

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0113284

(43) 공개일자 2020년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/078 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 35/545 (2014.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0634 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7027265(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년02월26일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2015-7026245

원출원일자(국제) 2014년02월26일

심사청구일자 2019년02월25일

(85) 번역문제출일자 2020년09월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/018667

(87) 국제공개번호 WO 2014/134165

국제공개일자 2014년09월04일

(30) 우선권주장

61/769,543 2013년02월26일 미국(US)

(71) 출원인

메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터

미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275

(72) 발명자

브렌트젠스 레니어 제이.

미국 뉴저지주 07078 쇼트 힐즈 올드 쇼트 힐즈
로드 140

잭슨 홀리 제이.

미국 뉴저지주 07030 호보켄 아파트 4 그랜드 스트리트 133

(74) 대리인

특허법인태평양

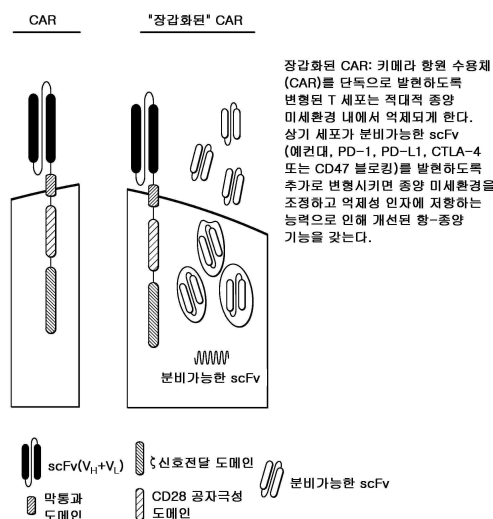
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 면역치료용 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 암 및 병원체에 대한 면역 반응을 향상시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 면역조절성 분자용으로 도입된 리간드를 발현하는 키메라 항원 수용체(CAR)일 수 있는 항원 수용체를 갖는 면역반응성 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 면역반응성 세포는 항원-지향성이고, 면역억제에 저항하며, 및/또는 향상된 면역-활성화 특성을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/545 (2013.01)

C07K 14/705 (2013.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 항원에 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR), 및 (ii) 재조합 CD40L을 포함하는 면역반응성 세포.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 CAR은 CD3ζ의 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 선택적으로 상기 CAR은 CD97의 세포내 도메인 또는 그의 일부, CD11a-CD18의 세포내 도메인 또는 그의 일부인, CD2의 세포내 도메인 또는 그의 일부, ICOS의 세포내 도메인 또는 그의 일부, CD27의 세포내 도메인 또는 그의 일부, CD154의 세포내 도메인 또는 그의 일부, CDS의 세포내 도메인 또는 그의 일부, OX40의 세포내 도메인 또는 그의 일부, 4-1BB의 세포내 도메인 또는 그의 일부, CD28의 세포내 도메인 또는 그의 일부의 세포내 도메인, 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 면역반응성 세포.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 면역반응성 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 림프구성 세포로 분화될 수 있는 다능성 줄기 세포, 및 이들의 조합이고, 선택적으로 상기 다능성 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포인 면역반응성 세포.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 면역반응성 세포는 T 세포이고, 선택적으로 상기 T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), 조절성 T 세포, 또는 이들의 조합인 면역반응성 세포.

청구항 5

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 항원은 종양 항원이고, 선택적으로 상기 종양 항원은 CD19, MUC16, MUC1, CAIX, CEA, CDS, CD7, CD10, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, 사이토메갈로바이러스(CMV) 감염된 세포 항원, EGP-2, EGP-40, EpCAM, Erb-B2, Erb-B3, Erb-B4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 플레이트 수용체-α, GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-α2, κ-경쇄, KDR, LeY, L1 세포 부착 분자, MAGE-A1, 메소텔린, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 암태아 항원(h5T4), PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2, 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역반응성 세포.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 종양 항원은 ROR1인 면역반응성 세포.

청구항 7

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 재조합 CD40L은 상기 면역반응성 세포의 면역 반응을 향상시키는 면역반응성 세포.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항의 면역반응성 세포를 포함하는 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물인 조성물.

청구항 10

CAR을 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 CD40L을 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 각각은 프로모터 요소에 작동가능하게 연결되는 핵산 조성물.

청구항 12

청구항 10 또는 청구항 11의 핵산 조성물을 포함하는 벡터.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 벡터는 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터인 벡터.

청구항 15

신생물을 치료하거나, 종양을 갖는 개체에서 종양 부하 및/또는 크기를 줄이거나, 및/또는 신생물을 갖는 개체의 생존을 증가시키는데 사용하기 위한 청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항의 면역반응성 세포, 청구항 7의 조성물, 청구항 8 또는 청구항 9의 핵산 조성물, 또는 청구항 10 또는 청구항 11의 벡터.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

상기 종양 및/또는 신생물은 혈액암, B 세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병, 비-호지킨 림프종, 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포.

청구항 17

청구항 8 또는 청구항 9에 있어서,

신생물을 치료하거나, 종양을 갖는 개체에서 종양 부하 및/또는 크기를 줄이거나, 및/또는 신생물을 갖는 개체의 생존을 증가시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 종양 및/또는 신생물은 혈액암, B 세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병, 비-호지킨 림프종, 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

개체에서 암 세포 또는 병원체에 대한 CD8⁺ 세포독성 T 세포 반응을 증가시키는데 사용하거나, 및/또는 암세포를 갖거나 병원체에 의해 초래되는 질환을 갖는 개체에서 수지상 세포의 성숙을 증가시키기 위한 것이고, 상기 CAR

이 결합하는 항원은 상기 암세포 또는 상기 병원체의 항원인 면역반응성 세포.

청구항 20

청구항 19에 있어서,

상기 면역-활성화 사이토카인은 IL-12를 포함하는 세포.

청구항 21

청구항 8 또는 청구항 9에 있어서,

개체에서 암 세포 또는 병원체에 대한 $CD8^+$ 세포독성 T 세포 반응을 증가시키는데 사용하거나, 및/또는 암세포를 갖거나 병원체에 의해 초래되는 질환을 갖는 개체에서 수지상 세포의 성숙을 증가시키기 위한 것이고, 상기 CAR 이 결합하는 항원은 상기 암세포 또는 상기 병원체의 항원인 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서,

상기 면역-활성화 사이토카인은 IL-12를 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 포함되는 2013년 2월 26일자로 출원된 미국 가출원 제 61/769,543호에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은 미국 국립보건원으로부터 기금 번호 CA95152, CA138738, CA059350 및 CA08748 하의 정부 지원으로 수행되었다.

[0003] 본 발명은 암 및 병원체에 대한 면역 반응을 향상시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 면역조절성 분자용으로 도입된 리간드를 발현하는 키메라 항원 수용체(CAR, chimeric antigen receptor)일 수 있는 항원 수용체를 갖는 면역반응성 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된(engineered) 면역반응성 세포는 항원-지향성이고, 면역억제에 저항하며, 및/또는 향상된 면역-활성화 특성을 갖는다.

배경 기술

[0004] 급성 림프아구성 백혈병(ALL, acute lymphoblastic leukemia), 만성 림프구성 백혈병 및 비-호지킨 림프종을 포함하는 대부분의 성인 B-세포 악성물(malignancy)은 현재 이용가능한 치료법에도 불구하고 치료될 수 없다. 유전적으로 조작된 자가성(autologous) T 세포를 이용한 입양적 치료(adoptive therapy)는 흑색종 및 지연성(indolent) B-세포 악성물에서 치료적 효능의 증거를 보여주었다. T 세포는 이러한 항원에 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR)라고 불리는 인공 T-세포 수용체를 암호화하는 유전자의 도입을 통해 종양-연관성 항원을 표적화하기 위해 변형될 수 있다. 면역치료는 암의 치료를 제공하기 위한 잠재력을 갖는 표적화된 치료이다.

[0005] 그러나, 악성 세포는 면역 인식 및 제거로부터 그 자신을 보호하기 위하여 면역억제성 미세환경을 생성하도록 적응한다. 이러한 "적대적(hostile)" 종양 미세환경은 표적화 T 세포 치료와 같은 면역 반응의 자극을 포함하는 치료 방법에 대한 도전과제를 제기한다. 따라서, 신생물을 치료하기 위한 신규한 치료 전략이 시급히 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 일반적으로 면역 세포 활성화 활성을 갖는 항원 결합 수용체(예컨대, CAR 또는 TCR) 및 면역억제 활성을 갖는 항원(예컨대, CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드)에 결합하는 단일-사슬 가변 절편(scFv, single-chain variable fragment)을 발현함으로써 상기 항원의 면역억제 활성을 줄이거나 또는 제거하는 면역반응성 세포(예컨대, T 세포, 자연 살해(NK, natural killer) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL, cytotoxic T lymphocyte) 및

조절성 T 세포)를 제공한다.

- [0007] 본 발명은 면역 세포 활성화 활성을 갖는 항원 결합 수용체(예컨대, CAR 또는 CTR) 및 면역자극성 또는 전염증성 활성을 갖는 항원(예컨대, CD28, OX-40, 4-1BB, CD40 및 그의 리간드)에 결합하는 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 발현함으로써 상기 항원의 면역자극 활성을 향상시키는 면역반응성 세포(예컨대, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL) 및 조절성 T 세포)를 추가로 제공한다.
- [0008] 본 발명은 면역 세포 활성화 활성을 갖는 항원 결합 수용체(예컨대, CAR 또는 CTR) 및 CD40L, 예를 들면, 외인성(exogenous) CD40L(세포 그 자체 내에서 발생하는 내인성(endogenous) CD40L과 비교하여 (예를 들면, CD40L을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 네이키드(naked) 핵산의 벡터를 통해) 세포 내로 직간접적으로 도입된 CD40L)을 발현함으로써 상기 항원의 면역자극 활성을 향상시키는 면역반응성 세포(예컨대, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL) 및 조절성 T 세포)를 추가로 제공한다.
- [0009] 따라서, 본 발명은 신생물, 감염성 질환 및 다른 병리의 치료를 위해 이러한 면역반응성 세포를 이용하는 방법을 제공한다.
- [0010] 한 측면에서, 본 발명은 항원에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 갖는 단리된 면역반응성 세포를 제공한다.
- [0011] 다른 측면에서, 본 발명은 개체(subject)에서 신생물을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 제1 항원에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 갖는 유효량의 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 신생물을 치료 또는 예방하는 단계를 포함한다.
- [0012] 다른 측면에서, 본 발명은 개체에서 종양 부하(burden)를 줄이는 방법을 제공하며, 상기 방법은 제1 항원에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 갖는 유효량의 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 종양 세포의 죽음을 유도하는 단계를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 신생물을 갖는 개체의 생존을 연장시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 제1 항원에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 갖는 유효량의 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여함으로써 상기 개체의 생존을 연장시키는 단계를 포함한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0013] 다양한 비-제한적 구현예에서, 본 발명은 개체에서 암 세포에 대한 반응으로 면역-활성화 사이토카인 생산을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 암 세포의 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 갖고, 추가로 외인성 CD40L을 발현하는 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 비-제한적 구현예에서, 상기 면역-활성화 사이토카인은 IL-12이다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0014] 다양한 비-제한적 구현예에서, 본 발명은 개체에서 병원체에 대한 반응으로 면역-활성화 사이토카인의 생산을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 병원체의 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 갖고, 추가로 외인성 CD40L을 발현하는 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 비-제한적 구현예에서, 상기 면역-활성화 사이토카인은 IL-12이다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0015] 다양한 비-제한적 구현예에서, 본 발명은 개체에서 암 세포에 대한 $CD8^+$ 세포독성 T 세포 반응을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 암 세포의 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 갖고, 추가로 외인성 CD40L을 발현하는 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0016] 다양한 비-제한적 구현예에서, 본 발명은 개체에서 병원체에 대한 $CD8^+$ 세포독성 T 세포 반응을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 병원체의 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 갖고, 추가로 외인성 CD40L을 발현하는 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0017] 다양한 비-제한적 구현예에서, 본 발명은 암을 갖는 개체에서 수지상 세포의 성숙을 촉진하는 방법을 제공하며, 상기 암 세포의 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 갖고, 추가로 외인성 CD40L을 발현하는 면역반응성 세포를

상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.

- [0018] 다양한 비-제한적 구현예에서, 본 발명은 병원체에 의해 초래되는 질환을 갖는 개체에서 수지상 세포의 성숙을 촉진하는 방법을 제공하며, 상기 병원체의 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 갖고, 추가로 외인성 CD40L을 발현하는 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 개체에서 신생물을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 제1 항원에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체를 갖고, 외인성 CD40L을 발현하는 유효량의 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 신생물을 치료 또는 예방하는 단계를 포함한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0020] 다른 측면에서, 본 발명은 개체에서 종양 부하를 줄이는 방법을 제공하며, 상기 방법은 제1 항원에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체를 갖고, 외인성 CD40L을 발현하는 유효량의 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 종양 세포의 죽음을 유도하는 단계를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 신생물을 갖는 개체의 생존을 연장시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 제1 항원에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체를 갖고, 외인성 CD40L을 발현하는 유효량의 면역반응성 세포를 상기 개체에 투여함으로써 상기 개체의 생존을 연장시키는 단계를 포함한다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 혈액암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 CD19에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체 및 CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드 중 하나 이상에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 갖는 치료학적 유효량의 T 세포를 상기 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 혈액암을 치료하는 단계를 포함한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 혈액암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 CD19에 결합하여서 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체를 갖고, 외인성 CD40L을 발현하는 치료학적 유효량의 T 세포를 상기 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 혈액암을 치료하는 단계를 포함한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0023] 한 측면에서, 본 발명은 항원-특이적 면역반응성 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 면역반응성 세포에 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 단계를 포함하고, 상기 면역반응성 세포는 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 갖는다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0024] 한 측면에서, 본 발명은 항원-특이적 면역반응성 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 면역반응성 세포에 CD40L을 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 단계를 포함하고, 상기 면역반응성 세포는 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 갖는다. 비-제한적 구현예에서, 상기 CD40L을 암호화하는 핵산 서열은 상기 면역반응성 세포 내에서 구성적으로(constitutively) 또는 유도적으로(inducibly) 발현되고, 선택적으로 벡터 내에 포함되는 프로모터 요소(promoter element)에 작동가능하게 연결된다(operably linked). 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다. 비-제한적 구현예에서, 본 발명은 각각 선택적으로 상기 면역반응성 세포내에서 구성적으로 또는 유도적으로 발현되는 프로모터 요소에 작동가능하게 연결된 CAR을 암호화하고 CD40L을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 제공하며, 상기 핵산은 선택적으로 벡터 내에 포함될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명은 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 암호화하는 핵산 서열을 갖는 벡터를 제공한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다.
- [0025] 한 측면에서, 본 발명은 항원에 결합하는 항원 인식 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 CD40L을 암호화하는 핵산 서열을 갖는 벡터를 제공한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다. 한 특정 비-제한적 구현예에서, 본 발명은 항-CD19 CAR(1928z)- 및 CD40L-암호화 핵산을 함유하는 레트로바이러스 벡터를 제공한다.
- [0026] 연관된 측면에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 부형제 내에 본 명세서에서 기술된 본 발명의 임의의 측면의 유효량의 면역반응성 세포를 함유하는 약학적 조성물을 제공한다. 다른 연관된 측면에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 부형제 내에 본 명세서에서 기술된 본 발명의 임의의 측면의 유효량의 종양 항원-특이적 T 세포를 함유하는 신생물의 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0027] 추가적인 측면에서, 본 발명은 신생물, 병원체 감염, 자가면역 질병 또는 동종성(allogenic) 이식을 치료하기 위한 키트를 제공하며, 상기 키트는 항원에 결합하고 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 갖는 면역반응성 세포를 함유한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 신생물, 병원체 감염, 자가면역 질병 또는 동종성 이식을 갖는 개체의 치료용으로 세포를 사용하기 위한 기록된 설명서를 추가로 함유한다.
- [0028] 추가적인 측면에서, 본 발명은 신생물, 병원체 감염, 자가면역 질병 또는 동종성 이식의 치료용 키트를 제공하며, 상기 키트는 항원에 결합하고 면역반응성 세포를 활성화시키는 항원 인식 수용체를 갖고, 외인성 CD40L을 발현하는 면역반응성 세포를 함유한다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 CAR이다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 신생물, 병원체 감염, 자가면역 질병 또는 동종성 이식을 갖는 개체의 치료용으로 세포를 사용하기 위한 기록된 설명서를 추가로 함유한다.
- [0029] 추가적인 측면에서, 본 발명은 신생물, 병원체 감염, 자가면역 질병 또는 동종성 이식의 치료용 키트를 제공하며, 상기 키트는 치료되는 상기 신생물, 병원체 감염, 자가면역 질병 또는 이식의 항원을 인식하는 CAR을 암호화하는 핵산 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 암호화하는 핵산을 포함한다. 선택적으로, 하나 또는 양쪽 핵산 모두는 동일한 벡터(바이시스트론성(bicistronic))이거나 별개의 벡터일 수 있는 벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 CAR을 암호화하는 핵산 및/또는 상기 scFv를 암호화하는 핵산은 각각 동일하거나 상이한 프로모터일 수 있는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 신생물, 병원체 감염, 자가면역 질병 또는 동종성 이식을 갖는 개체의 치료용으로 세포를 사용하기 위한 기록된 설명서를 추가로 함유한다.
- [0030] 추가적인 측면에서, 본 발명은 암의 치료용 키트를 제공하며, 상기 키트는 암의 항원을 인식하는 CAR을 암호화하는 핵산 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 암호화하는 핵산을 포함한다. 선택적으로, 하나 또는 양쪽 핵산 모두는 동일한 벡터(바이시스트론성(bicistronic))이거나 별개의 벡터일 수 있는 벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 CAR을 암호화하는 핵산 및/또는 상기 scFv를 암호화하는 핵산은 각각 동일하거나 상이한 프로모터일 수 있는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 암을 갖는 개체의 치료용으로 세포를 사용하기 위한 기록된 설명서를 추가로 함유한다.
- [0031] 추가적인 측면에서, 본 발명은 암 또는 병원체-매개성 질병의 치료용 키트를 제공하며, 상기 키트는 암 또는 병원체의 항원을 인식하는 CAR을 암호화하는 핵산 및 면역억제 활성 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 암호화하는 핵산을 포함한다. 선택적으로, 하나 또는 양쪽 핵산 모두는 동일한 벡터(바이시스트론성(bicistronic))이거나 별개의 벡터일 수 있는 벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 CAR을 암호화하는 핵산 및/또는 상기 scFv를 암호화하는 핵산은 각각 동일하거나 상이한 프로모터일 수 있는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 암 또는 질병을 갖는 개체의 치료용으로 세포를 사용하기 위한 기록된 설명서를 추가로 함유한다. 추가적인 측면에서, 본 발명은 암 또는 병원체-매개성 질병의 치료용 키트를 제공하며, 상기 키트는 암 또는 병원체의 항원을 인식하는 CAR을 암호화하는 핵산 및 CD40L을 암호화하는 핵산을 포함한다. 선택적으로, 하나 또는 양쪽 핵산 모두는 동일한 벡터(바이시스트론성(bicistronic))이거나 별개의 벡터일 수 있는 벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 CAR을 암호화하는 핵산 및/또는 상기 CD40L을 암호화하는 핵산은 각각 동일하거나 상이한 프로모터일 수 있는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 암 또는 질병을 갖는 개체의 치료용으로 세포를 사용하기 위한 기록된 설명서를 추가로 함유한다.
- [0032] 본 명세서에서 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 조절성 T 세포, 인간 배아 줄기 세포 및 림프구성 세포가 분화될 수 있는 다능성(pluripotent) 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 면역반응성 세포는 자가성이다.
- [0033] 본 명세서에서 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 T 세포 수용체(TCR, T cell receptor) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 외인성 또는 내인성이다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 재조합적으로 발현된다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 벡터로부터 발현된다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체

의 세포내 신호전달 도메인(signaling domain)은 CD ζ -사슬, CD3 ζ -사슬, CD97, CD11a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, CD28 신호전달 도메인, 그의 일부 또는 이들의 조합이다. 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 항원 결합부위와 함께 CD28, 4-1BB 및/또는 CD3 ζ -사슬의 적어도 일부를 포함하는 CAR이다(예를 들면, Zhong et al, 2010, Molecular Ther. 18(2):413-420 참조). 비-제한적 구현예에서, 상기 항원 인식 수용체는 문헌(Kohn et al., 2011, Molecular Ther. 19(3):432-438)에 개시된 CAR이며, 선택적으로 상기 항원 결합 부위는 다른 종양 또는 병원체 항원에 결합하는 아미노산 서열로 치환된다. 다양한 구현예에서, 상기 세포는 1928z 또는 4H1128z인 재조합 또는 내인성 항원 수용체를 발현한다.

[0034] 본 명세서에서 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 항원은 종양 또는 병원체 항원이다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 종양 항원은 CD19, MUC16, MUC1, CAIX, CEA, CDS, CD7, CD10, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, 사이토메갈로바이러스(CMV) 감염된 세포 항원, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, 태아 아세토콜린 수용체, 폴레이트 수용체- α , GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R- α 2, κ -경쇄(light chain), KDR, LeY, L1 세포 부착 분자, MAGE-A1, 메소텔린(Mesothelin), NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 암태아 항원(oncofetal antigen)(h5T4), PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2 또는 WT-1 중 하나 이상이다. 특정 구현예에서, 상기 항원은 CD19 또는 MUC16이다. 상기 항원에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열은 본 기술분야에 알려져 있거나, 본 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 준비될 수 있다; 예로는 면역글로불린, 면역글로불린의 가변 영역(예컨대, 가변 절편("Fv") 또는 이가의(bivalent) 가변 절편("Fab")), 단일 사슬 항체 등을 포함한다.

[0035] 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 가용성 scFv가 분비된다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 scFv는 벡터로부터 발현된다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 면역억제성 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드 중 하나 이상이다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 면역자극성 폴리펩티드는 CD28, OX-40, 4-1BB 및 그의 리간드 중 하나 이상이다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 가용성 scFv는 면역반응성 세포의 면역 반응을 향상시킨다.

[0036] 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 면역반응성 세포는 사이토카인을 분비한다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 사이토카인은 벡터로부터 발현된다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 본 발명의 면역반응성 세포를 함유하는 약학적 조성물은 사이토카인을 함유한다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 본 발명의 면역반응성 세포는 사이토카인과 함께 투여된다. 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL7, IL12, IL15, IL21, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, 알파, 베타 또는 감마 인터페론 및 에리트로포이에틴(erythropoietin) 중 하나 이상이다.

[0037] 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 구현예에서, 상기 방법은 종양 세포의 수를 줄이고, 종양의 크기를 줄이고, 개체에서 종양을 근절하고, 개체에서 종양 부하를 줄이고, 및/또는 개체에서 종양 부하를 근절한다.

[0038] 본 발명이 사용될 수 있는 예시적인 신생물은 백혈병(예컨대, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수아구성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성적혈구 증가증, 림프종(호지킨 질환, 비-호지킨 질환), 발덴스트롬 맥크로글로불린혈증, 중쇄(heavy chain) 질환, 및 육종, 암종(예컨대, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 연골육종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 증피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭포선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간세포암, 나일관(nile duct) 암종, 융모암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름 종양, 경부암, 자궁암, 고환암, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종(glioma), 성상 세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관아세포종, 청신경종, 핑지교종, 신경초종(schwannoma), 뇌수막종, 흑색종, 신경아세포종 및 망막아세포종)과 같은 고형 종양을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 명세서에 기술된 임의의 측면의 다양한 비-제한적 구현예에서, 상기 신생물은 혈액암, B 세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병, 비-호지킨 림프종 및 난소암 중 하나 이상이다. 어떤 구현예에서, 상기 혈액암은 B 세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병, 비-호지킨 림프종 중 하나 이상이다. 특정 구현예에서, 상기 신생물은 B 세포 백혈병이고, 상기

항원은 CD19이며, 면역억제 활성을 갖는 상기 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드 중 하나 이상이다. 특정 구현예에서, 상기 신생물은 다발성 골수종이고, 상기 항원은 CD19이며, 면역억제 활성을 갖는 상기 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드 중 하나 이상이다. 특정 구현예에서, 상기 신생물은 급성 림프아구성 백혈병(ALL)이고, 상기 항원은 CD19이며, 면역억제 활성을 갖는 상기 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드 중 하나 이상이다. 특정 구현예에서, 상기 신생물은 만성 림프구성 백혈병이고, 상기 항원은 CD19이며, 면역억제 활성을 갖는 상기 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드 중 하나 이상이다. 특정 구현예에서, 상기 신생물은 비-호지킨 림프종이고, 상기 항원은 CD19이며, 면역억제 활성을 갖는 상기 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드 중 하나 이상이다. 특정 구현예에서, 상기 신생물은 난소암이고, 상기 항원은 CD19이며, 면역억제 활성을 갖는 상기 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드 중 하나 이상이다.

[0040] 정의

[0041] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야의 기술자에 의해 보통 이해되는 의미를 갖는다. 다음의 참조문헌들은 본 기술분야의 기술자에게 본 발명에서 사용되는 많은 용어들의 일반적인 정의를 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 다음의 용어들은 달리 특정하지 않는 한 이들에 대해 아래에 기재한 의미를 갖는다.

[0042] "면역반응성 세포를 활성화시키는"은 세포 내에서 단백질 발현의 신호 전달 또는 변화를 유도하여 면역 반응을 개시하게 되는 것을 의미한다. 예를 들면, CD3 사슬이 리간드(ligand) 결합 및 면역수용체 티로신-기반의 억제 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITAM)에 대한 반응으로 클러스터될 때, 신호 전달 캐스케이드(cascade)가 생성된다. 어떤 구현예에서, 내인성 TCR 또는 외인성 CAR이 항원에 결합할 때, 결합된 수용체 주변의 많은 분자들(예컨대, CD4 또는 CD8, CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$, 등)의 클러스터링을 포함하는 면역학적 시냅스의 형성이 일어난다. 이러한 막 결합 신호화 분자들의 클러스터링은 CD3 사슬 내에 포함된 ITAM 모티프가 인산화되게 한다. 이러한 인산화는 다시 최종적으로 NF- κ B 및 AP-1과 같은 전사 인자를 활성화시키는 T 세포 활성화 경로를 개시한다. 상기 전사 인자는 증식을 위해 IL-2 생산을 증가시키기 위한 T 세포의 전체적인 유전자 발현 및 T 세포 매개성 면역 반응을 개시하기 위한 마스터 조절 T 세포 단백질의 발현을 유도한다. "면역반응성 세포를 자극시키는"은 강력하고 지속되는 면역 반응을 일으키게 되는 신호를 의미한다. 다양한 구현예에서, 이것은 면역 세포(예컨대, T-세포) 활성화 후에 일어나거나, CD28, CD137(4-1BB), OX40, CD40 및 ICOS를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 수용체를 통해 동시에 매개된다. 특정한 이론에 구애되는 일 없이, 복수의 자극성 신호를 받는 것은 강력하고 장기간의 T 세포 매개성 반응을 일으키는데 중요하다. 이러한 자극 신호를 받지 않으면, T 세포는 신속하게 억제되고 항원에 반응하지 않게 된다. 상기 공-자극성 신호의 효과는 다양하고 부분적으로만 이해되고 있지만, 이들은 일반적으로 완전하고 지속적인 근절을 위해 항원에 강력하게 반응하는 오래 생존하고, 증식성이며, 항-아포토시스적인 T 세포를 생성하기 위한 유전자 발현을 증가시키게 된다.

[0043] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "항원 인식 수용체"란 용어는 항원 결합에 대한 반응시 면역 세포(예컨대, T 세포)를 활성화시킬 수 있는 수용체를 나타낸다. 예시적인 항원 인식 수용체는 자연형 또는 내인성 T 세포 수용체 또는 종양 항원-결합 도메인이 면역 세포(예컨대, T 세포)를 활성화시킬 수 있는 세포내 신호화 도메인에 융합된 키메라 항원 수용체일 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "항체"란 용어는 온전한 항체 분자뿐만 아니라, 면역원(immunogen)-결합 능력을 유지하는 항체 분자의 절편도 의미한다. 이러한 절편은 또한 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 시험관내 및 생체내 모두에서 자주 도입된다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "항체"란 용어는 온전한 면역글로불린 분자뿐만 아니라 잘-알려진 활성 절편인 F(ab')₂ 및 Fab도 의미한다. 온전한 항체의 Fe 절편이 없는 F(ab')₂ 및 Fab 절편은 순환으로부터 보다 신속하게 제거되며, 온전한 항체의 비-특이적 조직 결합을 적게 가질 수 있다(Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). 본 발명의 항체는 전체의(whole) 자연형 항체, 양 특이성 항체; 키메라 항체; Fab, Fab', 단일 사슬 V 영역 절편(scFv), 융합 폴리펩티드 및 비전통적인 항체를 포함한다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "단일-사슬 가변 절편" 또는 "scFv"란 용어는 면역글로불린의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 영역이 공유결합으로 연결되어 VH:VL 헤테로다이머를 형성한 융합 단백질이다. 상기 중쇄(VH)

및 경쇄(VL)은 직접 연결되거나, 또는 VH의 N-말단과 VL의 C-말단을 연결하거나, 또는 VH의 C-말단과 VL의 N-말단을 연결하는 펩티드-암호화 링커(예컨대, 10, 15, 20, 25개 아미노산)에 의해 연결된다. 상기 링커는 보통 유연성을 위해 글리신이 풍부할 뿐만 아니라, 용해도를 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하다. 불변 영역이 제거되고 링커가 도입됨에도 불구하고, scFv 단백질은 원래의 면역글로불린의 특이성을 유지한다. 단일 사슬 Fv 폴리펩티드 항체는 허스턴 등의 문헌(Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)에 의해 개시된 것과 같이 VH- 및 VL-암호화 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현될 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,091,513호, 제5,132,405호 및 제4,956,778호; 미국 특허 공개 제20050196754호 및 제20050196754호 참조. 억제 활성을 갖는 길항성(antagonistic) scFv가 개시되어 있다(예컨대, 하기 문헌들 참조: Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40). 자극 활성을 갖는 작용성(agonistic) scFv가 개시되어 있다(예컨대, 하기 문헌들 참조: Peter et al., J Bio Chem 2003 25278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66).

[0046] "친화도"는 결합 강도를 측정한 것을 의미한다. 이론에 구애되는 일 없이, 친화도는 항원 조합 부위와 항원 결정기 사이의 입체화학적 맞춤(fit)의 근접함, 이들 사이의 접촉 면적의 크기, 및 대전된 기 및 소수성 기의 분포에 달려 있다. 친화도는 또한 가역적 복합체의 형성 후 항원-항체 결합의 강도를 나타내는 "결합도"란 용어를 포함한다. 항원에 대한 항체의 친화도를 계산하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있으며, 친화도를 계산하기 위한 결합 실험을 사용하는 것을 포함한다. 기능적 분석(예컨대, 유세포분석기 분석(flow cytometry assay))에서의 항체 활성은 또한 항체 친화도를 반영한다. 항체 및 친화도는 기능적 분석(예컨대, 유세포분석기 분석)을 이용하여 표현형적으로(phenotypically) 특성분석 및 비교될 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"란 용어는 면역 세포를 활성화 또는 자극시킬 수 있는 세포내 신호화 도메인에 융합된 항원-결합 도메인을 나타낸다. 가장 흔하게는, 상기 CAR의 세포의 결합 도메인은 쥐(murine) 또는 인간화 단일클론 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 영역을 융합시킴으로써 유래되는 단일 사슬 가변 절편(scFv)으로 이루어진다. 다른 한편으로, scFv는 (예컨대, Fab 라이브러리로부터 입수된 항체로부터 유래되는 대신에) Fab로부터 유래된 것이 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 상기 scFv는 막통과(transmembrane) 도메인에 융합된 후 세포내 신호화 도메인에 융합된다. "1세대" CAR은 항원 결합시 CD3 ζ 신호만을 제공하는 것들을 포함하며, "2세대" CAR은 공자극(예컨대, CD28 또는 CD137) 및 활성화(CD3 ζ) 모두를 제공하는 것들을 포함한다. "3세대" CAR은 복수의 공자극(예컨대, CD28 및 CD137) 및 활성화(CD3 ζ)를 제공하는 것들을 포함한다. 다양한 구현예에서, 상기 CAR은 항원에 대해 높은 친화도 또는 결합도를 갖도록 선택된다.

[0048] "면역억제 활성"이란 용어는 세포(예컨대, 활성화된 면역반응성 세포) 내에서 신호 전달을 유도하거나 단백질 발현을 변화시켜 면역 반응을 감소시키게 되는 것을 의미한다. 그 결합을 통해 면역 반응을 억제 또는 감소시키는 것으로 알려져 있는 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4, 및 SIRPa, PD-L1, PD-L2, B7-1 및 B7-2를 포함하는 그의 대응하는 리간드를 포함한다. 이러한 폴리펩티드는 종양 미세환경 내에 존재하고, 신생물 세포에 대한 면역 반응을 억제한다. 다양한 구현예에서, 면역억제성 폴리펩티드 및/또는 그의 리간드의 상호작용을 억제, 차단 또는 상쇄(antagonizing)하면, 면역반응성 세포의 면역 반응을 향상시킨다.

[0049] "면역자극 활성"이란 용어는 세포(예컨대, 활성화된 면역반응성 세포) 내에서 신호 전달을 유도하거나 단백질 발현을 변화시켜 면역 반응을 증가시키게 되는 것을 의미한다. 면역자극 활성은 전-염증성 활성을 포함할 수 있다. 그 결합을 통해 면역 반응을 자극 또는 증가시키는 것으로 알려져 있는 폴리펩티드는 CD28, OX-40, 4-1BB, 및 B7-1, B7-2, OX-40L 및 4-1BBL을 포함하는 그의 대응하는 리간드를 포함한다. 이러한 폴리펩티드는 종양 미세환경 내에 존재하고, 신생물 세포에 대한 면역 반응을 활성화시킨다. 다양한 구현예에서, 전-염증성 폴리펩티드 및/또는 그의 리간드를 촉진, 자극 또는 보강(agonizing)하면, 면역반응성 세포의 면역 반응을 향상시킨다.

[0050] "CD3 ζ 폴리펩티드"는 NCBI 참조 번호: NP_932170 또는 활성화 또는 자극 활성을 갖는 그의 절편과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성(identity)을 갖는 단백질을 의미한다. 예시적인 CD3 ζ 은 하기 서열 번호 1로 제공된다.

```
1 mkwkalfataa ilqaqlpita aqsfglldpk lcyllldgilf iygviltalf lrvkfsrsad
61 apayqggqng lyneinlgr eeydvldkrr grdpemggkp qrrknpqegl ynelqkdkma
121 eayseigmkg errrgkghdg lyqglstatk dtydahmqa lppr
```

[0051]

"CD3 3 핵산 분자"는 CD3 3 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0052]

"CD28 폴리펩티드"는 NCBI 참조 번호: NP_006130 또는 자극 활성을 갖는 그의 절편과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질을 의미한다. 예시적인 CD28은 하기 서열번호 2로 제공된다.

[0053]

```
1 mlrlillaln1 fpsiqvtgnk ilvkqspmlv aydnawnlsc kysynlfsre frasihkgld
61 savevcvvyg nysqqlqvys ktgfncdgkl gnesvtfylq nlyvntdiy fckievmypp
121 pyldnekang tiihvkghl cpsplfpgps kpfwvlvvyg gvlacysllv tvafiifwvr
181 skrsrllhsd ymmtprrpg ptrkhyqpya pprdfaayrs
```

[0054]

"CD28 핵산 분자"는 CD28 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0055]

"CD40L 폴리펩티드"는 CD40 리간드인 NCBI 참조 서열: NP_000065, 진뱅크 참조 번호 GenBank: AAH74950.1 또는 그의 절편과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질, 또는 다음의 프라이머 (1) 5'-CACGTGCATGATCGAAACATACAACCAAACTTCTCCCGATCTGC-3'(서열번호 3) 및 (2) 5'-CTCGAGGGATCCTCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGA-3'(서열번호 4)를 이용하여 단리된 건강한 공여자 PBMC로부터 PCR 증폭된 핵산에 의해 암호화되는 단백질을 의미한다(도 22a).

[0056]

"CD40L 핵산 분자"는 CD40 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0057]

"4-1BB 폴리펩티드"는 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor, TNF) 리간드로서 작용하는 NCBI 참조 번호: P41273 또는 NP_001552 또는 그의 절편과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질을 의미한다. 예시적인 4-1BB는 하기 서열번호 5로 제공된다.

[0058]

```
1 mgnscyniva tllllvlnfer trslqdpesn cpagtfcdnn rnqicspcpp nsfssaggqr
61 tedicrqckg vfrtrkccss tsnaecdctp gfhclgagcs mceqdckggq eltkkgckdc
121 cftgtfndqkr giorpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtpapare
181 pghspqiisf flaltstall filffltlrf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqttgeedg
241 cscrpfpeeee ggcel
```

[0059]

"4-1BBL 핵산 분자"는 4-1BBL 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0060]

"OX40L 폴리펩티드"는 종양 괴사 인자(TNF) 리간드인 NCBI 참조 번호: BAB18304 또는 NP_003317 또는 그의 절편과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질을 의미한다(서열번호 6).

[0061]

```
1 mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv iqqglgllcf tyiclhfsal qvshrypriq
61 sikvqfteyk kekgtfilsq kedeimkvqn nsviincdgf ylislkgyfs qevnislhyq
121 kdeepflqik kvrsvnslmv asltykdkvy lnttdntsl ddfhvnggel ilihqnpgef
181 cvl
```

[0062]

"OX40L 핵산 분자"는 OX40L 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0063]

"1929z"는 하기에 제공되는 서열과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질을 의미하며, 아미노산 1-18에서의 CDS 리더 서열을 포함하고, CD19에 결합할 수 있다(서열번호 7).

[0064]

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNW
VKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSED
SAVYFCARKTISSVVDYFYDYWGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQS
PKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKFLIYSATYRNSGVPDR
FTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVM
YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLV
VAFIIFWVRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFS
RSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPRX

[0065]

[0066]

CDS 리더 서열을 포함하는 1928z 폴리펩티드를 암호화하는 예시적인 핵산 서열은 하기 서열번호 8로 제공된다.

ccatggctctcccagtgactgccctactgcttcccctagcgcttctcctgcatg
cagaggtgaagctgcagcagctctggggctgagctggtgaggcctgggtcctcag
tgaagatttccctgcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaact
gggtgaagcagaggcctggacagggctcttgagtggttgacagatttatcctg
gagatggtgataactacaatggaaagttcaagggtcaagccacactgactg
cagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcggcctaacatctgagg
actctgcggctctatttctgtgcaagaaagaccattagttcggtagtagatttct
actttgactactggggccaagggaaccacgggtcacctgctcctcaggtggaggtg
gatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctgacattgagctcacccagt
ctccaaaattcatgtccacatcagtaggagacaggggtcagcgtcacctgcaagg
ccagtcagaatgtgggtactaatgtagcctggtatcaacagaaaccaggacaat
ctcctaaaccactgatttactcggcaacctaccggaacagtgagtccttgatc
gcttcacaggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcactaacgtgc
agtctaaagacttggcagactatttctgtcaacaatataacaggtatccgtaca
cgtccggaggggggaccaagctggagatcaaacggggcgccgcaattgaagtta
tgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatg
tgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccct
tttgggtgctggtggtggtggtggagtctggtgctatagcttgctagtaa
cagtggtcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcaca
gtgactacatgaacatgactccccgcgcgcggggccaccgcgaagcattacc
agccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttca
gcaggagcgcagagcccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacg
agctcaatctaggacgaagagagaggtacgatgttttggaagagagcgtggcc
gggacctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgt
acaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatga
aaggcgagcgcggaggggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtctcagta
cagccaccaaggacacctaagcagcgccttcacatgcaggccctgccccctcgcg

[0067]

[0068]

"4H1128z"는 하기에 제공되는 서열과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질을 의미하며, 아미노산 1-18에서의 CDS 리더 서열을 포함하고, MUC에 결합할 수 있다(서열번호 9).

