



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0093248
 (43) 공개일자 2017년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 14/705 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
 C07K 16/40 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
 C12N 9/88 (2006.01)

(71) 출원인
 다나-파버 캔서 인스티튜트 임크.
 미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴
 450

(52) CPC특허분류
 C07K 14/70521 (2013.01)
 A61K 39/0011 (2013.01)

(72) 발명자
 마라스코 웨인 에이.
 미국 02481 메사추세츠주 웰슬레이 라이스 스트리
 트 43

(21) 출원번호 10-2017-7020099

(74) 대리인
 김진희, 김태홍

(22) 출원일자(국제) 2015년12월21일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2017년07월18일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/067178

(87) 국제공개번호 WO 2016/100980

국제공개일자 2016년06월23일

(30) 우선권주장

62/094,596 2014년12월19일 미국(US)

전체 청구항 수 : 총 20 항

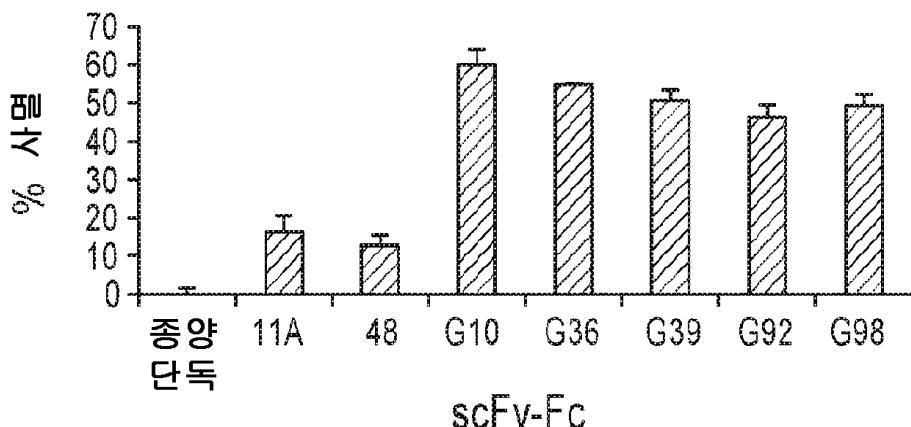
(54) 발명의 명칭 탄산무수화효소 IX 특이적 키메라 항원 수용체 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 탄산무수화효소 IX(CAIX)에 특이적인 키메라 항원 수용체 세포, 및 CAIX 발현 암, 예컨대 신장 세포 암종의 치료를 위해 상기 세포를 사용하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1a

sk-rc-09



(52) CPC특허분류

C07K 16/40 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12Y 402/01001 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/60 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

세포내 신호전달 도메인, 경막 도메인, 및 탄산무수화효소 IX(G250) 특이적 수용체를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 2

제1항에 있어서, 경막 도메인은 세포외 도메인과 경막 도메인 사이에 위치하는 줄기(stalk) 영역을 추가로 포함하는 것인 CAR.

청구항 3

제1항에 있어서, 경막 도메인이 CD28을 포함하는 것인 CAR.

청구항 4

제1항에 있어서, 경막 도메인과 세포내 신호전달 도메인 사이에 위치하는 하나 이상의 추가 보조자극 분자를 추가로 포함하는 CAR.

청구항 5

제4항에 있어서, 보조자극 분자가 CD28, 4-1BB, ICOS 또는 OX40인 CAR.

청구항 6

제1항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 CD3 제타 쇄를 포함하는 것인 CAR.

청구항 7

제1항에 있어서, 탄산무수화효소 IX(G250) 특이적 수용체가 항체인 CAR.

청구항 8

제7항에 있어서, 항체가 Fab 또는 scFV인 CAR.

청구항 9

제7항에 있어서, 항체가

- a) 아미노산 서열 SYAMS(서열번호 55)를 포함하는 CDR1,
- b) 아미노산 서열 AISANGGTTYYADSVKG(서열번호 67)를 포함하는 CDR2, 및
- c) 아미노산 서열 NGNYRGAFDI(서열번호 65)를 포함하는 CDR3

을 포함하는 중쇄; 및

i) 아미노산 서열 TGSSSNIGAGFDVH(서열번호 68)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNTNRPS(서열번호 69)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDRSRLSAWV(서열번호 70)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄;

ii) 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNSNRPS(서열번호 72)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDRSLSWV(서열번호 73)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄;

iii) 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNTNRPS(서열번호 69)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSTLRVWM(서열번호 74)을 포함하는 CDR3을 가진 경쇄;

iv) 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNNNRPS(서열번호 62)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSTLRVWM(서열번호 74)을 포함하는 CDR3을 가진 경쇄;

함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDKSLTWV(서열번호 76)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄;

v) 아미노산 서열 TGTSSNIGAGYDVH(서열번호 81)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNNNRPS(서열번호 62)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDKSLSWV(서열번호 80)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄;

vi) 아미노산 서열 TGSSSNIGAGFDVH(서열번호 68)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNNNRPS(서열번호 62)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSSLASAWV(서열번호 82)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 또는

vii) 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNSNRPS(서열번호 72)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSSLASAWV(서열번호 82)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄

를 갖는 것인 CAR.

청구항 10

제1항에 있어서, scFv 항체는 서열번호 1 및 3 내지 23의 아미노산 서열들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 갖고, 상기 scFv 항체는 서열번호 2 및 24 내지 44의 아미노산 서열들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는 것인 CAR.

청구항 11

제1항의 키메라 항원 수용체를 세포 표면 막 상에서 발현하여 보유하는 유전자 조작 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, 세포가 T-세포 또는 NK 세포인 유전자 조작 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, T 세포가 CD4⁺ 또는 CD8⁺인 유전자 조작 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포의 혼합된 집단을 포함하는 유전자 조작 세포.

청구항 15

탄산무수화효소 IX(G250) 발현 종양을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서, 제11항의 유전자 조작 세포를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 유전자 조작 세포는 대상체에 대해 자가유래성인 세포로부터 유래되는 것인 치료 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 종양이 신장암, 난소암, 유방암, 식도암, 방광암, 대장암 또는 비소세포 폐암인 치료 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 신장암이 신장 투명 세포 암인 치료 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, IL-2를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 치료 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 항-PD-1, 항-PDL-1 또는 항-CTL4 항체를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 2014년 12월 19일에 제출된 미국 가출원 제62/094,596호의 우선권 및 이익을 주장하며, 상기 가출원의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 인용된다.

[0003] 서열목록의 참고 인용

[0004] 2015년 12월 21일에 생성된 텍스트 파일(파일명: "DFCI-092_001WO Final Seq Listing_ST25.txt")의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 인용된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 탄산무수화효소 IX(CAIX)에 특이적인 키메라 항원 수용체 세포, 및 CAIX 발현 암, 예컨대 신장 세포 암종의 치료를 위해 상기 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0007] 정부 지원

[0008] 본 발명은 미국 국립보건원에 의해 부여된 승인번호 R21DK07228 하에서 정부 지원으로 만들어졌다. 정부는 본 발명에서 일부 권리를 가진다.

배경 기술

[0009] 탄산무수화효소는 살아있는 유기체에서 pH 균형을 유지하기 위해 이산화탄소의 가역적 수화를 촉진하는 아연 메탈로효소의 한 패밀리이다. 탄산무수화효소 IX(CAIX)는 54/58 kDa의 분자량을 가진 경막 당단백질이다. 구조적으로, CAIX는 4개의 도메인들로 구성된다: N-말단 프로테오글리칸 유사 도메인(PG)(aa 53-111), CA 촉매 도메인(CA)(aa 135-391), 경막 나선형 분절(aa 415-434), 및 짧은 세포질내 꼬리(aa 434-459). 저산소성 조건에서, CAIX 유전자는 저산소증 유도성 전사 인자 HIF-1 α 에 의해 전사 수준에서 직접적으로 활성화되어, 세포외 배지로의 양성자의 수송 및 pH의 저하를 유발한다. 따라서, CAIX 발현은 다양한 종양들에서 저산소증에 대한 대용 마커로서 간주될 수 있다. 그 결과, CA 활성에 의한 종양 미세환경의 산성화 및 CAIX의 PG 도메인 내의 O-연결된 글리칸 구조의 캐라틴 셀酹이트 유닛은 세포 부착 및 종양 진행의 과정에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 추정된다.

[0010] CAIX는 종양 관련 항원으로서 간주되고, 그의 과다발현은 여러 유형의 고형 종양, 특히 투명 세포 유형의 신장 세포 암종(RCC)뿐만 아니라, 난소, 유방, 식도, 방광, 대장, 비소세포 폐, 자궁경부의 이형성증 등을 비롯한 여러 조직학적 유형의 암종에서 발견된다. CAIX 발현은 암 진단 및 발암의 초기 검출을 위한 마커로서 작용하는 것으로 제안되어 있고, 높은 반응률 및 낮은 독성을 유발하는, 흑색종 및 신장암의 IL-2 치료된 환자에서 유리한 반응에 대한 예후 마커이기도 하다. 면역염색 및 웨스턴 블롯 연구는 고도의 CAIX 발현이 대다수의 일차 RCC(투명 세포 유형의 과립형 또는 방추 세포, 유두 유형의 호염색성 세포, 및 협염색성 세포를 제외한 집합관), 낭포성 RCC 및 전이성 RCC로 제한되나, 정상 신장 조직, 양성 상피 낭포성 병변 또는 비-신장 세포 투명 세포 선암종에서는 관찰되지 않는다.

[0011] RCC는 전이성 병변이 신장절제 후 자연발생적으로 퇴행하고 면역조절 요법, 예컨대, 암 백신 및 IL-2에 반응한다는 증거를 나타내는, 흑색종을 제외한 두 유형의 면역원성 종양들 중 하나이다. 생체외 증폭된 종양 침윤 림프구(TIL)를 사용하는, 전이성 흑색종 및 RCC 환자를 위한 입양 T 세포 요법은 일부 성공을 보였다. 최근에, TCR-변경된 T 세포(TCR α 및 β 쇄)도 효과적인 종양 표적화 T-세포 테퍼토리를 제공하는 데 사용되었다. 그러나, 후-표적화 항-종양 활성은 MHC 클래스 I-제한된 항원 제시 기구의 모든 수준에서 하향조절을 수반하는 결핍, 종양 상의 보조자극 분자의 발현 상실로 인해 유도된 무감작뿐만 아니라 종양에 의한 면역억제 활성을 가진 사이토카인의 분자 배출 및 분비에 의해 방해받을 수 있다.

발명의 내용

[0012] 다양한 양태에서, 본 발명은 세포내 신호전달 도메인, 경막 도메인, 및 탄산무수화효소 IX(G250) 특이적 수용체를 포함하는 세포외 도메인을 가진 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. 일부 양태에서, CAR은 세포외 도메인과 경막 도메인 사이에 위치하는 줄기(stalk) 영역을 추가로 포함한다. 경막 도메인은 예를 들면, CD28이다. 다른 양태에서, CAR은 경막 도메인과 세포내 신호전달 도메인 사이에 위치하는 하나 이상의 추가 보조자극 분자를 추가로 포함한다. 보조자극 분자는 예를 들면, CD28, 4-1BB, ICOS 또는 OX40이다. 세포내 신호전달 도메인은

CD3 제타 쇄를 포함한다.

[0013] 탄산무수화효소 IX(G250) 특이적 수용체는 항체, 예컨대, Fab 또는 scFv이다. 바람직하게는, 항체는 아미노산 서열 SYAMS(서열번호 55)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 AISANGGTTYYADSVKG(서열번호 67)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 NGNYRGAFDI(서열번호 65)를 포함하는 CDR3을 가진 중쇄; 및 아미노산 서열 TGSSSNIGAGFDVH(서열번호 68)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNTNRPS(서열번호 69)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSRLSAWV(서열번호 70)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNSNRPS(서열번호 72)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDRSLSWV(서열번호 73)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNTNRPS(서열번호 69)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSTLRVWM(서열번호 74)을 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNRRPS(서열번호 62)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDKSLTWV(서열번호 76)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGTSSNIGAGYDVH(서열번호 79)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNRRPS(서열번호 62)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDKSLSWV(서열번호 80)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGSSSNIGAGFDVH(서열번호 81)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNRRPS(서열번호 62)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSSLAWV(서열번호 82)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 또는 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNSNRPS(서열번호 72)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSSLAWV(서열번호 82)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄를 가진다.

[0014] 또 다른 양태에서, scFv 항체는 서열번호 1 및 3 내지 23의 아미노산 서열들로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 갖고, 이때 상기 scFv 항체는 서열번호 2 및 24 내지 44의 아미노산 서열들로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가진다.

[0015] 본 발명은 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체를 세포 표면 막 상에서 발현하여 보유하는 유전자 조작 세포도 제공한다. 상기 세포는 T 세포 또는 NK 세포이다. T 세포는 CD4+ 또는 CD8+이다. 다른 양태에서, 세포는 CD4+ 세포와 CD8+ 세포의 혼합된 집단이다.

[0016] 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 유전자 조작 세포를 대상체에게 투여함으로써 탄산무수화효소 IX(G250) 발현 종양을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 유전자 조작 세포는 대상체에 대해 자가유래성인 세포로부터 유래한다. 종양은 신장암, 난소암, 유방암, 식도암, 방광암, 대장암 또는 비소세포 폐암이다. 신장암은 예를 들면, 신장 투명 세포 암이다. 일부 양태에서, 상기 방법은 IL-2, 항-PD-1, 항-PDL-1 또는 항-CTLA4 항체를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0017] 달리 정의되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어들 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다. 본원에 기재된 방법 및 재료와 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 이하에 기재되어 있다. 본원에서 언급된 모든 공개문헌들, 특히출원들, 특허들 및 다른 참고문헌들은 전체적으로 명백히 참고로 도입된다. 불일치의 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 좌우할 것이다. 추가로, 본원에 기재된 재료, 방법 및 예는 단지 예시적이고 한정하기 위한 것이 아니다.

[0018] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 하기 상세한 설명 및 청구범위로부터 자명할 것이고 이러한 설명 및 청구범위에 의해 포괄될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1: CAIX 특이적 Ab들의 ADCC. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CAIX 특이적 scFv-Fc 미니바디를 인간 PBMC(E:T 25:1)의 존재 하에서 표적 종양 세포에 첨가하였다. 유사한 결과가 2회 실험에서 수득되었다. 무관한 항-SARS scFv-Fc(11A) 및 항-CCR4 scFv-Fc(48) 미니바디는 음성 대조군으로서 사용되었다. A, CAIX+ sk-rc-09 세포; B, CAIX+ sk-rc-52 세포; C, CAIX- sk-rc-59 세포.

도 2: CAIX 특이적 CAR들의 구축 및 발현. A. 구축: 제1세대 CAR인 scFv-CD8-TCR ζ (CD8 CAR)는 절단된 인간 CD8 α 세포와 도메인, 힌지(H), 경막(TM) 및 세포내 영역에 커플링된 후 인간 TCR ζ 의 신호전달 도메인에 커플링되어 있는 특이적 항-CAIX scFv로 구성된다. 제2세대 CAR인 scFv-CD28-TCR ζ (CD28 CAR)는 TCR ζ 에 대한 인간 CD28 세포와, TM 및 세포내 신호전달 도메인과 융합된 항-CAIX scFv를 함유한다. 항-CAIX CAR들을 둘 다를 내부 eF1- α 프로모터에 의해 유발된 발현을 가진 비시스트론성(bicistronic) 자가-불활성화(SIN) 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝하였다. CAR 조절 구축물은 무관한 항-HIV CCR5 특이적 A8 scFv 치환을 함유한다. B. FACS 분석: 레

포터 유전자 ZsGreen을 사용하여 렌티바이러스 CAR 구축물에 의한 일차 T 세포 형질도입 효율을 정량화하였다. 추가로, 항-CAIX scFv CAR들을 CAIX-Fc 융합 단백질로 염색하였고 C9-태그(TETSVAPPA)를 1D4 항체로 염색하였다. 형질도입되지 않은 활성화된 T-세포인 LAK만이 염색되지 않은 세포 대조군(i)으로서 사용되었거나, 2차 항체(ii. PE-항-인간 IgG 및 iii. APC-항-마우스 IgG)로 염색되어 염색 대조군으로서 사용되었다. C. 웨스턴 블로트: 항-CAIX(클론 G36) CD28 및 항-CCR5(클론 A8) CD28 CAR들의 단량체/이량체 구조물뿐만 아니라, 형질도입되지 않은 T 세포의 내생성 TCR ζ 쇄의 분자 크기도 표시되어 있다.

도 3: CAIX 특이적 CART들의 이펙터 기능. A. 사이토카인 분비. 사이토카인 생성을 위해 항-CAIX CART, 무관한 CART 또는 활성화된 대조군 T 세포(LAK)를 신장암 세포주 sk-rc-52(CAIX+) 및 sk-rc-59(CAIX-)와 함께 밤새 공배양하였다. 2개 내지 3개의 결과를 대표하는 하나가 표시되어 있다. B. ELISPOT. G36 CART 또는 대조군 A8 CART 세포를 밤새 종양 세포에 첨가하였다. ELISPOT에 의해 검출된 IFN- γ 또는 그랜자임(granzyme) B 분비 T 세포. 유사한 결과가 2회 또는 3회 실험에서 수득되었다. C. CAIX 특이적 CART 세포의 특이적 항-종양 세포독성, 대조군 A8 CART 세포 또는 LAK 세포를 표시된 비로 표적 종양 세포의 다양한 양에서 4시간 세포독성 어세이에서 항온처리하였다. 2회 실험 중 하나가 표시되어 있다. 클론 4-1은 sk-rc-52의 생체내 계대배양된 서브클론이다.

도 4: 종양 접촉 후 CART 세포의 클론 증폭. A. 증식. CAR-형질도입된 T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포(LAK)를 표시된 바와 같이 종양 대 T 세포의 세 상이한 비에서 방사선조사된 종양 세포(CAIX+ sk-rc-52 & CAIX- sk-rc-59)와 함께 주마다 플레이팅하였다. T 세포의 수를 2개의 분리된 웰들로부터 삼중으로 3일 또는 4일마다 카운팅하였다. 유사한 결과가 2회 실험에서 수득되었다. B. 클론 농후화. 종양 자극 실험에서, CART-세포 및 LAK 세포로부터의 배양물을 CART 및 T-세포 서브세트의 발현에 대해 유세포측정(flow cytometry)으로 1주 및 2주 동안 분석하였다. 2회 결과를 대표하는 하나가 표시되어 있다.

도 5: CART 세포에 의한 확립된 인간 RCC 이종이식물의 퇴행. 무흉선 널(null) 마우스를 좌측 옆구리 및 우측 옆구리에서 각각 7.5×10^6 개의 sk-rc-52 RCC 종양 세포 및 5×10^6 개의 sk-rc-59 RCC 종양 세포로 피하 접종하였다. 6일의 종양 이식 후, 마우스를 50×10^6 개의 G36 CD28 CART 세포, A8 CD28 CART 세포($\geq 20\%$ CAR+), LAK 또는 PBS 단독으로 정맥내 주사하였다. 고용량의 IL-2(1×10^5 U/ml)를 2일 또는 3일마다 주사하였다. 종양 크기를 2일 또는 3일마다 칼리퍼로 측정하였다. 실험 1, n = 7 & 실험 2, n = 8. 이들 2회 실험의 종양 크기는 따로 표시되었다. 이들 2회 시험에서 대조군인 T 세포 비치료 마우스에 비해 G36 텐덤 치료 마우스의 군들에서 +, $p<0.05$; *, $p<0.01$; **, $p<0.001$. 다른 통계학적 계산은 본문에 보고되어 있다.

도 6: CAR+ T-세포의 생체내 항-종양 활성. A. CART 세포에 의한 ZsGreen의 발현은 상부 패널에 표시되어 있다. CART 세포를 파 레드(Far Red) 염료로 미리 염색하였고 세포원심분리하였고 형광 현미경관찰로 조사하였다(하부 패널). B. 퇴행 종양에서 G36 CD28 CART 세포의 제자리(*in situ*) 염색. CART-세포를 RCC 확립된 마우스 내로 정맥내 주사하였고 종양 조직을 1일째 날 내지 3일째 날에 수집하였다. 공초점 현미경관찰을 이용하여 PE-Cy5 염료(적색으로 표시됨)를 사용한 TUNNEL 어세이로 종양 세포의 아폽토시스를 측정하였다. 형질도입된 T 세포는 ZsGreen으로 표시되었다. 핵을 DAPI로 반대염색하였다. 2개의 대표적인 슬라이드들은 각각 종양의 가장자리(상부 패널) 및 종양 층의 내부(중간 패널)에서 종양 세포의 아폽토시스를 표시하기 위해 제시되었다. 확대된 영상(하부 패널)은 다수의 종양들과 상호작용한 CART 세포를 입증하는 반면, 몇몇 둘러싸는 종양 세포들은 염색되어 있었다. C. 그랜자임 B+ T 세포 및 종양 괴사. CART 세포를 사용한 치료 후, 퇴행하는 CAIX+ sk-rc-52 종양은 그랜자임 B 항체(갈색) 및 H&E로 염색되었다. 보다 높은 확대도(상부 패널에서의 구획 a 및 b인 중간 및 하부 패널)는 그랜자임 B+ T 세포(화살표로 표시됨)의 위치를 보여주고, 상응하는 H&E 슬라이드는 종양 괴사를 보여준다(n으로 표시됨). 그랜자임 B+ T 세포는 종양의 가장자리(중간 패널) 및 종양의 내부(하부 패널)에 분포되어 있다.

도 7: 대조군 LAK 세포로 처리된 CAIX- sk-rc-52 종양은 음성 그랜자임 B 염색을 보였고(좌측)(상부 패널) 상응하는 조직구조는 H&E로 표시되었다(우측).

도 8: G36 CD28z CART 세포로 처리된 CAIX-sk-rc-59 종양에서 그랜자임 B의 낮은 배경 염색.

도 9: LAK 세포로 치료받은 CAIX-sk-rc-59 종양에서 그랜자임 B의 낮은 배경 염색.

도 10: G36 CD28z CART 세포가 국소적으로 주사된 sk-rc-52 종양에 대해 양성 대조군인 그랜자임 B 염색을 수행하였고(좌측), 종양 형태구조를 H&E로 표시하였다(우측).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 특히 면역요법에서 사용되는 면역 세포에 적합화된 키메라 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 탄산무수화효소 IX(CAIX) 특이적 CAR들을 제공한다.
- [0021] 보다 구체적으로, 본 발명은 CAIX(G36)-CD28z CART 세포가 보다 강한 세포독성 효능, 증가된 사이토카인 분비, 시험관내에서의 향상된 증식 및 클론 증폭, 및 IL-2 제공에 의한 생체내 종양의 개선된 억제의 조합된 효과에 의해 입증되었을 때 CAIX(G36)-CD8-TCR ζ CART 세포에 비해 더 우수한 항-종양 반응을 보유한다는 놀라운 발견에 근거한다.
- [0022] 종양을 항하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하기 위한 인간 림프구의 유전적 조작은 단백질-항원 프로세싱 및 제시에서의 비정상에 기인하는 종양 면역 탈출 기작을 우회하는 항종양 이펙터 세포를 생성할 수 있다. 더욱이, 이들 형질전환 수용체는 단백질로부터 유래되지 않은 종양 관련 항원으로 향할 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 적어도 CAR을 포함하도록 변경되어 있는 림프구가 존재하고, 본 발명의 특정 실시양태에서 단일 CAR은 2개 이상의 항원들을 표적화한다.
- [0023] 특정 경우, 림프구는 키메라성을 나타내고 비-천연적이고 적어도 부분적으로 인간의 손에 의해 조작되는 수용체를 포함한다. 특정 경우, 조작된 키메라 항원 수용체(CAR)는 1개, 2개, 3개 또는 4개 이상의 성분을 갖고, 일부 실시양태에서 하나 이상의 성분은 림프구가 하나 이상의 종양 항원 포함 암세포에 표적화되거나 결합하는 것을 용이하게 한다.
- [0024] 본 발명에 따른 CAR은 일반적으로 폴리펩티드들이 함께 조립되어 키메라 항원 수용체를 형성하도록 적어도 하나의 세포외 리간드 결합 도메인을 포함하는 적어도 하나의 경막 폴리펩티드; 및 적어도 하나의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 1개의 경막 폴리펩티드를 포함한다.
- [0025] 본원에서 사용된 용어 "세포외 리간드 결합 도메인"은 리간드에 결합할 수 있는 올리고펩티드 또는 폴리펩티드로서 정의된다. 바람직하게는, 도메인은 세포 표면 분자와 상호작용할 수 있을 것이다. 예를 들면, 세포외 리간드 결합 도메인은 특정 질환 상태와 관련된 표적 세포 상의 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 구체적으로, 세포외 리간드 결합 도메인은 표적의 항원에 대한 항체로부터 유래된 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.
- [0026] 특정 경우에, CAR은 탄산무수화효소 IX(G250)에 특이적이고, 일부 실시양태에서 본 발명은 보조자극 분자, 예컨대, CD28의 엔도도메인으로 CAIX 특이적 항체로부터 유래한 세포외 항원 결합 도메인을 T-세포 수용체 제타-쇄로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인에 연결함으로써 탄산무수화효소 IX(G250)에 특이적인 키메라 세포를 제공한다. 이 CAR은 인간 세포, 예컨대, T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포에서 발현되고, CAIX 양성 암의 표적화가 본 발명에 포함된다.
- [0027] 바람직하게는, 항체는 아미노산 서열 SYAMS(서열번호 55)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 AISANGGTTYYADSVKG(서열번호 67)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 NGNYRGAFDI(서열번호 65)를 포함하는 CDR3을 가진 중쇄; 및 아미노산 서열 TGSSSNIGAGFDVH(서열번호 68)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNTNRPS(서열번호 69)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSRLSAWV(서열번호 70)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNSNRPS(서열번호 72)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDRSLSWV(서열번호 73)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNTNRPS(서열번호 69)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSTLRVWM(서열번호 74)을 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNNNRPS(서열번호 62)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDKSLTWV(서열번호 76)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNNNRPS(서열번호 62)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSSLAWV(서열번호 82)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄; 또는 아미노산 서열 TGSSSNIGAGYDVH(서열번호 61)를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 GNSNRPS(서열번호 72)를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QSYDSSLAWV(서열번호 82)를 포함하는 CDR3을 가진 경쇄를 가진다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 1 및 3 내지 23의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 2 및 24 내지 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가진다. 아미노산 서열 및 핵산 서열은 하기 표 3에 예시되어

있다.

