), 폴리페논 E (녹차추출물)(Polypheno E International, Inc), PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals), PTC299 (PTC Therapeutics), PTK787 (바탈라닙)(Novartis), PXD101 (벨리노스타트)(CuraGen Corporation), RAD001 (에베로리무스)(Novartis), RAF265 (Novartis), 레고라페닙 (BAY73-4506)(Bayer), 레블리미드 (Celgene), 레탄 (Alcon Research), SN38 (리포솜)(Neopharm), SNS-032 (BMS-387032)(Sunesis), SOM230(파시레오티드)(Novartis), 스쿠알라민 (Genaera), 수라민, 수텐트 (Pfizer), 타세바 (Genentech), TB-403 (Thrombogenics), 템포스타틴 (Collard Biopharmaceuticals), 테트라티오몰리브데이트 (Sigma-Aldrich), TG100801 (TargeGen), 탈리도마이드 (Celgene Corporation), 틴자파린 소듐, TKI258 (Novartis), TRC093 (Tracon Pharmaceuticals Inc.), VEGF Trap (아플리버셉트)(Regeneron Pharmaceuticals), VEGF Trap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals), 베글린 (VasGene Therapeutics), 보르테조밉 (Millennium), XL184 (Exelixis), XL647 (Exelixis), XL784 (Exelixis), XL820 (Exelixis), XL999 (Exelixis), ZD6474 (AstraZeneca), 보리노스타트 (Merck), 및 ZSTK474를 포함한다.

[0452] 예시적인 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 수용체 억제제는 베바시주맙 (아바스틴®), 악시티닙 (인리타®); 브리바닙 알리네이트 (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-플루오로-2-메틸-17/-인돌-5-일옥시)-5-메틸피롤로[2,1-/][1,2,4]트리아진-6-일옥시)프로판-2-일)2-아미노프로파노에이트); 소라페닙 (넥사바르®); 파조파닙 (보트리엔트®); 수니티닙 말레이트 (수텐트®); 세디라닙 (AZD2171, CAS 288383-20-1); 바르가테프 (BIBF1120, CAS 928326-83-4); 포레티닙 (GSK1363089); 텔라티닙 (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); 아파티닙 (YN968D1, CAS 811803-05-1); 이마티닙 (글리벡®); 포나티닙 (AP24534, CAS 943319-70-8); 티보자닙 (AV951, CAS 475108-18-0); 레고라페닙 (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); 바탈라닙 디하이드로클로라이드 (PTK787, CAS 212141-51-0); 브리바닙 (BMS-540215, CAS 649735-46-6); 반데타닙 (카프렐사® 또는 AZD6474); 모테사닙 디포스페이트 (PCT 공개공보 번호 WO 02/066470에 기재된 AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-디하이드로-3,3-디메틸-1H-인돌-6-일)-2-[(4-피리디닐메틸)아미노]-3-피리딘카복사미드); 도비티닙 디락트산 (TKI258, CAS 852433-84-2); 린파닙 (ABT869, CAS 796967-16-3); 카보잔티닙 (XL184, CAS 849217-68-1); 레스타우르티닙 (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-디메틸에틸)-2-옥사졸릴]메틸]티오]-2-티아졸릴]-4-피페리딘카복사미드 (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-아미노-1-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피롤로 [2,1-f] [1,2,4]트리아진-5-일)메틸)피페리딘-3-올 (BMS6905 14); N-(3,4-디클로로-2-플루오로페닐)-6-메톡시-7-[[(3aa,5P,6aa)-옥타하이드로-2-메틸사이클로펜타

[c]피롤-5-일]메톡시]-4-퀴나졸린아민 (XL647, CAS 781613-23-8); 4-메틸-3-[[1-메틸-6-(3-피리디닐)-1//-피라졸로[3,4-i/]피리미딘-4-일]아미노]-/V-[3-(트리플루오로메틸)페닐]-벤즈아미드 (BHG712, CAS 940310-85-0); 및 아플리버셉트 (아일리아®)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 EGF 경로 억제제는 제한 없이, 티르포스틴 46, EKB-569, 엘로티닙 (타세바®), 게피티닙 (이레사®), 에르비툭스, 니모투주맙, 라파티닙 (타이커브®), 세툭시맙 (항-EGFR mAb), 188Re-표지된 니모투주맙 (항-EGFR mAb), 및 WO 97/02266, EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0 520 722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, US 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 및 WO 96/33980에 일반적으로 그리고 구체적으로 개시된 화합물을 포함한다.

[0453] 예시적인 EGFR 항체는 세툭시맙 (에르비툭스®); 파니투무맙 (베시티빅스®); 마투주맙 (EMD-72000); 트라스투주맙 (허셉틴®); 니모투주맙 (hR3); 잘루투무맙; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); 및 ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제는 에를로티닙 하이드로클로라이드 (타세바®), 게피티닙 (이레사®); N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-[[(3 "S")-테트라하이드로-3-푸라닐]옥시]-6-퀴나졸리닐]-4(디메틸아미노)-2-부텐아미드, 토복®); 반데타닙 (카프렐사®); 라파티닙 (타이커브®); (3R,4R)-4-아미노-1-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피롤로 [2, 1-f] [1,2,4] 트리아진-5-일)메틸)피페리딘-3-올 (BMS690514); 카네르티닙 디하이드로클로라이드 (CI-1033); 6-[4-[(4-에틸-1피페라지닐)메틸]페닐]-/V-[(1R)-1-페닐에틸]-7/-피롤로[2 3- 7]피리 인 이딘-4-아인 인크 (AEE788, CAS 497839-62-0); 무브리티닙 (TAK165); 펠리티닙 (EKB569); 아파티닙 (BIBW2992); 네라티닙 (HKI-272); A-[4-[[1-[(3-플루오로페닐)메틸]-1//-인다졸-5-일]아미노]-5-메틸피롤로[2,1-/|[1,2,4]트리아진-6-일]-카밤산, 3)-3-인 오르폴리닐인 씨틸 에스테르 (BMS599626); /V-(3,4-디클로로-2-플루오로페닐)-6-메톡시-7-[[(3aa,5p,6aa)-옥타하이드로-2-메틸사이클로펜타[c]피롤-5-일]메톡시]-4-퀴나졸린아민 (XL647, CAS 781613-23-8); 및 4-[4-[[(1R)-1-페닐에틸]아미노]-7A/-피롤로[2,3-z/J 피리미딘-6-이1J-페놀 (PKI1 66, CAS 187724-61-4)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0454] 예시적인 mTOR 억제제는 제한 없이, 라파마이신 (라파뮨®), 및 이의 유사체 및 유도체; SDZ-RAD; 템시롤리무스 (토리셀®; CCI-779로서 또한 알려짐); 리다포롤리무스 (정식으로 (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(IR,9S,125,15R,16E,1SR,19R,21R, 23S,24£,26£,28Z,30S,32S,35R)-1,18-디하이드록시-19,30-디메톡시-15,17,21,23,29,35-헥사메틸-2,3,10,14,20-펜타옥소-11,36-디옥사-4-아자트리사이클로[30.3.1.0 4,9] 헥사트리아콘타-16,24,26,28-테트라엔-12-일]프로필]-2-메톡시사이클로헥실 디메틸포스피네이트인 데페로리무스로서 알려지고, AP23573 및 MK8669로서 또한 알려지고, PCT 공개공보 번호 WO 03/064383에 기재됨); 에베롤리무스 (아피니토르® 또는 RAD001); 라파마이신 (AY22989, 시롤리무스®); 시마피모드 (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-비스[(3S)-3-메틸모르폴린-4-일]피리도[2,3-i/]피리미딘-7-일]-2-메톡시페닐)메탄올 (AZD8055); 2-아미노-8-[트랜스-A-(2-하이드록시에톡시)사이클로헥실]-6-(6-메톡시-3-피리디닐)-4-메틸-피리도[2,3-i/]피리미딘-7(8)-온 (PF04691502, CAS 1013101-36-4); 및 2-[1,4-디옥소-4-[[4-(4-옥소-8-페닐-4//-1-벤조피란-2-일)모르폴리늄-4-일]메톡시]부틸]-L-아르기닐글리실-L-a-아스파르틸L-세린 (서열번호 73), 내부 염 (SF1126, CAS 936487-67-1)을 포함한다.

[0455] 예시적인 면역조정제는 예컨대, 아푸투주맙 (로슈®로부터 이용가능함); 페그필그라스팀 (뉴라스타®); 레날리도마이드 (CC-5013, 레블리미드®); 탈리도마이드 (탈로미드®), 악티미드 (CC4047); 및 IRX-2 (인터류킨 1, 인터류킨 2, 및 인터페론 g를 포함하는 인간 사이토카인의 혼합물, CAS 951209-71-5, IRX Therapeutics로부터 이용가능함)를 포함한다. 예시적인 안트라사이클린은 예컨대, 독소루비신 (아드리아마이신® 및 루벡스®); 블레오마이신 (레녹산®); 다우노루비신 (다우옴비신 하이드로클로라이드, 다우노마이신 및 루비도마이신 하이드로클로라이드, 셈비딘®); 다우노루비신 리포솜 (다우노루비신 시트레이트 리포좀, 다우노좀®); 미톡산트론 (DHAD, 노반트론®); 에피루비신 (엘렌세™); 이담비신 (이다마이신®, 이다마이신 PFS®); 미토마이신 C (무타마이신®); 겔다나마이신; 허비마이신; 라비도마이신; 및 데스아세틸라비도마이신을 포함한다. 예시적인 빈카 알칼로이드는 예컨대, 비노렐빈 타르트레이트 (나벨빈®), 빈크리스틴 (온코빈®), 및 빈데신 (엘디신®)); 빈블라스틴 (빈블라스틴 설페이트, 빈카류코블라스틴 및 VLB, 알카반-AQ® 및 벨반®으로서 또한 알려짐); 및 비노렐빈 (나벨빈®)을 포함한다. 예시적인 프로테오좀 억제제는 보르테조밉 (벨케이드®); 카르필조밉 (PX-171-007, (S)-4-메틸-A/-((S)-1-(((S)-4-메틸-1-((R)-2-메틸옥시란-2-일)-1-옥소펜탄-2-일)아미노)-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)-2-((S)-2-(2-모르폴리노아세트아미도)-4-페닐부탄아미도)-펜탄아미드); 마리조밉 (NPI-0052); 익사조밉 시트레이트 (MLN-9708); 델란조밉 (CEP-18770); 및 C-엠씨틸-V-(2-엠시티 1-5-티아졸 일)카보니 1J-L-scry 1- C-엠씨티 1-V-(5)-2-[(2/^)-2-메틸-2-옥시라닐]-2-옥소-1-(페닐메틸)에틸]-L-세린아미드 (ONX-09 12)

를 포함한다.

[0456] 예시적인 포스포이노시티드 3-키나제 (PI3K) 억제제는 4-[2-(1H-인다졸-4-일)-6-[[4-(메틸설포닐)피페라진-1-일]메틸]티에노[3,2-d]피리미딘-4-일]모르폴린 (GDC 0941로서 또한 알려지고, PCT 공개공보 번호 WO 09/036082 및 WO 09/055730에 기재됨); 2-메틸-2-[4-[3-메틸-2-옥소-8-(퀴놀린-3-일)-2,3-디하이드로이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]페닐]프로피오니트릴 (BEZ 235 또한 NVP-BEZ 235로서 또한 알려지고, PCT 공개공보 번호 WO 06/122806에 기재됨); 4-(트리플루오로메틸)-5-(2,6-디모르폴리노피리미딘-4-일)피리딘-2-아민 (BKM120 또는 NVP-BKM120으로서 또한 알려지고, PCT 공개공보 번호 WO2007/084786에 기재됨); 토자세르팁 (VX680 또는 MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-피리디닐)-6-퀴놀리닐]메틸렌]-2,4-티아졸리딘디온 (GSK1059615, CAS 958852- 01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(아세틸옥시)-1-[(디-2-프로페닐아미노)메틸렌]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-옥타하이드로-11-하이드록시-4-(메톡시메틸)-4a,6a-디메틸사이클로펜타[5,6]나프토[1,2-c]피란-2,7,10(1H)-트리온 (PX866, CAS 502632-66-8); 및 8-페닐-2-(모르폴린-4-일)-크로멘-4-온 (LY294002, CAS 154447-36-6)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0457] 예시적인 단백질 키나제 B (PKB) 또는 AKT 억제제는 8-[4-(1-아미노사이클로부틸)페닐]-9-페닐-1,2,4-트리아졸로[3,4-f][1,6]나프티리딘-3(2H)-온 (MK-2206, CAS 1032349-93-1); 페리포신 (KRX0401); 4-도데실-N-1,3,4-티아디아졸-2-일벤젠설폰아미드 (PHT-427, CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-일)-에틸-7-[(3S)-3-피페리디닐메톡시]-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-4-일]-2-메틸-3-부틴-2-올 (GSK690693, CAS 937174-76-0); 8-(1-하이드록시에틸)-2-메톡시-3-[(4-메톡시페닐)메톡시]-6H-디벤조[b,d]피란-6-온 (팔로미드 529, P529, 또는 SG-00529); 트리시르빈 (6-아미노-4-메틸-8-(P-D-리보푸라노실)-4H,8H-피롤로[4,3,2-de]피리미도[4,5-c]피리다진); (aS)-a-[[[5-(3-메틸-1H-인다졸-5-일)-3-피리디닐]옥시]메틸]-벤젠에탄아민 (A674563, CAS 552325-73-2); 4-[(4-클로로페닐)메틸]-1-(7H피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-4-피페리딘아민 (CCT128930, CAS 885499-61-6); 4-(4-클로로페닐)-4-[4-(1H 피라졸-4-일)페닐]-피페리딘 (AT7867, CAS 857531-00-1); 및 알켁신 (RX-0201, CAS 663232-27-7)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0458] 칼슘 의존적 포스파타제 칼시뉴린을 억제하는 약물 (사이클로스포린 및 FK506) 또는 성장 인자 유도된 시그널링에 중요한 p70S6 키나제를 억제하는 약물 (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)이 또한 사용된다. 추가 양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, 플루다라빈과 같은 화학요법제를 사용한 T 세포 절제 요법, 외부-빔 방사선 요법 (XRT), 사이클로포스파미드 및/또는 OKT3 또는 CAMPATH와 같은 항체와 함께 (예컨대, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에 투여될 수 있다. 일 양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 CD20과 반응하는 약제, 예컨대, 리툭산과 같은 B-세포 절제 요법 후에 투여된다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 대상체는 고 용량 화학요법에 이어 말초 혈액 줄기 세포 이식을 포함하는 표준 치료를 겪을 수 있다. 특정 실시양태에서, 이식 후, 대상체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가적인 실시양태에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.

[0459] 병용 요법은 상승작용을 제공할 수 있고, 상승작용적, 즉, 활성 성분을 함께 사용할 때 달성되는 효과가 화합물을 개별적으로 사용하여 발생하는 효과의 합보다 크다는 것을 입증할 수 있다. 활성 성분이 다음과 같은 경우 상승작용적 효과를 얻을 수 있다: (1) 조합된 유닛 투여량 제형으로 공동-제형화되고 동시에 투여 또는 전달됨; (2) 별도의 제형으로서 교대로 또는 병렬로 전달됨; 또는 (3) 일부 다른 양생법에 의함. 교대로 전달될 때, 화합물이 예를 들어, 별도의 시린지 중 상이한 주사제에 의해 순차적으로 투여 또는 전달될 때 상승작용적 효과가 달성될 수 있다. 일반적으로, 교대하는 동안, 각각의 활성 성분의 유효 투여량이 순차적으로, 즉, 연속적으로 투여되는 반면, 병용 요법에서는 2 개 이상의 활성 성분의 유효 투여량이 함께 투여된다.

[0460] 일 실시양태에서, 본원에 개시된 항원 중 하나 이상 또는 이의 컨쥬게이트에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편의 유효량이 항-암 치료 후에 종양을 갖는 대상체에 투여된다. 투여된 항체 또는 항원 결합 단편 또는 컨쥬게이트가 각각의 암 세포 상에 발현된 항원과 면역 복합체를 형성하기에 충분한 양의 시간이 경과한 후, 면역 복합체가 검출된다. 면역 복합체의 존재 (또는 부재)는 치료의 유효성을 나타낸다. 예를 들어, 치료 전에 취한 대조군과 비교하여 면역 복합체의 증가는 치료가 효과적이지 않다는 것을 나타내는 반면, 치료 전에 취한 대조군과 비교하여 면역 복합체의 감소는 치료가 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0461] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항원 결합제는 대상체에 대한 하나 이상의 추가적인 약제의 투여를 추가로 포함하는 치료의 과정에 포함될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항원 결합제와 조합하여 투여된 추가적인 약제는 화학요법제일 수 있다. 다양한 실시양태에서, 본원에

기재된 바와 같은 항원 결합제와 조합하여 투여된 추가적인 약제는 염증을 억제하는 약제일 수 있다.

[0462] 일부 실시양태에서, 항-GCC 항원 결합제는 인간 GCC에 대해 특이성을 갖는 단일 도메인 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 단일 도메인 항체는 암 세포에 결합하고, 암 세포에 치료제를 전달하고, 인간 GCC를 발현하는 암 세포를 살해시키기 위해 치료제 (예컨대, 화학요법제 및 방사성 원자)에 컨쥬게이션 (예컨대, 연결)될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-GCC 결합제는 치료제에 연결된다. 일부 실시양태에서, 치료제는 화학요법제, 사이토카인, 방사성 원자, siRNA 또는 독소이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 화학요법제이다. 일부 실시양태에서, 약제는 방사성 원자이다.

[0463] 일부 실시양태에서, 방법은 GCC-연관된 장애에 대한 다른 요법과 함께 수행될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 화학요법과 동시에, 전에 또는 후에 대상체에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 입양 요법 방법과 동시에, 전에 또는 후에 대상체에 투여될 수 있다.

[0464] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 결합제와 조합하여 투여된 추가적인 약제는 항-GCC 결합제와 동시에, 항-GCC 결합제와 동일한 날에, 또는 항-GCC 결합제와 동일한 주에 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 결합제와 조합하여 투여된 추가적인 약제는 항-GCC 결합제와 함께 단일 제형으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가적인 약제는 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 결합제의 투여로부터 일시적으로 분리된 방식으로, 예컨대, 항-GCC 결합제의 투여 1 시간 이상 전 또는 후에, 1 일 이상 전 또는 후에, 1 주 이상 전 또는 후에, 또는 1 달 이상 전 또는 후에 투여된다. 다양한 실시양태에서, 하나 이상의 추가적인 약제의 투여 빈도는 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 결합제의 투여 빈도와 동일하거나, 유사하거나, 상이할 수 있다.

[0465] 병용 요법 내에는 본원에 기재된 바와 같은 2 개의 별개의 항체의 투여를 포함하는 치료 양생법 및/또는 복수의 제형 및/또는 투여의 경로에 의한 본원에 기재된 바와 같은 항체의 투여를 포함하는 치료 양생법이 포함된다.

[0466] 일부 실시양태에서, 조성물은 하나 이상의 추가적인 치료제, 예컨대, 대상체에서 GCC-연관된 장애 (예컨대, 암 또는 자가면역 장애)를 치료 또는 예방하기 위한 추가적인 요법과 함께 제형화될 수 있다. 대상체에서 GCC-연관된 장애를 치료하기 위한 추가적인 약제는 치료될 특정 장애에 따라 달라질 것이지만, 제한 없이, 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손, 오스파미드, 카보플라틴, 에토포사이드, 덱사메타손, 시타라빈, 시스플라틴, 사이클로포스파미드 또는 플루다라빈을 포함할 수 있다.

[0467] 본원에 기재된 조성물은 사전에 또는 현재 투여된 요법을 대체하거나 증대시킬 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 조성물을 이용한 치료 시, 하나 이상의 추가적인 활성제의 투여가 중단 또는 저하될 수 있고, 예컨대, 더 낮은 수준, 예컨대, 본원에 기재된 항-GCC 결합제의 투여 후 GCC 결합)에 대해 교차-경쟁하는 참조 항체의 더 낮은 수준으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 사전 요법의 투여가 유지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 사전 요법은 조성물의 수준이 치료적 효과를 제공하기에 충분한 수준에 도달할 때까지 유지될 것이다. 2 개의 요법이 조합으로 투여될 수 있다.

[0468] 일부 실시양태에서, 대상체에 본원에 기재된 요법 또는 조합의 투여와 연관된 부작용을 감소 또는 호전시키는 약제, 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포) 및 추가적인 약제가 투여될 수 있다. CAR-발현 세포의 투여와 연관된 부작용은 CRS, 및 대식세포 활성화 증후군 (MAS)으로 또한 불리는 혈구식세포 림프조직구증 (HLH)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. CRS의 증상은 고열, 메스꺼움, 일시적 저혈압, 및 저산소증 등을 포함한다. 따라서, 본원에 기재된 방법은 대상체에 본원에 기재된 요법, 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포)를 투여하는 단계 및 추가로 CAR-발현 세포를 이용한 치료로 인한 가용성 인자의 상승된 수준을 관리하기 위한 약제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 대상체에서 상승된 가용성 인자는 IFN-g, TNFa, IL-2 및 IL-6 중 하나 이상이다. 따라서, 이러한 부작용을 치료하기 위해 투여되는 약제는 이러한 가용성 인자 중 하나 이상을 중화시키는 약제일 수 있다. 이러한 약제는 스테로이드, TNFa의 억제제 및 IL-6의 억제제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. TNFa 억제제의 예는 엔타너셉트이다. IL-6 억제제의 예는 토실리주맙이다.

[0469] 일 실시양태에서, 대상체에 본원에 기재된 요법의 활성을 향상시키는 약제, 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR 발현 세포)가 투여될 수 있다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 약제는 억제 분자를 억제하는 약제일 수 있다. 예컨대, 추가적인 억제 분자는 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 반응을 시작하는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-F1, CTFA4, TIM3, FAG3, VISTA, BTFA, TIGIT, FAIR1, CD160 및 2B4를 포함한다.

[0470] 예컨대, DNA, RNA 또는 단백질 수준에서의 억제에 의한 억제 분자의 억제는 CAR-발현 세포 성능을 최적화할 수 있다. 실시양태에서, 억제 핵산, 예컨대, 억제 핵산, 예컨대, dsRNA, 예컨대, siRNA 또는 shRNA는 CAR-발현 세포에서 억제 분자의 발현을 억제하는 데 사용될 수 있다. 실시양태에서, 억제제는 shRNA이다. 실시양태에서, 억제 분자는 CAR-발현 세포 내에서 억제된다. 이들 실시양태에서, 억제 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자는 CAR의 구성요소, 예컨대, 이의 모든 구성요소를 코딩하는 핵산에 연결된다.

[0471] 일부 실시양태에서, 억제 신호의 억제제는 예컨대, 억제 분자에 결합하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 예를 들어, 약제는 PD1, PD-L1, PD-L2 또는 CTLA4에 결합하는 항체 또는 항체 단편 (예컨대, 이필리무맙 (MDX-010 및 MDX-101로서 또한 지칭되고, 예르보이®; Bristol - Myers Squibb; 트레멜리무맙 (Pfizer로부터 이용가능한 IgG2 단클론 항체, 이전에는 티실리무맙, CP-675,206으로서 알려짐)로 시판됨.)일 수 있다. 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포)의 활성을 향상시키는 약제는 예컨대, 제1 도메인 및 제2 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있으며, 여기서 제1 도메인은 억제 분자 또는 이의 단편이고, 제2 도메인은 양성 신호와 연관된 폴리펩티드이며, 예컨대, 양성 신호와 연관된 폴리펩티드는 CD28, ICOS 및 이의 단편, 예컨대, CD28 및/또는 ICOS의 세포내 시그널링 도메인이다. 일 실시양태에서, 융합 단백질은 CAR을 발현한 동일한 세포에 의해 발현된다. 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 항-GCC CAR을 발현하지 않는 세포, 예컨대, T 세포에 의해 발현된다.

[0472] 다른 실시양태에서, 대상체는 세포의 이식, 예컨대, 동종이계 줄기 세포 이식 전에 CAR-발현 세포, 예컨대, 본 개시내용의 조성물의 주입을 받는다. 바람직한 실시양태에서, CAR 발현 세포는 예컨대, CAR을 코딩하는 mRNA의 전기천공에 의해 일시적으로 CAR을 발현하고, 이로써 CAR의 발현은 생착 실패를 피하기 위해 공여자 줄기 세포의 주입 전에 종결된다.

[0473] 일부 환자는 투여 동안 또는 후에 본 개시내용의 화합물 및/또는 다른 항-암제(들)에 대한 알레르기 반응을 경험할 수 있으며; 따라서, 알레르기 반응의 위험을 최소화하기 위해 종종 항-알레르기제가 투여된다. 적합한 항-알레르기제는 덱사메타손 (예컨대, 데카드론®), 베클로메타손 (예컨대, 베클로벤트®), 하이드로코르티손 (코르티손, 하이드로코르티손 소듐 석시네이트, 하이드로코르티손 소듐 포스페이트로서 또한 알려지고, 상표명 알라-코르트®, 하이드로코르티손 포스페이트, 솔루-코르테프®, 하이드로코르트 아세테이트® 및 라나코르트®로 판매됨), 프레드니솔론 (상표명 델타-코르텔®, 오라프레드®, 페디아프레드® 및 프렐론®으로 판매됨), 프레드니손 (상표명 델타손®, 리퀴드 레드®, 메티코르텐® 및 오라소네®로 판매됨), 메틸프레드니솔론 (6-메틸프레드니솔론, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트로서 또한 알려지고, 상표명 듀랄론®, 메드랄론®, 메드롤®, M- 프레드니솔® 및 솔루-메드롤®로 판매됨); 항히스타민제, 예컨대, 디펜히드라민 (예컨대, 베나드릴®), 하이드록시진, 및 사이프로헵타딘; 및 기관지확장제, 예컨대, 베타-아드레날린성 수용체 작용제, 알부테롤 (예컨대, 프로벤틸®), 및 테르부탈린 (브레티네®)을 포함한다. 일부 환자는 본 개시내용의 화합물 및/또는 다른 항-암제(들)의 투여 동안 및 후에 메스꺼움을 경험할 수 있고; 따라서 항-구토제는 메스꺼움 (위의 상부(upper stomach)) 및 구토를 예방하는 데 사용된다. 적합한 항-구토제는 아프레피탄트 (에멘드®), 온단세트론 (조프란®), 그라니세트론 HCl (키트릴®), 로라제팜 (아티반® 덱사메타손 (데카드론®), 프로클로르페라진 (콤파진®), 카소피탄트 (레조닉® 및 준리사®) 및 이들의 조합을 포함한다.

[0474] 치료 기간 동안 경험하는 통증을 완화시키기 위한 의약은 종종 환자를 보다 편안하게 하기 위해 처방된다. 타이레놀®과 같은 일반적인 일반 의약품 진통제가 종종 사용된다. 그러나, 오피오이드 진통제 약물, 예컨대, 하이드로코돈/파라세타몰 또는 하이드로코돈/아세트아미노펜 (예컨대, 비코딘®), 모르핀 (예컨대, 아스트라모프® 또는 아빈자®), 옥시코돈 (예컨대, 옥시콘틴® 또는 퍼코세트®), 옥시모르폰 하이드로클로라이드 (오파나®), 및 펜타닐 (예컨대, 듀로게식®)이 또한 중등도 또는 중증 통증에 유용하다.