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQESGGGFVKPGGSLKVS CAASGFTFSSYAMSW
 VRLSPEMRLEWVATISSAGGYIFYSDSVQGRFTISRDNANTLHLQMGS LRSGD
 TAMYYCARQGFGNYGDYYAMDYWGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQ
 SPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSRTRKNQLAWYQQKPGQSPPELLIYWASTR
 QSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQSYNLLTFGPGTKLEIKRA
 AAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP\$PLFPGPSKPFVWL VVGGVLAC
 YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHS DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR
 SRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
 ALPPR

[0069]

[0070]

카과 리더 서열을 포함하는 4H1128z 폴리펩티드를 암호화하는 예시적인 핵산 서열은 하기 서열번호 10으로 제공 된다.

ccatggctctcccagtgactgccctactgcttcccctagcgcttctcctgcatg
 cagaggtgaagctgcaggagtcagggggaggcttcgtgaagcctggaggggtccc
 tcaaagctctcctgtgcagcctctggattcactttcagtagctatgccatgtcct
 ggggttcgcctgagtcgggagatgaggctggagtggtcgcaaccattagcagtg
 ctggtggttacatcttctattctgacagtggtgcagggacgattcaccatttcca
 gagacaatgccaagaacacctgcacctgcaaattgggcagtgctgaggtctgggg
 acacggccatgtattactgtgcaaggcagggatttggttaactacggtgattact
 atgctatggactactggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggag
 gtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctgacattgagctcacc
 agtctccatcctcctggctgtgtcagcaggagagaaggctcactatgagctgca
 aatccagtcagagtgctgtcaacagtagaaccgcgaagaaccagttggcttggt
 accagcaaaaaccaggacagtgctcctgaactgctgatctactgggcattccacta
 ggcaatctggagtccttgatcgcttcacaggcagtggtatctgggacagatttca
 ctctcaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctggcagtttattactgccagc
 aatcttataatctactcacgttcggctcctgggaccaagctggagatcaaacggg
 cggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagca
 atggaaccattatccatgtgaaagggaacacctttgtccaagtcacctatcttc
 ccggaccttctaagcccttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggctt
 gctatagcttgctagtaacagtggtcctttattattttctgggtgaggagtaaga
 ggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcgcgcgcgggc
 ccaccgcgaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatc
 gctccagagtgaaagttcagcaggagcgcagagcccccgcgtagcagcaggcc
 agaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttt
 tggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaaga
 accctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct
 acagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggagggggaaggggcacgatggcc
 tttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgc
 aggccctgccccctcgc

[0071]

[0072] "B6H12.2 scFv"는 하기에 제공되는 서열과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질을 의미하며, CD47에 결합할 수 있다(서열번호 11).

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVAT
ITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSL
AGNAMDYWGQTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVTPGD
RVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFAQSISGIPSRFSGSGS
GSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKEQKLISEEDL

[0073]

[0074] "5C4 scFv"는 하기에 제공되는 서열과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질을 의미하며, 인간 PD-1에 결합할 수 있다(서열번호 12).

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV
IWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND
DYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS
CRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFT
LTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

[0075]

[0076] "J43 scFv"는 하기에 제공되는 서열과 적어도 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 단백질을 의미하고, 아미노산 1-21에서의 카파 리더 서열을 포함하며, 인간 PD-1에 결합할 수 있다(서열번호 13).

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDMGLGLQWVFFVALLKGVHCEVRLLES GGGLVKP
EGSLKLSCVASGFTFSDFYMSWVRQAPGKGLEWVAHIYTKSYNYATYYSGSVKG
RFTISRDDSRSMVYLQMNNLRTEDTATYYCTRDGSGYPSLDFWGQGTQVTVSSA
TTTAPSVYPLAPACDSTTKSGGGGSGGGGSGGGGSELTQPPSASVNVGETVKI
TCSGDQLPKYFADWFHQSDQITLQVIYDDNKRPSGIPERISGSSSGTTATLTI
RDVRAEDEGDYYCFSGYVDSKLYVFGSGTQLTVLGGPKSSPKVTVFPPSPEE
LRTNKATLVCLVNDFYPGSATVTWKANGATINDGVKTTKPSKQGQNYMTSSYLS
LTADQWKSHNRVSCQVTHEGETVEKSLSPAECLEQKLISEEDL*

[0077]

[0078] 카파 리더 서열을 포함하는 J43 scFv 폴리펩티드를 암호화하는 예시적인 핵산 서열은 하기 서열번호 14로 제공된다.

ccATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTT
 CCACTGGTGACatgggattgggactgcagtgggttttctttgttgctcttttaa
 aagggtgtccactgtgaggtgcggtctctggagtctggtggaggattagtgaagc
 ctgaggggtcactgaaactctcctgtgtggcctctggattcaccttcagtgact
 atttcatgagctgggtccgccagggtccagggaaggggtggagtgggttgctc
 acatatacacgaaaagttataattatgcaacttattactcgggttcgggtgaaag
 gcagattcaccatctccagagatgattcccgaagcatggtctacctgcaaatga
 acaacctgagaactgaggacacggccacttattactgtacaagagatggaagcg
 gatatccctctcttggttttctgggtcaagggaaccaagtcaactgtctcctcag
 ccacaacaacagccccatctgtctatcccttggccctgctgtgacagcacaa
 ccaaatcggttgagggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctT
 atgagctgactcagccaccttcagcatcagtcaatgtaggagagactgtcaaaa
 tcacctgctctggggaccaattgccgaaatattttgcagattggtttcatcaaa
 ggtcagaccagaccattttgcaagtgatatatgatgataataagcgccctcgg
 ggatccctgaaagaatctctgggtccagctcagggacaacagccaccttgacca
 tcagagatgtccgggtgaggatgaaggtgactattactgtttctcaggatatg
 ttgatagtgatagcaaattgtatgtttttggcagcggaaaccagctcacctcc
 taggtggaccaagtcttctcccaaagtcacagtgtttccaccttcacctgagg
 agctccggacaaacaaagccacactgggtgtgtctggttaatgacttctaccgg
 gttctgcaacagtgacctggaaggcaaatggagcaactatcaatgatgggtga
 agactacaaagccttccaaacagggccaaaactacatgaccagcagctacctaa
 gtttgacagcagaccagtggaaatctcacaacaggggttctcctgccaagttacc
 atgaaggggaaactgtggagaagagtttgtccctgcagaatgtctcgaacaaa
 aactcatctcagaagaggatctgTAActcgag

[0079]

[0080]

본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 절편을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 이러한 핵산 분자는 내인성 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 전형적으로 실질적인 동일성을 나타낼 것이다. 내인성 서열에 대해 "실질적인 동일성"을 갖는 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 이중-가닥 핵산 분자의 적어도 한 가닥과 교잡할 수 있다. "교잡하는"은 다양한 엄중성(stringency) 조건 하에 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열들(예컨대, 본 명세서에서 개시된 유전자), 또는 그의 일부와 이중-가닥 분자의 쌍을 형성하는 것을 의미한다(예컨대, Wahi, G.M. and S.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507 참조).

[0081]

예를 들면, 엄중한 염 농도는 대개는 약 750 mM NaCl 및 75 mM 트리나트륨 시트레이트 이하, 바람직하게는 약 500 mM NaCl 및 50 mM 트리나트륨 시트레이트 이하, 및 보다 바람직하게는 약 250 mM NaCl 및 25 mM 트리나트륨 시트레이트 이하일 것이다. 낮은 엄중성 교잡은 포름아미드와 같은 유기 용매의 존재시에 얻어질 수 있고, 높은 엄중성 교잡은 적어도 약 35% 포름아미드, 보다 바람직하게는 적어도 약 50% 포름아미드의 존재시에 얻어질 수 있다. 엄중한 온도 조건은 대개는 적어도 약 30℃, 보다 바람직하게는 적어도 약 37℃, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 42℃의 온도를 포함할 것이다. 교잡 시간, 나트륨 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS)와 같은 계면활성제의 농도, 및 담체 DNA의 포함 또는 배제와 같은 다양한 추가적인 파라미터는 본 기술분야의 기술자에게 잘 알려져 있다. 다양한 레벨의 엄중성은 필요에 따라 상기 다양한 조건들을 조합함으로써 달성된다. 바람직한 구현예에서, 교잡은 750 mM NaCl, 75 mM 트리나트륨 시트레이트 및 1% SDS 내에서 30℃에서 일어날 것이다. 보다 바람직한 구현예에서, 교잡은 500 mM NaCl, 50 mM 트리나트륨 시트레이트, 1% SDS, 35% 포름아미드 및 100 µg/ml의 변성된(denatured) 연어 정자 DNA(ssDNA) 내에서 37℃에서 일어날 것이다. 가장 바람직한 구현예에서, 교잡은 250 mM NaCl, 25 mM 트리나트륨 시트레이트, 1% SDS, 50% 포름아미드 및 200 µg/ml

의 ssDNA 내에서 42℃에서 일어날 것이다. 상기 조건들에 대한 유용한 변동(variation)은 본 기술분야의 기술자에게 즉시 명확할 것이다.

- [0082] 대부분의 적용분야의 경우, 교잡 후의 세척 단계는 또한 엄중성이 다양할 것이다. 세척 엄중성 조건은 염 농도 및 온도에 의해 정의될 수 있다. 상기와 같이, 세척 엄중성은 염 농도를 감소시키거나 온도를 증가시킴으로써 증가될 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에 대한 엄중한 염 농도는 바람직하게는 약 30 mM NaCl 및 3 mM 트리나트륨 시트레이트 이하일 것이고, 가장 바람직하게는 15 mM NaCl 및 1.5 mM 트리나트륨 시트레이트 이하일 것이다. 세척 단계에 대한 엄중한 온도 조건은 대개는 적어도 약 25℃, 보다 바람직하게는 적어도 약 42℃, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 약 68℃의 온도를 포함할 것이다. 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 30 mM NaCl, 3 mM 트리나트륨 시트레이트 및 0.1% SDS 내에서 25℃에서 일어날 것이다. 보다 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 트리나트륨 시트레이트 및 0.1% SDS 내에서 42℃에서 일어날 것이다. 보다 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 트리나트륨 시트레이트 및 0.1% SDS 내에서 68℃에서 일어날 것이다. 상기 조건들에 대한 추가적인 변동은 본 기술분야의 기술자에게 즉시 명확할 것이다.
- [0083] 교잡 기술은 본 기술분야의 기술자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들면 하기 문헌들에 개시되어 있다: Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Rogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmei (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [0084] "실질적으로 동일한"은 참조 아미노산 서열(예를 들면, 본 명세서에 개시된 아미노산의 임의의 하나) 또는 핵산 서열(예를 들면, 본 명세서에 개시된 핵산 서열의 임의의 하나)과 적어도 50% 동일성을 나타내는 폴리펩티드 또는 핵산 분자를 의미한다. 바람직하게는, 이러한 서열은 아미노산 또는 핵산 레벨에서 비교를 위해 사용된 서열과 적어도 60%, 보다 바람직하게는 80% 또는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 95% 또는 심지어 99% 동일하다.
- [0085] 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어를 이용하여 측정된다(예를 들면, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST, BESTFIT, GAP, 또는 PILEUP/PRETTYBOX 프로그램). 이러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실 및/또는 다른 변형에 대한 상동성(homology) 정도를 배치함으로써 동일하거나 유사한 서열을 일치시킨다. 보존적 치환은 전형적으로 다음 군 내에서의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소루신, 루신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 동일성의 정도를 결정하기 위한 예시적인 접근법에서, 매우 연관된 서열을 나타내는 e-3 및 e-100 사이의 가능성 점수를 이용하여 BLAST 프로그램이 사용될 수 있다.
- [0086] "유사체(analog)"는 참조 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 기능을 갖는 구조적으로 연관된 폴리펩티드 또는 핵산 분자를 의미한다.
- [0087] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "리간드"란 용어는 수용체에 결합하는 분자를 나타낸다. 특히, 상기 리간드는 다른 세포 상의 수용체에 결합하여 세포-대-세포 인식 및/또는 상호작용을 허용한다.
- [0088] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "구성적 발현(constitutive expression)"이란 용어는 모든 생리학적 조건 하에 서의 발현을 나타낸다.
- [0089] "질환"은 세포, 조직 또는 기관의 정상 기능을 손상시키거나 간섭하는 임의의 증상 또는 질병을 의미한다. 질환의 예는 신생물 또는 세포의 병원체 감염을 포함한다.
- [0090] "유효량"은 치료적 효과를 갖기에 충분한 양을 의미한다. 한 구현예에서, "유효량"은 신생물의 지속적인 증식, 성장 또는 전이(예컨대, 침입 또는 이동)를 정지, 개선 또는 억제하기에 충분한 양이다.
- [0091] "내인성"은 세포 또는 조직 내에서 보통 발현되는 핵산 분자 또는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0092] "내성의 강화(enforcing tolerance)"는 이식된 기관 또는 조직을 표적화하는 자가-반응성 세포 또는 면역반응성 세포의 활성을 방지하는 것을 의미한다.
- [0093] "외인성"은 세포 내에 내인성으로 존재하지 않거나, 과-발현되었을 때 얻어지는 기능적 효과를 달성하기에 충분한 레벨로 존재하지 않는 핵산 분자 또는 폴리펩티드를 의미한다. 따라서, "외인성"이란 용어는 세포 내에서 발현되는 예컨대 외래의, 이종성(heterologous)의 임의의 재조합 핵산 분자 또는 폴리펩티드 및 과-발현된 핵산

분자 및 폴리펩티드를 포괄할 것이다.

- [0094] "이중성 핵산 분자 또는 폴리펩티드"는 세포 또는 세포로부터 입수된 샘플 내에 보통 존재하지 않는 핵산 분자(예컨대, cDNA, DNA 또는 RNA 분자) 또는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 핵산은 다른 유기체(organism) 유래일 수 있거나, 예를 들면 세포 또는 샘플에서 보통 발현되지 않는 mRNA 분자일 수 있다.
- [0095] "면역반응성 세포"는 면역 반응에서 기능을 하는 세포 또는 선조(progenitor) 또는 그의 자손(progeny)을 의미한다.
- [0096] "증가하는"은 적어도 5%까지 양성적으로 변경하는 것을 의미한다. 변경은 5%, 10%, 25%, 30%, 50%, 75%, 또는 심지어 100%까지 일 수 있다.
- [0097] "단리된 세포"는 자연적으로 세포와 동반하는 분자 및/또는 세포 성분으로부터 분리된 세포를 의미한다.
- [0098] "단리된", "정제된" 또는 "생물학적으로 정제된"이란 용어는 그 자연 상태에서 발견되는 것과 같이 보통 동반하는 성분이 다양한 정도로 없는 물질을 나타낸다. "단리물(isolate)"은 원래의 공급원(source) 또는 주위환경(surrounding)으로부터 분리된 정도를 나타낸다. "정제"는 단리보다 더 높은 분리 정도를 나타낸다. "정제된" 또는 "생물학적으로 정제된" 단백질은 다른 물질이 충분히 없어서 임의의 불순물이 상기 단백질의 생물학적 특성에 물질적으로 영향을 미치지 않거나 다른 불리한 결과를 초래하지 않는다. 즉, 본 발명의 핵산 또는 펩티드는 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 때 세포성 물질, 바이러스성 물질, 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학적 잔구체 또는 다른 화학물질이 없다면 정제된 것이다. 순도 및 동질성(homogeneity)은 전형적으로 분석적 화학 기술, 예를 들면 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 결정된다. "정제된"이란 용어는 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 필수적으로 하나의 밴드를 생성할 때 나타낼 수 있다. 변형, 예를 들면 인산화 또는 글리코실화를 당할 수 있는 단백질의 경우, 상이한 변형은 별도로 정제될 수 있는 상이한 단리된 단백질을 생성할 수 있다.
- [0099] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "중양 항원-결합 도메인"이란 용어는 중양 상에 존재하는 특정 항원 결정기 또는 항원 결정기 세트에 특이적으로 결합할 수 있는 도메인을 나타낸다.
- [0100] "제제를 입수하는"에서 "입수하는"이란 용어는 상기 제제(또는 나타낸 물질 또는 재료)를 구입, 합성 또는 달리 획득하는 것을 포함하는 의도이다.
- [0101] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "링커"는 2 이상의 폴리펩티드 또는 핵산을 공유적으로 부착해서 이들이 서로 연결되도록 하는 작용기(예컨대, 화학물질 또는 폴리펩티드)를 의미할 것이다. 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "펩티드 링커"는 2개의 단백질을 서로 커플링하기 위해(예컨대, V_H 및 V_L 도메인을 커플링하기 위해) 사용되는 하나 이상의 아미노산을 나타낸다. 본 발명에서 사용되는 예시적인 링커 서열은 GGGGSGGGSGGGGS이다.
- [0102] "조정하는"은 양성적으로 또는 음성적으로 변경하는 것을 의미한다. 예시적인 조정은 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 100% 변화를 포함한다.
- [0103] "신생물"은 세포 또는 조직의 병리학적 증식과 그 이후의 다른 조직 또는 기관으로의 이동 또는 침습에 의해 특징되는 질환을 의미한다. 신생물 성장은 전형적으로 조절되지 않고 진행형이며, 정상 세포의 증식을 일으키지 않거나 이의 증단을 초래하는 조건 하에 일어난다. 신생물은 방광, 뼈, 뇌, 유방, 연골, 교세포(glia), 식도, 나팔관, 쓸개, 심장, 내장, 신장, 간, 폐, 림프절, 신경 조직, 난소, 췌장, 전립선, 골격근, 피부, 척수, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 기도, 비뇨생식로, 요관, 요도 및 질로 이루어진 군으로부터 선택되지만 이에 한정되는 것은 아닌 기관, 또는 그의 조직 또는 세포 유형을 포함하는 다양한 세포 유형, 조직, 또는 기관에 영향을 미칠 수 있다. 신생물은 육종, 암종, 또는 형질세포종(혈장 세포의 악성 종양)과 같은 암을 포함한다.
- [0104] "병원체"는 질환을 초래할 수 있는 바이러스, 박테리아, 진균, 기생충 또는 프로토조아를 의미한다.
- [0105] 예시적인 바이러스는 레트로바이러스(예컨대, HIV-1(HDTV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III로도 불림)와 같은 인간 면역결핍 바이러스; 및 HIV-LP와 같은 다른 단리물); 피코르나바이러스(예컨대, 폴리오 바이러스, A 형 간염 바이러스; 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 에코바이러스); 칼시바이러스(예컨대, 위장염을 일으키는 균주); 토가바이러스(예컨대, 말 뇌염 바이러스, 루벨라 바이러스); 플라바이러스(예컨대, 뎅기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로노바이러스(예컨대, 코로나바이러스); 라브도바이러스(예컨대, 수포성 구내염 바이러스, 공수병 바이러스); 필로바이러스(예컨대, 에볼라 바이러스); 파라믹소바이러스(예컨대, 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스); 오르토믹소바이러스(예컨대, 인

플루엔자 바이러스); 봉가비리대(예컨대, 한탄 바이러스, 봉가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이라 바이러스); 아레나 비리대(출혈열 바이러스); 레오비리대(예컨대, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 비르나 비리대; 헤파드나비리대(B 형 간염 바이러스); 파르보비리대(파보바이러스); 파포바비리대(파필로마 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아테노비리대(대부분의 아테노바이러스); 헤르페스비리대(헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 1 및 2, 바리셀라 조스터 바이러스, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV), 헤르페스 바이러스); 폭스비리대(바리올라 바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스 바이러스); 및 이리도비리대(예컨대, 아프리카 돼지 열병 바이러스); 및 미분류 바이러스(예컨대, 델타 간염의 에이전트(agent)(B 형 간염 바이러스의 결합성 부수체(defective satellite)인 것으로 생각됨), 비-A, 비-B 간염의 에이전트(클래스 1 = 내부적으로 전염됨; 클래스 2 = 비경구적으로 전염됨(즉, C 형 간염)); 노르워크(Norwalk) 및 연관 바이러스, 및 아스트로바이러스)를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0106] 예시적인 박테리아는 파스퇴렐라, 스타필로코사이, 스트렙토코커스, 에스케리치아 콜라이, 슈도모나스 종 및 살모넬라 종을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 감염성 박테리아의 구체적인 예는 헬리코박터 피롤리스, 보렐리아 부르그도르페리, 레지오넬라 뉴모필리아, 마이코박테리아 속(예컨대, M. 투베르쿨로시스, M. 아비움, M. 인트라셀룰라레, M. 칸사이, M. 고르도네), 스타필로코커스 아우레우스, 네이세리아 고노로이애, 네이세리아 메닝기티디스, 리스테리아 모노시토게네스, 스트렙토코커스 피오게네스(A 군 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 아갈락티애(B 군 스트렙토코커스), 스트렙토코커스(비리단스 군), 스트렙토코커스 페칼리스, 스트렙토코커스 보비스, 스트렙토코커스(혐기성 속), 스트렙토코커스 뉴모니애, 병원성 캄필로박터 속(sp.), 엔테로코커스 속, 해모필루스 인플루엔제, 바실러스 안트라시스, 코리네박테리움 디프테리아, 코리네박테리움 속, 에리시펠로트릭스 루시오페티애, 클로스트리디움 페프프린저스, 클로스트리디움 테타니, 엔테로박터 아에로게네스, 클레브시엘라 뉴모니애, 파스투렐라 물토시다, 박테리오티스 속, 푸소박테리움 누클레아툼, 스트렙토바실러스 모닐리포르미스, 트레포네마 팔리디움, 트레포네마 페르테누에, 렙토스피라, 리케차, 및 악티노마이세스 이스라엘리를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0107] "수용체"는 세포막에 존재하고 하나 이상의 리간드에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 그의 일부를 의미한다.
- [0108] "줄이는"은 적어도 5%까지 음성적으로 변경하는 것을 의미한다. 변경은 5%, 10%, 25%, 30%, 50%, 75%, 또는 심지어 100%까지 일 수 있다.
- [0109] "인식하는"은 표적에 선택적으로 결합하는 것을 의미한다. 바이러스를 인식하는 AT 세포는 전형적으로 상기 바이러스에 의해 발현되는 항원에 결합하는 수용체를 발현한다.
- [0110] "참조물" 또는 "대조군"은 비교의 표준을 의미한다. 예를 들면, CAR 및 scFv를 발현하는 세포에 의한 scFv-항원 결합의 레벨은 CAR만을 발현하는 대응하는 세포에서의 scFv-항원 결합의 레벨과 비교될 수 있다.
- [0111] "분비되는"은 소포체, 골지체를 통해, 및 세포막에서 일시적으로 융합된 소포(vesicle)로서 분비 경로를 통해 세포로부터 방출되는 폴리펩티드를 의미하며, 상기 단백질을 세포 밖으로 방출한다.
- [0112] "신호 서열" 또는 "리더 서열"은 새로 합성된 단백질의 N-말단에 존재하고 분비 경로로의 진입을 인도하는 펩티드 서열(5, 10, 15, 20, 25, 30개 아미노산 길이)을 의미한다. 예시적인 리더 서열은 카파 리더 서열: METDTLLLVLLLVPGSTGD(서열번호 15)(인간), METDTLLLVLLLVPGSTGD(서열번호 16)(마우스); 및 CDS 리더 서열: MALPVTALLPLALLHAARP(서열번호 17)을 포함한다.
- [0113] "가용성"은 (예컨대, 막에 결합되지 않은) 수성 환경에서 자유롭게 확산할 수 있는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0114] "특이적으로 결합하는"은 관심있는 생물학적 분자(예컨대, 폴리펩티드)를 인식 및 결합하지만 자연적으로 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 생물학적 샘플과 같은 샘플 내의 다른 분자는 실질적으로 인식 및 결합하지 않는 폴리펩티드 또는 그의 절편을 의미한다.
- [0115] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "중양 항원"이란 용어는 정상 또는 비-IS 신생물 세포와 비교하여 중양 세포에서 구별되게 또는 달리 발현되는 항원(예컨대, 폴리펩티드)을 나타낸다. 본 발명과 관련하여, 중양 항원은 항원 인식 수용체(예컨대, CD19, MUC1)를 통해 면역 반응을 활성화 또는 유도할 수 있거나, 수용체-리간드 결합(예컨대, CD47, PD-L1/L2, B731/2)을 통해 면역 반응을 억제할 수 있는 중양에 의해 발현되는 임의의 폴리펩티드를 포함한다.
- [0116] "바이러스 항원"은 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스에 의해 발현되는 폴리펩티드를 의미한다.

- [0117] "포함하다", "포함하는"이란 용어는 미국 특허법에서 이들에 대해 개시하고 있는 넓은 의미를 의도하는 것이며, "함유하다", "함유하는" 등을 의미할 수 있다.
- [0118] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "치료"는 개인의 질환의 경로 또는 치료되는 세포를 변경하기 위한 시도에서의 임상적 개입을 나타내며, 예방을 위해 또는 임상적 병리의 경로 동안에 수행될 수 있다. 치료의 치료학적 효과는 질환의 출현 또는 재발을 방지하는 것, 증상을 완화하는 것, 질환의 임의의 직간접 병리학적 결과를 줄이는 것, 전이를 방지하는 것, 질환의 진행 속도를 감소시키는 것, 질환 상태를 개선 또는 완화시키는 것, 차도 또는 향상된 예후를 제한없이 포함한다. 질환 또는 질병의 진행을 방지함으로써, 치료는 병이 나거나 진단된 개체 또는 상기 질병을 갖는 것으로 의심되는 개체에서 질병으로 인한 악화를 방지할 수 있지만, 또한 치료는 질병의 위험이 있거나 상기 질병을 갖는 것으로 의심되는 개체에서 상기 질병 또는 질병 증상의 개시를 방지할 수 있다.
- [0119] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "개체"란 용어는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간을 나타낸다.
- [0120] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "면역손상된(immunocompromised)"이란 용어는 면역결핍을 갖는 개체를 나타낸다. 상기 개체는 대개 건강한 면역 시스템을 갖는 인간에서는 질환을 일으키지 않지만 기능이 약하거나 억제된 면역 시스템을 갖는 인간에게 영향을 미칠 수 있는 유기체에 의해 초래되는 감염인 기회 감염에 대해 매우 취약하다.
- [0121] 본 발명의 다른 측면들은 다음에 개시되며, 본 발명의 영역 이내이다.

과제의 해결 수단

- [0122] 본 발명은 일반적으로 적어도 항원-인식 수용체(예컨대, TCR 또는 CAR), 및 (i) 면역억제성 항원(예컨대, αPD-1, αPD-L1, αCTLA-4 또는 αCD47)에 결합하는 scFv, (ii) 면역자극성 항원(예컨대, αCD28, αOX-40 또는 α4-1BB)에 결합하는 scFv 또는 (iii) CD40L 중 어느 하나의 조합을 발현하는 유전적으로 변형된 면역반응성 세포(예컨대, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL) 세포)를 포함하는 세포, 및 이러한 세포를 신 생물 및 항원-특이적 면역 반응의 증가가 요구되는 다른 병리의 치료에 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명은 적어도 부분적으로는 면역억제성 항원(예컨대, 본 명세서에서 나타낸 것과 같은 CD47 및 PD-L1)에 결합하는 scFv가 면역반응성 세포를 활성화 및 자극시키는데 유용하다는 발견에 기초한다. 특히, 본 발명의 scFv는 종양 미세환경 내에서 활성화된 면역반응성 세포의 면역 반응이 억제되는 것을 감소시키거나 방지한다. 악성 세포는 그 자신을 면역 인식 및 제거로부터 보호하는 일련의 메커니즘을 개발하였다. 본 발명의 접근법은 종양 미세환경 내에서 종양 근절을 위한 면역원성을 제공하며, 종래 입양적 T 세포 치료에 대해 현저한 진보를 나타낸다.
- [0123] **종양 미세환경**
- [0124] 종양은 악성 세포가 그 자신을 면역 인식 및 제거로부터 보호하기 위한 일련의 메커니즘을 포함하는 숙주의 면역 반응에 적대적인 미세환경을 갖는다. 상기 "적대적 종양 미세환경"은 조절성 CD4⁺ T 세포(Treg, regulatory CD4⁺ T cell), 골수 유래 억제 세포(MDSC, myeloid derived suppressor cell), 종양 연관 대식세포(TAM, tumor associated macrophage), IL-10 및 TGF-β를 포함하는 면역 억제성 사이토카인의 침윤 및 활성화된 T 세포(CTLA-4 및 PD-1)에 의해 발현되는 면역 억제성 수용체를 표적으로 하는 리간드의 발현을 포함하는 다양한 면역 억제성 인자를 포함한다. 이러한 면역 억제 메커니즘은 내성의 유지 및 부적절한 면역 반응의 억제에 있어서 역할을 하지만, 상기 종양 미세환경 내에서 이러한 메커니즘은 효과적인 항-종양 면역 반응을 방지한다. 집합적으로, 이러한 면역 억제 인자는 표적화 종양 세포와 마주칠 때 뚜렷한 아네르기(anergy) 또는 입양적으로 전달된 CDR 변형된 T 세포의 아포토시스(apoptosis)를 유도할 수 있다.

[0125] 세포독성 T 림프구 항원 4(CTLA-4)

- [0126] CTLA-4는 활성화된 T 세포에 의해 발현되는 억제성 수용체로서, 그 대응하는 리간드(각각 CD80 및 CD86; B7-1 및 B7-2)에 의해 맞물릴 때, 활성화된 T 세포의 억제 또는 아네르기를 매개한다. 전임상 및 임상 연구 모두에서, 전신성 항체 주입에 의해 CTLA-4를 차단하면, 비록 임상적 세팅에서는 예측하지 못한 현저한 독성을 나타내었지만, 내인성 항-종양 반응을 향상시켰다. 특정 이론에 구애되는 일 없이, 종양 표적화 CAR 변형된 T 세포에 의한 길항성 scFv의 운반을 통한 표적화 CTLA-4를 차단하면 독성을 줄일 뿐만 아니라, 종양 표적화 T 세포의 대 용(surrogate) "내인성" 군집(CAR T 세포 군집)이 면역 억제로부터 보호되도록 한다. 전임상 연구(예컨대, B

세포 악성물 및 난소 암종의 인간 이중이식 종양 모델 및 뮤린(murine) 종양 모델을 사용하여 CAR 변형된 T 세포 군집뿐만 아니라 내인성 항-종양 면역 반응에 대한 scFv 분비의 효과를 평가할 수 있다. 항-CTLA-4 scFv는 마우스 항-마우스 CTLA-4 단일클론 항체를 분비하는 9D9 하이브리도마, 또는 햄스터 항-마우스 CTLA-4 단일클론 항체를 분비하는 9H10 하이브리도마로부터 생성될 수 있다.

[0127] **프로그램화 세포 죽음 단백질 1(PD-1)**

[0128] PD-1은 내인성 대식세포 및 수지상 세포에서 발견되는 대응하는 리간드인 PD-L1 및 PD-L2와 맞물릴 때 활성화된 T 세포의 음성적 면역 조절자이다. PD-L1의 상향조절(upregulation)은 종양 세포가 숙주의 면역 시스템을 피할 수 있는 한 메커니즘이다. 다시, 전임상 및 최근에 공개된 임상 시험에서, 길항성 항체에 의해 PD-1을 차단하면 숙주의 내인성 면역 시스템을 통해 매개되는 항-종양 반응을 유도하였다. 이중이식 및 동계성(syngeneic) 뮤린 종양 모델을 사용하여 종양 표적화 CAR 변형된 T 세포에 의해 분비된 길항성 항-PD-1 scFv가 상기 scFv를 분비하는 CAR 변형된 T 세포의 항-종양 효능을 향상시키는 것을 보일 수 있다.

[0129] **CD47**

[0130] CD47은 넓은 조직 분포를 갖고, 최근의 전임상 모델에서 넓은 범위의 종양 세포를 대식세포 인식으로부터 보호하는 것으로 나타난 막 단백질이다. 상기 모델에서, 항-CD47 단일클론 항체를 주입하면 확립된 종양의 진행이 감소하게 된다. 달리 말하면, 종양 세포 상의 CD47을 차단하면 상기 종양이 숙주 대식세포에 의해 인식 및 식작용(phagocytosis)되도록 노출되었다. 상기 항원이 다소 널리 발현됨을 고려할 때, 전신성 차단 항체를 주입하면 잠재적으로 표적-외(off-target) 독성을 유도할 수 있다. 다시, 표적화 운반의 패러다임을 유지하면서, CAR 변형된 T 세포에 의해 종양 미세환경에 직접 운반된 유사하게 차단하는 항-CD47 scFv를 분비하면 원하는 항-종양 효과를 유도/향상시키고, 이 경우 입양적 보다는 선천적(innate) 숙주 면역 시스템에 의해 매개된다. 또한, 상기 접근법은 신생물의 치료에 한정되는 것은 아니고, 항원-특이적 면역 반응의 증가가 요구되는 다양한 범위의 적용분야에 적용될 수 있으며, 이러한 적용분야는 신생물의 치료뿐만 아니라 병원체 감염 또는 감염성 질환에 대한 면역 반응을 향상시키는 것 및 자가면역 또는 동종 이식의 문맥에서 조절 T 세포에서의 면역 내성을 강화하는 것을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0131] **CD40L**

[0132] 종양 괴사 인자(TNF) 유전자 수퍼패밀리에 속하는 타입 II 막통과 단백질인 CD40 리간드(CD40L, CD154)는 종양 특이적 T 세포 기능을 향상시킬 잠재력을 갖는다. 처음에는 활성화된 CD4+ T 세포에서 확인되었으며, CD40L의 발현은 다양한 범위의 면역, 조절, 상피, 내피 및 평활근 세포에서 유도될 수 있다. 활성화된 T 세포에서, CD40L은 수분 내에 발현되고, 6시간 내에 피크이며, 이후 순차적으로 12-24시간에 걸쳐 감소된다. CD40L은 B 세포, 대식세포 및 수지상 세포(DC)를 포함하는 다양한 면역 및 비-면역 세포에서 구성적으로 발현되는 그 동족 수용체인 CD40에 결합한다. 중요하게는, CD40은 또한 만성 림프성 백혈병(CLL), 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 비-호지킨 림프종(NHL), 호지킨 림프종, 비인두 암종, 골육종, 유방 육종, 흑색종, 유방, 난소 및 경부 암종을 포함하는 몇 가지 조절 및 비-조절 악성물에서 발현되며, 이는 CAR/CD40L T 세포를 다양한 범위의 악성물에 적용할 잠재력을 나타낸다. 하기 실시예 6에 대한 참고문헌에서 나열된 참고문헌 8-17 참조.

[0133] **조혈 세포 혈통(lineage)**

[0134] 포유동물 조혈(혈액) 세포는 다양한 범위의 생리학적 활성을 제공한다. 조혈 세포는 림프성, 골수성 및 적혈구성 혈통으로 나누어진다. B, T 및 자연 살해(NK) 세포를 포함하는 림프성 혈통은 항체의 생산, 세포 면역 시스템의 조절, 혈액 내에서 외래 에이전트의 검출, 숙주에 외래인 세포의 검출 등을 제공한다. 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "T 세포"란 용어는 흉선에서 성숙되는 림프구를 나타내며, 세포-매개성 면역을 주로 책임진다. T 세포는 적응 면역 시스템에 관여한다. 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "자연 살해(NK) 세포"란 용어는 세포-매개성 면역의 일부이며 선천적 면역 반응 동안 작용하는 림프구를 나타낸다. 이들은 표적 세포에 대한 세포독성 효과를 수행하기 위하여 미리 활성화되는 것을 필요로 하지 않는다. 세포독성 T 세포(CTL 또는 킬러 T 세포)는 감염된 체세포 또는 종양 세포의 죽음을 유도할 수 있는 T 림프구의 서브세트(subset)이다.

[0135] **본 발명의 방법에서 사용하기 위한 세포**

[0136] 본 발명은 면역반응성 세포(예컨대, TCR, CAR)를 활성화시키는 항원-인식 수용체 및 면역억제성 항원(예컨대, αPD-1, αPD-L1, αCTLA-4 또는 αCD47)에 결합하는 scFv의 조합을 발현하는 세포 및 이러한 세포를 향상된 면역 반응을 필요로 하는 질환의 치료에 사용하는 방법을 제공한다. 한 접근법에서, 종양 항원-특이적 T 세포, NK 세포, CTL 세포 또는 다른 면역반응성 세포는 신생물의 치료 또는 예방을 위해 면역억제성 항원에 결합하는

scFv를 발현하도록 사용된다. 예를 들면, CD19를 인식하는 키메라 항원 수용체 1928z를 발현하는 T 세포는 CD47에 결합하는 scFv를 발현하는 T 세포 내에서 공-발현된다. 이러한 세포는 혈액암(예컨대, 백혈병, 림프종 및 골수종)의 치료 또는 예방을 위하여 이를 필요로 하는 인간 개체에 투여된다. 다른 접근법에서, 바이러스 항원-특이적 T 세포, NK 세포, CTL 세포는 바이러스 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 제1 CMV 항원을 인식하는 키메라 공-자극 항원 수용체 및 PD-1에 결합하는 scFv는 CMV를 치료하기 위하여 세포독성 T 림프구 내에서 공-발현된다.

[0137] 환자 자신의 T 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)라고 불리는 인공 T 세포 수용체를 암호화하는 유전자의 도입을 통해 종양을 표적화하기 위하여 유전적으로 변형될 수 있다. 1세대 CAR은 전형적으로 항체-유래의 항원 인식 도메인 및 단일 절편 길이 항체(scFv)로 이루어지고, 다양한 막통과 도메인에 융합되며, T 세포 수용체 사슬의 세포막 신호전달 도메인에 융합된다. C 사슬의 근처에 CD28, 4-1BB 및 OX-40을 포함하는 하나 또는 두 개의 공-자극성 수용체 신호전달 도메인을 추가로 포함하면 CAR 신호전달을 향상시키고, 각각 2세대 및 3세대 CAR을 생성한다.

[0138] *종양 항원-특이적 T 림프구(및 NK 세포)*

[0139] 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 종양 항원-특이적 인간 림프구의 유형은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형된 말초 공여자 림프구(Sadelain, M., et al., 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45), α 및 β 헤테로다이머를 포함하는 전장(full-length) 종양 항원-인식 T 세포 수용체 복합체를 발현하는 유전적으로 변형된 말초 공여자 림프구(Morgan, R.A., et al. 2006 Science 314:126-129), 종양 생검(biopsy) 내에서 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)로부터 유래되는 림프구 배양물(Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:4382-4392), 및 인공 항원-제공 세포(artificial antigen-presenting cell, AAPC) 또는 맥동(pulsed) 수지상 세포(Dupont, J., et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., et al. 2003 Blood 102:2498-2505)를 도입하는 선택적으로 시험관내에서 확장된 항원-특이적 말초 혈액 백혈구를 제한없이 포함한다. 상기 T 세포는 자가성, 동종, 또는 가공된 선조 또는 줄기 세포로부터 유래된 것일 수 있다.

[0140] 임의의 적합한 종양 항원(항원성 펩티드)이 본 명세서에서 개시된 종양-관련 구현예에서 사용하기에 적합하다. 항원의 공급원은 암 단백질을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 항원은 펩티드 또는 온전한 단백질 또는 그의 일부로서 발현될 수 있다. 상기 온전한 단백질 또는 그의 일부는 자연형 또는 돌연변이형일 수 있다. 적합한 항원은 전립선 특이적 막 항원(PSMA) 및 전립선 줄기 세포 항원(PCSA)을 포함한다.

[0141] *바이러스 항원-특이적 T 림프구(및 NK 세포)*

[0142] 예를 들면 면역손상된 개체에서의 병원체 감염 또는 다른 감염성 질환의 치료에 사용하기에 적합한 항원은 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스테인 바 바이러스(Epstein Barr Virus, EBV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 및 인플루엔자 바이러스에 존재하는 바이러스 항원을 제한없이 포함한다.

[0143] 상기 CTL의 정제되지 않은 공급원은 예컨대 태아의 간, 말초 혈액 또는 제대혈과 같은 골수, 태아, 신생아 또는 성인 또는 다른 조혈 세포 공급원과 같은 본 기술분야에 알려진 임의의 것일 수 있다. 다양한 기술이 상기 세포를 분리하기 위해 도입될 수 있다. 예를 들면, 음성 선택 방법은 비-CTL을 처음에 제거할 수 있다. mAb는 양성 및 음성 선택 모두의 경우에 특정 세포 혈통 및/또는 분화 단계와 연관된 마커를 확인하는데 특히 유용하다.

[0144] 최종적으로 분화된 세포들의 많은 비율이 상대적으로 대략적인 분리에 의해 처음에 제거될 수 있다. 예를 들면, 자성 비드 분리는 많은 수의 무관한 세포를 제거하기 위해 처음에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 총 조혈 세포의 적어도 약 80%, 보통 적어도 70%가 세포 단리 이전에 제거될 것이다.