[0029] [표 3]

예시적 CAIX 항체 서열

서열번호 1-CAIX G250 중쇄 CDR_001
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGNYRGSLAFDIWGQGTLTVSS
서열번호 2-CAIX G250 경쇄 CDR_001
QSVLTQPPSVSAGPQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAKLLIYGNNNRPSPGVPRDF GSKSGTSASLAITGLQAEDADYYCQSYDSSLAWVVFGGGTKLTVLG
서열번호 3-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 36
EVQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNGNYRGAFDIWGQGTMVTVSS
서열번호 4-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 10
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNGNYRGAFDIWGQGTMVTVSS
서열번호 5-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 119
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNGNYRGAFDIWGQGTMVTVSS
서열번호 6-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 6
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFGTYAMTWVRQAPGKGLEWVSAVGSGSTYYADSVK GRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRADDTAVYYCARGPVLRGYGFDIWGQGTMVTVSS
서열번호 7-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 37
QVQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNGNYRGAFDIWGQGTMVTVSS
서열번호 8-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 104
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTYHADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFSAYSGYDLWGQGTLTVSS
서열번호 9-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 62
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNGNYRGAFDIWGQGTTVTVSS
서열번호 10-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 45
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNGNYRGAFDIWGQGTMVTVSS
서열번호 11-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 119
EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNGNYRGAFDIWGQGTTVTVSS
서열번호 12-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 106
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAAGFDYWGQGTLTVSS
서열번호 13-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 39
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTYHADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGRYSSSLGYWGQGTLTVSS
서열번호 14-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 94
QVQLVQSGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREAPYSSLDAFDIWGQGTMVTVSS
서열번호 15-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 9
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVK

[0030]

GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSHSSGGFDYWGQTLTVSS
서열번호 16-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 21
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSHSSGGFDYWGQTLTVSS
서열번호 17-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 27
QVTLKESGGGVVQPGTSRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVGLISYDGSVTHTDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNTLRADDTAVYYCARGSGYQEHWGQGTLLTVSS
서열번호 18-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 40
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYGDYGSLDYWGQGTLLTVSS
서열번호 19-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 57
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGVSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYCSSTSCYRGMDVWGKGTLTVSS
서열번호 20-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 82
QVQLVQSGGGVVQPGRSRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRAARPPFDYWGQGTLLTVSS
서열번호 21-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 98
QVQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNNGYRGAFDIWGQGTMVTVSS
서열번호 22-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 124
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAPEFTFSKYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSRSGYFLPLDYWGQGTLLTVSS
서열번호 23-CAIX G250 중쇄 CDR 클론 125
EVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAVTGGFDPWGQGTLLTVSS
서열번호 24-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 36
QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDFS GSKSGTSASLAITGLQAEDETDYCQSYDSSLRAWFGGGTKLTVLG
서열번호 25-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 10
QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDFS GSKSGSSASLAITGLQAEDEAHYYCQSYDSSLRAWFGGGTKLTVLG
서열번호 26-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 119
QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDFS GSKSGTSASLAITGLQADEADYYCQSYDSSLRAWFGGGTKLTVLG
서열번호 27-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 6
VLTQPPSVSGAPGQRITISCTGSRNSNIGADYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNRPSGVGRFSAS KSGTSASLAISGLQAEDADYYCQSYDSSLRAWFGGGTKLAVLG
서열번호 28-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 37
QSVLTQPPSVSGAPGQRITISCTGSRNSNIGADYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNRPSGVPDFS GSKSGTSASLAITGLQAEDETDYFCQSYDSSLRAWFGGGTKLTVLG
서열번호 29-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 104
QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGRGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYDNTNRPSGVPARFS GSKSATASLASLTITGLQADEADYYCQSYDSSLRAWFGGGTKLTLG
서열번호 30-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 62
QSVLTQPPSVSGAPGQRITISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQVPGKAPKVIYGNRRPSGVPDFS GSKSGASASLAITGLQTEDEADYYCQSYDSSLRAWFGGGTKLTVLG

[0031]

서열번호 31-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 45
QSVLTQPPSVGAPGQRITISCTGTSSNIGAGYDVHWYQQLPGAAPRVLIIYGNNNRPSGVPDFRS GSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDKSLSWVFGGGTKLTVLR
서열번호 32-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 106
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQLPGTAPRLLIYGNNNRPSGVPDFRS GSKSGTSASLAITGLQAEDETDXFCQSYDSSLAWVFGGGTKVTLR
서열번호 33-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 18
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGRGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYDDTNRPSGVPHRFS GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAWVFGGGTKLAVLG
서열번호 34-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 39
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGRGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYDNTNRPSGVPARFS GSKSATSASLAITGLQADDEADYYCQSYDSGLRWVFGGGTKLTLR
서열번호 35-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 94
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGRGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNSRPSGVPDFRS GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCHSRDNNGHHIFGGGKLTVL
서열번호 36-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 9
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGRGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNTNRPSGVPDFRS GSKSGTSASLAITGLQAEDEGDYYCQSYDSSLAWVFGGGTKLTVLG
서열번호 37-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 21
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGRGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNTNRPSGVPDFRS GSKSGTSASLAITGLQAXDEGDYYCQSYDSSLAWVFGGGTKLTVLG
서열번호 38-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 27
LPVLTQPPSVVAPGQTARITCGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTIISVEAGDEADYYCQVWDSSDHVVFGGGTKLTVLG
서열번호 39-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 40
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNRPSGVPDFRS GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAWVFGGGTKLAVLG
서열번호 40-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 57
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNRPSGVPDFRS GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAWVFGGGTKLAVLG
서열번호 41-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 82
QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNYVYWWYQQLPGTAPKLPIYRNNQRPSGVPDFSG SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGVVFGGGTKLTVLR
서열번호 42-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 98
QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQHLPGTAPKLLIYGNNSRPSGVPDFRS GSKSGTSASLAITGLQAEDETDXFCQSYDSSLAWVFGGGTKVTLG
서열번호 43-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 124
SSELTQDPAVSVALQTVRITCQGNSLRYYYPSWYQQKPGQAPVLIYGNNSRPSGIPDRFSGSS SGNTASLITGTQAEDDEADYYCSSRDNTNRVVFGGGKLTVLG
서열번호 44-CAIX G250 경쇄 CDR 클론 125
QPGLTQPPSVVAPGQTARITCGDNIGRKSVHWYQQRPGQAPILVIRDDRDRPSGIPERFSGSS SVNTATLIIISRVEAGDEADYYCQVWDSSSKHYVFGPGTKVTLG
서열번호 45-HCA IX
MAPLCPSPWLLIIPAPAPGLTVQLLSSLLMPVHPQRLPRMQEDSPLGGGSSGEDDPLGEEDL PSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPVVKPKSEEEGSLKLEDLPTVEAPGDPQEPOQNAH RDKEGDDQSHWRGYGGDPPPRVSPACAGRQFQSPVDIRPQLAFCPALRPLELLGFQLPPLPELRL RNNGHSVQLTLLPPGLEMALGPGRGEYALQLHLHWGAAGRPGSEHTVEGHRFPAEIHVVHLSTAFAR VDEALGRPGLAVLAFFLEEGPEENSAYEQLLSRLEEIAEEGSETQVPGLDISALLPSDFSRFYFQ

YEGSLTTPPCAQQVIWTVFNQTVMLSACKLHTLSDLWPGPDSRLQLNFRATQPLNGRVIEASFP AGVDSSPRAAEPVQLNSCLAAGDILALVFGLLFAVTSAFLVQMRRQHRRGTTKGGVSYRPAEVAE TGA
서열번호 46-MCA IX
MASLGSPWPALSTPAPTAQLLLFLLLQVSAQPQGLSGMQGEPSLGDSSEDELGVDVLPSEED APEEADPPDGEDPPEVNSEDRMEESLGLEDLSTPEAPEHSQGSHDEKGHHSHWSYGGTLWLPQ VSPACAGRQFQSPVDIRLERTAFCTRLQPLELLGYELQPLPELSLSNNNGHTVQLTLPPGLKMALGP GQEYRALQLHLHWGTSDHPGSEHTVNNGHRFPAEIHVVLSTAFSELHEALGRPGLAVLAALQE SPEENSAYEQQLSHLEEISEEGSKIEIPGLDVSALLPSDFSRYYRYEGSLTTPCSQGVIWTVFN ETVKLSAKQLHTLSVSLWGPRLDSRLQLNFRATQPLNGRTIEASFPAEADSSPEPVHVNSCFTAGD ILALVFGLLFAVTSAFLQLRRQHRSGTKDRVSYSPAEMETG
서열번호 83-G10 인간 항-CAIX 항체 유전자
CAGGTGCAGCTGGTGAGTCAGCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATTCCCCCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTCTGCAATGGTGGTACCACTACGAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCAATAATGGGAACTATCGCGGTGCTTTGATATCT GGGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTTCAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTGGTCTGGC GGTGGTGGCAGGCCAGTCTGCTGACTCAGGCCACCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGT CACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCAAACATCGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTACCCAGC AGCTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCTCATCTATGTTAACAGCAATCGCCCTCAGGGGTCCAGGCTGA GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCTCCAGCCTCCAGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGA GGATGAGGCTCATTATTACTGCCAGTCATATGACAGAACGCTGTCTGGGTGTCGGCGGAGGGA CCAATTGACCGTCTAGGT
서열번호 84-G10 인간 항-CAIX 부분적 cds
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNNGNYRGAFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGSG GGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWFQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGV DRFSGSKSGSSASLAITGLQAEDEAHYCQSYDRSLSWVFGGGTKLTVLG
서열번호 85-G104 인간 항-CAIX 항체 유전자
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTG TCCAGCCTCTGGATTACCTTCTAGCATCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTGGCACATACCACGAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG ACCCGAGGACACGGCCGTCTTACTGTGCGAAATTCTCTGCGTATAGTGGCTACGATTGGTGGG GCCAGGGAAACCTGGTACCGTCTCAGTGGGGGGTCCGGAGGTGGTGGTCTGCCG GGTGGCAGCCAGTCTGCTGACTCAGGCCACCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCAC AATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCAAACATCGGGAGAGGTTATAATGTACACTGGTACCCAGCAGC TTCCAGGAACAGCCCCAAACTCTCATCTATGATAACACGAATCGCCCTCAGGGGTCCAGGCTGA CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGCCACGTCAAGCCTCCAGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGACGA TGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCGTATGACAGCGCCCTGAGGTGGTGGTCTGGCGGAGGGACCA AGCTGACCCCTCTAGGT
서열번호 86-G104 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYHADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFSAYSgyDLWGQGTLTVSSGGGSGGGGSG GGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGRGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYDNTNRPSGV RFSGSKSATASLITGLQADDEADYCYQSYDSGLRWVFGGGTKLTLG
서열번호 87-G106 인간 항-CAIX 항체 유전자
GAGGTGCAGCTGGTGAGTCAGCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATTACCTTCTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTCTGCAATGGTGGTACCACTACGAGACTCCGTGAAG

GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCGTATATTACTGTGCGAATAATGGGAACTATCGCGGTGCTTTGATATCT GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGCGTCCGGAGGTGGTGGTCTGGC GGTGGTGGCAAGCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGTGCTGGGCCAGGGCAGAGGGT CACCATCTCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCCAGGTTTGATGTACACTGGTACCCAGC AACTTCCAGGAACAGCCCCAGACTCTCATCTATGTTAACACATCGGCCCTCAGGGTCCCT GACCGATTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATATTGGGCTCCAGGTGA GGATGAGACTGATTATTCGCCAGTCTATGACAGCAGCCTGAGGGTCTGGATGTTCGGGAG GGACCAAGGTGACCGTCTACGT
서열번호 88-G106 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds
EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNNGNYRGAFDIWIWGQTTVTVSSEGGGGSGGGSG GGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRTVISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQLPGTAPRLLIYGNNNRPSPGP DRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDTDYFCQSYDSSLASAWVFGGGTKVTVLR
서열번호 89-G119 인간 항-CAIX 항체 유전자
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTG TGCAGCCTCTGGATTCCCCCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGCTCAGCTATTAGTGTCAATGGTGGTACCACTACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCGGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCAGAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCGTATATTACTGTGCGAATAATGGGAACTATCGCGGTGCTTTGATATCT GGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTCAGGTGGCGCGTCCGGAGGTGGTGGTCTGGC GGTGGTGGCATTCAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGTGCTGGGCCAGGGCAGAGGGT CACCATCTCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCCAGGTTATGATGTACACTGGTACCCAGC AGCTTCCAGGAACAGCCCCAACACTCTCATCTATGTTAACACCATCGGCCCTCAGGGTCCCT GACCGATTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATATTGGGCTCCAGGTGA CGATGAGGCTGATTATTAATGCCAGTCTATGACAGCAGCCTGAGGGTCTGGATGTTCGGGAG GGACCAAGGTGACCGTCTGGT
서열번호 90-G119 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGGTTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNNGNYRGAFDIWIWGQTMVTVSSEGGGGSGGGSG GGGIQSVLTQPPSVSGAPGQRTVISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSPGP DRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDSTLRVWMFGGGTKLTVLG
서열번호 91-G125 인간 항-CAIX 항체 유전자
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTG TGCAGCCTCTGGATTACCTCAGTACTGAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCAGCATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACGCGAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAG AGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGCCGCGTAACAGGAGGCTCGACCCCTGG GCCAGGGCACCTGGTACCGTCTCCTCAGGTGGCGCGTCCGGAGGTGGTGGTCTGGCGGT GGTGGCAGCCGCTGGGCTGACTCAGGCCACCTCTGGTGTCACTGGGCCCCAGGACAGACGGCAG GATTACCTGTGGGGAGACAATTGGAGAAAAGTGTGACTGGTACCAACAGAGGGCAGGCC AGGCCCTATTCTAGTCATCGGTGATGATAGGGATCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCT GGCTCCAGCTCTGTGAATACGCCACCTGATCATCAGCAGGGTGAAGCCGGAGATGAGGCCGA CTATTATTGTCAAGGTGTGGGATAGTAGTAGTAAACATTATGTCTCGGACCAGGGACCAAGGTCA CCGCCCTAGGT
서열번호 92-G125 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAVTGGFDPWGQGTIVTSSSEGGGGSGGGSG GGSQPGLTQPPSVSVAPGQATARITCGGDNIGRKSVHWYQQRPGQAPILVIRDDDRPSGIPEF'S GSSSVNTATLIISRVEAGDEADYYCQVWDSSSKHYVFGPGTKVTALG
서열번호 93-G27 인간 항-CAIX 항체 유전자

CAGGTACACCTTGAAGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGGACGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTACCTTAGCAACTATGCCATGACGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
GGCTGGAGTGGTGGGTCTAATATCTTATGATGGAAGTGTACACACTACACAGACTCCGTGAAG
GGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACTCACTGTATTGCAAATGAACACCCCTGAG
AGCCGACAGACACGGCTGTATTGTCAGGCTCCGCCAGGCTCCGCCAGGCTCCAGCAAGAACACTGGGGCCAGG
GAACCTGGTACCGTCTCAGGTGGCGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCTGCTGTGACTCACCCCTCGGTGTCAGTGCCCCAGGACAGACGCCAGGATTAC
CTGTGGGGAAACAACATTGAAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAAGCAGAAGCCAGGCCAGGCC
CTGTGCTGGTACATCTATTATGATAGCACCAGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCC
AACTCTGGAACACGCCACCTGACCATCAGCAGGGTGAAGCCGGGTGAGGCCACTATTA
CTGTAGGTGGGATAGTAGTGTACATCATGTGGTATTGGGAGGGACCAAGCTGACCG
TCCTAGGT

서열번호 94-G27 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds

QVTLKESGGGVVQPGTSRLSCAASGFTFSNYAMTVWRQAPGKGLEWVLISYDGSVTHYTDVK
GRFTISRDNAKNSLYLQMNTLRADDTAVYYCARSGSYQEHWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGG
SLPVLTQPPSVSVAQPQTARITCGGNINIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYYDSRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSDHVVFGGGTKLTVLG

서열번호 95-G36 인간 항-CAIX 항체 유전자

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
GGCTGGAGTGGTCTCAGCTATTAGTGTCTAATGGTGGTACCACTACAGCAGACTCCGTGAAG
GGCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG
AGCCGAGGACACGCCGTATATTACTGTGCGAATAATGGGAACTATCGCGGTGCTTTGATATCT
GGGGCAAGGGACAATGGTACCGTCTTCAGGTGGCGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTCTGGC
GGTGGTGCAGCCAGTCTGACTCAGGCCACCTCAGTGTCTGGGCCCCAGGGCAGAGGGT
CACCATCTCCTGCACGGAGCAGCTCCACATCGGGCAGGTTTGTATGTTACACTGGTACCAAGC
AGCTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTACGGTAACACCAATCGACCCCTCAGGGGTCCCT
GACCGATTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCTCCCTGGCATACTGGGCTCCAGGCTGA
GGATGAGACTGATTATTACTGCCAGTCTATGACAGTAGACTGAGTGCTGGTGGTCTGGCGAG
GGACCAAGCTGACCGTCTAGGT

서열번호 96-G36 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds

EVQLVQSGGGVVQPGGSRLSCAASGFPFSSYAMSWRQAPGKGLEWVSAISANGGTTYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNNGNYRGAFDIWGQGTMTVSSGGGSGGGGSG
GGGSQSVLTQPPSVSAGPQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDETYYCQSYDSRLSAWVFGGGTKLTVLG

서열번호 97-G37 인간 항-CAIX 항체 유전자

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
GGCTGGAGTGGTCTCAGCTATTAGTGTCTAATGGTGGTACCACTACAGCAGACTCCGTGAAG
GGCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG
AGCCGAGGACACGCCGTATATTACTGTGCGAATAATGGGAACTATCGCGGTGCTTTGATATCT
GGGGCAAGGGACAATGGTACCGTCTTCAGGTGGCGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTCTGGC
GGTGGTGCAGCCAGTCTGACTCAGGCCACCTCAGTGTCTGGGCCCCAGGGCAGAGGGT
CACCATCTCCTGCACGGAGCAGCTCCACATCGGGCAGGTTATGATGTTACTGGTACCAAGC
ACCTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAATAGCAATCGACCCCTCAGGAGTCCT
GACCGATTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCTCCCTGGCATACTGGGCTCCAGGCTGA
GGATGAGACTGATTATTCTGCCAGTCTATGACAGCAGCCTGAGTGCTGGTATTGGCGAG
GGACCAAGGTGACCGTCTAGGT

서열번호 98-G37 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds

QVQLVQSGGGVVQPGGSRLSCAASGFPFSSYAMSWRQAPGKGLEWVSAISANGGTTYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANNNGNYRGAFDIWGQGTMTVSSGGGSGGGGSG
GGGSQSVLTQPPSVSAGPQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQHLPGTAPKLLIYGNNSRPSGVP

DRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDETDYFCQSYDSSLASAWVFGGGTKVTVLG
서열번호 99-G39 인간 항-CAIX 항체 유전자
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTG TGCAGCCTCTGGATTACCTTACAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGCAGCATACTACGCGAGACTCCGTGAAG GGCGGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTACTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGACGTACGGTACTACGGCAGCCTCGACTACTGGG GCCAGGGCACCTGGTACCGTCTCTCAGGTGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTCTCGGGT GGTGGCAGCCAGTCTGTGCTGACTCAGCACCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCAC CATCTCTGCACTGGGAGCAGCTAACATGGGCGAGTTATGATGTACACTGGTACCAGCAGC TTCCAGGAACAGCCCCAAACTCTCATCTATGCTAACACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCAGGCTGAGGA TGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCATGACAGCAGCCTGAGGGCTGGGTGTTCGGCGGAGGGA CCAAGCTGACCCCTCACGT
서열번호 100-G39 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATKIGRYS SSLGYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSG GGGSQSVLTQPPSVGAPGQRTVISTGSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNTNRPSGVP ARFSGSKSATASLAITGLQADDEADYYCQSYDSGLRVFGGT KTLLR
서열번호 101-G40 인간 항-CAIX 항체 유전자
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTG TGCAGCCTCTGGATTACCTTACAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGCAGCATACTACGCGAGACTCCGTGAAG GGCGGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTACTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGACGTACGGTACTACGGCAGCCTCGACTACTGGG GCCAGGGCACCTGGTACCGTCTCTCAGGTGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTCTCGGGT GGTGGCAGCCAGTCTGTGCTGACTCAGCACCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCAC CATCTCTGCACTGGGAGCAGCTAACATGGGCGAGTTATGATGTACACTGGTACCAGCAGC TTCCAGGAACAGCCCCAAACTCTCATCTATGCTAACACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCAGGCTGAGGA TGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCATGACAGCAGCCTGAGGGCTGGGTGTTCGGCGGAGGGA CCAAGCTGACCCCTCTGGGT
서열번호 102-G40 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYGDYGS LDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSRG GGGSQSVLTQPPSVGAPGQRTVISTGSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSL RAWVFGGGT KLA VL RG
서열번호 103-G45 인간 항-CAIX 항체 유전자
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTG TGCAGCCTCTGGATTCCCTTACAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGTCTAATGGTGGTACACATACTACGCGAGACTCCGTGAAG GGCGGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTACTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAATAATGGGAAACTATCGCGGTGCTTTGATATCT GGGGCAAGGGACAATGGTACCGTCTTCAGGTGGCGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTCTGGC GGTGGTGGCAGCCAGTCTGTGCTGACTCAGCACCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGAT CACCATCTCTGCACTGGGACCAGCTAACATCGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTACCAGC AACTTCCAGGAGCAGCCCCAGAGTCTCATCTATGTTAACACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCAGGCTGA GGATGAGGCTGATTATTACTGTCA GTCCATGACAAGAGTCTGAGTTGGGTGTT CGGCGGAGGGA CCAAGCTGACCCCTCACGT
서열번호 104-G45 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISANGGTTYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSRAEDTAVYYCANNNGNYRGAFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGSG
GGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRITISCTGTSSNIAGAYDVHWYQQLPGAAPRVLIFYGNNNRPSGV
DRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDKSLSWVFGGGTKLTVLR

서열번호 105-G57 인간 항-CAIX 항체 유전자

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTG
TGCAGCCTCTGGATTACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
GGCTGGAGTGGGCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCGCCTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATTGCAAATGAACAGCCTGAG
AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATATTGTAGTAGTACAGCTGCTATCGCGTA
TGGACGTCTGGGCAAAGGACCCCTGGTACCGTCTCAGGTGGCGCCGGTCCGGAGGGTGGT
GGTCTCGCGGGTGGCAGCAGCTGTGACTCAGCACCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAG
GCAGAGGGTACCATCTCTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGCAGGGTATGATGTACACT
GGTACCAAGCAGCTCCAGGAACAGCCCCAAACTCTCATCTATGCTAACAAACATCGGCCCTCA
GGGGTCCCTGACCGATTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCT
CCAGGCTGAGGATGAGGCTATTACTGCCAGTCATGACAGCAGCCTGAGGGCTTGGGTGT
TCGGCGAGGGACCAAGCTGGCGTCTGGGT

서열번호 106-G57 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGVSTYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSRAEDTAVYYCAKYCSSTCYRGMDVWGKTLTVSSGGGSGGG
GSRGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGTSSNIAGAYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNNRPS
GVPDFRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAWVFGGGTKLAVLG

서열번호 107-G6 인간 항-CAIX 항체 유전자

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTG
TGCAGCCTCTGGATTACCTTAGCAGCTATGCCATGACCTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
GGCTGGAGTGGGCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG
AGCCGATGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAGAGCCCCGGTATTACGATATGGCTTGATATCT
GGGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTCTCAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGC
GGTGGTGGCAGCCAGTCTGTGACTCAGCACCCCTCAGTCTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGAT
CACCATCTCTGCACTGGGAGCAGGTCAAACATCGGGCAGATTATGATGTACACTGGTACCAAGC
AGCTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCTCATCTATGCTAACAAACATCGCCCTCAGGGGTCCCT
GGTCGATTCTCGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGGCTGA
GGATGAGGCTGATTACTACTGCCAGTCGTATGACAGCAGCCTGAGGGCTTGGGTGTTGGCGGAG
GGACCAAGCTGCCGTCTGGGT

서열번호 108-G6 인간 항-CAIX 항체 부분적 cds

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFGTYAMTWRQAPGKGLEWVSAVGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRADDTAVYYCARGPVLRGYFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGSG
GGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRITISCTGSRSNIAGDYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNNRPSGV
GRFSASKSGTSASLAISGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAWVFGGGTKLAVLG

서열번호 109-G9 인간 항-CAIX 항체 유전자

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTG
TGCAGCCTCTGGATTACCTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
GGCTGGAGTGGGCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG
AGCCGAGGACACGGCGTATTACTGTGCGAGGTCCCATAGCAGTGGAGGATTGACTACTGGG
GCCAGGGAAACCTGGTACCGTCTCTCAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGGGT
GGTGGCAGCCAGTCTGTGACTCAGCCACCCCTCAGTCTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCA
AAATCTCTGCACTGGGAGCACTCCAACATCGGGAGAGGTTATAATGTAACACTGGTACCAAGCAGC
TTCCAGGAACAGCCCCAAACTCTCATCTATGTAACACCAATCGCCCTCAGGGGTCCCTGAC
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGGCTGAGGA
TGAGGGTGATTACTACTGCCAGTCATGACAGCAGCCTGAGTGCTTGGGTGTTGGCGGGGGGA

[0037]

CCAAGCTGACCGTCTAGGT

서열번호 110-G9 인간 항-CAIX 항체 유전자 부분적 cds

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSRAEDTAVYYCARSHSSGGFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGSG GGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGTSSNIGRGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTRPSGV RFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEGDYYCQSYDSSLRAWVFGGGTKLTVLG

[0038]

바람직한 실시양태에서, 상기 세포외 리간드 결합 도메인은 유연성 링커에 의해 연결된 표적 항원 특이적 단일 클론 항체의 경쇄(V_L) 및 중쇄(V_H) 가변 단편을 포함하는 단일 쇄 항체 단편(scFv)이다.

[0039]

보다 바람직한 실시양태에서, 상기 scFv는 항-탄산무수화효소 IX scFv, 바람직하게는 scFV-G36(WO2007/065027
VH: 서열번호 1 및 VL: 서열번호 2)이다. 국제 특허출원 공보 제WO2007/065027호의 내용은 전체적으로 본원에 참고로 도입된다.

- [0041] scFv 이외의 다른 결합 도메인, 예컨대, 비-한정적 예로서 낙타 단일 도메인 항체 단편 또는 수용체 리간드, 항체 결합 도메인, 항체 초가변 루프 또는 CDR도 램프구의 소정의 표적화를 위해 사용될 수 있다.
- [0042] 바람직한 실시양태에서, 상기 경막 도메인은 상기 세포외 리간드 결합 도메인과 상기 경막 도메인 사이에서 줄기 영역을 추가로 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "줄기 영역"은 일반적으로 경막 도메인을 세포외 리간드 결합 도메인에 연결하는 데 작용하는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 구체적으로, 줄기 영역은 세포외 리간드 결합 도메인에게 더 높은 유연성 및 접근성을 제공하는 데 사용된다. 줄기 영역은 최대 300개의 아미노산, 바람직하게는 10개 내지 100개의 아미노산, 가장 바람직하게는 25개 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있다. 줄기 영역은 천연 생성 분자의 전부 또는 일부, 예컨대, CD8, CD4 또는 CD28의 세포의 영역의 전부 또는 일부, 또는 항체 불변 영역의 전부 또는 일부로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 줄기 영역은 천연 생성 줄기 서열에 상응하는 합성 서열일 수 있거나, 완전히 합성 줄기 서열일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 줄기 영역은 인간 CD8 알파 쇄의 일부이다.
- [0043] 본 발명의 CAR의 신호 전달도입 도메인 또는 세포내 신호전달 도메인은 면역 세포 및 면역 반응의 활성화를 야기하는, 세포외 리간드 결합 도메인과 표적의 결합 후 세포내 신호전달을 담당한다. 다시 말해, 신호 전달도입 도메인은 CAR이 발현되는 면역 세포의 정상 이팩터 기능들 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 예를 들면, T 세포의 이팩터 기능은 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "신호 전달도입 도메인"은 이팩터 신호 기능 신호를 전달도입하고 세포가 전문화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다.
- [0044] 신호 전달도입 도메인은 세포질 신호전달 서열의 두 상이한 클래스들, 즉 항원 의존적 일차 활성화를 시작하는 클래스, 및 이차 또는 보조자극 신호를 제공하도록 항원 독립적 방식으로 작용하는 클래스를 포함한다. 일차 세포질 신호전달 서열은 ITAM의 면역수용체 티로신-기저 활성화 모티프로서 공지되어 있는 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. ITAM은 syk/zap70 클래스 티로신 키나제에 대한 결합 부위로서 작용하는 다양한 수용체들의 세포질내 꼬리에서 발견되는 잘 정의된 신호전달 모티프이다. 본 발명에서 사용되는 ITAM의 예로는 비-한정적 예로서 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, FcR 앱실론, CD3 감마, CD3 엘타, CD3 앱실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래한 ITAM들이 있을 수 있다. 바람직한 실시양태에서, CAR의 신호 전달도입 도메인은 CD3 제타 신호전달 도메인, 또는 Fc 앱실론 RI 베타 또는 감마 쇄의 세포질내 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 신호전달은 예를 들면, CD28 및 종양 괴사 인자 수용체(TNFR), 예컨대, 4-1BB 또는 OX40에 의해 제공된 보조자극과 함께 CD3 제타에 의해 제공된다.
- [0045] 특정 실시양태에서, 본 발명의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 보조자극 신호 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개, 3개 또는 4개 이상의 보조자극 분자를 직렬로 함유한다. 보조자극 분자는 효율적인 면역 반응을 위해 요구되는, 항원 수용체 또는 이의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다.
- [0046] "보조자극 리간드"는 예를 들면, TCR/CD3 복합체와 웨პ티드로 적재된 MHC 분자의 결합에 의해 제공된 일차 신호 이외에 증식 활성화, 분화 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공함으로써 T-세포 상의 동족 보조자극 분자에 특이적으로 결합하는 항원 제시 세포 상의 분자를 지칭한다. 보조자극 리간드는 CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 보조자극 리간드(ICOS-L), 세포내 부착 분자(ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, 램포톡신 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, Toll 리간드 수용체에 결합하는 아고니스트 또는 항체, 및 B7-H3에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 보조자극 리간드는 특히, T 세포 상에 존재하는 보조자극 분자, 예컨대, CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 램프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드(그러나, 이들로 한정되지 않음)에 특이적으로 결합하는 항체도 포함한다.
- [0047] "보조자극 분자"는 보조자극 리간드에 특이적으로 결합함으로써, 세포에 의한 보조자극 반응, 예컨대, 증식(그러나, 이것으로 한정되지 않음)을 매개하는 T-세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 보조자극 분자는 MHC 클래스 1 분자, BTLa 및 Toll 리간드 수용체를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 보조자극 분자의 예로는 CD27, CD28, CD8, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 램프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드 등이 있다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 신호 전달도입 도메인은 보조자극 TNFR 구성원 패밀리의 세포질 꼬리인 TNFR 관련 인자 2(TRAF2) 결합 모티프이다. 보조자극 TNFR 패밀리 구성원의 세포질 꼬리는 메이저 보조된 모티프(P/S/A)X(Q/E)E 또는 마이너 모티프 (PXQXXD)로 구성된 TRAF2 결합 모티프를 함유하고, 이때 X는 임의의 아미노산이다. TRAF 단백질은 수용체 삼량

체화에 반응하여 많은 TNFR들의 세포내 꼬리에 모인다.

