



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월14일
(11) 등록번호 10-2509562
(24) 등록일자 2023년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7032762(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년02월20일
심사청구일자 2021년11월11일
(85) 번역문제출일자 2021년10월12일
(65) 공개번호 10-2021-0126793
(43) 공개일자 2021년10월20일
(62) 원출원 특허 10-2015-7025483
원출원일자(국제) 2014년02월20일
심사청구일자 2019년02월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/017364
(87) 국제공개번호 WO 2014/130657
국제공개일자 2014년08월28일
(30) 우선권주장
61/767,071 2013년02월20일 미국(US)
61/888,255 2013년10월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Cancer Sci., 2010, 제101권, 제12호, 페이지
2518-2524*
Human Gene Therapy, 2012, 제23권, 페이지
1043-1053*
Jpn. J. Cancer Res., 2000, 제91권, 페이지
1035-1043*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국, 19104 펜실바니아주, 필라델피아, 9층, 씨
빅 센터 불러바드 3600
유니버시티 오브 피츠버그 - 오브 더 커먼웰스 시
스템 오브 하이어 에듀케이션
미국 펜실베이니아 15260, 피츠버그, 130 새커리 애
비뉴, 퍼스트 플로어 가드너 스틸 컨퍼런스 센터
(72) 발명자
브룩든, 제니퍼
미국 02139 매사추세츠주 캠프리지 매사추세츠 애
비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼
리서치, 인크.
존슨, 로라 알렉산드라
미국 19003 펜실베이니아주 아드모어 아마트 애비뉴
111
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 김영

전체 청구항 수 : 총 23 항

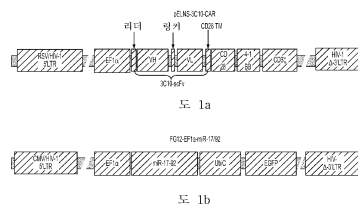
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 인간화 항-EGFRvIII 키메라 항원 수용체를 사용한 암의 치료

(57) 요약

본 발명은 EGFRvIII의 발현과 연관된 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, EGFRvIII에 특이적인 키메라 항원 수용체 (CAR), 이를 코딩하는 벡터, 및 항-EGFRvIII CAR을 포함하는 재조합 T 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 항-EGFRvIII 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 유전자 변형된 T 세포 (뒷면에 계속)

대표도



포를 부여하는 방법을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

C07K 16/3053 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/21 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

준, 칼 에이치.

미국 19066 펜실베이니아주 메리온 스테이션 베어드
로드409

뢰브, 안드레아스

미국 02143 매사추세츠주 소머빌 아파트먼트 #9 바
우 스트리트 50

마우스, 마셀라

미국 19010 펜실베이니아주 브린 모어 하빌랜드 드라
이브705

솔러, 존

미국 19072 펜실베이니아주 나버스 길핀 로드 410

오카다, 히데호

미국 15206 펜실베이니아주 피츠버그 비치우드 블러
바드 3008

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산 분자이며, 여기서 코딩된 CAR은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EGFRvIII 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 1차 신호전달 도메인, 공동자극 도메인, 또는 1차 신호전달 도메인과 공동자극 도메인 둘 다를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 여기서

(a) 중쇄 가변 영역이

- (i) 서열 DYYIH (서열 22)를 포함하는 CDR1;
- (ii) 서열 RIDPENDETKYGPFIQ (서열 23)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 RGGVY (서열 24)를 포함하는 CDR3을 포함하고,

(b) 경쇄 가변 영역이

- (i) 서열 KSSQSLDSDGKTYLN (서열 26)을 포함하는 CDR1;
- (ii) 서열 LVSKLDS (서열 27)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 WQGFHPGT (서열 28)를 포함하는 CDR3을 포함하고,

(c) 항-EGFRvIII 결합 도메인이

- (i) 서열 68의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열;
- (ii) 서열 68의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역의 20개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열;
- (iii) 서열 50의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- (iv) 서열 80의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인,