[0145] 분리를 위한 절차는 밀도 구배 원심분리; 리세팅(resetting); 세포 밀도를 변형하는 입자에 대한 커플링; 항체-코팅된 자성 비드를 이용한 자성 분리; 친화 크로마토그래피; 보체(complement) 및 세포독소(cytotoxin)를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니며, mAb에 결합하거나 이와 함께 사용되는 세포독성 제제; 및 플레이트, 칩과 같은 고체 매트릭스에 부착된 항체를 이용한 패닝(panning), 세정 또는 임의의 다른 종래 기술을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0146] 분리 및 분석을 위한 기술은 복수의 컬러 채널, 낮은 각 및 둔감한(obtuse) 광 산란 검출 채널, 임피던스(impedance) 채널과 같은 다양한 정도의 소피스티케이션(sophistication)을 갖는 유세포분석을 포함하지만 이에

한정되는 것은 아니다.

- [0147] 상기 세포는 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI)와 같은 죽은 세포와 연관된 염료를 도입함으로써 죽은 세포에 대해 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 2% 소 태아 혈청(fetal calf serum, FCS) 또는 0.2% 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA) 또는 임의의 다른 적합한, 바람직하게는 멸균된 등장 배지를 포함하는 배지 내에 수집된다.
- [0148] 따라서, 본 발명은 일반적으로 제1 항원에 결합하고 면역반응성 세포를 활성화시키는 수용체 및 제2 항원에 결합하고 면역반응성 세포를 자극시키는 수용체를 포함하는 바이러스 특이적 또는 종양 특이적 T 세포와 같은 면역반응성 세포를 제공한다.
- [0149] **백터**
- [0150] 면역반응성 세포(예컨대, T 세포, CTL 세포, NK 세포)의 유전적 변형은 실질적으로 동질한(homogeneous) 세포 조성물을 재조합 DNA 구조체(construct)로 형질도입함으로써 달성될 수 있다. 바람직하게는, 레트로바이러스 백터(감마-레트로바이러스 또는 렌티바이러스 중 하나)가 DNA 구조체를 세포 내로 도입하기 위하여 도입된다. 예를 들면, 항원(예컨대, 종양 항원 또는 그의 변이체 또는 절편)에 결합하는 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 레트로바이러스 백터 내로 클로닝될 수 있고, 발현은 그 내인성 프로모터, 레트로바이러스 긴 말단 반복구조(long terminal repeat), 또는 관심있는 표적 세포 유형에 특이적인 프로모터로부터 구동될 수 있다. 비-바이러스 백터도 사용될 수 있다.
- [0151] 종양 또는 바이러스 항원-특이적 세포를 제공하기 위한 세포의 초기 유전적 변형을 위하여, 일반적으로 레트로바이러스 백터가 형질도입을 위해 도입되지만, 임의의 다른 적합한 바이러스 백터 또는 비-바이러스 운반 시스템이 사용될 수 있다. 적어도 2 가지 공-자극성 리간드를 포함하는 항원 제공 복합체를 포함하는 세포를 제공하기 위한 세포의 후속 유전적 변형을 위하여, 레트로바이러스 유전자 전달(형질도입)이 마찬가지로 효과적인 것으로 판명된다. 레트로바이러스 백터와 적절한 포장 라인의 조합이 또한 적합하며, 캡시드 단백질이 인간 세포의 감염을 위해 기능을 할 것이다. PA12(Miller, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317(Miller, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); 및 CRIP(Danos, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464)을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 다양한 암포트로픽(amphotropic) 바이러스를 생성하는 세포주가 알려져 있다. VSVG, RD114 또는 GALV 외피를 갖는 위형(pseudotype) 입자 및 본 기술 분야에 알려진 임의의 다른 입자와 같은 비-암포트로픽 입자도 또한 적합하다.
- [0152] 적합한 형질도입 방법은 또한 예컨대 브레그니 등의 문헌(Bregni, et al. (1992) Blood 80:1418-1422)의 방법에 의해 생성하는 세포를 이용하여 세포를 직접 공-배양하거나, 또는 바이러스 상등액(supernatant)만을 배양하거나, 예컨대 수 등의 문헌(Xu, et al. (1994) Exp. Hemat. 22:223-230) 및 휴즈 등의 문헌(Hughes, et al. (1992) J. Clin. Invest. 89:1817)의 방법에 의해 농축된 백터 스톡(stock)을 적절한 성장 인자 및 폴리양이온과 함께 또는 없이 배양하는 것을 포함한다.
- [0153] 다른 바이러스 백터의 형질도입을 사용하여 본 발명의 공-자극성 리간드를 면역반응 세포에서 발현할 수 있다. 바람직하게는, 상기 선택된 백터는 높은 감염 효율과 안정한 통합(integration) 및 발현을 나타낸다(예컨대, Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini et al., Science 272:263-267, 1996; 및 Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997 참조). 사용될 수 있는 다른 바이러스 백터는 예를 들면 아데노바이러스, 렌티바이러스 및 아데노-연관 바이러스 백터, 백시니아 바이러스, 소파필로마 바이러스 또는 엡스테인-바 바이러스와 같은 헤르페스 바이러스(예를 들면, 하기 문헌들의 백터들도 참조: Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:31 1-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller et al., Biotechnology 7:980-990, 1989; LeGal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993; and Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995)를 포함한다. 레트로바이러스 백터는 특히 잘 개발되어 있으며, 임상적 세팅에서 사용되고 있다(Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson et al., 미국 특허 제5,399,346호).
- [0154] 비-바이러스 접근법이 또한 세포 내에서 단백질을 발현하기 위해 도입될 수 있다. 예를 들면, 핵산 분자는 상기 핵산을 리포펙션(lipofection)(Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono et

al., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983), 아시알로오로소뮤코이드(asialoorosomuroid)-폴리라이신 접합(Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989)의 존재 하에 투여하거나, 또는 수술적 조건 하에 미세-주사(micro-injection)함으로써(Wolff et al., Science 247:1465, 1990) 세포 내로 도입될 수 있다.

[0155] 유전자 전달을 위한 다른 비-바이러스 수단은 칼슘 포스페이트, DEAE 텍스트란, 전기천공 및 프로토플라스트(protoplast) 융합을 이용한 시험관내 형질감염을 포함한다. 정상 유전자를 개체의 병이 난 조직 내로 이식하는 것은 또한 정상 핵산을 배양가능한 세포 유형(예컨대, 자가성 또는 이종성의 원형 세포 또는 그의 자손) 내로 생체외에서(ex vivo) 전달하고, 이후 상기 세포(또는 그의 후손)가 표적 조직 내로 주사되거나 전신적으로 주사됨으로써 달성될 수 있다. 재조합 수용체는 또한 전이효소(transposase) 또는 표적화 뉴클레아제(nuclease)(예컨대, 징크 핑거 뉴클레아제, 메가뉴클레아제 또는 TALE 뉴클레아제)를 이용함으로써 도출 또는 입수될 수 있다. RNA 전기천공에 의해 일시적 발현이 얻어질 수 있다. 폴리뉴클레오티드 치료 방법에서 사용하기 위한 cDNA 발현은 임의의 적합한 프로모터(예컨대, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV), 원숭이 바이러스 40(SV40), 또는 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터)로부터 지향되고, 임의의 적절한 포유동물 조절 인자 또는 인트론(예컨대, 연장 인자 1a 인핸서(enhancer)/프로모터/인트론 구조)에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, 필요시, 특정 세포 유형에서 우세하게 유전자 발현을 지향하는 것으로 알려진 인핸서를 사용하여 핵산의 발현을 지향할 수 있다. 사용되는 인핸서는 조직- 또는 세포-특이적 인핸서로 특정되는 것들을 제한없이 포함할 수 있다. 다른 한편으로, 게놈성 클론이 치료적 구조체로 사용된다면, 조절은 유사한 조절 서열에 의해 매개되거나, 필요시 전술한 임의의 프로모터 또는 조절 인자를 포함하는 이종성 공급원으로부터 유래되는 조절 서열에 의해 매개될 수 있다.

[0156] 결과물인 세포는 변형되지 않은 세포의 경우와 유사한 조건 하에 성장될 수 있으며, 상기 변형되지 않은 세포는 다양한 목적으로 확장 및 사용될 수 있다.

[0157] 폴리펩티드 및 유사체

[0158] 또한, 본 발명에는 면역반응성 세포에서 발현될 때 항-신생물 활성을 향상시키는 방식으로 변형된 aCD19, CD28, CD3 ζ , 4H1128z, B6H12.2 scFv, 5C4 scFv 및 J43 scFv 폴리펩티드 또는 그의 절편(예컨대, 인간화 단일클론 항체)이 포함된다. 본 발명은 서열 내에 변경(alteration)을 생성함으로써 아미노산 서열 또는 핵산 서열을 최적화하는 방법을 제공한다. 이러한 변경은 어떤 돌연변이, 결실, 삽입 또는 번역후 변형을 포함할 수 있다. 본 발명은 본 발명의 임의의 자연 발생형 폴리펩티드의 유사체를 추가로 포함한다. 유사체는 본 발명의 자연 발생형 폴리펩티드와 아미노산 서열의 차이, 번역후 변형 또는 이들 모두에 의해 상이할 수 있다. 본 발명의 유사체는 일반적으로 본 발명의 자연 발생형 아미노산 서열의 전부 또는 일부와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 나타낼 것이다. 서열을 비교하는 길이는 적어도 5, 10, 15 또는 20 개 아미노산 잔기, 바람직하게는 적어도 25, 50 또는 75개 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 100 개 이상의 아미노산 잔기이다. 다시, 동일성의 정도를 결정하는 예시적인 접근법에서, 매우 연관된 서열을 나타내는 e^{-3} 및 e^{-100} 사이의 가능성 점수를 이용하여 BLAST 프로그램이 사용될 수 있다. 변형은 폴리펩티드의 생체내 및 시험관내 화학적 유도, 예컨대 아세틸화, 카르복실화, 인산화 또는 글리코실화를 포함하며, 이러한 변형은 폴리펩티드 합성 또는 가공 동안에, 또는 단리된 변형 효소의 처리 후에 일어날 수 있다. 유사체는 또한 1차 서열에서의 변경에 의해 본 발명의 자연 발생형 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 이들은 자연형 또는 유도된 유전적 변이체를 포함한다(예를 들면, 조사(irradiation) 또는 에탄메틸설페이트에 대한 노출에 의하거나, 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), CSH Press, 1989, or Ausubel et al., supra)에서 개시된 것과 같은 위치-특이적 돌연변이유발(mutagenesis)에 의한 무작위 돌연변이유발의 결과물임). 또한, L-아미노산 이외의 잔기, 예컨대 D-아미노산 또는 비-자연 발생형 또는 합성 아미노산, 예컨대 베타(β) 또는 감마(γ) 아미노산을 함유하는 고리화 펩티드, 분자 및 유사체가 포함된다.

[0159] 전장 폴리펩티드에 더하여, 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드 또는 펩티드 도메인의 임의의 하나의 절편을 제공한다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "절편"이란 용어는 적어도 5, 10, 13 또는 15 개 아미노산을 의미한다. 다른 구현예에서, 절편은 적어도 20 개의 인접한(contiguous) 아미노산, 적어도 30 개의 인접한 아미노산, 또는 적어도 50 개의 인접한 아미노산이고, 다른 구현예에서는 적어도 60 내지 80, 100, 200, 300 개 이상의 인접한 아미노산이다. 본 발명의 절편은 본 기술분야의 기술자에게 알려진 방법에 의해 생성될 수 있거나, 보통의 단백질 가공의 결과물일 수 있다(예컨대, 생물학적 활성에 필요하지 않은 발생기의(nascent) 폴리펩티드

로부터 아미노산을 제거하거나, 대안적인 mRNA 스플라이싱(splicing) 또는 대안적인 단백질 가공 사건에 의해 아미노산을 제거함).

[0160] 비-단백질 유사체는 본 발명의 단백질의 기능적 활성을 모방하도록 디자인된 화학적 구조를 갖는다. 이러한 유사체는 본 발명의 방법에 따라 투여된다. 이러한 유사체는 원래 폴리펩티드의 생리학적 활성을 상회할 수 있다. 유사체의 디자인 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 유사체의 합성은 면역반응성 세포에서 발현될 때 결과물인 유사체가 원래 폴리펩티드의 항-신생물 활성을 증가시키도록 화학적 구조를 변형시킴으로써 이러한 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 화학적 변형은 대안적인 R 기로 치환하는 것 및 참조 폴리펩티드의 특정 탄소 원자에서의 포화도를 변형시키는 것을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 단백질 유사체는 생체내 분해에 대해 상대적으로 저항적이며, 그 결과 투여시 치료 효과가 보다 지속된다. 기능적 활성을 측정하는 분석은 하기 실시예에서 개시되는 것들을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0161] 공-자극성 리간드

[0162] 적어도 하나의 공-자극성 리간드와의 상호작용은 면역 세포(예컨대, T 세포)의 완전한 활성화에 중요한 비-항원 특이적 신호를 제공한다. 공-자극성 리간드는 종양 괴사 인자(TNF) 리간드, 사이토카인(예컨대, IL-2, IL-12, IL-15 또는 IL-21) 및 면역글로불린(Ig) 슈퍼패밀리 리간드를 제한없이 포함한다.

[0163] 종양 괴사 인자(TNF)는 전신 염증에 관여하는 사이토카인이며, 급성 상 반응을 자극한다. 그 일차적인 역할은 면역 세포의 조절에 있다. 종양 괴사 인자(TNF) 리간드는 다수의 공통적인 특성을 공유한다. 상기 리간드의 대부분은 짧은 세포질 세그먼트 및 상대적으로 긴 세포외 영역을 함유하는 II형 막통과 단백질(세포외 C-말단)로 합성된다. TNF 리간드는 신경 성장 인자(nerve growth factor, NGF), CD40L(CD40L)/CD154, CD137L/4-1BBL, 종양 괴사 인자 알파(TNF α), CD134L/OX40L/CD252, CD27L/CD70, 파스 리간드(FasL), CD30L/CD153, 종양 괴사 인자 베타(TNF(β)/림포톡신-알파(LT α)), 림포톡신-베타(LT β), CD257/B 세포-활성화 인자(BAFF)/Blys/THANK/Tall-1, 글루코코르티코이드-유도성 TNF 수용체 리간드(glucocorticoid-induced TNF Receptor ligand, GITRL) 및 TNF-연관 아포토시스-유도성 리간드(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), LIGHT(TNFSF14)를 제한없이 포함한다. 상기 면역글로불린(Ig) 슈퍼패밀리는 세포의 인식, 결합 또는 부착 공정에 관여하는 세포 표면 및 가용성 단백질의 큰 군이다. 상기 단백질은 면역글로불린과 구조적 특성을 공유한다. 이들은 면역글로불린 도메인(접힘)을 갖고 있다. 면역글로불린 슈퍼패밀리 리간드는 모두 CD28에 대한 리간드인 CD80 및 CD86을 제한없이 포함한다.

[0164] 투여

[0165] 본 발명의 유전적으로 변형된 면역반응성 세포(예컨대, T 세포, NK 세포, CTL 세포 또는 그의 선조)를 포함하는 조성물은 신생물, 병원체 감염 또는 감염성 질환을 치료하기 위하여 개체에 전신으로 또는 직접 제공될 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 세포는 관심있는 기관(예컨대, 신생물에 의해 영향을 받는 기관) 내로 직접 주사된다. 다른 한편으로, 유전적으로 변형된 면역반응성 세포를 포함하는 조성물은 관심있는 기관에 예를 들면 순환 시스템(예컨대, 종양 맥관구조(vasculature)) 내로 투여함으로써 간접 제공된다. 시험관내 또는 생체내에서 T 세포, NK 세포 또는 CTL 세포의 생산을 증가시키기 위하여 상기 세포의 투여 전, 도중 또는 후에 확장 및 분화 제제가 제공될 수 있다.

[0166] 상기 변형된 세포는 임의의 생리학적으로 허용가능한 비히클(vehicle) 내에서 보통은 혈관내로 투여될 수 있지만, 이들은 또한 뼈 또는 세포가 재생 및 분화를 위한 적절한 부위를 찾을 수 있는 다른 편리한 부위(예컨대, 흉선) 내로 도입될 수 있다. 보통, 적어도 1×10^5 세포가 투여될 것이고, 결국 1×10^{10} 이상 도달할 것이다. 본 발명의 유전적으로 변형된 면역반응성 세포는 정제된 세포의 군집(population)을 포함할 수 있다. 본 기술분야의 기술자는 군집 내의 유전적으로 변형된 면역반응성 세포의 백분율을 형광 활성화된 세포 분류(fluorescence activated cell sorting, FACS)와 같은 다양한 잘 알려진 방법을 이용하여 즉시 결정할 수 있다. 유전적으로 변형된 면역반응성 세포를 포함하는 군집 내의 바람직한 순도 범위는 약 50 내지 약 55%, 약 55 내지 약 60%, 및 약 65 내지 약 70%이다. 보다 바람직하게는, 상기 순도는 약 70 내지 약 75%, 약 75 내지 약 80%, 약 80 내지 약 85%이다. 보다 더 바람직하게는, 상기 순도는 약 85 내지 약 90%, 약 90 내지 약 95%, 및 약 95 내지 약 100%이다. 용량(dosage)은 본 기술분야의 기술자에 의해 즉시 조정될 수 있다(예컨대, 순도가 감소하면 용량의 증가가 필요할 수 있다). 상기 세포는 주사, 카테터 등에 의해 도입될 수 있다. 필요시, IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL7, IL12, IL15, IL21과 같은 인터루킨뿐만 아니라 다른 인터루킨들, G-, M- 및 GM-CSF와 같은 콜로니 자극 인자, 감마-인터페론과 같은 인터페론 및 에리트로포이에틴을 포함하지만 이에 한정

되는 것은 아닌 인자들이 또한 포함될 수 있다.

[0167] 본 발명의 조성물은 유전적으로 변형된 면역반응성 세포 또는 그의 선조 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 포함한다. 투여는 자가성 또는 이종성일 수 있다. 예를 들면, 면역반응성 세포 또는 선조는 한 개체로부터 입수되고, 동일한 개체 또는 상이한 호환가능한(compatible) 개체에 투여될 수 있다. 말초 혈액에서 유래된 본 발명의 면역반응성 세포 또는 그의 자손(예컨대, 생체내, 생체외 또는 시험관내 유래)은 카테터 투여를 포함하는 국소 주사, 전신 주사, 국소 주사, 정맥내 주사 또는 비경구 투여를 통해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물(예컨대, 유전적으로 변형된 면역반응성 세포를 함유하는 약학적 조성물)을 투여할 때, 일반적으로 단위 용량의 주사가능한 형태(용액, 서스펜션(suspension), 에멀전(emulsion))로 제형화될 것이다.

[0168] 제형

[0169] 유전적으로 변형된 면역반응성 세포를 포함하는 본 발명의 조성물은 멸균 액체 제조물(preparation), 예컨대 등장 수용액, 서스펜션, 에멀전, 분산물 또는 점성 조성물로서 편리하게 제공될 수 있으며, 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 제조물은 보통 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조하기가 쉽다. 추가로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 다소 더 편리하다. 반면에, 점성 조성물은 특정 조직과 더 긴 접촉 기간을 제공하도록 적절한 점도 범위 내로 제형화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 예를 들면 물, 생리식염수, 인산염 완충 생리식염수, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매체일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

[0170] 멸균 주사가능한 용액은 본 발명의 실행에 이용되는 상기 유전적으로 변형된 면역반응성 세포를 필요시 다양한 양의 다른 성분들을 갖는 필요한 양의 적절한 용매 내에 포함시킴으로써 제조될 수 있다. 이러한 조성물은 멸균수, 생리학적인 생리식염수, 글루코오스, 텍스트로오스 등과 같은 적합한 담체, 희석제 또는 부형제와 혼합될 수 있다. 상기 조성물은 또한 동결건조될 수 있다. 상기 조성물은 습윤제, 분산제, 또는 에멀전화제(예컨대, 메틸셀룰로오스), pH 완충제, 겔화 또는 점도 향상 첨가제, 보존제, 향미제, 발색제 등과 같은 보조 물질들을 투여 경로 및 원하는 제조법에 기초하여 함유할 수 있다. 인용에 의해 본 명세서에 포함되는 "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985와 같은 표준 교과서는 과도한 실험 없이 적합한 제조물을 제조하기 위해 참고될 수 있다.

[0171] 항균 보존제, 항산화제, 킬레이트화제 및 완충액을 포함하는 상기 조성물의 안정성 및 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물 활동의 방지는 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등과 같은 다양한 항생제 및 항진균제에 의해 보증될 수 있다. 주사가능한 약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 일어날 수 있다. 그러나, 본 발명에 따르면, 사용되는 임의의 비히클, 희석제 또는 첨가제는 유전적으로 변형된 면역반응성 세포 또는 그의 선조와 호환되어야만 할 것이다.

[0172] 상기 조성물은 등장일 수 있으며, 즉 이들은 혈액 및 눈물 유체와 동일한 삼투압을 가질 수 있다. 원하는 등장(isotonicity)의 본 발명의 조성물은 염화나트륨 또는 텍스트로오스, 붕산, 나트륨 타르trate, 프로필렌 글리콜 또는 다른 무기 또는 유기 용질과 같은 다른 약학적으로 허용가능한 제제를 이용하여 달성될 수 있다. 나트륨 이온을 함유하는 완충액용으로는 염화나트륨이 특히 바람직하다.

[0173] 필요시, 상기 조성물의 점도는 약학적으로 허용가능한 점증제를 이용하여 선택된 레벨에서 유지될 수 있다. 메틸셀룰로오스가 바람직한데, 그 이유는 즉시 경제적으로 이용가능하고 취급이 용이하기 때문이다. 다른 적합한 점증제는 예를 들면 잔탄 겔, 카르복시메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 셀룰로오스, 카르보머 등을 포함한다. 상기 점증제의 바람직한 농도는 선택된 제제에 의존할 것이다. 중요한 점은 선택된 점도를 달성하게 되는 양을 사용하는 것이다. 명백하게, 적합한 담체 및 다른 첨가제의 선택은 정확한 투여 경로 및 특정한 제형, 예컨대, 액체 제형의 본성에 의존할 것이다(예컨대, 상기 조성물이 용액, 서스펜션, 겔 또는 시간 방출 형태 또는 액체-충진 형태와 같은 다른 액체 형태로 제형화되는지 여부).

[0174] 본 기술분야의 기술자는 상기 조성물의 성분들은 화학적으로 불활성이도록 선택되어야 하고, 본 발명에서 개시된 것과 같은 유전적으로 변형된 면역반응성 세포의 생존력 및 효율에 영향을 미치지 않을 것임을 인식할 것이다. 이것은 화학적 및 약학적 원칙을 갖는 기술자에게 아무 문제가 없을 것이며, 또는 문제들은 표준 교과서를 참고하거나 본 명세서 및 본 명세서에서 인용된 문헌들로부터 단순한 실험(과도한 실험을 포함하지 않음)에 의해 즉시 피할 수 있다. 본 발명의 유전적으로 변형된 면역반응성 세포의 치료학적 용도에 관한 한 가지 고려사

항은 최적의 효과를 달성하기 위해 필요한 세포의 양이다. 투여되는 세포의 양은 치료되는 개체에 대해 다양할 것이다. 한 구현예에서, 10^4 내지 10^{10} 사이, 10^5 내지 10^9 사이, 또는 10^6 내지 10^8 사이의 본 발명의 유전적으로 변형된 면역반응성 세포가 인간 개체에 투여된다. 보다 효과적인 세포는 훨씬 적은 수로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 약 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 및 5×10^8 의 본 발명의 유전적으로 변형된 면역반응성 세포가 인간 개체에 투여된다. 효과적인 복용량(dose)에 고려되어야 하는 요소의 정확한 결정은 크기, 연령, 성별, 체중 및 특정 개체의 증상을 포함하는 각 개체에 개별적인 인자들에 기초할 수 있다. 용량은 본 명세서 및 본 기술분야의 지식으로부터 본 기술분야의 기술자에 의해 즉시 확인될 수 있다.

[0175] 상기 기술자는 본 발명의 방법에서 투여되는 조성물 내의 세포 및 최적 첨가제, 비히클 및/또는 담체의 양을 즉시 결정할 수 있다. 전형적으로, (상기 활성 세포(들) 및/또는 제제(들) 이외의) 임의의 첨가제는 인산염 완충 생리식염수 내에서 0.001 내지 50 중량% 용액의 양으로 존재하며, 상기 활성 성분은 약 0.0001 내지 약 5 중량%, 바람직하게는 약 0.0001 내지 약 1 중량%, 보다 더 바람직하게는 약 0.0001 내지 약 0.05 중량% 또는 약 0.001 내지 약 20 중량%, 바람직하게는 약 0.01 내지 약 10 중량%, 및 훨씬 더 바람직하게는 약 0.05 내지 약 5 중량%와 같은 마이크로그램 내지 밀리그램의 제공수(order)로 존재한다. 물론, 동물 또는 인간에 투여되는 임의의 조성물 및 특정 투여 방법의 경우, 예컨대 마우스와 같은 설치류의 적합한 동물 모델에서 예컨대 치사 복용량(lethal dose, LD) 및 LD50을 결정하는 것에 의한 독성; 및 적합한 반응을 일으키는 상기 조성물(들)의 복용량, 그 내부의 성분들의 농도 및 상기 조성물(들)의 투여 시간을 결정하는 것이 바람직하다. 이러한 결정은 기술자의 지식, 본 명세서 및 본 명세서에 인용된 문헌들로부터 과도한 실험을 요구하지 않는다. 그리고, 순차적인 투여를 위한 시간은 과도한 실험없이 확인될 수 있다.

[0176] 치료의 방법

[0177] 본 명세서에는 개체에서 신생물을 치료하는 방법이 제공된다. 또한, 본 명세서에는 면역손상된 인간 개체와 같은 개체에서 병원체 감염 또는 다른 감염성 질환을 치료하는 방법이 고려된다. 상기 방법은 본 발명의 T 세포, NK 세포 또는 CTL 세포를 존재하는 증상의 완화 또는 재발의 방지와 같은 원하는 효과를 달성하기에 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함한다. 치료의 경우, 투여되는 양은 원하는 효과를 생성하기에 효과적인 양이다. 유효량은 한번 또는 일련의 투여로 제공될 수 있다. 유효량은 볼루스(bolus)로, 또는 연속적인 관류(perfusion)에 의해 제공될 수 있다.

[0178] "유효량"(또는 "치료학적 유효량")은 치료시 유익한 또는 원하는 임상적 결과를 얻기에 충분한 양이다. 유효량은 1 회 이상의 복용량으로 개체에 투여될 수 있다. 치료의 관점에서, 유효량은 질환의 진행을 완화, 개선, 안정화, 되돌림 또는 늦춤, 또는 그렇지 않다면 상기 질환의 병리학적 결과를 줄이기에 충분한 양이다. 상기 유효량은 일반적으로 사례별로 기초하여 내과의사에 의해 결정되며, 본 기술분야의 기술자의 범위 이내이다. 유효량을 달성하기 위한 적절한 복용량을 결정할 때 몇 가지 인자가 전형적으로 고려된다. 상기 인자는 개체의 연령, 성별 및 체중, 치료되는 증상, 증상의 심각성 및 투여되는 항원-결합 절편의 형태 및 효과적인 농도를 포함한다.

[0179] 항원-특이적 T 세포를 이용한 입양적 면역치료의 경우, 전형적으로 10^6 - 10^{10} (예컨대, 10^9) 범위의 세포 복용량이 투입된다. 유전적으로 변형된 세포를 숙주 내로 투여하고, 이후 분화될 때, T 세포는 상기 특이적 항원에 대해 특이적으로 지향하도록 유도된다. T 세포의 "유도"는 결실 또는 아네르기(anergy)에 의해서와 같은 항원-특이적 T 세포의 불활성화를 포함할 수 있다. 불활성화는 자가면역 질병과 같은 내성을 확립 또는 재확립하는데 특히 유용하다. 상기 변형된 세포는 정맥내, 피하, 비강내, 종양내, 척추강내, 흉막내, 복강내 및 흉선에 직접 투여를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 본 기술분야에 알려진 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0180] 치료적 방법

[0181] 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 면역 반응을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 한 구현예에서, 본 발명은 개체에서 신생물을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 특히 종래의 치료적 개입에 듣지 않는 혈액암(예컨대, 백혈병, 림프종 및 골수종) 또는 난소암을 갖는 개체의 치료에 유용한 치료를 제공한다. 치료에 적합한 인간 개체는 전형적으로 임상적 기준에 의해 구별될 수 있는 2 개의 치료 군을 포함한다. "진행된 질환" 또는 "높은 종양 부하"를 갖는 개체는 임상적으로 측정가능한 종양을 갖는 개체이다. 임상적으로 측정가능한 종양은 종양 질량에 기초하여 검출할 수 있는 종양이다(예컨대, 촉진, CAT 스캔, 초음파검사, 유방조영상 또는 X-선에 의해; 그 자신에 대한 양성 생화학적 또는 조직병리학적 마커는 상기 군집을 확인하는데 불충분함). 본 발명의 구현예인 약학적 조성물은 상기 개체에 투여되어 그 증상의 객관적인 완화와 함께 항-종양

반응을 일으킨다. 이상적으로, 종양 질량의 감소는 결과로서 일어나지만, 임의의 임상적 향상이 이점을 구성한다. 임상적 향상은 진행의 감소된 위험 또는 속도 또는 종양의 병리학적 결과에서의 감소를 포함한다.

[0182] 적합한 개체의 두 번째 군은 "보조제(adjutant) 군"으로 본 기술분야에 알려져 있다. 이들은 신생물의 이력을 갖고 있지만 다른 치료 모드(mode)에 반응성이 있는 개인이다. 이전의 치료는 외과적 절제, 방사선치료 및 전통적인 화학치료를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 그 결과, 상기 개인들은 임상적으로 측정가능한 종양이 없다. 그러나, 이들은 원래 종양 근처 또는 전이 중 하나에 의해 상기 질환의 진행 위험이 있는 것으로 의심된다. 상기 군은 고-위험 및 저-위험 개인으로 추가로 세분될 수 있다. 상기 세분은 처음 치료 전후에 관찰된 특성에 기초하여 이루어진다. 상기 특성은 임상 기술분야에 알려져 있으며, 각각의 상이한 신생물에 대해 적합하게 정의된다. 고위험 아군의 전형적인 특성은 종양이 이웃하는 조직으로 침입하거나, 림프절이 관여된 것을 보여주는 인간이다.

[0183] 다른 군은 신생물에 대한 유전적인 성향을 갖지만, 아직 신생물의 확증된 임상적 증상은 갖지 않는다. 예를 들면, 유방암과 연관된 유전자 돌연변이에 대해 양성으로 검사되었지만 아직 가임기인 여성은 예방적 수술을 수행하기에 적합할 때까지 신생물의 출현을 예방적으로 방지하기 위하여 치료시 본 명세서에 개시된 하나 이상의 항원-결합 절편을 받기 원할 수 있다.

[0184] 임의의 교모세포종, 흑색종, 신경아세포종, 선암종, 신경교종, 연조직 육종 및 다양한 암종(전립선암 및 소세포 폐암을 포함함)의 신생물을 갖는 인간 신생물 개체는 특히 적절한 개체이다. 적합한 암종은 성상세포종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 올리고덴드로신경교종, 상피세포종, 수모세포종, 원시 신경 외배엽 종양(primitive neural ectodermal tumor, PNET), 연골육종, 골원성 육종, 췌장 관 선암종, 소세포 및 대세포 폐 선암종, 연골종, 혈관육종, 내피육종, 편평세포 암종, 기관지폐포암종, 상피 선암종, 및 그의 간 전이, 림프관육종, 림프관 내피육종, 간세포암, 담관암, 활막종, 중피종, 유방 종양, 횡문근육종, 대장 암종, 기저세포 암종, 한선 암종, 유두 암종, 피지선 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장세포 암종, 담관 암종, 융모암종, 정상피종, 태생 암종, 율름 종양, 고환 종양, 수모세포종, 두개인두종, 상피세포종, 송과체종, 혈관아세포종, 청신경종, 올리고덴드로신경교종, 뇌수막종, 신경아세포종, 망막아세포종, 백혈병, 다발성 골수종, 발덴스트롬 매크로글로블린증, 및 중쇄 질환, 관 및 소엽 선암종과 같은 유방 종양, 자궁 경부의 편평 및 선암종, 자궁 및 난소 상피 암종, 전립선 선암종, 방광의 이행성(transitional) 편평세포 암종, B 및 T 세포 림프종, (마디성 및 확산성) 형질세포종, 급성 및 만성 백혈병, 악성 흑색종, 연조직 육종 및 평활근육종을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 종양학 분야에서 알려진 임의의 것들을 추가로 포함한다.

[0185] 상기 개체는 진행된 형태의 질환을 가질 수 있으며, 이 경우 치료 목적은 질환 진행의 경감 또는 되돌림 및/또는 부작용의 개선을 포함할 수 있다. 상기 개체는 이미 치료된 적이 있는 증상의 이력을 가질 수 있으며, 이 경우 치료 목적은 전형적으로 재발 위험의 감소 또는 지연을 포함할 것이다.

[0186] 따라서, 본 발명은 개체에서 신생물을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 종양 항원에 결합하고 면역반응성 세포(예컨대, TCR, CAR)를 활성화시키는 수용체 및 면역억제 활성을 갖는 항원(예컨대, CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드)에 결합하는 단일-사슬 가변 절편(svFv)을 암호화하는 벡터를 포함하는 유효량의 면역반응성 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서, 상기 신생물은 혈액암(예컨대, 백혈병, 림프종 및 골수종), 난소암, 전립선암, 유방암, 방광암, 뇌암, 대장암, 장암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 위암, 교모세포종 및 인후암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 상기 종양 항원은 탄소 안하이드라아제(carbonic anhydrase) IX(CAIX), 암태아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), CDS, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, 사이토메갈로바이러스(CMV)에 감염된 세포의 항원(예컨대, 세포 표면 항원), 상피 당단백질-2(EGP-2), 상피 당단백질-40(EGP-40), 상피 세포 부착 분자(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나아제 erb-B2,3,4, 폴레이트-결합 단백질(folate-binding protein, FBP), 태아 아세틸콜린 수용체(acetylcholine receptor, AChR), 폴레이트 수용체-α, 강글리오사이드 G2(GD2), 강글리오사이드 G3(GD3), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER-2), 인간 텔로머라아제 역전사효소(human telomerase reverse transcriptase, hTERT), 인터루킨-13 수용체 서브유닛 알파-2(IL-13R α2), κ-경쇄, 키나아제 삽입 도메인 수용체(kinase insert domain receptor, KDR), 루이스 Y(Lewis Y, LeY), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 델라노마 항원 패밀리 A1(MAGE-A1), 뮤신(Mucin) 16(MUC16), 뮤신 1(MUC1), 메소텔린(MSLN), NKG2D 리간드, 암-고환 항원 MY-ESO-1, 암태아 항원(h5T4), 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 종양-연관성 당단백질(tumor-associated glycoprotein) 72(TAG-72), 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth

factor) R2(VEGF-R2), 또는 윌름 종양 단백질(WT-1)의 하나 이상이다.

[0187] 종양 항원에 결합하고 면역반응성 세포(예컨대, TCR, CAR)를 활성화시키는 수용체 및 면역억제 활성을 갖는 항원(예컨대, CD47, PD-1, CTLA-4 및 그의 리간드)에 결합하는 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 암호화하는 벡터가 표면에 발현된 결과, 입양적으로 전달된 인간 T 또는 NK 세포는 상기 종양 부위에서 증강되고(augmented) 선택적인 세포용해 활성을 갖는다. 또한, 종양 또는 바이러스 감염에 위치 및 증식한 이후에, 공-자극성 리간드-발현 T 세포는 상기 종양 또는 바이러스 감염 위치를 생리학적 항-종양 또는 항-바이러스 반응에 관여하는 넓은 범위의 면역 세포(종양 침윤 림프구, NK-, NKT-세포, 수지상 세포 및 대식세포)에 대해 매우 전도성인 환경으로 되돌린다.

[0188] 다른 구현예에서, 본 발명은 병원체에 감염(예컨대, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 진균 감염, 기생충 감염 또는 프로토조아 감염)된 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 면역손상된 개체에서 면역 반응을 향상시키는데 특히 유용하다. 본 발명의 방법을 이용하여 치료할 수 있는 예시적인 바이러스 감염은 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스테인 바 바이러스(EBV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 및 인플루엔자 바이러스 감염을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0189] 따라서, 본 발명은 개체에서 병원체 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에 개시된 것과 같은 면역반응성 세포를 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0190] 키트

[0191] 본 발명은 신생물, 병원체 감염, 면역 질병 또는 동종 이식의 치료 또는 예방을 위한 키트를 제공한다. 한 구현예에서, 상기 키트는 단위 제형 내에 활성화 항원 수용체 및 면역억제 활성을 갖는 항원에 결합하는 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 포함하는 면역반응성 세포를 유효량으로 함유하는 치료적 또는 예방적 조성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 공-자극성 리간드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 치료적 또는 예방적 백신을 함유하는 멸균 용기를 포함한다. 상기 용기는 박스, 앰플, 병, 바이알, 튜브, 백, 파우치, 블리스터-팩(blister-pack), 또는 본 기술분야에 알려진 다른 적합한 용기 형태일 수 있다. 이러한 용기는 플라스틱, 유리, 적층 종이(laminated paper), 금속 포일(foil), 또는 약제를 수용하기에 적합한 다른 물질로 만들어질 수 있다.

[0192] 필요시, 상기 면역반응성 세포는 상기 세포를 신생물, 병원체 감염, 면역 질병 또는 동종 이식을 갖거나 이들이 발생할 위험성이 있는 개체에 투여하기 위한 설명서와 함께 제공된다. 상기 설명서는 일반적으로 신생물, 병원체 감염, 면역 질병 또는 동종 이식을 치료 또는 예방하기 위한 조성물의 사용에 관한 정보를 포함할 것이다. 다른 구현예에서, 상기 설명서는 다음 중 적어도 하나를 포함한다: 치료제의 설명; 신생물, 병원체 감염, 면역 질병 또는 동종 이식 또는 그의 증상을 치료 또는 예방하기 위한 복용량 스케줄 및 투여; 예방책; 주의사항; 지시사항; 금기사항; 과복용 정보; 부작용; 동물 약리학; 임상 연구; 및/또는 참고문헌. 상기 설명서는 용기 위에 직접 인쇄되거나(존재시), 용기에 적용된 라벨, 또는 별도의 시트, 팜플렛, 카드 또는 용기 내에 또는 용기와 함께 공급된 폴더일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0193] 다음의 상세한 설명은 예로서 주어지는 것으로서, 개시된 구체적인 구현예로 본 발명을 한정하기 위한 의도는 아니며, 부속하는 도면과 함께 이해될 수 있다.

도 1은 키메라 항원 수용체(CAR)를 단독으로 또는 분비가능한 scFv(예컨대, αPD-1, αPD-L1, αCTLA-4 또는 αCD47)와의 조합으로 발현하도록 변형된 T 세포를 나타낸다. 상기 키메라 항원 수용체(CAR)를 단독으로 발현하도록 변형된 T 세포는 가혹한 종양 미세환경 내에서 억제된다. 특정 이론에 구애되는 일 없이, 면역억제성 신호를 차단하기 위해 분비가능한 scFv를 발현하도록 상기 세포를 추가로 변형하면 상기 종양 미세환경을 조정하고 억제 인자에 저항하는 그의 능력으로 인해 항-종양 기능을 개선시켰다.

도 2a 및 도 2b는 분비가능한 항-CD47 scFv 구조체의 구조를 나타낸다. 도 2a는 상기 단백질을 배출하도록 카파(κ) 리더 서열을 포함하도록 디자인된 분비가능한 항-CD47 scFv의 구조를 나타낸다. 가변 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)는 세린 글리신 링커(G₄S)로 연결되었고, scFv를 검출하도록 하기 위하여 myc-태그 펩티드가 포함되었다. 도 2b는 나타낸 것과 같은 P2A 인자를 이용하여 1928z CAR 구조체에 연결된 분비가능한 scFv를 나타낸다.