[0475] 치료 독성으로부터 정상 세포를 보호하고 장기 독성을 제한하기 위한 노력으로, 세포보호제 (예컨대, 신경보호제, 자유-라디칼 스캐빈저, 심장보호제, 안트라사이클린 혈관외유출 중화제, 및 영양제 등)가 보조 요법으로서 사용될 수 있다. 적합한 세포보호제는 아미포스틴 (에티올®), 글루타민, 디메스나 (타보섭트®), 메스나 (메스넥스®), 덱스라족산 (지네카르드® 또는 토텍트®), 크살리프로덴 (크사프릴라®), 및 류코보린 (칼슘 류코보린, 시트로보룸 인자 및 폴린산으로서 또한 알려짐)을 포함한다.

[0476] 코드 번호, 제네릭 또는 상품명으로 식별되는 활성 화합물의 구조는 표준 개론서 "The Merck Index"의 실제판 또는 데이터베이스, 예컨대, Patents International (예컨대, IMS World Publications)으로부터 얻을 수 있다. 본 개시내용의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 위에 언급된 화합물은 위에 인용된 문서에서와 같은 당업계에서 기재된 바와 같이 제조 및 투여될 수 있다.

[0477] 일 실시양태에서, 본 개시내용은 단독으로 또는 다른 항-암제와 함께 인간 또는 동물 대상체에 투여하기에 적합

한 약학적으로 허용가능한 담체와 함께, 본 개시내용의 하나 이상의 치료제 (예컨대, 본 개시내용의 치료제) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0478] 일 실시양태에서, 본 개시내용은 세포 증식성 질환, 예컨대, 암을 앓고 있는 인간 또는 동물 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 단독으로 또는 다른 항-암제와 조합하여 치료적 유효량의 본 개시내용의 치료제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 이러한 치료를 필요로 하는 인간 또는 동물 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0479] 특히, 조성물은 조합 치료제로서 함께 제형화되거나 개별적으로 투여될 것이다. 병용 요법에서, 본 개시내용의 화합물 및 다른 항-암제(들)는 구체적인 시간 제한 없이 동시에, 병행하여 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 여기서 이러한 투여는 환자의 신체에서 2 개의 화합물의 치료적 유효 수준을 제공한다.

[0480] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 화합물 및 다른 항-암제(들)는 일반적으로 주입에 의해 또는 경구로 임의의 순서로 순차적으로 투여된다. 투약 양생법은 질환의 단계, 환자의 체력, 개별 약물의 안전성 프로파일, 및 개별 약물의 내약성뿐만 아니라 조합을 투여하는 주치의 및 개업의(들)에게 잘 알려진 기타 기준에 따라 달라질 수 있다. 본 개시내용의 치료제 (예컨대, GCC CAR) 및 다른 항-암제(들)는 치료를 위해 사용되는 특정 주기에 따라 서로 수분, 수시간, 수일 내에 또는 심지어 수주 간격으로 투여될 수 있다. 또한, 주기는 치료 주기 동안 하나의 약물을 다른 약물보다 더 자주 투여하고 약물의 투여마다 상이한 용량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0481] 본 개시내용의 치료제 (예컨대, GCC CAR)는 또한 알려진 치료적 과정, 예를 들어, 호르몬 또는 특히 방사선의 투여와 조합하여 유리하게 사용될 수 있다. 본 개시내용의 화합물은 특히 방사선요법에 대해 불량한 민감도를 나타내는 종양의 치료를 위한 방사선증감제로서 특히 사용될 수 있다.

[0482] 실시양태에서, 대상체에 CAR-발현 세포의 투여와 연관된 부작용을 감소 또는 호전시키는 약제가 투여될 수 있다. CAR-발현 세포의 투여와 연관된 부작용은 CRS, 및 대식세포 활성화 증후군 (MAS)으로 또한 불리는 혈구식 세포 림프조직구증 (HLH)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0483] 따라서, 본원에 기재된 방법은 대상체에 본원에 기재된 CAR 발현 세포를 투여하는 단계 및 CAR-발현 세포를 이용한 치료로 인한 상승된 수준의 가용성 인자를 관리하기 위해 하나 이상의 약제를 추가로 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 대상체에서 상승된 가용성 인자는 IFN-g, TNFa, IL-2 및 IL-6 중 하나 이상이다. 실시양태에서, 대상체에서 상승된 인자는 IL-1, GMCSF, IL-10, IL-8, IL-5 및 프락탈킨 중 하나 이상이다. 따라서, 이러한 부작용을 치료하기 위해 투여된 약제는 이러한 가용성 인자 중 하나 이상을 중화시키는 약제일 수 있다.

[0484] 일 실시양태에서, 이들 가용성 형태 중 하나 이상을 중화시키는 약제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 이러한 약제의 예는 스테로이드 (예컨대, 코르티코스테로이드), TNFa의 억제제 및 IL-6의 억제제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. TNFa 억제제의 예는 항-TNFa 항체 분자, 예컨대, 인플릭시맙, 아달리무맙, 세르톨리주맙 페골 및 골리무맙이다. TNFa 억제제의 다른 예는 융합 단백질, 예컨대, 엔타너셉트이다. TNFa의 소분자 억제제는 크산틴 유도체 (예컨대, 펜톡시파일린) 및 부프로피온을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. IL-6 억제제의 예는 항-IL-6 항체 분자, 예컨대, 토실리주맙 (toe), 사릴루맙, 엘실리모맙, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301 및 FM101이다. 일 실시양태에서, 항-IL-6 항체 분자는 토실리주맙이다. IL-1R 기반 억제제의 예는 아나킨라이다.

[0485] 일부 실시양태에서, 대상체에 특히 예컨대, 메틸프레드니솔론, 하이드로코르티손과 같은 코르티코스테로이드가 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 예컨대, 노르에피네프린, 도파민, 페닐에프린, 에피네프린, 바소프레신 또는 이들의 조합과 같은 승압제가 투여된다.

[0486] 일 실시양태에서, 대상체에 해열제가 투여될 수 있다. 실시양태에서, 대상체에 진통제가 투여될 수 있다.

[0487] 일 실시양태에서, 대상체에 CAR-발현 세포의 활성 또는 적합성을 향상시키는 약제가 추가로 투여될 수 있다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 약제는 T 세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자를 억제하는 약제일 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포 기능을 조정 또는 조절하는 분자는 억제 분자이다. 억제 분자, 예컨대, 프로그래밍된 사멸 1 (PD-1) 또는 PD-1 리간드 (PD-L1)는 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 반응을 시작하는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제 분자의 예는 PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (예컨대, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, GAL9 및 아데노신을 포함한다. 예컨대, DNA, RNA 또는 단백질 수준에서의 억제에 의해 T 세포 기능을 조정 또는 조절하는,

예컨대, 억제하는 분자의 억제는 CAR-발현 세포 성능을 최적화할 수 있다. 실시양태에서, 예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 약제, 예컨대, 억제 핵산, 예컨대, 억제 핵산, 예컨대, 억제 핵산, 예컨대, dsRNA, 예컨대, siRNA 또는 shRNA, 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복부 (CRISPR), 전사-활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN) 또는 징크 핑거 엔도뉴클레아제 (ZFN)는 CAR-발현 세포에서 억제 분자의 발현을 억제하는 데 사용될 수 있다. 실시양태에서, 억제제는 shRNA이다. 실시양태에서, T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 약제는 CAR-발현 세포 내에서 억제된다. 이들 실시양태에서, T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자는 CAR의 구성요소, 예컨대, 이의 모든 구성요소를 코딩하는 핵산에 연결된다.

[0488] 실시양태에서, T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자를 코딩하는 핵산 분자는 프로모터, 예컨대, HI- 또는 U6-유래된 프로모터에 작동가능하게 연결되며, 그에 따라 T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자는 발현되며, 예컨대, CAR-발현 세포 내에서 발현된다. 예컨대, Tiscomia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA," Chapter 3, in Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann and Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500 참고.

[0489] 실시양태에서, T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자를 코딩하는 핵산 분자는 CAR의 구성요소, 예컨대, 이의 모든 구성요소를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 동일한 벡터, 예컨대, 렌티바이러스 벡터 상에 존재한다. 이러한 실시양태에서, T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자를 코딩하는 핵산 분자는 CAR의 구성요소, 예컨대, 이의 모든 구성요소를 코딩하는 핵산의 5'- 또는 3'에서 벡터, 예컨대, 렌티바이러스 벡터 상에 위치한다. T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자를 코딩하는 핵산 분자는 CAR의 구성요소, 예컨대, 이의 모든 구성요소를 코딩하는 핵산과 동일한 또는 상이한 방향으로 전사될 수 있다. 실시양태에서, T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자를 코딩하는 핵산 분자는 CAR의 구성요소, 예컨대, 이의 모든 구성요소를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 이외의 벡터 상에 존재한다. 실시양태에서, T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자를 코딩하는 핵산 분자는 CAR-발현 세포 내에서 일시적으로 발현된다. 실시양태에서, T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자를 코딩하는 핵산 분자는 CAR-발현 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합된다. T-세포 기능을 조정 또는 조절하는, 예컨대, 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자와 함께 CAR의 구성요소, 예컨대, 이의 모든 구성요소를 발현하기 위한 예시적인 벡터의 구성은 예컨대, 본원에 참조로 원용되는 2014 년 12 월 19 일자로 출원된 국제 공개공보 WO20 15/090230의 도 47에 제공된다.

[0490] 실시양태에서, 본원에 기재된 요법, 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포)는 항-간질제, 예컨대, 아세타졸아미드, 비바르아세탐, 카바마제핀, 클로바잠, 클로나제팜, 에슬리카르바제핀 아세테이트, 에토석시미드, 가바펜틴, 라코사미드, 라모트리진, 레베티르아세탐, 옥스카바제핀, 페람파넬, 페노바르비탈, 페니토인, 피라세탐, 프레가발린, 프리미돈, 루디나미드, 소듐 발프로에이트, 스티리펜톨, 티아가빈, 토피라메이트, 발프로산, 비가바트린, 조니스아미드와 조합하여 투여된다. Weller et al. Lancet 13.9 (2012):e375-e382 참고. 실시양태에서, 항 간질제는 본원에 기재된 요법, 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포) 전에 발작을 예방하기에 효과적인 양으로 투여된다. 실시양태에서, 항-간질제의 투여는 임의로 본원에 기재된 요법, 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포)의 투여 내내 및 후에 계속된다. 실시양태에서, 본원에 기재된 요법, 예컨대, CAR-발현 세포 (예컨대, GCC CAR-발현 세포)는 항-간질제 및 방사선과 조합하여 치료에 사용될 수 있다.

[0491] 사이토카인 방출 증후군 (CRS)

[0492] 사이토카인 방출 증후군 (CRS)은 암 면역요법, 예컨대, 암 항체 요법 또는 T 세포 면역요법 (예컨대, CAR T 세포)의 결과로서 발생할 수 있는 잠재적으로 생명을 위협하는 사이토카인-연관된 독성이다. CRS는 많은 수의 림프구 및/또는 골수 세포가 활성화 시 염증성 사이토카인을 방출할 때 높은-수준의 면역 활성화로 인해 발생한다. CRS의 중증도 및 증상의 개시의 시기는 면역 세포 활성화의 크기, 투여된 요법의 유형 및/또는 대상체에서의 종양 부담의 정도에 따라 달라질 수 있다. 암에 대한 T-세포 요법의 경우, 증상 개시는 전형적으로 T-세포 요법의 투여 후 수일 내지 수주, 예컨대, 생체내 T-세포 확장이 피크일 때이다. 예컨대, Lee et al.

Blood. 124.2(2014): 188-95 참고.

[0493] CRS의 증상은 신경학적 독성, 파종성 혈관내 응고, 심장 기능장애, 성인 호흡 곤란 증후군, 신부전 및/또는 간부전을 포함할 수 있다. 예를 들어, CRS의 증상은 고열, 메스꺼움, 일시적인 저혈압, 및 저산소증 등을 포함한다. CRS는 임상 체질 징후 및 증상, 예컨대, 발열, 피로, 식욕부진, 근육통, 관절통, 메스꺼움, 구토 및 두통을 포함할 수 있다. CRS는 임상 피부 징후 및 증상, 예컨대, 발진을 포함할 수 있다. CRS는 임상 위장 징후 및 증상, 예컨대, 메스꺼움, 구토 및 설사를 포함할 수 있다. CRS는 임상적 호흡기 징후 및 증상, 예컨대, 빈호흡 및 저산소혈증을 포함할 수 있다. CRS는 임상적 심혈관 징후 및 증상, 예컨대, 빈맥, 넓어진 맥압, 저혈압, 증가된 심박출량 (초기) 및 잠재적으로 저하된 심박출량 (후기)을 포함할 수 있다. CRS는 임상적 응고 징후 및 증상, 예컨대, 상승된 d-이합체, 출혈이 있거나 없는 저섬유소원혈증을 포함할 수 있다. CRS는 임상적 신장 징후 및 증상, 예컨대, 질소혈증을 포함할 수 있다. CRS는 임상적 간 징후 및 증상, 예컨대, 아미노전이염 및 고빌리루빈혈증을 포함할 수 있다. CRS는 임상 신경학적 징후 및 증상, 예컨대, 두통, 정신 상태 변화, 혼란, 섬망, 단어 찾기 어려움 또는 프랭크 실어증, 환각, 떨림, 운동 거리 측정 장애, 보행 이상 및 발작을 포함할 수 있다.

[0494] IL-6은 CRS 독성의 매개자로 여겨진다. 예컨대, id 참고. 높은 IL-6 수준은 전염증성 IL-6 시그널링 캐스케이드를 개시하여, CRS 증상 중 하나 이상을 야기할 수 있다. 일부 경우에, C-반응성 단백질 (CRP)(예컨대, IL-6에 반응하여 간에서 생산되는 생체분자)의 수준이 IL-6 활성의 척도일 수 있다. 일부 경우에, CRS 동안 CRP 수준이 몇 배 (예컨대, 여러 로그) 증가할 수 있다. CRP 수준은 본원에 기재된 방법 및/또는 당업계에서 이용가능한 표준 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0495] CRS 등급

[0496] 일부 실시양태에서, CRS는 다음과 같은 1-5로부터의 중증도로 등급화될 수 있다. 등급 1-3은 중증보다 낮은 CRS이다. 등급 4-5는 중증 CRS이다. 등급 1 CRS의 경우, 증상적 치료 (예컨대, 메스꺼움, 열, 피로, 근육통, 불쾌감, 두통)만 필요하며, 증상은 생명을 위협하지 않는다. 등급 2 CRS의 경우, 증상은 중등도의 개입이 필요하며, 일반적으로 중등도의 개입에 반응한다. 등급 2 CRS를 갖는 대상체는 체액 또는 하나의 저-용량 승압제에 반응성인 저혈압이 발달하거나; 이들은 낮은 유량의 산소 (<40% 산소)에 반응성인 등급 2 장기 독성 또는 경미한 호흡기 증상이 발달한다.

[0497] 등급 3 CRS 대상체에서, 저혈압은 일반적으로 체액 요법 또는 하나의 저 용량 승압제로 역전될 수 없다. 이들 대상체는 일반적으로 낮은 유량보다 많은 산소를 필요로 하고, 등급 3 장기 독성 (예컨대, 신장 또는 심장 기능장애 또는 응고병증) 및/또는 등급 4 아미노전이염을 갖는다. 등급 3 CRS 대상체는 보다 적극적인 개입, 예컨대, 40% 이상의 산소, 고 용량 승압제(들) 및/또는 다중 승압제가 필요하다. 등급 4 CRS 대상체는 등급 4 장기 독성 또는 기계적 환기의 필요성을 포함하여 즉각적인 생명을 위협하는 증상을 앓고 있다. 등급 4 CRS 대상체는 일반적으로 아미노전이염을 갖지 않는다. 등급 5 CRS 대상체에서, 독성은 사멸을 유발한다. 예를 들어, CRS를 등급화하기 위한 기준은 본원에서 표 9로서 제공된다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 CRS는 표 9의 기준에 따른 CRS를 지칭한다.

[0498] 표 9. CRS 등급

Gr1	지지 케어만
Gr2	IV 요법+/- 입원.
Gr3	IV 수액 또는 저-용량 혈관작용제가 필요한 저혈압, 또는 산소, CPAP 또는 BIPAP가 필요한 저산소혈증.
Gr4	고-용량의 혈관작용제가 필요한 저혈압, 또는 기계장치가 필요한 저산소혈증
Gr5	사멸

[0499]

[0500] CRS 요법

[0501] CRS에 대한 요법은 IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙 또는 실툭시맙), sgp130 차단제, 혈관작용 의약, 코르티코스테로이드, 면역억압제 및 기계적 환기를 포함한다. CRS에 대한 예시적인 요법은 본원에 참조로 원용되는 국제 출원 WO2014011984에 기재되어 있다.

[0502] 토실리주맙은 인간화된 면역글로불린 G1카파 항-인간 IL-6R 단클론 항체이다. 예컨대, id 참고. 토실리주맙은 가용성 및 막 결합된 IL-6 수용체 (IL-6R)에 대한 IL-6의 결합을 차단하므로, 고전적 및 트랜스-IL-6 시그널링을 억제한다. 실시양태에서, 토실리주맙은 약 4-12 mg/kg, 예컨대, 성인의 경우 약 4-8 mg/kg 및 소아 대상체의 경우 약 8-12 mg/kg의 용량으로 투여되며, 예컨대, 1 시간의 과정에 걸쳐 투여된다. 일부 실시양태에서, CRS 치료제는 IL-6 시그널링의 억제제, 예컨대, IL-6 또는 IL-6 수용체의 억제제이다. 일 실시양태에서, 억제제는 항-IL-6 항체, 예컨대, 항-IL-6 키메라 단클론 항체, 예컨대, 실툭시맙이다. 다른 실시양태에서, 억제제는 IL-6 시그널링을 차단할 수 있는 가용성 gp130 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, sgp130 또는 이의 단편은 이종 도메인, 예컨대, Lc 도메인에 융합되며, 예컨대, gp130-Lc 융합 단백질, 예컨대, LE301이다. 실시양태에서, IL-6 시그널링의 억제제는 항체, 예컨대, IL-6 수용체에 대한 항체, 예컨대, 사릴루맙, 올로키주맙 (CDP6038), 엘실리모맙, 심쿠맙 (CNTO 136), ALD518/BMS-945429, ARGX-109 또는 LM101을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-6 시그널링의 억제제는 CPST2364와 같은 소분자를 포함한다.

[0503] 예시적인 혈관활성 의약은 안지오텐신-II, 엔도텔린-1, 알파 아드레날린 작용제, 로스타노이드, 포스포디에스테라제 억제제, 엔도텔린 길항제, 수축촉진제 (예컨대, 아드레날린, 도부타민, 이소프레날린, 에페드린), 승압제 (예컨대, 노르아드레날린, 바소프레신, 메타라미놀, 바소프레신, 메틸렌 블루), 강심제 (예컨대, 밀리논, 레보시멘단) 및 도파민을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 승압제는 노르에피네프린, 도파민, 페닐에프린, 에피네프린 및 바소프레신을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 고-용량 승압제는 다음 중 하나 이상을 포함한다: >20 ug/분의 노르페피네프린 단독요법, >10 ug/kg/분의 도파민 단독요법, >200 ug/분의 페닐에프린 단독요법, 및/또는 >10 ug/분의 에피네프린 단독요법. 일부 실시양태에서, 대상체가 바소프레신을 복용하는 경우, 고-용량 승압제는 바소프레신 + >10 ug/분의 노르에피네프린 등가물을 포함하며, 여기서 노르에피네프린 등가 용량 = [노르에피네프린 (ug/분)] + [도파민 (ug/kg/분) / 2] + [에피네프린 (ug/분)] + [페닐에프린 (ug/분) / 10]. 일부 실시양태에서, 대상체가 조합 승압제 (바소프레신이 아님)을 복용하는 경우, 고-용량 승압제는 >20 ug/분의 노르에피네프린 등가물을 포함하며, 여기서 노르에피네프린 등가 용량 = [노르에피네프린 (ug/분)] + [도파민 (ug/kg/분) / 2] + [에피네프린 (ug/분)] + [페닐에프린 (ug/분) / 10]. 예컨대, Id 참고.

[0504] 일부 실시양태에서, 저-용량 승압제는 고-용량 승압제에 대해 위에 나열된 용량 중 하나 이상보다 적은 용량으로 투여되는 승압제이다. 예시적인 코르티코스테로이드는 덱사메타손, 하이드로코르티손 및 메틸프레드니솔론을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 실시양태에서, 0.5 mg/kg의 덱사메타손의 용량이 사용된다. 실시양태에서, 10 mg/용량의 덱사메타손의 최대 용량이 사용된다. 실시양태에서, 2 mg/kg/일의 메틸프레드니솔론의 용량이 사용된다.

[0505] 예시적인 면역억압제는 TNFa의 억제제 또는 IL-1의 억제제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 실시양태에서, TNFa의 억제제는 항-TNFa 항체, 예컨대, 단클론 항체, 예컨대, 인플릭시맙을 포함한다. 실시양태에서, TNFa의 억제제는 가용성 TNFa 수용체 (예컨대, 에타너셉트)를 포함한다. 실시양태에서, IL-1 또는 IL-1R 억제제는 아나킨라를 포함한다.

[0506] 일부 실시양태에서, 중증의 CRS가 발달할 위험이 있는 대상체에 항-IFN-감마 또는 항-sIF2Ra 요법, 예컨대, IFN-감마 또는 sIF2Ra에 대해 지시된 항체 분자가 투여된다.

[0507] 실시양태에서, 블리나투모맙과 같은 치료적 항체 분자를 받았고 CRS를 갖거나 CRS가 발달할 위험이 있는 대상체의 경우, 치료적 항체 분자는 더 낮은 용량 및/또는 더 낮은 빈도로 투여되거나, 치료적 항체 분자의 투여가 중단된다.

[0508] 실시양태에서, CRS를 갖거나 CRS가 발생할 위험이 있는 대상체는 아세트아미노펜과 같은 해열 의약으로 치료된다. 실시양태, 본원의 대상체에 임의의 조합으로, 예컨대, 본원에 기재된 CAR-발현 세포와 조합하여, 본원에 기재된 CRS에 대한 하나 이상의 요법, 예컨대, IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙), 혈관작용 의약, 코르티코스테로이드, 면역억압제, 또는 기계적 환기 중 하나 이상이 투여되거나 제공된다.

[0509] 실시양태에서, CRS (예컨대, 중증의 CRS)가 발달할 위험이 있는 대상체 (예컨대, 중증의 CRS가 발달할 고 위험 상태를 갖는 것으로서 식별됨)에 임의의 조합으로, 예컨대, 본원에 기재된 CAR-발현 세포와 조합하여, 본원에 기재된 CRS에 대한 하나 이상의 요법, 예컨대, IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙), 혈관작용 의약, 코르티코스테로이드, 면역억압제 또는 기계적 환기 중 하나 이상이 투여된다.

[0510] 실시양태에서, 본원의 대상체 (예컨대, 중증의 CRS가 발달할 위험이 있는 대상체 또는 중증의 CRS가 발달할 위

험이 있는 것으로서 식별된 대상체)는 중환자실로 이송된다. 일부 실시양태에서, 본원의 대상체 (예컨대, 중증의 CRS가 발달할 위험이 있는 대상체 또는 중증의 CRS가 발달할 위험이 있는 것으로서 식별된 대상체)는 CRS와 연관된 하나 이상의 증상 또는 병태, 예컨대, 발열, 상승된 심박수, 응고병증, MODS (다발성 장기 기능장애 증후군), 심혈관 기능장애, 분배성 쇼크, 심근병증, 간 기능장애, 신장 기능장애, 뇌병증, 임상적 발작, 호흡 부전 또는 빈맥에 대해 모니터링된다. 일부 실시양태에서, 본원의 방법은 CRS와 연관된 증상 또는 병태 중 하나에 대한 요법을 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 실시양태에서, 예컨대, 대상체에 응고병증이 발달하는 경우, 방법은 동결침전물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예컨대, 대상체에 심혈관 기능장애가 발달하는 경우, 방법은 혈관활성 주입 지지를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예컨대, 대상체에 분배성 쇼크가 발달하는 경우, 방법은 알파-작용제 요법을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예컨대, 대상체에 심근병증이 발달하는 경우, 방법은 밀리논 요법을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예컨대, 대상체에 호흡 부전이 발달하는 경우, 방법은 기계적 환기 (예컨대, 침습적 기계적 환기 또는 비침습적 기계적 환기)를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예컨대, 대상체에 쇼크가 발달하는 경우, 방법은 결정질 및/또는 콜로이드성 유체를 투여하는 단계를 포함한다. 실시양태에서, CAR-발현 세포는 본원에 기재된 CRS에 대한 하나 이상의 요법, 예컨대, IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙), 혈관작용 의약, 코르티코스테로이드, 면역억압제 또는 기계적 환기 중 하나 이상의 투여 전에, 이와 병행하여, 또는 이에 후속적으로 투여된다. 실시양태에서, CAR-발현 세포는 본원에 기재된 CRS에 대한 하나 이상의 요법, 예컨대, IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙), 혈관활성 의약, 코르티코스테로이드, 면역억압제 또는 기계적 환기 중 하나 이상의 투여의 2 주 이내에 (예컨대, 2 또는 1 주 이내, 또는 14 일 이내에, 예컨대, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 일 이하 이내에) 투여된다. 실시양태에서, CAR-발현 세포는 본원에 기재된 CRS에 대한 하나 이상의 요법, 예컨대, IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙), 혈관작용 의약, 코르티코스테로이드, 면역억압제 또는 기계적 환기 중 하나 이상의 투여 전 또는 후 1 일 이상 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 또는 3 개월 이상) 투여된다.

[0511] 실시양태에서, 본원의 대상체 (예컨대, 중증의 CRS가 발달할 위험이 있는 대상체 또는 중증의 CRS가 발달할 위험이 있는 것으로서 식별된 대상체)에 단일 용량의 IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙)이 투여된다. 실시양태에서, 대상체에 IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙)의 복수의 용량 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 또는 6 회 이상의 용량)이 투여된다.

[0512] 실시양태에서, CRS (예컨대, 중증의 CRS)가 발생할 위험이 낮거나 없는 대상체 (예컨대, 중증의 CRS가 발달할 위험이 낮은 상태를 갖는 것으로서 식별됨)에 본원에 기재된 CRS에 대한 요법, 예컨대, IL-6 억제제 또는 IL-6 수용체 (IL-6R) 억제제 (예컨대, 토실리주맙), 혈관작용 의약, 코르티코스테로이드, 면역억압제 또는 기계적 환기 중 하나 이상이 투여되지 않는다.

[0513] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 의해 치료되는 대상체는 낮은 중증도의 CRS, 예컨대, 등급 1, 등급 2 또는 등급 3을 갖는다.

[0514] 실시양태에서, 생존가능한 CAR-발현 세포는 상승하는 용량으로 투여된다. 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량보다 더 크며, 예컨대, 10%, 20%, 30%, 또는 50% 더 크다. 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량의 크기의 2 배, 3 배, 4 배 또는 5 배이다. 실시양태에서, 제3 용량은 제2 용량보다 더 크며, 예컨대, 10%, 20%, 30%, 또는 50% 더 크다. 실시양태에서, 제3 용량은 제2 용량의 크기의 2 배, 3 배, 4 배 또는 5 배이다.