단리된 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 가변 영역이 서열 68의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 95%-99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 가변 영역이 서열 68의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 95%-99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;
- (b) 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 가변 영역이 서열 50의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 95%-99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 가변 영역이 서열 50의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 95%-99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;
- (c) 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 가변 영역이 서열 80의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 95%-99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 가변 영역이 서열 80의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 95%-99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;
- (d) 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 가변 영역이 서열 68의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 가변 영역이 서열 68의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하거나;
- (e) 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 가변 영역이 서열 50의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 가변 영역이 서열 50의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는
- (f) 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 가변 영역이 서열 80의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 항-

EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 가변 영역이 서열 80의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 단리된 핵산 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 항-EGFRvIII 결합 도메인이 서열 68, 서열 50, 또는 서열 80의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 단리된 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서,

(i) 항-EGFRvIII 결합 도메인을 코딩하는 핵산 분자가 서열 69, 서열 51 또는 서열 81의 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나;

(ii) 항-EGFRvIII 결합 도메인을 코딩하는 핵산 분자가 서열 69, 서열 51 또는 서열 81의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나;

(iii) 코딩된 CAR이 서열 73, 서열 55 또는 서열 85의 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(iv) CAR을 코딩하는 핵산 분자가 서열 72, 서열 54 또는 서열 84의 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 적어도 95% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

단리된 핵산 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 항 EGFRvIII 결합 도메인이 인간 또는 인간화 항체 또는 항체 단편을 포함하고, 여기서 항체 단편이 scFv인 것인, 단리된 핵산 분자.

청구항 6

제1항에 있어서,

(i) 코딩된 CAR이 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇠, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함하는 막횡단 도메인을 포함하거나;

(ii) 막횡단 도메인이 서열 15의 아미노산 서열; 서열 15의 아미노산 서열의 적어도 하나의 변형을 포함하지만 5개 이하의 변형을 포함하는 아미노산 서열; 또는 서열 15의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(iii) 막횡단 도메인을 코딩하는 핵산 분자가 서열 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 그와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

단리된 핵산 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 항-EGFRvIII 결합 도메인이 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인에 연결되고, 여기서

(i) 힌지 영역이 서열 14의 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(ii) 힌지 영역을 코딩하는 핵산 분자가 서열 7의 뉴클레오티드 서열, 또는 그와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

단리된 핵산 분자.

청구항 8

제1항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS

(CD278) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 1차 신호전달 도메인 및 공동자극 도메인, 또는 기능적 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서

(i) 공동자극 도메인이 서열 16의 아미노산 서열; 서열 16의 아미노산 서열의 적어도 하나의 변형을 포함하지만 5개 이하의 변형을 포함하는 아미노산 서열; 또는 서열 16의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(ii) 공동자극 도메인을 코딩하는 핵산 분자가 서열 9의 뉴클레오타이드 서열, 또는 그와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인,

단리된 핵산 분자.

청구항 9

제1항에 있어서,

(i) 세포내 신호전달 도메인이 1차 신호전달 도메인을 포함하거나;

(ii) 세포내 신호전달 도메인이 공동자극 신호전달 도메인을 포함하거나;

(iii) 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 및 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함하거나;

(iv) 공동자극 도메인이 서열 16의 아미노산 서열; 서열 16의 아미노산 서열의 적어도 하나의 변형을 포함하지만 20개 이하의 변형을 포함하는 아미노산 서열; 또는 서열 16의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 1차 신호전달 도메인이 서열 17 또는 서열 99의 아미노산 서열; 서열 17 또는 서열 99의 아미노산 서열의 적어도 하나의 변형을 포함하지만 20개 이하의 변형을 포함하는 아미노산 서열, 또는 서열 17 또는 서열 99의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

(v) 세포내 신호전달 도메인이 서열 16의 아미노산 서열 및 서열 17 또는 서열 99의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 아미노산 서열이 동일한 프레임에서 단일 폴리펩티드쇄로서 발현되거나; 또는

(vi) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 분자가 서열 9의 뉴클레오타이드 서열, 또는 그와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 또는 서열 10 또는 서열 100의 뉴클레오타이드 서열, 또는 그와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인,

단리된 핵산 분자.