도 3은 카파 리더 서열(서열번호 18)에 작동가능하게 연결된 B6H12.2 scFv 서열을 나타낸다. 상기 B6H12.2 하

이브리도마의 가변 중쇄(V_H) 및 가변 경쇄(V_L) 서열은 카파 리더 서열, c-myc 태그를 이용하여 PCR 증폭되었고, 세린 글리신 링커로 결합되었다. 상기 핵산 서열 및 아미노산 번역이 나타나 있다.

도 4는 CDS 리더 서열(서열번호 19)에 작동가능하게 연결된 B6H12.2 scFv 서열을 나타낸다. 상기 B6H12.2 하이브리도마의 가변 중쇄(V_H) 및 가변 경쇄(V_L) 서열은 CDS 리더 서열, c-myc 태그를 이용하여 PCR 증폭되었고, 세린 글리신 링커로 결합되었다. 상기 핵산 서열 및 아미노산 번역이 나타나 있다.

도 5는 1928z-2A-B6H12.2(카파 리더) 구조체(서열번호 20)의 핵산 서열을 나타낸다. 상기 B6H12.2 scFv 서열은 CD19-표적된 1928z CAR과 함께 발현되기 위하여 SFG 발현 벡터 내로 클로닝되었다. 나타난 것과, 같이 P2A 인자를 사용하여 상기 2개의 인자를 결합시켰다.

도 6은 4H1128z-2A-B6H12.2(카파 리더) 구조체(서열번호 21)의 핵산 서열을 나타낸다. 상기 B6H12.2 scFv 서열은 MUC-CD-표적된 4H1128z 키메라 항원 수용체(CAR)와 함께 발현되기 위하여 SFG 발현 벡터 내로 클로닝되었다. 나타난 것과 같이, P2A 인자를 사용하여 상기 2개의 인자를 결합시켰다.

도 7a 및 도 7b는 1928-2A-B6H12.2 293Glv9 패키징 세포의 생성을 나타낸다. 바이러스 패키징 세포는 1928z-2A-B6H12.2 또는 1928z 벡터를 이용하여 생성되었다. 도 7a는 1928z CAR의 발현에 기초한 클론 5 및 클론 6의 2개의 클론의 선택을 나타내며, 이들은 대조군 1928z 293Glv9 세포와 비교할 수 있었다. CAR 발현은 유세포분석 및 12d11 항체를 이용한 염색에 의해 결정되었다. 도 7b는 1928z 또는 1928z-2A-B6H12.2 패키징 세포 유래의 상등액이 CD47⁺ 종양 세포, Nalm-6 및 Raji와 함께 인큐베이션되고, 상기 종양 세포가 세척되며, 항-CD47로 염색된 실험을 나타낸다. 1928z-2A-B6H12.25 상등액(푸른선)으로 인큐베이션된 종양 세포는 1928z 상등액(검은선)으로 인큐베이션된 것과 비교하여 항-CD47 결합이 감소하였다. B6H12.2 하이브리도마 세포 유래의 상등액은 대조군(붉은선)으로 사용되었다.

도 8a 및 도 8b는 1928z-2A-B6H12.2 인간 말초 혈액 T 세포의 생성을 나타낸다. 인간 말초 혈액 T 세포는 1928z 또는 1928z-2A-B6H12.2 패키징 세포 유래의 상등액을 이용하여 형질도입되었다. 도 8a는 12d11 항체를 이용한 CAR 발현 및 형광 태그된 항-c-myc 태그 항체를 이용하여 염색된 결합된 항-CD47 scFv에 의한 유세포분석기에 의한 분석을 나타낸다. 도 8b는 T 세포를 항-CD47 항체를 이용하여 염색함으로써 결정된 CD47을 차단하는 항-CD47 scFv의 능력을 나타낸다. 1928z-2A-B6H12.2 T 세포는 1928z T 세포(붉은선)와 비교하여 항-CD47 결합(푸른선)이 감소하였다. B6H12.2 하이브리도마 상등액에서 인큐베이션된 1928z T 세포가 대조군(검은선)으로 사용되었다.

도 9a 내지 도 9d는 1928z-2A 인간 말초 혈액 T 세포를 나타낸다. 유세포분석을 수행하여 1928z 및 1928z-2A-B6H12.2 T 세포의 표현형을 특성분석하였다. 도 9a 및 도 9b는 1928z 및 1928z-2A T 세포가 CD4:CD8 T 세포의 비가 동등하고, 및 활성화 마커인 CD69 및 CD25의 발현이 동등함을 나타낸다. 1928z T 세포는 1928z-2A-B6H12.2 T 세포와 비교하여 CD62L의 발현이 증가되었다. 도 9c는 3T3(CD19⁺/B7.1⁺) aAPC 세포 및 골지 운반 억제제인 골지 플러그 및 골지 스탱과 인큐베이션한 후 유세포분석기에 의해 평가된 1928z 및 1928z-2A-B6H12.2 T 세포가 사이토카인을 분비하는 능력을 나타낸다. 1928z 및 1928z-2A-B6H12.2 T 세포는 3T3(CD19⁺/B7.1⁺) 세포로 자극된 후 동등한 레벨의 IL-2 및 IFN γ 를 생성하였다. 도 9d는 Raji 종양 세포를 이용하여 표준 ⁵¹Cr 방출 분석에 의해 결정할 때 1928z 및 1928z-2A-B6H12.2 T 세포가 동일한 세포용해(cytolytic) 능력을 갖고 있음을 나타낸다.

도 10a 및 도 10b는 1928z-2A-B6H12.2 T 세포의 항-종양 효능을 나타낸다. 1928z-2A-B6H12.2 T 세포의 생체내 항-종양 효능은 전임상 SCID-Beige 마우스 모델을 이용하여 조사되었다. 마우스는 1×10^6 Nalm-6-FireFly 루시퍼라아제⁺ 종양 세포로 정맥 접종되었고, 이어서 역시 정맥내 접종된 5.7×10^6 CAR⁺ 1928z, 1928z-2A-B6H12.2 또는 대조군 난소암을 표적하는 4H1128z-2A-B6H12.2 T 세포로 처리되었다. 도 10a는 1928z-2A-B6H12.2 T 세포로 처리된 마우스가 처리되지 않거나, 1928z 또는 4H1128z-2A-B6H12.2 처리된 마우스와 비교하여 생존이 향상되었음을 나타낸다. 도 10b는 종양 진행을 모니터링하기 위한 생물발광 이미지를 이용하여, 1928z-2A-B6H12.2 처리된 마우스는 처리되지 않거나, 1928z 또는 4H1128z-2A-B6H12.2 T 세포 처리된 마우스와 비교하여 종양 부하가 줄었음을 나타낸다.

도 11은 카파 리더 서열(서열번호 22)와 작동가능하게 연결된 5C4 scFv 서열을 나타낸다. 상기 5C4 항체 클론

의 가변 중쇄(V_H) 및 가변 경쇄(V_L) 서열은 카파 리더 서열, c-myc 태그를 이용하여 디자인되었고, 세린 글리신 링커로 결합되었다. 상기 핵산 서열 및 아미노산 번역이 나타나 있다.

도 12는 1928z-2A-5C4(카파 리더) 구조체(서열번호 23)의 핵산 서열을 나타낸다. 상기 5C4 scFv 서열은 CD19-표적화된 1928z CAR과 함께 발현되기 위해 SFG 발현 벡터 내로 클로닝되었다. 나타낸 것과 같이, P2A 요소를 사용하여 2개의 인자들을 결합시켰다.

도 13은 4H1128z-2A-5C4(카파 리더) 구조체(서열번호 24)의 핵산 서열을 나타낸다. 상기 5C4 scFv는 MUC-CD-표적화된 4H1128z CAR과 함께 발현되기 위해 SFG 발현 벡터 내로 클로닝되었다. 나타낸 것과 같이, P2A 요소를 사용하여 2개의 인자들을 결합시켰다.

도 14는 1928z-2A-5C4(카파 리더) 293Glv9 세포의 생성을 나타낸다. 바이러스 패키징 세포는 1928z-2A-5C4를 이용하여 생성되었다. 클론 A6 및 B6의 2개의 클론을 1928z CAR의 발현에 기초하여 선택하였고, 이들은 대조군 1928z 293Glv9 세포와 비교할 수 있었다. CAR 발현은 유세포분석 및 12d11 항체를 이용한 염색에 의해 결정되었다.

도 15는 1928z-2A-5C4(카파 리더) 인간 말초 혈액 T 세포의 생성을 나타낸다. 인간 말초 혈액 T 세포는 1928z 또는 1928z-2A-5C4 패키징 세포 유래의 상등액을 이용하여 형질도입되었다. 유세포분석기를 사용하여 12d11 항체를 이용한 CAR 발현 및 형광 태그된 항-c-myc 태그 항체를 이용한 염색을 이용한 결합된 항-CD47 scFv를 분석하였다.

도 16은 3T3(CD19⁺/B7.1⁺), Raji 및 Nalm-6 세포에서의 PD-L1 발현을 나타낸다. 유세포분석을 이용하여 PD-L1을 발현하도록 형질도입된 3T3(CD19⁺/B7.1⁺), Raji 및 Nalm-6 세포에서의 PD-L1의 발현을 결정하였다. 형질도입된 세포는 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 현저한 레벨의 PD-L1을 발현하였고, 실험에 사용하기 위해 모여있는(circled) 군집을 분류하였다.

도 17은 1928z 및 1928z-2A-5C4 T 세포 확장을 나타낸다. 1928z 및 1928z-2A-5C4 T 세포는 3T3(CD19⁺/B7.1⁺) 또는 3T3(CD19⁺/B7.1⁺/PD-L1⁺)를 이용하여 인큐베이션되었고, T 세포 확장은 트리판 블루를 이용하여 모니터링되었으며, CAR 발현은 유세포분석에 의해 결정되었다. 확장 및 CAR 발현은 3T3(CD19⁺/B7.1⁺) 세포에서 확장된 세포의 경우와 연관되었다.

도 18은 마우스 카파 리더 서열(서열번호 25)과 작동가능하게 연결된 J43 scFv 서열을 나타낸다. J43 항체 클론의 가변 중쇄(V_H) 및 가변 경쇄(V_L) 서열은 마우스 카파 리더 서열 및 c-myc 태그를 이용하여 디자인되었고, 세린 글리신 링커로 결합되었다. 서열 및 아미노산 번역이 나타나 있다.

도 19는 19m28mziRESJ43(마우스 카파 리더) 구조체(서열번호 26)의 핵산 서열을 나타낸다. 상기 J43 scFv는 CD19-표적화된 19m28mz CAR과 함께 발현되기 위해 SFG 발현 벡터 내로 클로닝되었다. 나타낸 것과 같이, 내부 리보솜 유입 위치(IRES, internal ribosome entry site) 요소를 사용하여 2개의 인자들을 결합시켰다.

도 20은 4H11m28mziRES43(마우스 카파 리더) 구조체(서열번호 27)의 핵산 서열을 나타낸다. 상기 J43 scFv는 MUC-CD-표적화된 4H11m28mz CAR과 함께 발현되기 위해 SFG 발현 벡터 내로 클로닝되었다. 나타낸 것과 같이, 내부 리보솜 유입 위치(IRES) 요소를 사용하여 2개의 인자들을 결합시켰다.

도 21은 "적대적" 종양 미세환경을 극복하기 위해 scFv 분자를 발현하기 위하여 CAR T 세포를 유전적으로 변형하기 위한 전략을 나타낸다("장갑화된(armored) CAR T 세포"). CAR⁺ T 세포는 면역 조절 기능을 갖는 길항성 scFv를 분비하도록 변형될 수 있다. 동족(cognate) 항원에 대한 CAR을 활성화시키면, (1) 장갑화된 CAR 변형된 T 세포는 주입된 CAR 변형된 T 세포 및 내인성 항-종양 T 세포 모두에 있는 억제성 PD-1 T 세포 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 항-종양 이펙터(effector) 기능을 향상시키거나, (2) 주입된 CAR 변형된 T 세포 및 내인성 항-종양 T 세포 모두에 있는 억제성 CTLA-4 T 세포 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 항-종양 효과 이펙터 기능을 향상시키거나, 또는 (3) 종양 세포에 발현되는 CD47 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 상기 종양 세포가 숙주의 선천적 항-종양 면역 반응에 의해 인식되는 것을 은폐하는 것을 되돌림으로써 숙주의 대식세포에 의해 종양이 인식 및 근절되도록 할 수 있다.

도 22a 내지 도 22d는 인간 T 세포에 의한 CD40L의 구성적 발현을 나타낸다. 도 22a는 인간 CD40L 벡터를 암호화하는 레트로바이러스 구조체의 개략도이다; LTR, 긴 말단 반복구조; SD, SA, 스플라이스 공여자 및 수용자;

Ψ , 패키징 인자. 도 22b는 레트로바이러스 유전자 전달 이후의 CD4+ 및 CD8+ CD40L-변형된 T 세포의 유세포분석을 나타낸다; x-축은 APC-콘주게이트된(conjugated) 항-인간 CD40L(CD154)이다. 도 22c는 목(mock) 형질도입된 T 세포와 비교하여 CD40L-변형된 T 세포의 향상된 증식을 나타낸다. 도 22d는 목 형질도입된 T 세포와 비교하여 CD40L-변형된 T 세포의 가용성 CD40L(sCD40L), IFN- γ 및 GM-CSF의 향상된 분비를 나타낸다. 모든 결과는 적어도 3번의 별도의 실험을 나타낸다(*는 통계적으로 유의미함을 나타냄).

도 23a 및 도 23b는 CD40L-변형된 T 세포에 의한 CD40+ 종양 세포의 증강된 면역원성을 나타낸다. 도 23a는 동일한 공여자 유래의 목-형질도입된 T 세포와 배양된 경우(회색선)와 비교하여 CD40L-변형된 T 세포와 공-배양된 후(실선), DOHH2 종양 세포주 상의 공-자극 분자(CD80 및 CD86), 부착 분자(CD54, CD58 및 CD70), HLA 분자(HLA 클래스 I 및 HLA-DR), 및 Fas-데쓰(death) 수용체(CD95)가 상향조절된 것을 보여주는 유세포분석이다. 도 23b는 CD40L-변형된 T 세포와 공-배양된 후 표현형 변화가 없음을 보여주는 CD40- 종양을 나타낸다(NALM6가 나타남).

도 24a 및 도 24b는 자가성(autologous) CD40L-변형된 T 세포에 의한 CLL 세포의 증강된 면역원성을 나타낸다. 도 24a는 레트로바이러스 벡터를 함유하는 CD40L을 이용한 레트로바이러스 유전자 전달 후 CD40L-변형된 T 세포로부터 유래된 환자의 유세포분석을 나타낸다; x-축은 APC-콘주게이트된 항-인간 CD40L(CD154)이다. 도 24b는 동일한 공여자 유래의 목-형질도입된 T 세포와 배양된 경우(회색선)와 비교하여 자가성 CD40L-변형된 T 세포와 공-배양된 후(실선), CLL 세포 상의 공-자극 분자(CD80 및 CD86), 부착 분자(CD54, CD58 및 CD70), HLA 분자(HLA 클래스 I 및 HLA-DR), 및 Fas-데쓰 수용체(CD95)가 상향조절된 것을 보여주는 유세포분석이다. 모든 결과는 적어도 3번의 별도의 실험을 나타낸다.

도 25a 및 도 25b는 CD40L-변형된 T 세포에 의한 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)의 IL-12 분비 및 성숙을 나타낸다. 도 25a는 3명의 별도의 공여자 유래의 moDC 및 CD40L-변형된 T 세포 사이에 공-배양(24시간)에 대한 배양 배지의 사이토카인 분석을 나타내며, 상승된 IL-12p70 분비를 보여준다. 도 25b는 CD40L-변형된 T 세포와 공-배양된 후 성숙된 것을 보여주는 moDC의 유세포분석이다. 모든 결과는 적어도 3번의 별도의 실험을 나타낸다.

도 26a 내지 도 26c는 CAR/CD40L 벡터를 이용한 인간 T 세포의 효율적인 형질도입을 나타내며, 향상된 세포독성을 보여준다. 도 26a는 1928z-IRES-CD40L 및 Pz1-IRES-CD40L 유전자를 함유하는 레트로바이러스 구조체의 개략도이다; LTR, 긴 말단 반복구조; SD, SA, 스플라이스 공여자 및 수용자; Ψ , 패키징 인자; CD8은 CD8 리더 서열을 나타낸다; scFv, 단일 사슬 가변 절편; VH 및 VL, 가변 중쇄 및 경쇄; TM, 막통과 도메인. 도 26b는 19-28z/CD40 벡터(미리-자극됨)를 발현하도록 형질도입된 인간 T 세포를, 생체내 실험을 위해 사용된 AAPC(CD19 및 CD80을 발현하는 NIH 3T3 섬유아세포; 1928/CD40LT-세포가 나타남)와 공-배양한 후 CAR/CD40L의 발현이 향상된 것을 보여주는 FACS 분석을 나타낸다. x-축, PE-콘주게이트된 1928z CAR-특이적 항체(19e3); y-축, APC-콘주게이트된 항-인간 CD40L(CD154). 도 26c는 표준 51Cr 방출 분석에 의해 결정된 것과 같이, 19-28z/40L T 세포는 19-28z T 세포와 비교하여 DOHH2 종양 세포를 용해시키는 능력이 현저하게 증가되었다. 모든 결과는 적어도 3번의 별도의 실험을 나타낸다(*는 통계적으로 유의미함을 나타냄).

도 27은 1928z/CD40L T 세포 주입 후의 종양 근절 및 장기간 생존을 나타낸다. CAR-변형된 T 세포의 단일 정맥내 투여 2일 전에 정맥내(i.v.) 주사에 의해 DOHH2 종양 세포로 접종된 SCID-Beige 마우스의 생존 곡선이다. 대조군 T 세포의 패널(1928z 군, n=8; Pz1 및 Pz1/40L 군, n=5)과 비교하여 1928z/CD40L T 세포(n=10)로 처리된 마우스에서 향상된 장기간 생존이 나타났다. 결과는 적어도 2번의 실험을 나타낸다(*는 통계적으로 유의미함을 나타냄).

도 28은 sCD40L에 의한 CD40+ 종양 세포의 증강된 면역원성을 나타낸다. 도 28은 상승된 레벨의 sCD40L이 없는 배지(목-형질도입된 T 세포 배지)(회색선)와 비교하여 상승된 레벨의 sCD40L을 함유하는 조건화된(conditioned) 배지(CD40L-변형된 T 세포 배지)(실선)로 공-배양된 후 DOHH2 종양 세포주 상의 공-자극 분자(CD80), 부착 분자(CD54, CD58 및 CD70), HLA 분자(HLA 클래스 I 및 HLA-DR), 및 Fas-데쓰 수용체가 상향조절된 것을 보여주는 유세포분석이다.

도 29는 1928z/CD40L T 세포가 향상된 세포독성을 보여줌을 나타낸다. 표준 51Cr 방출 분석에 의해 결정된 것과 같이, 19-28z/40L T 세포는 19-28z T 세포와 비교하여 Raji 종양 세포를 용해시키기 위한 현저히 증가된 능력을 갖는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0194] 본 발명의 실행은, 달리 특정하지 않는 한, 본 기술분야의 기술자의 범위 내인 분자 생물학(재조합 기술을 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 종래의 기술을 도입한다. 이러한 기술은 하기의 문헌들에 충분히 설명되어 있다: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). 상기 기술들은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 제조에 적용가능하며, 이와 같이 본 발명을 제조 및 실행하는데 고려될 수 있다. 특정 구현예에 대해 특히 유용한 기술은 하기 섹션에서 논의될 것이다.
- [0195] 하기 실시예는 본 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 분석, 스크리닝 및 치료 방법을 제조 및 이용하는 방법을 완전한 개시와 설명으로 제공하기 위한 것이며, 본 발명자들이 본 발명으로서 간주하는 것의 범위를 한정하기 위한 의도는 아니다.
- [0196] **실시예 1. 키메라 항원 수용체(CAR) 및 항-SCD47 scFv를 공-발현하는 T 세포는 종양을 근절하였다.**
- [0197] 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 scFv를 생성하였고, 상기 scFv 및 종양 항원(CD19)을 인식하는 CAR로 변형된 인간 말초 혈액 T 세포는 시험관내 항-종양 효능뿐만 아니라 전임상 모델에서 향상된 항-종양 효능을 나타내었다.
- [0198] 1928z-2A-B6H12.2를 포함하는 구조체(도 1 내지 도 5)를 생성하였고, 상기 CAR 및 scFv 서열을 시퀀싱함으로써 확인하였다. 또한, 4H1128z로 불리는 난소암 항원인 MUC-CD에 특이적인 CAR을 이용하여 대조군 구조체를 생성하였다(도 6). 카파 리더 서열을 이용하여 상기 구조체에 대해 안정한 프로듀서(producer) 세포주를 생성하였고, 유세포분석에 의해 확인하였다(도 7a). 유세포분석 기반의 분석에서 분비된 항-CD47 scFv를 함유하는 패키징 세포주 유래의 상등액은 CD47 항체가 Nalm-6 및 Raji 종양 세포에 결합하는 것을 차단할 수 있었다. 패키징 세포 유래의 상등액으로 인큐베이션된 종양 세포는 또한 항-c-myc 태그 항체로 염색되었는데, 이는 상기 scFv가 결합되었음을 나타낸다(도 7b).
- [0199] 상기 패키징 세포는 인간 말초 혈액 T 세포를 형질도입하기 위해 사용되었고, 형질도입 효율은 CAR 발현의 유세포분석기 분석에 의해 평가되었다(도 8a). 분비된 scFv는 자가분비(autocrine) 방식으로 기능할 수 있었고, 항-CD47 항체는 1928z T 세포와 비교하여 1928z-2A-B6H12.2 T 세포에 대한 결합이 줄어들었다. 항-c-myc 태그 항체를 이용한 양성 염색은 scFv가 결합되었음을 나타낸다(도 8b). 형질도입된 T 세포의 표현형을 유세포분석에 의해 조사하였으며, 1928z-2A-B6H12.2 T 세포에서 감소된 것으로 나타난 CD62L을 제외하고는 1928z-2A-B6H12.2 및 1928z T 세포 사이에 유사한 것으로 나타났다(도 9a 및 도 9b). 항-CD47 scFv를 생성하는 T 세포의 기능을 멀티파라미터 유세포분석 및 표준 51Cr 방출 분석을 이용하여 조사하였다. 1928z-2A-B6H12.2 T 세포는 1928z T 세포와 비교할 때 동등한 사이토카인 생성 및 세포독성 기능을 갖는 것으로 나타났다(도 9c 및 도 9d).
- [0200] 생체내에서 1928z-2A-B6H12.2 T 세포가 종양에 반응하는 능력을 전임상 SCID-Beige 마우스 모델을 이용하여 조사하였다. SCID-Beige 마우스에 초파리 루시페라아제를 발현하도록 변형된 1×10^6 Nalm-6 종양 세포를 주사하였고, 3일 후 5.7×10^6 CAR⁺ 1928z 또는 1928z-2A-B6H12.2 또는 대조군 4H1128z-2A-B6H12.2 T 세포를 역시 정맥내 주사로 처리하였다. 종양의 진행을 임상적으로 및 생물발광 이미징을 이용하여 모니터링하였다. 종양을 갖고 있는 마우스를 1928z-2A-B6H12.2 T 세포로 처리하면 1928z T 세포의 처리와 비교하여 종양 부하를 줄였고, 종양을 갖고 있는 마우스의 생존을 향상시켰다(도 10a 및 도 10b).
- [0201] **실시예 2. 키메라 항원 수용체(CAR) 및 항-인간 PD-1 scFv를 공-발현하는 T 세포는 증식이 증가되고, CAR의 발현이 유지되었다.**
- [0202] 항-PD-1 항체 유래의 V_H 및 V_L 사슬에 기초하여 항-인간 PD-1 scFv를 생성하였다(클론 5C4)(미국 특허 제 8,008,449호). 상기 5C4 scFv는 카파 리더 서열, 세린 글리신 링커 및 c-myc 태그를 포함하도록 디자인되었다(도 11). 상기 scFv 구조체를 SFG 레트로바이러스 백본 내로 클로닝하여 1928z-2A-5C4 및 4H1128z-2A-5C4를 생성하였다(도 12 및 도 13). (예컨대, 1928z/4H1128z CAR T 세포에서 발현하기 위하여) 인간 PD-1에 결합하는 높은 친화도의 scFv를 개발하기 위하여, 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하여 인간 PD-1

(및 잠재적으로는 마우스 PD-1)에 특이적으로 결합하는 scFv를 결정하였다.

[0203] 안정한 293Glv9 패키징 세포주를 생성하였고, 1928z CAR 및 4H1128z CAR의 발현을 유세포분석에 의해 평가하였다(도 14). 상기 패키징 세포 유래의 상등액을 이용하여 인간 말초 혈액 T 세포를 형질도입하였고, 형질도입 효율을 CAR 발현을 검출하기 위한 유세포분석에 의해 평가하였다(도 15).

[0204] 상기 항-인간 PD-1 scFv가 인공 항원 제공 세포(aAPC)에 대한 반응으로 T 세포의 증식을 증가시키는 능력을 조사하였다. 본 연구를 위해 PD-L1 양성 종양 세포 및 3T3 aAPC를 생성하였다(도 16). 형질도입된 T 세포와 인간 CD19를 발현하는 3T3 aAPC를 공-배양한 후, 인간 B7.1 및 인간 PD-L1, 1928z-2A-C4 T 세포는 1928z T 세포와 비교하여 증식이 증가되고, CAR의 발현이 유지되었다(도 17). 1928z CAR 및 항-PD1 scFv를 공-발현하는 T 세포의 표현형 및 항-종양 기능은 유세포분석, 루미네스 사이토카인 분석 연구,⁵¹ 크롬 방출 분석, 및 생체내 항-종양 기능을 결정하기 위한 SCID-Beige 전임상 모델을 이용하여 결정될 수 있다.

[0205] **실시예 3. 키메라 항원 수용체(CAR) 및 항-마우스 PD-1 scFv의 공-발현은 마우스 T 세포를 자극시킨다.**

[0206] 항-마우스 PD-1 scFv를 항-PD1 항체 클론 J43 유래의 VH 및 VL에 기초하여 생성하였다(Honjo 등의 미국 특허 제 7,858,746호). 상기 J43 scFv는 마우스 카파 사슬 리더 서열, 세린 글리신 링커 및 c-myc 태그를 포함하도록 디자인되었다(도 18). 상기 scFv 구조체를 마우스 C28 및 마우스 CD3zeta를 통해 신호를 전달하는 인간 CD19 또는 인간 MUC-CD를 표적화하고, 이로 인해 마우스 T 세포를 자극시키는 CAR을 발현하는 SFG 레트로바이러스 백본 내로 클로닝하였다. 종래 개시된 것과 같이 상기 구조체 19m28mz-IRES-J43(도 19) 및 4H11m28mz-IRES-J43(도 20)을 사용하여 안정한 피닉스 패키징 세포주를 생성하고, 원발성(primary) 무린 T 세포를 유전적으로 변형시킨다(Lee et al., Cancer Res 2011, 71(8):2871). 마우스 19m28mz 및 19m28mz-IRES-J43 T 세포를 인간 CD19 및 마우스 PD-L1을 발현하도록 변형된 EL4 홍선종 종양 세포와 함께 배양하고, 마우스 T 세포의 증식을 통해 살아있는 세포 카운트 및 CFSE 라벨링을 모니터링하였다.

[0207] MUC-CD 항원을 표적화하는 상기 4H11m28mz CAR을 발현하는 무린 T 세포의 경우, MUC-CD 및 마우스 PD-L1을 발현하도록 변형된 IDS 종양 세포에 대한 반응으로 기능이 평가될 수 있다(Chekmasova et al., Clin Cancer Res, 2010, 16:3594). 전술한 것과 같이, 무린 PD-1에 결합하는 인간 scFv를 19m28mz 및 4H11m28mz 벡터 구조체 내로 클로닝하고, 무린 T 세포를 변형하기 위해 사용한다. 무린 PD-1에 결합하는 인간 scFv를 발현하도록 변형된 T 세포의 생체내 항-종양 효과를 평가하기 위한 동계성 모델이 이용가능하다: C57BL/6 마우스에 복강내 접종되는 ID8-MUC-CD 종양 세포를 이용하는 난소암 종양 모델; 및 인간 CD19를 발현하도록 변형된 EL4 홍선종 종양 세포로 접종되는 마우스 CD19 대신에 인간 CD19를 발현하는 유전자이식(transgenic) 마우스(Pegram et al., Blood 2012, 119(18):4133). 따라서, 상기 항-종양 효과는 면역-적격(immune-competent) 모델에서 평가될 수 있고, 이로 인해 종양 미세환경에 대한 항-PD-1 scFv의 영향을 평가하도록 한다.

[0208] **실시예 4. 면역 세포에서 키메라 항원 수용체(CAR) 및 작용성 svFv의 공-발현**

[0209] 한 구현예에서, 본 발명은 항원 결합 수용체(예컨대, CAR 또는 TCR) 및 작용성 면역자극 활성을 갖는 항원(예컨대, CD28, OX-40, 4-1BB 및 그의 리간드)에 결합하는 단일-사슬 가변 절편(scFv)을 발현하는 면역 세포를 제공한다. 공자극성 분자인 4-1BB를 표적화하는 작용성 scFv를 생성하기 위하여, 3H3 하이브리도마 세포주를 입수하였다(Shuford et al., J Exp Med 1997, 186:47-55; Mick Croft 교수(La Jolla Institute for Allergy and Immunology)에 의해 제공됨). 공자극성 분자인 OX-40을 표적화하는 작용성 scFv를 생성하기 위하여, OX-86 하이브리도마 세포주를 입수하였다(al-Shamkhani et al., Eur J Immunol 1996, 26(8):1695-9; European Collection of Cell Cultures(Catalogue number 96110601)). QIAgen RNAeasy 키트를 이용하여 제조사(QIAgen, CA, USA)의 설명서에 따라 하이브리도마 mRNA를 세포로부터 분리하였고, 이후 New England Biolabs Protoscript AMV First strand cDNA 합성 키트를 이용하여 제조사(New England Biolabs, MA, USA)의 설명서에 따라 cDNA를 제조하였다. 이후, 가변 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)를 다음의 약화된(degenerate) 프라이머들을 이용하여 증폭하였다:

[0210] Orlandi 프라이머(Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1989, 86:3833-37)

[0211] VHFOR: 5'- tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc ttg gcc cca g -3'(서열번호 28)

[0212] VH1BACK: 5'- agg tsm arc tgc ags agt cwg g -3'(서열번호 29)

[0213] VKFOR: 5'- gtt aga tct cca gcttgg tcc c -3'(서열번호 30)

- [0214] VK1BACK: 5'- gac att cag ctg acc cag tct cca -3'(서열번호 31)
- [0215] Cooper 프라이머(Wang et al., Blood 2002, 99:2459-2467)
- [0216] Vk 5'-GGCTGCAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGRAC-3'(서열번호 32),
- [0217] Ck 5'-CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG-3'(서열번호 33);
- [0218] RACE 프라이머(Kettleborough et al., Eur. J Immunol 1993, 23:206-211)
- [0219] VKf1a: Ata tcc atg gca gac gtc cag atg atc cag tct cca(서열번호 34)
- [0220] Vkf1b: ata tcc atg gca gac att gtg ctg act cag tct cc(서열번호 35)
- [0221] Vkf1c: ata tcc atg gca gat gtt gtg atg ace caa act cca(서열번호 36)
- [0222] Vkf1d: ata tcc atg gca caa att gtt ctc acc cag tct cc(서열번호 37)
- [0223] Vkf1e: ata tcc atg gca gac att gtg atg aca cag tct cca(서열번호 38)
- [0224] Vkf1f: ata tcc atg gca gat att gtg atg acg cag gct gca(서열번호 39)
- [0225] Vkf1g: ata tcc atg gca gac att gtg atg acc cag tct c(서열번호 40)
- [0226] Reverse Kappa: gct tca aca gga atg agt gtt aac tcg agg tag(서열번호 41)
- [0227] 상기 VH 및 VL을 scFv 내로 조립하기 위하여, 상기 VH 및 VL 사슬을 PCR하는 동안에 세린 글리신 링커뿐만 아니라 c-myc 태그 및 뮤린 Ig 카파 사슬 또는 CDS 리더 서열이 부가된다. 결과물인 폴리뉴클레오티드를 상기 1928z 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 기존의 레트로바이러스 발현 벡터(SFG 백본) 내로 클로닝하여 SFG-1928z-2A-3H3 또는 1928z-2A-0X86을 생성한다.
- [0228] 항-마우스 PD-1 J43 scFv에 대해 개시한 것과 같이 안정한 패키징 세포주를 생성하고, 입양적 T 세포 전달의 유사한 뮤린 모델에서 테스트하였다.
- [0229] 본 명세서에서 제공된 결과는 scFv 분자를 발현하는 유전적으로 변형된 CAR T 세포("장갑화된 CART 세포")는 면역반응성이고, "적대적" 종양 미세환경을 극복할 수 있으며, 따라서 신생물의 치료에 효과적임을 나타낸다. CAR⁺ T 세포는 면역 조절성 기능을 갖는 길항성 scFv를 분비하도록 변형된다(도 21). 동족 항원에 대한 CAR을 활성화시키면, (1) 장갑화된 CAR 변형된 T 세포는 주입된 CAR 변형된 T 세포 및 내인성 항-종양 T 세포 모두에 있는 억제성 PD-1 T 세포 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 항-종양 이펙터 기능을 향상시키거나, (2) 주입된 CAR 변형된 T 세포 및 내인성 항-종양 T 세포 모두에 있는 억제성 CTLA-4 T 세포 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 항-종양 효과 이펙터 기능을 향상시키거나, 또는 (3) 종양 세포에 발현되는 CD47 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 상기 종양 세포가 숙주의 선천적 항-종양 면역 반응에 의해 인식되는 것을 은폐하는 것을 되돌림으로써 숙주의 대식세포에 의해 종양이 인식 및 근절되도록 할 수 있다.
- [0230] 본 명세서에서 보고된 결과들은, 달리 나타내지 않는 한, 다음의 방법 및 재료를 이용하여 얻어졌다.
- [0231] 항-CD47 B6H12.2 scFv의 생성
- [0232] B6H12.2 하이브리도마 세포주를 American Tissue Culture Collection(ATCC, VA, USA; catalogue number HB-9771)로부터 입수하였다. QIAgen RNAeasy 키트를 이용하여 제조사(QIAgen, CA, USA)의 설명서에 따라 B6H12.2 mRNA를 하이브리도마 세포로부터 단리하였고, New England Biolabs Protoscript AMV First strand cDNA 합성 키트를 이용하여 제조사(New England Biolabs, MA, USA)의 설명서에 따라 cDNA를 제조하였다. 가변 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)를 카파 리더 서열, 세린 글리신 링커 및 c-myc 태그를 포함하도록 디자인된 프라이머를 이용하여 다음과 같이 PCR 증폭하였다:
- [0233] 프라이머 1. B6H12.2 VH 정방향(forward) 프라이머(서열번호 42)
- [0234] 5'- CCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TGC TAT GGG TAC TGC TGC TCT GGG TTC CAG GTT CCA CTG GTG ACG AGG TGC TGC AGC TGG TGG AGT CCG GGG -3'
- [0235] 프라이머 2. B6H12.2 VH 역방향(reverse) 프라이머(서열번호 43):
- [0236] 5'- AGA TCC ACC TCC ACC AGA TCC ACC TCC ACC TGA TCC ACC TCC ACC TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT TCC TTG

ACC -3'

- [0237] 프라이머 3. B6H12.2 VL 정방향 프라이머(서열번호 44):
- [0238] 5'- GGT GGA GGT GGA TCA GGT GGA GGT GGA TCT GGT GGA GGT GGA TCT GAC ATT GTG ATG ACT CAG TCT CCA GCC ACC -3'
- [0239] 프라이머 4. B6H12.2 VL 역방향 프라이머(서열번호 45):
- [0240] 5'- CTC GAG TTA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC TCC ACC GAA CG-3'
- [0241] 상기 디자인에 더하여, T 세포로부터 scFv를 방출하기 위한 효율적인 리더 서열을 결정하기 위하여 다음의 대안적인 정방향 프라이머를 이용하여 CD8L 서열을 갖는 scFv를 생성하였다:
- [0242] 프라이머 5. B6H12.2 VH CD8L 정방향(서열번호 46):
- [0243] 5'- TAT ACC ATG GCC TTA CCA GTG ACC GCC TTG CTC CTG CCG CTG GCC TTG CTG CTC CAC GCC GCC AGG CCG GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG -3'
- [0244] 상기 VH 및 VL PCR 생성물을 제조사(Invitrogen, NY, USA)의 설명서에 따라 pCR2.1TOPO 내로 클로닝하였다. M13F2 및 M13R2 프라이머(Invitrogen)를 이용하여 MSKCC DNA 시퀀싱 코어 설비에 의해 시퀀싱을 수행하여 VH 및 VL 생성물 모두의 서열을 확인하였다. 상기 VH 및 VL PCR 생성물 및 프라이머 1 또는 5 및 4를 이용하여 중첩(overlapping) PCR을 수행하여 항-CD47 scFv를 생성하였다(도 1 참조).
- [0245] 상기 항-CD47 scFv 구조체를 1928z 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 기존의 레트로바이러스 발현 벡터(SFG 백본) 내로 클로닝하여 SFG-1928z-2A-B6H12.2를 생성하였다. 상기 SFG-1928z-2A-B6H12.2 DNA를 시퀀싱하여 상기 서열을 확인하였다.
- [0246] *인간 T 세포에 대한 안정한 패키징 세포주의 생성*
- [0247] 안정한 패키징 세포주를 생성하기 위하여, Promega 칼슘 포스페이트 전달감염 키트를 이용하여 제조사(Promega)의 설명서에 따라 10 μ g의 SFG-1928z-2A-B6H12.2 DNA로 H29 세포를 일시적으로 전달감염시켰다. H29 상등액 유래의 상등액을 사용하여 293Glv9 세포를 형질도입하였고, 이후 서브-클로닝하여 안정한 패키징 세포를 생성하였다. 2개의 서브-클론(클론 5 및 클론 6)은 1928z CAR의 발현과 293Glv9 상등액이 인간 말초 혈액 T 세포를 형질도입하는 능력(유세포분석 및 12d11 항체를 이용한 염색에 의해 결정됨) 모두에 근거하여 선별하였다. 인간 말초 혈액 T 세포의 형질도입은 종래 개시된 것과 같이 수행하였다(Brentjens et al., Clin Cancer Res 2007, 13(18Pt1):5426).
- [0248] *항-CD47 scFv 생성/기능의 평가*
- [0249] 1928z-2A-B6H12.2 293Glv9 및 형질도입된 인간 말초 혈액 T 세포로부터의 항-CD47 scFv의 생성은 상기 세포들 유래의 상등액 내에 CD47⁺ 종양 세포(Raji 및 Nalm-6)를 인큐베이션함으로써 결정되었다. 이후, 종양 세포를 세척하였고, 형광 콘주게이트된 항-c-myc 태그 항체(Cell Signaling, MA, USA)로 염색하여 상기 종양 세포에 결합된 상등액 유래 단백질을 검출하였다. 또한, 종양 세포를 형광 콘주게이트된 항-CD47(클론 B6H12.2, eBioscience)로 염색하여 B6H12 scFv가 CD47을 차단하는 능력을 검출하였다.
- [0250] *생체내 입양적 전달 모델*
- [0251] 마우스를 초파리 루시페라아제를 발현하도록 변형된 1×10^6 Nalm-6로 정맥내 주사하였다(0일). 3일에, 마우스를 5.7×10^6 CAR⁺ T 세포로 처리하였고, 또한 정맥내 접종하였다. 종양의 진행을 종래 개시된 것과 같이 임상적으로 및 생물발광 이미징을 이용하여 모니터링하였다(Santos et al., Nature Medicine 2009, 15(3):338).
- [0252] *5C4 항-종양 PD-1 scFv의 생성*
- [0253] 인간 PD-1, 클론 5C4에 특이적으로 결합하는 항체의 서열을 전술한 것과 같이 입수하였다. 상기 서열을 카파 리더 서열, 세린 글리신 링커 및 c-myc 태그를 포함하도록 변형하였고, GeneArt(Invitrogen, 도 9)로부터 구입하였다. 상기 scFv를 SFG 레트로바이러스 백본 내로 클로닝, 안정한 패키징 세포의 생성, 인간 말초 혈액 T 세포의 형질도입 및 형질도입 효율의 평가는 전술한 것과 같이 달성하였다.
- [0254] *항-인간 PD-1 기능의 평가*