[0515] 특정 실시양태에서, 방법은 다음의 a)-h) 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 개 또는 모두를 포함한다:

[0516] a) 제1 용량으로 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 수는 제2 용량으로 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 수의 1/3 이하임;

[0517] b) 제1 용량으로 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 수는 투여된 CAR 발현, 생존가능한 세포의 총 수의 1/X 이하이며, 여기서 X는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50임;

[0518] c) 제1 용량으로 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 수는 1 x 107, 2 x 107, 3 x 107, 4 x 107, 5 x 107, 6 x 107, 7 x 107, 8 x 107, 9 x 107, 1 x 108, 1.75 x 108, 2 x 108, 3 x 108, 4 x 108, 또는 5 x 108 개 이하의 CAR-발현, 생존가능한 세포이며, 제2 용량은 제1 용량보다 더 큼;

[0519] d) 제2 용량으로 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 수는 제3 용량으로 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 수의 1/2 이하임;

[0520] e) 제2 용량으로 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 수는 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 총 수의 1/Y 이하이며, 여기서 Y는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50임;

[0521] f) 제2 용량으로 투여된 CAR-발현, 생존가능한 세포의 수는 1 x 107, 2 x 107, 3 x 107, 4 x 107, 5 x 107, 6 x 107, 7 x 107, 8 x 107, 9 x 107, 1 x 108, 1.75 x 108, 2 x 108, 3 x 108, 4 x 108, 또는 5 x 108 개 이하의 CAR-발현, 생존가능한 세포이며, 제3 용량은 제2 용량보다 더 큼;

[0522] h) 제1, 제2 및 임의로 제3 용량의 투여량 및 투여 기간은 대상체가 4, 3, 2 또는 1 이하의 수준에서 CRS를 경험하도록 선택됨.

[0523] 실시양태에서, 총 용량은 약 5 x 108 개의 CAR-발현, 생존가능한 세포이다. 실시양태에서, 총 용량은 약 5 x 107 - 5 x 108 개의 CAR-발현, 생존가능한 세포이다. 실시양태에서, 제1 용량은 약 5 x 107 (예컨대, ±10%, 20%, 또는 30%) 개의 CAR-발현, 생존가능한 세포이고, 제2 용량은 약 1.5 x 108 (예컨대, ±10%, 20%, 또는 30%) 개의 CAR-발현, 생존가능한 세포이고, 제3 용량은 약 3 x 108 (예컨대, ± 10%, 20% 또는 30%) 개의 CAR-발현, 생존가능한 세포이다.

[0524] 실시양태에서, 대상체는 용량을 받은 후, 예컨대, 제1 용량, 제2 용량 및/또는 제3 용량을 받은 후 CRS에 대해 평가된다.

[0525] 실시양태에서, 대상체는 CRS 치료, 예컨대, 토실리주맙, 코르티코스테로이드, 에타너셉트 또는 실툭시맙을 받는다. 실시양태에서, CRS 치료는 CAR 분자를 포함하는 세포의 제1 용량 전 또는 후에 투여된다. 실시양태에서, CRS 치료는 CAR 분자를 포함하는 세포의 제2 용량 전 또는 후에 투여된다. 실시양태에서, CRS 치료는 CAR 분자를 포함하는 세포의 제3 용량 전 또는 후에 투여된다. 실시양태에서, CRS 치료는 CAR 분자를 포함하는 세포의 제1 용량 및 제2 용량 사이에, 및/또는 CAR 분자를 포함하는 세포의 제2 용량 및 제3 용량 사이에 투여된다.

[0526] 실시양태에서, 제1 용량 후 CRS, 예컨대, CRS 등급 1, 2, 3 또는 4를 갖는 대상체에서, 제2 용량은 제1 용량 후 2, 3, 4 또는 5 일 이상 투여된다. 실시양태에서, 제2 용량 후 CRS, 예컨대, CRS 등급 1, 2, 3 또는 4를 갖는 대상체에서, 제3 용량은 제2 용량 후 2, 3, 4 또는 5 일 이상 투여된다. 실시양태에서, 제1 용량 후 CRS를 갖는 대상체에서, CAR-발현 세포의 제2 용량은 대상체가 CRS를 갖지 않았더라면 제2 용량이 투여되었을 때에 비해 지연된다. 실시양태에서, 제2 용량 후 CRS를 갖는 대상체에서, CAR-발현 세포의 제3 용량은 대상체가 CRS를 갖지 않았더라면 제3 용량이 투여되었을 때에 비해 지연된다.

[0527] 실시양태에서, 대상체는 제1 용량이 투여되기 전에 높은 질환 부담을 갖는 암을 갖는다. 실시양태에서, 대상체는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이상, 예컨대, 5% 이상의 골수 모세포 수준을 갖는다. 실시양태에서, 대상체는 I기, II기, III기 또는 IV기의 암을 갖는다. 실시양태에서, 대상체는 예컨대, 단일 종양 또는 복수의 종양에서 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 또는 1000 g 이상의 종양 덩어리를 갖는다.

[0528] 일부 실시양태에서, 대상체는 암 (예컨대, 결장직장암)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 GCC 발현과 연관된 질환이다. 실시양태에서, CAR 분자는 본원에 기재된 바와 같은 CAR 분자이다.

[0529] 일 양태에서, CAR-발현 세포, 예컨대, GCC CAR-발현 세포는 렌티바이러스와 같은 렌티바이러스 바이러스 벡터를 사용하여 생성된다. 이런 방식으로 생성된 CAR-발현 세포는 안정한 CAR 발현을 가질 것이다. 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스로부터 유래된 벡터는 트랜스진의 장기의 안정한 통합 및 이의 딸 세포에서의 전파를 허용하기 때문에 장기의 유전자 전달을 달성하는 데 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 비증식 세포, 예컨대, 간세포를 형질도입할 수 있다는 점에서 뮤린 백혈병 바이러스와 같은 종양-레트로바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 부가적인 이점을 갖는다. 이들은 또한 낮은 면역원성의 부가적인 이점을 갖는다. 레트로바이러스 벡터는 또한 예컨대, 감마레트로바이러스 벡터일 수 있다. 감마레트로바이러스 벡터는 예컨대, 프로모터, 패키징 신호 (y), 프라이머 결합 부위 (PBS), 하나 이상 (예컨대, 2 개)의 긴 말단 반복부 (LTR) 및 관심 있는 트랜스진, 예컨대, CAR을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 감마레트로바이러스 벡터에는 바이러스 구조 유전자, 예컨대, gag, pol 및 env가 결여될 수 있다. 예시적인 감마레트로바이러스 벡터는 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV), 비장-집중 형성 바이러스 (SFFV) 및 골수증식성 육종 바이러스 (MPSV) 및 이들로부터 유래된 벡터를 포함한다. 다른 감마레트로바이러스 벡터는 예컨대, Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713에 기재되어 있다.

[0530] 일 양태에서, CAR-발현 세포는 형질도입 후 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 일 동안 CAR 벡터를 일시적으로 발현한다. CAR의 일시적인 발현은 RNA CAR 벡터 전달에 의해 영향을 받을 수 있다. 일 양태에서, CAR RNA는 전기천공에 의해 T 세포 내로 형질도입된다.

[0531] 일시적으로 발현하는 CAR-발현 세포를 사용하여 (특히 뮤린 scFv 보유 CAR-발현 세포를 이용하여) 치료될 환자에서 발생할 수 있는 잠재적 문제는 다중 치료 후 아나필락시스이다. 이 이론에 얽매이지 않고, 이러한 아나필락시스 반응은 체액성 항-CAR 반응, 즉, 항-IgE 아이소타입을 갖는 항-CAR 항체를 발달시키는 환자에 의해 유발될 수 있는 것으로 여겨진다. 항원에 노출된 지 10 내지 14 일의 휴식이 있을 때 환자의 항체 생산 세포는 IgG 아이소타입 (아나필락시스를 유발하지 않음)에서 IgE 아이소타입으로 클래스 스위치를 겪는 것으로 여겨진다.

[0532] 환자가 일시적인 CAR 요법 (예컨대, RNA 형질도입에 의해 생성된 것들)의 과정 동안 항-CAR 항체 반응을 생성할 위험이 높은 경우, CAR-발현 세포 주입의 휴식은 10 내지 14 일보다 오래 지속되어서는 안 된다.

[0533] **조성물**

[0534] 개시된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체, 항원 결합 단편, 컨쥬게이트, CAR 또는 담체 (예컨대, 약학적으로 허용가능한 담체)로 본원에 개시된 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 CAR을 발현하는 T 세포 중 하나 이상을 포함하는 유전자 요법, 면역요법 및/또는 세포 요법에 사용하기 위한 조성물이 본원에 제공된다. 조성물은 대상체에 투여하기 위한 유닛 투여량 형태로 제조될 수 있다. 투여의 양 및 시기는 원하는 결과를 달성하기 위해 치료하는 임상의의 재량에 따른다. 조성물은 전신 (예컨대, 정맥내) 또는 국소 (예컨대, 종양-내) 투여를 위해 제형화될 수 있다. 일 예에서, 개시된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체, 항원 결합 단편, 컨쥬게이트는 비경구 투여, 예컨대, 정맥내 투여를 위해 제형화된다. 본원에 개시된 바와 같은 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 컨쥬게이트, 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 조성물은, 예를 들어, 종양, 예를 들어, 제한 없이, 신경모세포종의 치료 및 검출을 위해 사용된다. 일부 예에서, 조성물은 암종의 치료 또는 검출에 유용하다. 본원에 개시된 바와 같은 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 컨쥬게이트, 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 조성물은 또한 예를 들어, 병리학적 혈관신생의 검출을 위해 사용된다.

[0535] 투여용 조성물은 수성 담체와 같은 약학적으로 허용가능한 담체에 용해된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 컨쥬게이트, 항체 또는 항원 결합 단편의 용액을 포함할 수 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어, 완충된 식염수 등이 사용될 수 있다. 이들 용액은 멸균상태이며 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 없다. 이들 조성물은 종래의 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 생리적 조건을 근접시키는 데 필요한 약학적으로 허용가능한 보조 물질, 예컨대, pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제, 및 아쥬반트 약제 등, 예를 들어, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 칼슘 클로라이드, 및 소듐 락테이트 등을 함유할 수 있다. 이들 제형에서 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 항원 결합 단편 또는 컨쥬게이트의 농도는 광범위하게 변할 수 있고, 선택된 특정 투여 모드 및 대상체의 필요에 따라 유체 부피, 점도, 및 체중 등에 기반하여 주로 선택될 것이다. 유전자 요법, 면역요법 및/또는 세포 요법에 사용하기 위한 이러한 투여량 형태를 제조하는 실제 방법은 당업자에게 알려져 있거나, 명백할 것이다.

[0536] 일부 실시양태에서, 조성물은 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 조합된 GCC CAR을 포함한다. 이러한 조성물은 완충액, 예컨대, 중성 완충된 식염수, 및 포스페이트 완충된 식염수 등; 탄수화물, 예컨대, 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 덱스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대, 글리신; 항산화제; 킬레이팅제, 예컨대, EDTA 또는 글루타티온; 아쥬반트 (예컨대, 알루미늄 하이드록시드); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 일 양태에서 정맥내 투여용으로 제형화된다.

[0537] 본 발명의 약학 조성물은 치료될 (또는 예방될) 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여의 수량 및 빈도는 환자의 병태, 환자의 질환의 유형 및 중증도의 이러한 인자에 의해 결정될 것이나, 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있다.

[0538] 일 실시양태에서, 약학 조성물은 예컨대, 내독소, 마이코플라스마, 복제 적격 렌티바이러스 (RCL), p24, VSV-G 핵산, HIV gag, 잔류 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드, 마우스 항체, 풀링된 인간 혈청, 소 혈청 알부민, 소 혈청, 배양 배지 구성요소, 벡터 패키징 세포 또는 플라스미드 구성요소, 박테리움 및 진균으로 이루어진 군으로부터 선택된 오염물질이 실질적으로 없으며, 예컨대, 이의 검출가능한 수준이 없다. 일 실시양태에서, 박테리움은 알칼리게네스 패칼리스, 칸디다 알비칸스, 대장균, 헤모필루스 인플루엔자, 나이세리아 메닌기티데스, 슈도모나스 아에루기노사, 스타필로코커스 아우레우스, 스트렙토코커스 뉴모니아 및 스트렙토코커스 파이오게네스 그룹 A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이다.

[0539] 일 양태에서, 본 발명은 CAR-발현 세포, 예컨대, CART 세포 또는 CAR-발현 NK 세포의 집단을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명은 다른 약제, 예컨대, 키나제 억제제, 예컨대, 본원에 기재된 키나제 억제제와 조합하여, CAR-발현 세포 (예컨대, CART 세포 또는 CAR-발현 NK 세포)의 집단을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0540] 다른 양태에서, 발명은 본원에 기재된 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 세포, 예컨대, 인간 T 세포, 예컨대, 본원에 기재된 인간 T 세포이다. 일 실시양태에서, 인간 T 세포는 CD8+ T 세포이다.

[0541] 다른 양태에서, 발명은 본원에 기재된 세포, 예컨대, 본원에 기재된 T 세포를, CAR, 예컨대, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질도입하는 단계를 포함하는, 세포의 제조 방법에 관한 것이다.

[0542] 본 발명은 또한 외인성 RNA를 일시적으로 발현하는 RNA 조작된 세포, 예컨대, 본원에 기재된 세포, 예컨대, T 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공한다. 방법은 생체외 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 세포 내로 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 RNA는 본원에 기재된 CAR 분자를 코딩하는 핵산을 포함한다.

[0543] 본원에 기재된 임의의 방법 및 조성물 중 임의의 것의 실시양태에서, CAR을 포함하는 세포는 CAR을 코딩하는 핵산을 포함한다. 일 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산은 렌티바이러스 벡터이다. 일 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산은 렌티바이러스 형질도입에 의해 세포 내로 도입된다. 일 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산은 RNA, 예컨대, 생체외 전사된 RNA이다. 일 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산은 전기천공에 의해 세포 내로 도입된다.

[0544] 본원에 기재된 방법 및 조성물 중 임의의 것의 실시양태에서, 세포는 T 세포 또는 NK 세포이다. 일 실시양태에서, T 세포는 자가유래 또는 동종이계 T 세포이다.

[0545] 정맥내 투여를 위한 전형적인 조성물은 1 일당 대상체당 약 0.01 내지 약 30 mg/kg의 항체 또는 항원 결합 단편 또는 컨쥬게이트 (또는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 컨쥬게이트의 상응하는 용량)를 포함한다. 투여가능한 조성물을 제조하기 위한 실제 방법은 알려져 있거나, 당업자에게 명백할 것이며, Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)와 같은 이러한 공개물에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0546] CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체, 항원 결합 단편, 또는 컨쥬게이트는 동결건조된 형태로 제공될 수 있고, 투여 전에 멸균수로 재수화될 수 있지만, 이들은 또한 알려진 농도의 멸균 용액으로 제공된다. 이어서, CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 항원 결합 단편 또는 컨쥬게이트 용액을 0.9% 소듐 클로라이드, USP를 함유하는 주입 백에 첨가하고, 일부 경우에, 0.5 내지 15 mg/체중 kg의 투여량으로 투여한다. 항체 또는 항원 결합 단편 및 컨쥬게이트 약물의 투여에 있어서 상당한 경험이 당업계에서 이용가능하며; 예를 들어, 항체 약물은 1997년에 리툭산®의 승인 이후 미국에서 시판되었다. CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체, 이의 항원 결합 단편 및 컨쥬게이트는 정맥 푸시 또는 볼루스보다는 느린 주입에 의해 투여될 수 있다. 일 예에서, 더 높은 로딩 용량이 투여되고, 후속적으로, 유지 용량이 더 낮은 수준으로 투여된다. 예를 들어, 4 mg/kg의 항체 또는 항원 결합 단편의 초기 로딩 용량 (또는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 컨쥬게이트의 상응하는 용량)이 90 분 정도의 기간에 걸쳐 주입될 수 있으며, 이어서 사전 용량이 내약성이 좋은 경우 30 분 기간에 걸쳐 주입된 2 mg/kg의 4-8 주 동안의 주간 유지 용량이 주입될 수 있다.

[0547] 제어 방출 비경구 제형은 임플란트, 유성 주사제 또는 미립자 시스템으로서 만들어질 수 있다. 단백질 전달 시스템의 광범위한 개요에 대해 Banga, A. J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995)를 참고한다. 미립자 시스템은 마이크로스피어, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 나노캡슐, 나노구 및 나노입자를 포함한다. 마이크로캡슐은 치료적 단백질, 예컨대, 세포독소 또는 약물을 중심 코어로서 함유한다. 마이크로스피어에서, 치료제는 입자 전체에 분산된다. 약 1 μm보다 작은 입자, 마이크로스피어 및 마이크로캡슐은 일반적으로 각각 나노입자, 나노스피어 및 나노캡슐로서 지칭된다. 모세혈관은 대략 5 μm의 직경을 가져, 나노입자만이 정맥으로 투여된다. 마이크로입자는 전형적으로 약 100 μm의 직경이며 피하 또는 근육내로 투여된다. 예를 들어, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 219-342 (1994); 및 Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y., pp. 315-339, (1992) 참고.

[0548] 중합체는 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 본원에 개시된 항원 결합 단편 또는 컨쥬게이트 조성물의 이온-제어 방출을 위해 사용될 수 있다. 제어된 약물 전달에 사용하기 위한 다양한 분해성 및 비분해성 중합

체 매트릭스가 당업계에 알려져 있다 (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993). 예를 들어, 블록 공중합체인 폴락사머 407은 저온에서는 점성이 있지만 유동적인 액체로서 존재하지만 체온에서는 반고체 젤을 형성한다. 이는 재조합 인터류킨-2 및 우레아제의 제형화 및 지속적인 전달을 위한 효과적인 비히클인 것으로 나타났다 (Johnston et al., Pharm. Res. 9:425-434, 1992; and Pec et al., J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990). 대안적으로, 하이드록시아파타이트는 단백질의 제어 방출을 위한 마이크로담체로서 사용되어 왔다 (Ijntema et al., Int. J. Pharm. 112:215-224, 1994). 또 다른 양태에서, 리포솜은 지질-캡슐화된 약물의 약물 표적화뿐만 아니라 제어 방출을 위해 사용된다 (Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa. (1993)). 치료적 단백질의 제어된 전달을 위한 수많은 추가적인 시스템이 알려져 있다 (미국 특허 번호 5,055,303; 5,188,837; 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; 4,957,735; 5,019,369; 5,055,303; 5,514,670; 5,413,797; 5,268,164; 5,004,697; 4,902,505; 5,506,206; 5,271,961; 5,254,342 및 5,534,496 참고).

[0549] **키트**

[0550] 일 양태에서, 본원에 개시된 CAR을 사용하는 키트가 또한 제공된다. 예를 들어, 대상체에서 종양을 치료하기 위한 키트, 또는 본원에 개시된 CAR 중 하나 이상을 발현하는 CAR T 세포를 제조하기 위한 키트. 키트는 전형적으로 개시된 항체, 항원 결합 단편, 컨쥬게이트, 핵산 분자, CAR 또는 본원에 개시된 바와 같은 CAR을 발현하는 T 세포를 포함할 것이다. 개시된 항체, 항원 결합 단편, 컨쥬게이트, 핵산 분자, CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포 중 하나 초과가 키트에 포함될 수 있다.

[0551] 키트는 용기 및 표지 또는 용기 상의 또는 용기와 연관된 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 용기는 전형적으로 개시된 항체, 항원 결합 단편, 컨쥬게이트, 핵산 분자, CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 수용한다. 몇몇 실시양태에서, 용기는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피부밑 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알 또는 정맥내 용액 백일 수 있음). 표지 또는 패키지 삽입물은 조성물이 특정 병태를 치료하기 위해 사용됨을 나타낸다.

[0552] 표지 또는 패키지 삽입물은 전형적으로 예를 들어, 종양을 치료 또는 예방하는 방법에서 또는 CAR T 세포를 제조하는 방법에서, 개시된 항체, 항원 결합 단편, 컨쥬게이트, 핵산 분자, CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포의 사용에 대한 지침을 추가로 포함할 것이다. 패키지 삽입물은 전형적으로 이러한 치료적 생성물의 사용에 관한 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 치료적 생성물의 상업용 패키지에 관례적으로 포함된 지침을 포함한다. 지침 자료는 전자 형식 (예컨대, 컴퓨터 디스켓 또는 컴팩트 디스크)으로 작성되거나, 시각적일 수 있다 (예컨대, 비디오 파일). 키트는 또한 키트가 설계된 특정 적용을 용이하게 하기 위해 추가적인 구성요소를 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 키트는 추가적으로 표지를 검출하는 수단 (예컨대, 효소적 표지를 위한 효소 기질, 형광 표지를 검출하기 위한 필터 세트, 또는 이차 항체와 같은 적절한 이차 표지 등)을 함유할 수 있다. 키트는 추가적으로 특정 방법의 실시에 일상적으로 사용되는 완충액 및 기타 시약을 포함할 수 있다. 이러한 키트 및 적절한 내용물은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0553] **키메라 항원 수용체를 조절하기 위한 전략**

[0554] CAR 활성이 조절될 수 있는 많은 방법이 있다. 일부 실시양태에서, CAR 활성이 제어될 수 있는 조절가능한 CAR (RCAR)은 CAR 요법의 안전성 및 효험을 최적화하는 데 바람직하다. 예를 들어, 예컨대, 이합체화 도메인에 융합된 카스파제를 사용하여 아폽토시스를 유도하는 것 (예컨대, Di et al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3; 365(18):1673- 1683 참고)은 본 발명의 CAR 요법에서 안전성 스위치로서 사용된다. 다른 예에서, CAR-발현 세포는 또한 이합체화 약물 (예컨대, 리미두시드 (AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) 또는 AP20187 (Ariad)로 또한 칭함))의 투여 시 카스파제-9의 활성화 및 세포의 아폽토시스를 야기하는 유도성 카스파제-9 (i카스파제-9) 분자를 발현할 수 있다. i카스파제-9 분자는 CID의 존재 하에 이합체화를 매개하는 이합체화의 화학적 인듀서 (CID) 결합 도메인을 함유한다. 이는 CAR-발현 세포의 유도성 및 선택적인 고갈을 초래한다. 일부 경우에, i카스파제-9 분자는 CAR-코딩 벡터(들)와 분리된 핵산 분자에 의해 코딩된다. 일부 경우에, i카스파제-9 분자는 CAR-코딩 벡터와 동일한 핵산 분자에 의해 코딩된다. i카스파제-9는 CAR-발현 세포의 임의의 독성을 피하기 위한 안전성 스위치를 제공할 수 있다. 예컨대, Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; 및 Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83 참고.

[0555] 본 발명의 CAR 요법을 조절하기 위한 대안적인 전략은 예컨대, CAR-발현 세포를 결실시킴으로써, 예컨대, 항체 의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC)을 유도함으로써 CAR 활성을 불활성화시키거나 끄는 소분자 또는 항체를 활

용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또한 세포 사멸, 예컨대, ADCC 또는 보완-유도된 세포 사멸을 유도할 수 있는 분자에 의해 인식되는 항원을 발현할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 CAR 발현 세포는 또한 항체 또는 항체 단편에 의해 표적화될 수 있는 수용체를 발현할 수 있다. 이러한 수용체의 예는 EpCAM, VEGFR, 인테그린 (예컨대, 인테그린 anb3, a4, aI¾b3, a4b7, a5b1, anb3, an), TNF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원 (예컨대, TRAIL-R1, TRAIL-R2), PDGF 수용체, 인터페론 수용체, 폴레이트 수용체, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, IL-6 수용체, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1 1, CD1 1a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/lgE 수용체, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigin, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7, 및 EGFR, 및 이들의 절삭된 버전 (예컨대, 하나 이상의 세포외 에피토프를 보존하지만 세포질 도메인 내의 하나 이상의 영역이 결여된 버전)을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또한 시그널링 역량이 결여되지만 ADCC를 유도할 수 있는 분자, 예컨대, 세툭시맙 (ERBITUX®)에 의해 인식되는 에피토프를 보유하는 절삭된 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)를 발현할 수 있으며, 그에 따라 세툭시맙의 투여는 ADCC 및 후속적인 CAR-발현 세포의 고갈을 유도한다 (예컨대, WO2011/056894, 및 Jonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860 참고).

[0556] 다른 전략은 리툭시맙에 결합하여, 예컨대, ADCC에 의해 CAR-발현 세포의 선택적 고갈을 초래하는, 본원에 기재된 CAR-발현 세포에서 CD32 및 CD20 항원 둘 모두로부터의 표적 에피토프를 조합하는 매우 컴팩트한 마커/자살 유전자를 발현하는 것을 포함한다 (예컨대, Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287 참고). 본원에 기재된 CAR-발현 세포를 고갈시키는 다른 방법은 예컨대, ADCC를 유도함으로써 파괴를 위해 성숙한 림프구, 예컨대, CAR-발현 세포에 선택적으로 결합하고 이를 표적화하는 단클론 항-CD52 항체인 CAMPATH®의 투여를 포함한다. 다른 실시양태에서, CAR-발현 세포는 CAR 리간드, 예컨대, 항-이디오타입 항체를 사용하여 선택적으로 표적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-이디오타입 항체는 이펙터 세포 활성, 예컨대, ADCC 또는 ADC 활성을 유발하여, CAR-발현 세포의 수를 감소시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, CAR 리간드, 예컨대, 항이디오타입 항체는 세포 살해를 유도하는 약제, 예컨대, 독소에 커플링되어, CAR-발현 세포의 수를 감소시킬 수 있다. 대안적으로, CAR 분자 자체는 아래 기재된 바와 같이 활성이 조절될 수 있도록, 예컨대, 켜고 끌 수 있도록 구성될 수 있다.

[0557] 일부 실시양태에서, RCAR은 폴리펩티드의 세트, 전형적으로 가장 단순한 실시양태에서 2 개를 포함하며, 여기서 본원에 기재된 표준 CAR의 구성요소, 예컨대, 항원 결합 도메인 및 세포내 시그널링 도메인은 별도의 폴리펩티드 또는 구성원 상에 분할된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 세트는 이합체화 분자의 존재 시 폴리펩티드를 서로 커플링할 수 있는, 예컨대, 항원 결합 도메인을 세포내 시그널링 도메인에 커플링할 수 있는 이합체화 스위치를 포함한다.

[0558] 이러한 조절가능한 CAR의 추가적인 설명 및 예시적인 구성은 본원 및 그 전체가 본원에 참조로 원용된 국제 공개공보 번호 WO 2015/090229에 제공된다. 실시양태에서, RCAR은 다음의 2 개의 폴리펩티드 또는 구성원을 포함한다: 1) 세포내 시그널링 도메인, 예컨대, 본원에 기재된 일차 세포내 시그널링 도메인, 및 제1 스위치 도메인을 포함하는 세포내 시그널링 구성원; 2) 예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 본원에 기재된 종양 항원을 표적화하는 항원 결합 도메인 및 제2 스위치 도메인을 포함하는 항원 결합 구성원. 임의로, RCAR은 본원에 기재된 막관통 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 막관통 도메인은 세포내 시그널링 구성원, 항원 결합 구성원 또는 둘 모두에 배치될 수 있다. (달리 나타내지 않는 한, RCAR의 구성원 또는 요소가 본원에 기재된 경우, 순서는 제공된 그대로일 수 있지만, 다른 순서도 포함된다. 다시 말해서, 실시양태에서, 순서는 본문에 제시된 바와 같지만, 다른 실시양태에서는 순서가 상이할 수 있다. 예컨대, 막관통 영역의 하나의 측면 상의 요소의 순서는 실시예와 상이할 수 있으며, 예컨대, 세포내 시그널링 도메인에 대한 스위치 도메인의 배치는 상이할 수 있으며, 예컨대, 반전될 수 있다).