[0048] 적절한 경막 폴리펩티드의 구별되는 특징은 면역 세포, 특히 립프구 세포 또는 천연 킬러(NK) 세포의 표면에서 발현되고 소정의 표적 세포에 대한 면역 세포의 세포 반응을 유도하기 위해 함께 상호작용하는 능력을 포함한다. 세포의 리간드 결합 도메인 및/또는 신호 전달도입 도메인을 포함하는 본 발명의 CAR의 상이한 경막 폴리펩티드들은 표적 리간드와의 결합 후 신호 전달도입에 참여하고 면역 반응을 유도하도록 함께 상호작용한다. 경막 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 경막 도메인은 임의의 막-결합된 또는 경막 단백질로부터 유래될 수 있다.

[0049] 본원에서 사용된 용어 "의 일부"는 보다 짧은 웨პ티드인, 분자의 임의의 서브세트를 지칭한다. 대안적으로, 폴리 웨პ티드의 아미노산 서열 기능성 변이체는 폴리웨პ티드를 코딩하는 DNA 내의 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변이체 또는 기능성 변이체는 예를 들면, 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 활성을 보유하는 한, 최종 구축물에 도달하기 위해, 특히 특이적 항-표적 세포 면역 활성을 나타내기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합도 만들 수 있다. 숙주 세포 내에서 본 발명의 CAR의 기능성은 특정 표적의 결합 시 상기 CAR의 신호전달 잠재력을 입증하기에 적합한 어세이에서 검출될 수 있다. 이러한 어세이는 당분야에서 숙련된 자에 의해 이용될 수 있다. 예를 들면, 이 어세이, 예컨대, 칼슘 이온 방출, 세포내 티로신 인산화, 이노시톨 포스페이트 전환율, 또는 이로써 달성된 인터류킨(IL) 2, 인터페론 감마, GM-CSF, IL-3, IL-4 생성의 증가를 측정하는 단계를 포함하는 어세이는 표적의 결합 시 유발된 신호전달 경로의 검출을 가능하게 한다.

세포

[0050] 본 발명의 실시양태는 CAR을 발현하는 세포를 포함한다. 상기 세포는 암 요법을 위한 CAR을 발현할 수 있는 면역 세포 또는 CAR을 코딩하는 발현 벡터를 보유하는 세포, 예컨대, 세균 세포를 비롯한 임의의 종류의 세포일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이를 용어들 전부가 임의의 모든 후속 세대들인 그들의 자손도 포함한다. 모든 자손들이 의도적 또는 우발적 돌연변이로 인해 동일하지 않을 수 있다는 것이 이해된다. 이종 핵산 서열의 발현과 관련하여, "숙주 세포"는 벡터를 복제할 수 있고/있거나 벡터에 의해 코딩된 이종 유전자를 발현할 수 있는 진핵 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 벡터를 위한 수용자로서 사용될 수 있고 사용되고 있다. 숙주 세포는 외생성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭하는 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 세포일 수 있다. 형질전환된 세포는 일차 대상 세포 및 그의 자손을 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "조작된" 및 "재조합" 세포 또는 숙주 세포는 외생성 핵산 서열, 예를 들면, 벡터가 도입되는 세포를 지칭하기 위한 것이다. 따라서, 재조합 세포는 재조합적으로 도입된 핵산을 함유하지 않는 천연 생성 세포와 구별될 수 있다. 본 발명의 실시양태에서, 숙주 세포는 세포독성 T 세포(TC, 세포독성 T 립프구, CTL, T-킬러 세포, 세포용해성 T 세포, CD8+ T-세포 또는 킬러 T 세포로서도 공지되어 있음)를 포함하는 T 세포이고; NK 세포 및 NKT 세포도 본 발명에 포함된다.

[0051] 일부 벡터들은 원핵 세포 및 진핵 세포 둘 다에서 복제될 수 있고/있거나 발현될 수 있게 하는 조절 서열을 사용할 수 있다. 당업자는 모든 상기 숙주 세포들을 유지하고 벡터의 복제를 허용하도록 항온처리하는 조건도 이해할 것이다. 벡터의 대규모 생산뿐만 아니라, 벡터에 의해 코딩된 핵산 및 이의 동족 폴리웨პ티드, 단백질 또는 웨პ티드의 생성도 가능하게 할 기법 및 조건도 이해되고 공지되어 있다.

[0052] 세포는 자가유래성 세포, 동계 세포, 동종이계 세포 및 심지어 일부 경우 이종이계 세포일 수 있다.

[0053] 많은 상황들에서, 치료를 종결하고자 하는 경우 변경된 CTL을 사멸시킬 수 있기를 원할 수 있고, 세포는 그의 존재 후 세포의 부재가 관심을 끄는 연구 또는 다른 경우에서 신생물성을 갖게 된다. 이 목적을 위해, 조절된 조건 하에서 변경된 세포를 사멸시킬 수 있는 일부 유전자 생성물, 예컨대, 유도성 자살 유전자의 발현을 제공할 수 있다.

CTL 내로의 구축물의 도입

[0054] 구축물(들)을 함유하는 숙주 세포의 선택을 가능하게 할 적어도 하나의 마커가 존재할 수 있는 경우, CAR을 코딩하는 발현 벡터는 하나 이상의 DNA 문자 또는 구축물로서 도입될 수 있다. 유전자 및 조절 영역이 단리될 수 있고, 적절하게 라이케이션될 수 있고, 적절한 클로닝 숙주에 클로닝될 수 있고 제한 또는 서열결정 또는 다른 편리한 수단에 의해 분석될 수 있는 경우, 구축물은 편리한 방식으로 제조될 수 있다. 구체적으로, "프라이머 복구", 라이케이션, 시험관내 돌연변이유발 등을 적절하게 사용하여 하나 이상의 돌연변이를 도입할 수 있는 경우, PCR을 이용하여 기능성 유닛의 전부 또는 일부를 포함하는 개별 단편을 단리할 수 있다. 그 다음, 일단 구

축물(들)이 완성되고 적절한 서열을 가진 것으로 입증되면, 이 구축물(들)을 임의의 편리한 수단으로 CTL 내로 도입할 수 있다. 세포 내로의 감염 또는 형질도입을 위해, 레트로바이러스 벡터 또는 랜티바이러스 벡터를 포함하는 비-복제 결합 바이러스 게놈, 예컨대, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV) 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV) 등 내로 상기 구축물을 삽입할 수 있고 팩키징할 수 있다. 구축물은 원하는 경우 형질감염을 위한 바이러스 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 구축물을 융합, 전기천공, 바이올리스틱(biolistics), 형질감염, 지질감염 등으로 도입할 수 있다. 구축물(들)의 도입 전에 숙주 세포를 배양물에서 성장시키고 증폭시킨 후, 구축물(들)의 도입 및 구축물(들)의 삽입을 위해 적절히 처리할 수 있다. 그 다음, 세포를 증폭시키고 구축물에 존재하는 마커로 스크리닝한다. 성공적으로 사용될 수 있는 다양한 마커들은 hprt, 네오마이신 내성, 타이미딘 키나제, 하이그로마이신 내성 등을 포함한다.

[0057] 일부 경우, 구축물이 특정 좌위에서 삽입될 것이 요구되는 경우, 상동성 재조합을 위한 표적 부위를 가질 수 있다. 예를 들면, 당업자는 상동성 재조합에 대해 당분야에서 공지되어 있는 재료 및 방법을 이용하여 내생성 유전자를 넉-아웃시킬 수 있고 (동일한 좌위 또는 다른 부분에서) 이를 구축물에 의해 코딩된 유전자로 대체할 수 있다. 상동성 재조합을 위해, 당업자는 OMEGA 또는 O-벡터를 사용할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Thomas and Capecchi, Cell (1987) 51, 503-512], 문헌[Mansour, et al., Nature (1988) 336, 348-352], 및 문헌[Joyner, et al., Nature (1989) 338, 153-156]을 참조한다.

[0058] 구축물은 적어도 CAR을 코딩하는 단일 DNA 문자 및 임의적으로 또 다른 유전자, 또는 하나 이상의 유전자를 가진 상이한 DNA 문자로서 도입될 수 있다. 다른 유전자는 예를 들면, 치료 문자를 코딩하는 유전자 또는 자살 유전자를 포함한다. 동일한 또는 상이한 마커를 각각 가진 구축물들은 동시에 또는 연속적으로 도입될 수 있다.

[0059] 구축물 DNA들의 스톡(stocks)을 제조하고 형질감염을 수행하는 데 사용될 수 있는 유용한 요소, 예컨대, 세균 또는 효모 복제기점, 선택가능한 및/또는 증폭가능한 마커, 원핵생물 또는 진핵생물에서의 발현을 위한 프로모터/인핸서 요소 등을 함유하는 벡터는 당분야에서 잘 공지되어 있고, 다수가 상업적으로 입수 가능하다.

사용 방법

[0061] 본 발명에 따른 세포는 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 상기 단리된 세포는 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암의 치료용 약제의 제조에 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명은 치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법으로서, 하기 단계들 중 적어도 하나를 포함하는 방법에 의존한다: (a) 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체 세포를 제공하는 단계; 및 (b) 상기 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계.

[0063] 환자는 암 환자, 또는 암에 민감하거나 암을 가진 것으로 의심받는 환자이다. 암은 CAIX 발현 암, 예컨대, 신장암, 난소암, 유방암, 식도암, 방광암, 대장암 또는 비소세포 폐암이다. 일부 실시양태에서, 신장암은 신장 투명세포 암이다.

세포의 투여

[0065] 본 발명이 전형적으로 기증자로부터 수득된 T-세포가 비-동종반응성 세포 내로 형질전환될 수 있게 하는 한, 본 발명은 동종이계 면역요법에 특히 적합하다. 이것은 표준 프로토콜 하에서 수행될 수 있고 필요한 만큼 많은 횟수로 재현될 수 있다. 생성된 변경된 T 세포는 풀링될 수 있고 한명 또는 여러 명의 환자들에게 투여될 수 있으므로, "기성품"인 치료 제품으로서 입수 가능하게 된다.

[0066] 세포의 성질에 따라, 세포는 매우 다양한 방식으로 숙주 유기체, 예를 들면, 포유동물 내로 도입될 수 있다. 대안적 실시양태에서 세포는 암에 민감하거나 암에 민감하도록 변경되지만, 특정 실시양태에서 세포는 종양의 부위에서 도입될 수 있다. 사용되는 세포의 수는 많은 환경, 도입 목적, 세포의 수명, 사용될 프로토콜, 예를 들면, 투여 횟수, 증식하는 세포의 능력, 재조합 구축물의 안정성 등에 의해 좌우될 것이다. 세포는 일반적으로 관심있는 부위 그 자체 또는 근처에서 주사되는 분산액으로서 적용될 수 있다. 세포는 생리학적으로 허용 가능한 배지에 존재할 수 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 세포는 면역 인식을 억제하도록 캡슐화되고 종양의 부위에 배치된다.

[0068] 세포는 원하는 경우 투여될 수 있다. 원하는 반응, 투여 방식, 세포의 수명 및 존재하는 세포의 수에 따라, 다양한 프로토콜들이 이용될 수 있다. 투여 횟수는 적어도 부분적으로 전술된 인자에 의해 좌우될 것이다.

[0069]

본 발명에 따른 세포 또는 세포 집단의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 주입 또는 이식을 비롯한 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 피하, 피내, 종양내, 결절내, 수질내, 근육내, 정맥내 또는 림프내 주사, 또는 복강내로 환자에게 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 바람직하게는 정맥내 주사에 의해 투여된다.

[0070]

세포 또는 세포 집단의 투여는 범위 이내의 세포 수의 모든 정수 값들을 포함하는, 체중 kg당 10^4 개 내지 10^9 개의 세포, 바람직하게는 체중 kg당 10^5 개 내지 10^6 개의 세포의 투여로 구성될 수 있다. 세포 또는 세포 집단은 1회분 이상의 용량으로 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포의 상기 유효량은 1회분 용량으로서 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 세포의 상기 유효량은 일정 기간에 걸쳐 1회분 초과의 용량으로서 투여된다. 투여 시간조절은 주치의의 판단 이내에 있고 환자의 임상적 상태에 의해 좌우된다. 세포 또는 세포 집단은 임의의 공급원, 예컨대, 혈액 은행 또는 기증자로부터 입수될 수 있다. 개별 필요성은 상이하지만, 특정 질환 또는 질병에 대한 소정의 세포 유형의 유효량의 최적 범위의 결정은 당분야의 기술 이내에 있다. 유효량은 치료적 또는 예방적 이익을 제공하는 양을 의미한다. 투여되는 용량은 수용자의 연령, 건강 및 체중, 존재하는 경우 병행 치료의 종류, 치료의 빈도 및 요구된 효과의 성질에 의해 좌우될 것이다.

[0071]

시스템은 많은 변수들, 예컨대, 리간드에 대한 세포 반응, 발현의 효율 및 적절한 경우 분비의 수준, 발현 생성물의 활성, 시간 및 환경에 따라 달라질 수 있는 환자의 구체적인 필요성, 세포 상실의 결과로서 세포 활성의 상실 또는 개별 세포의 발현 활성의 상실의 속도 등에 예속된다는 것을 인식해야 한다. 따라서, 각각의 개별 환자에 대해 대규모로 집단에게 투여될 수 있는 보편적인 세포가 존재하는 경우조차도, 각각의 환자는 개체에 대한 적절한 용량에 대해 모니터링될 것이라고 예상되고, 환자를 모니터링하는 이러한 관행은 당분야에서 관례적이다.

[0072]

핵산-기저 발현 시스템

[0073]

본 발명의 CAR들은 발현 벡터로부터 발현될 수 있다. 이러한 발현 벡터를 생성하는 재조합 기법은 당분야에서 잘 공지되어 있다.

[0074]

벡터

[0075]

용어 "벡터"는 핵산 서열이 복제될 수 있는 세포 내로 도입하기 위해 핵산 서열이 삽입될 수 있는 담체 핵산 분자를 지칭하는 데 사용된다. 핵산 서열은 "외생성" 핵산 서열일 수 있고, 이 용어는 상기 핵산 서열이 벡터가 도입되어 있는 세포에 대한 외래 물질임을 의미하거나, 상기 서열이 세포 내의 서열과 상동하되, 상기 서열이 통상적으로 발견되지 않는 숙주 세포 핵산 내의 위치에 존재한다는 것을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스), 및 인공 염색체(예를 들면, YAC)를 포함한다. 당업자는 표준 재조합 기법을 통해 벡터를 구축하도록 장비를 잘 갖출 것이다(예를 들면, 둘 다 본원에 참고로 도입되는 문헌(Maniatis et al., 1988) 및 문헌(Ausubel et al., 1994) 참조).

[0076]

용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 RNA를 코딩하는 핵산을 포함하는 임의의 유형의 유전적 구축물을 지칭한다. 그 다음, 일부 경우, RNA 분자는 단백질, 폴리펩티드 또는 웨პ티드로 번역된다. 다른 경우, 이들 서열들은 예를 들면, 안티센스 분자 또는 리보자임의 생성에서 번역되지 않는다. 발현 벡터는 특정 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 전사 및 가능하게는 번역에 필요한 핵산 서열을 지칭하는 다양한 "조절 서열들"을 함유할 수 있다. 전사 및 번역을 좌우하는 조절 서열 이외에, 벡터 및 발현 벡터는 다른 기능도 수행하고 이하에 기재되어 있는 핵산 서열을 함유할 수 있다.

[0077]

프로모터 및 인핸서

[0078]

"프로모터"는 전사의 시작 및 속도가 조절되는 핵산 서열의 영역인 조절 서열이다. 이것은 핵산 서열의 특정 전사를 시작하기 위해 조절 단백질 및 분자, 예를 들면, RNA 중합효소 및 다른 전사 요소가 결합할 수 있는 유전적 요소를 함유할 수 있다. 어구 "작동 가능하게 위치하는", "작동 가능하게 연결된", "조절 하에서" 및 "전사 조절 하에서"는 프로모터가 핵산 서열의 전사 시작 및/또는 발현을 조절하기 위해 그 핵산 서열과 관련하여 정확한 기능적 위치 및/또는 배향으로 존재한다는 것을 의미한다.

[0079]

프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위한 출발 부위를 위치시키는 작용을 하는 서열을 포함한다. 이것의 가장 잘 공지된 예는 TATA 박스이지만, TATA 박스를 결여하는 일부 프로모터들, 예를 들면, 포유동물 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 유전자에 대한 프로모터 및 SV40 후기 유전자에 대한 프로모터에서 상기 출발 부위 위에 놓인 별개의 요소 그 자체가 시작 위치를 고정시키는 데 도움을 준다. 추가 프로모터 요소는 전사 시작의 빈도

를 조절한다. 전형적으로, 이들은 출발 부위의 30 내지 110 bp 업스트림에 있는 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터들은 출발 부위의 다운스트림에 있는 기능성 요소도 함유하는 것으로 밝혀져 있다. 코딩 서열을 프로모터의 "조절 하에" 놓이게 하기 위해, 전사 판독 프레임의 전사 시작 부위의 5' 말단을 선택된 프로모터의 "다운스트림"(즉, 3')에 위치시킨다. "업스트림" 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고 코딩된 RNA의 발현을 촉진한다.

[0080] 프로모터 요소들 사이의 간격은 종종 유연하므로, 프로모터 기능은 요소들이 서로에 대해 상대적으로 뒤집어지거나 이동할 때 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소들 사이의 간격은 활성이 감퇴하기 시작하기 전에 50 bp 간격까지 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소들은 협력적으로 또는 독립적으로 작용하여 전사를 활성화시킬 수 있는 듯하다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화에 관여된 시스-작용 조절 서열을 지칭하는 "인핸서"와 함께 사용될 수 있거나 사용될 수 없다.

[0081] 프로모터는 코딩 분절 및/또는 엑손의 업스트림에 위치한 5 프라임 비-코딩 서열을 단리함으로써 수득될 수 있기 때문에 핵산 서열과 자연적으로 연결된 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 "내생성" 프로모터로서 지칭될 수 있다. 유사하게, 인핸서는 핵산 서열의 다운스트림 또는 업스트림에 위치한, 그 핵산 서열과 자연적으로 연결된 인핸서일 수 있다. 대안적으로, 일부 장점은 코딩 핵산 분절을, 통상적으로 그의 천연 환경에서 핵산 서열과 연결되어 있지 않은 프로모터를 지칭하는 재조합 또는 이종 프로모터의 조절 하에 위치시킴으로써 획득될 것이다. 재조합 또는 이종 인핸서는 통상적으로 그의 천연 환경에서 핵산 서열과 연결되어 있지 않은 인핸서도 지칭한다. 이러한 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 임의의 다른 바이러스, 또는 원핵 또는 진핵 세포로부터 단리된 프로모터 또는 인핸서, 및 "천연적으로 생성되지" 않는, 즉 상이한 전사 조절 영역의 상이한 요소들, 및/또는 발현을 변경시키는 돌연변이를 함유하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 예를 들면, 재조합 DNA 구축에 가장 통상적으로 사용되는 프로모터는 락타마제(lactamase)(페니실리나제(penicillinase)), 락토스 및 트립토판(trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 합성적으로 생성하는 것 이외에, 본원에 개시된 조성물과 관련하여 PCR.TM.을 비롯한 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 이용하여 서열을 생성할 수 있다(예를 들면, 본원에 각각 참고로 도입되는 미국 특허 제4,683,202호 및 제5,928,906호 참조). 나아가, 비-핵 세포소기관(organelle), 예컨대, 미토콘드리아, 엽록체 등의 내부에서 서열의 전사 및/또는 발현을 유도하는 조절 서열도 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0082] 자연적으로, 발현을 위해 선택된 세포소기관, 세포 유형, 조직, 장기 또는 유기체에서 DNA 분절의 발현을 효과적으로 유도하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것이 중요할 것이다. 분자생물학 분야에서 숙련된 자는 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 유형 조합의 사용을 알고 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Sambrook et al. 1989) 참조). 사용된 프로모터는 예컨대, 재조합 단백질 및/또는 웹티드의 대규모 생성에서 유리한 도입된 DNA 분절의 고수준 발현을 유도하기에 적절한 조건 하에서 항시적일 수 있고/있거나, 조직 특이적일 수 있고/있거나, 유도 가능할 수 있고/있거나 유용할 수 있다. 프로모터는 이종 또는 내재성 프로모터일 수 있다.

[0083] 추가로, 임의의 프로모터/인핸서 조합물도 발현을 유도하는 데 사용될 수 있었다. T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용은 또 다른 가능한 실시양태이다. 적절한 세균 중합효소가 전달 복합체의 일부로서, 또는 추가 유전적 발현 구축물로서 제공되는 경우, 진핵 세포는 일부 세균 프로모터들로부터의 세포질 전사를 뒷받침할 수 있다.

[0084] 조직 특이적 프로모터 또는 요소의 본질뿐만 아니라 이들의 활성을 특징규명하는 어세이도 당업자에게 잘 공지되어 있다.

[0085] 특정 시작 신호도 코딩 서열의 효율적인 번역을 위해 요구될 수 있다. 이 신호는 ATC 시작 코돈 또는 인접 서열을 포함한다. ATG 시작 코돈을 포함하는 외생성 번역 조절 신호가 제공될 필요가 있을 수 있다. 당분야에서 통상의 기술을 가진 자는 용이하게 이것을 확인할 수 있을 것이고 필요한 신호를 제공할 수 있을 것이다.

[0086] 본 발명의 일부 실시양태에서, 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 요소의 사용은 다중유전자 또는 폴리시스템성 메신지를 생성하는 데 사용되고, 이들은 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0087] 벡터는 다수의 제한 효소 부위들을 함유하는 핵산 영역인 다중 클로닝 부위(MCS)를 포함할 수 있고, 상기 제한 효소 부위들 중 임의의 제한 효소 부위가 표준 재조합 기술과 함께 벡터를 분해하는 데 사용될 수 있다. "제한 효소 분해"는 핵산 분자의 특정 위치에서만 작용하는 효소를 사용한 핵산 분자의 촉매작용적 절단을 지칭한다. 이들 제한 효소들 중 대다수는 상업적으로 입수 가능하다. 이러한 효소의 사용은 당업자에 의해 널리 이해된다. 종종, 외생성 서열이 벡터에 라이게이션될 수 있도록 MCS 내부에서 절단하는 제한 효소를 사용하여 벡터를 선형

화하거나 단편화한다. "라이게이션"은 서로 인접할 수 있거나 인접하지 않을 수 있는 2개의 핵산 단편들 사이의 포스포디에스테르 결합을 형성하는 과정을 지칭한다. 제한 효소 및 라이게이션 반응을 포함하는 기법은 재조합 기술의 분야에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있다.

[0088] 스플라이싱 부위, 종결 신호, 복제기점 및 선택 마커도 사용될 수 있다.

플라스미드 벡터

[0089] 일부 실시양태에서, 플라스미드 벡터는 숙주 세포를 형질전환시키기 위해 사용될 것으로 예상된다. 일반적으로, 숙주 세포와 상용가능한 종으로부터 유래한 레플리콘 및 조절 서열을 함유하는 플라스미드 벡터는 이를 숙주들과 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위뿐만 아니라, 형질전환된 세포에서 표현형적 선택을 제공할 수 있는 표시 서열도 보유한다. 비-한정적 예에서, 이. 콜라이 종으로부터 유래한 플라스미드인 pBR322의 유도체를 사용하여 이. 콜라이를 종종 형질전환시킨다. pBR322는 앰피실린 및 테트라사이클린 내성에 대한 유전자를 함유하므로, 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR 플라스미드, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 파지는 예를 들면, 그 자신의 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터도 함유해야 하거나 함유하도록 변경되어야 한다.

[0090] 추가로, 숙주 미생물과 상용가능한 레플리콘 및 조절 서열을 함유하는 파지 벡터는 이를 숙주들과 함께 형질전환 벡터로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 파지 람다 GEM.TM. 11은 숙주 세포, 예를 들면, 이. 콜라이 LE392를 형질전환시키는 데 사용될 수 있는 재조합 파지 벡터를 표시하는 데 사용될 수 있다.

[0091] 추가 유용한 플라스미드 벡터는 추후 정제 및 분리 또는 절단을 위해 글루타티온 S 트랜스퍼라제(GST) 가용성 응합 단백질을 생성하는 데 사용될 pIN 벡터(Inouye et al., 1985) 및 pGEX 벡터를 포함한다. 다른 적합한 응합 단백질은 갈락토시다제(galactosidase), 유비퀴틴 등을 가진 응합 단백질이다.

[0092] 발현 벡터를 포함하는 세균 숙주 세포, 예를 들면, 이. 콜라이는 다수의 적합한 배지들 중 임의의 적합한 배지, 예를 들면, LB에서 성장한다. 일부 벡터들에서 재조합 단백질의 발현은 당업자에 의해 이해될 바와 같이 숙주 세포를 일부 프로모터들에 특이적인 물질과 접촉시킴으로써, 예를 들면, IPTG를 배지에 첨가하거나 항온처리를 고온으로 전환시킴으로써 유도될 수 있다. 일반적으로 2시간 내지 24시간의 추가 기간 동안 세균을 배양한 후, 세포를 원심분리로 수집하고 세척하여 잔류 배지를 제거한다.

바이러스 벡터

[0093] 수용체 매개 세포내이입을 통해 세포를 감염시키거나 세포 내로 들어가고 숙주 세포 계놈 내로 삽입되고 바이러스 유전자를 안정하게 및 효율적으로 발현하는 일부 바이러스들의 능력으로 인해, 이들은 외래 핵산을 세포(예를 들면, 포유동물 세포) 내로 전달하기 위한 흥미로운 후보가 된다. 본 발명의 성분은 본 발명의 하나 이상의 CAR을 코딩하는 바이러스 벡터일 수 있다. 본 발명의 핵산을 전달하는 데 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 비-한정적 예는 이하에 기재되어 있다.

아데노바이러스 벡터

[0094] 핵산을 전달하는 구체적인 방법은 아데노바이러스 발현 벡터의 사용을 포함한다. 아데노바이러스 벡터가 계놈 DNA 내로 삽입되는 능력이 낮은 것으로 공지되어 있지만, 이 특징은 이를 벡터들에 의해 부여된 고효율의 유전자 전달에 의해 균형이 잡힌다. "아데노바이러스 발현 벡터"는 (a) 구축물의 팩키징을 뒷받침하고 (b) 궁극적으로 그 내부에 클로닝되어 있는 조직 또는 세포 특이적 구축물을 발현하기에 충분한 아데노바이러스 서열을 함유하는 구축물을 포함하기 위한 것이다. 유전적 조직구성, 또는 36 kb 선형 이중 가닥 DNA 바이러스인 아데노바이러스의 지식은 최대 7 kb의 외래 서열에 의해 아데노바이러스 DNA의 큰 조각의 치환을 가능하게 한다(Grunhaus and Horwitz, 1992).

AAV 벡터

[0095] 아데노바이러스 보조 형질감염을 이용하여 핵산을 세포 내로 도입할 수 있다. 증가된 형질감염 효율은 아데노바이러스 커플링된 시스템을 사용하는 세포 시스템에서 보고되었다(Kelleher and Vos, 1994; Cotten et al., 1992; Curiel, 1994). 아데노 관련 바이러스(AAV)는 고빈도의 삽입을 갖고 비분열 세포를 감염시킴으로써, 예를 들면, 조직 배양물(Muzyczka, 1992) 또는 생체내에서 포유동물 세포 내로의 유전자의 전달에 유용할 수 있기 때문에 본 발명의 세포에서 사용될 흥미로운 벡터 시스템이다. AAV는 감염성에 대한 넓은 숙주 범위를 가진다 (Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1986; Lebkowski et al., 1988; McLaughlin et al., 1988). rAAV 벡터의 생성 및 사용에 관한 세부사항은 본원에 각각 참고로 도입되는 미국 특허 제5,139,941호 및 제4,797,368

호에 기재되어 있다.

[0100] 레트로바이러스 백터

[0101] 레트로바이러스는 그의 유전자를 숙주 세포 내로 삽입하여 다양한 외래 유전적 물질을 전달하고 광범위한 종 및 세포 유형들을 감염시키고 특별한 세포주 내에 팩키징되는 그의 능력 때문에 전달 백터로서 유용하다(Miller, 1992).