- [0255] PD-1 리간드인 PD-L1을 200 ng/ml의 재조합 인간 인터페론-감마(RnD systems, MN, USA) 내에서 인큐베이션된 SKOV3(ATCC) 종양 세포로부터 PCR 증폭하였다. 인간 PD-L1을 증폭하기 위한 프라이머는 하기에 나타나 있다:
- [0256] 프라이머 6. 인간 PD-L1 정방향 프라이머(서열번호 47)
- [0257] 5'- CACGTGCCATGGATGAGGATAT TTGCTGTCTT TATAT -3'
- [0258] 프라이머 7. 인간 PD-L1 역방향 프라이머(서열번호 48)
- [0259] 5'CTCGAGTTACGTCTCTCCAAATGTGTATCACTTT3'
- [0260] 상기 인간 PD-L1 서열을 SFG 레트로바이러스 백본 내로 클로닝하였고, 종래 개시된 것과 같이 3T3, Raji 및 Nalm-6 세포주 내로 형질도입하였다(Brentjens et al., Clin Cancder Res 2007, 13(18 Pt 1):5426). 세포를 항-PD-L1(클론 MIH1, BD Pharmingen, CA, USA)로 염색하였고, FACS 분류하여 PD-L1을 발현하는 총 세포 군집을 확인하였다(도 14).
- [0261] 인간 1928z-2A-5C4 및 1928z T 세포를 3T3(CD19/B7.1/PD-L1) aAPC와 함께 배양하였고, 살아있는 세포 카운트를 트리판 블루 배제를 이용하여 수행하였으며, CAR의 발현을 결정하기 위하여 유세포분석을 수행하였다. 이것은 3T3(CD19/B7.1) aAPC와 함께 배양될 때 T 세포의 확장과 연관되었다.
- [0262] 항-마우스 PD-1 scFv의 생성
- [0263] 무린 PD-1, 클론명 J43에 특이적으로 결합하는 항체의 서열을 전술한 것과 같이 입수하였다. 상기 서열을 세린 글리신 링커와 함께 카파 사슬 리더 서열 및 c-myc 태그 서열을 포함하도록 변형하여 scFv를 형성하였고, GeneArt(Invitrogen, 도 16)으로부터 구입하였다. 이것을 마우스 CD28 및 CD3 제타 분자를 통해 신호전달이 매개되는 무린 CAR을 암호화하는 기존의 레트로바이러스 발현 벡터(SFG) 내로 클로닝하였다. B 세포 및 난소 종양을 각각 표적화하기 위하여 19m28mz-IRES-J43 및 4H11m28mz-IRES-J43을 생성하였다(도 17 및 도 18).
- [0264] 항-마우스 PD-1 기능의 평가
- [0265] PD-1 리간드인 PD-L1을 Renca 종양 세포(ATCC)로부터 PCR 증폭하였으며, 마우스 PD-L1을 증폭하기 위해 사용된 프라이머는 아래에 나타나 있다:
- [0266] 프라이머 8. 마우스 PD-L1 정방향 프라이머(서열번호 49)
- [0267] 5'- TAT TAC ACG TGT TAC ATG AGG ATA TTT GCT GTC TTT -3'
- [0268] 프라이머 9. 마우스 PD-L1 역방향 프라이머(서열번호 50)
- [0269] 5' TAT AGG ATC CTC GAG GAT GTT ACG TCT CCT CCA AAT GTG TA 3'
- [0270] 상기 항-마우스 PD-1 scFv를 SFG 레트로바이러스 백본 내로 클로닝하였고, 3T3 aAPC, IDS 및 EL4 세포주 내로 형질도입하였다. 항-PD-L1(클론 MIH1 BD Pharmingen)으로 염색된 세포를 FACS 분류하여 PD-L1을 발현하는 총 세포 군집을 확인한다.
- [0271] CTL 크롬 방출 살해 분석
- [0272] 원하는 항원을 발현하는 표적 세포를 51Cr을 이용하여 표지하였고, 감소하는 작용기:표적 비에서 T 세포와 함께 공-배양하였다. 4시간 배양한 후, 상등액을 제거하였고, 크롬으로부터 방출된 방사능을 측정하기 위해 사용하였다. 25T 세포와 배양되지 않은 표적 세포의 배경 방사능을 빼고, 0.2% 트리톤 X-100에 의해 완전히 용해된 표적 세포로부터 측정된 방사능으로 나눔으로써 특이적 용해를 결정하였다.
- [0273] 실시예 5. CD47을 차단하면 CAR T 세포 치료를 개선한다.
- [0274] T 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)의 발현을 통해 종양 항원을 표적화하도록 유전적으로 변형될 수 있다. CD19-특이적 CAR T 세포의 임상적 전달은 혈액학적 악성물을 갖는 일부 환자에서 임상적 효능이 있는 것으로 나타나 있지만, 크기가 큰(bulky) 임파선염을 갖는 만성 림프구성 백혈병 환자는 CAR T 세포 치료에 대해 아최적(suboptimal) 반응을 갖는다. 또한, CAR T 세포 치료는 임상 시험에서 고형 종양에 대한 효능을 설명하는데 실패하였다. 본 실시예에서, CAR T 세포로부터 CD47-차단 단일 사슬 가변 절편(scFv)의 분비를 통해 선천적 항-종양 면역 반응을 모집함으로써 상기 CAR T 세포의 임상적 효능이 향상되었다. 종래의 연구는 종양 세포의 CD47과 대식세포의 SIRPa 사이의 상호작용을 차단하면 종양 세포의 식작용이 일어남을 보여준다. 이러한 효과를 활용하기 위하여, CD19-특이적 CAR(1928z)을 발현하고 B6H12.2 하이브리도마로부터 클로닝된 인간

CD47(1928z/B6H12.2 T 세포)에 특이적인 scFv를 분비하도록 T 세포를 변형시켰다. 1928z/B6H12.2 T 세포는 인간 CD47에 특이적인 기능적 scFv를 분비하는 것으로 나타났으며, 시험관내에서 CAR-매개성 사이토카인 분비 또는 세포독성에는 영향을 미치지 않았다. 1928z/B6H12.2 T 세포 유래의 상등액은 시험관내에서 대식세포가 종양 세포를 식작용하는 것을 자극하였지만, 1928z T 세포는 그렇지 않았다. 1928z/B6H12.2 T 세포의 입양적 전달은 향상된 항-종양 효과를 매개하였고, 전임상 무인 모델에서 Nalm6 종양을 근절하였다. 상기 신규한 전략은 CAR T 세포-매개성 효과와 선천적 면역 세포-매개성 종양 세포의 파괴를 조합하여 CAR T 세포 치료의 항-종양 효능을 개선시킨다.

[0275] **실시예 6. 구성적 CD40L 발현을 통한 키메라 항원 수용체 매개성 T 세포의 항-종양 효능의 향상**

[0276] 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포를 이용한 입양적 세포 치료는 B-ALL을 갖는 환자에 대한 유망한 치료법이다. 그러나, 대부분의 임상 시험에서, CAR-변형된 T 세포는 특히 낮은 등급의 B 세포 악성물 및 고형 종양의 문맥에서 현저한 치료적 유익을 나타내는데 실패하였다. 본 실시예 섹션에서 제공된 실험에서, 본 발명자들은 T 세포가 CD40 리간드(CD40L, CD154)를 구성적으로 발현하도록 가공함으로써 CAR-변형된 T 세포의 항-종양 효능을 추가로 향상시켰다. CD40L을 구성적으로 발현하도록 변형된 T 세포(CD40L-변형된 T 세포)는 전-염증성 TH1 사이토카인의 증식 및 분비를 증가시켰다. 또한, CD40L-변형된 T 세포는 상기 종양 세포의 표면에 공-자극성 분자(CD80 및 CD86), 부착 분자(CD54, CD58 및 CD70), HLA 분자(클래스 I 및 HLA-DR) 및 Fas 데스 수용체(CD95)를 상향조절함으로써 CD40+ 종양 세포의 면역원성을 증강시켰다. 추가적으로, CD40L-변형된 T 세포는 성숙을 유도하였고, 단핵구 유래 수지상 세포에 의한 전-염증성 사이토카인 IL-12의 분비를 자극하였다. 마지막으로, 종양 표적화 CAR/CD40L T 세포는 CD40+ 종양에 대한 세포독성을 증가시켰고, 전신성 림프종의 이중이식 모델에서 종양을 갖는 마우스의 생존을 연장시켰다. 상기 전임상 데이터는 예상되는 향상된 항-종양 효능 및 개선된 임상적 결과와 함께 CD40L을 구성적으로 발현하도록 추가적으로 변형된 CAR T 세포의 임상적 적용을 뒷받침한다.

[0277] **재료 및 방법**

[0278] **세포 배양**

[0279] DoHH2, Raji 및 NALM-6(American Type Culture Collection) 종양 세포주를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS, fetal bovine serum), 비필수 아미노산, 나트륨 피루베이트, HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 버퍼 및 2-메르캅토에탄올(Invitrogen)로 보충된 RPMI 1640 배지(Gibco)에서 유지하였다. 293GP-GLV9 레트로바이러스 프로듀서 세포주는 종래 개시되어 있으며, 10% FBS로 보충된 DMEM(Invitrogen)에서 배양하였다.²⁹ NIH-3T3 인공 항원-제공 세포(AAPC)를 종래 개시된 것과 같이 10% 열-불활성화된 공여자 송아지 혈청(DCS, donor calf serum)으로 보충된 DMEM에서 배양하였다.³⁰ 메모리얼 슬로안-케터링 캔서 센터(MSKCC) IRB-승인된 프로토콜 95-054 하에 건강한 공여자의 말초 혈액으로부터 BD Vacutainer CPT 튜브(Becton Dickinson)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 인간 T 세포를 분리하였다. MSKCC IRB-승인된 프로토콜 06-138 하에 치료를 받고 있는 환자로부터 환자의 T 세포 및 CLL 세포를 입수하였고, Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28 비드(Invitrogen)를 이용하여 분리하였다. T 세포를 10% FBS 및 20 IU/ml IL-2(R&D Systems)로 보충된 RPMI 1640에서 배양하였다. 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)를 건강한 공여자의 조직 배양 플라스틱-부착성 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)으로부터 입수하였고, 종래 기재된 것과 같이 1% 모은(pooled) 인간 A/B 혈청, HEPES 버퍼, 2-메르캅토에탄올(Invitrogen), 인터루킨-4(IL-4; 500 IU/ml - R&D Systems) 및 과립구-단핵구 콜로니-자극 인자(GM-CSF; 1,000 IU/ml - R&D Systems)로 보충된 RPMI 1640에서 배양하였다.³¹ 모든 배지는 2 mmol/l L-글루타민(Invitrogen), 100 유닛/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Invitrogen)으로 부충되었다.

[0280] **레트로바이러스 구조체의 구축**

[0281] 인간 CD50L cDNA를 분리된 건강한 공여자의 PBMC로부터 다음의 프라이머 (1) 5'-CACGTGCATGATCGAAACATACAACCAACTTCTCCCGATCTGC-3'(서열번호 3) 및 (2) 5'-CTCGAGGGATCCTCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGA-3'(서열번호 4)를 사용하여 PCR 증폭하였다(도 22a). 인간 CD40L을 암호화하는 감마-레트로바이러스 벡터를 SFG 벡터 백본을 이용하여 구축하였다.³² 1928z 및 Pz1(항-전립선 특이적 막 항원 CAR; 항-PSMA) SFG-벡터의 구축은 종래 개시되어 있다.^{33,34} 1928z-IRES-40L 및 Pz1-IRES-40L-감마-레

트로바이러스 벡터의 구축은 중첩 PCR을 이용하여 생성되었다(도 26a).³⁵

[0282] 인간 T 림프구의 레트로바이러스 형질도입

[0283] 안정한 293GP-GLV9 레트로바이러스 프로듀서 세포주의 생성 및 인간 T 세포의 유전적 변형은 종래 개시되어 있다.^{29,36} T 세포 형질도입을 위하여, 단리된 건강한 공여자의 PBMC를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma)에서 피토펜아글루타닌(PH A)을 이용하여 활성화시켰고, 환자 유래의 T 세포를 Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28 비드를 이용하여 제조사의 권고에 따라 단리, 활성화 및 확장시켰다. 활성화된 T 세포를 종래 개시된 것과 같이 레트로벡터-코팅된 비-조직 배양물 처리된 플레이트에서 레트로바이러스로 형질도입하였다.³⁶ 7일에 유세포분석기에 의해 유전자 전달을 평가하였다. 상등액이 엠프티(empty) 293GP-GLV9 세포 배양물로부터 유래된 것을 제외하고는 동일한 방식으로 대조군 목-형질도입된 T 세포를 생성하였다. GD40L-변형된 T 세포의 증식을 guava[®] ViaCount 시약(EMD Millipore)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 guava[®] easyCyte[™] 세포 카운터에 의해 평가하였다. 생체내 실험을 위한 변형된 T 세포의 확장을 종래 개시된 것과 같이 공-자극(CD80)과 함께 표적 항원(CD19 또는 PSMA)을 발현하도록 유전적으로 가공된 NIH-3T3 무린 섬유아세포 유래의 AAPC를 이용하여 수행하였다.³⁰

[0284] 공-배양 분석

[0285] 종양 세포(DOHH2, Raji, Ph⁺ ALL 3.1, NALM-6)를 5:1 비의 CD40L-변형된 T 세포 및 목-형질도입된 T 세포와 함께 공-배양하였다. 3일 후 유세포분석을 수행하여 종양 세포의 표현형을 결정하였다. moDC(2.5×10^5)를 1:5 비의 자가성 CD40L-변형된 T 세포 또는 목-형질도입된 T 세포와 함께 공-배양하였고, 24시간 후 Luminex IS100 시스템(하기 참조) 상에서 IL-12p70에 대해 조직 배양 상등액을 분석하였다. 또한, moDC를 5:1 비의 CD40L-변형된 T 세포 및 목-형질도입된 T 세포와 함께 공-배양하였고, 24시간 후 moDC의 표현형을 유세포분석에 의해 분석하였다.

[0286] 세포독성 분석

[0287] 형질도입된 T 세포의 세포용해 능력을 종래 개시된 것과 같이 표준 ⁵¹Cr 방출 분석을 이용하여 결정하였다.³⁴

[0288] 사이토카인 검출 분석

[0289] 조직 배양 상등액에서의 사이토카인 검출을 Luminex IS100 시스템 및 IS 2.3 소프트웨어(Luminex Corp.)와 함께 제조사의 설명서에 따라 MILLIPLEX 인간 사이토카인 검출 시스템(Millipore Corp.)을 이용하여 평가하였다.

[0290] 유세포분석

[0291] FACSscan 세포측정기(cytometer)를 이용하여 유세포분석을 수행하였고, FlowJo 버전 9.2 소프트웨어(Tree Star)를 이용하여 데이터를 분석하였다. CAR 발현을 CAR 특이적 미국 햄스터 단일클론 항체 19E3(1928z) 및 12D11(1928z 및 Pz1, MSKCC 단일클론 항체 설비)을 이용하여 검출하였다. CD40L 발현을 마우스 항-인간 CD154(BD Biosciences)를 이용하여 검출하였다. 인간 T 세포를 마우스 항-인간 CD3(BD Biosciences), CD4 및 CD8(Invitrogen)으로 염색하였다. moDC를 마우스 항-인간 CD11b, HLA-DR, CD83 및 CD86(Invitrogen)을 이용하여 염색하였다. DOHH2, Raji 및 NALM6 종양 세포 표현형을 마우스 항-인간 CD19, CD40, CD54, CD80, CD86, HLA-클래스 I 및 HLA-DR(Invitrogen), CD58, CD70 및 CD95(BD Biosciences)를 이용하여 검출하였다.

[0292] CAR T 세포의 생체내 연구

[0293] 본 발명자들은 8 내지 12주령의 SCID/Beige(CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lysf^{bg-J}/Cr1) 마우스(Charls River Laboratories)에 DOHH2 종양 세포(5×10^5 세포)를 정맥내 주사에 의해 접종하였다. 2일 후, 마우스를 형질도입된 T 세포(1×10^7 CAR T 세포)로 정맥내 주입하였다. 종양의 진행을 임상적으로 모니터링하였고, 질환이 임상적으로 확실해졌을 때(뒷다리의 마비가 발생하거나, 자극에 대한 반응이 감소함) 마우스를 안락사시켰다. 모든 무린 연구는 메모리얼 슬로안-케터링 캔서 센터 기관 동물 케어 및 이용 위원회가 승인한 프로토콜(00-05-065)에 따라 수행하였다.

[0294] 통계적 분석

[0295] 모든 분석은 Graphpad Prism 5.0 소프트웨어를 이용하여 계산되었고, 생존 데이터는 로그-랭크(log-rank) 분석

을 이용하여 평가되었으며, 다른 모든 분석은 Mann-Whitney 테스트(one-tailed)를 이용하여 달성되었다.

[0296] **결과**

[0297] *인간 T 세포에 의한 CD40L의 구성적 발현*

[0298] 본 발명자들은 먼저 건강한 공여자 유래의 T 세포를 CD40L 레트로바이러스 벡터로 형질도입하였다(도 22a). T 세포를 CD40L 유전자로 레트로바이러스 형질도입하면 일상적으로(routinely) $\geq 40\%$ 의 유전자 전달을 나타내었고, CD4+ 및 CD8+ T 세포 서브세트 모두에서 CD40L이 안정하게 발현되었다(도 22b). CD40L-변형된 T 세포의 증식은 동일한 3명의 공여자로부터 생성된 목-형질도입된 T 세포와 비교하여 현저하게 증가되었다(도 22c). CD40L-변형된 T 세포 유래의 조직 배양 배지를 분석하였고, 예상한 것과 같이, 목-형질도입된 T 세포와 비교할 때 현저하게 증가된 가용성 CD40L(sCD40L)을 가질 뿐만 아니라, 전-염증성 사이토카인인 IFN- γ 및 GM-CSF의 분비가 현저하게 증가된 것으로 나타났다(도 22d).

[0299] *CD40L-변형된 T 세포는 CD40+ 종양 세포주 및 환자 유래 CLL 세포 모두의 표현형을 변경시킨다.*

[0300] 종양 세포의 표현형을 변형시키기 위한 CD40L/CD40 경로의 능력을 조사하기 위하여, CD40+ B 세포 종양 세포 및 CD40L-변형된 T 세포 또는 목-형질도입된 T 세포의 공-배양을 수행하였다. CD40L-변형된 T 세포와의 배양물은 DOHH2 종양 세포의 표면에 공-자극성 분자(CD80 및 CD86), 부착 분자(CD54, CD58 및 CD70), HLA 분자(HLA 클래스 I 및 HLA-DR) 및 Fas 데스 수용체(CD95)의 상향조절을 유도하였지만, 목-형질도입된 T 세포는 그렇지 않았다(도 23a). 또한, DOHH2 종양 세포가 상승된 레벨의 sCD40L을 함유하는 CD-40L-변형된 T 세포 유래의 조정 배지(conditioned medium)에서 배양될 때 표현형의 변화는 자명하였다(도 28). 종양 세포의 CD40 발현 종양 세포 표현형을 변경하는데 필수적인지 여부를 결정하기 위하여, CD40-종양 세포주(NALM6)와 CD40L-변형된 T 세포 및 목-형질도입된 T 세포의 공-배양을 수행하였다. 상기 연구 결과 표현형의 변경은 없었는데, 이는 종양 세포 표현형에서의 CD40L 매개성 변화를 유도하기 위해서는 종양에 의한 CD40 발현이 필요함을 나타낸다(도 23b).

[0301] 상기 효과를 임상적으로 관련있는 세팅에서 추가로 확인하기 위하여, 본 발명자들은 CLL을 갖는 환자로부터 유래된 CD40L-변형된 T 세포와 자가성 CLL 종양 세포를 공-배양하였다. CLL 환자 유래의 T 세포를 레트로바이러스 형질도입하면 일상적으로 $\geq 40\%$ 의 유전자 전달을 나타내었고, CD40L 유전자가 안정하게 발현되었다(도 24a). 상기 세팅에서, 환자 유래의 CD40L-변형된 T 세포는 상기 자가성 CLL 세포의 표면에 공-자극성 분자, 부착 분자, HLA 분자 및 Fas 데스 수용체를 상향조절하는 능력을 나타내었지만, 목-형질도입된 T 세포는 그렇지 않았다(도 24b).

[0302] *CD40L-변형된 T 세포는 IL-12p70 분비를 유도하고, moDC의 성숙을 매개한다.*

[0303] DC 성숙 및 전-염증성 사이토카인 IL-12의 분비에서의 CD40L의 역할을 고려하여, 본 발명자들은 다음으로 자가성 moDC와 공-배양될 때 CD40L-변형된 T 세포가 동일한 효과를 유도할 수 있는지 여부를 조사하였다. 의미있게도, 본 발명자들은 3명의 별도의 공여자 유래의 moDC 및 자가성 CD40L-변형된 T 세포를 함유하는 공-배양에서 CD40L-변형된 T 세포가 IL-12p70의 분비를 유도함을 발견하였다(도 25a). 표면 공-자극성 분자(HLA-DR, CD86 및 CD83)의 상향조절에 의해 결정된 것과 같은 moDC의 성숙은 또한 CD40L-변형된 T 세포와의 공-배양 후에 보여졌지만, 목-형질도입된 T 세포와의 공-배양 후에는 보이지 않았다(도 25b).

[0304] *T 세포에 의해 CAR 및 CD40L이 모두 발현되면 시험관내 및 생체내 세포독성이 향상되게 된다.*

[0305] 본 발명자들은 다음으로 바이-시스트론성 레트로바이러스 벡터(1928z/CD40L; 도 26a)를 이용하여 T 세포가 항-CD19 CAR(1928z) 및 CD40L 모두를 발현하는 능력을 평가하였다. T 세포를 형질도입하면 일상적으로 1928z 및 CD40L 모두 $\geq 40\%$ 발현을 나타내었다(1928z/CD40L T 세포; 도 26b). 또한, 항-CD19 CAR(1928z) 및 항-PSMA CAR을 포함하는 대조군 레트로바이러스 벡터를 생성하였다(Pz1 및 Pz1/CD40L; 도 26b). 1928z/CD40L T 세포의 시험관내 항-종양 활성을 평가하기 위하여, 표준 4시간 ^{51}Cr 방출 분석을 수행하였다. CD40L의 구성적 발현은, 1928z CAR을 단독으로 발현하도록 변형된 T 세포를 포함하는 대조군 T 세포의 패널과 비교할 때, CD19+ 종양 세포에 대한 1928z T 세포의 용해 능력을 통계적으로 향상시켰다(도 26c). 향상된 세포독성은 또한 다른 CD19+/CD40+ 종양 세포주에 대해서도 나타난다(도 29).

[0306] 1928z/CD40L T 세포의 생체내 항-종양 활성을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 전신성 DOHH2 림프종의 이종이식 모델을 이용하였다. 본 발명자들은 이전에 전신성 DOHH2 종양 세포는 SCID/Beige 마우스에서 CD19-표적화 CAR T 세포 치료에 현저하게 난치성임을 관찰하였다. CAR T 세포를 CD40L로 추가로 변형하면 상기 모델에서 항-종양 효능을 향상시킬 수 있는지 여부를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 전신성 DOHH2 종양을 갖는 SCID/Beige

마우스를 CAR/CD40L T 세포로 접종 및 처리하였다. 의미있게도, 1928z/CD40L T 세포로 처리하면, 1928z T 세포 또는 대조군 T 세포(Pz1 및 Pz1/CD40L T 세포)로 처리한 것과 비교하여, 향상된 생존을 나타내었고, 그 결과 1928z/CD40L T 세포로 처리된 마우스의 장기간 생존이 30% 증가되었다.

[0307] 논의

[0308] CAR T 세포를 이용하는 입양적 치료는 B 세포 악성물을 갖는 환자에서 유망한 임상적 반응을 나타내었다.²⁻⁴ 상기 연구들은 유일한 항-종양 이펙터 세포로서의 CAR T 세포의 잠재력을 보여주었다. 그러나, 이러한 접근법은 강력한 면역억제성 종양 미세환경을 갖는 종양에 대해서는 성공이 제한될 수 있다.⁵ 또한, 현재의 형태에서는 CAR T 세포는 표적 항원이 손실된 후 종양의 탈출에 반응하는 능력을 보여주지 못하였다.⁶ 이러한 제한을 극복하기 위한 가능한 하나의 방법은 T 세포의 세포용해 능력/증식을 개선하고, 종양의 면역원성을 증강시키며, DC 항원 제공/기능을 개선하기 위한 노력으로 CD40L의 구성적 발현을 통해 CAR T 세포를 추가로 가공하는 것이다. CD40L의 구성적 발현을 통해 CAR T 세포를 변형하면 또한 내인성 면역 반응을 추가로 활성화시킬 수 있고, 이로 인해 항-종양 효능을 향상시킨다.

[0309] T 세포에 의한 CD40L의 구성적 발현의 역할을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 먼저 CD40L 유전자를 단독으로 함유하는 레트로바이러스 벡터를 개발하였다. T 세포에 형질도입될 때, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 서브세트 모두 구성적 발현이 나타난다(도 22b). CD4⁺ T 세포와 보다 일반적으로 연관되어 있지만, 메모리 CD8⁺ T 세포에서의 CD40L 발현 및 헬퍼 기능이 최근 보고되었다.³⁷ CD40L 발현은 또한 T 세포 증식 및 전-염증성 TH1 사이토카인(IFN- γ , GM-CSF)의 분비를 향상시키는 것으로 알려져 있다.^{21,22} CD40L-변형된 T 세포는 동일한 공여자 유래의 유사하게 활성화되지만 목 형질도입된 T 세포와 비교하여 전-염증성 사이토카인을 분비하고 증식을 향상시키는 능력을 나타낸다(도 22c 및 도 22d). CD40L의 구성적 발현을 통해 T 세포를 강화하면 그 항-종양 기능/활성화를 향상시킬 잠재력을 갖는다.

[0310] HLA 클래스 I, 공-자극성 분자 및/또는 부착 분자를 포함하는 세포 표면 단백질의 하향조절이 면역 인식을 피하기 위하여 종양에 의해 종종 도입된다.^{5,38,39} 아포토시스성 저항이 또한 악성 세포 표면의 Fas 데스 수용체의 손실과 함께 일어날 수 있다.⁴⁰ 이것에 대응하기 위하여, CD40L은 악성 세포의 CD40과 상호작용하여 공-자극성 분자(CD80 및 CD86), 부착 분자(CD54, CD58 및 CD70), HLA 분자(HLA 클래스 I 및 HLA-DR)의 상향조절을 매개하고, 악성 B 세포 종양에 대한 Fas/FasL 경로를 통해 아포토시스를 촉진할 수 있다.^{41,42} CD40L-변형된 T 세포는 CD40+ 종양 세포의 표현형을 변형시켜 상기 핵심적인(critical) 표면 단백질을 상향조절하게 되고, 그 결과 면역 회피에 대한 종양 세포의 능력에 대응하게 된다(도 2). CD40- 종양 세포가 CD40L-변형된 T 세포와 공-배양될 때에는 상기 표현형의 변화는 없어졌기 때문에, 상기 효과는 종양 세포에 의한 CD40의 발현에 의존하였다(도 23a 및 도 23b). 상기 효과는 또한 CLL 환자로부터 유래된 공-배양된 CD40L-변형된 T 세포가 자가성 CLL 세포의 면역원성을 증강시키는 보다 임상적으로 관련있는 세팅에서도 나타났다(도 24a 및 도 24b). 이러한 발견은 T 세포가 구성적 CD40L 발현을 통해 자가성 악성 세포의 면역원성을 증강시키기 위한 능력을 유지하고 있음을 나타낸다. 중요하게는, 상승된 레벨의 sCD40L을 함유하는 배지가 유사한 표현형적 변화를 유도하였기 때문에, 세포 대 세포의 접촉은 종양 세포의 표현형을 변형하기 위해 필요하지 않는다(도 28). 상기 CD40L/CD40 경로를 통해 암 세포의 면역원성을 증강시키면, CD40L을 암호화하는 아데노바이러스 벡터로 형질도입된 자가성 CLL 종양 세포(Ad-CD40L CLL 세포)의 주입을 이용하는 종래 보고된 백신 연구에서 내인성 항-종양 반응이 유도되는 것으로 나타났다.^{27,28} 또한, CD40L을 구성적으로 발현하도록 추가로 변형된 종양-특이적 T 세포를 주입하면 내인성 항-종양 반응을 유도하는 능력을 동일하게 가질 수 있었다. 이것의 결과는 내인성 항-종양 T 또는 NK 세포의 모집을 통한 에피토프 확산(epitope spreading)일 수 있고, 이로 인해 단일 표적 항원의 하향조절을 통한 종양 탈출의 능력을 제한할 수 있다.

[0311] 수지상 세포(DC)의 기능은 상기 종양 미세환경 내에서 지연된다. 보통, DC는 림프절 내에서 성숙, 이동 및 항원을 제공하고, 이로 인해 악성물 또는 병원체의 존재에 대한 면역 시스템의 적응성 암(arm)을 자극한다.⁵ 그러나, 억제성 종양 미세환경에 노출된 DC는 T_{regs}를 유도하고 종양-특이적 T 세포를 내성시키는 역설적인 기능을 갖는다.⁴³ 이것에 대응하기 위하여, CD40L/CD40 경로는 DC의 항원 제공, 전-염증성 사이토카인 IL-12의 생성을

부스트(boost)하고, CD8⁺ T 세포의 세포독성 기능을 촉진할 수 있다.^{19,20} 작용성 CD40 항체는 종래 DC를 활성화시키고, CD8⁺ T 세포 반응을 부스트하며, 이로 인해 CD4⁺ T 세포의 도움에 대한 필요성을 교체하는 것으로 나타났다.²⁶ 아울러, CD40L-변형된 종양-특이적 CD8⁺ T 세포는 종양을 갖는 마우스에서 DC의 성숙을 자극하고, 입양적으로 전달된 CD8⁺ T 세포의 항-종양 반응을 증강시키는 것으로 나타났다.⁴⁴ CD40L-변형된 T 세포가 인간 DC의 기능을 증강시키는 능력을 테스트하기 위하여, 자가성 moDC를 이용한 시험관내 공-배양 실험을 사용하였다. 의미있게도, CD40L-변형된 T 세포는 moDC로부터 IL-12p70의 분비를 자극하였다(도 25a 및 도 25b). IL-12는 본 발명자들 및 다른 연구자들이 종래 나타낸 것과 같이 T 세포의 증식, 세포독성 능력을 향상하고, Treg 억제에 대한 저항성을 매개하는 능력을 포함하는 몇 가지 면역-자극 기능을 갖는 다면성(pleiotropic) 사이토카인이다.^{7,45} CAR/CD40L T 세포가 DC로부터 IL-12 생성을 자극하는 능력은 입양적으로 전달된 CAR T 세포의 개선된 항-종양 효과 및 내인성 종양 특이적 T 세포 및 자연 살해(NK) 세포의 모집 및 활성화로 번역될 수 있다. 종양의 근방에서 IL-12의 생산을 촉진함으로써, 본 발명자들은 전신성 IL-12 투여 후 심각한 독성을 보여주는 종래의 연구와 비교하여 IL-12 연관성 독성이 최소화될 것임을 예상한다. IL-12의 생성을 자극하는 것에 더하여, CD40L-변형된 T 세포는 DC의 성숙을 촉진하고, CAR T 세포의 세포독성의 문맥에서 DC 종양 항원 섭취 및 제공을 추가로 향상시켜 이펙터 T 세포 및 NK 세포에 의한 내인성 항-종양 반응의 모집/활성화되게 된다(도 25a 및 도 25b). 함께 고려하면, 향상된 DC의 기능은 내인성 항-종양 면역 반응의 모집을 통한 유전적으로 변형된 종양 특이적 T 세포의 향상된 항-종양 효능으로 번역되어야 한다.

[0312] CAR T 세포가 T 세포의 특이성을 재겨냥하는 능력은 다수의 전임상 및 임상 보고에서 나타나 있다.¹ 본 발명자들은 항-CD19 CAR(1928z) 및 CD40L 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터를 개발하였다(도 28a). T 세포에 의한 1928z 및 CD40L 모두의 구성적 발현은 즉시 달성될 수 있다(도 28b). 의미있게도, CD19+ 표적의 폐널에 대한 1928z/40L T 세포의 세포독성 잠재력을 테스트할 때, 본 발명자들은 1928z CAR 단독으로 변형된 T 세포와 비교하여 증가된 세포독성을 나타내었다(도 28c). 최근, 라우린(Laurin) 및 동료들은 표면 부착 분자의 CD40/IL-4 의존성 상호조절 후 종양 세포주에 대해 CAR T 세포에 의한 향상된 세포독성을 보고하였으며, 이는 또한 본 발명자들의 실험에서 나타난 증가된 세포독성을 설명할 수 있었다.⁴⁶ CAR/CD40L T 세포의 생체내 잠재력을 테스트하기 위하여, 공격적으로 형질전환된 소포성 림프종 세포주인 DOHH2를 이용한 이종이식 모델을 사용하였다. 상기 모델은 역사적으로 1928z T 세포에 의한 근절에 저항성이었다(도 27). 그러나, CD40L의 변형을 추가함으로써, 본 발명의 1928z/CD40L T 세포는 1928z T 세포를 단독으로 처리된 마우스와 비교할 때 종양을 갖는 마우스의 생존을 연장시켰고, 1928z/CD40L T 세포 처리된 군에서 장기간의 생존을 30% 연장시키게 되었다(도 27). 상기 모델은 생존의 차이를 나타내지만, SCID/Beige 마우스에 의한 적격 면역 시스템의 부재는 상기 모델로 CAR T 세포에 의한 구성적 CD40L 발현이 확립된 종양을 근절할 수 있다는 완전한 유익을 조사하는 것을 부적합하게 만든다. 본 발명의 모델에서 본 발명자들은 향상된 항-종양 효능을 관찰하지만, 이것은 자가분비성/근거리분비(paracrine) CD40/CD40L 경로에 의한 CAR T 세포의 향상된 세포독성과 연관되고, CD40L-변형된 CAR T 세포에 의한 내인성 면역 반응의 모집/활성화를 통한 것은 아닐 수 있다. 종양 미세환경 및 내인성 항-종양 면역 반응의 모집에 대한 CAR T 세포에 의한 CD40L의 구성적 발현의 완전한 효과를 조사하기 위하여 면역-적격 동계성 종양 모델이 사용될 수 있다. 인간 CD19+ B 세포 악성물의 면역-적격 동계성 모델이 최근 개발되었고, 적격 면역 시스템의 문맥에서 1928z/CD40L T 세포를 평가하기 위해 사용되고 있다.

[0313] 골수 또는 흉선 세포에 대해 CD40L을 구성적으로 발현하면 CD40L-결핍 마우스 내로 주입한 후 T 림프구증식성 질병이 되는 것으로 나타났다.⁴⁷ 흉선세포의 끊임없는 CD40L 자극 후 흉선 내에서 일어나는 클론 군집은 (CD40L-변형된 세포의 삽입성 암발생보다는) 악성 형질전환을 유도할 수 있다. 본 발명자들은 CAR/CD40L T 세포의 주입 후 최소의 독성과 악성 형질전환이 없음을 나타내었지만, 악성 T 세포 형질전환에 관한 염려를 고려하면, iCasp9과 같은 효과적인 자살 유전자가 상기 레트로바이러스 벡터 내에 포함되는 것이 바람직할 수 있다.⁴⁸

[0314] 실시예 6에 대한 참고문헌

- [0315] 1. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. J Gene Med. 2012;14(6):405-415.
- [0316] 2. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular

Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177):177ra138.

- [0317] 3. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*. 2011;118(18):4817-4828.
- [0318] 4. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-733.
- [0319] 5. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-271.
- [0320] 6. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-1518.
- [0321] 7. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012;119(18):4133-4141.
- [0322] 8. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. 1992;357(6373):80-82.
- [0323] 9. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(1):4-43.
- [0324] 10. Uckun FM, Gajl-Peczalska K, Myers DE, Jaszcz W, Haissig S, Ledbetter JA. Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B-cell ontogeny and the efficacy of anti-CD40 immunotoxins against clonogenic B-lineage acute lymphoblastic leukemia as well as B-lineage non-Hodgkin's lymphoma cells. *Blood*. 1990;76(12):2449-2456.
- [0325] 11. Gruss HJ, Ulrich D, Braddy S, Armitage RJ, Dower SK. Recombinant CD30 ligand and CD40 ligand share common biological activities on Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Eur J Immunol*. 1995;25(7):2083-2089.
- [0326] 12. Zong YS, Lin H, Choy DT, et al. Nasopharyngeal carcinoma and lymphoinfiltration. *Oncology*. 1991;48(4):290-296.
- [0327] 13. Lollini PL, Landuzzi L, Frabetti F, et al. Expression of functional CD40 on human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells. *Clin Cancer Res*. 1998;4(8):1843-1849.
- [0328] 14. van den Oord JJ, Maes A, Stas M, et al. CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol*. 1996;149(6):1953-1961.
- [0329] 15. Wingett DG, Vestal RE, Forcier K, Hadjokas N, Nielson CP. CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas: variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas-mediated apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;50(1):27-36.
- [0330] 16. Ciaravino G, Bhat M, Manbeian CA, Teng NN. Differential expression of CD40 and CD95 in ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2004;25(1):27-32.
- [0331] 17. Altenburg A, Baldus SE, Smola H, Pfister H, Hess S. CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. *J Immunol*. 1999;162(7):4140-4147.
- [0332] 18. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:111-135.
- [0333] 19. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996;184(2):747-752.
- [0334] 20. Clarke SR. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leukoc Biol*. 2000;67(5):607-614.
- [0335] 21. Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T

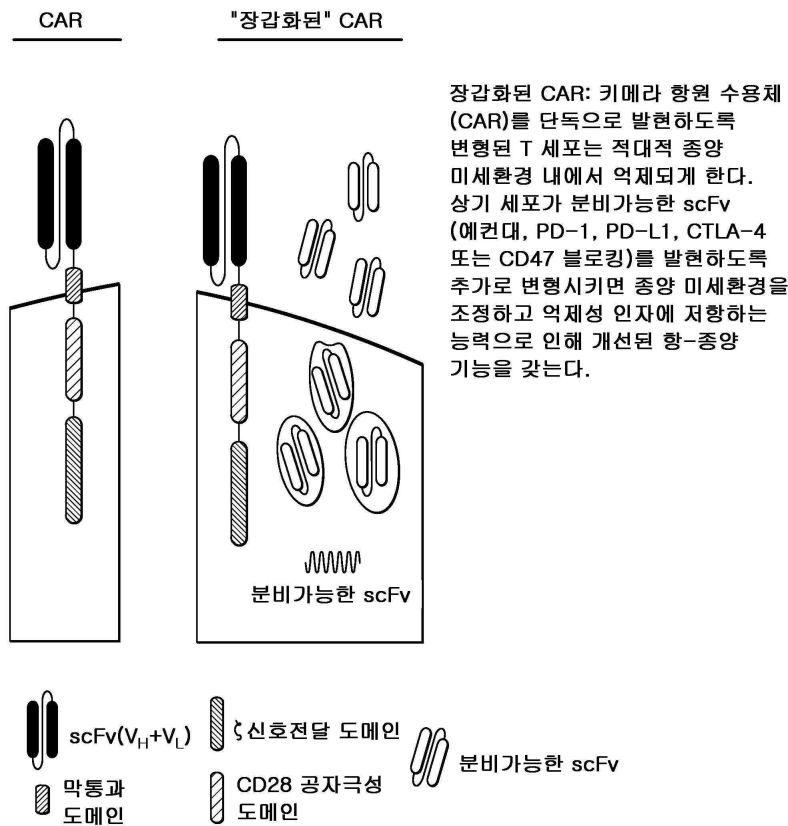
lymphocytes. *J Immunol.* 1994;152(4):1523-1531.