[0559] 실시양태에서, 제1 및 제2 스위치 도메인은 세포내 또는 세포외 이합체화 스위치를 형성할 수 있다. 실시양태에서, 이합체화 스위치는 예컨대, 제1 및 제2 스위치 도메인이 동일한 경우 동종이합체화 스위치일 수 있거나, 예컨대, 제1 및 제2 스위치 도메인이 서로 상이한 경우 이종이합체화 스위치일 수 있다.

[0560] 실시양태에서, RCAR은 "다중 스위치"를 포함할 수 있다. 다중 스위치는 이종이합체화 스위치 도메인 또는 동종이합체화 스위치 도메인을 포함할 수 있다. 다중 스위치는 제1 구성원, 예컨대, 항원 결합 구성원 및 제2 구성원, 예컨대, 세포내 시그널링 구성원 상에 독립적으로 복수의, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 스위치 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 제1 구성원은 복수의 제1 스위치 도메인을 포함할 수 있고, 제2 구성원은 복수의 제2 스위치 도메인을 포함할 수 있다. 실시양태에서, 제1 구성원은 제1 및 제2 스위치 도메인을 포

함할 수 있고, 제2 구성원은 제1 및 제2 스위치 도메인을 포함할 수 있다.

[0561] 실시양태에서, 세포내 시그널링 구성원은 하나 이상의 세포내 시그널링 도메인, 예컨대, 일차 세포내 시그널링 도메인 및 하나 이상의 공동자극 시그널링 도메인을 포함한다.

[0562] 실시양태에서, 항원 결합 구성원은 하나 이상의 세포내 시그널링 도메인, 예컨대, 하나 이상의 공동자극 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. 실시양태에서, 항원 결합 구성원은 예컨대, 4-IBB, CD28, CD27, ICOS 및 OX40으로부터 선택되는 본원에 기재된 복수의, 예컨대, 2 또는 3 개의 공동자극 시그널링 도메인을 포함하고, 실시양태에서 일차 세포내 시그널링 도메인은 포함하지 않는다. 실시양태에서, 항원 결합 구성원은 세포외 방향으로부터 세포내 방향으로 다음의 공동자극 시그널링 도메인을 포함한다: 4-1BB-CD27; 4-1BB-CD27; CD27-4-1BB; 4-1BBCD28; CD28-4-1BB; OX40-CD28; CD28-OX40; CD28-4-1BB; 또는 4-1BB-CD28. 이러한 실시양태에서, 세포내 결합 구성원은 CD3 제타 도메인을 포함한다. 이러한 일 실시양태에서 RCAR은 (1) 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 2 개의 공동자극 도메인, 및 제1 스위치 도메인을 포함하는 항원 결합 구성원; 및 (2) 막관통 도메인 또는 막 테더링 도메인 및 하나 이상의 일차 세포내 시그널링 도메인, 및 제2 스위치 도메인을 포함하는 세포내 시그널링 도메인.

[0563] 실시양태는 항원 결합 구성원이 CAR 세포의 표면에 테더링되지 않은 RCAR을 제공한다. 이는 항원 결합 구성원을 코딩하는 서열로 세포를 형질전환시키지 않고, 세포내 시그널링 구성원을 갖는 세포가 하나 이상의 항원 결합 도메인과 편리하게 쌍을 이룰 수 있게 한다. 이러한 실시양태에서, RCAR은 다음을 포함한다: 1) 제1 스위치 도메인, 막관통 도메인, 세포내 시그널링 도메인, 예컨대, 일차 세포내 시그널링 도메인 및 제1 스위치 도메인을 포함하는 세포내 시그널링 구성원; 및 2) 항원 결합 도메인, 및 제2 스위치 도메인을 포함하는 항원 결합 구성원, 여기서 항원 결합 구성원은 막관통 도메인 또는 막 테더링 도메인을 포함하지 않고, 임의로 세포내 시그널링 도메인을 포함하지 않음. 일부 실시양태에서, RCAR은 3) 제2 항원 결합 도메인, 예컨대, 항원 결합 도메인에 의해 결합된 것과 상이한 항원에 결합하는 제2 항원 결합 도메인; 및 제2 스위치 도메인을 포함하는 제2 항원 결합 구성원을 추가로 포함할 수 있다.

[0564] 또한 항원 결합 구성원이 이중특이적 활성화 및 표적화 역량을 포함하는 RCAR이 본원에 제공된다. 이 실시양태에서, 항원 결합 구성원은 복수, 예컨대, 2, 3, 4 또는 5 개의 항원 결합 도메인, 예컨대, scFv를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 항원 결합 도메인은 표적 항원, 예컨대, 상이한 항원 또는 동일한 항원, 예컨대, 동일한 항원 상의 동일한 또는 상이한 에피토프에 결합한다. 실시양태에서, 복수의 항원 결합 도메인은 탠덤으로 존재하고, 임의로 링커 또는 힌지 영역은 항원 결합 도메인 각각 사이에 배치된다. 적합한 링커 및 힌지 영역이 본원에 기재되어 있다.

[0565] 실시양태는 증식의 스위칭을 허용하는 구성을 갖는 RCAR을 제공한다. 이 실시양태에서, RCAR은 다음을 포함한다: 1) 임의로 막관통 도메인 또는 막 테더링 도메인; 예컨대, 4-IBB, CD28, CD27, ICOS 및 OX40으로부터 선택된 하나 이상의 공동-자극 시그널링 도메인, 및 스위치 도메인을 포함하는 세포내 시그널링 구성원; 및 2) 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 일차 세포내 시그널링 도메인, 예컨대, CD3 제타 도메인을 포함하는 항원 결합 구성원, 여기서 항원 결합 구성원은 스위치 도메인을 포함하지 않거나, 세포내 시그널링 구성원 상의 스위치 도메인과 이합체화하는 스위치 도메인을 포함하지 않음. 실시양태에서, 항원 결합 구성원은 공동자극 시그널링 도메인을 포함하지 않는다. 실시양태에서, 세포내 시그널링 구성원은 동종이합체화 스위치로부터의 스위치 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 세포내 시그널링 구성원은 이종이합체화 스위치의 제1 스위치 도메인을 포함하고, RCAR은 이종이합체화 스위치의 제2 스위치 도메인을 포함하는 제2 세포내 시그널링 구성원을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 제2 세포내 시그널링 구성원은 세포내 시그널링 구성원과 동일한 세포내 시그널링 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 이합체화 스위치는 세포내 스위치이다. 실시양태에서, 이합체화 스위치는 세포외 스위치이다.

[0566] 또한 RCAR 코딩 서열을 포함하는 핵산 및 벡터가 본원에 제공된다. RCAR의 다양한 요소를 코딩하는 서열은 동일한 핵산 분자, 예컨대, 동일한 플라스미드 또는 벡터, 예컨대, 바이러스 벡터, 예컨대, 렌티바이러스 벡터 상에 배치될 수 있다.

[0567] 실시양태에서, (i) 항원 결합 구성원을 코딩하는 서열 및 (ii) 세포내 시그널링 구성원을 코딩하는 서열은 동일한 핵산, 예컨대, 벡터 상에 존재할 수 있다. 상응하는 단백질의 생산은 예컨대, 별도의 프로모터의 사용에 의해, 또는 바이시스트론 전사 생성물 (이는 단일 번역 생성물의 절단에 의해 또는 2 개의 별도의 단백질 생성물의 번역에 의해 2 개의 단백질의 생산을 초래할 수 있음)에 의해 달성될 수 있다. 실시양태에서, 절단가능한 펩티드를 코딩하는 서열, 예컨대, P2A 또는 F2A 서열은 (i) 및 (ii) 사이에 배치된다. 실시양태에서, IRES, 예컨

대, EMCV 또는 EV71 IRES를 코딩하는 서열은 (i) 및 (ii) 사이에 배치된다. 이들 실시양태에서, (i) 및 (ii)는 단일 RNA로서 전사된다. 실시양태에서, 제1 프로모터는 (i)에 작동가능하게 연결되고, 제2 프로모터는 (ii)에 작동가능하게 연결되어, (i) 및 (ii)는 별도의 mRNA로서 전사된다.

[0568] 대안적으로, RCAR의 다양한 요소를 코딩하는 서열은 상이한 핵산 분자, 예컨대, 상이한 플라스미드 또는 벡터, 예컨대, 바이러스 벡터, 예컨대, 렌티바이러스 벡터 상에 배치될 수 있다. 예컨대, (i) 항원 결합 구성원을 코딩하는 서열은 제1 핵산, 예컨대, 제1 벡터 상에 존재할 수 있고, (ii) 세포내 시그널링 구성원을 코딩하는 서열은 제2 핵산, 예컨대, 제2 벡터 상에 존재할 수 있다.

[0569] 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어 및 어구는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 이제 기술된다. 본원에 언급된 모든 공개물은 참조로 본원에 원용된다.

[0570] 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 조직 배양 및 형질전환 (예컨대, 전기천공, 리포펙션)을 위해 표준 기술이 사용될 수 있다. 효소적 반응 및 정제 기술은 제조업체의 사양에 따라 또는 당업계에서 통상적으로 달성되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 전술한 기술 및 절차는 일반적으로 당업계에 잘 알려진 종래의 방법에 따라 그리고 본 명세서 전번에 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예컨대, 임의의 목적을 위해 본원에 참조로 원용되는, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) 참고.

[0571] 본원에 언급된 모든 공개물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그 전체가 참조로 원용된다. 본 발명은 다음의 실시예를 참조하여 더욱 완전히 이해될 것이다.

[0572] **실시예**

[0573] 이들 실시예는 발명의 이해를 돕기 위해 제시된 것이지만, 임의의 방식으로 그 범주를 제한하려는 의도가 아니며 그렇게 해석되어서도 안 된다. 실시예는 당업자에게 잘 알려질 것인 통상적인 방법 (분자 클로닝 기술 등)의 상세한 설명을 포함하지 않는다.

[0574] **실시예 1. GCC VH 항체의 분리 및 선택**

[0575] 인간 GCC를 특이적으로 표적화하는 단일 도메인 중쇄 항체 (vH)(예컨대, 표 1-3에 제공된 항-GCC 바인더)를 생성하였다. 표 5에 나타낸 바와 같이, 재조합 단일 도메인 항-GCC VH 작제물을 생체외에서 GCC에 대한 결합 친화도에 대해 판정하였다. 결합 동역학을 Octet 결합 검정을 사용하여 결정하였다. 이들을 실시간 바이오-층 간섭계 기반 바이오센서 Octet (ForteBio)에서 측정하였다. 모든 결합 연구를 HBS-ET Octet 동역학 완충액에서 수행하였다. 바이오센서를 상이한 단계 사이에서 항상 Octet 동역학 완충액에서 세척하였다. 각각의 VH의 7 포인트, 2-배 희석 시리즈를 만들었다. 결합 단계 각각에 대한 접촉 시간은 300 초였고, 해리 단계는 400-600 초 사이에서 변화되었다. ForteBio Analysis 소프트웨어를 사용하여 데이터를 처리하고 1:1 결합 모델에 피팅함으로써 동역학 결합 (ka) 및 해리 (kd) 속도 상수를 결정하였다. 계산된 친화도 및 동역학 상수는 표 5에 나타나 있다.

[0576] CT26 세포에 대한 단일 도메인 항체의 결합을 유동 세포측정법을 사용하여 측정하였다. CT26 세포를 연속 희석된 VH와 함께 항온처리하고 형광을 유동 세포측정법으로 측정하였다. 표 5에 나타낸 바와 같이 세포 결합 EC50 (nM)을 수득하기 위해 FACS 용량 반응 검정에 의해 CT26 세포에 대한 결합에 대해 항-GCC VH 항체를 확인하였다.

[0577] *표 5. GCC VH 항체의 결합 친화도*

[0578]

GCC 항원 결합제	K오프 (1/s)	KD(M)	세포 결합 EC50 (M)
V1	0.00020795	3.2935E-10	7.2E-10
V5	0.000718667	7.713E-09	1.52E-09
V36	0.0035	0.000000105	N/A
V48	0.000341	1.375E-09	1.01E-09
V51	0.00185	9.544E-09	N/A

[0579] 안정성을 결정하기 위해, VH 작제물을 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 적용하였다. 간략하게, 정제된 VH를 4

℃에서 밤새 PBS 완충액에 다양한 농도로 저장한 다음, SEC 컬럼을 사용하여 다양한 시점에서 분석하였다. 샘플을 소듐 포스페이트 완충액에 주사하였다. 시간 경과에 따라 데이터를 수집하고, 출발 시 (T=0)에 존재하는 것과 비교하여 저장 후 남아 있는 단량체 피크의 면적을 계산하였다. 안정성 결과를 아래 표 6에 나타낸 바와 같이 수득하였다.

[0580] *표 6. SEC를 사용한 하룻밤 안정성*

항-GCC VH 항체	% 4° C 단량체 (%)	순도 (%)	RT (분)
V1	108.4	91.5	3.686
V5	123.04	79.2	3.17
V36	92.43	79.36	3.08
V48	104.54	73.91	3.208
V51	109.2	69.22	3.304

[0581]

[0582] 인간 경쇄에 대한 VH 결합을 측정하기 위해 ELISA를 수행하였다. VH 각각에 대한 결합 값 (OD450 nm로서 측정됨)은 0.1 미만이었으며, 이는 이 검정에 대한 배경 신호이다.

[0583] **실시예 2. GCC 키메라 항원 수용체의 설계 및 특성화**

[0584] 키메라 항원 수용체 작제물은 위에 기재된 단일 도메인 항체 (예컨대, 표 2 또는 표 3에 제공된 VH)를 포함하는 세포외 결합 도메인 (예컨대, 항-GCC 바인더 서열)을 포함하도록 조작된다. CAR T 작제물은 CD28 힌지/막관통 도메인 및 공동자극 도메인 및 CD3 제타-1xx 시그널링 도메인에 프레임 내 바인더 서열을 연결함으로써 생성된다. 예시적인 CAR 작제물의 개략도는 도 1a 및 1b에 나타나 있다. 본 실시예에서 테스트된 예시적인 CAR 작제물 서열은 표 4에 제공된다. V1 (서열번호 1) 및 V1-01 (서열번호 20)은 아래 실시예에서 작동할 것으로 예상된다.

[0585] CAR 작제물 서열 (서열번호 61-70)을 코딩하는 핵산을 레트로바이러스 플라스미드 백본 내로 클로닝하였다. 레트로바이러스 벡터 함유 상청액을 phenix ampho 세포 (ATCC CRL-3213)의 일시적 형질주입에 의해 생성하였고, 레트로바이러스 벡터-함유 상청액을 수확하고, -80℃에서 저장하였다.

[0586] 제조업체의 프로토콜 (EasySep™ 인간 T 세포 단리 키트, Stem Cell Technologies #17951)에 따라 CD3+ 세포의 면역자기 비드 선택을 사용하여 건강한 공여자로부터의 인간 일차 T 세포를 류코팩(leukopak)(공여자의 서면 동의 하에 상업적 제공자로부터 구입함)으로부터 단리된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 정제하였다. T 세포를 10% 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco 15140-122) 및 2 ng/ml IL-2 (Milteyni 130-097-743)가 100만 개의 세포/ml의 밀도로 보충된 X-vivo 15 배지 (Lonza #04-744Q)에서 배양하였다. 세포를 CD3/CD28 MACS® T Cell TransAct 시약 (Miltenyi Biotec MACS #130-111-160)으로 활성화하고, CAR 작제물을 코딩하는 레트로바이러스 벡터로 2 일차 또는 3 일차에 밤새 형질도입하였다. 다음날, CAR-T 세포 배양물을 G-Rex6® 웰 플레이트 (WilsonWolf P/N 80240M)로 옮기고, 7-10 일차에 수확할 때까지 10% 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco 15140-122) 및 2 ng/ml IL-2 (Milteyni 130-097-743)가 보충된 X-vivo 15 배지 (Lonza #04-744Q)에서 증식시켰다. 배지 교환 및 IL-2 보충을 2-3 일마다 수행하였다.

[0587] CAR 표면 발현을 위해 항-EGFR 항체 (R&D systems: FAB9577R) 또는 가용성 GCC 세포외 도메인 재조합 단백질을 사용하여 유세포 분석법에 의해 CAR T 세포 발현을 평가하였다.

[0588] **실시예 3. 생체외 GCC CAR T 세포 활성**

[0589] 본 실시예는 생체외 항-GCC CAR T 세포 활성을 기재한다. 항-GCC CAR (서열번호 48-52)을 발현하는 CAR-T 세포를 GCC-발현 및 GCC-음성 표적 암 세포주에 대한 세포독성에 대해 조사하였다. 표적 암 세포주는 GCC를 내인성으로 발현하는 GSU, LS1034 및 HT55뿐만 아니라 GCC를 안정적으로 발현하도록 조작된 인간 결장직장암 세포주인 HT29-GCC, 및 GCC-음성인 이의 벡터 제어 세포주인 HT29-vec을 포함하였다. 각각의 표적 세포주를 384-웰 플레이트에 씨딩하고, GCC CAR-T 또는 비-표적화 CAR-T 세포 (음성 대조군)를 10:1, 3:1, 1:1 및 0.3:1의 이펙터-대-표적 (E:T) 비율로 첨가하였다. 표적 세포만 있는 웰 및 이펙터 세포만 있는 웰을 대조군으로서 포함하였다. 2 일 후, CellTiter-Glo® One Solution 검정 (Promega, G8462)를 사용하여 세포 생존력을 측정하였다. 먼저

이펙터 세포만 있는 웰의 신호를 뺀 다음, 표적 세포만 있는 웰의 신호로 나눈 후, 공동-배양 웰의 발광 신호로부터 표적 세포의 생존력 퍼센트를 계산하였다. 100% GCC CAR-T 세포로부터 표적 세포의 생존력 퍼센트를 뺌으로써 살해 퍼센트를 계산하였다.

[0590] VH 항-GCC 바인더는 대조군으로서 사용된 비-표적화 CD19 CAR-T 세포 (1928z-1xx)와 대조적으로, GCC-발현 표적 세포주에 대해 세포 살해를 나타냈다. 도 2a-2d에 나타낸 바와 같이, 절삭된 EGFR (tEGFR)의 부재 하에 항-GCC CAR을 발현하는 CAR-T 세포는 GCC 발현 세포 HT29-GCC 세포, GCC를 안정적으로 발현하도록 조작된 인간 결장직장암 세포주 HT29)(도 2a); 및 GCC를 내인성으로 발현하는 세포주 GSU (도 2c) 및 LS1034 (도 2d)에 대하여 생체외 세포독성을 입증하였다. 도 3a-3d에 나타낸 바와 같이, 절삭된 EGFR (tEGFR)(서열번호 56-60)의 존재 하에 항-GCC CAR을 발현하는 CAR-T 세포는 또한 GCC 발현 세포 HT29-GCC (도 3a); GSU (도 3c) 및 LS1034 (도 3d)에 대하여 생체외 세포독성을 입증하였다. 막대는 3 개의 기술적 반복실험의 평균 + SD 값을 나타낸다. 데이터는 >3 명의 공여자로부터의 항-GCC CAR T 세포로 수행된 >3 개의 독립적인 실험을 나타낸다. GCC CAR-T 세포는 GCC-음성 HT29-vec 세포에 대하여 세포 살해를 나타내지 않았으며 (도 2b 및 도 3b), 이는 GCC CAR-T 세포 살해 활성이 항원-의존적임을 나타낸다.

[0591] 항원-의존적 세포 살해에 더하여, IFNɣ 및 IL2의 항원-의존적 분비를 평가함으로써 GCC CAR-T 세포의 생체외 활성을 또한 판정하였다. 항-GCC VH 바인더를 포함하는 GCC CAR-T 세포를 10:1, 3:1, 1:1 및 0.3:1의 E:T 비율로 GCC-발현 및 GCC-음성 표적 암 세포주와 공동-배양하였다. 공동-배양 2 일 후에 상청액을 수집하였다. Intellicyt QBeads Human PlexScreen 키트 (Sartorius, 90702)를 사용하여 상청액 중 분비된 IFNɣ 및 IL2를 검출하였다. 모든 VH 바인더를 포함하는 GCC CAR-T 세포는 GCC-발현 표적 세포와 공동-배양되었을 때 tEGFR (5a-5d)의 존재 및 부재 (4a-4d) 둘 모두에서 IFNɣ를 분비하였지만, GCC-음성 표적 세포와 공동-배양되었을 때는 그렇지 않았으며 (도 4b 및 5b), 이는 항원-의존적 사이토카인 방출을 나타낸다. 모든 VH 바인더를 포함하는 GCC CAR-T 세포는 GCC-발현 표적 세포와 공동-배양되었을 때 tEGFR의 존재 (7a-7d) 및 부재 (6a-6d) 둘 모두에서 IL2를 분비하였지만, GCC-음성 표적 세포와 공동-배양되었을 때는 그렇지 않았으며 (도 6b 및 7b), 이는 항원-의존적 사이토카인 방출을 나타낸다.

[0592] **실시예 4. 생체내 GCC CAR T 세포 활성**

[0593] 본 실시예는 생체내 항-GCC CAR T 세포 활성을 기재한다. 상이한 VH 바인더를 포함하는 GCC CAR-T의 항종양 활성을 구아닐릴 사이클라제 C (GCC)를 내인성으로 발현하는 다중 인간 결장직장암 종양 이종이식편 모델에서 연구하였다. 비-비만 당뇨병/중증 복합 면역결핍/ɣ-쇄-/- (NSG) 마우스에 HT55 세포, LS1034 세포 또는 GSU 세포를 피하 접종하였다. 평균 종양 부피가 대략 150 mm^3에 도달하였을 때, GCC CAR-T 세포 또는 모의 T 세포 (비표적화된 CAR-T)를 정맥내 (IV) 급성 투여하였다. 상이한 용량 수준 및 공여자 공급원을 평가하고, 도 8a-18에 나타낸 바와 같이 표시하였다. 최대 50 일 동안 매주 2 회 종양 부피 및 체중을 측정하였다.

[0594] 시간 경과 (40 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화를, 2 명의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 8a) 및 D686 (도 8b)으로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델 (내인성으로 발현되는 GCC 발현 결장직장암, GCC H-점수 = 300/300)에서 결정하였다. 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화를, 3 명의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 9a), D797 (도 9b) 및 D954 (도 9c)로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델에서 결정하였다. 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화를, 건강한 공여자 D393 (도 10a), D797 (도 10b) 및 D954 (도 10c)로부터 제조된 tEGFR을 공동-발현하는 항-GCC CAR-T 세포로 처리되고, 건강한 공여자 D393으로부터 제조된 tEGFR의 부재 하에 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델에서 결정하였다. 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화를, 3 명의 상이한 건강한 공여자 D393 (도 11a), D954 (도 11b) 및 D686 (도 11c)으로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델에서 결정하였다. 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm^3)의 변화를, 0.25 x 10^6 개의 CAR+ 세포, 0.5 x 10^6 개의 CAR+ 세포, 또는 1 x 10^6 개의 CAR+ 세포의 용량에서, 건강한 공여자 D393 (도 12a), D954 (도 12b) 및 D686 (도 12c)으로부터 제조된 tEGFR을 공동-발현하는 v48 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 HT55 모델에서 결정하였다.

[0595] 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화를, tEGFR의 부재 하에 2 명의 건강한 공여자 D393 (도 13a), D954 (도 13b), D393 (도 15a), D954 (도 15b) 및 D686 (도 15c)으로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 GSU 모델 (내인성 GCC 발현 위암, GCC H-점수=170/300)에서 결정하였다. 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화를, 상이한 건강한 공여자 D393 (도 14a) 및 D954 (도 14b), D393 (도 16a), D954 (도

16b) 및 D686 (도 16c)으로부터 제조된 tEGFR을 공동-발현하는 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 GSU 모델 (내인성 GCC 발현 위암, GCC H-점수=170/300)에서 결정하였다.

[0596] 시간 경과 (42 일)에 따른 평균 종양 부피 (mm3)의 변화를, tEGFR을 공동-발현하는 (도 18) 또는 tEGFR의 부재 (도 17) 하에 건강한 공여자로부터 제조된 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 LS1034 모델 (내인성 GCC 발현 위암, GCC H-점수=300/300)에서 결정하였다.

[0597] 다중 공여자로부터의 GCC CAR-T 세포의 급성 IV 투여는 모든 종양 모델에서 이들 각각의 대조군 그룹과 비교하여 종양 성장의 유의한 억제를 야기하였다. GCC CAR T 세포로 처리된 LS1034 또는 GSU 종양 보유 NSG 마우스에서 이들 각각의 대조군 그룹과 비교하여 유의한 체중 손실이 관찰되지 않았다. HT-55 종양 모델에서, 관찰된 체중 손실은 종양 부담으로 인한 것이다. GCC CAR-T 세포 치료 후 종양 부담 감소는 체중 증가를 초래한다.

[0598] 따라서, 본 발명의 하나 이상의 실시양태의 여러 양태를 설명하였지만, 다양한 변경, 변형 및 개선이 당업자에게 용이하게 명백할 것이라는 것이 이해되어야 한다. 이러한 변경, 변형 및 개선은 본 개시내용의 일부인 것으로 의도되며, 발명의 사상 및 범주 내에 있는 것으로 의도된다. 따라서, 전술한 설명 및 도면은 단지 예로서 제공되며 발명은 다음과 같은 청구범위에 의해 상세하게 설명된다.

[0599] **서열 표**

[0600] 아래 표 7은 본원에 개시된 설명 및 서열을 제공한다.