[0102] 레트로바이러스 백터를 구축하기 위해, 복제 결합 바이러스를 생성하기 위해 핵산(예를 들면, 원하는 서열을 코딩하는 핵산)을 일부 바이러스 서열들 대신에 바이러스 세포를 이용해, gag, pol 및 env 유전자를 함유하되 LTR 및 팩키징 성분을 갖지 않은 팩키징 세포주를 구축한다(Mann et al., 1983). 레트로바이러스 LTR 및 팩키징 서열과 함께 cDNA를 함유하는 재조합 플라스미드가 (예를 들면, 인산칼슘 침전에 의해) 특별한 세포주 내로 도입될 때, 팩키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자 내로 팩키징될 수 있게 하고, 그 후 상기 바이러스 입자는 배양 배지 내로 분비된다(Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). 그 다음, 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고 임의적으로 농축하고 유전자 전달을 위해 사용한다. 레트로바이러스 백터는 다양한 세포 유형들을 감염시킬 수 있다. 그러나, 삽입 및 안정한 발현은 숙주 세포의 분열을 요구한다(Paskind et al., 1975).

[0103] 렌티바이러스는 공통된 레트로바이러스 유전자 gag, pol 및 env 이외에 조절 또는 구조적 기능을 가진 다른 유전자를 함유하는 복합 레트로바이러스이다. 렌티바이러스 백터는 당분야에서 잘 공지되어 있다(예를 들면, 문헌(Naldini et al., 1996); 문헌(Zufferey et al., 1997); 문헌(Blomer et al., 1997); 미국 특허 제6,013,516호 및 제5,994,136호 참조). 렌티바이러스의 일부 예들로는 인간 면역결핍 바이러스, 즉 HIV-1 및 HIV-2, 및 원숭이 면역결핍 바이러스, 즉 SIV가 있다. 렌티바이러스 백터는 HIV 병독성 유전자를 다중 약화시킴으로써 생성되었고, 예를 들면, 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef가 결실되어, 상기 백터를 생물학적으로 안전하게 만든다.

[0104] 재조합 렌티바이러스 백터는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있고 핵산 서열의 생체내 및 생체외 유전자 전달 및 발현 둘 다를 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 비-분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스로서, 적합한 숙주 세포가 팩키징 기능, 즉 gag, pol 및 env뿐만 아니라 rev 및 tat도 보유하는 2개 이상의 백터들로 형질감염되어 있는 것인 재조합 렌티바이러스는 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,994,136호에 기재되어 있다. 특정 세포 유형의 수용체에 표적화하기 위해 외피(envelope) 단백질을 항체 또는 특정 리간드와 연결함으로써 재조합 바이러스를 표적화할 수 있다. 예를 들면, 관심있는 서열(조절 영역을 포함함)이 특정 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드를 코딩하는 또 다른 유전자와 함께 바이러스 백터 내로 삽입됨으로써, 상기 백터는 표적 특이적이다.

[0105] 다른 바이러스 백터

[0106] 다른 바이러스 백터는 본 발명에서 백신 구축물로서 사용될 수 있다. 바이러스, 예컨대, 백시니아 바이러스(Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988), 신드비스(sindbis) 바이러스, 사이토메갈로바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스로부터 유래한 백터가 사용될 수 있다. 이들은 다양한 포유동물 세포들에게 여러 매력적인 특징들을 제공한다(Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990).

[0107] 변경된 바이러스를 사용한 전달

[0108] 전달될 핵산은 특정 결합 리간드를 발현하도록 조작되어 있는 감염성 바이러스 내부에 수용될 수 있다. 따라서, 바이러스 입자는 표적 세포의 동족 수용체에 특이적으로 결합하여 내용물을 세포에게 전달할 것이다. 바이러스 외피에의 락토스 잔기의 화학적 추가에 의한 레트로바이러스의 화학적 변경을 기반으로 레트로바이러스 백터의 특이적 표적화를 가능하게 하도록 디자인된 신규 방법을 개발하였다. 이 변경은 시알로당단백질 수용체를 통한 간세포의 특이적 감염을 가능하게 할 수 있다.

[0109] 레트로바이러스 외피 단백질 및 특정 세포 수용체에 대한 바이오티닐화된 항체가 사용되는 재조합 레트로바이러스의 또 다른 표적화 방법을 디자인하였다. 상기 항체는 스트렙타비딘의 사용에 의해 바이오틴 성분을 통해 커플링되었다(Roux et al., 1989). 주조직적합성 복합체 클래스 I 및 클래스 II 항원에 대한 항체를 사용하였을 때, 이들은 시험관내에서 동종지향성(ecotropic) 바이러스를 사용하여 표면 항원을 보유하는 다양한 인간 세포들을 감염시켰음을 입증하였다(Roux et al., 1989).

[0110] 벡터 전달 및 세포 형질전환

[0111] 세포의 형질감염 또는 형질전환을 위한 핵산 전달에 적합한 방법은 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 공지되어 있다. 이러한 방법은 예컨대, 생체외 형질감염, 주사 등에 의한 DNA의 직접적인 전달을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 당분야에서 공지되어 있는 기법의 적용을 통해 세포를 안정하게 또는 일시적으로 형질전환시킬 수 있다.

[0112] 생체외 형질전환

[0113] 생체외 환경에서 유기체로부터 제거된 진핵 세포 및 조직을 형질감염시키는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 따라서, 세포 또는 조직을 제거할 수 있고 본 발명의 핵산을 사용하여 생체외에서 형질감염시킬 수 있다는 것이 예상된다. 특정 양태에서, 이식된 세포 또는 조직은 유기체 내에 배치될 수 있다. 바람직한 양태에서, 핵산은 이식된 세포에서 발현된다.

[0114] 본 발명의 키트

[0115] 본원에 기재된 조성물들 중 임의의 조성물이 키트에 포함될 수 있다. 비-한정적 예에서, 세포 요법에서 사용될 하나 이상의 세포, 및/또는 재조합 발현 벡터를 보유하는, 세포 요법에서 사용될 하나 이상의 세포를 생성하기 위한 시약이 키트에 포함될 수 있다. 키트 성분들은 적합한 용기 수단 내에 제공된다.

[0116] 키트의 일부 성분들은 수성 매질 또는 동결건조된 형태로 포장될 수 있다. 키트의 용기 수단은 일반적으로 성분이 배치될 수 있고 바람직하게는 적절하게 분취될 수 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단을 포함할 것이다. 키트 내에 하나 초과의 성분이 존재하는 경우, 키트는 일반적으로 추가 성분이 따로 배치될 수 있는 제2, 제3 또는 다른 추가 용기도 함유할 것이다. 그러나, 성분들의 다양한 조합물이 바이알에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트는 전형적으로 상업적 판매를 위해 폐쇄된 구획 내부에 성분을 함유하기 위한 수단도 포함할 것이다. 이러한 용기는 원하는 바이알이 보유되어 있는 사출 또는 취입 성형 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0117] 키트의 성분들이 하나 및/또는 그 이상의 액체 용액으로 제공되어 있을 때, 액체 용액은 수용액이고, 이때 멸균 수용액이 특히 유용하다. 일부 경우, 용기 수단은 그 자체가 주사기, 피펫 및/또는 다른 장치, 예컨대, 유사한 장치일 수 있고, 제제는 이러한 장치로부터 신체의 감염된 부위에 적용될 수 있고/있거나, 동물 내로 주사될 수 있고/있거나, 심지어 키트의 다른 성분에 적용될 수 있고/있거나 키트의 다른 성분과 혼합될 수 있다.

[0118] 그러나, 키트의 성분은 건조된 분말(들)로서 제공될 수 있다. 시약 및/또는 성분이 건조 분말로서 제공될 때, 분말은 적합한 용매의 첨가에 의해 재구성될 수 있다. 용매는 또 다른 용기 수단 내에 제공될 수도 있다는 것이 예상된다. 키트는 멸균 약학적으로 허용 가능한 완충제 및/또는 다른 희석제를 함유하기 위한 제2 용기 수단도 포함할 수 있다.

[0119] 본 발명의 특정 실시양태에서, 세포 요법을 위해 사용될 세포는 키트 내에 제공되고, 일부 경우 상기 세포는 본질적으로 키트의 유일한 성분이다. 키트는 원하는 세포를 제조하기 위한 시약 및 재료를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 시약 및 재료는 원하는 서열을 증폭하기 위한 프라이머, 뉴클레오티드, 적합한 완충제 또는 완충제 시약, 염 등을 포함하고, 일부 경우 시약은 본원에 기재된 CAR 및/또는 이에 대한 조절 요소를 코딩하는 벡터 및/또는 DNA를 포함한다.

[0120] 특정 실시양태에서, 개체로부터 하나 이상의 샘플을 추출하는 데 적합한 하나 이상의 장치가 키트에 존재한다. 상기 장치는 주사기, 메스 등일 수 있다.

[0121] 본 발명의 일부 경우, 키트는 세포 요법 실시양태 이외에 제2 암 요법, 예컨대, 화학요법, 호르몬 요법 및/또는 면역요법도 포함한다. 키트(들)는 개체를 위해 특정 암에 맞게 조정될 수 있고 개체를 위해 각각의 제2 암 요법을 포함할 수 있다.

[0122] 조합 요법

[0123] 본 발명의 일부 실시양태에서, 임상 양태에 대한 본 발명의 방법은 과다증식성 질환의 치료에 효과적인 다른 물질, 예컨대, 항암제와 병용된다. "항암"제는 예를 들면, 암세포를 사멸시키거나, 암세포의 아폽토시스를 유도하거나, 암세포의 성장 속도를 감소시키거나, 전이의 발생률 또는 수를 감소시키거나, 종양 크기를 감소시키거나, 종양 성장을 억제하거나, 종양 또는 암세포에게의 혈액 공급을 감소시키거나, 암세포 또는 종양에 대한 면역 반응을 촉진하거나, 암의 진행을 예방하거나 억제하거나, 암을 가진 대상체의 수명을 증가시킴으로써 대상체에서

암에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다. 보다 일반적으로, 이들 다른 조성물들은 세포를 사멸시키거나 세포의 증식을 억제하기에 효과적인 조합된 양으로 제공될 것이다. 이 과정은 암세포를 발현 구축물 및 약제(들) 또는 다수의 인자(들)와 동시에 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 이것은 세포를, 상기 약제들 둘 다를 포함하는 단일 조성물 또는 약리학적 제제와 접촉시킴으로써, 또는 세포를 2개의 상이한 조성물들 또는 제제들과 동시에 접촉시킴으로써 달성될 수 있고, 이때 한 조성물은 발현 구축물을 포함하고 다른 조성물은 제2 약제(들)을 포함한다.

[0124] 화학요법제 및 방사선요법제에 대한 종양 세포 내성은 임상 종양학에서 주요 문제점을 대표한다. 현재의 암 연구의 한 목적은 화학요법 또는 방사선요법을 다른 요법과 조합함으로써 화학요법 및 방사선요법의 효능을 개선하는 방식을 찾는 것이다. 본 발명과 관련하여, 세포 요법은 유사하게 화학요법적, 방사선요법적 또는 면역요법적 중재뿐만 아니라, 전구-아폽토시스 또는 세포 주기 조절제와도 함께 사용될 수 있다는 것이 예상된다.

[0125] 대안적으로, 본 발명의 요법은 수분 내지 수주의 간격으로 다른 약제 치료에 앞설 수 있거나 뒤따를 수 있다. 다른 약제 및 본 발명이 개체에 따로 적용되는 실시양태에서, 일반적으로 상기 약제 및 본 발명의 요법이 세포에 대한 유리하게 조합된 효과를 여전히 발휘할 수 있도록 각각의 전달 시간 사이에 유의한 시간이 만료하지 않았다는 것을 보장할 것이다. 이러한 경우, 서로 약 12시간 내지 24시간 이내에, 보다 바람직하게는 서로 약 6시간 내지 12시간 이내에 세포를 두 모달리티(modalities)와 접촉시킬 수 있다는 것이 예상된다. 일부 상황에서, 치료 기간을 유의하게 연장시키는 것이 바람직할 수 있으나, 수일(2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일) 내지 수주(1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주 또는 8주)가 각각의 투여 사이에 경과된다.

[0126] 치료 주기가 필요에 따라 반복될 것임이 예상된다. 다양한 표준 요법들뿐만 아니라 수술적 중재도 본 발명의 세포 요법과 함께 적용될 수 있다는 것도 예상된다.

화학요법

[0128] 암 요법은 화학적 기반 치료 및 방사선 기반 치료 둘 다를 사용한 다양한 조합 요법들도 포함한다. 조합 화학요법은 예를 들면, 아브락산(abraxane), 알트레타민(altrretamine), 도세탁셀(docetaxel), 헤르셉틴(herceptin), 메토트렉세이트(methotrexate), 노반트론(novantrone), 졸라덱스(zoladex), 시스플라틴(cisplatin)(CDDP), 카보플라틴(carboplatin), 프로카바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 캠토테신(camptothecin), 이포스파마이드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 부설판(busulfan), 니트로스우레아(nitrosurea), 닉티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포사이드(etoposide)(VP16), 타목시펜(tamoxifen), 랄록시펜(raloxifene), 에스트로겐 수용체 결합 물질, 탁솔(taxol), 겨미타비엔(gemcitabien), 나벨빈(navelbine), 파르네실(farnesyl)-단백질 트랜스퍼라제(transferase) 억제제, 트랜스플라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(fluorouracil), 빙크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토트렉세이트(methotrexate), 또는 상기 물질들의 임의의 유사체 또는 유도체 변이체 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0129] 특정 실시양태에서, 개체를 위한 화학요법은 예를 들면, 본 발명의 투여 전, 동안 또는 후 본 발명과 함께 사용된다.

방사선요법

[0131] DNA 손상을 야기하고 광범위하게 사용되는 다른 인자는 통상적으로 .감마.-선, X-선, 및/또는 종양 세포에게의 방사성동위원소의 유도된 전달로서 공지되어 있는 것을 포함한다. 다른 형태의 DNA 손상 인자, 예컨대, 마이크로파 및 UV-방사선조사도 예상된다. 아마도 이들 인자들 전부가 DNA, DNA의 전구체, DNA의 복제 및 복구, 및 염색체의 조립 및 유지에 대한 광범위한 손상을 미칠 것이다. X-선에 대한 선량 범위는 연장된 기간(3주 내지 4주) 동안 50 내지 200 뮌트겐의 1일 선량부터 2000 내지 6000 뮌트겐의 단일 선량까지 이른다. 방사성동위원소에 대한 선량 범위는 광범위하게 다양하고, 동위원소의 반감기, 방사된 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물성 세포에 의한 흡수에 의해 좌우된다.

[0132] 세포에 적용될 때 용어 "접촉된" 및 "노출된"은 치료 구축물 및 화학요법제 또는 방사선요법제가 표적 세포에게 전달되거나 표적 세포와 직접 병렬로 배치되는 과정을 기술하기 위해 본원에서 사용된다. 세포 사멸 또는 정체를 달성하기 위해, 상기 요법제들 둘 다가 세포를 사멸시키거나 세포의 분열을 방해하기에 효과적인 조합된 양으로 세포에게 전달된다.

[0133] 면역요법

면역요법은 일반적으로 암세포를 표적화하고 파괴하기 위한 면역 이펙터 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 면역 이펙터는 예를 들면, 종양 세포의 표면 상의 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 항체 단독은 요법의 이펙터로서 사용될 수 있거나 세포 사멸에 실제로 영향을 미치기 위해 다른 세포를 모집할 수 있다. 항체는 약물 또는 독소(화학요법제, 방사성핵종, 리신 A 쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합될 수도 있고 표적화제로서만 사용될 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 종양 세포 표적과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 보유하는 램프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.

따라서, 본원에 기재된 본 발명의 요법 이외의 면역요법은 본 세포 요법과 함께 조합된 요법의 일부로서 사용될 수 있다. 조합된 요법을 위한 일반적인 방법은 이하에 논의되어 있다. 일반적으로, 종양 세포는 표적화될 수 있는, 즉 대다수의 다른 세포들 상에 존재하지 않는 일부 마커를 보유해야 한다. 많은 종양 마커들이 존재하고 이들 중 임의의 종양 마커가 본 발명과 관련하여 표적화에 적합할 수 있다. 흔한 종양 마커는 PD-1, PD-L1, CTLA4, 발암배아 항원, 전립선 특이적 항원, 비뇨기 종양 관련 항원, 태아 항원, 티로시나제(tyrosinase)(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 항원, MucA, MucB, PLAP, 에스트로겐 수용체, 라미닌 수용체, erb B 및 p155를 포함한다.

[0136] 유전자

또 다른 실시양태에서, 이차 치료는 치료 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 임상적 실시양태 전, 후 또는 동시에 투여되는 유전자 요법이다. 세포 증식의 유도제, 세포 증식의 억제제 또는 프로그래밍된 세포 사멸의 조절제를 포함하는 다양한 발현 생성물들이 본 발명에 포함된다.

[0138] 수술

암을 가진 사람들의 대략 60%는 예방적, 진단적 또는 병기분류, 치유적 및 완화적 수술을 포함하는 일부 유형의 수술을 받을 것이다. 치유적 수술은 다른 요법, 예컨대, 본 발명의 치료, 화학요법, 방사선요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대안적 요법과 함께 사용될 수 있는 암 치료이다.

치유적 수술은 암성 조직의 전부 또는 일부가 물리적으로 제거되고/되거나, 절제되고/되거나 파괴되는 절제술을 포함한다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부의 물리적 제거를 지칭한다. 종양 절제술 이외에, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동수술, 전기수술, 및 미시적으로 제어된 수술(모즈 수술(Mohs' surgery))을 포함한다. 본 발명은 표피 암, 전구암 또는 우발적 양의 정상 조직의 제거와 함께 이용될 수 있다는 것도 예상된다.

암성 세포, 조직 또는 종양의 일부 또는 전부의 절제 시, 신체에 캐비티(cavity)가 형성될 수 있다. 치료는 추가 항암 요법을 사용한 관류, 직접적인 주사 또는 영역의 국소 적용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 치료는 예를 들면, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일마다, 1주, 2주, 3주, 4주 및 5주마다, 또는 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이 치료는 상이한 용량의 치료일 수도 있다.

[0142] 다른 약제

다른 약제는 치료의 치료적 효능을 개선하기 위해 본 발명과 함께 사용될 수 있다는 것이 예상된다. 이 추가 약제는 면역조절제, 세포 표면 수용체의 상향조절 및 GAP 연접에 영향을 미치는 약제, 세포증식억제성 및 분화 약제, 세포 부착의 억제제, 또는 아폽토시스 유도제에 대한 과다증식성 세포의 민감성을 증가시키는 약제를 포함한다. 면역조절제는 종양 괴사 인자; 인터페론 알파, 베타 및 감마; IL-2 및 다른 사이토카인; F42K 및 다른 사이토카인 유사체; 또는 MIP-1, MIP-1베타, MCP-1, RANTES 및 다른 케모카인을 포함한다. 세포 표면 수용체 또는 이의 리간드, 예컨대, Fas/Fas 리간드, DR4 또는 DR5/TRAIL의 상향조절은 과다증식성 세포에 대한 자가분비 또는 측분비 효과를 확립함으로써 본 발명의 아폽토시스 유도 능력을 증강시킬 것이라는 것도 예상된다. GAP 연접의 수의 상승에 의한 세포내 신호전달의 증가는 인접 과다증식성 세포 집단에 대한 항-과다증식성 효과를 증가시킬 것이다. 다른 실시양태에서, 세포증식억제성 또는 분화 약제는 치료의 항-과다증식성 효능을 개선하기 위해 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 세포 부착의 억제제는 본 발명의 효능을 개선할 것으로 예상된다. 세포 부착 억제제의 예는 국소 부착 키나제(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 아폽토시스에 대한 과다증식성 세포의 민감성을 증가시키는 다른 약제, 예컨대, 항체 c225도 치료 효능을 개선하기 위해 본 발명과 함께 사용될 수 있다는 것이 예상된다.

[0144] 실시예

[0145]

실시예 1: 재료 및 방법

[0146]

세포, 배양 배지 및 시약. 인간 CAIX+ 신장 세포주 sk-rc-52(본원에서 Skrc52로서도 지칭됨), sk-rc-09 및 CAIX- sk-rc-59(본원에서 Skrc59로서도 지칭됨)를 저드 리터(Gerd Ritter) 박사(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York)로부터 입수하였다. 이들을, 10% FCS, 2 mmol/l L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Sigma)으로 보충된 RPMI 1640 배지(Life Technologies)를 함유하는 R-10 완전 배지에서 5% CO₂와 함께 37°C에서 배양하였다. 일차 인간 T 세포를, 10% 인간 혈청 및 100 IU/ml 재조합 인간 인터류킨 2(IL-2)(Chiron)를 가진 R-10에서 유지하였다. 인간 배아 신장 세포주 293T(ATCC) 및 마우스 섬유모세포 NIH3T3 세포(ATCC)를, 10% FCS, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Sigma)을 가진 DMEM 배지를 함유하는 D-10 완전 배지(Life Technologies)에서 성장시켰다. 보스톤 아동 병원의 혈액 은행으로부터 입수된 류코팩(Leukopacks)을, 사전 동의서를 작성한 건강한 자원자로부터 수집하였다.

[0147]

scFv 단리 및 scFv-Fc로의 scFv의 전환. 이미 보고되어 있고 GQ903548-GQ903561²³의 수탁번호(이의 내용은 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)로 진뱅크에 제출된 비-면역 인간 scFv 파지 라이브러리로부터 CAIX 특이적 scFv 항체를 단리하였다. pFarber 파지미드로부터의 scFv-코딩 DNA 단편을 SfI/NotI 부위로 분해하였고, 인간 IgG1 F105 리터 서열 및 인간 IgG1 헌지-CH2-CH3 Fc 부분을 가진 포유동물 발현 벡터 pcDNA3.1-F105L-헌지-스튜퍼(stuffer) 내로 서브클로닝하여 scFv-Fc 항체를 발현하였다. 리포펙타민(lipofectamine) 2000(Invitrogen)으로 scFv-Fc의 플라스미드를 293T 세포 내로 일시적으로 형질감염시켰고, 세파로스 단백질 A 비드(Amersham Bioscience)를 사용하여 발현된 항체를 정제하였다. CAIX-발현 293T 및 sk-rc-52 세포주, 및 CAIX 음성 293T 및 sk-rc-59 세포주와 함께 항온처리함으로써, scFv-Fc 포맷 항체로 전환된 파지 scFv 항체 또는 scFv로 염색하여 CAIX에의 특이적 결합을 시험하였다. 이들 실험에서, 무관한 항-HIV CCR5 항체(클론 A8)²⁵ 또는 항-SARS 항체(11A)²⁴ 및 형광 접합된 이차 항체 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0148]

한 실시양태에서, 인간 ccRCC 세포주, Skrc52, 원래의 CAIX+/ PD-L1-, 및 Skrc59, 원래의 CAIX-/PD-L1+를 저드 리터(Gerd Ritter) 박사(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York)로부터 입수하였다. 이들 세포들을 10%(v/v) 열-불활성화된 태아 소 혈청(FBS, Gibco), 100 IU/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640 배지(Life Technologies)에서 배양하였다. 293T(CRL-11268, ATCC) 및 Lent i-X 293T(Clontech) 세포를 10% FBS, 100 IU/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 DMEM 배지(Life Technologies)에서 성장시켰다. 이 프로젝트에서 사용된 모든 세포주들을, 렌티바이러스 형질도입을 통해 루시퍼라제(luciferase)로 형질도입하였고 5% CO₂와 함께 37°C에서 유지하였다. 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 분류로 CAIX-/PD-L1- 및 CAIX+/PD-L1- 세포 집단에 대해 Skrc52 세포를 선택하였다. 고수준의 인간 CAIX를 발현하도록 Skrc59 세포를 조작하였고 CAIX+/PD-L1+을 FACS 분류로 선택하였다.

[0149]

scFv-CD8-TCR ζ 및 scFv-CD28-TCR ζ 구축물의 구축. 파지미드 벡터 pSL1180 내의 DNA 구축물인 Pz1, scFv-CD8-TCR ζ, 및 P28z, scFv-CD28-TCR ζ를 미셸 사델라인(Michel Sadelain) 박사(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York)로부터 입수하였다. Pz1에서, scFv 및 TCR ζ 세포내 도메인은 각각 인간 CD8 α 쇄의 N-말단 및 C-말단에 추가되어 있다. 유사하게, P28z에서, scFv 및 TCR ζ 서열은 각각 인간 CD28의 N-말단 및 C-말단에 추가되어 있다. 인간 CD8 α의 아미노산 서열은 CD8 α 세포외 및 헌지, 경막 및 세포질 도메인들의 각각 47개(aa 137-183), 23개(aa 184-206) 및 2개(aa 207-208)의 잔기로 구성된, 길이에 있어서 71개 잔기이다. P28z에서 CD28 서열은 CD28 세포외, 경막 및 세포질 도메인들의 각각 40개(aa 114-153), 23개(aa 154-176) 및 44개(aa 177-220)의 잔기로 구성된, 길이에 있어서 107개 잔기이다. 두 CAR들에 공통된 인간 CD3 ζ 세포내 도메인은 112 개의 아미노산(aa 52-163)으로 구성된다.

[0150]

GGGGS 링커를 가진 내부 C9-태그(인간 로돕신의 9-아미노산 웨티드, TETSQVAPA)를 코딩하는 핵산 서열을 PCR로 증폭하였고 5' NotI 부위 및 3' PacI 부위를 가진 CD8-TCR ζ 및 CD28-TCR ζ 서열과 업스트림에서 응합시켰다. 키메라 TCR ζ 구축물을 클로닝하는 데 사용된 프라이머는 다음과 같다: 5' TAG GGC GCG GCC GC_a acc gag acc agc cag gtg gcg ccc gcc GGG GGA GGC AGC CCC ACC ACG ACG CCA GCG CCG CGA 3'(서열번호 71)(CD8 구축물에 대한 정방향 프라이머, 이때 이탈릭체는 NotI 부위이고, 대문자는 C9 태그 서열이고, 밑줄은 GGGGS 링커를 표시함), 5' TAG GGC GCG GCC GC_a acc gag acc agc cag gtg gcg ccc gcc GCG GGA GGC AGC ATT GAA GTT ATG TAT CCT CCT CCT 3'(서열번호 75)(CD28 구축물에 대한 정방향 프라이머) 및 두 구축물들에 대한 역방향 프라이머 CTA GCC TT AAT TAA TTA GCG AGG AGG GGG CAG GGC CTG CAT(서열번호 77)(이때, 이탈릭체는 PacI 부위임). 이를 DNA 단편들은 하기 순서에 따라 정렬되어 있는 기능적 특징을 코딩한다: NotI -

C9tag(TETSQVQPQ) - GGGGS - CD8 또는 CD28 - TCR ζ - PacI. 서열 TETSQVQPQ는 서열 번호 78을 가진다. 서열 GGGGS는 서열번호 79를 가진다. NotI 및 PacI 제한 부위를 사용하여 내부 C9 태그를 가진 키메라 TCR 구축물을, 항-CXCR4 scFv-Fc를 함유하는 pcDNA3.1-F105L-힌지 스튜퍼 벡터 내로 클로닝하였다(클론 48). 이 디자인은 본 발명자들로 하여금 Fc 부분 단편을 대체하도록 키메라 TCR 수용체 구축물을 삽입할 수 있게 한다. 그 후, SfiI/NotI 부위에서 항-CXCR4 scFv를 대체하도록 항-CAIX scFv(클론 G36) 및 항-CCR5 scFv(무관한 scFv 대조군으로서 클론 A8) 항체 단편을 클로닝하여 CAIX 특이적 키메라 TCR 구축물을 생성하였다.

[0151] 렌티바이러스 벡터 pHAGE-CMV-DsRed-IRES-ZsGreen, 및 4개의 HIV 헬퍼 플라스미드 pHMD-Hgpm2(HIV gag-pol), pMD-tat, pRC/CMV-rev 및 Env VSV-G 슈도타입을 리차드 뮬리간(Richard Mulligan) 박사(Virus Production Core at The Harvard Gene Therapy Initiative in Boston)로부터 입수하였다. pHAGE-CMV-IRES-ZsGreen의 CMV 프로모터를 SpeI/NotI 부위에서 pSIN 렌티바이러스 벡터로부터 유래한 EF1 α 프로모터로 대체하였다. 5개의 scFv-Fc 항체들 중 하나인 G36(CAIX+ 세포에 대한 고친화성을 갖고 CAIX+ 종양 세포에 대해서만 높은 ADCC를 가짐)을 AscI/BamHI에서 pHAGE-EF1 α 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝하여 DsRed 단백질의 첫 번째 카세트를 대체하였다.