- [0336] 22. Peng X, Kasran A, Warmerdam PA, de Boer M, Ceuppens JL. Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol.* 1996;26(7):1621-1627.
- [0337] 23. Bhadra R, Gigley JP, Khan IA. Cutting edge: CD40-CD40 ligand pathway plays a critical CD8-intrinsic and -extrinsic role during rescue of exhausted CD8 T cells. *J Immunol.* 2011;187(9):4421-4425.
- [0338] 24. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science.* 2002;297(5589):2060-2063.
- [0339] 25. Khong A, Nelson DJ, Nowak AK, Lake RA, Robinson BW. The use of agonistic anti-CD40 therapy in treatments for cancer. *Int Rev Immunol.* 2012;31(4):246-266.
- [0340] 26. Vonderheide RH, Glennie MJ. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013;19(5):1035-1043.
- [0341] 27. Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2000;96(9):2917-2924.
- [0342] 28. Wierda WG, Castro JE, Aguilon R, et al. A phase I study of immune gene therapy for patients with CLL using a membrane-stable, humanized CD154. *Leukemia.* 2010;24(11):1893-1900.
- [0343] 29. Ghani K, Wang X, de Campos-Lima PO, et al. Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Hum Gene Ther.* 2009;20(9):966-974.
- [0344] 30. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med.* 2003;9(3):279-286.
- [0345] 31. Ratzinger G, Reagan JL, Heller G, Busam KJ, Young JW. Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation. *Blood.* 2003;101(4):1422-1429.
- [0346] 32. Riviere I, Brose K, Mulligan RC. Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(15):6733-6737.
- [0347] 33. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5426-5435.
- [0348] 34. Gong MC, Latouche JB, Krause A, Heston WD, Bander NH, Sadelain M. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia.* 1999;1(2):123-127.
- [0349] 35. Santos EB, Yeh R, Lee J, et al. Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase. *Nat Med.* 2009;15(3):338-344.
- [0350] 36. Quintas-Cardama A, Yeh RK, Hollyman D, et al. Multifactorial optimization of gammaretroviral gene transfer into human T lymphocytes for clinical application. *Hum Gene Ther.* 2007;18(12):1253-1260.
- [0351] 37. Frentsch M, Stark R, Matzmohr N, et al. CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood.* 2013;122(3):405-412.
- [0352] 38. Greaves P, Gribben JG. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood.* 2013;121(5):734-744.
- [0353] 39. Geijtenbeek TB, van Kooyk Y, van Vliet SJ, Renes MH, Raymakers RA, Figdor CG. High frequency of adhesion defects in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1999;94(2):754-764.

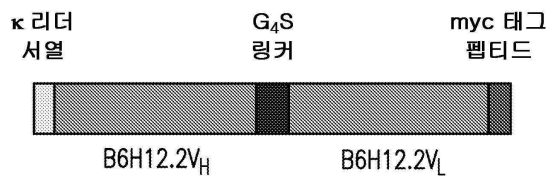
- [0354] 40. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995;268(5215):1347-1349.
- [0355] 41. Schultze JL, Cardoso AA, Freeman GJ, et al. Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: a conceptual model to improve their tumor immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(18):8200-8204.
- [0356] 42. Schattner EJ, Mascarenhas J, Bishop J, et al. CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood*. 1996;88(4):1375-1382.
- [0357] 43. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*. 2004;104(8):2235-2246.
- [0358] 44. Higham EM, Wittrup KD, Chen J. Activation of tolerogenic dendritic cells in the tumor draining lymph nodes by CD8+ T cells engineered to express CD40 ligand. *J Immunol*. 2010;184(7):3394-3400.
- [0359] 45. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133-146.
- [0360] 46. Laurin D, Marin V, Biagi E, et al. Upregulation of Adhesion Molecules on Leukemia Targets Improves the Efficacy of Cytotoxic T Cells Transduced With Chimeric Anti-CD19 Receptor. *J Immunother*. 2013;36(3):181-189.
- [0361] 47. Brown MP, Topham DJ, Sangster MY, et al. Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice. *Nat Med*. 1998;4(11):1253-1260.
- [0362] 48. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1673-1683.
- [0363] **본 발명의 구현예**
- [0364] 상기 개시된 내용으로부터, 다양한 용법 및 조건을 채택하기 위하여 본 명세서에서 개시된 본 발명에 변동 및 변형이 이루어질 수 있음이 명확할 것이다. 이러한 구현예는 또한 하기 청구항의 범위 이내이다.
- [0365] 본 명세서에서 다양하게 정의된 임의의 인자들의 목록을 인용하는 것은 임의의 단일 인자 또는 나열된 인자들의 조합(또는 서브조합)으로서 상기 다양한 것들의 정의를 포함한다. 본 명세서의 구현예를 인용하는 것은 임의의 단일 구현예 또는 임의의 다른 구현예 또는 그의 일부와의 조합으로서 상기 구현예를 포함한다.
- [0366] 본 발명의 일부 주제는 그 개시된 내용이 인용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함되는 2007년 3월 30일자로 출원된 미국 가출원 제60/921,144호의 이익을 주장하는 2010년 3월 8일자로 출원된 국제 특허 출원 제 PCT/US2008/004251호의 35 U.S.C. § 371에 의한 미국 국내 단계 출원인 미국 특허 출원 제12/593,751호에 관한 것일 수 있다.
- [0367] 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 공개문헌들은 각각의 독립적인 특허 및 공개문헌들이 구체적이고 개별적으로 인용에 의해 포함됨을 나타내는 것과 동일한 정도로 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

도면

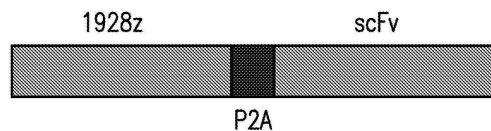
도면1



도면2a



도면2b



분비가능한 항-CD47 scFv 구조

(도 2a) 분비가능한 항-CD47 scFv는 상기 단백질의 방출을 허용하기 위하여 카파(κ) 리더 서열을 포함하도록 디자인되었다. 세린 글리신 링커(G4S)를 이용하여 가변 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)가 연결되었고, scFv의 검출을 허용하도록 myc-태그 펩티드가 포함되었다.

(도 2b) 나타낸 것과 같이, 분비가능한 scFv는 P2A 인자를 이용하여 1928z CAR 구조체에 연결되었다.

도면3

카파 리더 서열을 갖는 B6H12.2 scFv

카파 리더 서열	
cc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act ggt gac ggg gtg cag ctg gtg gag tcc ggg gga gac tta gtg M E T D T L L L L V L L L W V P G S T G D E V Q L V E S G G D L V	
aag cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt gcc tat gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg K P G S L K L S C A A S G F T F S G Y G M S W V R Q T P D K R L	
B6H12.2 VH 서열	
gag tgg gtc gca acc att act agt ggt agt act tac acc tac tat cca gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg E W V A T I T S G G T Y T Y Y P D S V K G R F T I S R D N A K N T L	
tac ctg caa ata gac agt ctg aag tct gag gat aca gcc ata tat ttc tgt gca aga tcc ctc gcg gga aat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc Y L Q I D S L K S E D T A I Y F C A R S L A G N A M D Y W G Q G T	
세린 클리신 링커 서열	
tca gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggt gga tca ggt gga ggt gga tct gac att gtg atg act cag tct cca gcc acc ctg tct S V T V S S G G G G S G G S G G G G S G G G S D I V M T Q S P A T L S	
gtg act cca gga gat aga gtc tct ctt tcc tgc agg gcc agc cag act att agc gac tac tta cac tgg tat cca caa aaa tca cat gag tct cca agg ctt V T P G D R V S L S C R A S Q T I S D Y L H W Y Q Q K S H E S P R L	
B6H12.2 VL 서열	
ctc atc aaa ttt gct tcc caa tcc att tct ggg atc ccc tcc agg ttc agt ggc agt gga tca ggc tca gat ttc act ctc act atc aac agt gtg gaa L I K F A S Q S I S G I P S R F S G S G S G S G S I N S V E	
cct gaa gat gtt gga gtg tat tac tgt caa aat ggt cac ggc ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa gaa caa aaa ctc atc P E D V G V Y Y C Q N G H G F P R T F G G G T K L E I K	c-myc 태그 서열 gaa caa aaa ctc atc E Q K L I
tca gaa gag gat ctg TAA ctc gag S E E D L * L E	

CD8 리더 서열을 갖는 B6H12.2 scFv

[illegible]

도면5

1928z-2A-B6H12.2 (카파 리더) 서열

atggctctccagtgactgccctactgcttcccttagcgtcttcttgcagtgaggtgaagctgcagcagcttggg
 gctgagctgggtgaggtcctgggtcctcagtgaggttcttgcaggtcttggctatgcatcagtagctactggatgaa
 ctgggtgaagcagaggtcctggacaggtcttggatggatggacagattatcttggagatggtagactaacataat
 ggaaagtccaaggtcaagccacactgactgcagacaaatccctccagcacagcctacatgcagctcagcggcctaacat
 ctgaggactctgaggctcttcttctgcaagaagaccattagttcggtagtagatttctactttgactactggggccaagg
 gaccacggtcaccgtctcctcagggtgggtggatcagggtgggtggatctgggtgggtggatctgacattgagc
 tcaccagctctcaaaattcatgtccacatcagtaggagacaggtcagcgtcaccctgcaaggccagtcagaaatgggt
 actaatgtagcttgggtatcaacagaaccaggaacatctcttaaacacatgatttactcggcaaccctaccggaacagtg
 agtccctgactcctcaccagcagtggtatcgggacagatttactctcaccatcaactaacgtgcagcttaagacttggc
 agactatttctgcaacaataataacaggtatcctgacacgtccggaggggggacacagctggagatcaaacggcggc
 cgaattgaagtatgtatctctcttcttactctagacaatgagaagagcaatggaccattatccatgtgaagggaacaa
 ccttggccaagtccctatttccggacccttctaaagcccttgggtgctgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt
 gctttagtagtaacagtggtcttatttatttctgggtgaggtgaagagggagcaggtctctgcacagtgactacatgaac
 atgactcccgccgccccgggccccccgaagcattaccagccctatgccccaccacggcagcttgcagcctatcgtct
 cagagtgaggttcagcaggagcagagagcccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatct
 aggaagagagagggagtagcaggttgggacagagacgtggcgggacccctgagatgggggggaagccgagag
 gaagaacccctcagggaaggtctgtaaatgaactgcagaagataagatggcgaggccctacagtgagattgggtatga
 aaggcagcgcgggaggggaggggacaggtggccttaccaggggtcagtagacccaccaagggacacctacga
 cggccttcaatgcaggccctgccccctcgaggatctggagcaacaacttctactactcaaacagcaggtgacgtgg
 aggagaatcccggaacccatggagacagacacacctctgctatgggtactgctgcttgggttccaggttccactggtagc
 gaggtgcagctgggtgggttccgggggagcttagtgaagcctggaggggtccctgaacctctcttctgcagcctctgga
 ttaccttctcagtggtatggcagcttgggttcgcagacctcagacagaagggctggagtggttcgcaaccattactagt
 ggtggtacttacacctactatcagacagtgtagggggcagatccaccatctccagagacaaatgccagaacacccctgta
 ctgcaaatagacagctggaagctgaggaatacagccatatttctgcaagatccctcgggggaatgctatggacta
 ctggggtaaggaacctcagtcaccgtctcctcaggtggaggtggatcaggtggaggtggatctgggtggaggtggatc
 tgacattgtgatgactcagctcaccagccctgtctgtgactccaggagatagagctctcttcttgcagggccagccag
 actatagcagctacttacactggatcaacaaatcacatgagctcacaaggttctcatcaaatgtcttcccaatccattt
 ctgggtcccttccaggttcagtgaggtggatcaggttcagatttcactctcagtagtaacagtgtaggaacctgaagatg
 ttggagtgatctactgtaaatgggtcagcgttctcctggacgttcgggtggagggcaccagctggaatcaagaacaa
 aactcatctcagaagaggtctgtaa

1928z CAR
 P2A
 B6H12.2 scFv

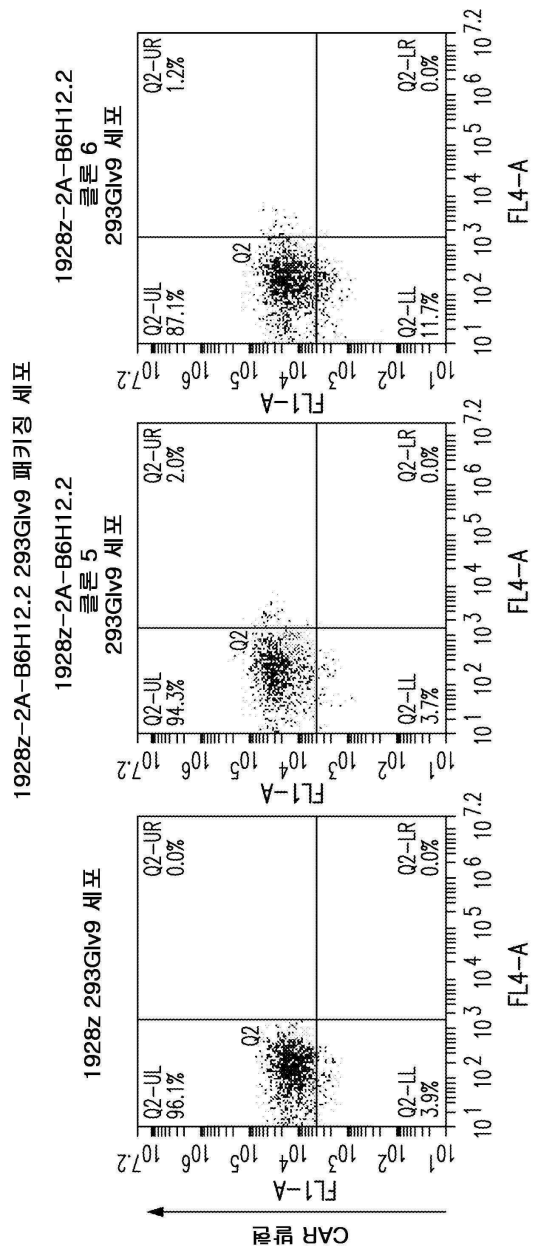
도면6

4H1128z-2A-B6H12.2 (카파 리더) 서열

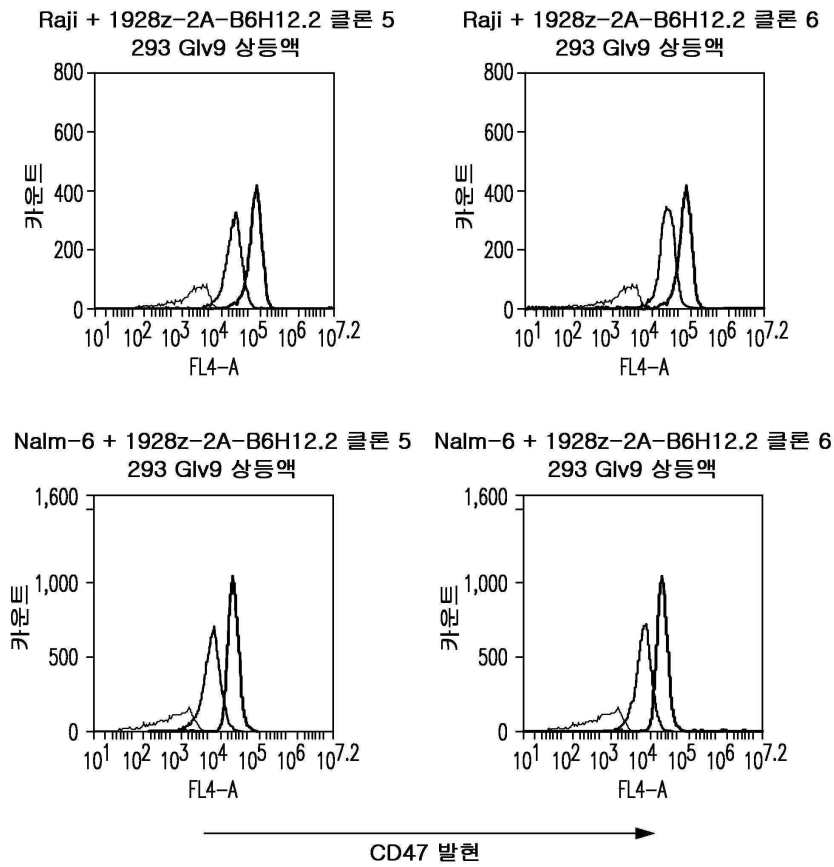
CATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAG
 CTGCAGGAGTCAAGGGGAGGCTTCGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTCAAAGTCTCCTGTGCAGC
 CTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTGGGTTCGCCTGAGTCCGGAGATGAGGCTG
 GAGTGGGTCCGAACCTATGCAGTGCTGGTGGTTACATCTTCTATTCTGACAGTGTGCAGGGA
 CGATTACCATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGCACCTGCAAAATGGGCAGTCTGAGG
 TCTGGGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCAGGATTTGGTAACGCTGATTACTATG
 CTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGT
 GGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCT
 GTGTGACAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAG
 AACCCGAAGAACCAAGTTGGCTTGGTACCAGCAAAAACAGGACAGTCTCCTGAAGTCTG
 ATCTACTGGGCATCCACTAGGCAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGG
 ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAG
 CAATCTTATAATCTACTgcaacaacttctcactactcaaacagcaggtgacgtggaggagaatcccggaacccat
 ggagacagacacacctctgctatgggtactgctgcttgggttccaggttccactggtagcaggtgcagctggtagg
 tccgggggagccttagtgaagcctggaggggtccctgaacctctcttctgcagcctctggattcaatttcaatggctatgg
 catgcttgggttcgcagacctcagacagaagggctggagtggttcgaaccattactagtggtggtacttacacctact
 atccagacagtgtagggggcagttaccatctccagagacaaatgccagaacacccctgactgcaaatagacagctg
 gaagctgaggaatacagccatatttctgtgcaagatccctcgggggaatgctatggactactgggtcaaggaacc
 cagtcacccgtctcctcaggtggaggtggatcaggtggaggtggatctgggtggaggtggatctgacattgtgatgact
 cagctcaccagccctgtctgtgactccaggagatagagctctcttcttgcagggccagccagactatagcagta
 cttaacattggatcaacaaatcacatgagctcacaaggttctcatcaaatgtcttcccaatccatttctgggtccct
 ccaggttcagtgaggtggatcaggttcagatttcactctcagtagtaacagtgtaggaacctgaagatgtggagtgat
 tactgtcaaatgggtcagcgttctcctggacgttcgggtggagggcaccagctggaatcaagaacaaactcatct
 cagaagaggtctgtaa

4H1128z CAR
 P2A
 B6H12.2 scFv

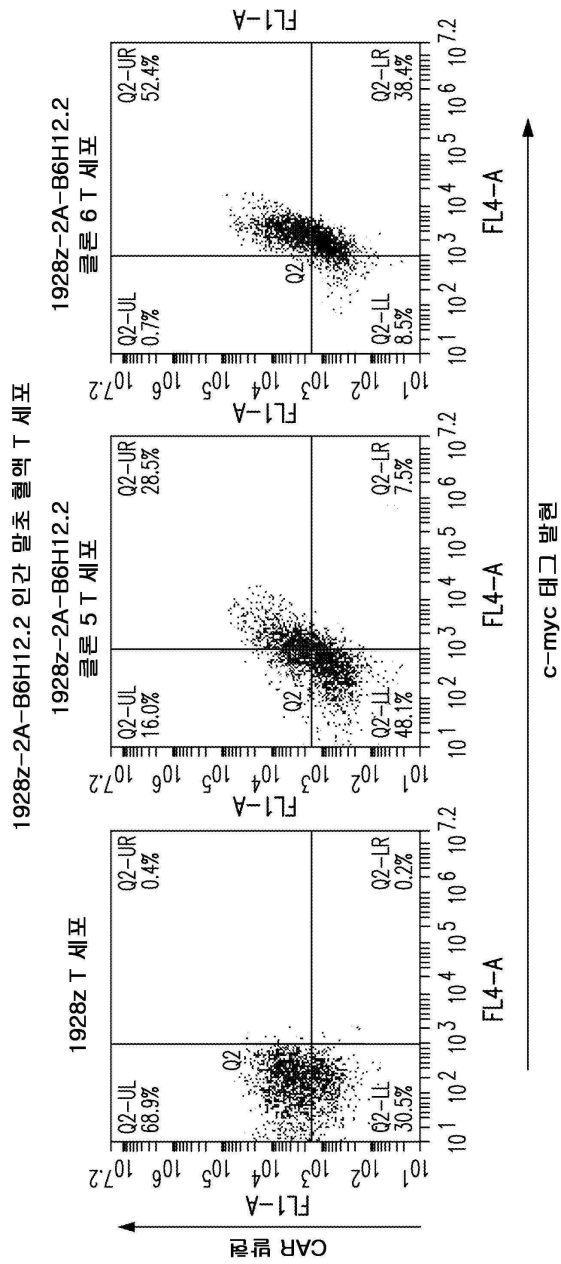
도면7a



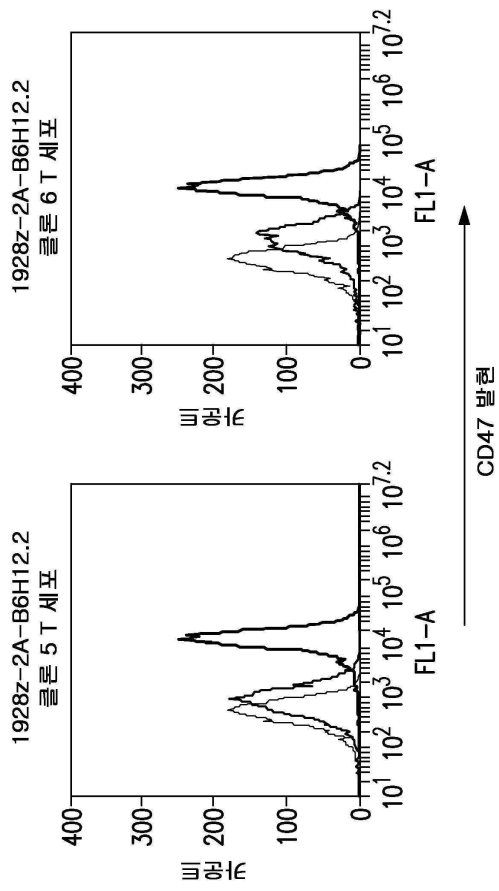
도면7b



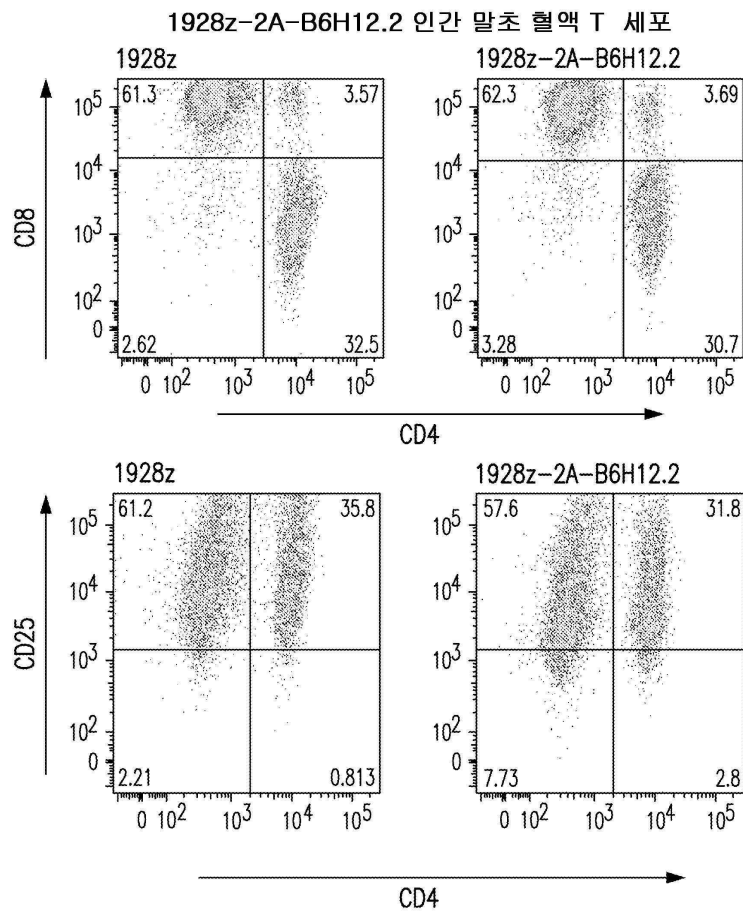
도면8a



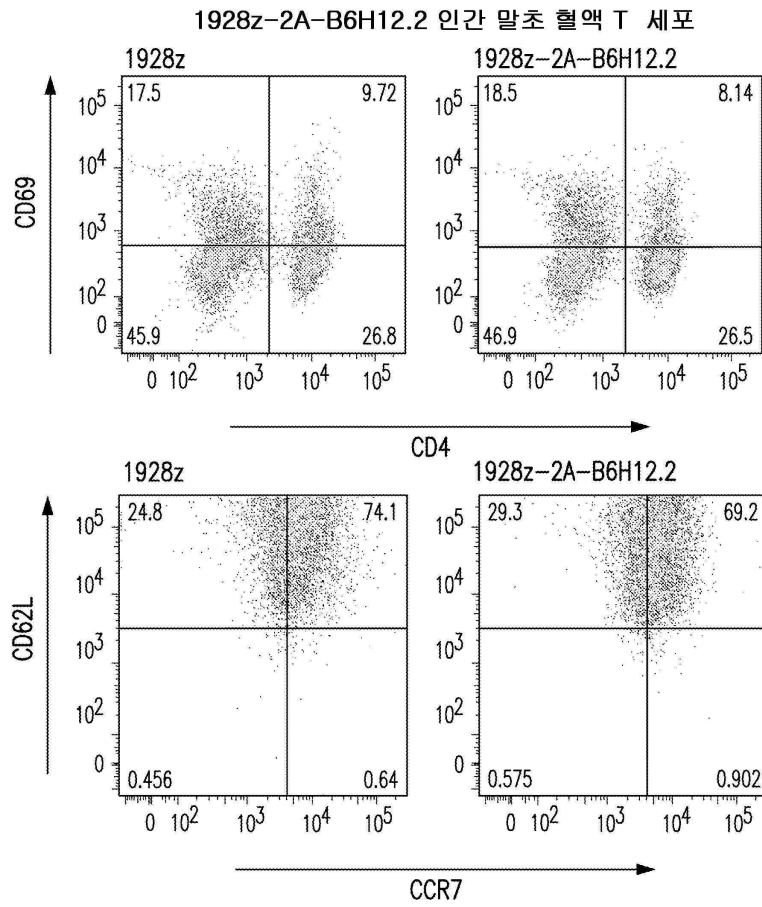
도면8b



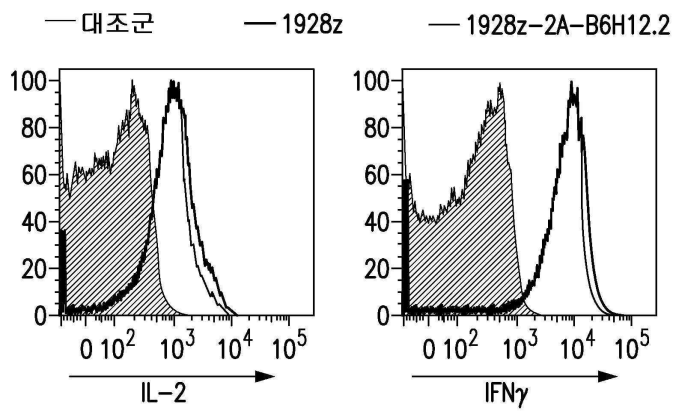
도면9a



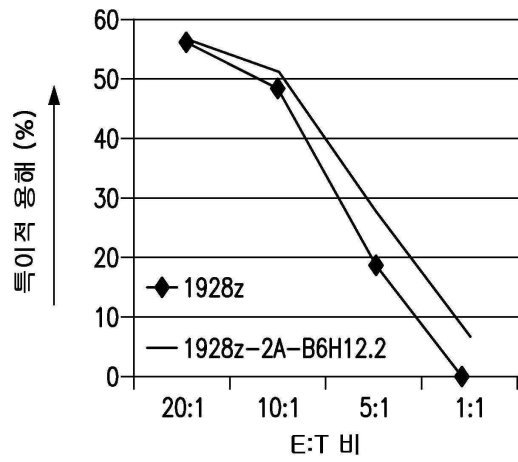
도면9b



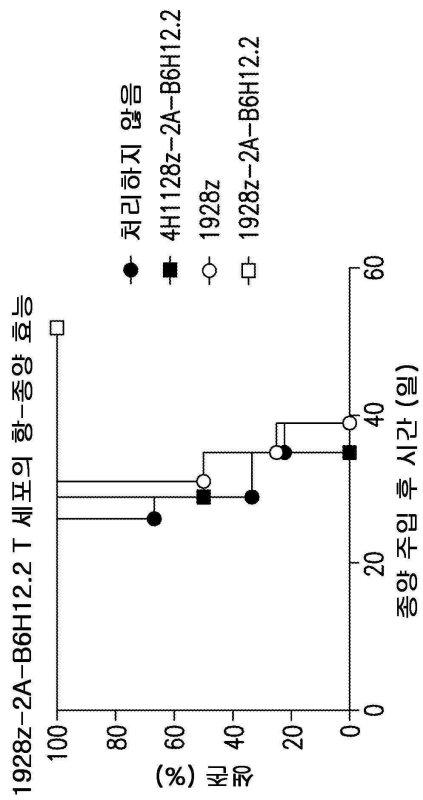
도면9c



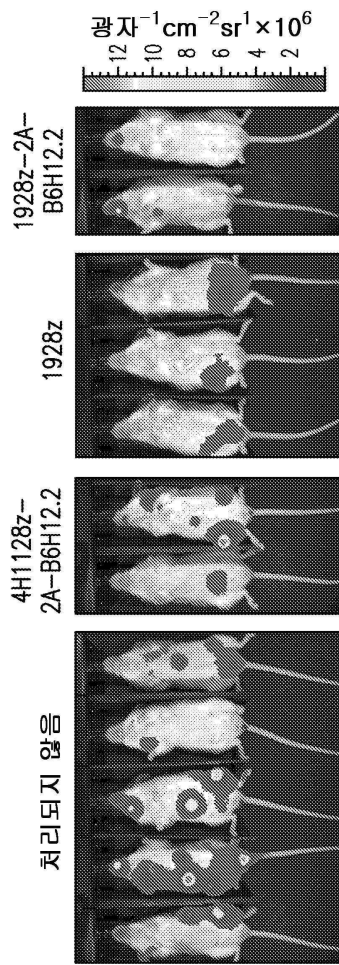
도면9d



도면10a



도면10b



도면11

카파 리더 서열을 갖는 5C4scFv

카파 리더 서열	
ATG CAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D Q V Q L V E S G G V V	
CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC GAC TGT AAA GGG TCT GGA ATC ACC TTC AGT AAC TCT GGC ATG CAG TGG GTC GGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG Q P G R S L R L D C K A S G I T F S N S G M H W V R Q A P G K G L	
GAG TGG GTG GCA GTT ATT TGG TAT GAT GGA AGT AAA AGA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG E W V A V I W Y D G S K R Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T	
CTG TTT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACA AAC GAC GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC L F L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T N D D Y W G Q G T L V T V	
세린 클리신 링커 서열	
TCC TCA GGT GGA GGT GGA TCA GGT GGA GGT GGA TCT GGT GGA GGT GGA TCT GMA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG S G G G G S G G G G G S G G G G S E I V L T Q S P A T L S L S P G	
GAA AGA GCC ACC CTC TCC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGT TAC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D	
GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGC TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A	
GTT TAT TAC TGT CAG CAG AGT AGC AAC TGG CCT CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA GMA CMA AAA CTC ATC TCA GMA GAG GAT CTG TAA V Y Y C Q Q S S N W P R T F G G Q G T K V E I K E Q K L I S E E D L *	c-myc 태그 서열

도면12

1928z-2A-5C4 (카파 리더) 서열

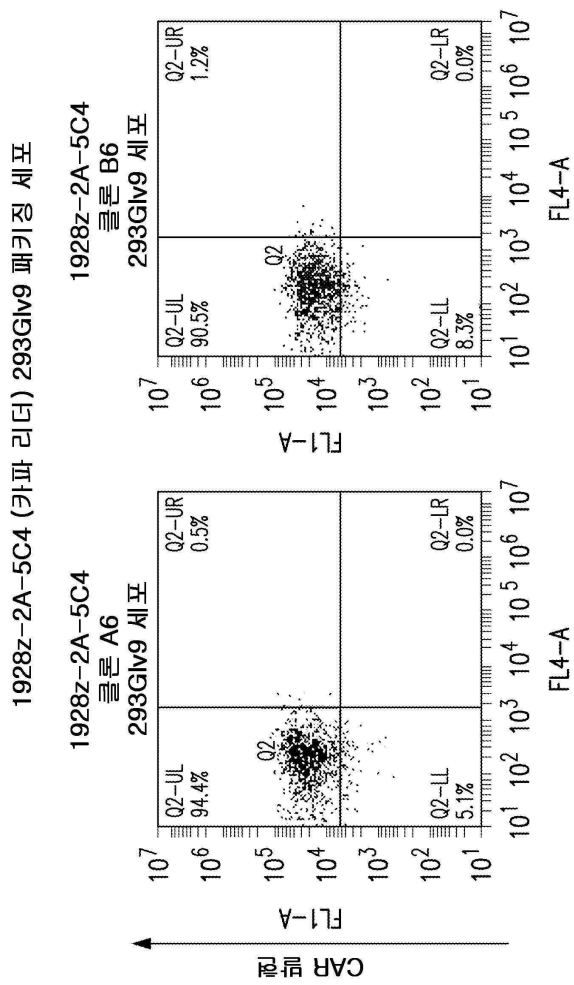
atggctctcccagtgactgccctactgtctcccctagcgttctctgcatgcagaggtgaagctgcagcagctctggg gctgagctggtaggacctgggtctctcagtgagatttcttgcaggcttcttggtatgcattcagtagctactggatgaa ctgggtgaagcagaggcctggacaggctcttgagtggttgacagatttatctggagatggtagtaacttaaat ggaaagtccaagggtcaagccacactgactgcagacaattctccagcagacctacatgcagctcagcgccctaacat ctgaggactctgggtctatttctgtgcagaagaaccattagttcggtagtagatttctactttgactactgggccaagg gaccacggtcaccgtctctcaggtggagtggtcaggtggagtggtctggtaggtggatctgacattgagc tcaccagctctccaaattcatgtccacatcagtaggagcagggtcagcgtcaccctgcaggccagtcagaaatgtgggt actaatgtagcctggtagtaacagaaaccaggacaatctctaaaccactgatttactcggcaaccctaccggaacagtgg agtccctgactgcttcacaggcagtggtctgggacagatttcaactctaccatcactaacgtgcagcttaagacttggc agactatttctgtcaacaataaacagggtatcgtacacgtcggaggggggaccaagctggagatcaaacgggcggc cgcaattgaagtattgtatctctctcttaccatagacaatgagaagagcaatggaaacattatccatgtgaagggaaca cctttgtccaaagctccctatttccggacctcttaagcccttttgggtgctgggtgggttggtaggtcttggcttctata gcttgcagtagtaacagtgcccttatttatttctgggtgaggtgaagagagcaggtctctgcacagtgactacatgaac atgactcccgcccgccggggccaccggcaagcattaccagccctatgcccccaccgcgacttcgcagcctatcgtc cagagtgaagtctcagcaggagcgcagagcccccgctaccagcaggggcagaaccagctctataacgagctcaact aggacgaagagaggtacgatgttttgacaagagacgtggcggggaccctgagatggggggaagccgagagag gaagaacctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaagaataagatggcgaggccctacagtgaattgggatga aaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtctcagtagagccaccaaggacacctacga cgccctcaatgcaggccctgcccctcggggtctggagcaacaattctcaactactcaacaagcaggtgacgtgg aggagaatcccggaacc	1928z CAR
ATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGG TTCCACTGGTGACCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGT CCCTGAGACTCGACTGTAAGCGTCTGGAATCACCTTCAGTAACCTTGGCATGCACTGGGTCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAAAAGATA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTT CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGACAAACGACGAC TACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGA TCTGGTGGAGGTGGATCTGAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAGAGCCACCCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGTTACTTAGCCTGGTACCAA CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCC CAGCCAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGCCTAGAGC CTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACGAGAGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTTGGCCAAAGG GACCAAGGTGGAATCAAAGAACAAAACATCTCAGAAGAGGATCTGTAACCTCGAGGATCC	
	P2A
	sC4 scFv

도면13

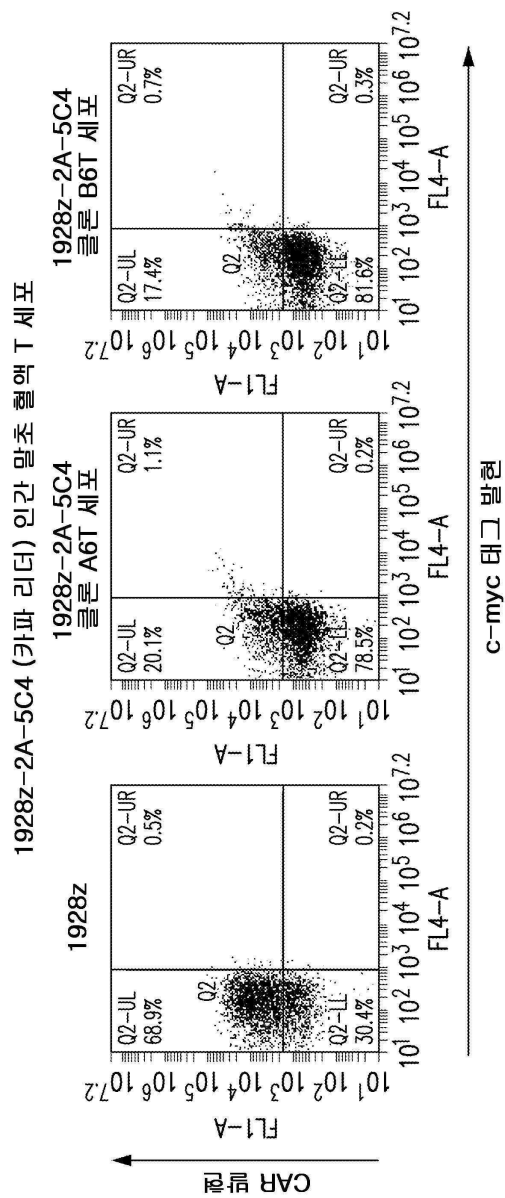
4H1128Z-2A-5C4 (카파 리더) 서열

CATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAG	4H1128z CAR	
CTGCAGGAGTCAGGGGAGGCTTCGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTCAAAGTCTCCTGTGCAGC		
CTCTGGATTCACTTTCACTAGCTATGCCATGTCTGGGTTCCGCTGAGTCCGGAGATGAGGCTG		
GAGTGGGTCGCAACCATTAGCAGTGCTGGTGGTTACATCTTCTATTCTGACAGTGTGCAGGGA		
CGATTCAACATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGCACCTGCAAATGGGCAGTCTGAGG		
TCTGGGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCAGGGATTGGTAACACGGTGATTACTATG		
CTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGT		
GGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCT		
GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAG		
AACCCGAAAGAACCAGTTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGTCTCCTGAACTGCTG		
ATCTACTGGGCATCCACTAGGCAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG		
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAG		
CAATCTTATAATCTACTgcaacaaattctcactactcaacaagcaggtgacgtggaggagaatcccgaccc		
ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA		SC4 scFv
CCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT		
CGACTGTAAGCGTCTGGAATCACCTTCAGTAACTCTGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTC		
CAGGCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAAAGATACTATGC		
AGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTTTCTGC		
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGACAAACGACGACTA		
CTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGA		
TCTGGTGGAGGTGGATCTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCA		
GGGGAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGTTACTTAGCCTGGTA		
CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTG		
GCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG		
CCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAGCAACTGGCCTCGGACGT		
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTA		
ACTCGAGGATCC		