청구항 10

제1항에 있어서, CAR이 리더 서열을 포함하고, 리더 서열이 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 단리된 핵산 분자.

청구항 11

제1항의 핵산 분자에 의해 코딩되고, 서열 73, 서열 55 또는 서열 85의 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 CAR 분자.

청구항 12

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EGFRvIII 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 1차 신호전달 도메인, 공동자극 도메인, 또는 1차 신호전달 도메인과 공동자극 도메인 둘 다를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서

(a) 중쇄 가변 영역이

(i) 서열 DYYIH (서열 22)를 포함하는 CDR1;

(ii) 서열 RIDPENDETKYGPIFQG (서열 23)를 포함하는 CDR2; 및

(iii) 서열 RGGVY (서열 24)를 포함하는 CDR3을 포함하고,

(b) 경쇄 가변 영역이

- (i) 서열 KSSQSLDSDGKTYLN (서열 26)을 포함하는 CDR1;
- (ii) 서열 LVSKLDS (서열 27)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 WQGFHPGT (서열 28)를 포함하는 CDR3을 포함하고,

(c) 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인이

- (i) 서열 68의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열;
- (ii) 서열 68의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역의 20개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열;
- (iii) 서열 50의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- (iv) 서열 80의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인,

키메라 항원 수용체 (CAR) 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 CAR인, CAR 분자.

청구항 14

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

(a) 중쇄 가변 영역이

- (i) 서열 DYYIH (서열 22)를 포함하는 CDR1;
- (ii) 서열 RIDPENDETKYGPFIQ (서열 23)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 RGGVY (서열 24)를 포함하는 CDR3을 포함하고,

(b) 경쇄 가변 영역이

- (i) 서열 KSSQSLDSDGKTYLN (서열 26)을 포함하는 CDR1;
- (ii) 서열 LVSKLDS (서열 27)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 WQGFHPGT (서열 28)를 포함하는 CDR3을 포함하고,

(c) 항-EGFRvIII 결합 도메인이

- (i) 서열 68의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열;
- (ii) 서열 68의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역의 20개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열;
- (iii) 서열 50의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는
- (iv) 서열 80의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인,

항-EGFRvIII 결합 도메인.

청구항 15

제1항의 핵산 분자를 포함하는 벡터이며,

- (i) 벡터가 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

- (ii) 벡터가 프로모터, 또는 서열 97의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 EF-1 프로모터를 추가로 포함하거나;
- (iii) 벡터가 시험관내 전사된 벡터이거나;
- (iv) 벡터가 폴리(A) 테일을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하거나; 또는
- (v) 벡터가 3'UTR을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는,
벡터.

청구항 16

제1항의 핵산 분자, 제11항의 단리된 CAR 분자, 제12항의 CAR 분자, 또는 제15항의 벡터를 포함하고, 여기서

- (i) 세포가 T 세포 또는 CD8+ T 세포; 또는
- (ii) 세포가 인간 세포인,
단리된 세포.

청구항 17

- (i) T 세포를 제1항의 핵산 분자 또는 제15항의 벡터로 형질도입하는 것을 포함하는 세포를 제조하는 단계; 또는
- (ii) 제1항의 핵산 분자를 포함하는 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 세포 내로 도입하는 것을 포함하는,
RNA-조작된 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는,
시험관내(*in vitro*) 또는 생체외(*ex vivo*) 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 포유동물에게 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 항종양 면역을 제공하는 방법에 사용하기 위한, 세포.

청구항 19

제16항에 있어서, 포유동물에게 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하며, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환이 다형성 교모세포종 (GBM), 역형성 성상세포종, 거대 세포 교모세포종, 신경교육종, 역형성 핍지교종, 역형성 상의세포종, 맥락종 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/형문근양 종양, 폐암 (또는 비소세포 폐 암종), 유방 암종, 전립선 암종, 난소 암종, 결장직장 암종 및 방광 암종, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암, 및 상기 암 중 어느 것의 전이인, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환을 갖는 포유동물을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 세포.