[0601] *표 7. 서열의 표*

[0602]

서열번호	설명	서열
1	V1 vH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS
2	CD8 막관통 도메인	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
3	4-1BB 세포내 도메인	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
4	CD3-제타 시그널링 도메인	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
5	힌지 서열	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
6	리더 서열 (v1)	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
7	리더 서열 (v5, v36, v48, v51)	MELGLSWVFLVAILEGVQC
8	V1 HCDR1	HYYWS
9	V5 HCDR1	RYWMS
10	V36 HCDR1	RYWMT
10	V48 HCDR1	RYWMT
10	V51 HCDR1	RYWMT
11	V1 HCDR2	RIYPSGSTSYNPSLKS
12	V5 HCDR2	KIRHDGGEKYYVDSVKG
13	V36 HCDR2	KIKYDGSEKYYADSVKG
14	V48 HCDR2	KIRHDGGEKYYPDSVKG
15	V51 HCDR2	KIRHDGGEKYYADSVKG
16	V1 HCDR3	DRSTGWSEWNSDL
17	V5 HCDR3	DYTRDV
18	V36 HCDR3	DYNKDY
19	V48 HCDR3	DYNKDL
18	V51 HCDR3	DYNKDY

[0603]

20	V1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSG STSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSS
21	V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDG GEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTA VTVSS
22	V8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIKYDG SEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDTGVYYCATDFTRDVWGQGTT VTVSS
23	V9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGRGLEWVAKIRYDG GEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTT VTVSS
24	V30	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVRQAPGKGREWVAKIKYDG SEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTT VTVSS
25	V31	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGREWVAKIKYDG SEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVWGQGTT VTVSS
26	V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDG SEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTL VTVSS
27	V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDG GEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTL VTVSS
28	V61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDG GEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTL VTVSS
29	CD28 힌지 도메인	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
30	CD28 막관통 도메인	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
31	CD28 힌지/막관	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSL

	통 도메인	LVTVAFIIFWV
32	CD28 신호 도메인	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
33	CD3z-1XX 돌연변이 시그널링 도메인	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
34	COMBINED CAR 막관통 도메인 및 세포내 도메인	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
35	V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
36	V6 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
37	V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
38	V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTW

[0604]

		VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDT AMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGL FQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
39	V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAE AFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
40	열-안정성 강독소	NTFYCCELCCNPACAGCY
41	GCC AA 서열	MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLE DAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKIS NAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRLMSPAR KLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALEASVSYFSHEL GFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLKGDRAVAEDIVIILVDL FNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGIL LFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTS VDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKLPNDITGRGPQILMIAVFTLT GAVVLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKWSHIPPENIFPLETNETNHVSLKIDDDK RRDTIQRLRQCKYDKKRVILKDLKHNDGNFTEKQKIELNKLLQIDYYNLTKFYGT VKLDTMIFGVIEYCERGSLREVLNDTISYPDGTFMDWEFKISVLYDIAKGMSYLH SSKTEVHGRLKSTNCVVDSRMVVKITDFGCNSILPPKKDLWTAPEHLRQANISQK GDVYSYGIIAQEIILRKETFYTLSCRDRNEKIFRVENSNGMKPFRPDLFLETAEE KELEVYLLVKNCWEEDPEKRPDFKKIETTLAKIFGLFHDQKNESYMDTLIRRLQL YSRNLEHLVEERTQLYKAERDRADRLNFMLLPRLVVKSLKEKGFVEPELYEEVTI YFSDIVGFTTICKYSTPMEVVDMLNDIYKSFDHIVDHHDVYKVETIGDAYMVASG LPKRNGNRHAIDIAKMALEILSFMGTFELEHLPGLPIWIRIGVHSGPCAAGVVGI

[0605]

		KMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPLRIHVSGSTIAILKRTECQFLYEVRGETYLK GRGNETTYWLTGMKDQKFNLPTPPTVENQQRLQAEFSDMIANSLQKRQAAGIRSQ KPRRVASYKKGTLEYLQLNTTDKESTYF
42	v31 리더	MEFGLSWVFLVAIIKGVQC
43	tEGFR	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIS GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSR GRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
44	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
45	리더 서열	MALPVTALLLPLALLLHAARP
46	V1 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSG STSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLV VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFD ALHMQALPPR
47	V1 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSG STSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATK DTFDALHMQALPPR
48	V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSW FRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH

[0606]

		VKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGE RRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
49	V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
50	V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDT AVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
51	V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDT AMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
52	V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAE AFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR

[0607]

53	링커 서열	RAAA
54	링커 서열	GGGGS
55	V1 CAR (28z1xx-tEGFR)	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSG STSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATK DTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIS GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSR GRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
56	V1-01 CAR (28z1xx-tEGFR)	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSW FRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH VKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGE RRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIS GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSR GRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI

[0608]

		DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
67	V5 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIS GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSR GRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
68	V36 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDT AVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIS GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSR GRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP

[0609]

		KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
59	V48 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDT AMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIS GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSR GRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
60	V61 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIS GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSR GRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

[0610]

[0611]

61	V1-01 CAR 핵산 서열	ATGGGCTGGTCTTGTATTATCTTGTTTCTCGTCGCAACTGCTACAGGCGTTCATT CTGAAGTTCAACTCCAAGAATCTGGTCCTGGCCTGGTGAAACCTTCCGAAACTCT CTCACTCACCTGTACCGTCTCAGGCGCTTCAATATCACACTATTATTGGTCTTGG TTCCGGCAACCTGCAGGCAAAGGTCTCGAATGGATAGGCAGAATATATCCCAGTG GAAGCACCTCCTATAATCCCTCTCTCAAGTCAAGAGTTGCAATGAGCGTTGACAC ACCCAAGAACCAATTCTCCCTCAAGCTGTCATCTGTAACTGCCGCCGATACTGCC GTTTACTACTGCGCTAGAGATAGATCAACCGGATGGTCAGAATGGAATTCAGATC TGTGGGGACGGGGAACCCTCGTGACCGTATCTTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGT TATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCAT GTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAAC AGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGC CCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG GAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACC CTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGA ACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
62	V5 CAR 핵산 서열	ATGGAACTGGGACTGTCTTGGGTGTTCCTGGTCGCTATATTGGAAGGAGTACAGT GCCAGGTCCAGCTCGTCGAGTCCGGGGGTGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCT CCGGCTGAGCTGCACAGCCTCAGGGTTTACATTCAGCAGGTACTGGATGAGTTGG GTTAGGCAAGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGGCCAAAATCCGACATGATG GGGGCGAAAAGTACTATGTGGATAGTGTGAAGGGACGGTTCACAATATCACGAGA CAATGCCAAAAACTCTTTGTACCTGCAAATGAACTCCCTGCGCGCCGAAGACACA GCTGTGTACTACTGCGCTACAGACTACACTAGGGACGTCTGGGGTCAAGGAACAG CCGTCACCGTGAGTAGTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTA CCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTT TGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGG TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT

		CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCC TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA
63	V36 CAR 핵산 서열	ATGGAGCTGGGATTGTCCTGGGTTTTCCTGGTGGCTATACTCGAAGGCGTACAGT GTGAAGTGCAGTTGGTGGAGAGTGGCGGTGGCCTGGCCCAGCCGGGAGGCTCTTT GAGACTCTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACTTTCTCCCGCTATTGGATGACCTGG GTCCGGCAGGCGCCCGGCGGACGCCTGGAGTGGGTGGCTAAGATCAAGTATGATG GATCAGAAAAATATTACGCAGATAGCGTAAAAGGCCGGTTCACAATATCCAGGGA TAATGCAAAAAACTCCCTGTATCTGCAGATGGATAGCCTGCGCGCTGAAGACACC GCCGTATATTATTGCACAAGAGACTACAATAAAGATTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTTACGGTGAGCTCACGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTA CCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTT TGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGG TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCC TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
64	V48 CAR 핵산 서열	ATGGAGCTGGGGCTTTCTTGGGTGTTTCTGGTAGCCATCCTCGAGGGAGTCCAGT GCGAGGTCCAGCTCGTCGAATCTGGCGGGGGGCTGGTCCAGCCTGGCGGTTCTCT CCGCCTGACCTGTGCGGCCTCAGGGTTCACTTTCAGCCGGTACTGGATGACATGG GTGAGACAGGCCCCCGGCAAGGGACTGGAATGGGTAGCAAAGATTAGGCACGACG

[0612]

[0613]

		GCGGTGAGAAATACTATCCCGACAGTGTCAAGGGGCGGTTTACTGTCTCCCGAGA TAATGCCAAAAACTCACTCTACCTGCAGATGGATAATCTGCGAGCGGAGGATACT GCTATGTACTACTGTACTCGAGACTACAACAAGGACCTGTGGGGGCAGGGGACAC TGGTGACGGTTAGTTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTA CCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTT TGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGG TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCC TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
66	V61 CAR 핵산 서열	ATGGAACTGGGACTGTCATGGGTCTTTCTCGTGGCCATTCTCGAGGGGGTCCAGT GTGAGGTTCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGCAGTCT TAGGTTGTCATGTGCCGCGAGCGGGTTCACGTTCTCACGATATTGGATGACCTGG GTTCGCCAGGCACCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCCAAGATCAGGCACGACG GCGGAGAAAAATATTACGCGGATTCCGTGAAAGGCAGATTCACAATCTCTAGGGA TAACGCCAAAAATTCCCTTTATCTTCAGATGAATAGCCTGAGGGCTGAAGACACT GCCGTGTACTACTGCACGCGGGATTACAACAAAGATTATTGGGGCCAGGGAACAC TGGTGACCGTCAGCTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTA CCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTT TGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGG TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC

		CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCC TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
66	V1-01 CAR + tEGFR 핵산 서열	ATGGGCTGGTCTTGTATTATCTTGTTTCTCGTCGCAACTGCTACAGGCGTTCATT CTGAAGTTCAACTCCAAGAATCTGGTCCTGGCCTGGTGAAACCTTCCGAAACTCT CTCACTCACCTGTACCGTCTCAGGCGCTTCAATATCACACTATTATTGGTCTTGG TTCCGGCAACCTGCAGGCAAAGGTCTCGAATGGATAGGCAGAATATATCCCAGTG GAAGCACCTCCTATAATCCCTCTCTCAAGTCAAGAGTTGCAATGAGCGTTGACAC ACCCAAGAACCAATTCTCCCTCAAGCTGTCATCTGTAACTGCCGCCGATACTGCC GTTTACTACTGCGCTAGAGATAGATCAACCGGATGGTCAGAATGGAATTCAGATC TGTGGGGACGGGGAACCCTCGTGACCGTATCTTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGT TATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCAT GTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAAC AGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGC CCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG GAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACC CTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGA ACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGAAGCGGAGC TACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCC ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCC TCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGT GGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTC CTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGG GTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAG AACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAG

[0614]

		TCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGA TGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAAC TGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAG GTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGA GGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGA GGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTG TGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAA CATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATT GACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACA CCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAA CTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGCCT AAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGG TGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG
67	V5 CAR + tEGFR 핵산 서열	ATGGAACTGGGACTGTCTTGGGTGTTCCTGGTCGCTATATTGGAAGGAGTACAGT GCCAGGTCCAGCTCGTCGAGTCCGGGGGTGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCT CCGGCTGAGCTGCACAGCCTCAGGGTTTACATTCAGCAGGTACTGGATGAGTTGG GTTAGGCAAGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGGCCAAAATCCGACATGATG GGGGCGAAAAGTACTATGTGGATAGTGTGAAGGGACGGTTCACAATATCACGAGA CAATGCCAAAAACTCTTTGTACCTGCAAATGAACTCCCTGCGCGCCGAAGACACA GCTGTGTACTACTGCGCTACAGACTACACTAGGGACGTCTGGGGTCAAGGAACAG CCGTCACCGTGAGTAGTGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCT AGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGT CCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG GTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTG GGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCC CGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT TCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA CCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG TACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGA GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC GATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTC

[0615]

[0616]

		ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAA GCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACAAGC CTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTGT GTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAA TATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCG GTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAAC TGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTG GCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGC AGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACAT CCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGG AAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACC TCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCA CAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCC CAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAG TGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATAC AGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGG ACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAG ACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAG ACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGG GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACT GGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCT TCATG
68	V36 CAR + tEGFR 핵산 서열	ATGGAGCTGGGATTGTCCTGGGTTTTCCTGGTGGCTATACTCGAAGGCGTACAGT GTGAAGTGCAGTTGGTGGAGAGTGGCGGTGGCCTGGCCCAGCCGGGAGGCTCTTT GAGACTCTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACTTTCTCCCGCTATTGGATGACCTGG GTCCGGCAGGCGCCCGGCGGACGCCTGGAGTGGGTGGCTAAGATCAAGTATGATG GATCAGAAAAATATTACGCAGATAGCGTAAAAGGCCGGTTCACAATATCCAGGGA TAATGCAAAAAACTCCCTGTATCTGCAGATGGATAGCCTGCGCGCTGAAGACACC GCCGTATATTATTGCACAAGAGACTACAATAAAGATTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTTACGGTGAGCTCACGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTA CCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTT TGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGG

[0617]

		TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCC TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCT GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACA AGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAG TGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTAC GAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTG CCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGACCCACAGG AACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGC TTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGC GGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTC AGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGG ACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGG CCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGA GCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGAC AAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCA TACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACG GGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACG CAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCAC TGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCC ACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCC TCTTCATG
69	V48 CAR + tEGFR	ATGGAGCTGGGGCTTTCTTGGGTGTTTCTGGTAGCCATCCTCGAGGGAGTCCAGT

[0618]

	핵산 서열	GCGAGGTCCAGCTCGTCGAATCTGGCGGGGGGCTGGTCCAGCCTGGCGGTTCTCT CCGCCTGACCTGTGCGGCCTCAGGGTTCACTTTCAGCCGGTACTGGATGACATGG GTGAGACAGGCCCCCGGCAAGGGACTGGAATGGGTAGCAAAGATTAGGCACGACG GCGGTGAGAAATACTATCCCGACAGTGTCAAGGGGCGGTTTACTGTCTCCCGAGA TAATGCCAAAAACTCACTCTACCTGCAGATGGATAATCTGCGAGCGGAGGATACT GCTATGTACTACTGTACTCGAGACTACAACAAGGACCTGTGGGGGCAGGGGACAC TGGTGACGGTTAGTTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTA CCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTT TGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGG TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCC TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCT GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACA AGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAG TGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTAC GAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTG CCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGACCCACAGG AACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGC TTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGC GGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTC AGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGG ACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGG CCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGA GCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGAC

[0619]

		AAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCA TACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACG GGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACG CAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCAC TGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCC ACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCC TCTTCATG
70	V61 CAR + tEGFR 핵산 서열	ATGGAACTGGGACTGTCATGGGTCTTTCTCGTGGCCATTCTCGAGGGGGTCCAGT GTGAGGTTCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGCAGTCT TAGGTTGTCATGTGCCGCGAGCGGGTTCACGTTCTCACGATATTGGATGACCTGG GTTCGCCAGGCACCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCCAAGATCAGGCACGACG GCGGAGAAAAATATTACGCGGATTCCGTGAAAGGCAGATTCACAATCTCTAGGGA TAACGCCAAAAATTCCCTTTATCTTCAGATGAATAGCCTGAGGGCTGAAGACACT GCCGTGTACTACTGCACGCGGGATTACAACAAAGATTATTGGGGCCAGGGAACAC TGGTGACCGTCAGCTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTA CCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTT TGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGG TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCC TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCT GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACA AGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAG TGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTAC

		GAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTG CCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGACCCACAGG AACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGC TTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGC GGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAA CATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTC AGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGG ACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGG CCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGA GCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGAC AAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCA TACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACG GGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACG CAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCAC TGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCC ACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCC TCTTCATG

[0620]

[0621] **등가물**

[0622] 청구범위 요소를 변형시키기 위해 청구범위에서 "제1", "제2", "제3" 등과 같은 서수 용어의 사용은 그 자체로 하나의 청구범위 요소의 다른 청구범위 요소에 대한 임의의 우선순위, 선행 또는 순서, 또는 방법의 동작이 수행되는 시간적 순서를 의미하지 않고, 단지 청구범위 요소를 구별하기 위해 특정 명칭을 갖는 하나의 청구범위 요소를 동일한 명칭을 갖는 다른 요소 (단, 서수 용어 사용)와 구별하기 위한 표지로서 사용된다.

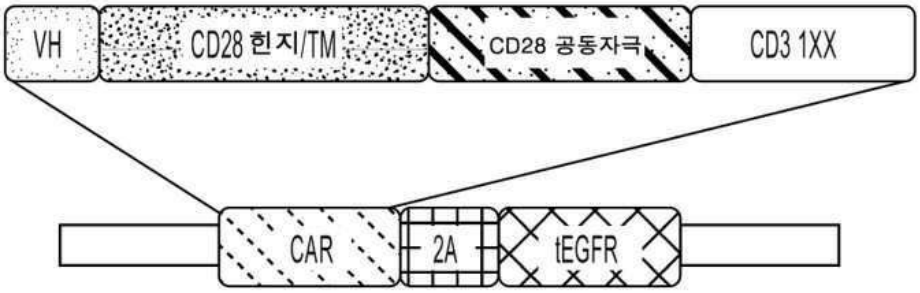
[0623] 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 관사 "(단수형)"은 명확하게 반대되는 증거를 나타내지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은 반대되는 증거를 나타내지 않은 한, 또는 문맥에서 달리 명백하지 않은 한, 그룹 구성원 중 하나, 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이에 사용되거나, 달리 이와 관련이 있는 경우 충족되는 것으로 간주된다. 발명은 그룹 중 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이에 사용되거나, 달리 이와 관련되는 실시양태를 포함한다. 발명은 또한 하나 초과 또는 전체 그룹 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이에 사용되거나, 달리 관련되는 실시양태를 포함한다. 게다가, 발명은 달리 나타내지 않는 한, 또는 모순 또는 불일치가 발생할 것이라는 것이 당업자에게 명백하지 않는 한, 나열된 청구범위 중 하나 이상으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 구절, 설명 용어 등이 동일한 기본 청구범위에 대한 종속항인 다른 청구범위 (또는 관련되는 경우, 임의의 다른 청구범위)에 도입되는 모든 변동, 조합 및 순열을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 요소가 (예컨대, Markush 그룹 또는 유사한 형식의) 목록으로서 제시되는 경우, 요소의 각각의 하위그룹이 또한 개시되며, 임의의 요소(들)는 그룹으로부터 제거될 수 있음을 이해해야 한다. 일반적으로, 발명 또는 발명의 양태가 특정 요소, 특징 등을 포함하는 것으로서 지칭되는 경우, 발명의 특정 실시양태 또는 발명의 양태는 이러한 요소, 특징 등으로 이루어지거나 본질적으로 이루어짐을 이해해야 한다. 단순성을 위해, 모든 경우에 이러한 실시양태는 본원에서 그렇게 많은 단어로 구체적으로 제시되지 않았다. 또한, 발명의 임의의 실시양태 또는 양태는 구체적인 배제가 명세서에 인용되는지 여부에 관계없이 청구범위에서 명시적으로 배제될 수 있음을 이해해야 한다. 발명의 배경을 설명하고 이의 실시에 관한 추가적인 세부사항을 제공하기 위해 본원에 참조된 공개물, 웹사이트 및 기타 참고 자료는 본원에 참조로 원용된다.