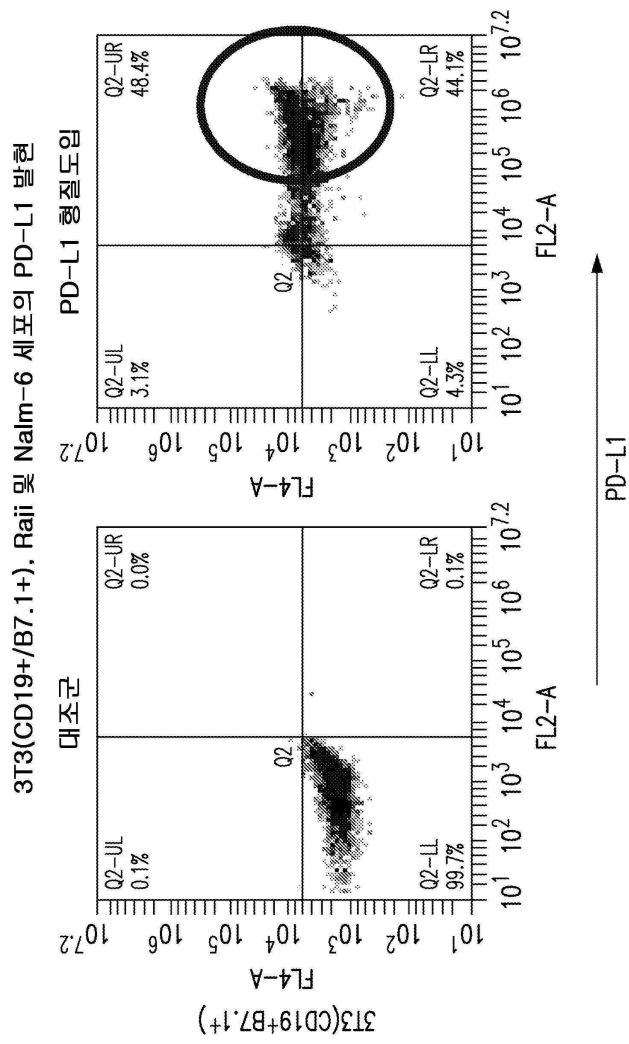
도면14



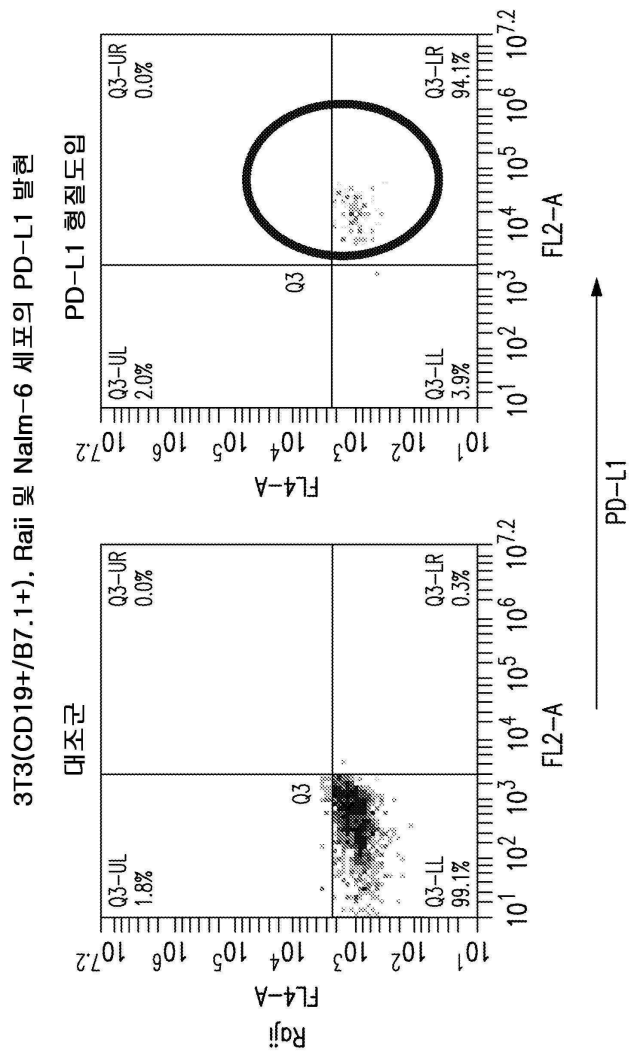
도면 15



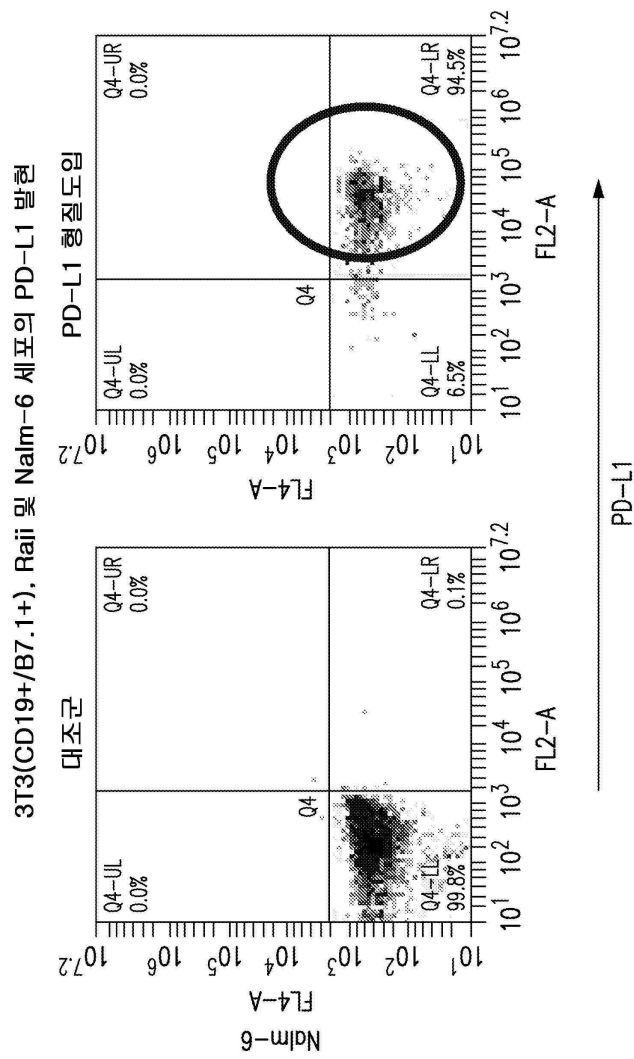
도면16a



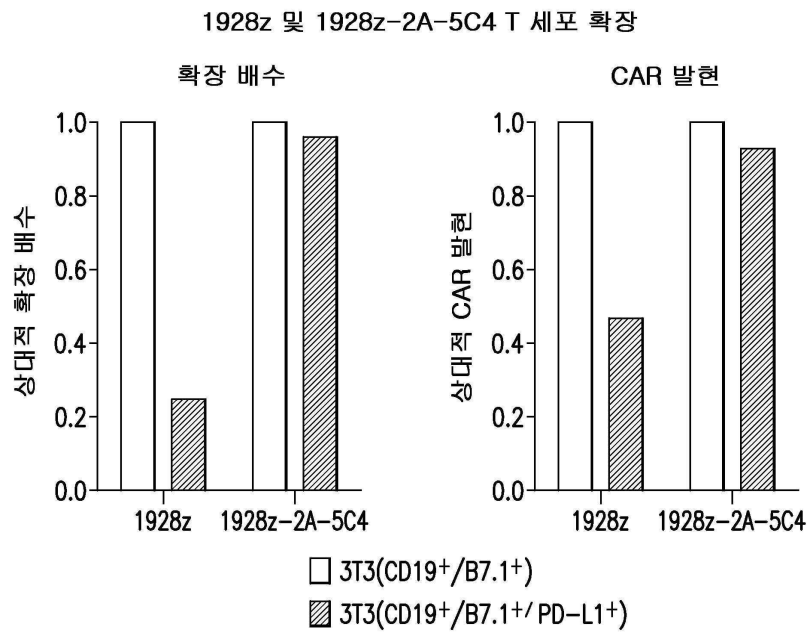
도면16b



도면16c



도면17

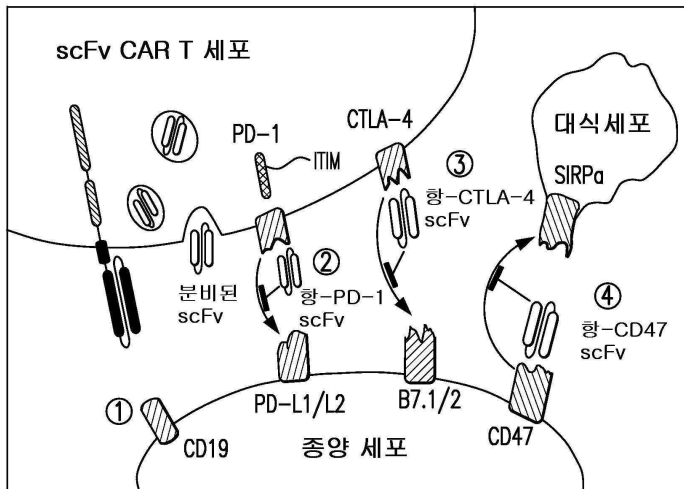


도면18

마우스 카파 리더 서열을 갖는 J43 scFv

마우스 카파 리더 서열									
ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC ATG GGA TTG GGA CTG CAG TGG GTT TTC TTT GTT	W	E	T	D	T	L	L	L	W
GGT CTT TTA AAA GGT GTC CAC TGT GAG CTG CCG CTT CTG GAG TTA GGT GGA GGA TTA GGT GAC CCA GAG GAG TCA CTG AAA CTC TCC GTG GGC	A	L	L	K	G	V	H	C	E
TCT GGA TTC ACC TTG ACC GAC TAT TTC ATG AGC TGG CTC CCG CAG GCT CCA GAG GAG GAG CTG TGG GTT GCT CAG ATA TAC ACC AAA AGT TAT AAT	S	G	F	T	F	S	D	Y	F
TAT GCA ACT TAT TAC TCG GGT TCG CTG AAA GGC AGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCC CGA AGC ATG CTC TAC CTG CAA ATG MAC MAC CTG AGA ACT GAG	Y	A	T	Y	S	G	S	V	K
GAC AGC GGC ACT TAT TAC TGT ACA AGA GAT GCA AGC GGA TAT CCG TCT CTG GAT TCC TGG GGT CAA GGC ACC CAA GTC ACT GTC TCC TCA GCC ACA ACA ACA	T	A	T	Y	C	T	R	D	G
GCC CCA TCT GTC TAT CCG TTG GCG GCT GGC TGT GAC AGC ACA ACC AAA TCG GGT GGA GGT GGA TCA GGT GGA GGT GGA TCT GGT GGA CGT GGA TCT TAT	A	P	S	V	Y	P	L	A	P
세린 클리신 링커 서열									
GAG CTG ACT CAG CCA CCA CCA GTC ATG GTC GGA GAG ACT GTC AAA ATC ACC TGC TCT GGC GAC CAA TTG GCG AAA TAT TTT GCA GAT TGG TTT	E	L	T	Q	P	P	S	A	S
CAT CAA AGG TCA GAC CAG ACC AAT TTG CAA GTG AIA TAT GAT AAT AAG CCG CCG TCG GGG ATC CCT GAA AGA ATC TCT GGG TCG AGC TCA GGG ACA	H	Q	R	S	D	Q	T	I	L
J43 VL 서열									
ACA GGC ACC TTG ACC ATC AGA GAT GTC CCG GCT CAG GAT GAA GGT GAC TAT TAC TGT TTC TCA GGA TAT GTT GAT AGT AGC AAA TTG TAT GTT TTT GGC	T	A	T	L	T	I	R	D	V
AGC GGA ACC CAG CTC ACC GTC CTA GGT GGA CCG AGG TCT TCT CCG AAA GTC ACA GAT CCA CCA TCA CCT CCA GAG GAG CTC GGG ACA MAC AAA GGC ACA	S	G	T	Q	L	T	V	L	G
CTG CTG TGT CTG GTT AAT GAC TTC TAC CCG GGT TCT GCA ACA GTC ACC TGG AAG GCA AAT GCA GCA ACT ATC AAT GAT GCG CTG AAG ACT ACA AAG CCT	L	Y	C	L	V	N	D	F	Y
TCC AAA CAG GGC CAA MAC TAC ATG ACC AGC TAC CTA AGT TTG ACA GCA GAC CAG TGG AAA TCT CAC MAC AGG GTT TCC TGC CAA GTT ACC CAT GAA	S	K	Q	G	N	Y	M	T	S
GGG GAA ACT GTG GAG AAG AGT TTG TCC CCT GCA GAA TGT CTC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG TAA	G	E	T	V	E	K	S	L	S
C-myc 태그 서열									
E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L
*									

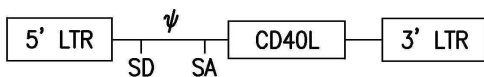
도면21



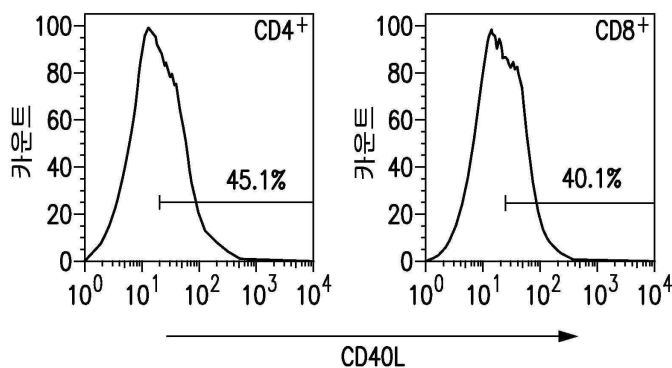
"적대적 종양 미세환경"을 극복하도록 디자인된 유전적으로 가공된 "장감화된" CAR T 세포

CAR-T 세포는 대안적으로 면역 조절 기능을 갖는 길항성 scFv를 분비하도록 추가로 변형될 수 있다. 동족 항원에 대한 CAR을 활성화시키면, (1) 장감화된 CAR 변형된 T 세포는 주입된 CAR 변형된 T 세포 및 내인성 항-종양 T 세포 모두에 있는 억제성 PD-1 T 세포 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 항-종양 이펙터 기능을 향상시키거나, (2) 주입된 CAR 변형된 T 세포 및 내인성 항-종양 T 세포 모두에 있는 억제성 CTLA-4 T 세포 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 항-종양 이펙터 기능을 향상시키거나, 또는 (3) 종양 세포에 발현되는 CD47 수용체에 길항성인 scFv를 분비하도록 유도되어 상기 종양 세포가 숙주의 선천적 항-종양 면역 반응에 의해 인식되는 것을 은폐하는 것을 되돌림으로써 숙주의 대식세포에 의해 종양이 인식 및 근절되도록 할 수 있다.

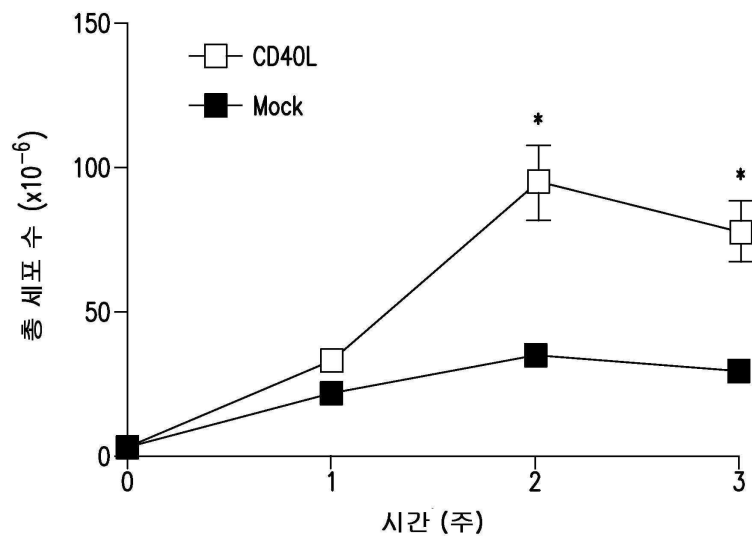
도면22a



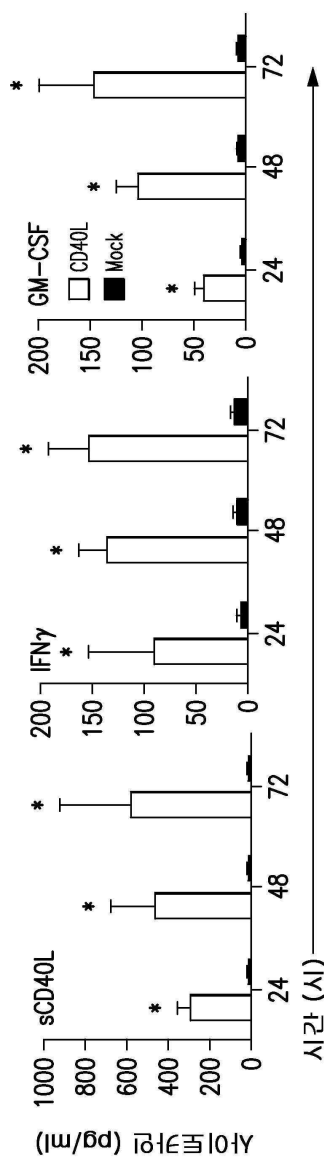
도면22b



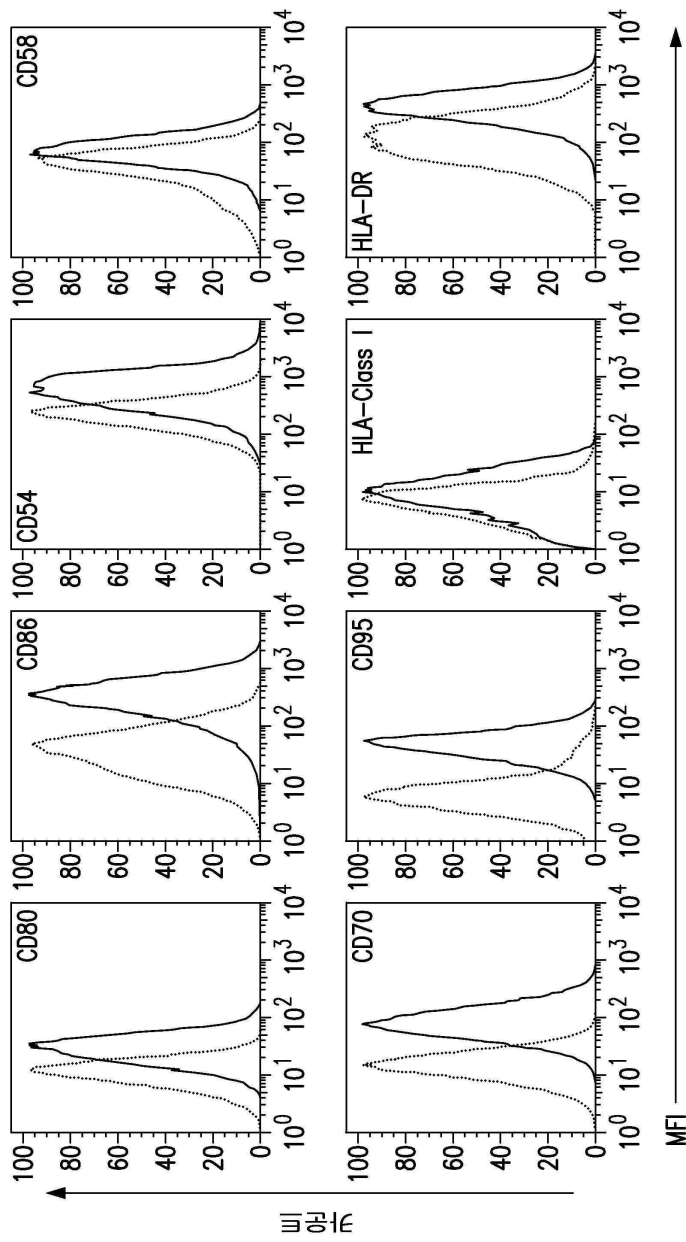
도면22c



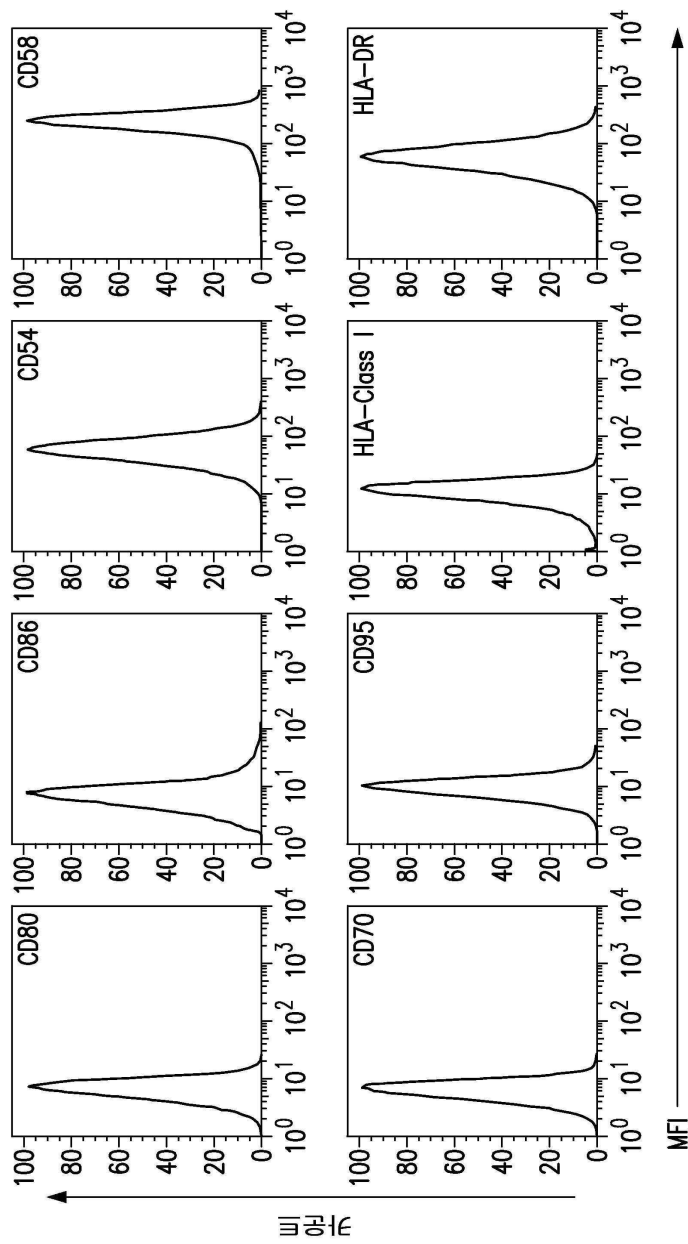
도면22d



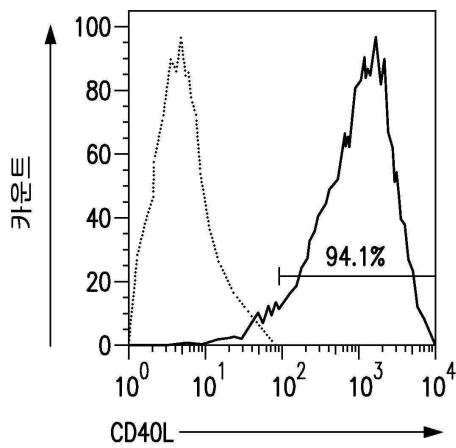
도면23a



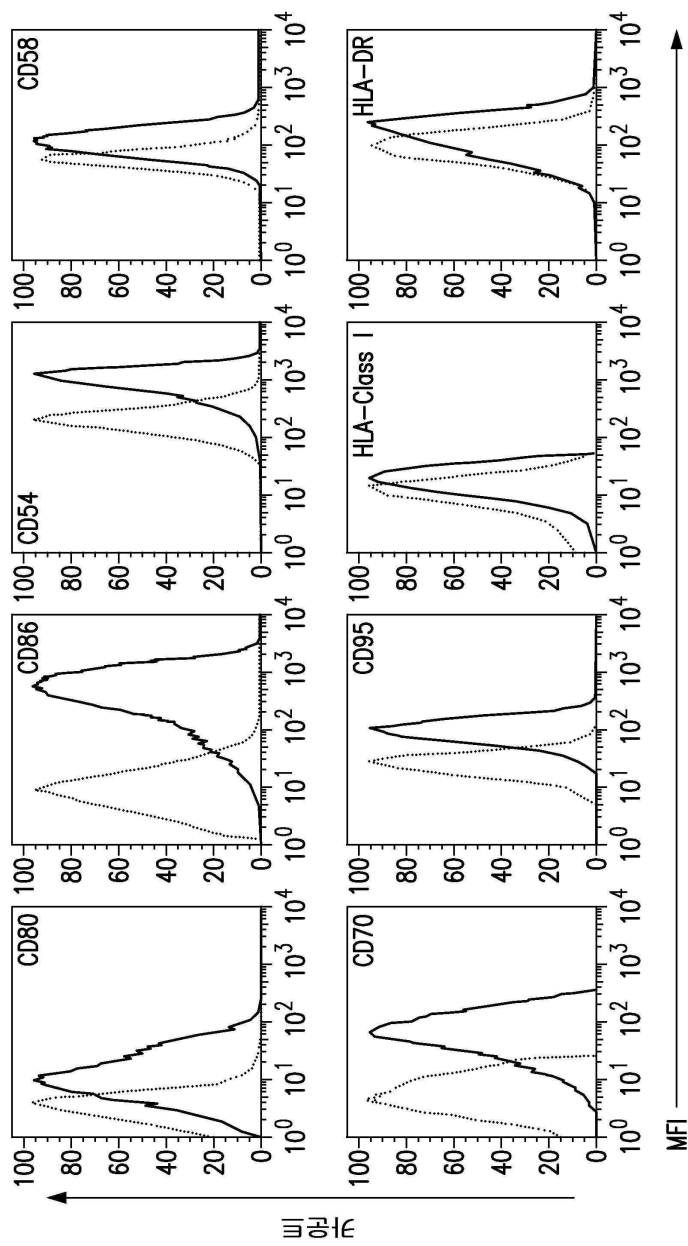
도면23b



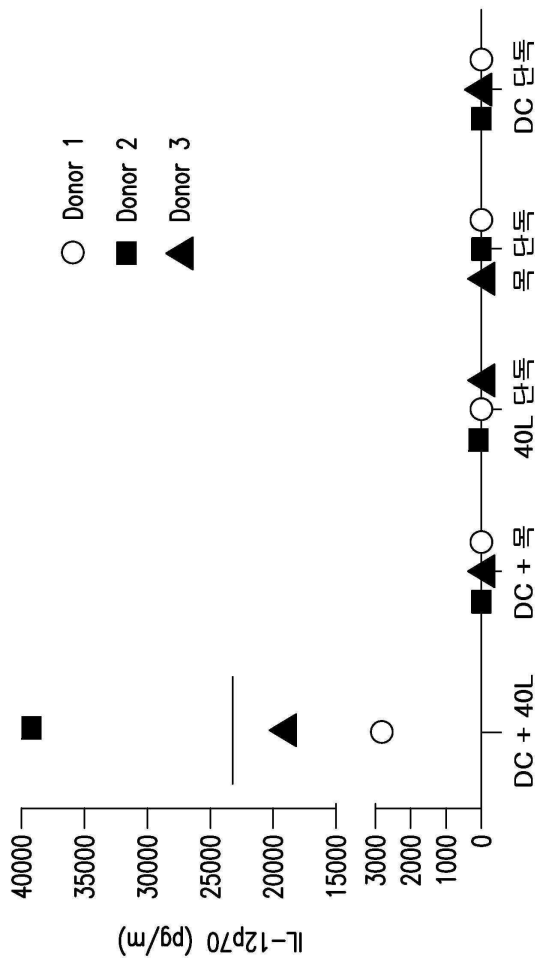
도면24a



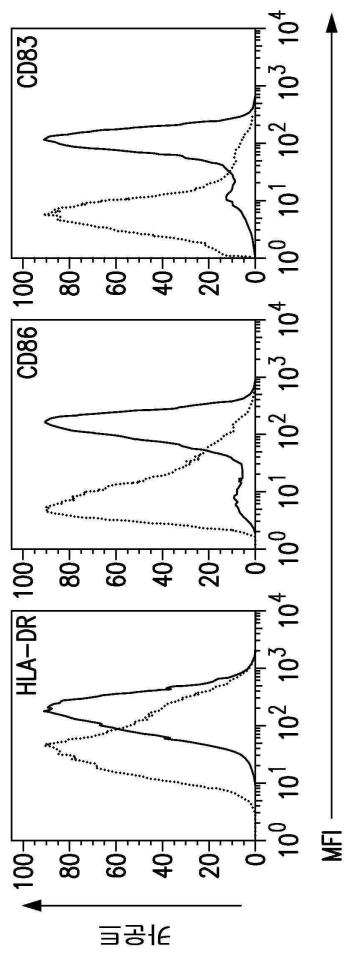
도면24b



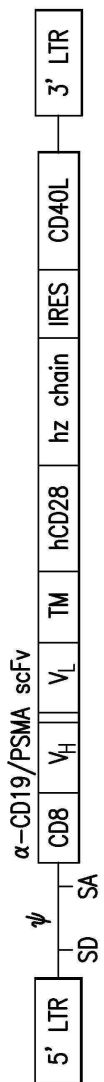
도면25a



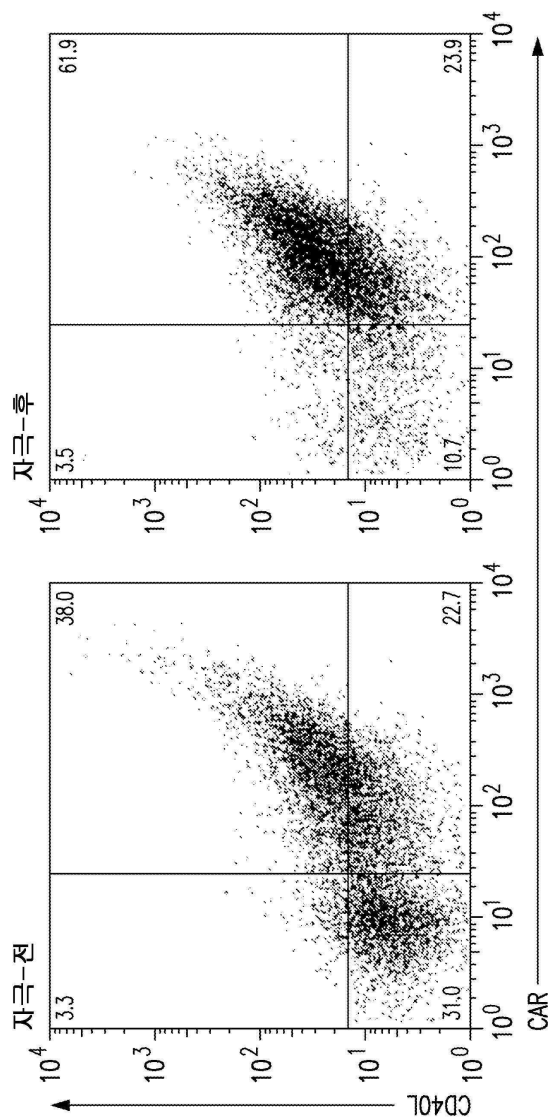
도면25b



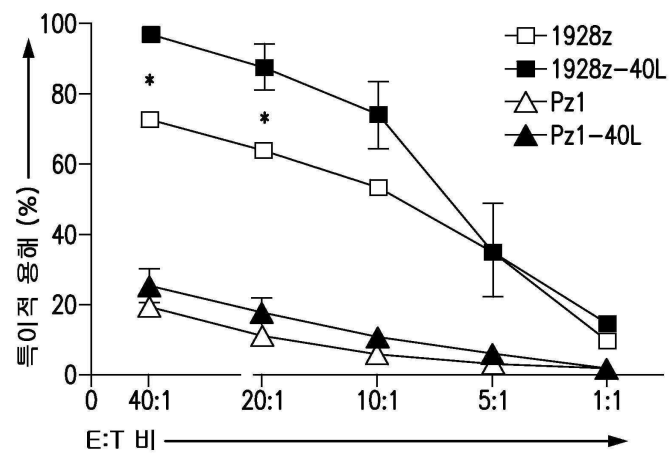
도면26a



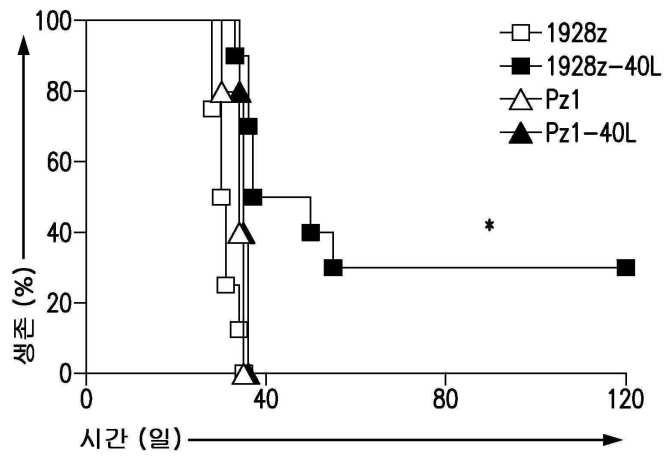
도면26b



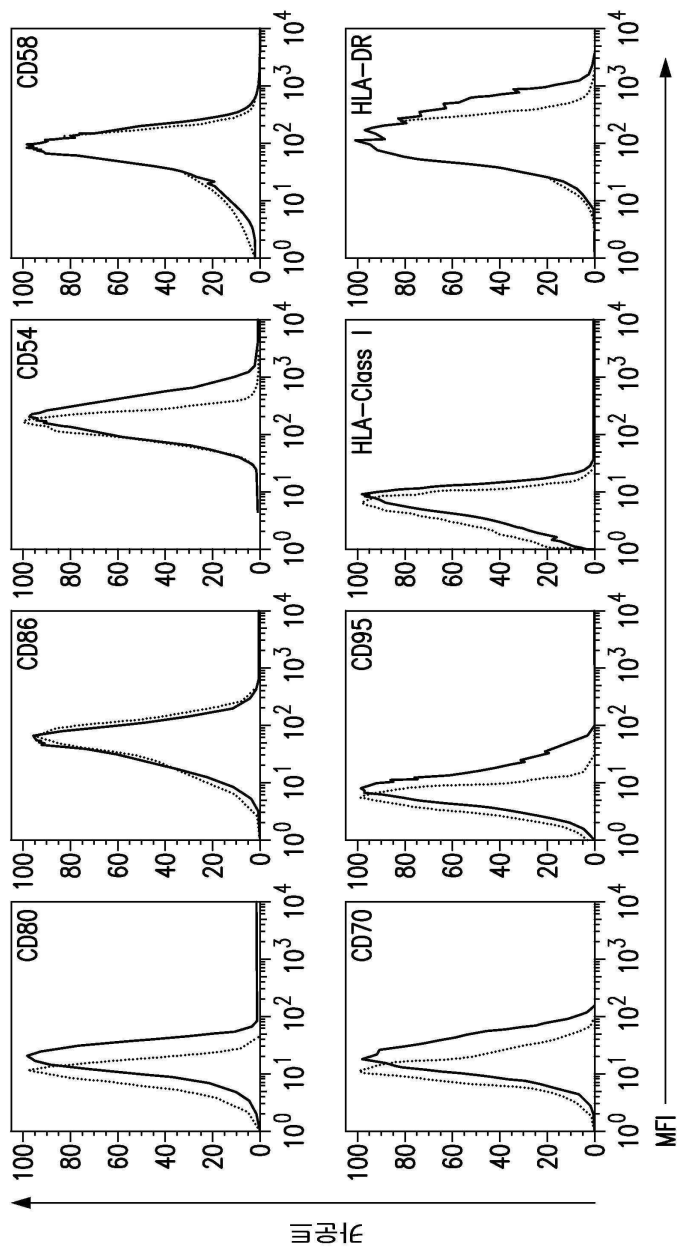
도면26c



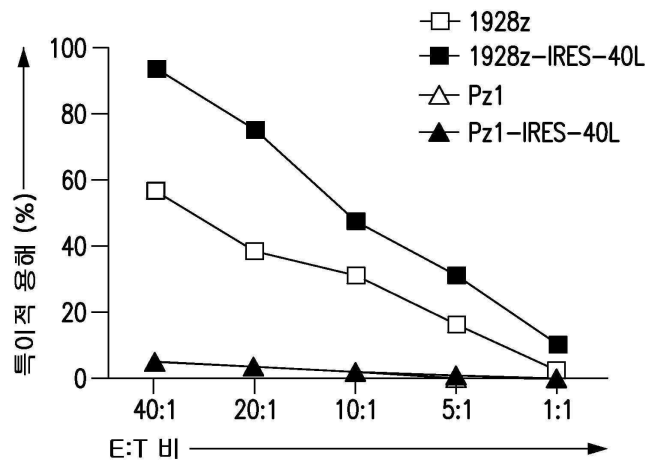
도면27



도면28



도면29



서열목록

- <110> MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMMUNOTHERAPY
- <130> 2020-FPA-0259D
- <150> 61/769,543
- <151> 2013-02-26
- <160> 56
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 164
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

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

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

<210> 2
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
 1 5 10 15
 Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
 20 25 30
 Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
 35 40 45
 Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
 50 55 60
 Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
 65 70 75 80
 Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
 85 90 95
 Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
 115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

210 215 220

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 3

cacgtgcatg atcgaaacat acaaccaaac ttctccccga tctgc 45

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 4

ctcgagggat cctcagagtt tgagtaagcc aaagga 36

<210> 5

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

1 5 10 15
 Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
 20 25 30
 Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

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

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

 195 200 205
 Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 210 215 220
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 225 230 235 240
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 245 250 255
 <210> 6

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg

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

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

145	150	155	160
Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn			
165	170	175	
Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu			
180			

<210> 7

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (486)

<223> Any amino acid

<400> 7

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

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

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

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

210				215				220							
Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Val	Gln	Ser	Lys	Asp	Leu	Ala	Asp
225				230				235				240			
Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly
245				250				255							
Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro
260				265				270							
Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val
275				280				285							
Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys
290				295				300							
Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser
305				310				315				320			
Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg
325				330				335							
Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro
340				345				350							
Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe
355				360				365							
Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Glu	Pro	Pro
370				375				380							
Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly
385				390				395				400			
Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro
405				410				415							
Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr
420				425				430							
Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly
435				440				445							
Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln
450				455				460							

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

465 470 475 480

Ala Leu Pro Pro Arg Xaa

485

<210> 8

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 8

```

ccatggctct cccagtgact gccctactgc tccccctagc gcttctctg catgcagagg      60
tgaagctgca gcagtctggg gctgagctgg tgaggcctgg gtcctcagt aagatttcct      120
gcaaggcttc tggctatgca ttcagtagct actggatgaa ctgggtgaag cagaggcctg      180
gacagggtct ttagtgatt ggacagattt atcctggaga tggtgatact aactacaatg      240
gaaagttcaa gggtaagcc acactgactg cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc      300
agctcagcgg cctaacatct gaggactctg cggctctatt ctgtgcaaga aagaccatta      360
gttcggtagt agatttctac ttgtactact ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct      420

caggtggagg tggatcaggt ggaggtggat ctggtggagg tggatctgac attgagctca      480
cccagtctcc aaaattcatg tccacatcag taggagacag ggtcagcgtc acctgcaagg      540
ccagtcagaa tgtgggtact aatgtagcct ggtatcaaca gaaaccagga caatctccta      600
aaccactgat ttactcgga acctaccgga acagtggagt ccctgatcgc ttcacaggca      660
gtggatctgg gacagatttc actctcacca tctaactcgt gcagtctaaa gacttggcag      720
actatttctg tcaacaatat aacaggtatc cgtacacgtc cggagggggg accaagctgg      780
agatcaaacg ggcggccgca attgaagtta tgtatcctcc tccttaccta gacaatgaga      840

agagcaatgg aaccattatc catgtgaaag ggaacacct ttgtccaagt cccctatttc      900
ccggaccttc taagcccttt tgggtgctgg tgggtggtgg tggagtcctg gcttgctata      960
gcttgctagt aacagtggcc ttattatttt tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc      1020
tgcacagtga ctacatgaac atgactcccc gccgccccgg gccacccgc aagcattacc      1080
agccctatgc cccaccacgc gacttcgcag cctatcgctc cagagtgaag ttcagcagga      1140
gcgcagagcc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag      1200
gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg      1260

```

gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga 1320
 tggcgagggc ctacagttag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg 1380
 atggccttta ccaggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc 1440
 aggccctgcc ccctcgcg 1458