청구항 20

제1항에 있어서, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환이 다형성 교모세포종 (GBM), 역형성 성상세포종, 거대 세포 교모세포종, 신경교육종, 역형성 핍지교종, 역형성 상의세포종, 맥락종 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/형문근양 종양, 폐암 (또는 비소세포 폐 암종), 유방 암종, 전립선 암종, 난소 암종, 결장직장 암종 및 방광 암종, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암, 및 상기 암 중 어느 것의 전이인, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환을 갖는 포유동물을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 단리된 핵산 분자.

청구항 21

제11항에 있어서, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환이 다형성 교모세포종 (GBM), 역형성 성상세포종, 거대 세포 교모세포종, 신경교육종, 역형성 핍지교종, 역형성 상의세포종, 맥락종 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/형문근양 종양, 폐암 (또는 비소세포 폐 암종), 유방 암종, 전립선 암종, 난소 암종, 결장직장 암종 및 방광 암종, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암, 및 상기 암 중 어느 것의 전이인, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환을

갖는 포유동물을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 단리된 CAR 분자.

청구항 22

제12항에 있어서, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환이 다형성 교모세포종 (GBM), 역형성 성상세포종, 거대 세포 교모세포종, 신경교육종, 역형성 핍지교종, 역형성 상의세포종, 맥락종 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/형문근양 종양, 폐암 (또는 비소세포 폐 암종), 유방 암종, 전립선 암종, 난소 암종, 결장직장 암종 및 방광 암종, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암, 및 상기 암 중 어느 것의 전이인, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환을 갖는 포유동물을 치료하는 방법에 사용하기 위한, CAR 분자.

청구항 23

제15항에 있어서, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환이 다형성 교모세포종 (GBM), 역형성 성상세포종, 거대 세포 교모세포종, 신경교육종, 역형성 핍지교종, 역형성 상의세포종, 맥락종 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/형문근양 종양, 폐암 (또는 비소세포 폐 암종), 유방 암종, 전립선 암종, 난소 암종, 결장직장 암종 및 방광 암종, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암, 및 상기 암 중 어느 것의 전이인, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환을 갖는 포유동물을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 벡터.

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2013년 10월 8일에 출원된 미국 출원 번호 61/888,255 및 2013년 2월 20일에 출원된 미국 출원 번호 61/767,071을 우선권 주장하며, 이들 출원 각각의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0002] 정부 지원 연구 또는 개발에 관한 설명

[0003] 본 발명은 국립 보건 연구소 (NIH)가 수주한 2R01 NS055140 및 1P01 CA1322714 하의 정부 지원으로 만들어졌다. 정부가 본 발명에 대한 특정 권리를 갖고 있다.

[0004] 서열 목록

[0005] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되었던 서열 목록을 함유하고 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2014년 2월 20일에 만든 상기 ASCII 카피는 N2067-7000WO_SL.txt로 명명되고 그 크기는 228,605 바이트이다.

[0006] 본 발명의 분야

[0007] 본 발명은 일반적으로, 표피 성장 인자 수용체 III의 발현과 연관된 질환을 치료하기 위하여 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 조작된 T 세포의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0008] 중추 신경계 (CNS)가 종종 면역학적으로 특권을 지닌 것으로 간주되기는 하지만 (문헌 [Okada et al., 2009, Crit Rev Immunol 29:1-42]), 악성 신경교종 환자에 대한 최근의 백신 연구는 긍정적인 결과를 명확히 보여주었다 (Aguilar et al., 2012, Curr Treat Options Oncol 13:437-450; Ruzevick, et al., 2012, Neurosurg Clin N Am 23:459-470;15; and Okada et al., 2011, J Clin Oncol 29:330-336). 그러나, 온전한 숙주-면역 활성화에 의존하는 백신 효능은 면역억제성 시토카인의 종양 발현과 화학요법 및 방사선 요법에 기인한 전신 면역 억제를 겪을 수 있다. 다른 한편으로는, 자가 T-세포, 특히 키메라 항원 수용체 (CAR)로 형질도입된 T-세포를 이용한 양자 세포 전이 (ACT) 요법이 시험적인 혈액암 시도에서 장래성이 있는 것으로 밝혀졌다 (Kalos et al., 2011, Sci Transl Med 3(95):95ra73; and Porter et al., 2011, New England Journal of Medicine 365:725-733).