[0152] 렌티바이러스의 생성 및 인간 일차 T 세포의 형질도입. 제조자의 지시(Invitrogen)에 따라 리포펙타민 2000을 사용하여 5개의 플라스미드를 293T 세포 내로 일시적으로 형질감염시킴으로써 렌티바이러스를 생성하였다. 세포를 15 cm 페트리 접시(Nalge Nunc)에서 80% 전면생장(confluence)에 도달하도록 준비하였고 총 30 μ g의 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 벡터 플라스미드의 비(pHMD-Hgpm2(HIV gag-pol): pMD-tat: pRC/CMV-rev: Env VSV-G 슈도타입)는 20:1:1:1:2이었다. D-10 배지로 바꾼 후, 바이러스 성청액을 3일째 날에 회수하였고 0.45 μ m 필터를 통해 여과하였고 16,500 rpm(48,960 x g, Beckman SW28 로터) 및 4°C에서 90분 동안 한외원심분리(Beckman Coulter, Fullerton, CA)로 농축하였다. 바이러스 펠렛을 R-10 배지에 재현탁하였고 -80°C에서 동결시켜 보관하였다.

[0153] 한 실시양태에서, 폴리에틸렌이민(PEI)을 사용하여 5개의 플라스미드를 293T 세포 내로 일시적으로 형질감염시킴으로써 렌티바이러스를 생성하였다. 요약하건대, 15 cm 플레이트(Nalge Nunc) 내의 각각의 80% 전면생장 293T 세포를 총 30 μ g의 5개 플라스미드(5 μ g의 각각의 구조 플라스미드 pHMD-Hgpm2(HIV gag-pol), pMD-tat; pRC/CMV-rev 및 Env VSV-G, 및 CAR(항-CAIX/항-PD-L1 IgG1, 항-CAIX/항-PD-L1 IgG4, 항-CAIX/항-SARS IgG1 또는 항-BCMA/항-SARS IgG1)을 코딩하는 10 μ g의 주요 플라스미드)로 형질감염시켰다. 제조자의 지시에 따라 Lent-i-X 농축기(Clontech)를 이용하여 바이러스 상청액을 농축하였고 -80°C에서 동결시켜 보관하였다.

[0154] 인간 PBMC를 피콜 밀도 구배 분리로 단리하였고 4일 동안 2 μ g/ml PHA(Sigma) 플러스 100 IU/ml 인간 IL-2로 활성화시켰다. 세포를 10 μ g/ml DEAE의 존재 하에서 10 내지 20의 다중감염도(MOI)에서 2 또는 3 라운드의 렌티바이러스 형질도입으로 감염시켰다. 형질도입한 지 3일 후, 시험관내에서의 표현형적 및 기능적 분석을 위해 형질도입된 T 세포를 수집하였거나 생체내 실험을 위해 형질도입된 T 세포를 증폭시켰다.

[0155] 유세포측정 분석. 인간 일차 T 세포의 형질도입 효율을 레포터 유전자(ZsGreen)의 발현으로 평가하였다. CAIX의 아미노산 38-397에 이어 인간 IgG1 힌지, CH2 및 CH3 도메인들을 코딩하는 pcDNA3.1 플라스미드로부터 CAIX-Fc 단백질을 발현하였고, CAIX 신호 태그(aa 1-37)를 Ig 리더 서열로 대체하였다. 세포를 1 μ g의 CAIX-Fc 단백질로 염색한 후 APC-접합된 마우스 항-인간 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)로 염색함으로써 형질도입된 T 세포 상에서의 scFv(G250)의 발현을 시험하였다. 추가로, 5 μ g의 마우스 1D4 항체로 염색한 후, APC-접합된 염소 항-마우스 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)로 염색함으로써, 형질도입된 T 세포 상에서의 TCR 구축물의 scFv 도메인의 내부 로돕신 노나펩티드(TETSQVAPA) C9 태그의 발현을 검출하였다. 분석을 위해, 클론 증폭 실험 동안 배양물 중의 인간 세포의 서브세트를 CD3(클론 S4.1), CD4(클론 S3.5) 또는 CD8(클론 3B5)에 대한 형광 접합된 마우스 항-인간 항체(Invitrogen)로 염색하였다. 모든 세포 염색에서, 오십만 개의 세포를 회사의 지시에 따라 권고된 농도에서 항체로 염색하였다. 각각의 샘플에 대한 일치된 이소타입 대조군 항체를 사용하였고 FACSCalibur 사이토미터(Becton-Dickinson)를 이용하여 세포를 분석하였다.

[0156] 한 실시양태에서, 293T 세포 또는 CD8+ T 세포의 형질도입을 항-CAIX 또는 항-BCMA 발현의 FACS 분석으로 확인하였다. 세포를 본 발명자들의 실험실에서 제조된 10 μ g/ml의 인간 CAIX-Fc 또는 인간 BCMA-마우스-Fc(AB Bioscience)로 염색한 후, 각각 1:250 APC-접합된 마우스 항-인간 IgG Ab(Southern Biotech) 또는 염소-항 마우스 IgG Ab(Biolegend)로 현상하였다. CountBrightTM 절대 카운팅 비드(Molecular Probes)를 증식 및 클론 증폭 어세이에 사용하였다. 모든 샘플들을 LSR 포르테사(Fortessa) 또는 FACSCalibur(BD Bioscience)로 분석하였고 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석하였다. CART 세포의 T 세포 소진의 상태를 분석하기 위해, CART 세포를 5일 동안 IL-21 50 U/ml(Peprotech) 및 다이나비즈(Dynabeads) 인간 T 활성화제 CD3/CD28의 존재

하에서 배양하였다. 이 기간 후, 소진을 자극하기 위해 CART 세포를 2일 동안 Skrc-59 CAIX+ PD-L1+ 세포와 함께 공-배양하였다. 이 어세이로부터의 1×10^6 개의 CART 세포 및 생체내 어세이로부터 수집된 종양-침윤 텁프구(TIL)를 FITC-접합된 항-인간 PD-1, PE-접합된 항-인간 Tim3, PerCP/Cy5.5-접합된 항-인간 Lag3 항체(Biolegend) 및 파시픽 블루(Pacific Blue)-접합된 항-인간 CD45로 염색하였고 FACS로 분석하였다. 이 프로젝트에서 사용된 상이한 RCC 세포 계통에서 CAIX 및 PD-L1의 발현 수준을 검증하기 위해, 본 별명자들은 본 별명자들의 실험실에서 제조된 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항-인간 CAIX mAb(클론 G36) 및 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 바이오티닐화된 마우스 항-인간 PD-L1(Biolegend)을 사용하였다. 각각 1:250 APC-접합된 항-인간 Ab 및 PE-접합된 아비딘을 사용하여 일차 항체를 검출하였고 FACS로 분석하였다.

[0157] 렌티바이러스 형질도입된 T 세포의 ADCC 및 세포독성 어세이. 제조자의 지시에 따라 DELFIA EuTDA 세포독성 키트(Perkin Elmer, Boston, MA)를 사용하여 세포독성 어세이를 수행하였다. 요약하건대, 표적 종양 세포를 37°C 에서 30분 동안 형광 리간드(BATDA)로 표지하였고 웨일 1 $\times 10^4$ 개의 표지된 세포를 96-웰 U-바닥 플레이트에 적재하였다. 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC) 어세이를 위해, 항-CAIX scFv-Fc 항체 또는 무관한 scFv-Fc 항체의 패널을 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 따로 첨가하였다. 50:1, 25:1 및 12.5:1의 이펙터 세포(인간 PBMC) 대표적 세포(E:T)의 비로 상기 어세이를 설정하였다. T 세포 세포독성 어세이를 위해, 이펙터 세포(형질도입되지 않았거나 형질도입된 T 세포) 대 표적 세포(E:T)의 상이한 비를 준비하였다(100:1, 50:1 및 25:1). 배양물을 37°C 에서 습윤화된 5% CO_2 와 함께 4시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 500x g에서 5분 동안 원심분리한 후, 20 μl 의 상청액을 평저 플레이트로 옮겼다. 200 μl 의 유로퓸 용액을 첨가하였고, 세포로부터 방출된 형광을 형광측정기(VictorTM, PerkinElmer)로 판독하였다. 표지 세포만을 배양함으로써 자연발생적 방출에 대한 대조군을 제조하였고, 용해 완충제(제공된 키트)를 표지 세포에 첨가함으로써 최대 방출에 대한 대조군을 제조하였다.

[0158] ELISA, ELISPOT 어세이 및 웨스턴 블로트. 사이토카인 분비를 위해, RCC 세포주 sk-rc-52(CAIX+) 또는 sk-rc-59(CAIX-)를 웨일 1 $\times 10^6$ 개씩 24-웰 플레이트에 밤새 시딩한 후, 1 $\times 10^6$ 개의 형질도입되지 않았거나 형질도입된 T 세포를 시팅하였다. 종양 세포와 함께 공-배양하기 전, T 세포를 PBS로 2회 세척하여 인간 IL-2를 제거하였다. 밤새 항온처리한 후, 상청액을 회수하였고 ELISA(e-Bioscience)로 IL-2 및 IFN- γ 에 대해 분석하였다. IFN- γ ELISPOT 어세이(e-Bioscience)를 위한 T 세포의 검출에서, AEC 기질 용액을 사용하여 막을 현상하였고 점의 수를 ELISPOT 플레이트 판독기(C.T.L. Cellular Technology)로 카운팅하였다.

[0159] 웨스턴 블로트를 위해, 형질도입되지 않은 T 세포 및 형질도입된 T 세포의 제조를 기재하였다⁵⁰. 백만 개의 세포를 비-환원 및 환원 완충제(0.1 M 디티오프레이톨)에서 제조하였고 10-20% 폴리아크릴아미드 구배 겔(Invitrogen) 상에서 런닝시켰다. 단백질을 100 V 및 4°C 에서 밤새 폴리비닐리덴 플루오라이드 전달 막(NEN Life Science Products, Boston, MA)으로 옮겼다. 상기 막을 1:2000 일차 항체, 항-인간 ζ -쇄 단일클론 항체 8D3(BD Pharmingen, San Diego, CA) 및 이어서 1:3000 이차 항체 호스라디쉬 페록시다제(Caltag)와 함께 항온처리하였다. ECL 플러스 웨스턴 블로팅 검출 시스템(GE Healthcare, Piscataway, NJ) 및 x-선 필름 노출을 이용하여 면역검출을 수행하였다.

[0160] 종양 세포 접촉 후 증식, 클론 증폭 및 사이토카인 분비. 종양 세포를 방사선조사하였고(3,000 rads) 웨일 2.5 $\times 10^5$ 개씩 시팅하였다. 1주 배양을 위해 T 세포를, R-10 플러스 100 IU/mL 인간 IL-2를 함유하는 배양 배지에 1 $\times 10^6$ 개씩 첨가하였다. T 세포를 분할하여 적합한 밀도를 유지하였고 주마다 종양 세포로 재자극하였다. T 세포의 수를 2주 동안 3일 또는 4일마다 카운팅하였다. 형질도입된 T 세포 및 T 세포 서브세트에 의한 ZsGreen의 백분율 발현을 형광-활성화된 세포 분류(FACS)로 주마다 측정하였다. 종양 세포 접촉 후 사이토카인 분비 연구를 위해, 1주 또는 2주 동안 방사선조사된 종양 세포와 접촉한 T 세포를 세척하였고 새로운 종양 세포와 함께 밤새 항온처리하였고, 분석을 위해 배양 상청액을 24시간 후 수집하였다.

[0161] 종양 학립 및 T 세포 요법. 한 실시양태에서, 6주령 내지 8주령의 암컷 BALB/c 누드 마우스에서의 sk-rc-52의 면역거부로 인해 생체내 성장 성질을 가속화하기 위해, 5백만 개의 세포를 마우스 내로 피하 접종하였고 회수하였고 시험관내에서 증폭하였다. 그 다음, 세포주를 누드 마우스에서 2회 이상 계대배양하였고, 추가 실험을 위해 계대배양된 세포를 증폭하였다(서브클론 4-1). 치료적 실험을 위해, 5백만 개의 sk-rc-59 및 7백 5십만 개의 계대배양된 sk-rc-52 세포를 대향하는 옆구리 상에서 누드 마우스 내로 피하 접종하여 필적할만한 종양 성장을 을 달성하였다. 7일 후, 종양은 약 6 mm의 크기까지 성장하였고, 5천만 개의 형질도입되지 않았거나 형질도입된 T 세포를 정맥내로 주사하였다. 또한, 마우스를 2일마다 복막 주사로 20,000 IU의 인간 IL-2로 치료하였다. 종

양 크기를 2차원에서 칼리퍼로 측정하였고 2개의 종양 직경의 평균이 여기에 보고되었다. 동물 실험을 지침 (Dana Farber Cancer Institute Animal Care Committee)에 따라 수행하였다. 종양이 15-mm 직경 또는 2,000 mm³에 도달하였을 때, 마우스를 희생시켰고 종양을 회수하였다.

[0162] **면역조직화학 및 면역형광 염색.** 형질도입된 T 세포의 시험관내 조사를 위해, PBS를 사용하여 배양된 T 세포를 2회 세척하였고 37°C에서 15분 동안 PBS 중의 2 μM 파 레드(Far Red) DDAO-SE 셀트레이스(CellTrace) 염료 (Molecular Probe)에 재현탁하였다. 그 다음, 세포를 배양 배지로 2회 세척하였고 유리 슬라이드 상에서 세포원심분리하였다. 공초점 현미경관찰(Zeiss)(Optical Imaging Core facility, Harvard NeuroDiscovery Center)을 이용하여 ZsGreen 공발현을 가진 파 레드 미리-염색된 CART 세포를 가시화하였다.

[0163] 제자리 종양 층 내의 형질도입된 T 세포의 사멸 효과를 조사하기 위해, ApopTag 퍼록시다제 제자리 아폽토시스 검출 키트(Millipore)를 위한 동결된 박편용으로 종양을 준비하였다. 냉동박편을 1시간 동안 TdT 효소 (Millipore)와 함께 항온처리하였다. 토끼 항-DIG(Dako)를 첨가하였고 30분 동안 항온처리한 후, Cy3-접합된 항-토끼 항체(Invitrogen)를 첨가하였고 30분 동안 항온처리하였다. 박편을 DAPI 안티페이드(antifade) 마운팅 배지로 마운팅하였고 공초점 현미경관찰을 이용하여 형광 영상을 조사하였다.

[0164] 이종이식물 종양 및 마우스 비장을 회수하였고 10% 포르말린/PBS 용액에서 고정시켰고 하바드 의과대학 설치류 조직병리학 핵심 시설(Harvard Medical School, Rodent Histopathology Core Facility)에 제출하였다. 파라핀-매립된 박편을 자일렌으로 탈왁싱하였고 염색 전에 등급화된 알코올을 통해 재수화하였다. 1시간 동안 일차 항체로서 항-인간 그랜자임 B 항체(Dako, 클론 GrB-7(1:200))와 함께 항온처리한 후, 30분 동안 이차 항-토끼 항체(Pierce) 또는 항-마우스 항체(Dako)와 함께 항온처리함으로써 면역조직화학 염색을 수행하였다. DAB 기질을 사용하여 박편을 현상하였고 혜마톡실린으로 반대염색하였다.

[0165] 한 실시양태에서, 고정된 종양을 파라핀-매립시켰고 4-마이크로미터로 박편화하였고 슬라이드 상에 배치하였고 IHQ를 위해 준비하였다. 조직을 항-인간 Ki67(벡터, VP-K451), PD-L1(클론 405.9A11, 고든 프리만(Gordon Freeman) 박사의 실험실에서 제조됨), 그랜자임 B(Abcam, ab4059) 또는 NCAM(CD56)(Abcam, ab133345) 항체로 염색한 후, 이차 HRP-접합된 항-토끼 Ab 또는 HRP-아비딘으로 염색하였다. DAB를 사용하여 슬라이드를 현상하였고 혜마톡실린으로 반대염색하였다. DP71 디지털 카메라(Olympus)를 이용하여 올림푸스 BX51 현미경관찰에서 영상을 수득하였고 DP 제어기 소프트웨어(Olympus)에서 분석하였다. 문현(Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. PLoS one. 2014;9:e96801)에 기재된 ImageJ 소프트웨어의 IHC 프로파일러 플러그인(IHC Profiler Plugin)을 이용하여 영상 정량을 수행하였다.

통계학적 분석

[0166] 양측의 스튜던트 t-검정을 이용하여 통계학적 유의성을 측정하였다.

[0168] 한 실시양태에서, ANOVA 및 Tukey 사후검정을 이용하여 데이터의 통계학적 유의성을 평가하였다. P<0.05는 유의한 것으로서 간주되었다. IBM SPSS 통계학적 소프트웨어 버전 20을 이용하여 통계학적 분석을 수행하였다.

실시예 2: 항-CAIX 항체의 ADCC 매개 사멸 및 CAR 표적화 모이어티의 선택

[0169] 본 발명자들은 그들의 에피토프 맵핑, 발현 수준 및 CAIX을 내재화하는 능력 면에서 상이한 고친화성 인간 항-CAIX 항체의 패널에 대해 이미 보고하였다²³. 본 발명자들의 첫 번째 목적은 CAR 구축을 위한 후보로서 이들 항-CAIX 단일-쇄 항체들 중 5개의 항-CAIX 단일-쇄 항체들의 항-종양 활성을 조사하는 것이었다. 항-CAIX mAb 매개 ADCC에 대해 시험하기 위해, scFv를 scFv-Fc(hIgG1) 미니바디로 전환시켰다²³. 본 발명자들은 모든 scFv-Fc들이 항원 특이적 종양 용해를 나타내었다는 것을 발견하였다. 높은 CAIX+ 발현을 가진 종양 세포주 sk-rc-09의 경우, 특이적 용해는 40% 내지 57%였고, 중간 CAIX+ 발현을 가진 sk-rc-52의 경우, 특이적 용해는 46% 내지 60%이었고, 이때 CAIX- 종양 세포주 sk-rc-59에 대한 용해의 배경 수준은 5% 미만이다. 음성 대조군 scFv-Fc, 예컨대, 항-CXCR4 48-Fc²³ 및 항-SARS 11A-Fc²⁴의 경우, 단지 배경 수준의 세포 용해가 관찰되었다(도 1). ADCC 사멸 및 다른 공개된 분석을 근거로, scFvG36을 CAR 표적화 모이어티로서 추가 평가하기 위해 선택하였다.

[0171] **CAIX 특이적 키메라 수용체의 구축 및 발현.** 항-CAIX CAR의 두 세대를 구축하였다: CD8, 절단된 세포외, 힌지 및 경막 도메인 플러스 TCR ζ의 신호전달 도메인에 연결된 scFvG36을 가진 제1세대 G36 CD8 CAR(G36-CD8z). 보조자극 신호를 전달하기 위해, CD28의 절단된 세포외, 경막 및 세포내 도메인 플러스 TCR ζ의 신호전달 도메인

에 융합된 scFvG36으로 구성된 제2세대 CD28 CAR(G36-CD28z)을 생성하였다(도 2a). 항-HIV CCR5(클론 A8) scFv를 대신 사용하여 무관한 제2세대 CD28 CAR을 제조하였다²⁵. 이를 구축물들의 발현을 검출하기 위해, scFv와 CD8 또는 CD28 도메인 사이에 인간 로돕신 C9 태그를 삽입하였고, IRES 서열 후 ZsGreen이 발현되었다. 고농도의 바이러스 스톡을 293T 세포 내로의 벡터 플라스미드의 공형질감염에 의해 시험된 상이한 구축물들 사이에 필적가능한 수준에서 수득되었다(데이터는 제시되어 있지 않음).

[0172] 형질도입을 위해, PHA 미토겐(mitogen)을 사용하여 3일 동안 말초혈 램프구를 자극하였다. 양이온성 시약 DEAE가 폴리브렌과 비교될 때 1.5배 내지 2배의 형질도입률을 증가시켰기 때문에, 농축된 렌티바이러스 상청액을 사용하여 양이온성 시약 DEAE의 존재 하에서 인간 일차 T 세포를 감염시켰다(데이터는 제시되어 있지 않음). 일차 T 세포의 형질도입률은 FACS 분석에서 ZsGreen 발현에 의해 17% 내지 45%이었다. 렌티바이러스 형질도입 후 일차 CART 세포에 의한 약 25%의 ZsGreen 발현을 보여주는 대표적인 실험은 도 2b의 좌측 컬럼에 제시되어 있다. CAIX-Fc 융합 단백질은 G36-CD8z 및 -CD28z CART 세포에 결합할 수 있으나 대조군 A8-CD28z CART 세포에는 결합할 수 없다(도 2b, 중간 컬럼). mAb 1D4가 내부 폴리펩티드 서열에 비해 카복시-말단으로서 제시되었을 때(데이터는 제시되어 있지 않음) 로돕신 노나펩티드 C9를 우선적으로 인식한다는 발견과 관련되어 있을 가능성이 높은 CAIX-Fc 단백질의 약 3분의 1 수준에서 C9-태그 발현만이 검출되었다(도 2b, 우측 컬럼). 6주 동안 시험관내에서 배양된 형질도입된 세포는 그의 ZsGreen 발현을 유지하였다.

[0173] 환원 조건 하의 웨스턴 블롯 상에서, G36 및 A8 CD28z CAR들은 약 53 kD의 몰 중량으로 이동한 반면, 내생성 TCR ζ 는 16 kDa이었다. G36-CD8z CAR은 약 48 kD의 몰 중량으로 이동하였다. 비환원 조건 하에서, 이를 2개의 CD28z CAR들은 동종이량체를 형성하였다(도 2c, CD8z CAR의 데이터는 제시되어 있지 않음).

실시예 3: CAIX+ 종양과의 접촉 시 형질도입된 T 세포에 의한 향상된 사이토카인 분비

[0175] MHC 제시를 우회하고 제1세대 G36-CD8z CART 세포에 비해 T 세포 이펙터 기능을 향상시키기 위해 보조자극 분자 CD28의 신호전달 성분을 포함하는 제2세대 G36-CD28z CART 세포 사용의 보고된 뛰어난 효과를 비교하기 위한 연구를 수행하였다. 도 3a에서 관찰된 바와 같이, CAIX+ sk-rc-52 세포와 함께 밤새 항온처리한 후, 대조군 A8 CD28z CART 세포 또는 LAK 세포 단독의 사용 시 낮은 수준의 I형 사이토카인 IL-2, IFN γ 및 IL-17 분비만이 관찰되었다. 대조적으로, 제1세대 G36 발현 CART 세포 및 제2세대 G36 발현 CART 세포 둘 다가 제1세대 G36-CD8z CART 세포에 비해 그의 보다 높은 활성화 상태를 반영하는 보다 높은 양의 I형 사이토카인을 분비하는 제2세대 G36-CD28z CART 세포에 의한 상승된 수준의 사이토카인 분비를 보였다. 구체적으로, G36-CD28z CART 세포는 G36-CD8z CART 세포보다 각각 6.5배, 2.3배 및 4배 더 많은 IL-2, IFN γ 및 IL-17을 분비하였다. 상기 2종의 G36 CART 세포들에 의한 사이토카인 분비 유도의 특이성은 CAIX- sk-rc-59 세포를 사용한 그들의 최소 자극에 의해 관찰된다.

[0176] Elispot 연구에서, CAIX+ sk-rc-52 종양과의 상호작용 후, G36-CD28z CART 세포는 고성능 IFN- γ 생성 세포가 되었다(도 3b). G36-CD28z CART 세포는 CAIX+ sk-rc-52 종양 세포와의 상호작용 시 G36-CD8z CART 세포에 대해 관찰된 점보다 6배 더 많은 점을 생성하였고 CAIX- sk-rc-59 종양 세포와의 상호작용 후 관찰된 점보다 12배 더 많은 점을 생성하였다. 유사하게, G36-CD28z CART 세포는 G36-CD8z CART 세포 및 대조군 T 세포에 비해 CAIX+ 종양과의 접촉 후 보다 높은 양의 그랜자임 B-분비 점을 가졌다. PMA 및 이오노마이신(ionomycin)은 T 세포를 자극하여, 가장 많은 양의 IFN- γ 및 그랜자임 B 분비 T 세포를 생성하였다. 이를 연구들은 CAIX+ 종양 세포와의 접촉에 의해 활성화되는 G36-CD28z CART 세포의 특이성 및 고성능 둘 다를 입증한다.

실시예 4: 형질도입된 T 세포에서 CAR 신호전달을 통한 특이적 세포독성

[0178] 상이한 G36 CART 세포의 사멸 활성을 더 평가하기 위해 시험관내 세포독성 어세이를 확립하였다. 상이한 비의 이펙터-대-표적을 사용하여, G36-CD28z CART 세포 및 그의 2회 생체내 계대배양된 서브클론 4-1은 가장 많은 양의 CAIX+ 종양 sk-rc-52 세포용해를 나타내었다(도 3c). 25:1 초과의 높은 비를 사용하였을 때, G36-CD28z CART 세포는 G36-CD8z CART 세포보다 2배 내지 3배 더 높은 세포독성을 보였고, 5:1의 낮은 비를 사용하였을 때, G36-CD28z CART 세포는 G36-CD8z CART 세포보다 8배 내지 9배 더 높은 용해를 보였다. 그러나, G36-CD8z CART 세포는 100:1의 E:T 비를 사용하였을 때 최대 60% 초과의 종양 용해로 여전히 우수한 세포독성을 나타내었다. 무관한 A8-CD28z CART 세포 및 대조군 T 세포 LAK는 가장 높은 100:1의 E:T 비를 사용하였을 때 약 20% 용해로 배경 비-특이적 종양 용해를 보였다. CAIX- 종양 sk-rc-59를 사용하는 모든 경우들에서, 형질도입된 T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포는 배경 용해를 보였다.

실시예 5: 연장된 CAIX+ 종양을 가진 CART 세포에서 개선된 시험관내 증식

[0180]

단기간 CAIX+ 종양 세포 접촉 시 항상된 사이토카인 분비 및 세포독성 이외에, CAR 구축물 내로의 CD28 보조자극 분자의 도입은 항원 특이적 종양 세포와의 연장된 접촉 시 개선된 증식을 입증하였다. 형질도입되지 않은 T 세포 및 형질도입된(약 20%) T 세포를 100 유닛/ml 인간 IL-2의 존재 하에서 주마다 새로 방사선조사된 종양 세포와 혼합하였다. 고정된 양의 T 세포에서 상이한 수준의 항원 자극을 시험하기 위해, 본 발명자들은 1:8, 1:4 및 1:2의 종양 세포 대 T 세포 비를 사용하였다. T 세포 수를 트립판 배제로 카운팅하였고 CART 세포 분획을 유세포측정으로 조사하였다. CAIX- sk-rc-59 종양 세포를 사용한 배양 하에서, 형질도입된 T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포의 수는 유지되었다(도 4a 하부). 기저 수준의 대조군 T 세포 증식의 결여는 종양 세포주에 의해 분비된 다량의 억제성 사이토카인에 기인할 것이다. 대조적으로, CAIX+ sk-rc-52 종양 세포와 함께 2주 동안 배양한 후, 1:8의 비에서 G36-CD28z CART 세포의 집단은 30배까지 증가되었고 G36-CD8z CART 세포는 17배까지 증식된 반면, 1:4의 비에서 G36-CD28z CART 세포의 수는 19배 증가되었고 G36-CD8z CART 세포는 4배 증식되었다. 다량의 종양 세포를 사용하였을 때, G36-CD28z 또는 G36-CD8z CART 세포 중 어느 세포도 증식할 수 없었다. 무관한 A8-CD28z CART 세포 및 대조군 T 세포 LAK는 종양 세포에 의한 증식을 전혀 보이지 않았다(도 4a 상부).

[0181]

증식하는 T 세포도 회수하여, CAIX+ 종양 세포 접촉 시 그의 농후화를 조사하였다. CAIX- 종양 접촉 시, 집단 내에서 임의의 CART 세포의 백분율의 변화는 없었다. 그러나, CAIX+ sk-rc-52 종양 세포와의 접촉 시, G36 CART 세포의 두 집단들에서 농후화가 있었다. G36-CD28z CART 세포의 경우, 양성 집단은 0일째 날 18%부터 8일째 날 52%까지, 그리고 16일째 날 88%까지 농후화되었다. G36-CD8z CART 세포의 발현은 0일째 날 19%(T 세포에서만 동일한 수준)부터 8일째 날 32%까지, 그리고 16일째 날 72%까지 농후화되었다. A8-CD28z CART 세포의 증폭은 2주 연구에 걸쳐 관찰되지 않았다(도 4b). CD8 세포의 백분율은 모든 조건들 하에서 16일 연구 전체에 걸쳐 일정하게 유지되었다(도 4c).