<210> 9

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 9

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

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

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

145	150	155	160
Thr	Gln	Ser	Pro
Ser	Ser	Leu	Ala
Val	Ser	Ala	Gly
Glu	Lys	Val	Thr
165	170	175	

Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys
180 185 190

Asn Gln Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Leu
195 200 205

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

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val
225 230 235 240

Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Leu
245 250 255

Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
260 265 270

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
275 280 285

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
290 295 300

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
305 310 315 320

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
325 330 335

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
340 345 350

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
355 360 365

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
370 375 380

Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430

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

435 440 445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly

450 455 460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr

465 470 475 480
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490

<210> 10

<211> 1475

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 10

ccatggctct cccagtgact gccctactgc ttcccctagc gcttctcctg catgcagagg 60
tgaagctgca ggagtcaggg ggaggtctcg tgaagcctgg agggtcctc aaagtctcct 120
gtgcagcctc tggattcact ttcagtagct atgccatgtc ctgggttcgc ctgagtcagg 180
agatgaggct ggagtgggtc gcaaccatta gcagtgtctg tggttacatc ttctattctg 240
acagtgtgca gggacgattc accatttcca gagacaatgc caagaacacc ctgcacctgc 300
aaatgggcag tctgaggctt ggggacacgg ccatgtatta ctgtgcaagg cagggatttg 360
glaactacgg tgattactat gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct 420

cctcaggtagg aggtggatca ggtggagggt gatctggtgg aggtggatct gacattgagc 480
tcaccagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact atgagctgca 540
aatccagtc gagtctgtc aacagtagaa cccgaaagaa ccagttagct tggtagcagc 600
aaaaaccagg acagtctcct gaactgtctga tctactgggc atccactagg caatctggag 660
tccctgatcg cttcacagcg agtggatctg ggacagattt cactctcacc atcagcagtg 720
tgcaggtgca agacctggca gtttattact gccagcaatc ttataatcta ctcacgttcg 780
gtcctgggac caagctggag atcaaacggg cggccgcaat tgaagttagt taccctctc 840

cttacctaga caatgagaag agcaatggaa ccattatcca tgtgaaagg aaacaccttt 900
gtccaagtc cctatttccc ggaccttcta agcccttttg ggtgtgtgtg gtggttggtg 960
gagtcctggc ttgctatagc ttgctagtaa cagtggcctt tattattttc tgggtgagga 1020

gtaagaggag caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgccccgggc 1080
ccaccgcaa gcattaccag ccctatgcc caccacgcga cttcgagcc tatcgctcca 1140
gagtgaagtt cagcaggagc gcagagcccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct 1200
ataacagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc 1260

gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaagc ctgtacaatg 1320
aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc 1380
ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc aggtctcag tacagccacc aaggacacct 1440
acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctgc 1475

<210> 11

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 11

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

1	5	10	15
Ser	Leu	Lys	Leu
Ser	Cys	Ala	Ala
Ser	Gly	Phe	Thr
Phe	Ser	Gly	Tyr
20	25	30	
Gly	Met	Ser	Trp
Val	Arg	Gln	Thr
Pro	Asp	Lys	Arg
Leu	Glu	Trp	Val
35	40	45	
Ala	Thr	Ile	Thr
Ser	Gly	Gly	Thr
Tyr	Thr	Tyr	Tyr
Pro	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	Ile	Asp	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys
85	90	95													
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
100	105	110													
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
115	120	125													
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu
130	135	140													

Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

145 150 155 160

Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser

165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro

180 185 190

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

195 200 205

Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

245 250

<210> 12

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 12

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

1 5 10 15

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

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 Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

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 Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100

105

110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

195

200

205

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg

210

215

220

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

225

230

235

<210> 13

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 13

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1

5

10

15

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

20

25

30

Ala Leu Leu Lys Gly Val His Cys Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly

35

40

45

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

Val Leu Gly Gly Pro Lys Ser Ser Pro Lys Val Thr Val Phe Pro Pro
305 310 315 320

Ser Pro Glu Glu Leu Arg Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val
325 330 335

Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ser Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly
340 345 350

Ala Thr Ile Asn Asp Gly Val Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Gly
355 360 365

Gln Asn Tyr Met Thr Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Trp
370 375 380

Lys Ser His Asn Arg Val Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Glu Thr
385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Glu Glu Asp Leu

420

<210> 14

<211> 1274

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 14

ccatggagac agacacactc ctgctatggg tactgctgct ctgggttcca ggttcactg 60

gtgacatggg attgggactg cagtgggttt tctttgtgc tcttttaaaa ggtgtccact 120

gtgaggtgcg gcttctggag tctggtggag gattagttaa gcctgagggg tactgaaac 180

tctctgtgt ggctctgga ttacattca gtgactattt catgagctgg gtccgccagg 240

ctccaggga ggggctggag tgggttctc acatatacac gaaaagtta aattatgcaa 300

cttattactc ggggtcgggtg aaaggcagat tcaccatctc cagagatgat tcccgaagca 360

tgggtctacct gcaaatgaac aacctgagaa ctgaggacac ggccacttat tactgtacaa 420

gagatggaag cggatatccc tctctggatt tctgggttca agggacccaa gtcactgtct 480

cctcagccac aacaacagcc ccatctgtct atcccttggc ccctgcctgt gacagacaaa 540

ccaaatcggg tggaggtgga tcaggtggag gtggatctgg tggaggtgga tcttatgagc 600

tgactcagcc accttcagca tcagticaatg taggagagac tgtcaaaatc acctgctctg 660

gggaccaatt gccgaaatat tttgcagatt ggtttcatca aaggicagac cagaccattt 720

tgcaagtgat atatgatgat aataagcgcc cctcggggat ccctgaaaga atctctgggt 780

ccagctcagg gacaacagcc accttgacca tcagagatgt cgggctgag gatgaagggtg 840

actattactg tttctcagga tatgttgata gtgatatcaa attgtatgtt tttggcagcg 900

gaaccagct caccgtccta ggtggacceca agtcttctcc caaagtcaca gtgtttccac 960

cttcacctga ggagctccgg acaaacaaag ccacactggg gtgtctgggt aatgacttct 1020

acccgggttc tgcaacagtg acctggaagg caaatggagc aactatcaat gatggggtga 1080

agactacaaa gccttcctaaa cagggccaaa actacatgac cagcagctac ctaagtttga 1140

cagcagacca gtggaaatct cacaacaggg tttctgcca agttacccat gaaggggaaa 1200

ctgtggagaa gagtttgtcc cctgcagaat gtctcgaaca aaaactcacc tcagaagagg 1260

atctgtaact cgag 1274

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp

20

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp

20

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: CDS leader peptide

<400> 17

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 18

<211> 824

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 18

ccatggagac agacacactc ctgctatggg tactgctgct ctgggttcca ggttcactg 60

gtgacgaggt gcagctggtg gactccgggg gagacttagt gaagcctgga gggccctga 120

aactctcctg tgcagcctct ggattcactt tcagtggcta tggcatgtct tgggttcgcc 180

agactccaga caagaggctg gagtgggtcg caaccattac tagtggtggt acttacacct 240

actatccaga cagtgtgaag gggcgattca ccactcctcag agacaatgcc aagaacaccc 300

tgtacctgca aatagacagt ctgaagtctg aggatacagc catatatttc tgtgcaagat 360

ccctcgcggg aaatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctgagtcacc gtctcctcag 420

gtggaggtgg atcaggtgga ggtggatctg gtggaggtgg atctgacatt gtgatgactc 480

agtctccagc caccctgtct gtgactccag gagatagagt ctctctttcc tgcagggccca 540

gccagactat tagcgactac ttactctggt atcaacaaaa atcacatgag tctccaaggc 600

ttctcatcaa atttgcttcc caatccattt ctgggatccc ctccaggttc agtggcagtg 660

gatcaggctc agatttcact ctgagtatca acagtgtgga acctgaagat gttggagtgt 720

attactgtca aaatggtcac ggctttcttc ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa 780

tcaaagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgtaact cgag 824

<210> 19

<211> 824

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 19

ccatggcctt accagtgacc gccttgctcc tgcgctggc cttgctgctc cagcccgcca	60
ggccggaggt gcagctgggt gagtccgggg gagacttagt gaagcctgga gggtcctga	120
aactctctg tgcagcctct ggattcactt tcagtggcta tggcatgtct tgggttcgcc	180
agactccaga caagaggtcg gagtgggtcg caaccattac tagtgggtgt acttacacct	240
actatccaga cagtgtgaag gggcgattca ccactccag agacaatgcc aagaacacc	300
tgtacctga aatagacagt ctgaagtctg aggatacagc catatatttc tgtgcaagat	360
ccctcgcggg aaatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctgagtcacc gtctctcag	420
gtggaggtgg atcaggtgga ggtggatctg gtggaggtgg atctgacatt gtgatgactc	480
agtctccagc caccctgtct gtgactccag gagatagagt ctctctttcc tgcagggcc	540
gccagactat tagcgactac ttactctgtt atcaacaaaa atcacatgag tctccaaggc	600
ttctcatcaa atttgcctcc caatccattt ctgggatccc ctccaggttc agtggcagtg	660
gatcaggctc agatttctct ctgagtatca acagtgtgga acctgaagat gttggagtgt	720
attactgtca aaatggtcac ggctttcttc ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa	780
tcaaagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgtaact cgag	824

<210> 20

<211> 2337

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 20

atggctctcc cagtgactgc cctactgctt ccctagcgc ttctctgca tgcagaggtg	60
aagctgcagc agtctggggc tgagctgggt aggctgggt cctcagtga gatttctgc	120
aaggcttctg gctatgcatt cagtagctac tggatgaact gggatgaagca gaggcctgga	180
cagggtcttg agtggattgg acagatttat cctggagatg gtgatactaa ctacaatgga	240
aagttcaagg gtcaagccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag	300
ctcagcggcc taacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaaa gaccattagt	360
tcggtagtag atttctactt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctca	420
ggtaggaggt gatcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgacat tgagtcacc	480
cagtctccaa aattcatgtc cacatcagta ggagacaggg tcagcgtcac ctgcaaggcc	540

agtcagaatg tgggtactaa tgtagcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa	600
ccactgattt actcggcaac ctaccggaac agtggagtcc ctgatcgctt cacaggcagt	660
ggatctggga cagatttcac tctcaccatc actaacgtgc agtctaaaga ctitggcagac	720
tatttctgtc aacaataata caggtatccg tacacgtccg gaggggggac caagctggag	780
atcaaacggg cggccgcaat tgaagttagt tatcctctc cttacctaga caatgagaag	840
agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacaccttt gtccaagtcc cctatttccc	900
ggaccttcta agcccttttg ggtgctgggt gtggttgggt gagtccctggc ttgctatagc	960
ttgctagtaa cagtggcctt tattattttc tgggtgagga gtaagaggag caggctcctg	1020
cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgccccgggc ccaccgcaa gcattaccag	1080
ccctatgccc caccacgca cttcgcagcc tatcgctcca gagtgaagtt cagcaggagc	1140
gcagagcccc ccgctacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga	1200
cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga	1260
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg	1320
gcggaggcct acagtgaatg tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgaa	1380
ggcctttacc aggttctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag	1440
gccctgcccc ctgcggatc tggagcaaca aacttctcac tactcaaaca agcaggtgac	1500
gtggaggaga atcccgacc catggagaca gacacactcc tgctatgggt actgctgctc	1560
tgggttccag gtccactgg tgacagggtg cagctggtgg agtccggggg agacttagtg	1620
aagcctggag ggtccctgaa actctcctgt gcagcctctg gattcacttt cagtggctat	1680
ggcatgtctt gggttcgcca gactccagac aagaggctgg agtgggtcgc aaccattact	1740
agtgggtgga cttacaccta ctatccagac agtgtgaagg ggcgattcac catctccaga	1800
gacaatgcca agaacacct gtacctgcaa atagacagtc tgaagtctga ggatacagcc	1860
atatatttct gtgcaagatc cctcgcggga aatgctatgg actactgggg tcaaggaacc	1920
tcagtcaccg tctcctcagg tggaggtgga tcaggtggag gtggatctgg tggaggtgga	1980
tctgacattg tgatgactca gtctccagcc accctgtctg tgactccagg agatagagtc	2040
tctcttccct gcagggccag ccagactatt agcgactact tacactggta tcaacaaaaa	2100
tcacatgagt ctccaaggct tctcatcaaa tttgttccc aatccatttc tgggatcccc	2160
tccaggttca gtggcagagg atcaggctca gatttcactc tcagtatcaa cagtgtggaa	2220
cctgaagatg ttggagtgtt ttactgtcaa aatggtcacg gctttctctg gacgttcggt	2280
ggaggcacca agctggaaat caaagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgttaa	2337

<210> 21

<211> 1644

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 21

catggctctc ccagtactg ccctactgct tcccctagcg cttctctgc atgcagaggt	60
gaagctgcag gagtcagggg gaggcttcgt gaagcctgga gggtcctca aagtctctg	120
tgcagcctct ggattcactt tcagtagcta tgccatgtcc tgggttcgcc tgagtcgga	180
gatgaggctg gagtgggtcg caaccattag cagtgtgtgt ggttacctt tctattctga	240
cagtgtgcag ggacgattca ccatttccag agacaatgcc aagaacaccc tgcacctgca	300
aatgggcagt ctgaggtctg gggacacggc catgtattac tgtgcaaggc agggatttgg	360
taactacggt gattactatg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc	420
ctcaggtgga ggtggatcag gtggaggtgg atctggtgga ggtggatctg acattgagct	480
caccagctct ccactctccc tggctgtgtc agcaggagag aagtcacta tgagctgcaa	540
atccagtcag agtctgtca acagtagaac ccgaaagaac cagtggctt ggtaccagca	600
aaaaccagga cagtctctg aactgctgat ctactgggca tccactaggc aatctggagt	660
ccctgatcgc ttcacagga gtggatctgg gacagatttc acttcacca tcagcagtgt	720
gcaggctgaa gacctggcag tttattactg ccagcaatct tataatctac tgcaacaaac	780
ttctcactac tcaacaagc aggtgacgtg gaggagaatc ccggacccat ggagacagac	840
acactcctgc tatgggtact gctgctctgg gttccagggt cactggtga cgaggtgcag	900
ctggtggagt ccgggggaga cttagtgaag cctggagggt ccctgaaact ctctgtgca	960
gcctctggat tcactttcag tggctatggc atgtcttggg ttgccagac tccagacaag	1020
aggctggagt ggttcgcaac cattactagt ggtggtactt acacctacta tccagacagt	1080
gtgaaggggc gattccatct tccagagac aatgccaaga acacctgta cctgcaaata	1140
gacagtctga agtctgagga tacagccata tatttctgtg caagatccct cgcgggaaat	1200
gctatggact actggggica aggaacctca gtcaccgtct cctcaggtgg aggtggatca	1260
ggtggaggtg gatctggtgg aggtggatct gacattgtga tgactcagtc tccagccacc	1320
ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct ctttctgca gggccagcca gactattagc	1380
gactacttac acaggtatca acaaaaatca catgagcttc caaggcttct catcaaattt	1440
gtttcccaat ccatttttgg gatccctcc aggttcagtg gcagtggatc aggtcagat	1500
ttcactctca gtatcaacag tgtggaacct gaagatgttg gagtgtatta ctgtcaaat	1560

ggtcacggct ttctcggac gttcgggtga ggcaccaagc tggaaatcaa agaacaaaaa 1620
ctcatctcag aagaggatct gtaa 1644

<210> 22
<211> 801
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 22

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gaccaggtgc agctgggtga gtctggggga ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga 120
ctcgactgta aagcgtctgg aatcaccttc agtaactctg gcatgactg ggtccgccag 180
gtccaggca aggggctgga gtgggtggca gttatttgg atgatggaag taaaagatac 240
tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaattcaa gaacacgctg 300

tttctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggctg tgtattactg tgcgacaaac 360
gacgactact ggggccaggg aaccttggtc accgtctcct caggtggagg tggatcaggt 420
ggaggtggat ctggtggagg tggatctgaa attgtgttga cacagtctcc agccaccctg 480
tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tctgcaggg ccagtcagag tgttagtagt 540
tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc caggtccca ggctcctcat ctatgatgca 600
tccaacaggg ccaactggcat ccagccagg ttcagtggca gtgggtcttg gacagacttc 660
actctacca tcagcagcct agagcctgaa gattttgcag tttattactg tcagcagagt 720

agcaactggc ctcgacgtt cggccaagg accaaggtgg aatcaaaga acaaaaactc 780
atctcagaag aggatctgta a 801

<210> 23
<211> 2332
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 23

atggctctcc cagtgactgc cctactgctt ccctagcgc ttctcctgca tgcagaggtg 60
aagctgcagc agtctggggc tgagctggtg aggcctgggt cctcagtga gatttctctg 120
aaggcttctg gctatgcatt cagtagctac tggatgaact ggggaagca gaggcctgga 180

cagggtctag agtggattgg acagatttat cctggagatg gtgatactaa ctacaatgga	240
aagttcaagg gtcaagccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag	300
ctcagcggcc taacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaaa gaccattagt	360
tcggtagtag atttctactt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	420
ggtggaggtg gatcagggtg aggtggatct ggtggaggtg gatctgacat cgagctcacc	480
cagtctccaa aattcatgtc cacatcagta ggagacaggg tcagcgtcac ctgcaaggcc	540
agtcagaatg tgggtactaa tgtagcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa	600
ccactgattt actcggcaac ctaccggaac agtggagtcc ctgacgctt cacaggcagt	660
ggatctggga cagattccac tctcaccatc actaacgtgc agtctaaaga ctgggcagac	720
tatttctgtc aacaataaa caggtatccg tacacgtccg gaggggggac caagctggag	780
atcaaaggcg cgccgcaat tgaagttatg tctcctctc cttacctaga caatgagaag	840
agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aacaccttt gtccaagtc ccctatttcc	900
cggaccttct aagcccttg ggtgctggtg gtggttggtg gagtctggc ttgctatagc	960
cgctagtaac agtggccttt attattttct ggtgaggag taagaggagc aggctcctgc	1020
acagtgacta catgaacatg actccccgcc gccccgggcc caccgcaag cattaccagc	1080
cctatgcccc accacgcgac ttcgcagcct atcgtccag agtgaagttc agcaggagcg	1140
cagagcccc cgcgtagcag cagggccaga accagctcta taacgagtc aatctaggac	1200
gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa	1260
agccgagaag gaagaacct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg	1320
cggaggccta cagttagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg	1380
gcctttacca ggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg	1440
ccctgcccc tcgcgatct ggagcaacaa acttctcact actcaaaca gcaggtgacg	1500
tggaggagaa tcccggacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct	1560
gggttccagg ttccactggt gaccaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcgtggtcc	1620
agcctgggag gtcctgaga ctgcactgta aagcgtctgg aatcaccttc agtaactctg	1680
gcatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca gttatttgg	1740
atgatggaag taaaagatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag	1800
acaattccaa gaacacgtg tttctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggctg	1860
tgtattactg tgcgacaaac gacgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct	1920
caggtggagg tggatcaggt ggaggtggat ctggtggagg tggatctgaa attgtgttga	1980
cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tctgcaggg	2040

ccagtcagag tgtagtagt tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc caggctccca	2100
ggctcctcat ctatgatgca tccaacaggg cactggcat ccagccagg ttcagtggca	2160
gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa gattttgcag	2220
tttattactg tcagcagagt agcaactggc ctcgacgtt cggccaaggg accaaggtgg	2280
aaatcaaaga acaaaaactc atctcagaag aggatctgta actcaggat cc	2332
<210> 24	
<211> 1640	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 24	
catggctctc ccagtactg ccctactgct tcccctagcg cttctcctgc atgcagaggt	60
gaagctgcag gagtcagggg gaggttcgt gaagcctgga gggccctca aagtctcctg	120
tgcagcctct ggattcactt tcagtagcta tgccatgtcc tgggttcgcc tgagtccgga	180
gatgaggctg gagtgggtcg caaccattag cagtgcctgt ggttacatct tctattctga	240
cagtgtgcag ggacgattca ccatttcag agacaatgcc aagaacaccc tgcacctgca	300
aatgggcagt ctgaggtctg gggacacggc catgtattac tgtgcaaggc agggatttgg	360
taactacggt gattactatg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc	420
ctcaggtgga ggtggatcag gtggaggtgg atctggtgga ggtggatctg acattgagct	480
caccagctct ccacctccc tggctgtgtc agcaggagag aaggtcacta tgagctgcaa	540
atccagtcag agtctgtca acagtagaac ccgaaagaac cagtggctt ggtaccagca	600
aaaaccagga cagtctcctg aactgctgat ctactgggca tccactaggc aatctggagt	660
ccctgatcgc ttcacaggca gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagtgt	720
gcaggtgtaa gacctggcag tttattactg ccagcaatct tataatctac tgcaacaaac	780
ttctcactac tcaaaacagc aggtgacgtg gaggagaatc ccggacccat ggagacagac	840
acactcctgc tatgggtact gctgctctgg gtccaggtt ccactggtga ccaggtgcag	900
ctggtggagt ctgggggagg cgtggtccag cctgggaggt ccctgagact cgactgtaaa	960
gcgtctggaa tcaccttcag taactctggc atgcactggg tccgccaggc tccaggcaag	1020
gggtggagt ggtggcagt tatttggat gatggaagta aaagatacta tgcagactcc	1080
gtgaagggcc gattcacat ctccagagac aattccaaga acacgtgtt tctgcaaatg	1140
aacagcctga gagccgagga caggctgtg tattactgtg cgacaaacga cgactactgg	1200

ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca ggtggagggtg gatcagggtg aggtggatct	1260
ggtggagggtg gatctgaaat tgtgttgaca cagtctccag ccaccctgtc ttgtgtcca	1320
ggggaaagag ccaccctctc ctgcagggcc agtcagagtg ttagtagtta cttagcctgg	1380
taccaacaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct atgatgcac caacagggcc	1440
actggcatcc cagccagggtt cagtggcagt gggctctggga cagacttcac tctcaccatc	1500
agcagcctag agcctgaaga ttttcagtt tattactgtc agcagagtag caactggcct	1560
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaagaac aaaaactcat ctgagaagag	1620
gatctgtaac tcgaggatcc	1640
<210> 25	
<211> 1266	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 25	
atggagacag acacactcct gctatgggia ctgctgtctt gggttccagg ttccactggt	60
gacatgggat tgggactgca gtgggttttc ttgttgctc ttttaaagg tgtccactgt	120
gaggtgcggc ttctggagtc tgggtggagga ttagtgaagc ctgaggggtc actgaaactc	180
tcctgtgtgg cctctggatt caccitcagt gactatttca tgagctgggt ccgccaggct	240
ccagggaagg ggctggagtg ggttgctcac atatacacga aaagttataa ttatgcaact	300
tattactcgg gticggtgaa aggcagattc accatctcca gagatgattc ccgaagcatg	360
gtctactgc aaatgaacaa cctgagaact gaggacacgg ccacttatta ctgtacaaga	420
gatggaagcg gatatccctc tctggatttc tggggtcaag ggacccaagt cactgtctcc	480
tcagccacaa caacagcccc atctgtctat cccttggccc ctgcctgtga cagcacaacc	540
aaatcgggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc ttatgagctg	600
actcagccac cttcagcatc agtcaatgta ggagagactg tcaaaatcac ctgctctggg	660
gaccaattgc cgaatatatt tgcagattgg ttcatcaaa ggtcagacca gaccattttg	720
caagtgatat atgatgataa taagcgcccc tcggggatcc ctgaaagaat ctctgggtcc	780
agctcaggga caacagccac cttgaccatc agagatgtcc gggctgagga tgaagtgac	840
tattactgtt tctcaggata tgttgatagt gatagcaaat tgtatgtttt tggcagcgga	900
accagctca ccgtctagg tggaccaag tcttctccca aagtcacagt gtttccacct	960
tcacctgagg agctccggac aaacaaagcc aactggtgt gtctggttaa tgacttctac	1020

ccgggttctg caacagtgc ctggaaggca aatggagcaa ctatcaatga tggggtgaag 1080
actacaaagc cttccaaaca gggccaaaac tacatgacca gcagctacct aagtttgaca 1140
gcagaccagt ggaaatctca caacagggtt tcctgccaag ttacccatga aggggaaact 1200
gtggagaaga gtttgtcccc tgcagaatgt ctgcaacaaa aatcatctc agaagaggat 1260
ctgtaa 1266

<210> 26
<211> 3325
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 26

catggctctc ccagtgactc ccctactgct acccctagcg ttctcctgca tgcagagggtg 60
aagctgcagc agtctggggc tgagctgggt aggcctgggt cctcagtga gatttcctgc 120
aaggcttctg gctatgcatt cagtagctac tggatgaact ggggaagca gaggcctgga 180
cagggtcttg agtggattgg acagatttat cctggagatg gtgatactaa ctacaatgga 240
aagttcaagg gtcaagccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag 300

ctcagcggcc taacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaaa gaccattagt 360
tcggtagtag atttctactt tgactactgc ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
ggtggagggtg ggcaggggag gtggatctgg ggaggtggat ctgacattga gctcaccag 480
tctccaaaat tcatgtccac atcagtagga cacagggtca gcgtcacctg caaggccagt 540
cagaatgtgg gtactaatgt agcctggtat caacagaaac caggacaatc tcctaaacca 600
ctgatttact cggcaaccta ccggaacagt ggagtccttg agcgcttcac aggcagtgga 660
tctgggacag atttactctt caccatcact aacgtgcagt ctaaagactt ggcagactat 720

ttctgtcaac aatataacag gtagccgtac acgtccggag gggggaccaa gctggagatc 780
aaacggggcg ccgcaattga gttcatgtac cctccgcctt acctagacaa cgagaggagc 840
aatggaacta ttattcacat aaaagagaaa catctttgtc atactcagtc atctcctaag 900
ctgttttggg cacttggtcgt ggttgtggag tcctgttttg ttatggcttg ctagtgcag 960
tggtctttgt gttatctgga caaatagtag aaggaacaga ctcttcaaa gtgactacat 1020
gaacatgact ccccgaggag cagggtcac tcgaaagcct taccagcct acgccctgc 1080
cagagacttt gcagcgtacc gcccagagc aaaattcagc aggagtgcag agactgctgc 1140

caacctgcag gacccaacc agctctacaa tgagctcaat ctagggcgaa gagaggaata 1200

tgacgtcttg gagaagaagc cggctcggga tccagagatg gcagccaaac agcagaggag	1260
caggaacccc caggaagcgg tatacaatgc actgcagaaa gacaagatgg cagaagccta	1320
cagttagatc ggcacaaaag gcgagaggcg gagaggcaag gggcacgatg gcctttacca	1380
gggtctcagc actgccacca aggacacctt tgatgggctg catatgcaga ccctggcccc	1440
tcgctaacag ccaactcagg atccgcccct ctccctcccc cccccctaac gttactggcc	1500
gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtcgt ttgactatat gttatittcc accatatgic	1560
cgctcttttg caatgtgagg gcccggaaac ctggccctgt cttcttgacg agcattccta	1620
ggggtctttc ccctctcgcc aaaggaatgc aggggtctgt gaatgtcgtg aaggaagcag	1680
ttcctctgga agcttcttga agacaaacaa cgtctgtagc gaccctttgc aggcagcgga	1740
acccccacc tggcgacagg tgccctcagc accaaaggcc acgtgtataa gatacaccag	1800
caaagcggcg acaacccagc tgccacgttg tgagttggat agttgtgaa agagtcaaat	1860
ggctctcctc aagcgtattc aacaaggggc tgaaggatgc ccagaaggta cccattgta	1920
tgggatctga tctggggcct cggtcacatg ctttacctgt gtttagtcga ggttaaaaaa	1980
acgtctaggc ccccgaaac acggggacgt ggttttctt tgaaaaacac gatgataata	2040
tggccacaaa ctgcatgga gacagacaca ctctgtctaa gggtactgct gctctgggtt	2100
ccaggttcca ctggagacat gggattggga ctgcagaggg ttttctttgt tgctctttta	2160
aaaggtgtcc actgtgaggt gcggcttctg gactctggtg gaggattagt gaagcctgag	2220
gggtcactga aatctcctgt gtggcctcag gattcacctt cagagactat ttcattgact	2280
gggtccgcca ggctccaggg aaggggctgg agtgggttgc tcacatatc acgaaaagtt	2340
ataattatgc aacttattac tcgggttcgg tgaaaggcag attcaccatc tccagagatg	2400
attcccgaag catggtctac cgcaaatgaa caacctgaga actgaggaca cggccactta	2460
ttactgtaca agagatggaa gcggatatcc ctctctggat ttctggggtc aagggaacca	2520
agtcactgtc tctcagcca caacaacagc cccatctgtc tatcccttgg ccctgcctg	2580
tgacagcaca accaaatcgg gtggaggtgg atcaggtgga ggtggatctg gtggaggtgg	2640
atcttatgag ctgactcagc caccttcagc atcagtcaat gtaggagaga ctgtcaaaat	2700
cacctgctct ggggaccaat tgccgaaata ttttcagat tggtttcac aaaggtcaga	2760
ccagaccatt ttgcaagtga tatatgatga taataagcgc ccctcgggga tccctgaaag	2820
aatctctggg tccagctcag ggacaacagc caccttgacc atcagagatg tccgggctga	2880
ggatgaaggt gactattact gtttctcagg atatgttgat agtgatagca aattgtatgt	2940
ttttggcagc ggaaccagc tcaccgtcct aggtggaccc aagtcttctc ccaaagtcac	3000
agtgtttcca ccttcacctg aggagctccg gacaaacaaa gccacactgg tgtgtctggt	3060

taatgacttc tacccgggtt ctgcaacagt gacctggaag gcaaatggag caactatcaa	3120
tgatggggtg aagactacaa agccttccaa acagggccaa aactacatga ccagcagcta	3180
cctaagtttg acagcagacc agtggaaatc tcacaacagg gtttcctgcc aagttaccca	3240
tgaaggggaa acigtggaga agagtttgc cctgcagaa tgtctcgaac aaaaactcat	3300
ctcagaagag gatctgtaac tggag	3325
<210> 27	
<211> 3333	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 27	
ctctcccagt gactgcceta ctgcttcccc tagcgctact cctgcatgca gaggtgaagc	60
tgcaggagtc agggggaggc ttcgtgaagc ctggagggtc cctcaaagtc tctgtgcag	120
cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcctgggt tcgcctgagt ccggagatga	180
ggctggagtg ggtcgcaacc attagcagtg ctggtggtta catcttctat tctgacagtg	240
tgcagggacg attcaccatt tccagagaca atgccaagaa caccctgcac ctgcaaatgg	300
gcagtctgag gtctggggac agggccatgt attactgtgc aaggcaggga ttigttaact	360
acggtgatta ctatgctatg gactactggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctcag	420
gtggaggtgg atcagggtga ggtggatctg gtggaggtgg atctgacatt gagctcacc	480
agtctccatc ctccctggct gtgtcagcag gagagaaggt cactatgagc tgcaaatcca	540
gtcagagtct gctcaacagt agaaccgaa agaaccagtt ggcttggtag cagcaaaaac	600
caggacagtc tctgaactg ctgatctact gggcatccac taggcaatct ggagtcctg	660
atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttactct caccatcagc agtgtgcagg	720
ctgaagacct ggcagtttat tactgccagc aatcttataa tctactggga ccaagctgga	780
gatcaaacgg gcggccgcaa ttgagttcat gtaccctccg ccttacctag acaacgagag	840
gagcaatgga actattatc acataaaaga gaaacatctt tgtcactc agtcatctcc	900
taagctgttt tgggcactgg tcgtggttgc tggagtccag tttgttatg gcttgctagt	960
gacagtggct ctttgtgta tctggacaaa tagtagaagg aacagactcc ttcaaagtga	1020
ctacatgaac atgactcccc ggaggcctgg gctcactcga aagccttacc agccctacgc	1080
ccctgccaga gactttgcag cgtaccggcc cagagcaaaa ttcagcagga gtgcagagac	1140
tgctgccaac ctgcaggacc ccaaccagct ctacaatgag ctcaatctag ggccaagaga	1200

ggaatatgac gtcttggaga agaagcggcc tcgggatcca gagatgggag gcaaacagca	1260
gaggaggagc aacccccagg aaggcgtata caatgcactg cagaaagaca agatggcaga	1320
agcctacagt gagatcgga caaaaggcga gaggcggaga ggcaaggggc acgatggcct	1380
ttaccagggt ctccagactg ccaccaagga cacctatgat gccctgcata tgcagaccct	1440
ggccccctgc taacagccac tcgaggatcc gccctctcc ctecccccc cctaacgtta	1500
ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta ttttcacca	1560
tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca	1620
ttcctagggg tctttccct ctcgccaaag gaatgcaggg tctgttgaat gtcgtgaagg	1680
aagcagtcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttcagggc	1740
agcggaaacc ccacctggc gacaggtgcc tctgcgacca aaggccacgt gtataagata	1800
cacctgcaaa ggcggcaca cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag	1860
tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc	1920
attgtatggg atctgatctg gggcctcggg cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt	1980
aaaaaaaact ctaggcccc cgaaccacgg ggcagtgggt ttcctttgaa aaacacgatg	2040
ataatatggc cacaaactgc catggagaca gacacactcc tgctatgggt actgctgctc	2100
tgggttccag gttccactgg tgacatggga ttgggactgc agtgggtttt ctttgttgc	2160
cttttaaaag gtgtccactg tgaggtgcgg ctctggagt ctggtggagg attagtgaag	2220
cctgaggggt cactgaaact ctctgtgtg gcctctggat tcaccttcag tgactatttc	2280
atgagctggg tccgccaggc tccaggaag gggctggagt gggttgtca catatacacg	2340
aaaagttata attatgaac ttattactcg ggttcggtga aaggcagatt caccatctcc	2400
agagatgatt cccgaagcat ggtctacctg caaatgaaca acctgagaac tgaggacacg	2460
gccattatt actgtacaag agatggaagc ggatatacct ctctggattt ctggggtcaa	2520
gggacccaag tactgtctc ctccagccaca acaacagccc catctgtcta tcccttggcc	2580
cctgcctgtg acagcacaac caaatcgggt ggaggtggat cagggtggagg tggatctggt	2640
ggaggtggat cttatgagct gactcagcca cttcagcat cagtcaatgt aggagagact	2700
gtcaaaatca cctgctctgg ggaccaattg ccgaaatatt ttgcagattg gtttcatcaa	2760
aggtcagacc agaccatttt gcaagtata tatgatata ataagcgcgc ctccggggatc	2820
cctgaaagaa tctctgggtc cagctcaggg acaacagcca ccttgacat cagagatgtc	2880
cgggctgagg atgaaggatg ctattactgt ttctcaggat atgttgatag tgatagcaaa	2940
ttgtatgttt ttggcagcgg aaccagctc accgtcctag gtggacccaa gtcttctccc	3000
aaagtcacag tgtttccacc ttcactgag gagctccgga caaacaagc cacactggtg	3060

tgctctggta atgacttcta cccgggttct gcaacagtga cctggaaggc aaatggagca 3120

actatcaatg atggcgtgaa gactacaaag ccttccaaac agggccaaaa ctacatgacc 3180

agcagctacc taagtttgac agcagaccag tggaaatctc acaacagggt ttcctgcca 3240

gttaccatg aaggggaaac tgtggagaag agtttgctcc ctgcagaatg tctgaacaa 3300

aaactcatct cagaagagga tctgtaactc gag 3333

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 28

tgaggagacg gtgaccgtgg tcccttggcc ccag 34

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 29

aggtsmarct gcagsagtcw gg 22

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 30

gttagatctc cagcttggtc cc 22

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 31

gacattcagc tgacccagtc tcca	24
<210> 32	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 32	
ggctgcagst tcagtggcag tggrtcwggr ac	32
<210> 33	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223>	
Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 33	
ctcattcctg ttgaagctct tgacaatggg	30
<210> 34	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 34	
atatccatgg cagacgtcca gatgatccag tctcca	36
<210> 35	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 35	
atatccatgg cagacattgt gctgactcag tctcc	35
<210> 36	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400>	36	
	atatccatgg cagatgttgt gatgacccaa actcca	36
<210>	37	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400>	37	
	atatccatgg cacaattgt tctcaccag tctcc	35
<210>	38	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400>	38	
	atatccatgg cagacattgt gatgacacag tctcca	36
<210>	39	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400>	39	
	atatccatgg cagatatgt gatgacgcag gctgca	36
<210>	40	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400>	40	
	atatccatgg cagacattgt gatgacccag tctc	34
<210>	41	
<211>	33	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 41

gcttcaacag gaatgagtgt taactcgagg tag 33

<210> 42

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 42

ccatggagac agacacactc ctgctatggg tactgctgct ctgggttcca ggttcactg 60

gtgacgaggt gctgcagctg gtggagtccg ggg 93

<210> 43

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 43

agatccacct ccaccagatc cactccacc tgatccacct ccacctgagg agacggtgac 60

tgaggttcct tgacc 75

<210> 44

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 44

ggtggaggtg gatcaggtag aggtggatct ggtggaggtg gatctgacat tgtgatgact 60

cagtctccag ccacc 75

<210> 45

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
 <400> 45
 ctcgagttac agatcctctt ctgagatgag tttttgttgt ttgatttcca gcttggtgcc 60

 tccaccgaac g 71
 <210> 46
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
 <400> 46
 tatacatgg ccttaccagt gaccgccttg ctctgcccgc tggccttgct gctccacgcc 60
 gccaggccgg aggtgcagct ggtggagtcc ggg 93
 <210> 47
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

 <400> 47
 cacgtgccat ggatgaggat atttgctgtc ttatat 37
 <210> 48
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
 <400> 48
 ctcgagttac gtctcctcca aatgtgtatc acttt 35
 <210> 49
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
 <400> 49

tattacacgt gttacatgag gatatttgct gtcttt

36

<210> 50

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 50

tataggatcc tcgaggatgt tacgtctcct ccaaattgtgt a

41

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 51

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 53

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 53

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Ile Asp Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Phe Ala Ser Gln Ser

195 200 205

Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr

245 250 255

Lys Leu Glu Ile Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

260 265 270

<210> 54

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Ile Asp Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Phe Ala Ser Gln Ser

195 200 205
 Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp
 210 215 220
 Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr

225 230 235 240
 Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 245 250 255
 Lys Leu Glu Ile Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 260 265 270

<210> 55

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 55

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

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

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

130 135 140
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

145 150 155 160
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

165 170 175
Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

180 185 190
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro

195 200 205
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Asn Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250 255

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

260 265

<210> 56

<211> 422

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 56

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp Met Gly Leu Gly Leu Gln Trp Val Phe Phe Val

20 25 30
Ala Leu Leu Lys Gly Val His Cys Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly

35 40 45
Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala

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

65								70								75								80
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	His	Ile	Tyr	Thr	Lys	Ser	Tyr									
				85				90				95												
Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile									
				100				105				110												
Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu									
				115				120				125												
Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Asp	Gly	Ser	Gly									
				130				135				140												
Tyr	Pro	Ser	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser									
145					150				155				160											
Ser	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala									
				165				170				175												
Cys	Asp	Ser	Thr	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly									
				180				185				190												
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser									
				195				200				205												
Val	Asn	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Gln	Leu									
				210				215				220												
Pro	Lys	Tyr	Phe	Ala	Asp	Trp	Phe	His	Gln	Arg	Ser	Asp	Gln	Thr	Ile									
225					230				235				240											
Leu	Gln	Val	Ile	Tyr	Asp	Asp	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu									
				245				250				255												
Arg	Ile	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Arg									
				260				265				270												
Asp	Val	Arg	Ala	Glu	Asp	Glu	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Ser	Gly	Tyr									
				275				280				285												
Val	Asp	Ser	Asp	Ser	Lys	Leu	Tyr	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Leu									
				290				295				300												
Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Ser	Pro	Lys	Val	Thr	Val	Phe	Pro									
305					310				315				320											

Pro Ser Pro Glu Glu Leu Arg Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
325 330 335

Val Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ser Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn
340 345 350

Gly Ala Thr Ile Asn Asp Gly Val Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln
355 360 365

Gly Gln Asn Tyr Met Thr Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln
370 375 380

Trp Lys Ser His Asn Arg Val Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Glu
385 390 395 400

Thr Val Glu Lys Ser Leu Ser Pro Ala Glu Cys Leu Glu Gln Lys Leu
405 410 415

Ile Ser Glu Glu Asp Leu
420