[0009] 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)의 발현 증강이 유방암, 폐암, 두경부암뿐만 아니라 교모세포종을 포함한 각종 암종에서 자주 검출되고 있다. EGF 수용체 유전자 내에서의 자발적인 재배열이 원발성 인간 교모세포종 종양에서

처음으로 확인되었고, 거의 모든 증례에서 이러한 변경이 EGFR 증폭을 수반한 종양에서 보고되었다. 이들 재배열로부터 3가지 상이한 유형의 돌연변이체가 발생된다. 이들 중 가장 흔한 것이 유형 III EGF 결실-돌연변이체 수용체 (EGFRvIII)이며, 이는 EGFR mRNA 내의 엑손 2-7이 결실되는 것을 특징으로 한다. 이들 결실은 아마도 대체 스플라이싱 또는 재배열을 통하여, 아미노산 6-276을 코딩하는 cDNA 뉴클레오타이드 275-1075에 상응한다. EGFR 유전자의 세포외 도메인 내의 801 bp를 결실시키면, 정상 EGFR 단백질의 프레임내 절단이 유발되어, 145-kDa 수용체가 생성됨으로써, 종양 특이적이고 면역원성인 에피토프가 창출된다 (문헌 [Hatanpaa et al., 2010, Neoplasia 12:675-684]; [Mukasa et al., 2010, Proc Natl Acad Sci USA 107:2616-2621]에서 고찰됨). EGFRvIII 발현은 다형성 교모세포종 (GBM)을 포함한 많은 종양 유형에서 관찰되었지만, 정상 조직에서는 거의 관찰되지 않는다. EGFRvIII은 GBM 증례의 24% 내지 67%에서 발현되고, ≥ 1 년 생존하는 환자에서는 EGFRvIII의 발현이 독립적인 음성 예후 지표이다 (Heimberger et al., 2005, Clin. Cancer Res. 11:1462-1466; Heimberger et al., 2005, J Transl. Med 3:38).

발명의 내용

- [0010] 본 발명은 특히, 키메라 항원 수용체 (CAR) 구축물 내로 통합된 표피 성장 인자 수용체 III (EGFRvIII)과 결합하는 최적화 및/또는 인간화 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, scFv)을 제공함으로써 환자에서 면역 반응을 제어하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 EGFRvIII의 발현과 연관된 암을 치료하기 위하여 CAR 내로 통합된, EGFRvIII과 결합하는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어 EGFRvIII과 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편을 발현하도록 조작된 T 세포의 용도에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 발명은 생체 외에서 제조된 세포의 특이성, 수 및 기능적 표현형이, 생체내 면역에 의해 유도된 천연 T-세포 보다 훨씬 더 우수하게 조작되고 제어될 수 있기 때문에, 신경교종 환자에 대해 특히 적합할 수 있는 양자 세포 전이에 관한 것이다.
- [0011] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이며, 여기서 상기 CAR은 항-EGFRvIII 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편), 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 일차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편), 본원에 기재된 막횡단 도메인, 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 일차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함한다.
- [0012] 한 실시양태에서, 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하며, 예를 들어 1개 이상, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR과 1개 이상, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR을 포함하는 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인일 수 있다. 한 실시양태에서, 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원 (예를 들어, 표 2 또는 서열 11)에 기재된 경쇄 가변 영역 및/또는 본원 (예를 들어, 표 2 또는 서열 11)에 기재된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 표 2 또는 서열 11의 아미노산 서열의 경쇄와 중쇄를 포함하는 scFv이다. 특정 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 표 2 또는 서열 11에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 2 또는 서열 11의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 표 2 또는 서열 11에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 2 또는 서열 11의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 68의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 39, 서열 45, 서열 51, 서열 57, 서열 63, 서열 69, 서열 75, 서열 81, 및 서열 98로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 scFv이고, 본원, 예를 들어 표 2 또는 서열 11