도면

도면1

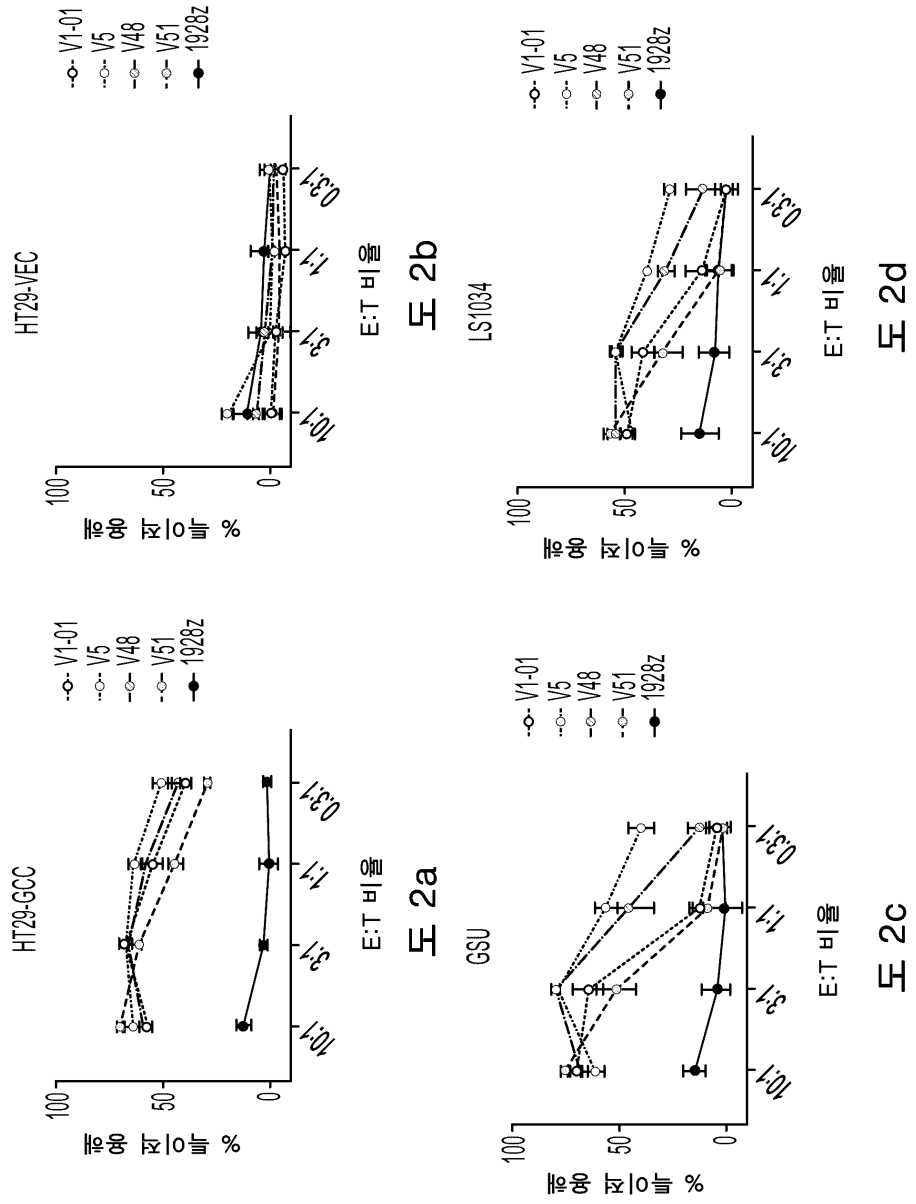


도 1a



도 1b

도면2



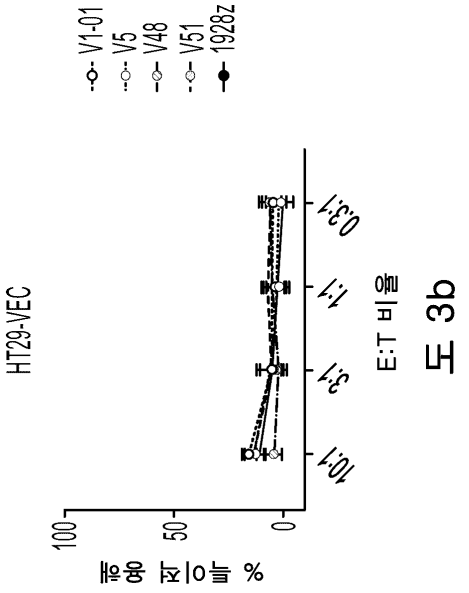
도 2a

도 2b

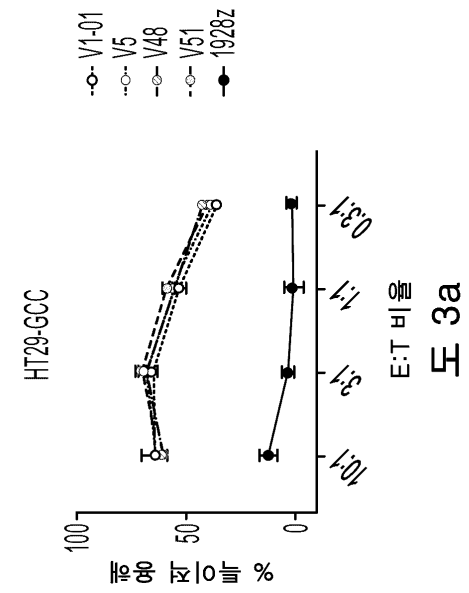
도 2c

도 2d

도면3



도 3a

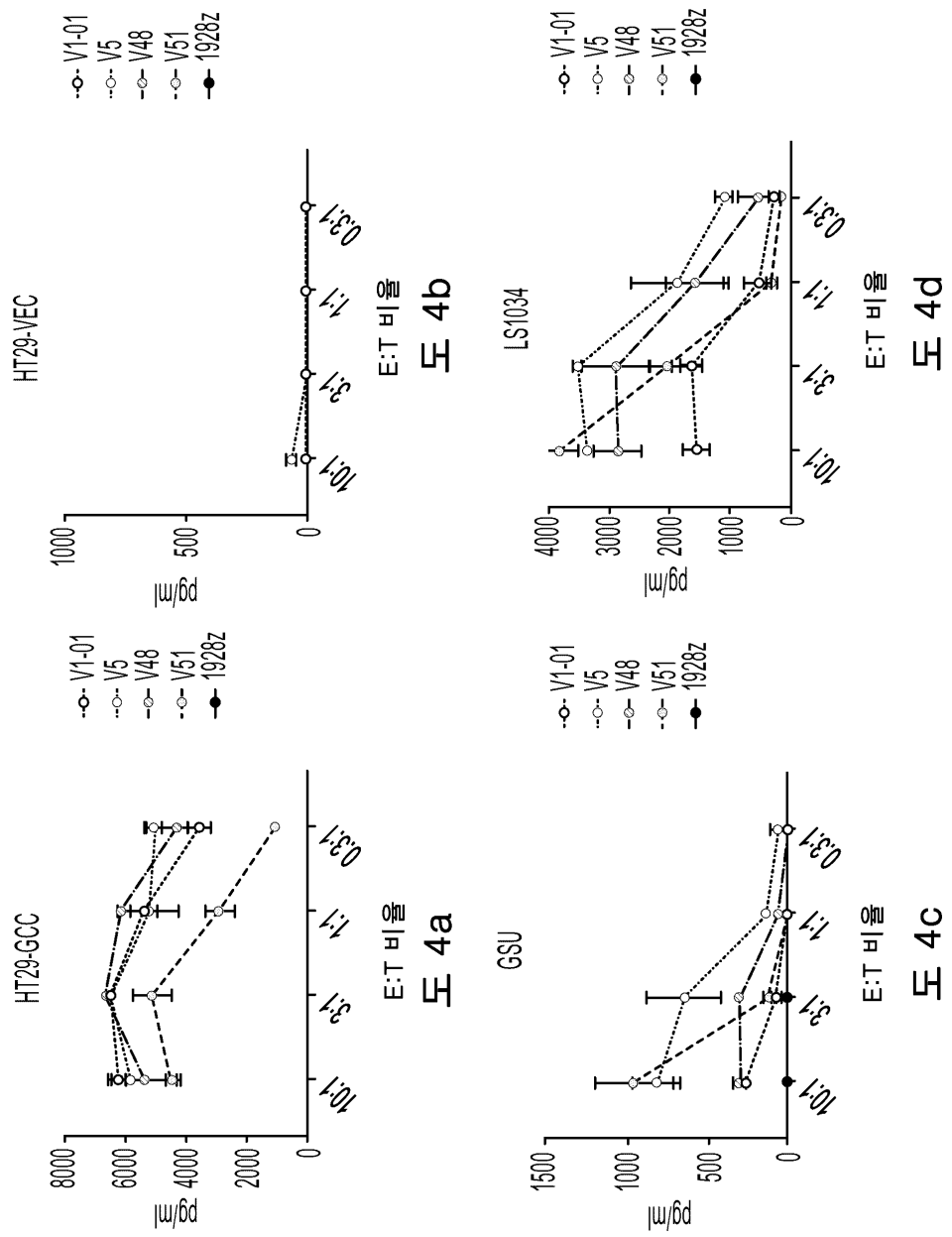


도 3b

도 3c

도 3d

도면4



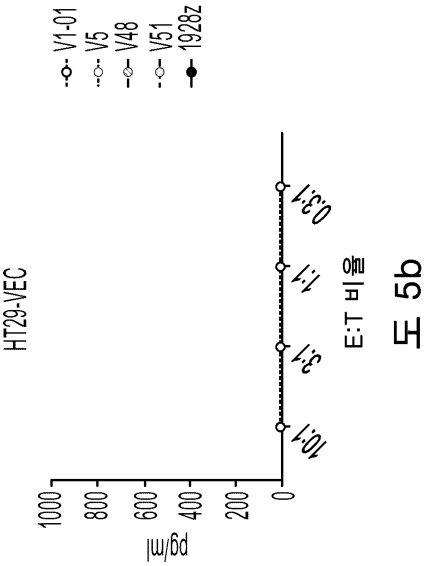
도 4a

도 4b

도 4c

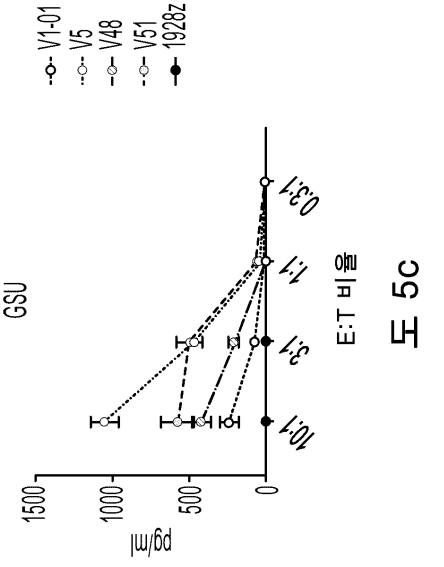
도 4d

도면5

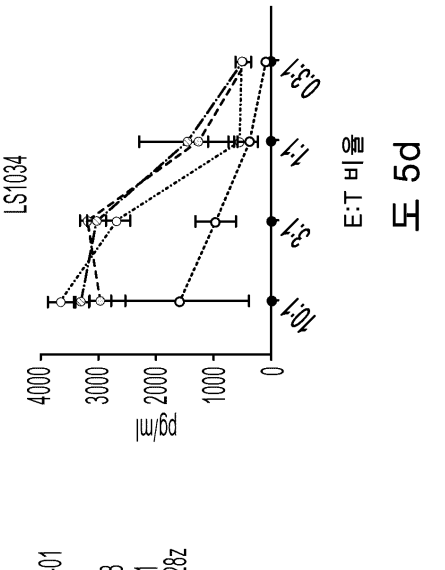


도 5a

도 5b

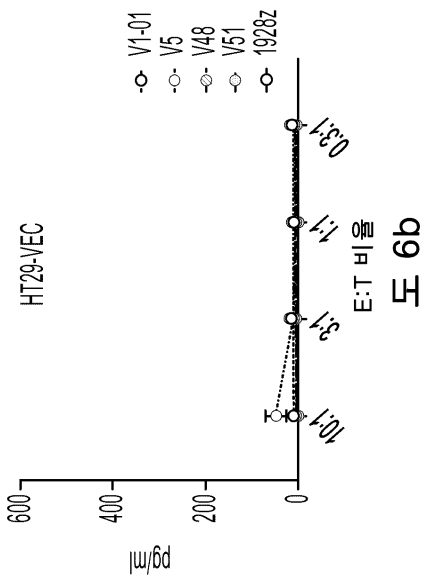


도 5c

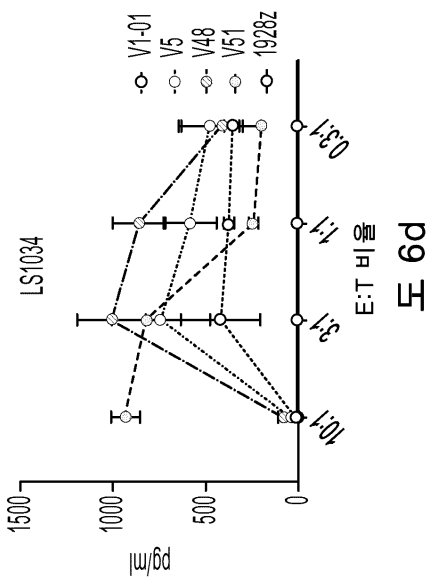


도 5d

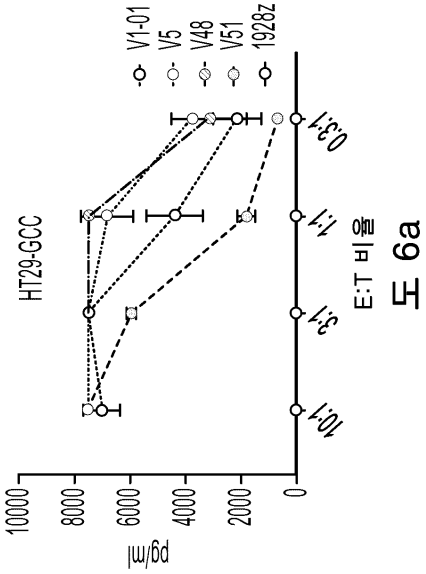
도면6



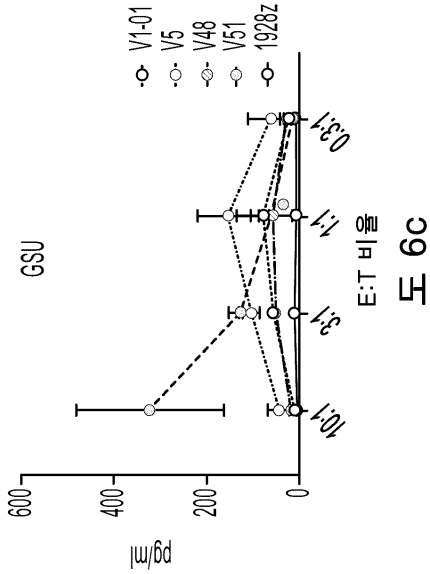
도 6b



도 6d

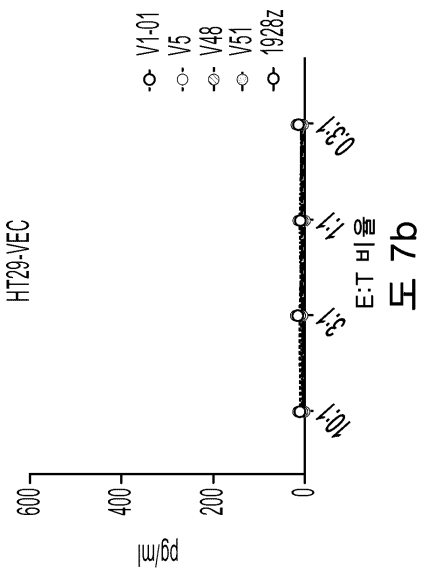


도 6a

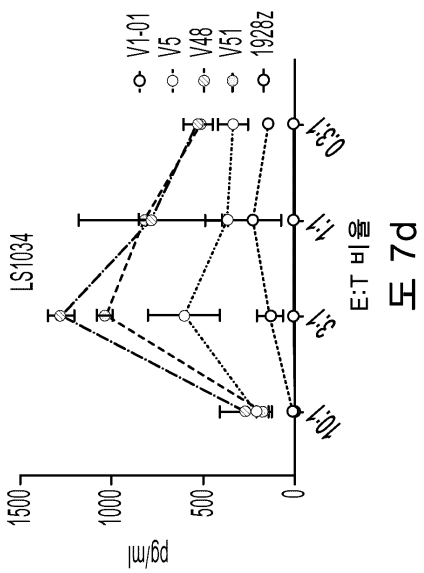


도 6c

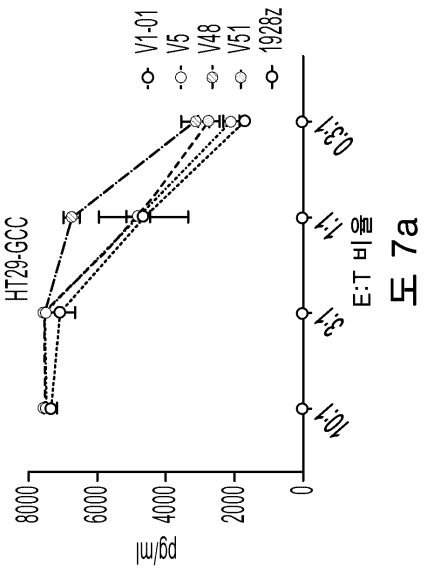
도면7



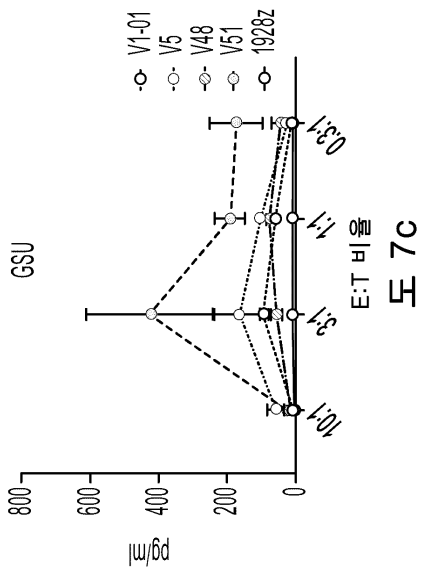
도 7b



도 7d

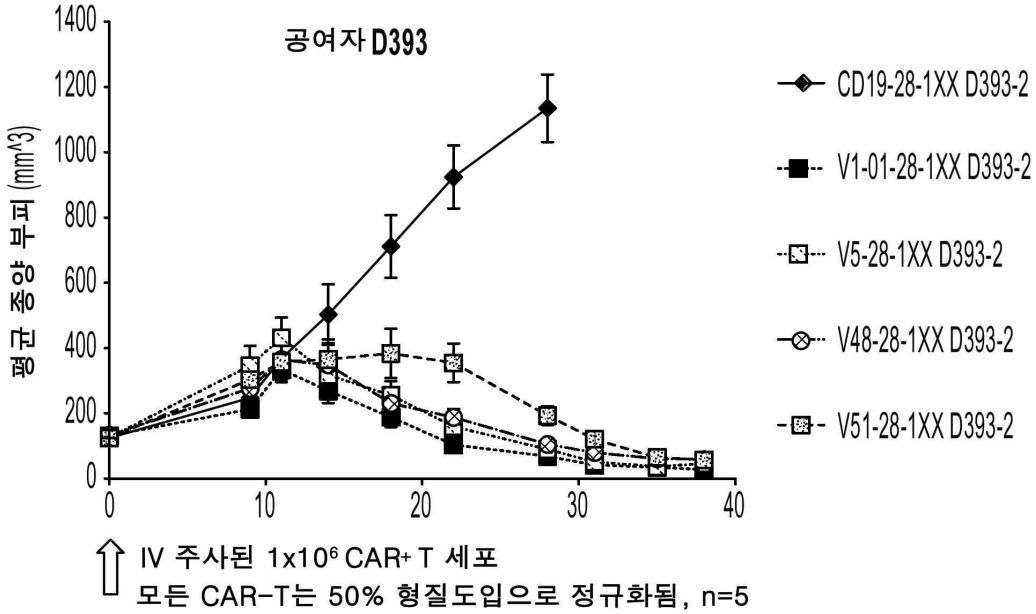


도 7a

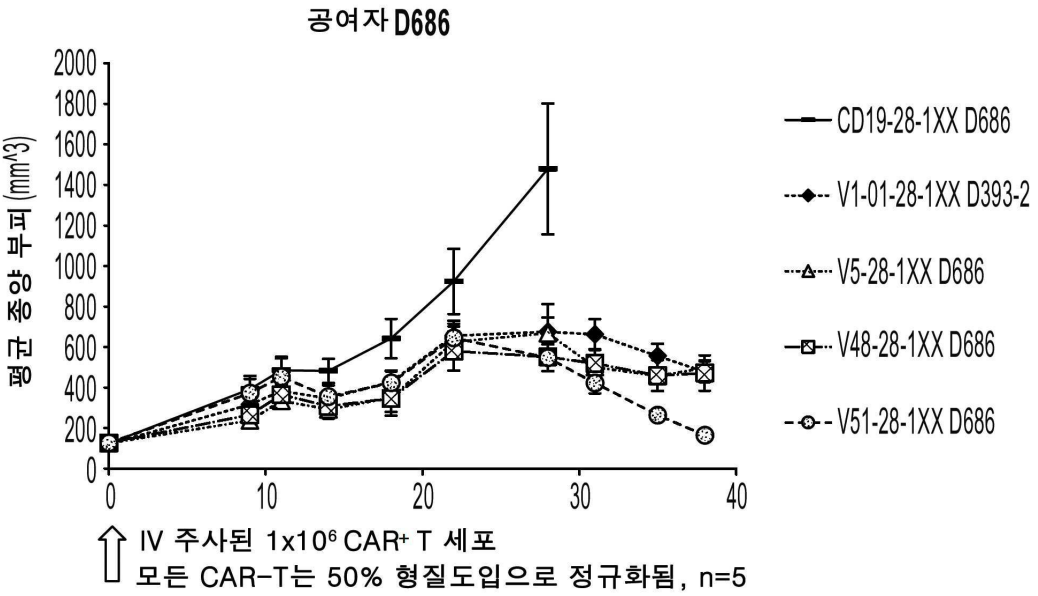


도 7c

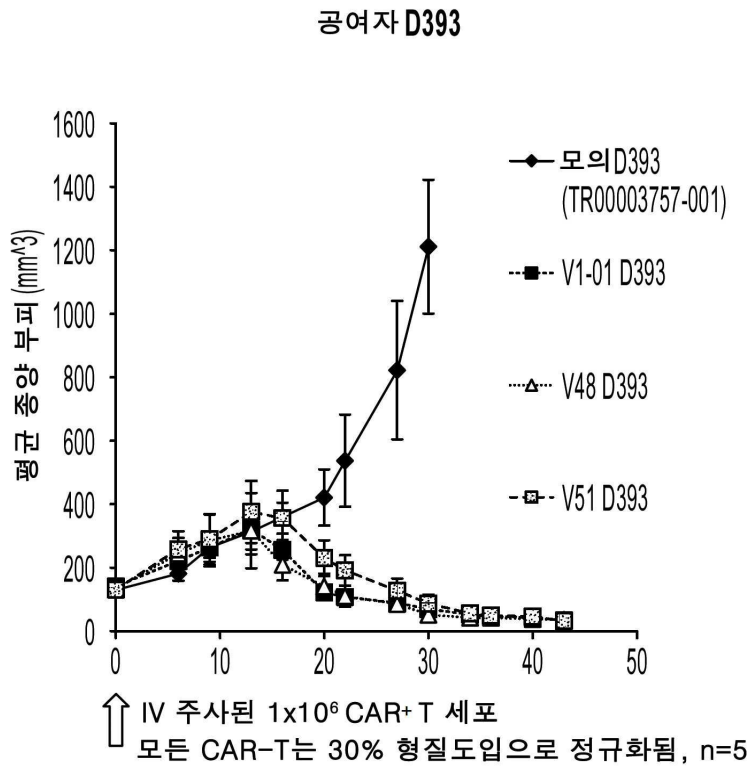
도면8a


공여자 D393
평균 종양 부피 (mm^3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
CD19-28-1XX D393-2
V1-01-28-1XX D393-2
V5-28-1XX D393-2
V48-28-1XX D393-2
V51-28-1XX D393-2
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

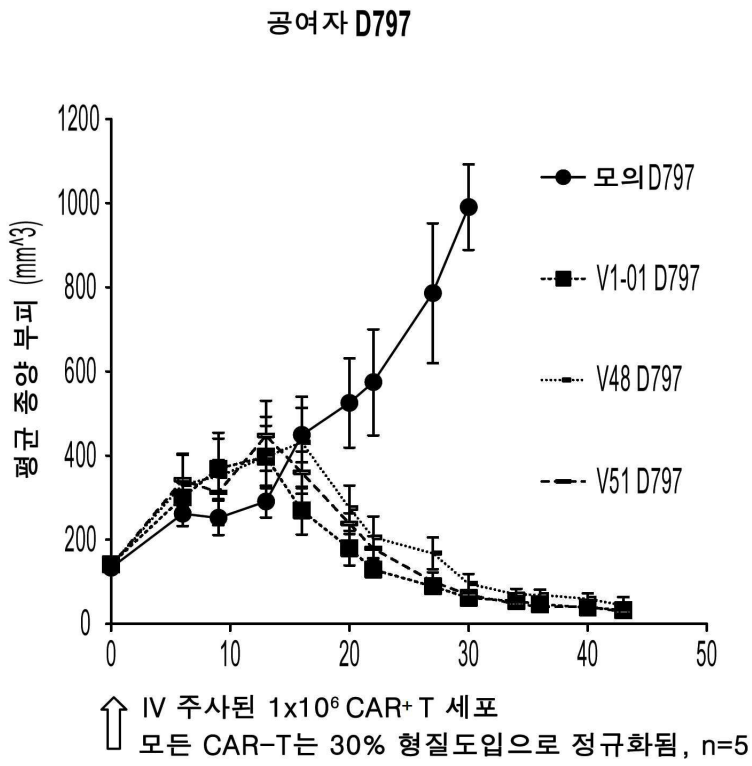
도면8b


공여자 D686
평균 종양 부피 (mm^3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
CD19-28-1XX D686
V1-01-28-1XX D393-2
V5-28-1XX D686
V48-28-1XX D686
V51-28-1XX D686
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

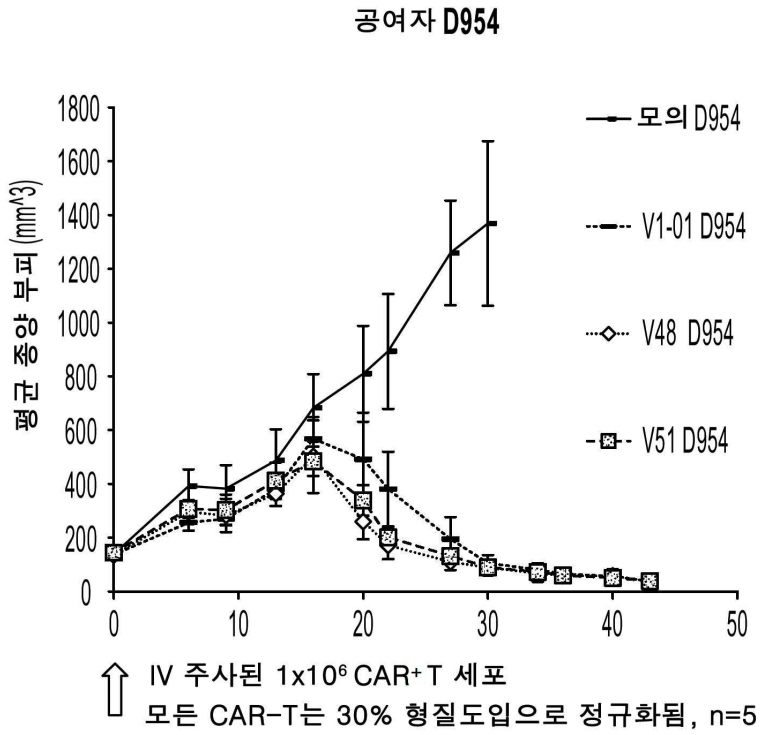
도면9a


공여자 D393
평균 종양 부피 (mm^3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
모의D393
(TR00003757-001)
V1-01 D393
V48 D393
V51 D393
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

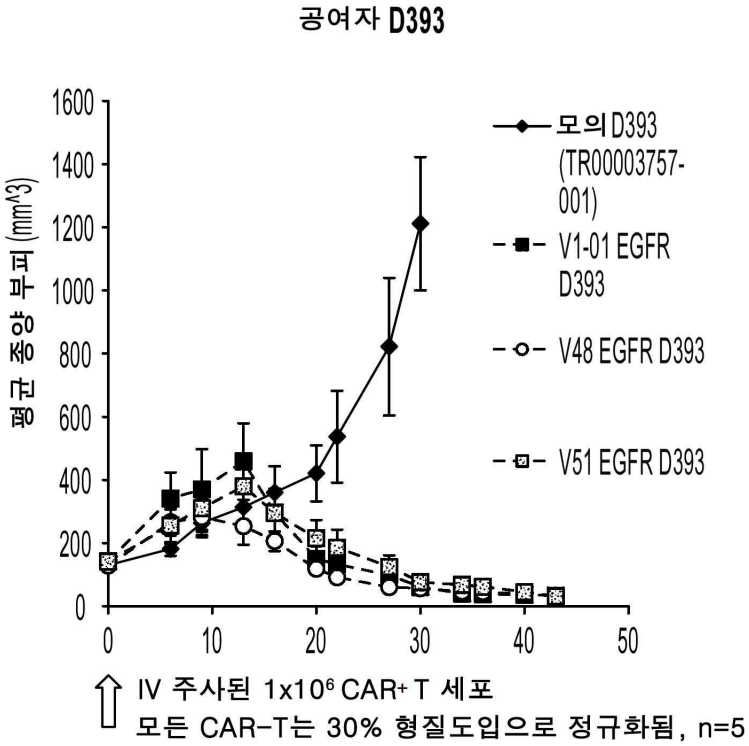
도면9b


공여자 D797
평균 종양 부피 (mm^3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
모의D797
V1-01 D797
V48 D797
V51 D797
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

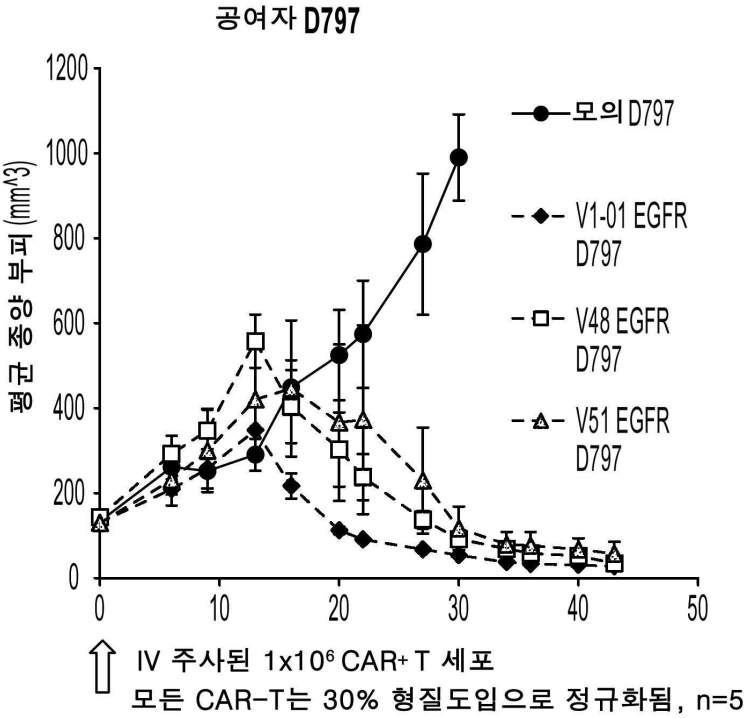
도면9c


공여자 D954
평균 종양 부피 (mm^3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
모의 D954
V1-01 D954
V48 D954
V51 D954
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

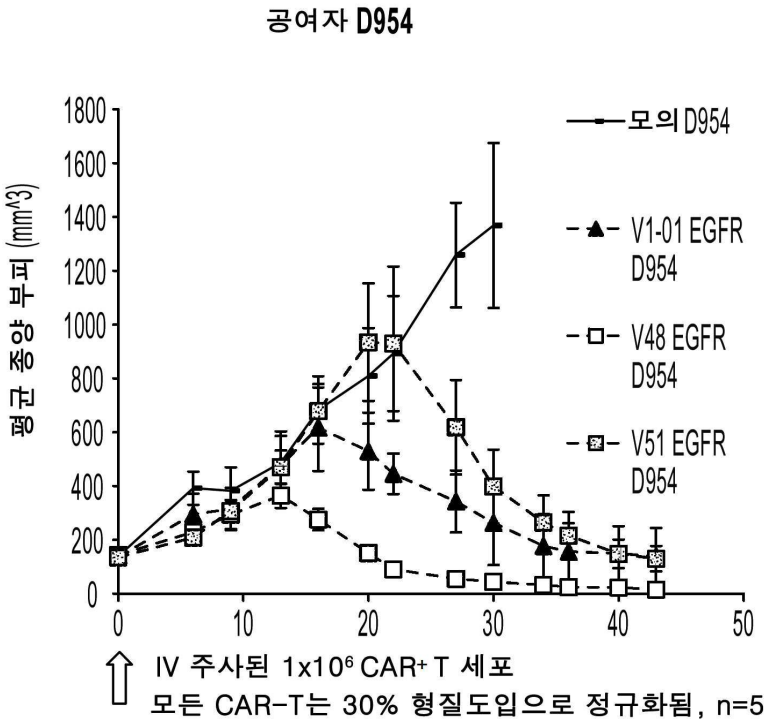
도면10a


공여자 D393
평균 종양 부피 (mm^3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
모의 D393 (TR00003757-001)
V1-01 EGFR D393
V48 EGFR D393
V51 EGFR D393
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

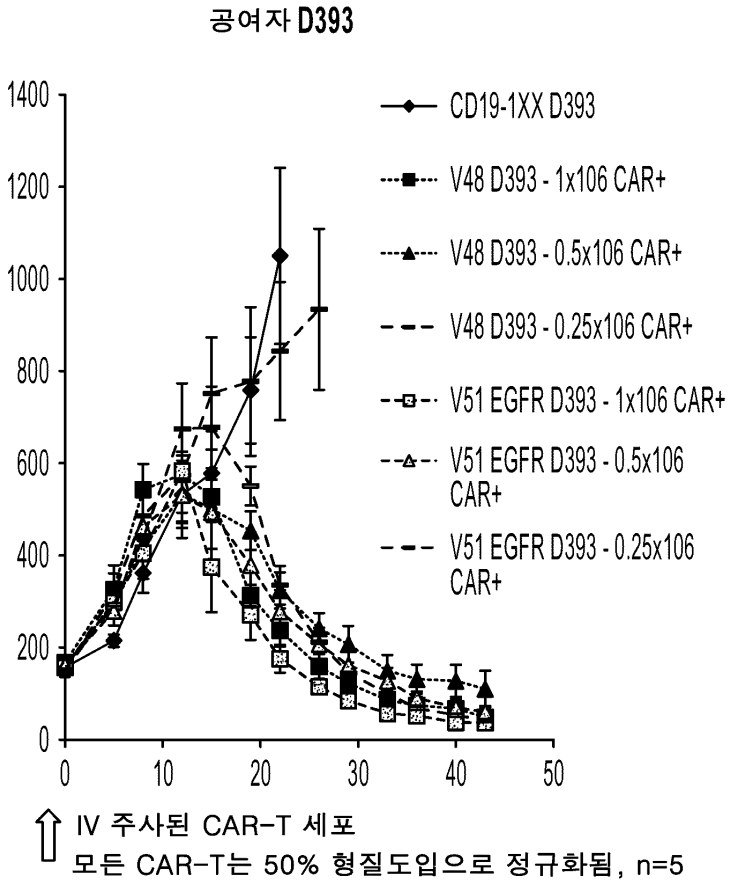
도면10b


공여자 D797
평균 종양 부피 (mm^3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
모의 D797
V1-01 EGFR D797
V48 EGFR D797
V51 EGFR D797
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