[0182]

실시예 6: 종양과의 재접촉 후 CART 세포의 지속적인 이펙터 기능

[0183]

1주 또는 2주 동안 방사선조사된 종양 세포와 접촉한 형질도입된 T 세포를 새로운 비-방사선조사된 종양 세포와 24시간 동안 접촉시킨 후 사이토카인 분비에 대해서도 시험하였다. 1주 또는 2주 동안 CAIX+ 종양(sk-rc-52)과의 접촉 시, G36-CD28z CART 세포 및 G36-CD8z CART 세포는 유사한 IFN- γ 분비 수준을 보였지만, G36-CD28z CAR을 통한 보조자극 신호전달은 G36-CD8z CAR에 대해 관찰된 IFN- γ 분비보다 2배 내지 2.5배 더 많은 IFN- γ 분비를 제공하였다(표 1). IL-2 분비를 위해, G36-CD28z CART 세포 및 G36-CD8z CART 세포에 대한 2주의 종양 접촉은 1주의 접촉보다 더 많은 IL-2 분비를 나타내었다. G36-CD28z CART 세포는 1주 접촉 시 G36-CD8z CART 세포보다 5배 더 많은 IL-2를 제공하였고 2주 동안의 접촉 시 2.5배 더 많은 IL-2를 제공하였다. 추가로, 2주 동안 종양 세포와 접촉한 G36-CD28z CART 세포는 1시간 종양 접촉보다 3.3배 더 많은 IL-2를 분비한 반면, G36-CD8z CART는 1주의 종양 접촉 후에 비해 2주 후 6.8배 더 많은 IL-2 분비를 제공하였다. 이 결과는 형질도입된 CART 세포가 제2 종양 자극 후 소진되지 않았고 기능적 활성을 유지하였다는 것을 시사한다. CAIX- sk-rc-59 세포와의 접촉 시 A8-CD28z, LAK 및 G36 CART 세포 처리의 경우 배경 수준의 INF- γ 및 IL-2 분비만이 관찰되었다.

[0184]

실시예 7: CART 세포에 의한 확립된 종양의 억제

[0185]

다음으로, 본 발명자들은 CART 세포가 유사한 종양 곡선을 제공하도록 확립된 좌측 옆구리 및 우측 옆구리 상에서 sk-rc-52 종양 세포(좌측 옆구리) 및 sk-rc-59 종양 세포(우측 옆구리)로 접종된 누드 마우스에서 확립된 종양 세포 성장을 억제하는지를 시험하였다. 약 6x6 mm의 전형적인 종양 크기를 가진 종양 이식 후 7일째 날, 5 천만 개의 G36-CD28z CART 세포, A8-CD28z CART 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포(LAK)를 정맥내로 주사하였다. 고용량 IL-2(2×10^5 IU)의 존재 하에서, 제1시험에서 n=7의 군 크기 및 제2시험에서 n=8의 군 크기를 사용한 2회 별개의 실험에서 복막내 주사를 통해 입양 T-세포 요법을 수행하였다. 종양의 성장 및 세포 요법의 효과를 비교하기 위해 T-세포 치료 부재를 포함시켰다.

[0186]

시험 1에서, 치료된 CAIX- sk-rc-59 종양 및 비치료된 CAIX- sk-rc-59 종양은 (4개의 시험된 군들 내에서) 4일째 날 6.09 ± 0.02 mm의 평균 크기를 가졌고 25일째 날 9.29 ± 0.12 mm의 평균 크기를 가졌다. 이들은 대조군 및 T-세포 치료군에서 동일한 종양 성장률을 나타내었다. T 세포를 제공받지 않은 비치료된 CAIX+ 종양은 4일째 날 6.09 ± 0.13 mm의 평균 크기 및 25일째 날 9.15 ± 0.11 mm의 평균 크기를 가지면서 CAIX- 종양과 유사한 종양 크기를 보였다. 그러나, G36-CD28z CART 세포 치료 마우스의 종양 크기는 25일 연구에 걸쳐 검사된 모든 시점에서 T-세포 비치료 마우스에 비해 크기의 통계학적으로 유의한 감소를 보였다(도 5). G36-CD28z CART 치료는 양측 t 검정에 의해 계산되었을 때 7일째 날($p<0.05$) 및 25일째 날($p<0.001$) A8-CD28z CART 세포 및 LAK 치료 마우스에서 관찰된 종양 크기의 감소보다 더 큰 종양 크기의 감소도 유발하였다. 시험 2에서, G36-CD28z

CART 세포 치료 마우스의 종양 크기는 29일 실험을 통해 T-세포 비치료 마우스의 종양 크기보다 유의하게 더 작았다. G36-CD28z CART 세포 치료 마우스는 8일째 날부터 26일째 날까지($p<0.01$) 및 29일째 날($p<0.001$) A8 CD28z CART 세포 및 LAK 치료 마우스에서 관찰된 종양보다 더 작은 종양도 가졌다(도 5).

[0187] 종양 크기가 동일한 T-세포를 제공받은 동일한 마우스에서 대조군 CAIX- 종양의 30% 부피보다 더 작았을 때 CAIX+ 종양의 부분적 퇴행이 인정되었다. 부분적 종양 퇴행은 G36-CD28z CART 세포를 사용한 사례들에서 높은 백분율로 관찰되었고(15 중 10, (67%)), 무관한 표적 A8-CD28z CART 세포(15 중 1, (7%)) 및 활성화된 T 세포 LAK(15 중 2, (13%))에서는 드물게만 관찰되었다(표 2). 부분적 퇴행 반응의 빈도는 괴색 검정에 의해 확인될 때 대조군 A8-CD28z CART 세포 및 LAK에 비해 G36-CD28z CART 세포로 치료된 마우스의 경우 통계학적으로 유의한 것으로 발견되었다(각각 $p<0.001$ 및 $p<0.005$).

[0188] 실시예 8: CART 세포에 의한 제자리 세포독성

[0189] 생체내 연구를 위해 사용된 형질도입된 T 세포의 전체 집단의 샘플을 과 레드 염료로 미리 염색하였고 상기 집단 내에서 ZsGreen 단백질을 발현하는 CART 세포를 공초점 현미경관찰로 분석하였다. 이 결과는 본 발명자들의 FACS 분석과 일치하는 약 30% 형질도입 효율을 입증하였다(도 6a).

[0190] 생체내에서 CAIX+ sk-rc-52 종양 세포의 G36-CD28z CART 세포 치료가 아폽토시스에 의한 사멸을 야기하였다는 증거를 제공하기 위해, 종양 박편을 터널(Tunne1) 어세이로 염색하였다. 입양 T 세포 치료 후 3일째 날, 터널 염색은 종양의 가장자리(도 6b 상부 열) 및 종양 층의 내부(도 6b 중간 열)에서 아폽토시스성 종양 세포(적색)를 확인시켜주었다. 아폽토시스성 종양 세포는 DAPI 핵 염색을 상실하였다. 아폽토시스를 겪고 있는 2개의 종양 세포와 상호작용하는 ZsGreen 발현 CART 세포는 확대된 그래프에 표시되어 있다(도 6b 하부 열).

[0191] 형광 신호의 한정으로 인해, ZsGreen 발현 CART 세포는 전체 조직 박편으로부터 관찰될 수 없었다. 따라서, G36-CD28z CART 세포 또는 LAK 처리 후 3일째 날, 종양을 회수하였고 박편을 그랜자임 B 항체로도 염색하여 활성화된 T 세포의 위치를 확인하였다. 도 6c에서, 암갈색 염색 영역은 CAIX+ sk-rc-52 종양 박편 내로 침윤하는 것으로 관찰된 그랜자임 B+ T 세포를 보여준다(도 6c 상부 좌측). 종양 주변(도 6c 상부 좌측(a) 및 중간) 및 종양 내부(도 6c 상부 좌측(b) 및 하부)에서 이 그랜자임 B+ T 세포가 관찰되었다. 괴사 영역을 가진 종양은 H&E 염색된 슬라이드에서 보여졌고(도 6c 우측 중간 및 하부 내에서 n으로서 표지됨) 그랜자임 B+ T 세포에 가까운 위치에 놓여 있었다. 대조적으로, 대조군 활성화된 T 세포(LAK)로 처리된 CAIX+ sk-rc-52 종양(도 7)은 임의의 그랜자임 B+ T 세포를 보이지 않았다. 유사하게, G36-CD28z CART 세포로 처리되었거나(도 8) LAK로 처리된(도 9) CAIX- sk-rc-59는 낮은 배경 염색을 보인 반면, 종양은 증식하였다. 그랜자임 B 염색의 양성 대조군을 위해, CART 세포를 마우스 내의 확립된 sk-rc-52 종양 내로 국소적으로 주사하였다. 1일 후, 마우스를 희생시켰고 이 염색을 위해 종양 조직을 박편화하였다(도 10).

[0192]

[표 1]

종양 세포와의 1주 또는 2주 접촉 후 사이토카인 분비*				
RC-SK-52 (CAIX+) 세포				
CART 세포	IFN- γ (pg/ml)		IL-2 (pg/ml)	
	1주	2주	1주	2주
G36-CD28z	25,788	28,192	7,524	24,937
G36-CD8z	13,096	10,961	1,470	10,029
A8-CD28z	55	55	9	13
LAK	68	58	9	13
RC-SK-59 (CAIX-) 세포				
G36-CD28z	31	29	5	4
G36-CD8z	27	38	8	10
A8-CD28z	56	55	7	8
LAK	49	56	10	8

*- 형질도입된 T 세포를 방사선조사된 종양 세포와 함께 1주 또는 2주 동안 항온처리한 후, 회수하고 세척하였고 새로운 비-방사선조사된 종양 세포와 함께 밤새 항온처리하였고, 사이토카인 분석을 위해 24시간 후 상청액을 수집하였다. 종양 세포와 상호작용하지 않은 T 세포 배양물의 경우, 단지 배경 수준의 사이토카인이 <50 pg/ml IFN- γ 및 <10 pg/ml IL-2의 수준에서 검출하였다.

[0193]

[0194]

[표 2]

G36-CD28z CART 세포에 의한 CAIX+ 종양의 부분적 퇴행의 빈도				
유전자 구축물	LAK	A8-CD28z	G36-CD28z	통계학
표적 항원	부재	무관함	특이적	
보조자극	부재	2 개 신호	2 개 신호	
부분적 반응	2	1	10	$p<0.005^*$; $p<0.001^{**}$
비-부분적 반응	13	14	5	N.S.

도 5에 보고된 실험으로부터의 마우스(실험 1, n = 7 & 실험 2, n = 8)를 10일째 날에 반응에 대해 점수화하였다. 부분적 반응은 종양이 대조군 종양의 30% 부피보다 더 작은 정도까지 퇴행되는 것으로서 정의된다(sk-rc-52의 좌측 옆구리 및 대조군 종양 sk-rc-59의 우측 옆구리를 가진 동일한 마우스에서의 동일한 T-세포 치료)

피셔 검정 결과 - * G36-CD28z 대 LAK; ** G36-CD28z 대 A8-CD28z; N.S. - 종양의 수와, LAK로 형질도입된 T 세포와 A8-CD28z로 형질도입된 T 세포 사이의 부분적 반응 사이의 통계학적으로 유의한 관계의 부재

[0195]

[0196]

참고문헌

1. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001; 158(3): 905-19.
2. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC et al. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer research* 2001; 61(17): 6394-9.
3. Hilvo M, Baranauskiene L, Salzano AM, Scaloni A, Matulis D, Innocenti A et al. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem* 2008; 283(41): 27799-809.
4. Oosterwijk E, Ruiter DJ, Hoedemaeker PJ, Pauwels EK, Jonas U, Zwartendijk J et al. Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 1986; 38(4): 489-94.
5. Liao SY, Brewer C, Zavada J, Pastorek J, Pastorekova S, Manetta A et al. Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas. *Am J Pathol* 1994; 145(3): 598-609.
6. Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer research* 1997; 57(14): 2827-31.
7. Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(10): 3714-21.
8. Lokich J. Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review. *Am J Clin Oncol* 1997; 20(4): 416-8.
9. Chang AE, Li Q, Jiang G, Sayre DM, Braun TM, Redman BG. Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(5): 884-90.
10. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002; 298(5594): 850-4.
11. Schaft N, Willemse RA, de Vries J, Lankiewicz B, Essers BW, Gratama JW et al. Peptide fine specificity of anti-glycoprotein 100 CTL is preserved following transfer of engineered TCR alpha beta genes into primary human T lymphocytes. *J Immunol* 2003; 170(4): 2186-94.

[0197]

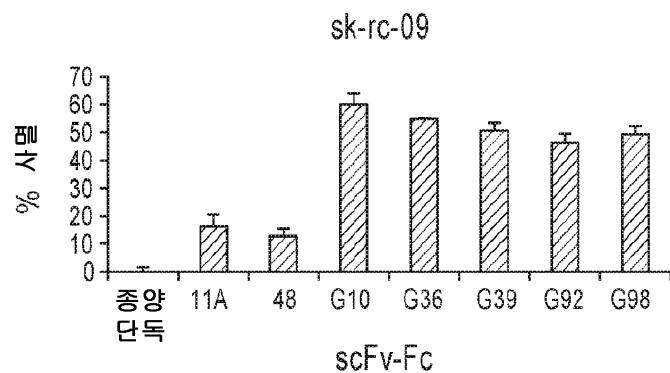
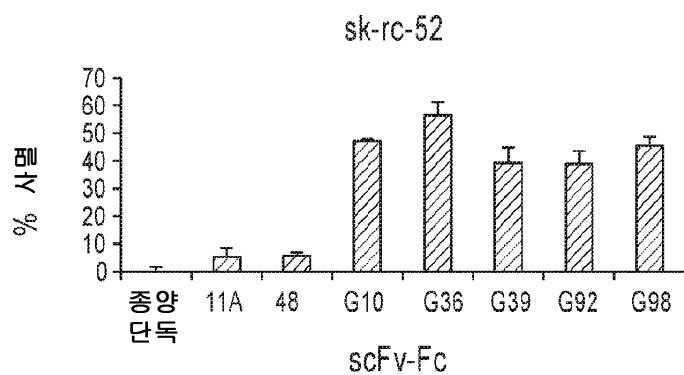
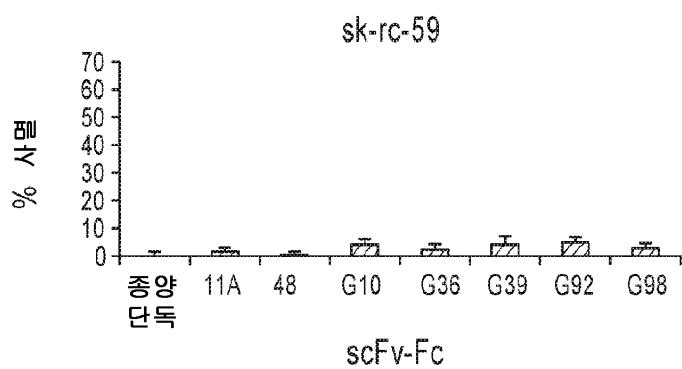
12. Bubenik J. MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *International journal of oncology* 2004; 25(2): 487-91.
13. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunological reviews* 2006; 213: 131-45.
14. Frigola X, Inman BA, Lohse CM, Krco CJ, Cheville JC, Thompson RH et al. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17(7): 1915-23.
15. Grepin R, Guyot M, Giuliano S, Boncompagni M, Ambrosetti D, Chamorey E et al. The CXCL7/CXCR1/2 axis is a key driver in the growth of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer research* 2014; 74(3): 873-83.
16. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 2009; 21(2): 215-23.
17. Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2013; 21(4): 904-12.
18. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2009; 17(8): 1453-64.
19. Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies DM, Julien S, Cooper L et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol* 2008; 180(7): 4901-9.
20. Lo AS, Ma Q, Liu DL, Junghans RP. Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16(10): 2769-80.
21. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science translational medicine* 2011; 3(95): 95ra73.
22. Pegram HJ, Park JH, Brentjens RJ. CD28z CARs and armored CARs. *Cancer J* 2014; 20(2): 127-33.
23. Xu C, Lo A, Yammanuru A, Tallarico AS, Brady K, Murakami A et al. Unique biological properties of catalytic domain directed 인간 항-CAIX antibodies discovered through phage-display technology. *PloS one* 2010; 5(3): e9625.

[0198]

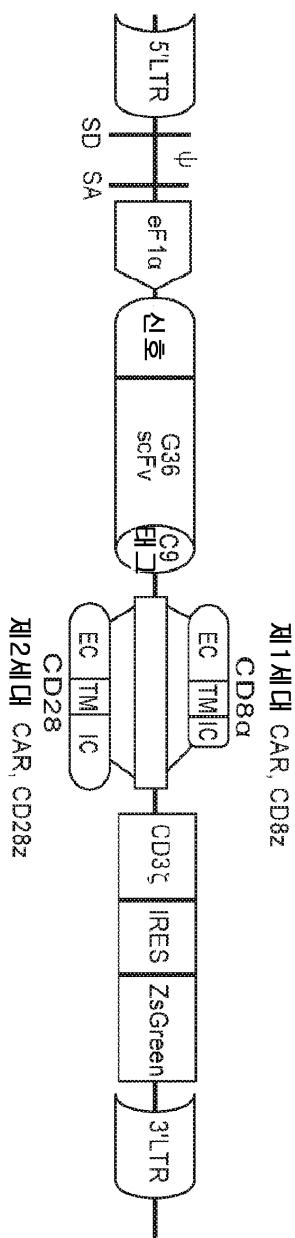
24. Sui J, Aird DR, Tamin A, Murakami A, Yan M, Yammanuru A *et al.* Broadening of neutralization activity to directly block a dominant antibody-driven SARS-coronavirus evolution pathway. *PLoS pathogens* 2008; 4(11): e1000197.
25. Mirzabekov T, Kontos H, Farzan M, Marasco W, Sodroski J. Paramagnetic proteoliposomes containing a pure, native, and oriented seven-transmembrane segment protein, CCR5. *Nat Biotechnol* 2000; 18(6): 649-54.
26. Wald O, Weiss ID, Wald H, Shoham H, Bar-Shavit Y, Beider K *et al.* IFN-gamma acts on T cells to induce NK cell mobilization and accumulation in target organs. *J Immunol* 2006; 176(8): 4716-29.
27. Zeytin H, Reali E, Zaharoff DA, Rogers CJ, Schлом J, Greiner JW. Targeted delivery of murine IFN-gamma using a recombinant fowlpox virus: NK cell recruitment to regional lymph nodes and priming of tumor-specific host immunity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2008; 28(2): 73-87.
28. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* 2009; 183(7): 4169-75.
29. Bar E, Whitney PG, Moor K, Reis e Sousa C, LeibundGut-Landmann S. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. *Immunity* 2014; 40(1): 117-27.
30. Hinrichs CS, Kaiser A, Paulos CM, Cassard L, Sanchez-Perez L, Heemskerk B *et al.* Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood* 2009; 114(3): 596-9.
31. Hombach AA, Rappl G, Abken H. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation". *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2013; 21(12): 2268-77.
32. Mor F, Cohen IR. IL-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. Correlation with induction of Bcl-2. *J Immunol* 1996; 156(2): 515-22.
33. Isakov N, Altman A. PKC-theta-mediated signal delivery from the TCR/CD28 surface receptors. *Frontiers in immunology* 2012; 3: 273.
34. Loskog A, Giandomenico V, Rossig C, Pule M, Dotti G, Brenner MK. Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells. *Leukemia* 2006; 20(10): 1819-28.
35. Schwarzer A, Wolf B, Fisher JL, Schwaab T, Olek S, Baron U *et al.* Regulatory T-cells and associated pathways in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients undergoing DC-vaccination and cytokine-therapy. *PloS one* 2012; 7(10): e46600.

[0199]

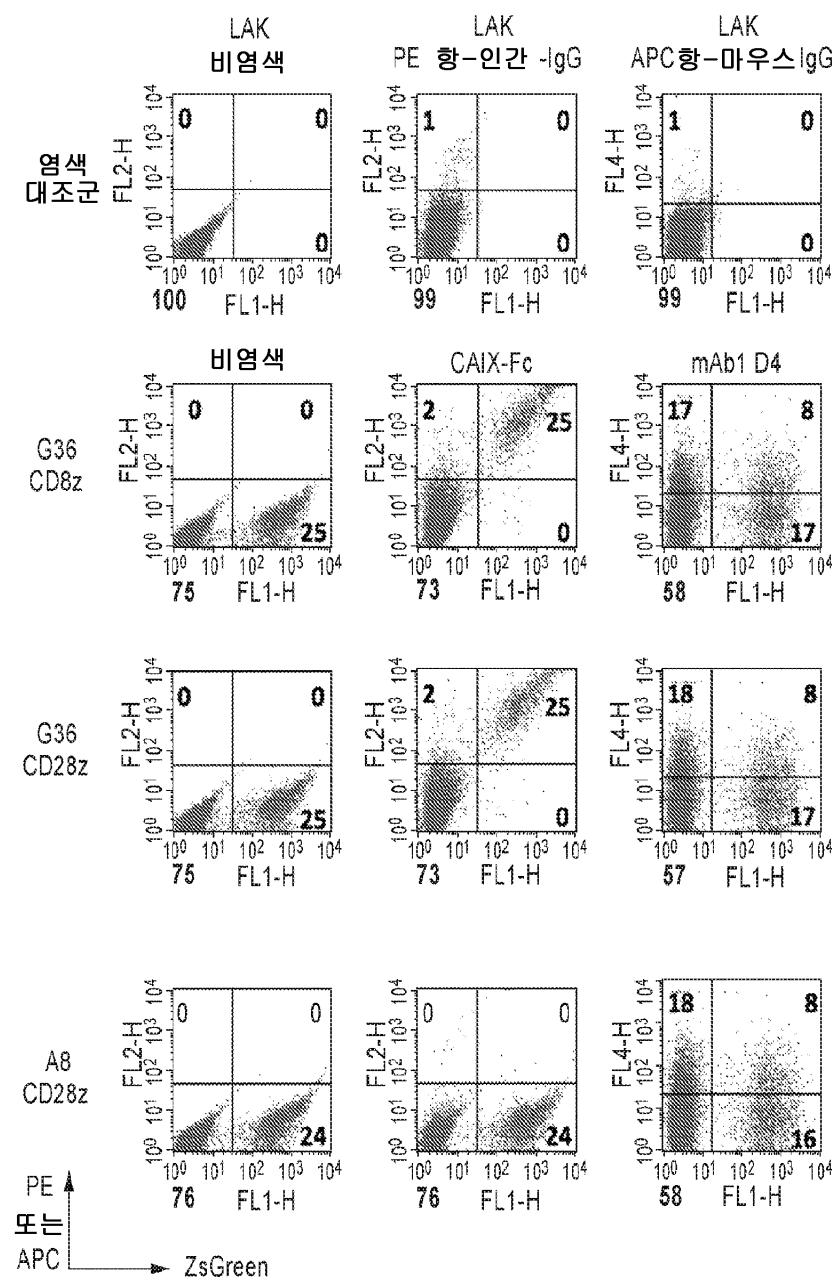
36. Lamers CH, Willemse R, van Elzakker P, van Steenbergen-Langeveld S, Broertjes M, Oosterwijk-Wakka J *et al.* Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells. *Blood* 2011; 117(1): 72-82.
37. Miotti S, Negri DR, Valota O, Calabrese M, Bolhuis RL, Gratama JW *et al.* Level of anti-mouse-antibody response induced by bi-specific monoclonal antibody OC/TR in ovarian-carcinoma patients is associated with longer survival. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 1999; 84(1): 62-8.
38. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20 Pt 1): 6106-15.
39. Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy. *Cancer Therapy* 2004; 2: 245-262.
40. Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK, Opavsky R, Zelnik V, Saarnio J *et al.* Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* 1997; 112(2): 398-408.
41. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Waheed A, Casey MC, Zhou XY *et al.* Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1998; 46(4): 497-504.
42. Zavadova J, Zavadova Z, Zat'ovicova M, Hyrsil L, Kawaciuk I. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2003; 89(6): 1067-71.
43. Hombach A, Koch D, Sircar R, Heuser C, Diehl V, Kruis W *et al.* A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene Ther* 1999; 6(2): 300-4.
44. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhal M, Suhoski MM *et al.* Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106(9): 3360-5.
45. Gill S, Tasian SK, Ruella M, Shestova O, Li Y, Porter DL *et al.* Efficacy against human acute myeloid leukemia and myeloablation of normal hematopoiesis in a mouse model using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood* 2014.
46. Hombach AA, Heiders J, Poppe M, Chmielewski M, Abken H. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells. *Oncimmunology* 2012; 1(4): 458-466.
- [0200]
47. Song DG, Ye Q, Carpenito C, Poussin M, Wang LP, Ji C *et al.* In vivo persistence, tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB). *Cancer research* 2011; 71(13): 4617-27.
48. Bedke J, Stenzl A. Immunotherapeutic strategies for the treatment of renal cell carcinoma: where are we now? *Expert review of anticancer therapy* 2013; 13(12): 1399-408.
49. Bailey A, McDermott DF. Immune checkpoint inhibitors as novel targets for renal cell carcinoma therapeutics. *Cancer J* 2013; 19(4): 348-52.
50. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 2002; 20(1): 70-5.
- [0201]
- [0202] 다른 실시양태
- [0203] 본 발명은 그의 상세한 설명과 함께 기재되어 있지만, 상기 설명은 예시하기 위한 것이고 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 한정하기 위한 것이 아니다. 다른 양태, 장점 및 변경은 하기 청구범위 이내에 있다.