에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역은 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커를 통하여 본원, 예를 들어 표 2 또는 서열 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역에 부착된다. 한 실시양태에서, 상기 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 (Gly₄-Ser)_n 링커 (여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6, 바람직하게 4 (서열 110)이다)를 포함한다. scFv의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은, 예를 들어 다음 배향 중 어느 것으로도 존재할 수 있다: 경쇄 가변 영역-링커-중쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역-링커-경쇄 가변 영역.

[0013] 한 실시양태에서, 코딩된 CAR은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 엠실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함하는 막횡단 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 막횡단 도메인은 서열 15의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 막횡단 도메인은 서열 15의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 15의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 8의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0014] 한 실시양태에서, 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 힌지(hinge) 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인과 연결된다. 한 실시양태에서, 코딩된 힌지 영역은 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 7 또는 서열 105 또는 서열 107 또는 서열 109의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0015] 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 추가로, 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 공동자극 도메인은 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 신호 전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 공동자극 도메인은 서열 16의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 공동자극 도메인은 서열 102의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 공동자극 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16 또는 서열 102의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 9의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0016] 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 추가로, 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 및/또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 CD27의 기능적 신호전달 도메인 및/또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 99의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16의 아미노산 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 99의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16 또는 서열 102의 아미노산 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 99의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 서열 및 서열 17 또는 서열 99의 서열을 포함하며, 이러한 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열은 동일한 프레임 내에서 단일 폴리펩티드 쇄로서 발현된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 9 또는 서열 103의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열, 및/또는 서열 10 또는 서열 100의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 리더 서열, 예를 들어 본원에 기재된 리더 서열, 예를 들어 서열 13의 리더 서열; 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3을 포함하는 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 표 2 또는 서열 11에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열; 본원에 기재된 힌지 영역, 예를 들어 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108의 힌지 영역; 본원에 기재된 막횡단 도메인, 예를 들어 서열 15의 서열을 갖는 막횡단 도메인; 및 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인, 예를 들어 서열 16의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인

인, 및/또는 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 서열 17 또는 서열 99의 서열을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인, 예를 들어 서열 102의 서열을 갖는 CD27 공동자극 도메인, 및/또는 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 서열 17 또는 서열 99의 서열을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인, 예를 들어 서열 16의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 서열 17 또는 서열 99의 서열을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인, 예를 들어 서열 102의 서열을 갖는 CD27 공동자극 도메인, 및 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 서열 17 또는 서열 99의 서열을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 6의 핵산 서열, 또는 그와 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 리더 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 39, 서열 45, 서열 51, 서열 57, 서열 63, 서열 69, 서열 75, 서열 81, 또는 서열 98의 핵산 서열, 또는 그와 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 항-EGFR 결합 도메인 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 69의 핵산 서열, 또는 그와 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 항-EGFR 결합 도메인 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 4의 핵산 서열, 또는 그와 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 항-EGFR 결합 도메인 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 8의 핵산 서열, 또는 그와 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 막횡단 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 9의 핵산 서열, 또는 그와 95-99% 동일성을 갖는 서열 및/또는 서열 10의 핵산 서열, 또는 그와 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 세포내 신호전달 도메인 서열을 포함한다.

[0018] 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85 또는 서열 90의 CAR 아미노산 서열, 또는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85 또는 서열 90의 아미노산 서열 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 20개 또는 30개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 60개, 50개 또는 40개 미만의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85 또는 서열 90의 아미노산 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함한다 (예를 들어, 이루어진다). 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 서열 1 또는 서열 2의 CAR 아미노산 서열, 또는 서열 1 또는 서열 2의 아미노산 서열 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 20개 또는 30개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 60개, 50개 또는 40개 미만의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 1 또는 서열 2의 아미노산 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함한다 (예를 들어, 이루어진다).