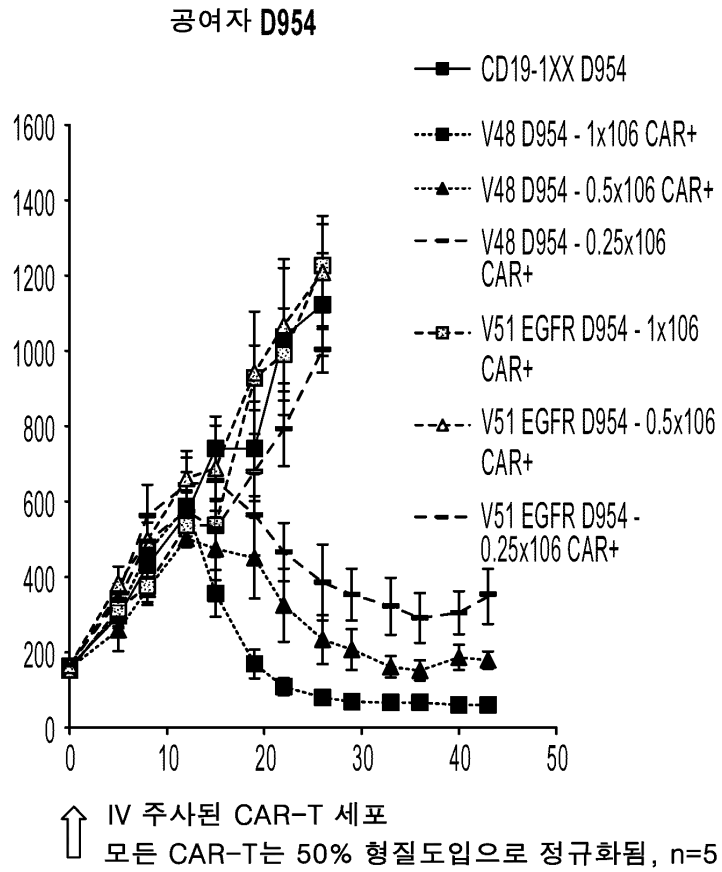
도면10c


공여자 D954
평균 종양 부피 (mm^3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
모의 D954
V1-01 EGFR D954
V48 EGFR D954
V51 EGFR D954
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

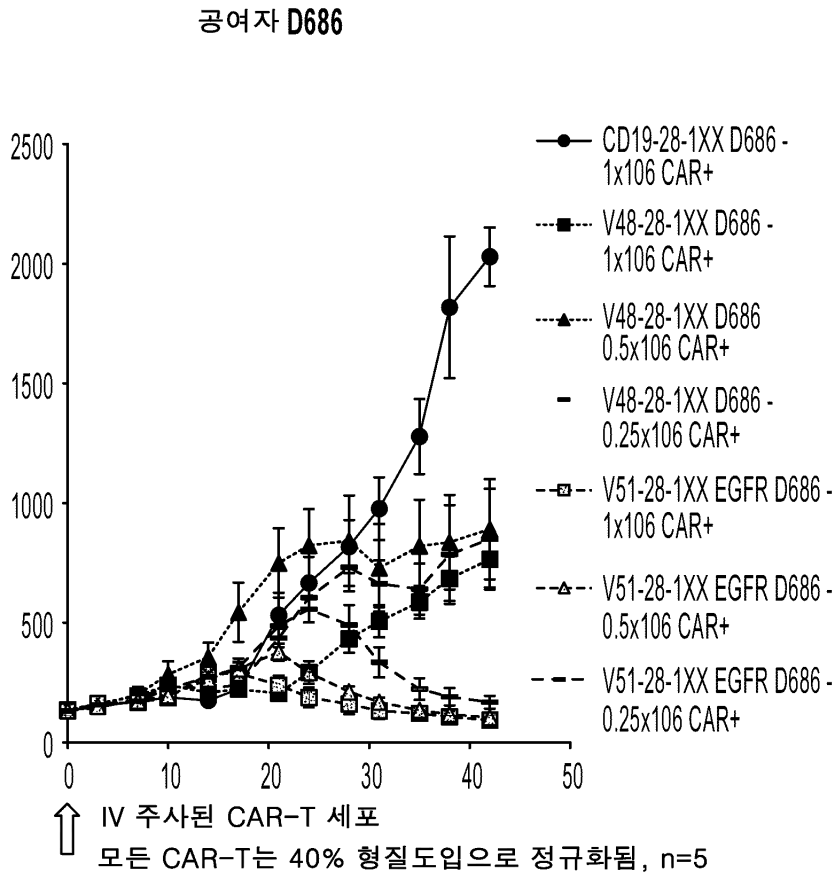
도면11a


공여자 D393
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-1XX D393
V48 D393 - 1x106 CAR+
V48 D393 - 0.5x106 CAR+
V48 D393 - 0.25x106 CAR+
V51 EGFR D393 - 1x106 CAR+
V51 EGFR D393 - 0.5x106 CAR+
V51 EGFR D393 - 0.25x106 CAR+
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

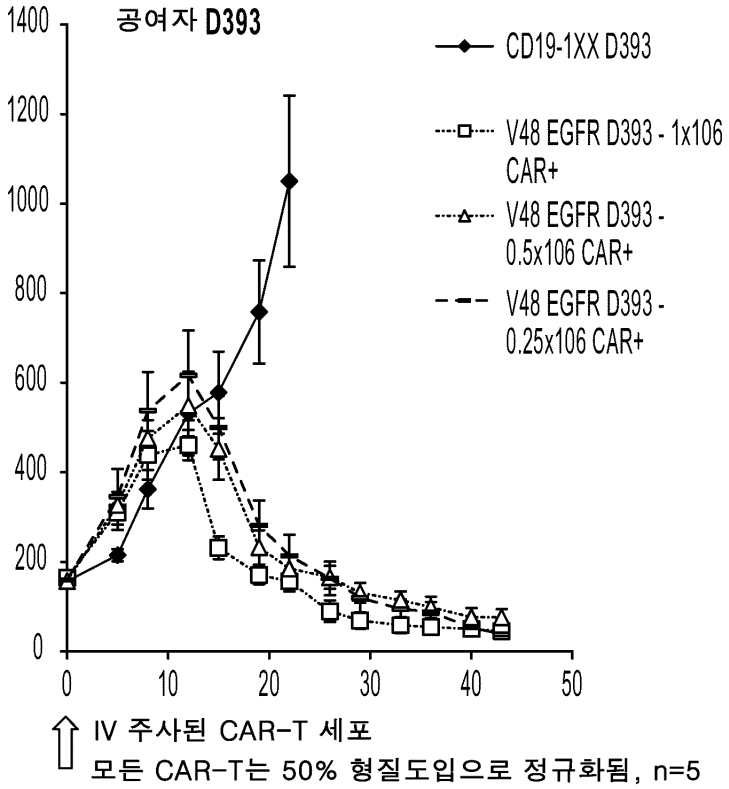
도면11b


공여자 D954
CD19-1XX D954
V48 D954 - 1x106 CAR+
V48 D954 - 0.5x106 CAR+
V48 D954 - 0.25x106 CAR+
V51 EGFR D954 - 1x106 CAR+
V51 EGFR D954 - 0.5x106 CAR+
V51 EGFR D954 - 0.25x106 CAR+
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

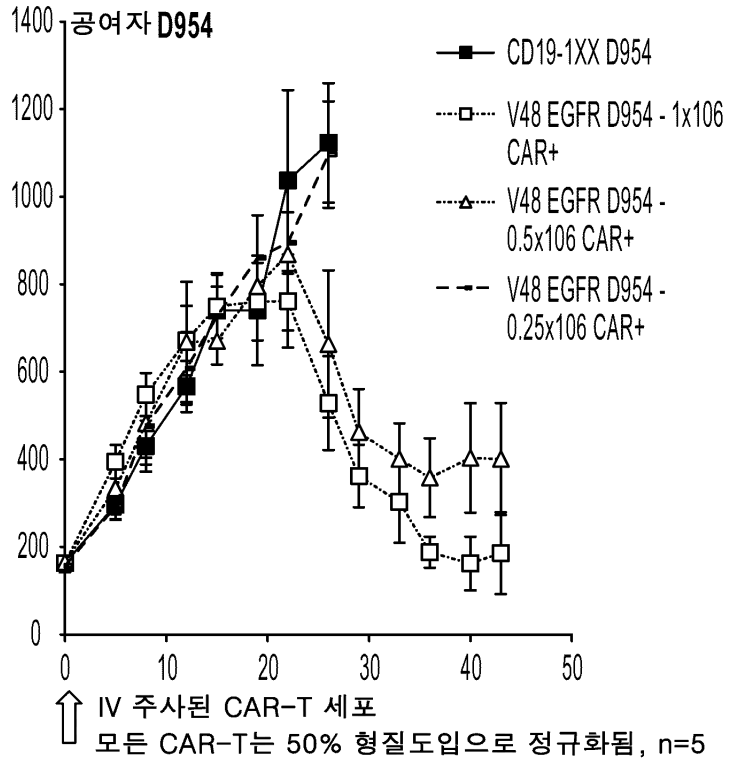
도면11c


공여자 D686
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
CD19-28-1XX D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX D686 0.5x106 CAR+
V48-28-1XX D686 - 0.25x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 1x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 0.5x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 0.25x106 CAR+
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 40% 형질도입으로 정규화됨, n=5

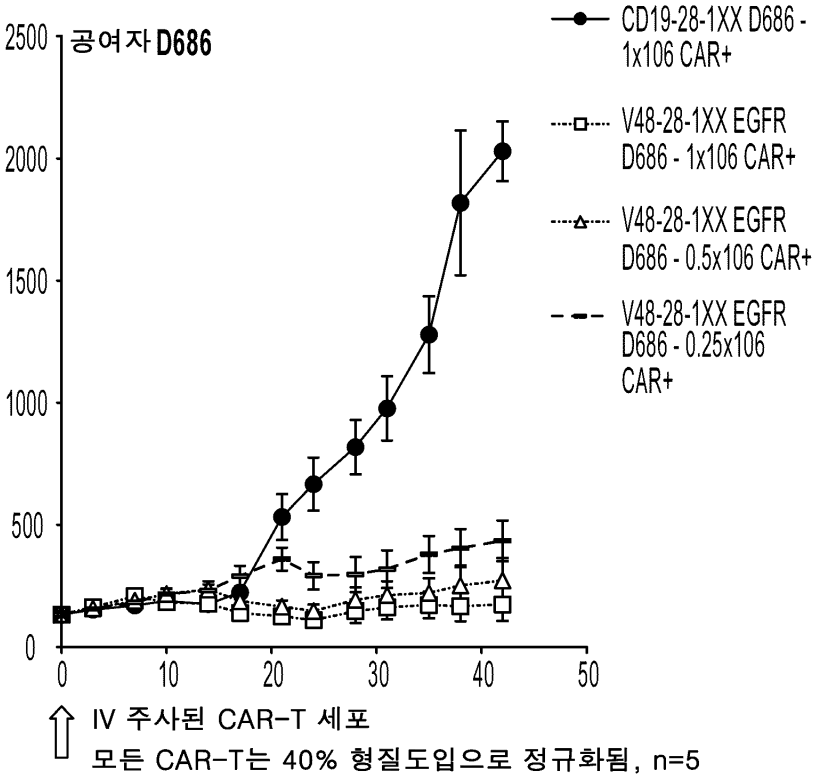
도면12a


공여자 D393
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-1XX D393
V48 EGFR D393 - 1x106 CAR+
V48 EGFR D393 - 0.5x106 CAR+
V48 EGFR D393 - 0.25x106 CAR+
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

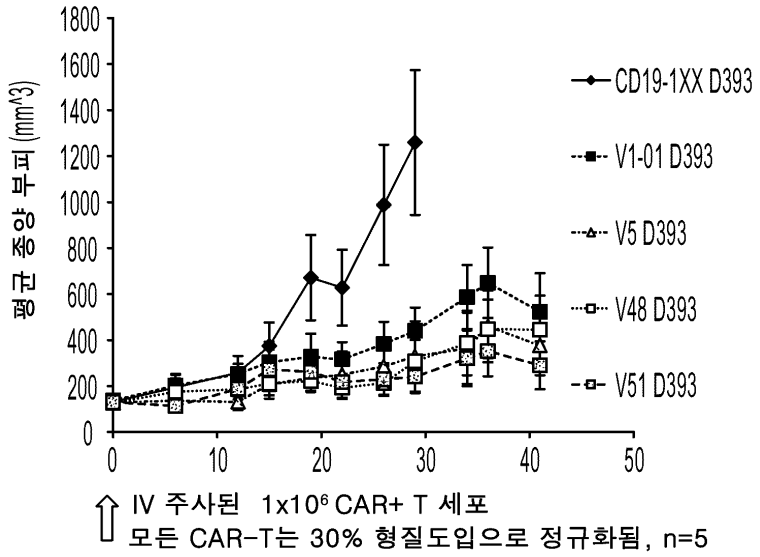
도면12b


공여자 D954
CD19-1XX D954
V48 EGFR D954 - 1x106 CAR+
V48 EGFR D954 - 0.5x106 CAR+
V48 EGFR D954 - 0.25x106 CAR+
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

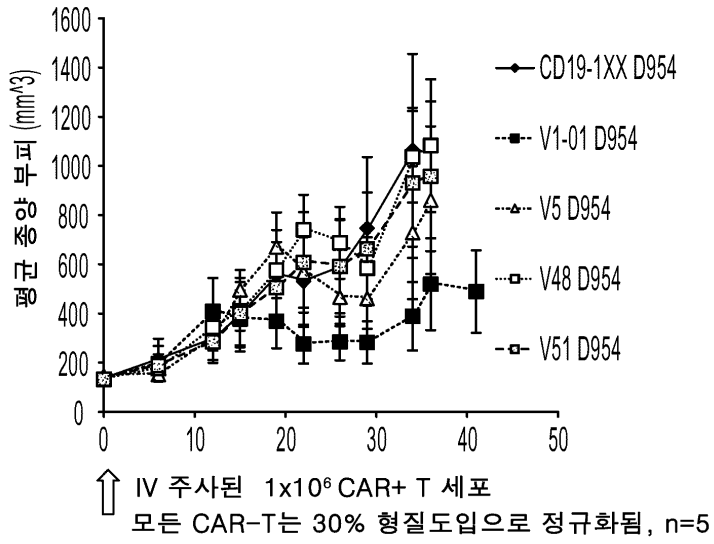
도면12c


공여자 D686
CD19-28-1XX D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX EGFR D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX EGFR D686 - 0.5x106 CAR+
V48-28-1XX EGFR D686 - 0.25x106 CAR+
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 40% 형질도입으로 정규화됨, n=5

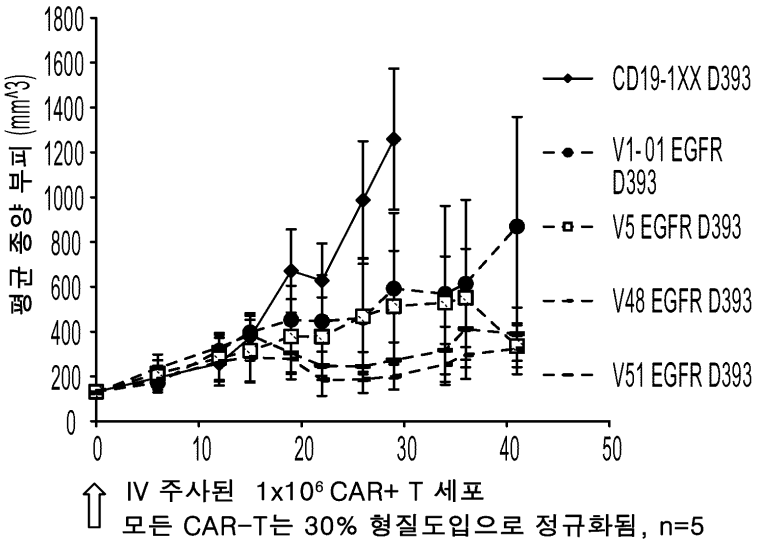
도면13a


평균 종양 부피 (mm^3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-1XX D393
V1-01 D393
V5 D393
V48 D393
V51 D393
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

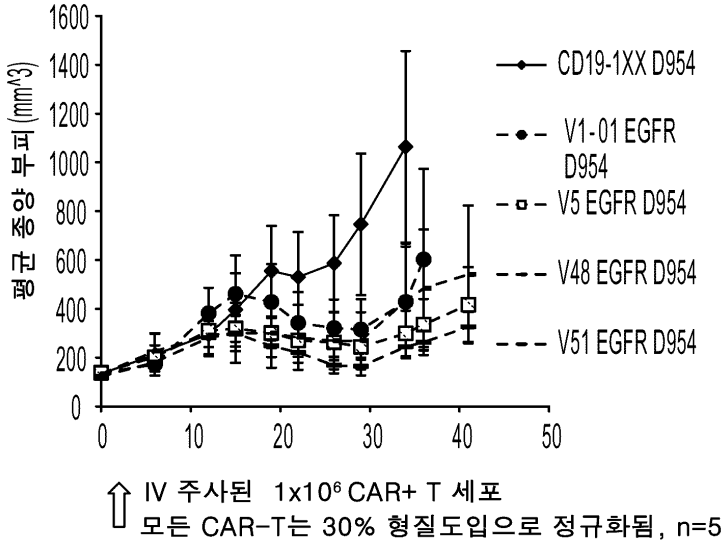
도면13b


평균 종양 부피 (mm^3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-1XX D954
V1-01 D954
V5 D954
V48 D954
V51 D954
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

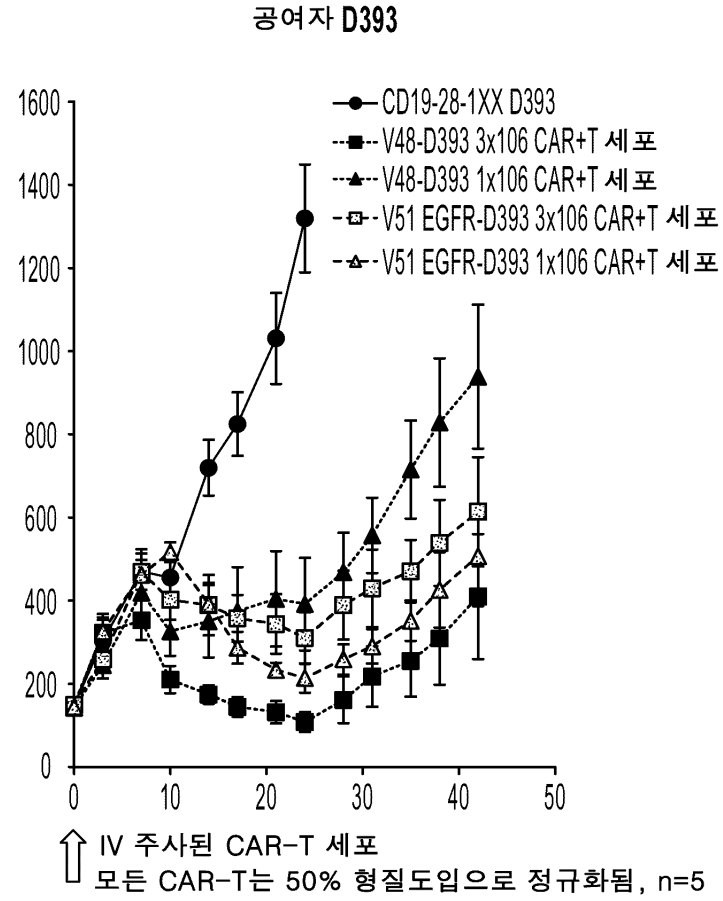
도면14a


평균 종양 부피 (mm^3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-1XX D393
V1-01 EGFR D393
V5 EGFR D393
V48 EGFR D393
V51 EGFR D393
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

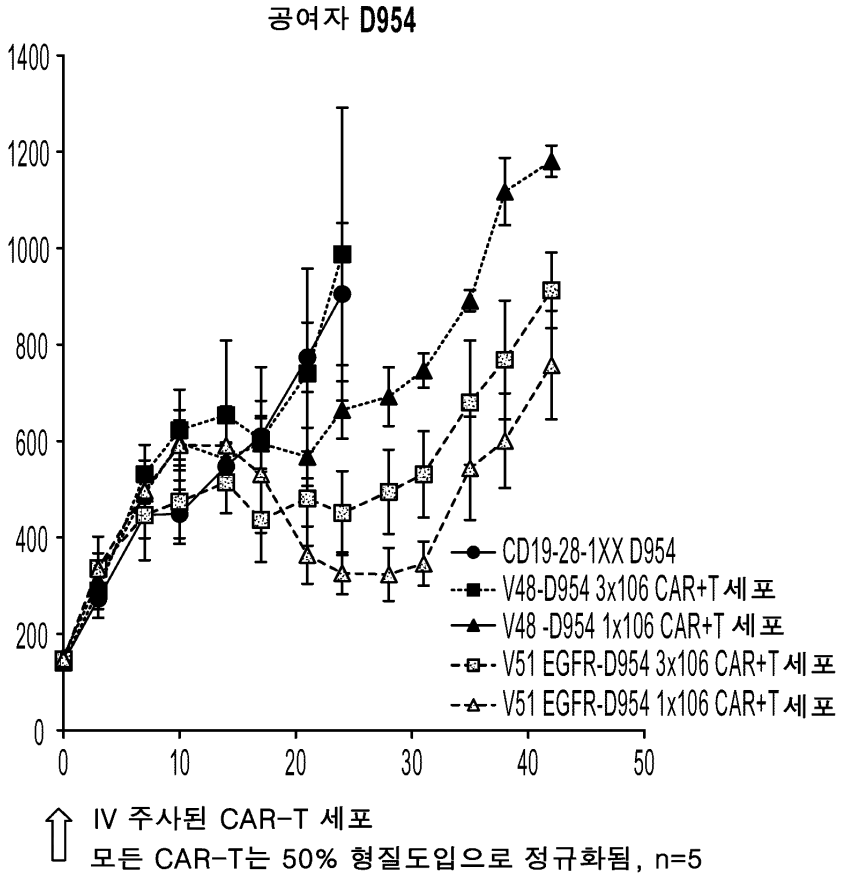
도면14b


평균 종양 부피 (mm^3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-1XX D954
V1-01 EGFR D954
V5 EGFR D954
V48 EGFR D954
V51 EGFR D954
IV 주사된 1x10⁶ CAR+ T 세포
모든 CAR-T는 30% 형질도입으로 정규화됨, n=5

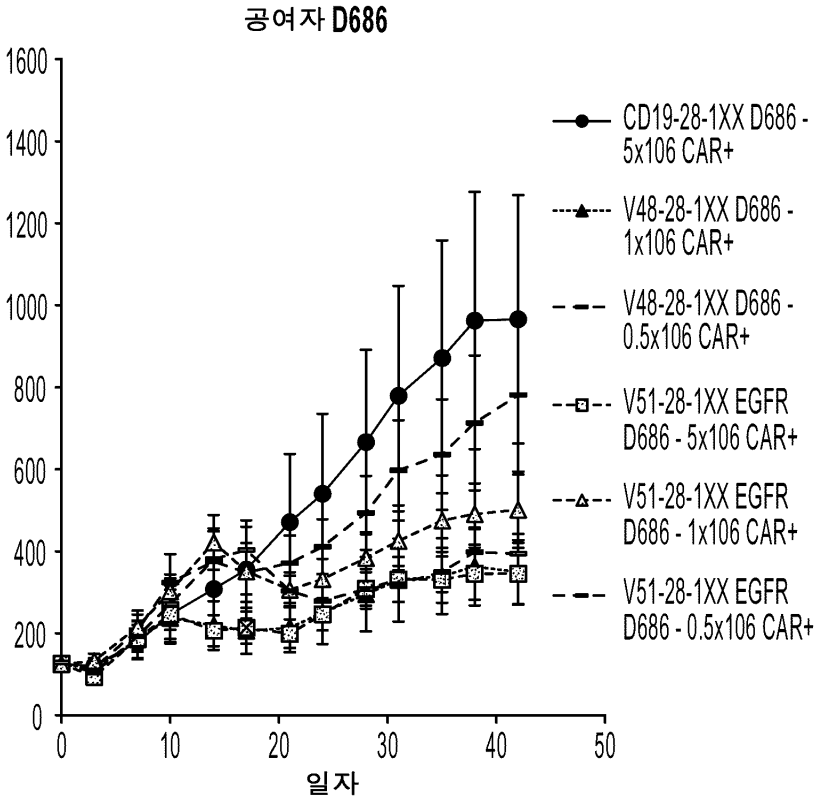
도면15a


공여자 D393
CD19-28-1XX D393
V48-D393 3x106 CAR+T 세포
V48-D393 1x106 CAR+T 세포
V51 EGFR-D393 3x106 CAR+T 세포
V51 EGFR-D393 1x106 CAR+T 세포
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

도면15b

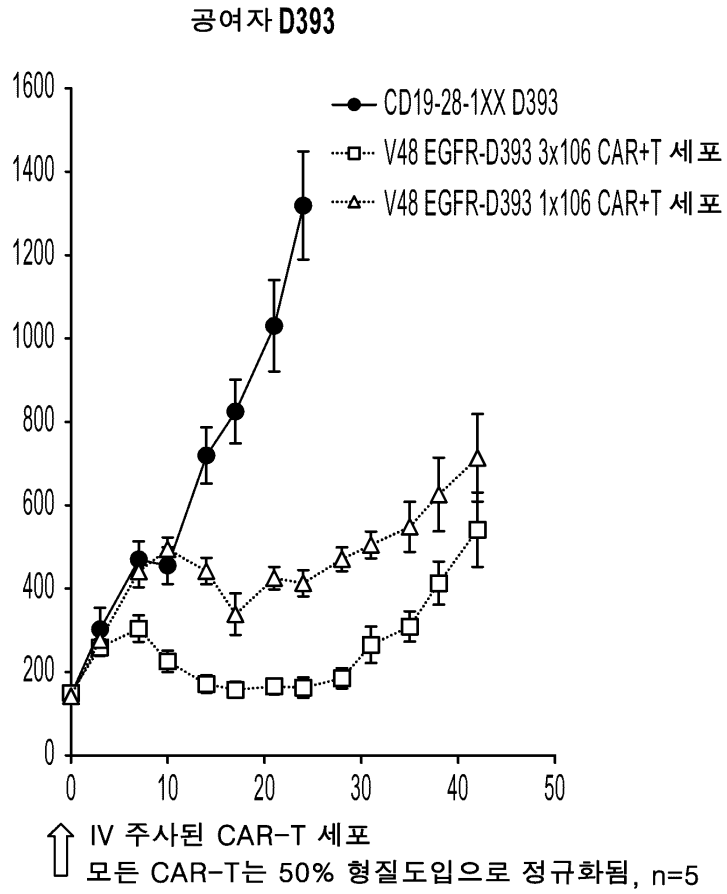

공여자 D954
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-28-1XX D954
V48-D954 3x106 CAR+T 세포
V48 -D954 1x106 CAR+T 세포
V51 EGFR-D954 3x106 CAR+T 세포
V51 EGFR-D954 1x106 CAR+T 세포
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