도면**도면1a****도면1b****도면1c**

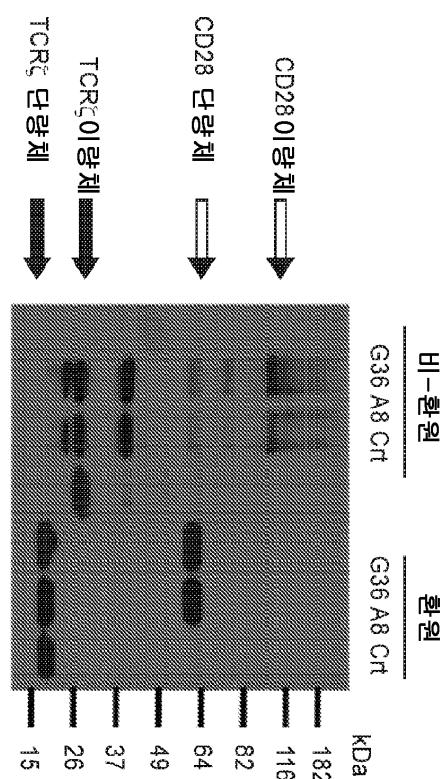
도면2a



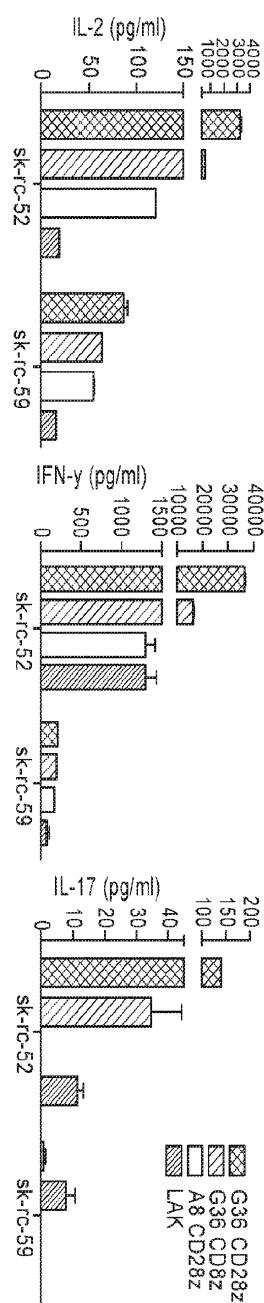
도면2b



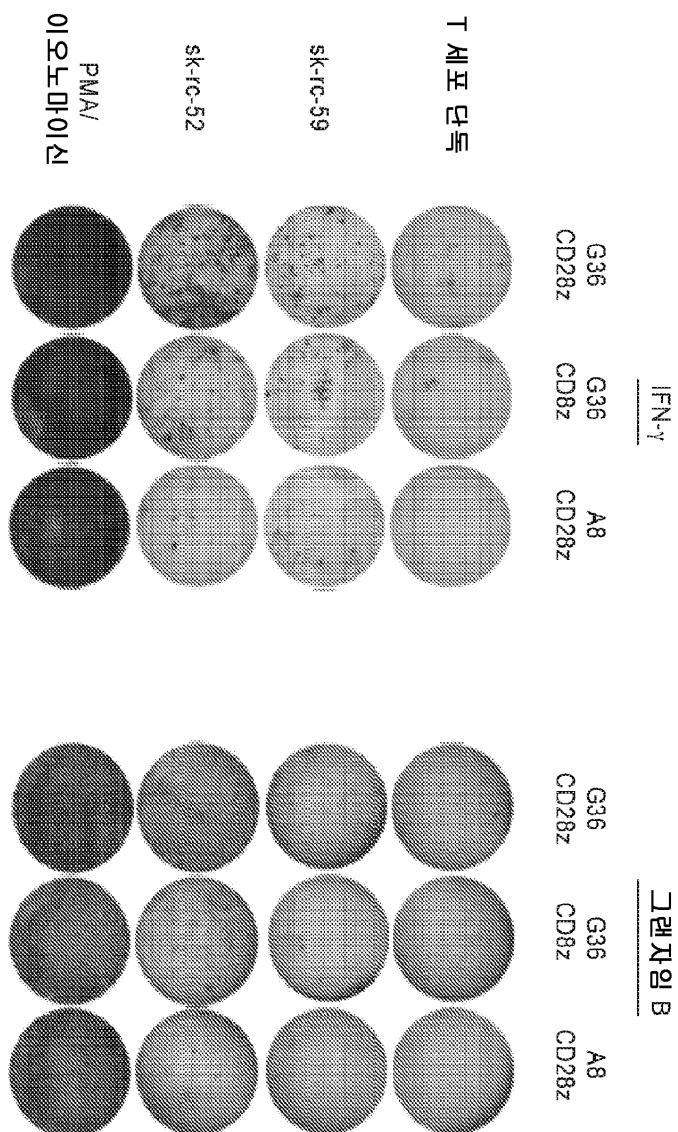
도면2c



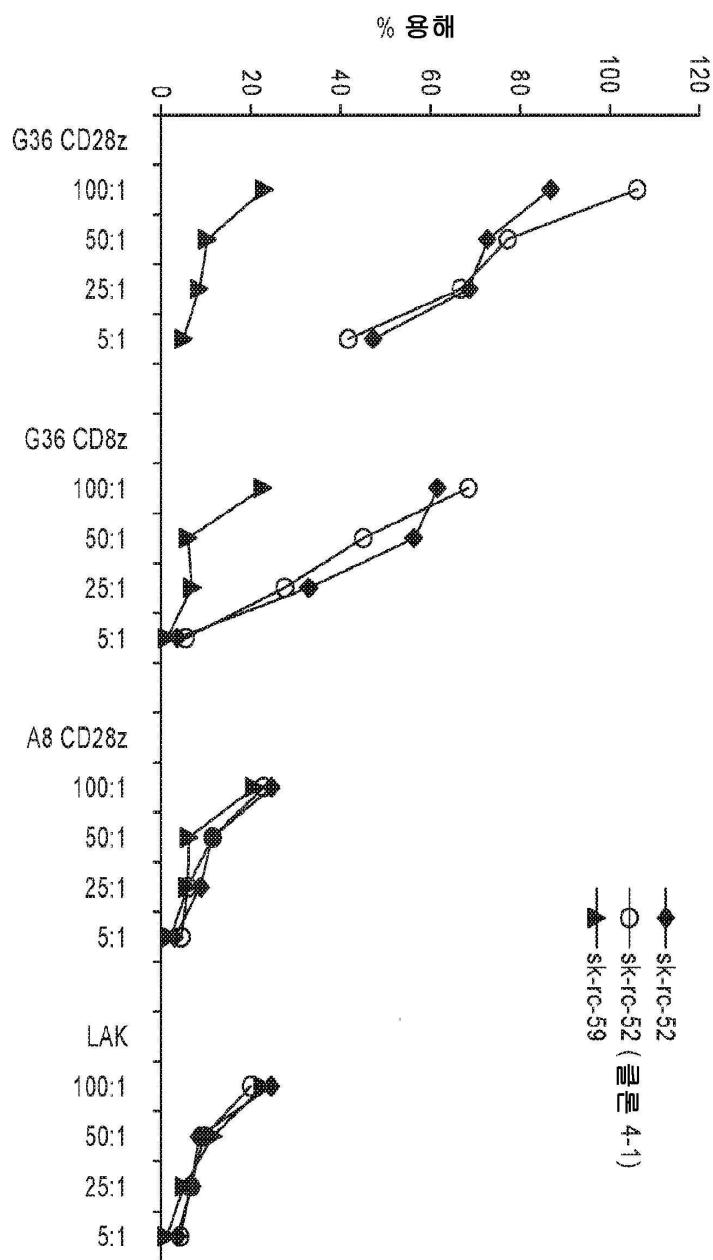
도면3a



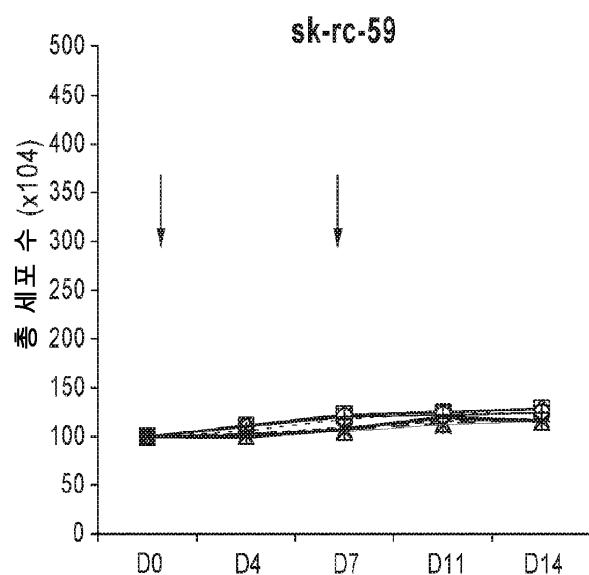
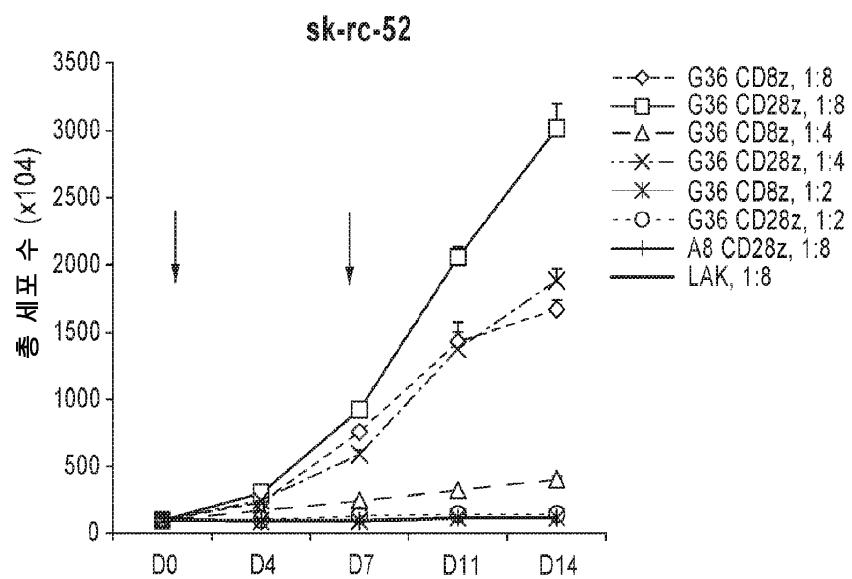
도면3b



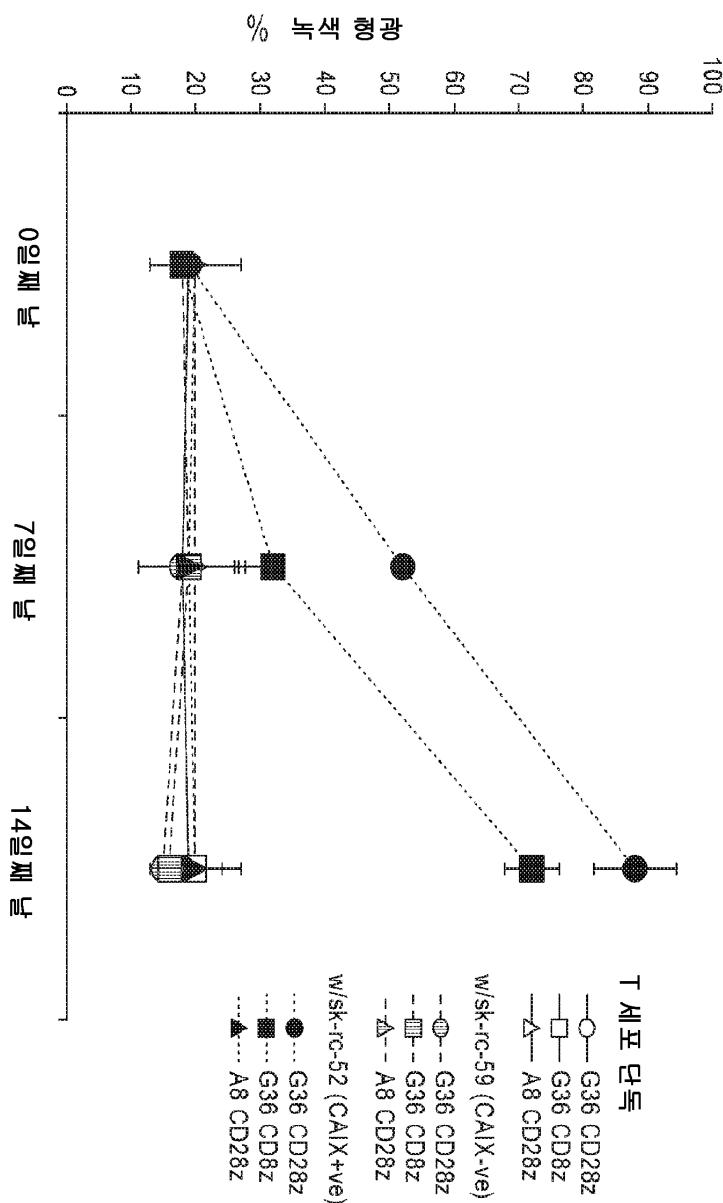
도면3c



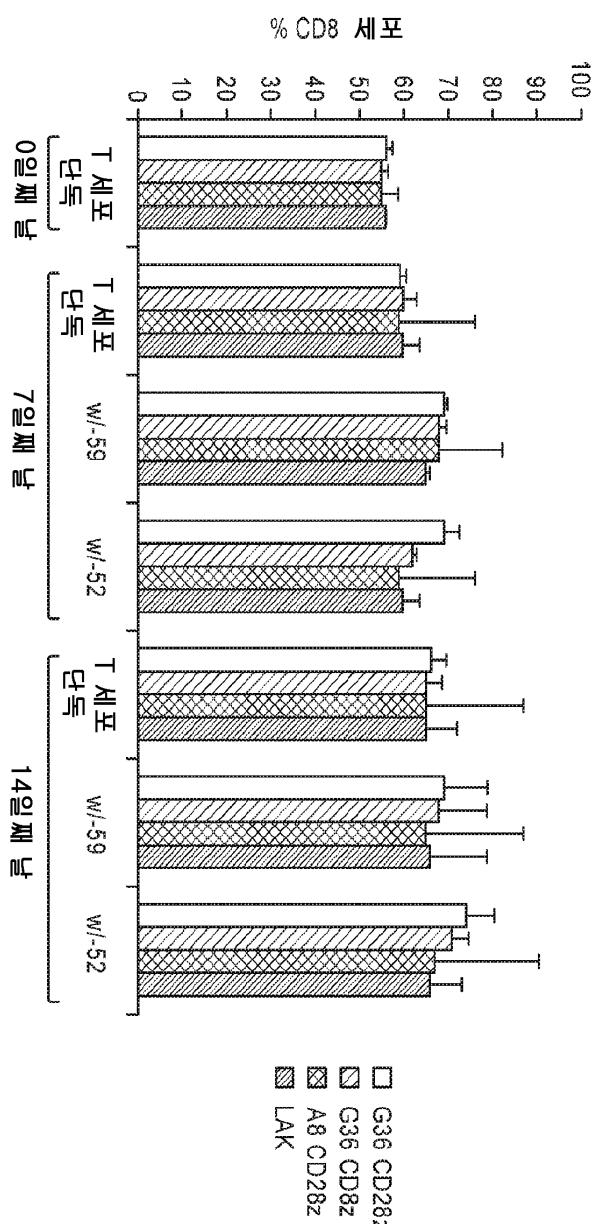
도면4



도면4b

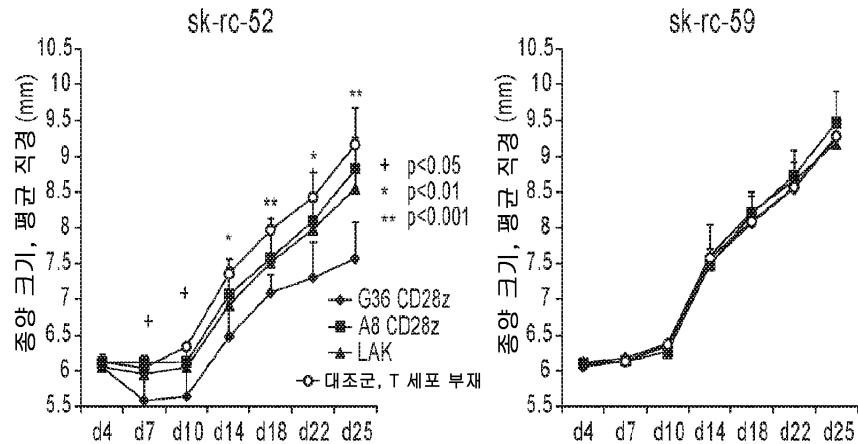


도면4c

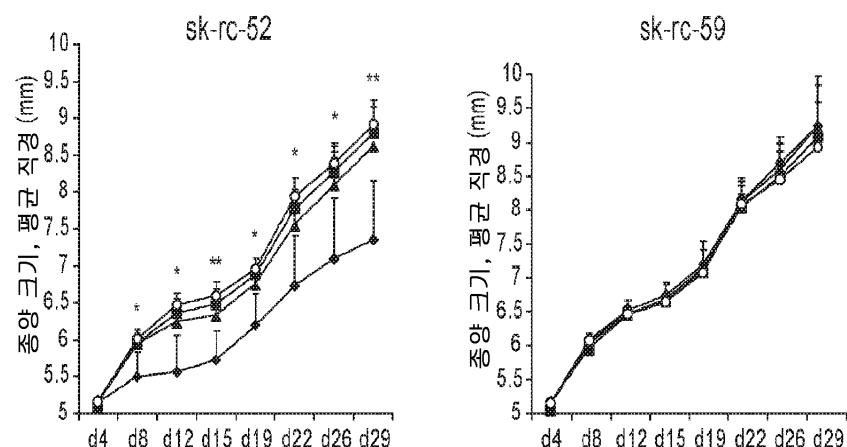


도면5

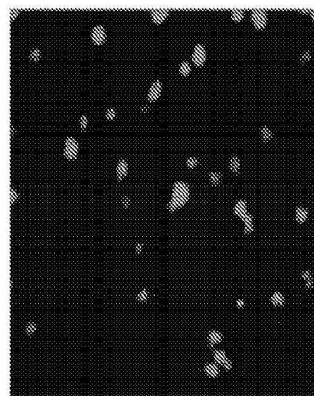
실험 1



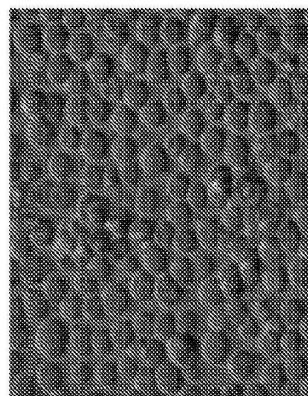
실험 2



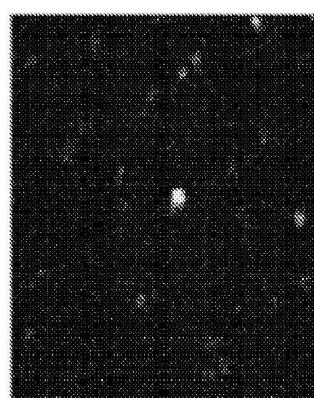
도면6a



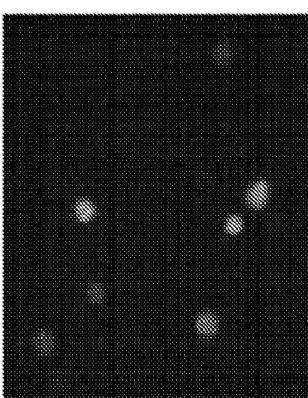
미리 염색된 T 세포



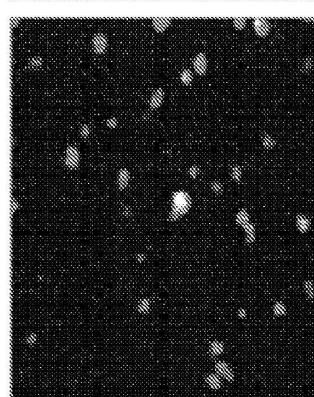
위상자



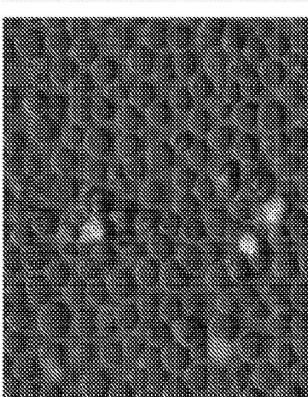
ZsGreen



ZsGreen

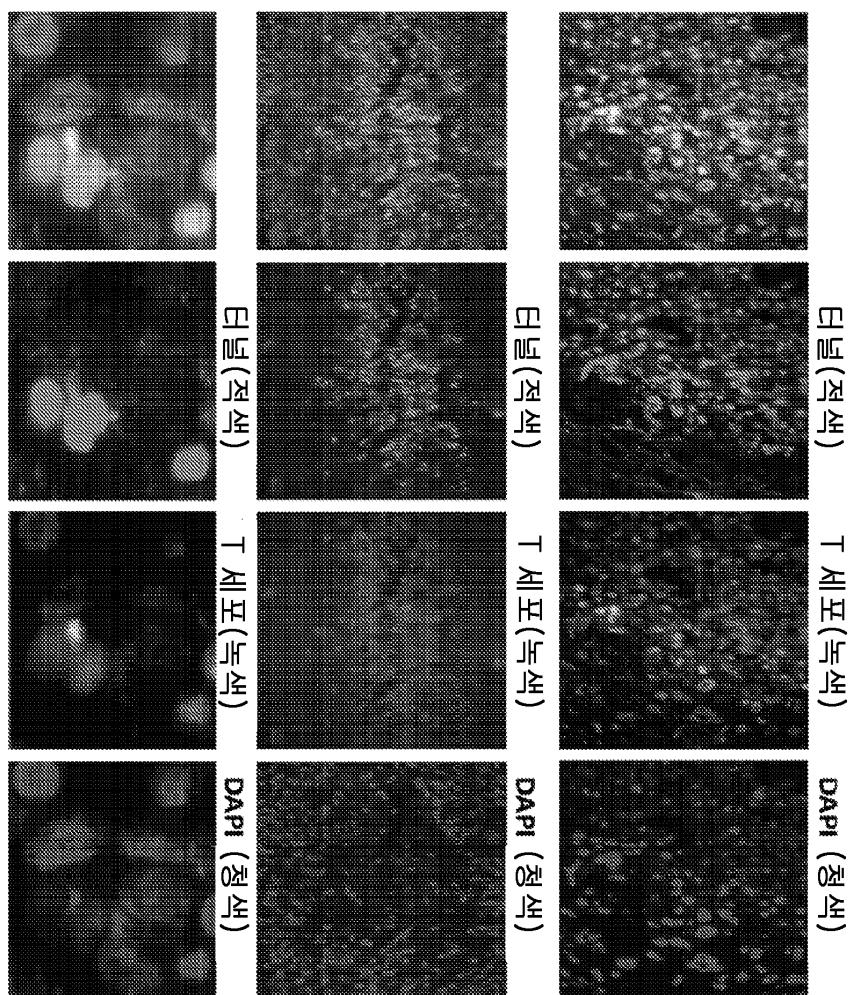


병합

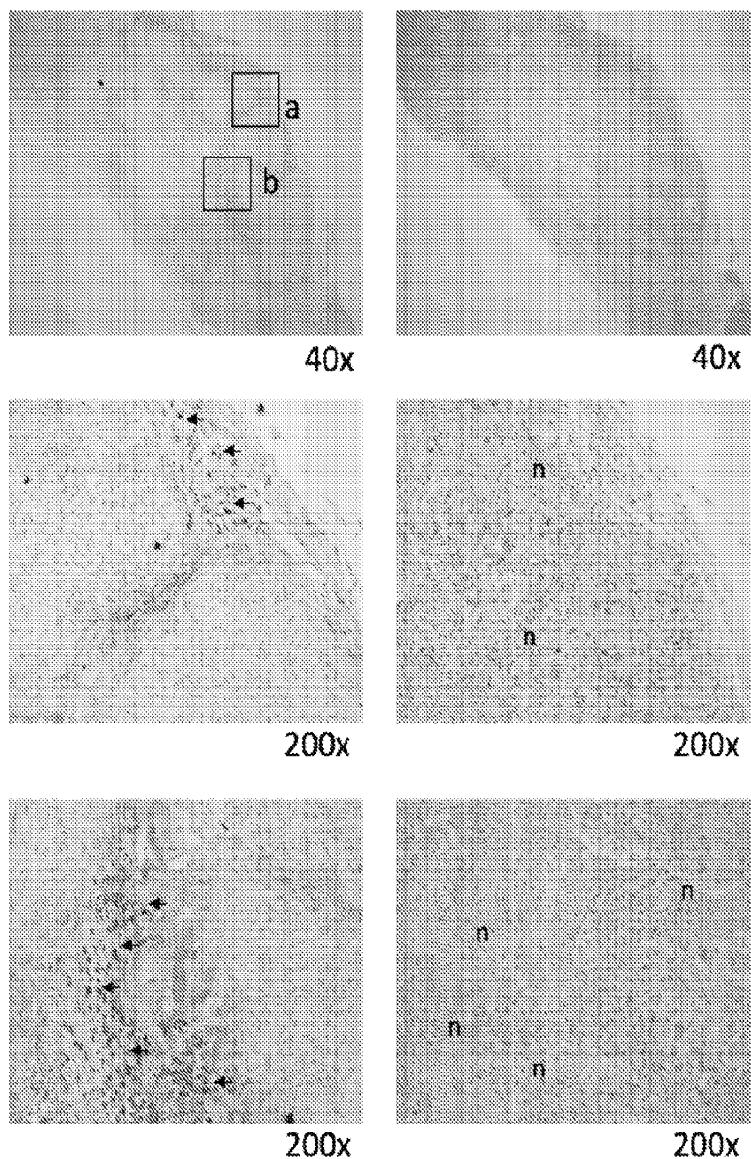


병합

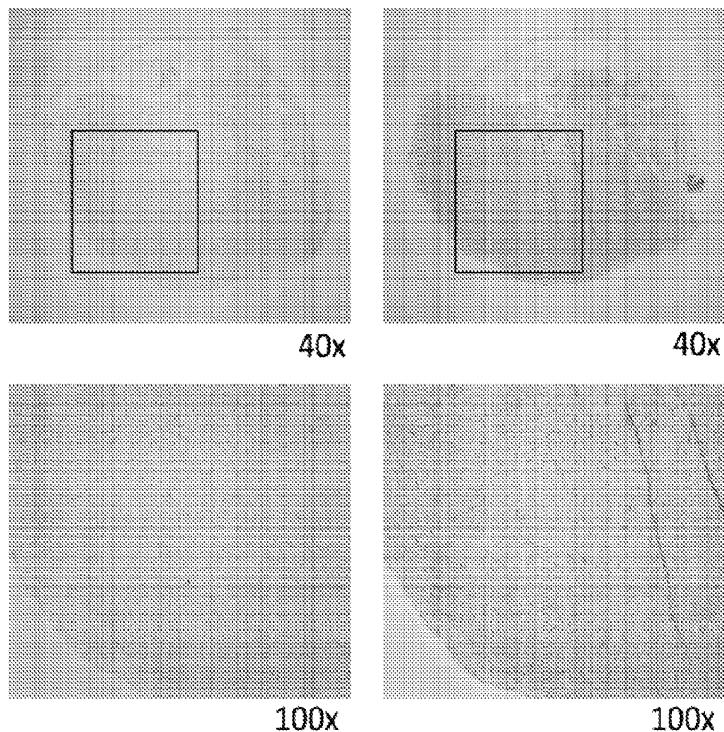
도면6b



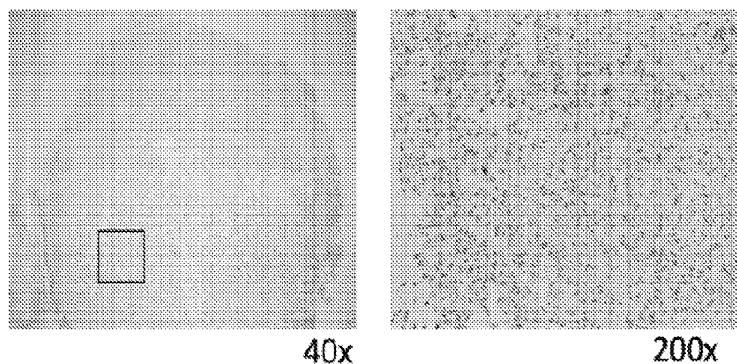
도면6c



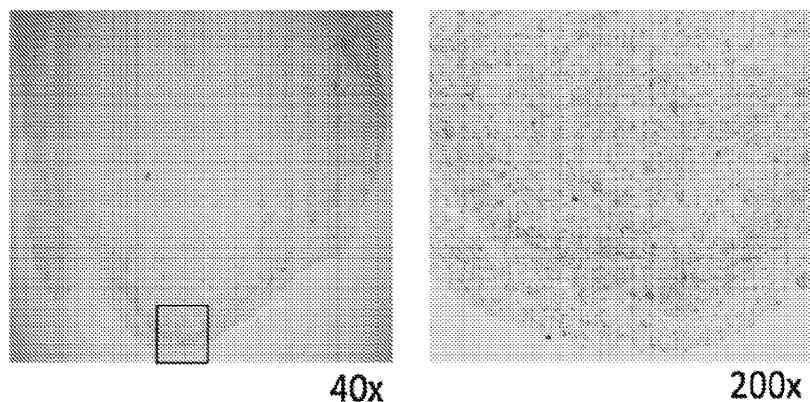
도면7



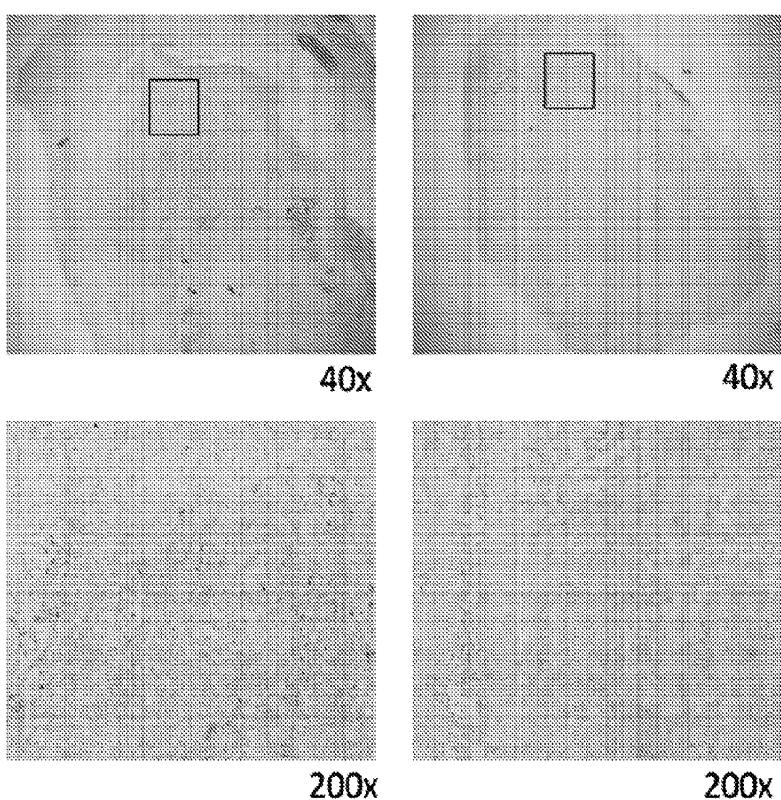
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

<120> CARBONIC ANHYDRASE IX SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS AND
METHODS OF USE THEREOF

<130> DFCI-092_001WO

<150> 62/094,596

<151> 2014-12-19

<160> 110

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ser Leu Ala Phe Asp Ile Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

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

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

85	90	95
Leu Ser Ala Trp Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
100	105	110
Gly		

<210> 3
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30

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

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly		
100	105	110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Pro Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Pro Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
----	----	----

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

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Gly Thr Tyr
 20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Val Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser 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 Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

100	105	110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		

115	120
<210> 15	
<211> 118	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		

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

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		

115
<210> 16
<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Val Thr His Tyr Thr 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 Thr Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Arg Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Arg Ala Ala Arg Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Pro Glu Phe Thr Phe Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
Ala Lys Ser Ser Arg Ser Gly Tyr Phe Leu Pro Leu Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

 115
 <210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

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

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

<210> 25
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

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

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ile Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Thr
 85 90 95
 Leu Arg Val Trp Met Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85 90 95

Leu Arg Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly

100 105 110

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85 90 95

Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 29

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Gly

20 25 30

Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Ala Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gly

85 90 95

Leu Arg Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gly

100 105 110

<210> 30

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

Arg Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val

35 40 45

Val Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ala Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Lys Ser

85 90 95

Leu Thr Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

Arg Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Arg Val

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Lys Ser

85 90 95

Leu Ser Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg

100 105 110

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Arg Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85 90 95

Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg

100 105 110

<210> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Gly

20 25 30

Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro His Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65	70	75	80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser			
85	90	95	
Leu Arg Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly			
100	105	110	

<210> 34
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34			
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Gly			
20	25	30	
Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu			
35	40	45	
Leu Ile Tyr Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe			
50	55	60	

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

<210> 35
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 35

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

20 25 30
 Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60
 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Arg Asp Asn Asn

85 90 95

Gly His His Ile Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser

100 105 110

<210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Gly

20 25 30

Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85 90 95

Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (83)..(83)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 37

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Gly

20 25 30

Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Xaa Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85 90 95

Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50	55	60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His			

85	90	95	
His Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
100	105	110	

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

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

Leu Arg Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly			
100	105	110	

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

1	5	10	15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly			
20	25	30	
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu			
35	40	45	
Leu Ile Tyr Ala Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe			
50	55	60	
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu			
65	70	75	80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser			
85	90	95	
Leu Arg Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly			

100	105	110	
<210> 41			
<211> 111			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 41			
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn			
20	25	30	
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Pro			
35	40	45	

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

100 105 110

<210> 42

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85 90 95

Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 43

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asn Ser Leu Arg Tyr Tyr Tyr Pro

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

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

<210> 44

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

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

65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Lys His			
85	90	95	
Tyr Val Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Thr Ala Leu Gly			
100	105		

<210> 45

<211> 458

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Ala Pro Leu Cys Pro Ser Pro Trp Leu Pro Leu Leu Ile Pro Ala

1	5	10	15
Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu			
20	25	30	
Met Pro Val His Pro Gln Arg Leu Pro Arg Met Gln Glu Asp Ser Pro			
35	40	45	
Leu Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp			
50	55	60	
Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu			
65	70	75	80
Glu Asp Leu Pro Gly Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro			
85	90	95	
Glu Val Lys Pro Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu Asp			
100	105	110	
Leu Pro Thr Val Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro Gln Asn Asn			
115	120	125	
Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg Tyr Gly			
130	135	140	
Gly Asp Pro Pro Trp Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala Gly Arg Phe			
145	150	155	160
Gln Ser Pro Val Asp Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe Cys Pro Ala			
165	170	175	
Leu Arg Pro Leu Glu Leu Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Pro Glu			
180	185	190	
Leu Arg Leu Arg Asn Asn Gly His Ser Val Gln Leu Thr Leu Pro Pro			
195	200	205	
Gly Leu Glu Met Ala Leu Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Ala Leu Gln Leu			
210	215	220	
His Leu His Trp Gly Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser Glu His Thr Val			
225	230	235	240
Glu Gly His Arg Phe Pro Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser Thr			
245	250	255	

Ala Phe Ala Arg Val Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu Ala

260	265	270
-----	-----	-----

Val Leu Ala Ala Phe Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr

275	280	285
-----	-----	-----

Glu Gln Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu Glu Gly Ser Glu

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Ser Arg Tyr Phe Gln Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ala

325	330	335
-----	-----	-----

Gln Gly Val Ile Trp Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser Ala

340	345	350
-----	-----	-----

Lys Gln Leu His Thr Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly Pro Gly Asp Ser

355	360	365
-----	-----	-----

Arg Leu Gln Leu Asn Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn Gly Arg Val

370	375	380
-----	-----	-----

Ile Glu Ala Ser Phe Pro Ala Gly Val Asp Ser Ser Pro Arg Ala Ala

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Glu Pro Val Gln Leu Asn Ser Cys Leu Ala Ala Gly Asp Ile Leu Ala

405	410	415
-----	-----	-----

Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe Ala Val Thr Ser Val Ala Phe Leu Val

420	425	430
-----	-----	-----

Gln Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly Thr Lys Gly Gly Val Ser Tyr

435	440	445
-----	-----	-----

Arg Pro Ala Glu Val Ala Glu Thr Gly Ala

450	455
-----	-----

<210> 46

<211> 437

<212>

> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Met Ala Ser Leu Gly Pro Ser Pro Trp Ala Pro Leu Ser Thr Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Thr Ala Gln Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Gln Val Ser Ala Gln
 20 25 30
 Pro Gln Gly Leu Ser Gly Met Gln Gly Glu Pro Ser Leu Gly Asp Ser
 35 40 45
 Ser Ser Gly Glu Asp Glu Leu Gly Val Asp Val Leu Pro Ser Glu Glu
 50 55 60

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

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

Leu Gly Pro Gly Gln Glu Tyr Arg Ala Leu Gln Leu His Trp
 195 200 205
 Gly Thr Ser Asp His Pro Gly Ser Glu His Thr Val Asn Gly His Arg
 210 215 220

Phe Pro Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser Thr Ala Phe Ser Glu
 225 230 235 240
 Leu His Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu Ala Val Leu Ala Ala

245	250	255
-----	-----	-----

Phe Leu Gln Glu Ser Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr Glu Gln Leu Leu

260	265	270
-----	-----	-----

Ser His Leu Glu Glu Ile Ser Glu Glu Gly Ser Lys Ile Glu Ile Pro

275	280	285
-----	-----	-----

Gly Leu Asp Val Ser Ala Leu Leu Pro Ser Asp Phe Ser Arg Tyr Tyr

290	295	300
-----	-----	-----

Arg Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ser Gln Gly Val Ile

305	310	315
-----	-----	-----

320

Trp Thr Val Phe Asn Glu Thr Val Lys Leu Ser Ala Lys Gln Leu His

325	330	335
-----	-----	-----

Thr Leu Ser Val Ser Leu Trp Gly Pro Arg Asp Ser Arg Leu Gln Leu

340	345	350
-----	-----	-----

Asn Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn Gly Arg Thr Ile Glu Ala Ser

355	360	365
-----	-----	-----

Phe Pro Ala Ala Glu Asp Ser Ser Pro Glu Pro Val His Val Asn Ser

370	375	380
-----	-----	-----

Cys Phe Thr Ala Gly Asp Ile Leu Ala Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe

385	390	395
-----	-----	-----

400

Ala Val Thr Ser Ile Ala Phe Leu Leu Gln Leu Arg Arg Gln His Arg

405	410	415
-----	-----	-----

His Arg Ser Gly Thr Lys Asp Arg Val Ser Tyr Ser Pro Ala Glu Met

420	425	430
-----	-----	-----

Thr Glu Thr Gly Ala

435	440	445
-----	-----	-----

<210> 47

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

><223> Chemically synthesized primer

<400> 47

atcgacgcgt gcctgagcga ggtgcagctg gtgcagtc	38
<210> 48	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Chemically synthesized primer	
<400> 48	
caatggcac cac cgtctttca gctagcacca gg	32
<210> 49	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Chemically synthesized primer	
<400> 49	
atcccaagct taagccagtc tgtgctgact cagcc	35
<210> 50	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Chemically synthesized primer	
<400> 50	
ggagggacca aattgaccgt cctaggtagt c	31
<210> 51	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Chemically synthesized primer	
<400> 51	
tagggcacgc gtgtgctgag cgaggtgcag ctgggtcagt c	41
<210> 52	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Chemically synthesized primer	

<400>

52

tctagtgcta gctgaagaga cggtgaccat tg 32

<210> 53

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized primer

<400> 53

ctagcaagct tatcccgatc tgtgctgact cagcc 35

<210> 54

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Chemically synthesized primer

<400> 54

atagcaccta ggacggtcag cttggc 26

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Portion of CDR1 heavy chain sequence

<400> 55

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Portion of CDR1 heavy chain sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 56

Xaa Tyr Ala Met Xaa

1 5

<210

> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Portion of CDR1 heavy chain sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 57

Ser Tyr Xaa Met Xaa

1 5

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Portion of CDR2 heavy chain sequence

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 58

Ala Ile Ser Xaa Xaa Gly Gly Xaa Thr Xaa Xaa Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Portion of CDR2 heavy chain sequence

<400> 59

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Portion of CDR3 heavy chain sequence

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 60

Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ser Leu Xaa Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 61

<211>

14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Portion of CDR1 light chain sequence

<400> 61

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

1 5 10
<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Portion of CDR2 light chain sequence
<400> 62

Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser

1 5
<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Portion of CDR3 light chain sequence
<400> 63

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val Val

1 5 10

<210> 64
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Consensus sequence
<400> 64

Glu Glu Asp Leu Pro Glu

1 5
<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Portion of the CDR3 heavy chain sequence
<400> 65

Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10
<210> 66

<400> 66

000

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 67

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

1 5 10 15

Gly

<210> 68

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 68

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Phe Asp Val His

1 5 10

<210> 69

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 69

Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 70

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Leu Ser Ala Trp Val

1 5 10

<210> 71

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 71

tagggcgcgg ccgcaaccga gaccagccag gtggcgcccg ccgggggagg aggccagccc 60

accacgacgc cagcgccgca a 81

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 72

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 73

Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Leu Ser Trp Val

1 5 10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 74

Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Leu Arg Val Trp Met

1 5 10

<210> 75

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 75

tagggcgcgg ccgcaaccga gaccagccag gtggcgcccg ccggcggagg aggcagcatt 60

gaagttatgt atccctctcc t 81

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 76

Gln Ser Tyr Asp Lys Ser Leu Thr Trp Val

1 5 10

<210> 77

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 77

ctagccttaa ttaatttagcg aggagggggc agggcctgca t 41

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 78

Thr Glu Thr Ser Gln Val Gln Pro Gln

1 5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 80

Gln Ser Tyr Asp Lys Ser Leu Ser Trp Val

1 5 10

<210> 81

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 81

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Phe Asp Val His

1 5 10

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligopeptide

<400> 82

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val

1 5 10

<210> 83

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 83

caggtgcagc tggcagtc tgggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt ccccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgcaggct	120
ccagggagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgcta atggtggtac cacatactac	180

gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaataatggg	300
aactatcgcg gtgttttga tatctgggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttcaggt	360
ggcgccggtt ccggagggtgg tggttctggc ggtggtgca gccagtcgt gctgactcag	420
ccaccctcag tgtctgggc cccagggcag agggtcacca tctcctgcac tgggagcagc	480
tccaacatcg gggcaggta tcatgtacac tggtaccagc agttccagg aacagcccc	540
aaactcctca tctatggtaa cagcaatcgg ccctcagggg tccctgaccg attctctggc	600

tccaaatctg gctcctcagc ctccctggcc atcactggc tccaggctga ggatgaggct	660
cattattact gcacgtcata tgacagaagg ctgtttggg tggtcggcgg agggaccaaa	720
ttgaccgtcc taggt	735

<210> 84

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 84

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys

210 215 220

Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Leu Ser Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Gly

245

<210> 85

<211> 732

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 85

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttggtagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc atctatgcc a tgagctgggt ccgcaggct 120

ccagggagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtgggtgg cacataccac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc gaaattctct	300
gcgtatagtg ctacgattt gtggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcaggtggc	360
ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcgtt ggtggcagcc agtctgtgct gactcagcca	420
ccctcagtgt ctggggcccc agggcagagg gtcacaatct cctgcactgg gagcagctcc	480
aacatcgaaa gaggttataa tgtacactgg taccagcagc ttccaggaac agccccaaa	540

ctcctcatct atgataaacac gaatcgccc tcaggggtcc ctgcccatt ctctggctcc	600
aagtctgcca cgtcagcctc cctgaccatc actgggctcc aggctgacga tgaggctgat	660
tattactgcc agtcgtatga cagcggctg aggtgggtgt tcggcggagg gaccaagctg	720
accctcttag gt	732

<210> 86

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 86

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser 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 Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

115	120	125
Gly	Gly	Gly
Ser	Gln	Ser
Val	Leu	Thr
Gln	Pro	Pro
Pro	Ser	Val
Ser		
130	135	140
Gly	Ala	Pro
Gly	Gln	Arg
Val	Thr	Ile
Asn	Ser	Cys
Thr	Gly	Ser
Ser	Ser	Ser
145	150	155
Asn	Ile	Gly
Arg	Gly	Tyr
Asn	Val	His
Trp	Tyr	Gln
Gln	Leu	Pro
Gly		
165	170	175
Thr	Ala	Pro
Lys	Leu	Ile
Tyr	Asp	Asn
Thr	Asn	Arg
Pro	Ser	Gly
180	185	190
Val	Pro	Ala
Arg	Phe	Ser
Gly	Ser	Lys
Ser	Ala	Thr
Ser	Ala	Ser
Leu		
195	200	205
Thr	Ile	Thr
Gly	Leu	Gln
Ala	Asp	Asp
Glu	Ala	Asp
Tyr	Tyr	Cys
Gln		
210	215	220
Ser	Tyr	Asp
Ser	Gly	Leu
Arg	Trp	Val
Phe	Gly	Gly
Gly	Thr	Lys
Leu		
225	230	235
Thr	Leu	Gly

<210> 87

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 87

gaggtgcagc	tggtgca	ttggggaggc	ttggta	cggggggc	cctgagac	tc	60
tcctgtcag	cctctggatt	cacctttagc	agctatgcc	tgagctgg	ccgc	cagg	120

ccagggagg	ggctggagt	gg	tctcag	attagt	gtcta	atgg	tggtac	ca	cata	tac	ac	180
gcagactcg	tgaaggccg	gtt	caccatc	tcc	agagaca	at	ccaagaa	ca	cgc	tgat		240
ctgcaa	at	ga	ac	agc	cctgag	ag	ccgagg	ac	ggc	ccgt	at	300
aactatcg	cg	tg	ctt	tt	ga	at	ctgg	gc	ca	gg	at	360
ggcggcg	tt	cc	gg	gg	gt	tg	tt	gg	cc	gg	tg	420
ccaccctc	ag	tg	tc	tgg	gg	tc	gg	gg	cc	gg	tc	480
cc	ac	ct	gg	gg	gg	tc	gg	gg	cc	gg	tc	

tccaacatcg gggcagggtt tcatgtacac tggtaccagc aacttccagg aacagcccc 540

agactcctca tctatggtaa caacaatcg ccctcagggg tccctgaccg attctctggc 600

tccaagtctg gcacccctcgc ctccctggcc atcaactggc tccaggctga ggatgagact 660

gattatttct gccagtccta tgacagcagc ctgagtgctt gggtattcgg cggagggacc 720

aagggtgaccg tcctacgt 738

<210> 88

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 88

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Asn Ile Gly Ala Gly Phe Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Phe Cys

210 215 220

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

225 230 235 240

Lys Val Thr Val Leu Arg

245

<210> 89

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 89

caggtgcagc tggcagtc tgggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc	60
---	----

tcctgtgcag cctctggatt ccccttagc agctatgcc a tggctgggt ccggcaggct	120
--	-----

ccagggagg ggctggagt ggtctcagct attagtgcta atgggtgtac cacatactac	180
---	-----

gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat	240
--	-----

ctgcaa atga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaataatggg	300
--	-----

aactatcgcg gtgttttga tatctgggc caagggacaa tggcacccgt ctcttcagg	360
--	-----

ggcggcggtt ccggaggtgg tggtctggc ggtggggca tccagtcgt gctgactcag	420
--	-----

ccaccctcag tgtctgggc cccaggcag agggcacca tctcgtcac tgggagcagc	480
---	-----

tccaa catcg gggcaggta tggatgtacac tggta ccaggc agcttccagg aacagcccc	540
---	-----

aaactcctca tctatggtaa caccatcg ccctcagggg tccctgaccg attctctggc	600
---	-----

tccaa gtctcg gcacccatcgc ctccctggcc atcatggc tccaggctga cgtatgaggct	660
---	-----

gattattact gccagtccta tgacagcacc ctgagggtct ggatgttcgg cggaggacc	720
--	-----

aagctgaccg tccttggt	738
---------------------	-----

<210> 90

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ala Ile Ile Gly Leu Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

210 215 220

Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Leu Arg Val Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr

225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Leu Gly

245

<210> 91

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 91

gaggtgcagc tggtgagtc tggggaggc gtggccagc ctggaggc cctgagactc	60
--	----

tcctgtcagc cctctggatt caccttca gactatggca tgcactgggt ccggcaggct	120
---	-----

ccagggagg ggctggatgt ggtctcagct attagtgta gtgggttag cacatactac	180
--	-----

gcagactccg tgaaggccg attaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgtgtat	240
--	-----

ctgcaa atga acagtctgag agccgaggac acggctgtgtt attactgtgc aagagcccg	300
--	-----

gtaacaggag gttcgaccc ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcaggtggc	360
--	-----

ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc agcctggct gactcagcca	420
--	-----

ccctcggtgt cagtggcccc aggacagacg gccaggattt cctgtgggg agacaatatt	480
--	-----

ggaagaaaaa gtgtgcactg gtaccaacag aggccaggcc aggcccstat tctagtcatc	540
---	-----

cgtgatgata gggatcgccc ctcaggatc cctgagcgtat tctctggctc cagctctgt	600
--	-----

aatacggcca ccctgatcat cagcagggtc gaagccggag atgaggccga ctattattgt	660
---	-----

caggtgtggg atagtagtag taaacattat gtcttcggac cagggaccaa ggtcaccgcc	720
---	-----

ctaggt	726
--------	-----

<210> 92

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 92

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

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

<210> 93

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 93

caggtcacct tgaaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggacgtc cctgagactc	60
---	----

tcctgtgcag cctctggatt caccttagc aactatgcc a tacatgggt ccgcaggct	120
---	-----

ccagggagg ggctggagt ggtgggtcta atatctatg atgaaatgt tacacactac	180
---	-----

acagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat	240
--	-----

ttgcaaatga acaccctgag agccgacgac acggctgtgtt attattgtgc gagaggctcc	300
--	-----

ggctaccaag aacactgggg ccagggacc ctggtcaccc tctcctcagg tggccgggt	360
---	-----

tccggagggtg gtggttctgg cggtggtgcc agcctgcctg tgctgactca gccaccctcg	420
--	-----

gtgtcagtgg ccccaggaca gacggccagg attacctgtg gggaaacaa catttggaaat	480
---	-----

aaaagtgtgc actggcacca gcagaagcca ggccaggccc ctgtgctgg catctattat	540
--	-----

gatacgacc ggcctcagg gatccctgag cgattcttg gctccaactc tggaaacacg	600
--	-----

gccaccctga ccatcagcag ggtcgaagcc gggatgagg ccgactatta ctgtcagg	660
--	-----

tggatagta gtagtcatca tcatgtggta ttccggcgag ggaccaagct gaccgtctca	720
--	-----

gtt	723
-----	-----

<210> 94

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 94

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe

180 185 190

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val

195 200 205

Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser

210 215 220

Ser Asp His His Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

225 230 235 240

Gly

<210> 95

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 95

gagggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtggtagcgc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtcag cctctggatt ccccttagc agctatgcc	120
cgaggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgc	180
tgcataactcg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca	240
atccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag	300
acggcgtat attactgtgc gaataatggg aactatcg	360
cg gtgctttga tatctgggc caagggacaa tggtaccgt	420
ccgcgcggtt ccggagggtgg tggtctggc ggtggtgca	480
gccagtcgt gctgactcag ccaccctcag tgtctgggc	
cccaggcag agggtcacca tctcgcac tgggagcagc	

tccaacatcg gggcagggtt tgatgtacac tggtaccagc	540
agcttccagg aacagcccc aaactcccta tctacggtaa	600
caccaatcga ccctcagggg tccctgaccg attctctggc	
tccaaatctg gcacccctcagc ctccctggcc atcactggc	660
tccaggctga gcatgagact gattattact gccagtccta	720
tgacagtaga ctgagtgctt gggtgtcgg cggagggacc	
aagctgaccg tcctaggt	738

<210> 96

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 96

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

1	5	10	15												
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro	Phe	Ser	Ser	Tyr

20	25	30													
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val

35	40	45													
Ser	Ala	Ile	Ser	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val

50	55	60													
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr

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

85	90	95													
Ala	Asn	Asn	Gly	Asn	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly
100	105	110													

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115

120

125

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

130

135

140

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

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Ala Gly Phe Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys

210

215

220

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

225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Leu Gly

245

<210> 97

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 97

caggtgcagc tggcgcagtc tgggggaggc gtggcacgc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtcagc cctctggatt ccccttagc agctatgcc a tggctgggt ccggccaggct 120

ccagggagg ggcgtggagt ggtctcagct attagtgc a tgggtggta cacatactac 180

gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca atccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaa atga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaataatgg 300

aactatcgcc gtcgttttga tatctgggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttcagg 360

ggcgccggtt ccggagggtgg tggctctggc ggtggtgca gccagtcgt gctgactcag 420

ccaccctcag tgtctgggc cccagggcag agggtcacca tctcctgcac tgggagcgc 480

tccaaacatcg gggcaggta tgatgttcac tggtaccagc acttccagg aacagcccc 540

aaactcctca tctatggta tagcaatcga ccctcaggag tccctgaccg attctctggc 600

tccaaagtctg gcacctcagc ctccctggcc atcactggc tccaggctga ggatgagact 660

gattattct gccagtccta tgacagcagc ctgagtgctt gggtattcgg cgaggggacc 720

aagggtgaccg tccttaggt 738

<210> 98

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 98

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160
 Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln His Leu Pro

165 170 175
 Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser

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

195 200 205
 Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Phe Cys

210 215 220
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr

225 230 235 240
 Lys Val Thr Val Leu Gly

245

<210> 99

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 99

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttggtagc cttgggggtc cctgagactc	60
---	----

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccggccaggct	120
---	-----

ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgta gtgggtggtag cacatactac	180
--	-----

gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
---	-----

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaattgga	300
---	-----

cggtagatca gcagcttggg gtactgggc cagggcaccc tggcacccgt ctcctcagg	360
---	-----

ggcgccggtt ccggagggtgg tggtctggc ggtggggca gccagtcgt gctgactcag	420
---	-----

ccaccctcag tgtctgggc cccaggcag agggtcacaa tctcctgcac tgggagcagc	480
---	-----

tccaacatcg ggagaggta taatgtacac tggtaccagc agcttccagg aacagcccc	540
---	-----

aaactcctca tctatgataa cacgaatcgg ccctcagggg tccctgccc attctctggc	600
--	-----

tccaagtctg ccacgtcagc ctccctggcc atcactggc tccaggctga cgtatgaggct	660
---	-----

gattattact gccagtcgta tgacagcggc ctgagatggg tggcgccgg ggggaccaag	720
--	-----

ctgaccctcc tacgt	735
------------------	-----

<210> 100

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 100

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Arg Gly Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro

165 170 175

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

180 185 190

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

195	200	205
Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys		
210	215	220
Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Leu Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys		
225	230	235
Leu Thr Leu Leu Arg		
245		

<210> 101
<211> 735
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 101

caggtgcagc tggcagtc tgggggaggc ttggtagac ctgggggtc cctgagactc	60
---	----

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccggccaggct	120
ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgta gtgggtggtag cacatactac	180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgttat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gacgtacggt	300
gactacggca gcctcgacta ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcaggtggc	360
ggcggttccg gaggtggtagg ttctcgcggt ggtggcagcc agtctgtgct gactcagcca	420
ccctcagtgt ctggggcccc agggcagagg gtcaccatct cctgcactgg gagcagctcc	480

aacatcgaaa caggttatga tgtacactgg taccagcagc ttccaggaac agccccaaa	540
ctcctcatct atgctaacaa caatcgccc tcaggggtcc ctgaccgatt ctctggctcc	600
aagtctggca cctcagccctc cctggccatc actgggtcc aggctgagga tgaggctgat	660
tattactgcc agtccatga cagcagccctg agggcttggg tggtcgccgg agggaccaag	720
ctggccgtcc tgggt	735

<210> 102

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 102

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

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

245

<210> 103

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 103

cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggg ttgggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
--	----

tcctgtgcag cccttgatt cccctttagc agctatgccca tgagctgggt ccggccaggct	120
--	-----

ccagggagg ggctggagg tggtctcagct attagtgcata atgggtggta cacatactac	180
---	-----

gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
--	-----

ctgcaaatga acagccttag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaataatggg	300
---	-----

aactatcgcg gtgcgttta tatctgggc caaggacaa tggtcaccgt ctcttcagggt	360
---	-----

ggcggcggtt ccggagggtgg tggttctggc ggtggggca gccagtcgt gctgactcag	420
--	-----

ccaccctcag tgtctgggc cccaggccag aggatcacca ttcctgcac tgggaccaggc	480
--	-----

tccaaatcg gggcaggta tggatgtacac tggtaaccagg aacttcagg agcagcccc	540
---	-----

agagtcctca tctatggtaa caacaatcg ccctcagggg tccctgaccg attctctggc	600
--	-----

tccaaatcg gcacccatcagc ctccctggcc atcaatggc tccagtcgt ggtggggct	660
---	-----

gattattact gtcaatccta tgacaagagt ctgagttggg tggtcggcg aggaccaag	720
---	-----

ctgaccgtcc taagt	735
------------------	-----

<210> 104

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 104

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

210 215 220

Gln Ser Tyr Asp Lys Ser Leu Ser Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Arg

245

<210> 105

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 105

caggtgcagc tggtcagtc tgggggaggc ttggtagc cttgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatgcc a tagctgggt ccggcaggct 120

ccagggagg ggctggagggt ggtctcgat attagtgta gtgggttag cacatactac 180

gcagactccg tgaaggccg cttaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240

ttgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatattgt 300

atgtatcca gctgctatcg cggtatggac gtctgggca aaggcacctt ggtcaccgtc 360

tcctcagggt gccgcgttc cggaggtggt ggttctcgcg gtggtggcag ccagtctgt 420

ctgactcagc caccctcagt gcttgggccc ccagggcaga gggtaccat ctccgtcact 480

gggagcagct ccaacatcg ggcagggttat gatgtacact ggtaccagca gttccagga 540

acagccccca aactcctcat ctatgctaact aacaatcgcc cctcagggtt ccctgaccga 600

ttctctggct ccaagtctgg cacctcagcc tccctggcca tcactggctt ccaggctgag 660

gtatggcgtt attattactg ccagtcctat gacagcagcc tgaggcctt ggttccgc 720

ggagggacca agctggccgt cctgggt 747

<210> 106

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 106

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Arg Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp

210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Ala Trp Val Phe Gly

225 230 235 240

Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly

245

<210> 107

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 107

cagggtgcagtc tggcgcagtc tgggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctgaatt caccttttgtt acctatgccca tgacctgggt ccgcaggct	120
ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcggtt gttagtgta gtggtggttag cacatactac	180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaggaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgatgac acggccgtgt attactgtgc aagaggcccg	300
gttattacgat atggcttta tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttcaggt	360

ggcggcggtt ccggaggtgg tggctctggc ggtggtgca gccagtcgt gctgactcag 420

ccaccctcag tctctgggc cccagggcag aggtaccca tctcctgcac tgggagcagg 480

tccaaacatcg gggcagatta tgatgtacac tggtaccagc agttccagg aacagcccc 540

aaactcctca tctatgctaa caacaatcgg ccctcagggg tccctggctg attctctgcc 600

tccaaagtctg gcacccctcagc ctccctggcc atcagtgccc tccaggctga ggttggct 660

gattattact gccagtcgta tgacagcagc ctgaggcctt gggtgttcgg cggagggacc 720

aagctggccg tcctgggt 738

<210> 108

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Val Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Arg
 145 150 155 160
 Ser Asn Ile Gly Ala Asp Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro
 165 170 175
 Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asn Asn Asn Arg Pro Ser
 180 185 190
 Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
 195 200 205
 Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Ala Val Leu Gly
 245

<210> 109

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 109

```

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttggtccagc ctgggggtc cctgagactc      60
tcctgtcagc cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggttag cacatactac      180
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaggtccat      300
agcagtggag gatttgacta ctggggccag ggaacctgg tcaccgtctc ctcaggtggc      360

```

```

ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc agtctgtgct gactcagcca      420
ccctcagtgt ctggggcccc agggcagagg gtcacaatct cctgcactgg gagcagctcc      480
aacatcgga gaggttataa tgtacactgg taccagcagc ttccaggaac agcccccaaa      540
ctcctcatct atggtaaacac caatcgccc tcaggggtcc ctgaccgatt ctctggctcc      600
aagtctggca cctcagcctc cctggccatc actgggctcc aggctgagga tgagggtgat      660
tattactgcc agtcctatga cagcagcctg agtgcttggg tggcggcgg ggggaccaag      720

```

ctgaccgtcc taggt 735

<210> 110

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 110

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Ile Gly Arg Gly Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu
195 200 205
Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220
Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Thr Val Leu Gly
245