도면15c

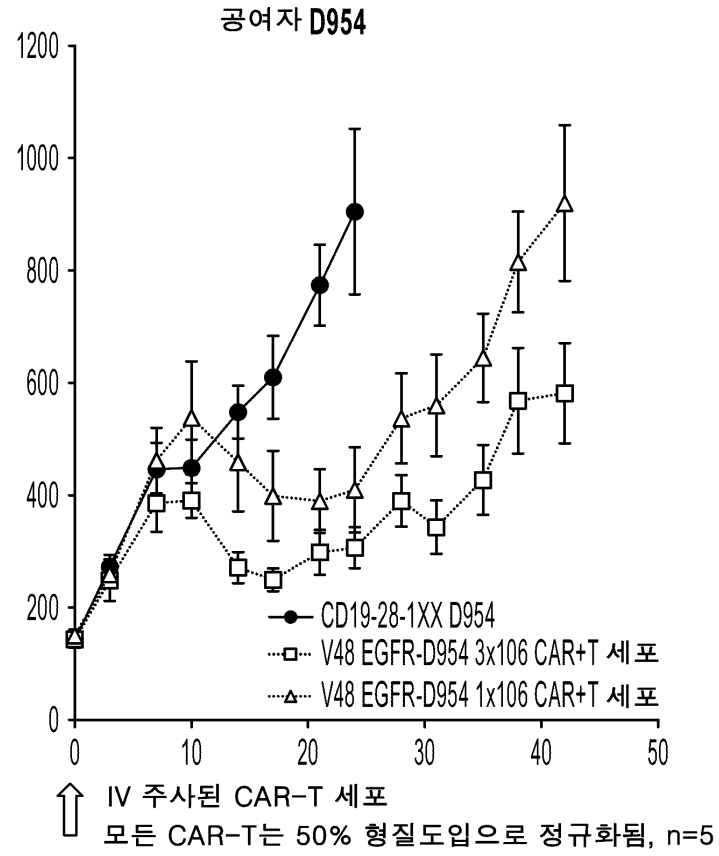


⇧ IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

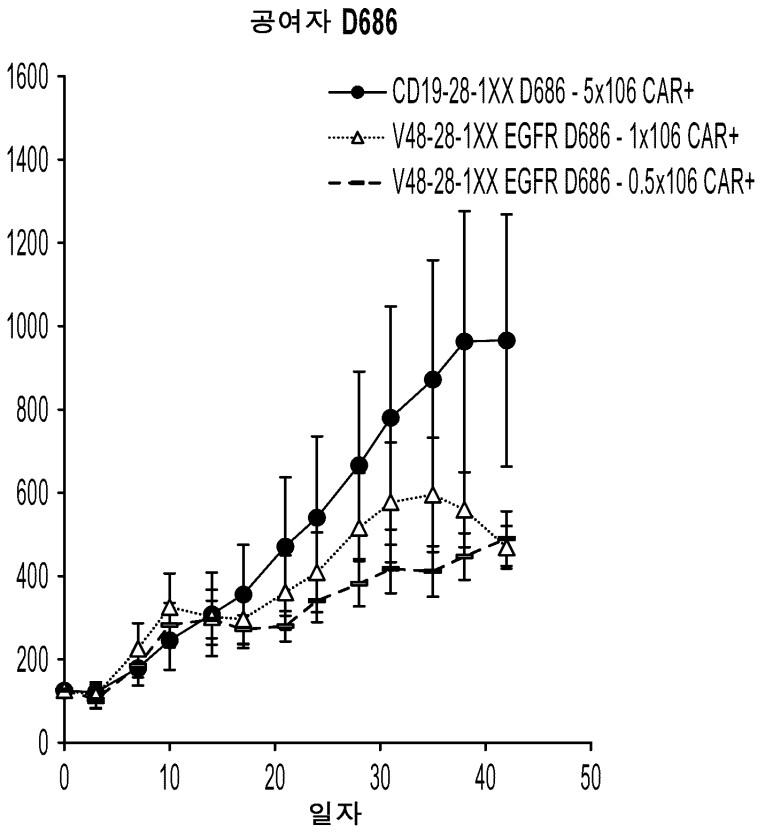
도면16a


공여자 D393
CD19-28-1XX D393
V48 EGFR-D393 3x106 CAR+T 세포
V48 EGFR-D393 1x106 CAR+T 세포
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

도면16b

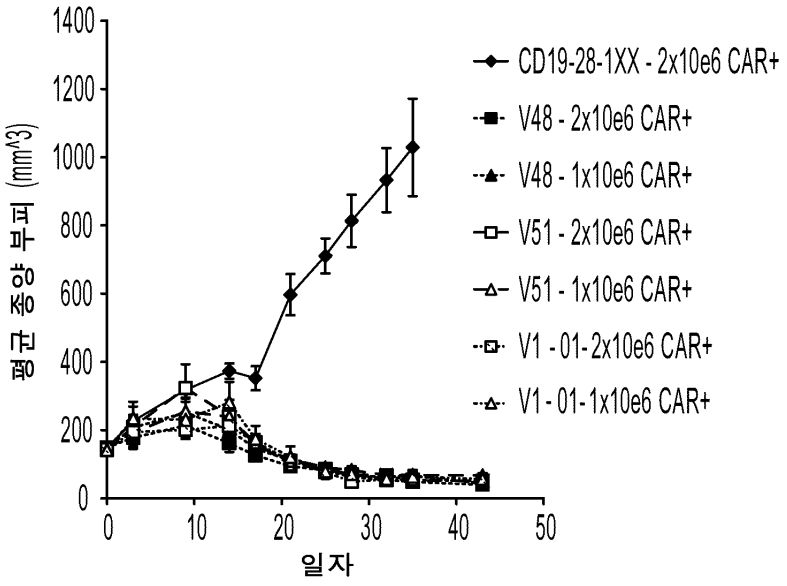

공여자 D954
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-28-1XX D954
V48 EGFR-D954 3x106 CAR+T 세포
V48 EGFR-D954 1x106 CAR+T 세포
IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 50% 형질도입으로 정규화됨, n=5

도면16c



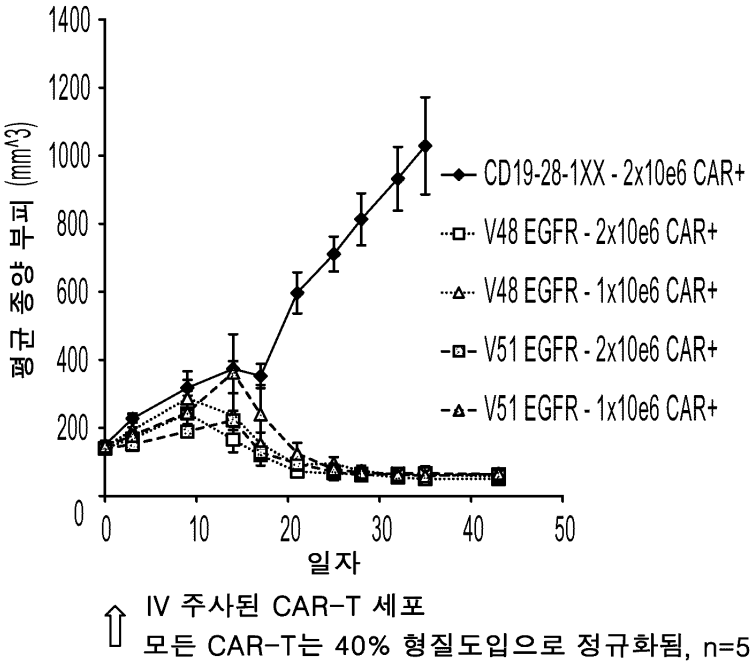
⇧ IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 40% 형질도입으로 정규화됨, n=5

도면17



⇧ IV 주사된 CAR-T 세포
모든 CAR-T는 40% 형질도입으로 정규화됨, n=5

도면18



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

<120> COMPOSITIONS OF GUANYLYL CYCLASE C (GCC) ANTIGEN BINDING AGENTS
AND METHODS OF USE THEREOF

<130> MIL-005WO

<140><141><150> 63/123,331

<151> 2020-12-09

<160> 73

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 1

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 2

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

20

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 3

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> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 4

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys 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> 5

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 5

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8

His Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9

Arg Tyr Trp Met Ser

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10

Arg Tyr Trp Met Thr

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 11

Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 14

Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 15

Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 16

Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Asp Tyr Thr Arg Asp Val

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr

1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Asp Tyr Asn Lys Asp Leu

1 5

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 20

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 23

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Lys Ile Arg Tyr Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 24

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gly Arg Tyr
20 25 30

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

Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 25

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 25

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

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

20 25 30

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

Ala Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

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

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

85 90 95

Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 27

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 29

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
35

<210> 30
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 30
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 31
<211> 66
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 31
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60
Trp Val

65

<210> 32

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 32

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> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 33

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 Phe Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 34

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 34

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

210 215

<210> 35

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp

115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met

130 135 140

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

145 150 155 160

His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro

165 170 175

Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

355

<210> 36

<211> 353

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 36

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ala Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu
130 135 140

Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His
145 150 155 160

Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val
165 170 175

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
180 185 190

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
195 200 205
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg

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

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

340 345 350
Arg

<210> 37
<211> 353
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 37
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln
20 25 30

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

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

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

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
225 230 235 240
Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
245 250 255
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

305 310 315 320

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr

325 330 335

Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

340 345 350

Arg

<210> 38

<211> 353

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 38

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu

130 135 140

Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His

145 150 155 160

Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val

165 170 175

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

305 310 315 320

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr

325 330 335

Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
340 345 350
Arg

<210> 39
<211> 353
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 39
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu
130 135 140
Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His
145 150 155 160

Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val
165 170 175

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

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

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

<210> 40
<211> 18
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<400> 40

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly

1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 41

<211> 1073

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln

1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn

20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala

35 40 45

Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile

50 55 60

Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala

65 70 75 80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg

85 90 95

Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala

100 105 110

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr

115 120 125

Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala

130 135 140

Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu

145 150 155 160

Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys

165 170 175

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

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

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

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

420 425 430

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

Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Asp Lys Lys Arg
500 505 510
Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys
515 520 525
Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Asn Leu
530 535 540
Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
545 550 555 560

Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
565 570 575
Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser
580 585 590
Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
595 600 605
Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser
610 615 620

Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro
625 630 635 640
Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn
645 650 655
Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu
660 665 670

Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg
675 680 685

Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe
690 695 700
Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val
705 710 715 720
Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro
725 730 735
Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe
740 745 750

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

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

Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met
885 890 895
Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu
900 905 910
Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys

915 920 925

Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly

930 935 940

Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu

945 950 955 960

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

965 970 975

Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg

980 985 990

Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe

995 1000 1005

Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys

1055 1060 1065

Glu Ser Thr Tyr Phe

1070

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 43

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 43

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45

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

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140

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

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly

180 185 190

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

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
260 265 270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
325 330 335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
340 345 350
Ile Gly Leu Phe Met
355

<210> 44
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 44

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 45

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 45

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> 46

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 46

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu

50 55 60

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

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

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

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

355

<210> 47

<211> 363

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 47

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Ser Leu Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp

115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala

130 135 140

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
145 150 155 160

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270

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

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
290 295 300

Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320

Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335

His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
340 345 350

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

<210> 48

<211> 363

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

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

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125

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

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
145 150 155 160

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
275 280 285
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
290 295 300
Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320

Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335
His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
340 345 350
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360

<210> 49
<211> 357
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 49
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

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

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

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro

275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe

290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly

305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln

325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln

340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg

355

<210> 50

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 50

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Arg Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe

290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly

305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln

325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln

340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 51

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 51

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

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

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

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350
Ala Leu Pro Pro Arg
355
<210> 52
<211> 357
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 52

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

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

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

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

210 215 220
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe

290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly

305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln

325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln

340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg

355

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 53

Arg Ala Ala Ala

1

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 54

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 55
<211> 742
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 55

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

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

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

165 170 175

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

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

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

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

Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His
420 425 430

Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val
435 440 445

Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln
450 455 460

Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu
465 470 475 480

Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn
485 490 495

Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu
500 505 510

Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys
515 520 525

Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys
530 535 540

Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln
545 550 555 560

Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr
565 570 575

Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro
580 585 590

Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu
595 600 605

Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val
610 615 620

Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala
625 630 635 640

Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys
645 650 655

Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly

660 665 670

Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly

675 680 685

His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly

690 695 700

Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile

705 710 715 720

Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu

725 730 735

Gly Ile Gly Leu Phe Met

740

<210> 56

<211> 742

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 56

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp

115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala

130 135 140

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr

355 360 365

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly

370 375 380

Pro Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His

385 390 395 400

Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile

405 410 415

Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His

420 425 430

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

435 440 445

Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln

450 455 460

Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu

465 470 475 480

Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn

485 490 495

Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu

500 505 510

Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys

515 520 525

Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys

530 535 540

Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln

545 550 555 560

Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr

565 570 575

Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro

580 585 590

Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu

595 600 605

Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val

610 615 620

Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala

625 630 635 640

Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys

645 650 655

Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly

660 665 670

Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly

675 680 685

His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly

690 695 700

Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile

705 710 715 720

Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu

725 730 735

Gly Ile Gly Leu Phe Met

740

<210> 57

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 57

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Ala Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350
Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
355 360 365
Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380

Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400
Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser
405 410 415
Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430
Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
435 440 445

Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
450 455 460
Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
465 470 475 480
Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
485 490 495
Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
515 520 525
Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn

530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
565 570 575

Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val
580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr
625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670

Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700

Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 58

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 58

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270

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

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350
Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
355 360 365
Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380
Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400

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

Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
465 470 475 480
Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly

485 490 495

Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn

500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp

515 520 525

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

530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser

545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala

565 570 575

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

580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn

595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile

610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr

625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly

645 650 655

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn

660 665 670

Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys

675 680 685

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys

690 695 700

Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly

705 710 715 720

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met

725 730 735

<210> 59

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 59

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

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

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

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

Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430
Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser

435 440 445

Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys

450 455 460

Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu

465 470 475 480

Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly

485 490 495

Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn

500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp

515 520 525

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

530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser

545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala

565 570 575

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

580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn

595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile

610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr

625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly

645 650 655

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn

660 665 670

Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys

675 680 685

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700
Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 60
<211> 736
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 60
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160
Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

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

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

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

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380
Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile

385 390 395 400

Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser

405 410 415

Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser

420 425 430

Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser

435 440 445

Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys

450 455 460

Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu

465 470 475 480

Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly

485 490 495

Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn

500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp

515 520 525

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

530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser

545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala

565 570 575

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

580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn

595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile

610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr

625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655
Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670
Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700
Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 61

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 61

atgggctggt cttgtattat cttgtttctc gtcgcaactg ctacaggcgt tcattctgaa 60

gttcaactcc aagaatctgg tcctggcctg gtgaaacctt ccgaaactct ctcactcacc 120

tgtaccgtct caggcgcttc aatatcacac tattattggt cttggttccg gcaacctgca 180

ggcaaaggtc tcgaatggat aggcagaata tatcccagtg gaagcacctc ctataatccc 240

tctctcaagt caagagttgc aatgagcgtt gacacaccca agaaccaatt ctccctcaag 300

ctgtcatctg taactgccgc cgatactgcc gtttactact gcgctagaga tagatcaacc 360

ggatggtcag aatggaattc agatctgtgg ggacggggaa ccctcgtgac cgtatcttct 420

cgggcggccg caattgaagt tatgtatcct cctccttacc tagacaatga gaagagcaat 480

ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac ctttgtccaa gtcccctatt tcccggacct 540

tctaagccct tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600

gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 660

gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat 720

gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagagtga agttcagcag gagcgcagac 780

gcccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 840

gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 900

agaaggaaga accctcagga aggcctgttc aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 960

gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1020

ttccagggtc tcagtacagc caccaaggac accttcgacg cccttcacat gcaggccctg 1080

cccctcgc 1089

<210> 62

<211> 1074

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 62

atggaactgg gactgtcttg ggtgttcctg gtcgctatat tggaaggagt acagtgccag 60

gtccagctcg tcgagtccgg gggtggcctg gtgcagcccg gcggcagcct ccggctgagc 120

tgcacagcct cagggtttac attcagcagg tactggatga gttgggttag gcaagcccct 180

ggcaaaggcc tggagtgggt ggccaaaatc cgacatgatg ggggcgaaaa gtactatgtg 240

gatagtgtga agggacggtt cacaatatca cgagacaatg ccaaaaactc tttgtacctg 300

caaatgaact ccctgcgcgc cgaagacaca gctgtgtact actgcgctac agactacact 360

agggacgtct ggggtcaagg aacagccgtc accgtgagta gtcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg ctaa 1074

<210> 63

<211> 1071

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 63

atggagctgg gattgtcctg ggttttcctg gtggctatac tcgaaggcgt acagtgtgaa 60

gtgcagttgg tggagagtgg cggtggcctg gcccagccgg gaggctcttt gagactctcc 120

tgcgctgcct ccggcttcac tttctcccgc tattggatga cctgggtccg gcaggcgccc 180

ggcggacgcc tggagtgggt ggctaagatc aagtatgatg gatcagaaaa atattacgca 240

gatagcgtaa aaggccggtt cacaatatcc agggataatg caaaaaactc cctgtatctg 300

cagatggata gcctgcgcgc tgaagacacc gccgtatatt attgcacaag agactacaat 360

aaagattact ggggccaggg aaccctggtt acggtgagct cacgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg c 1071

<210> 64

<211> 1071

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 64

atggagctgg ggctttcttg ggtgtttctg gtagccatcc tcgagggagt ccagtgcgag 60

gtccagctcg tcgaatctgg cgggggggctg gtccagcctg gcggttctct ccgcctgacc 120

tgtgcggcct cagggttcac tttcagccgg tactggatga catgggtgag acaggccccc 180

ggcaagggac tggaatgggt agcaaagatt aggcacgacg gcggtgagaa atactatccc 240

gacagtgtca aggggcggtt tactgtctcc cgagataatg ccaaaaactc actctacctg 300

cagatggata atctgcgagc ggaggatact gctatgtact actgtactcg agactacaac 360

aaggacctgt gggggcaggg gacactggtg acggttagtt ctcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg c 1071

<210> 65

<211> 1071

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 65

atggaactgg gactgtcatg ggtctttctc gtggccattc tcgaggggggt ccagtgtgag 60

gttcagctgg tggagagcgg ggggggtctg gttcagccag gtggcagtct taggttgtca 120

tgtgccgcga gcgggttcac gttctcacga tattggatga cctgggttcg ccaggcacca 180

gggaaggggc tggagtgggt cgccaagatc aggcacgacg gcggagaaaa atattacgcg 240

gattccgtga aaggcagatt cacaatctct agggataacg ccaaaaattc cctttatctt 300

cagatgaata gcctgagggc tgaagacact gccgtgtact actgcacgcg ggattacaac 360

aaagattatt ggggccaggg aacactggtg accgtcagct ctcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg c 1071

<210> 66

<211> 2226

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 66

atgggctggt cttgtattat cttgtttctc gtcgcaactg ctacaggcgt tcattctgaa 60

gttcaactcc aagaatctgg tcctggcctg gtgaaacctt ccgaaactct ctcactcacc 120

tgtaccgtct caggcgcttc aatatcacac tattattggt cttggttccg gcaacctgca 180

ggcaaaggtc tcgaatggat aggcagaata tatcccagtg gaagcacctc ctataatccc 240

tctctcaagt caagagttgc aatgagcgtt gacacaccca agaaccaatt ctccctcaag 300

ctgtcatctg taactgccgc cgatactgcc gtttactact gcgctagaga tagatcaacc 360

ggatggtcag aatggaattc agatctgtgg ggacggggaa ccctcgtgac cgtatcttct 420

cgggcggccg caattgaagt tatgtatcct cctccttacc tagacaatga gaagagcaat 480

ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac ctttgtccaa gtcccctatt tcccggacct 540

tctaagccct tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600

gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 660

gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat 720

gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagagtga agttcagcag gagcgcagac 780

gcccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 840

gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 900

agaaggaaga accctcagga aggcctgttc aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 960

gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1020

ttccagggtc tcagtacagc caccaaggac accttcgacg cccttcacat gcaggccctg 1080

ccccctcgcg gaagcggagc tactaacttc agcctgctga agcaggctgg agacgtggag 1140

gagaaccctg gacccatgct tctcctggtg acaagccttc tgctctgtga gttaccacac 1200

ccagcattcc tcctgatccc acgcaaagtg tgtaacggaa taggtattgg tgaatttaaa 1260

gactcactct ccataaatgc tacgaatatt aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt 1320

ggcgatctcc acatcctgcc ggtggcattt aggggtgact ccttcacaca tactcctcct 1380

ctggacccac aggaactgga tattctgaaa accgtaaagg aaatcacagg gtttttgctg 1440

attcaggctt ggcctgaaaa caggacggac ctccatgcct ttgagaacct agaaatcata 1500

cgcggcagga ccaagcaaca tggtcagttt tctcttgcag tcgtcagcct gaacataaca 1560

tccttgggat tacgctccct caaggagata agtgatggag atgtgataat ttcaggaaac 1620

aaaaatttgt gctatgcaaa tacaataaac tggaaaaaac tgtttgggac ctccggtcag 1680

aaaaccaaaa ttataagcaa cagaggtgaa aacagctgca aggccacagg ccaggtctgc 1740

catgccttgt gctcccccga gggctgctgg ggcccggagc ccagggactg cgtctcttgc 1800

cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg gacaagtgca accttctgga gggtgagcca 1860

agggagtttg tggagaactc tgagtgcata cagtgccacc cagagtgcct gcctcaggcc 1920

atgaacatca cctgcacagg acggggacca gacaactgta tccagtgtgc ccactacatt 1980

gacggccccc actgcgtcaa gacctgcccg gcaggagtca tgggagaaaa caacaccctg 2040

gtctggaagt acgcagacgc cggccatgtg tgccacctgt gccatccaaa ctgcacctac 2100

ggatgcactg ggccaggtct tgaaggctgt cccacgaatg ggcctaagat cccgtccatc 2160

gccactggga tggtgggggc cctcctcttg ctgctggtgg tggccctggg gatcggcctc 2220

ttcatg 2226

<210> 67

<211> 2205

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 67

atggaactgg gactgtcttg ggtgttcctg gtcgctatat tggaaggagt acagtgccag 60

gtccagctcg tcgagtccgg gggtggcctg gtgcagcccg gcggcagcct ccggctgagc 120

tgcacagcct cagggtttac attcagcagg tactggatga gttgggttag gcaagcccct 180

ggcaaaggcc tggagtgggt ggccaaaatc cgacatgatg ggggcgaaaa gtactatgtg 240

gatagtgtga agggacggtt cacaatatca cgagacaatg ccaaaaactc tttgtacctg 300

caaatgaact ccctgcgcgc cgaagacaca gctgtgtact actgcgctac agactacact 360

agggacgtct ggggtcaagg aacagccgtc accgtgagta gtgcggccgc aattgaagtt 420

atgtatcctc ctccttacct agacaatgag aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa 480

gggaaacacc tttgtccaag tcccctattt cccggacctt ctaagccctt ttgggtgctg 540

gtggtggttg gtggagtcct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc ctttattatt 600

ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc 660

cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca 720

gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc 780

cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 840

aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 900

ggcctgttca atgaactgca gaaagataag atggcggagg ccttcagtga gattgggatg 960

aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt tccagggtct cagtacagcc 1020

accaaggaca ccttcgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcgg aagcggagct 1080

actaacttca gcctgctgaa gcaggctgga gacgtggagg agaaccctgg acccatgctt 1140

ctcctggtga caagccttct gctctgtgag ttaccacacc cagcattcct cctgatccca 1200

cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 1260

acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg 1320

gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctcctc tggacccaca ggaactggat 1380

attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac 1440

aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat 1500

ggtcagtttt ctcttgcagt cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc 1560

aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat 1620

acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaaat tataagcaac 1680

agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag 1740

ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg 1800

gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct 1860

gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga 1920

cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggccccca ctgcgtcaag 1980

acctgcccgg caggagtcat gggagaaaac aacaccctgg tctggaagta cgcagacgcc 2040

ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt 2100

gaaggctgtc ccacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg ccactgggat ggtgggggcc 2160

ctcctcttgc tgctggtggt ggccctgggg atcggcctct tcatg 2205

<210> 68

<211> 2208

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 68

atggagctgg gattgtcctg ggttttcctg gtggctatac tcgaaggcgt acagtgtgaa 60

gtgcagttgg tggagagtgg cggtggcctg gcccagccgg gaggctcttt gagactctcc 120

tgcgctgcct ccggcttcac tttctcccgc tattggatga cctgggtccg gcaggcgccc 180

ggcggacgcc tggagtgggt ggctaagatc aagtatgatg gatcagaaaa atattacgca 240

gatagcgtaa aaggccggtt cacaatatcc agggataatg caaaaaactc cctgtatctg 300

cagatggata gcctgcgcgc tgaagacacc gccgtatatt attgcacaag agactacaat 360

aaagattact ggggccaggg aaccctggtt acggtgagct cacgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080

gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140

cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200

ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260

gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320

ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380

gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440

aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500

catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560

ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620

aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680

aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740

gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800

agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860

tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920

ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980

aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040

gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100

cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160

gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 69

<211> 2208

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 69

atggagctgg ggctttcttg ggtgtttctg gtagccatcc tcgagggagt ccagtgcgag 60

gtccagctcg tcgaatctgg cgggggggctg gtccagcctg gcggttctct ccgcctgacc 120

tgtgcggcct cagggttcac tttcagccgg tactggatga catgggtgag acaggccccc 180

ggcaagggac tggaatgggt agcaaagatt aggcacgacg gcggtgagaa atactatccc 240

gacagtgtca aggggcggtt tactgtctcc cgagataatg ccaaaaactc actctacctg 300

cagatggata atctgcgagc ggaggatact gctatgtact actgtactcg agactacaac 360

aaggacctgt gggggcaggg gacactggtg acggttagtt ctcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080

gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140

cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200

ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260

gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320

ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380

gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440

aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500

catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560

ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620

aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680

aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740

gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800

agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860

tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920

ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980

aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040

gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100

cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160

gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 70

<211> 2208

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 70

atggaactgg gactgtcatg ggtctttctc gtggccattc tcgagggggt ccagtgtgag 60

gttcagctgg tggagagcgg gggggtctg gttcagccag gtggcagtct taggttgtca 120

tgtgccgcga gcgggttcac gttctcacga tattggatga cctgggttcg ccaggcacca 180

gggaaggggc tggagtgggt cgccaagatc aggcacgacg gcggagaaaa atattacgcg 240

gattccgtga aaggcagatt cacaatctct agggataacg ccaaaaattc cctttatctt 300

cagatgaata gcctgagggc tgaagacact gccgtgtact actgcacgcg ggattacaac 360

aaagattatt ggggccaggg aacactggtg accgtcagct ctcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080

gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140

cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200

ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260

gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320

ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380

gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440

aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500

catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560

ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620

aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680

aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740

gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800

agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860

tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920

ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980

aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040

gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100

cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160

gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 71

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 71

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> 72

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> SITE

<222> (1)..(30)

<223> /note="This sequence may encompass 1-6 'Gly Gly Gly Gly Ser' repeating units"

<400> 72

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 73

Arg Gly Asp Ser

1