[0019] 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 서열 42, 서열 48, 서열 54, 서열 60, 서열 66, 서열 72, 서열 78, 서열 84 또는 서열 89의 핵산 서열, 또는 서열 42, 서열 48, 서열 54, 서열 60, 서열 66, 서열 72, 서열 78, 서열 84 또는 서열 89의 핵산 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이루어진다). 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 서열 18 또는 서열 19의 핵산 서열, 또는 서열 18 또는 서열 19의 핵산 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이루어진다).

[0020] 한 측면에서, 본 발명은 항-EGFRvIII 결합 도메인을 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이며, 이러한 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하며, 예를 들어 1개 이상, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR과 1개 이상, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR을 포함하는 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인일 수 있다. 한 실시양태에서, 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원 (예를 들어, 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80)에 기재된 경쇄 가변 영역 및/또는 본원 (예를 들어, 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80)에 기재된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80의 아미노산 서열의 경쇄와 중쇄를 포함하는 scFv이다. 특정 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80에 제공된 경

쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 39, 서열 45, 서열 51, 서열 57, 서열 63, 서열 69, 서열 75, 서열 81 및 서열 98로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 scFv이고, 본원, 예를 들어 표 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역은 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커를 통하여 본원, 예를 들어 표 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역에 부착된다. 한 실시양태에서, 상기 코딩된 항-EGFRvIII 결합 도메인은 (Gly₄-Ser)_n 링커 (여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6, 바람직하게 4 (서열 110)이다)를 포함한다. scFv의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은, 예를 들어 다음 배향 중 어느 것으로도 존재할 수 있다: 경쇄 가변 영역-링커-중쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역-링커-경쇄 가변 영역.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 핵산 분자에 의해 코딩된 단리된 폴리펩티드 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드 분자는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85 및 서열 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 서열 73의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 서열 79의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-EGFRvIII 결합 도메인(예를 들어, EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편), 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 일차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함하는 단리된 키메라 항원 수용체 (CAR) 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이러한 CAR은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편); 본원에 기재된 막횡단 도메인; 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 공동자극 도메인 및/또는 일차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달)을 포함한다.

[0023] 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하며, 예를 들어 1개 이상, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR과 1개 이상, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR을 포함하는 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원 (예를 들어, 표 2 또는 서열 11)에 기재된 경쇄 가변 영역 및/또는 본원 (예를 들어, 표 2 또는 서열 11)에 기재된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 표 2 또는 서열 11에 열거된 아미노산 서열의 경쇄와 중쇄를 포함하는 scFv이다. 특정 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 표 2 또는 서열 11에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 2 또는 서열 11에 제공된 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 표 2 또는 서열 11에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 2 또는 서열 11에 제공된 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 scFv이고, 본원, 예를 들어 표 2 또는 서열 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역은 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커를 통하여 본원, 예를 들어 표 2 또는 서열 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역에 부착된다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 (Gly₄-Ser)_n 링커 (여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6, 바람직하게 4 (서열 110)이다)를 포함한다.

scFv의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은, 예를 들어 다음 배향 중 어느 것으로도 존재할 수 있다: 경쇄 가변 영역-링커-중쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역-링커-경쇄 가변 영역.

- [0024] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 15의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0025] 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 힌지 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인과 연결된다. 한 실시양태에서, 코딩된 힌지 영역은 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0026] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 추가로, 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16 또는 서열 102의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 추가로, 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB 또는 CD27의 기능적 신호전달 도메인 및/또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 서열 및/또는 서열 17의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 서열 및/또는 서열 99의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 아미노산 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 99의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16 또는 서열 102의 아미노산 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 99의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 서열 및 서열 17 또는 서열 99의 서열을 포함하며, 이러한 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열은 동일한 프레임 내에서 단일 폴리펩티드 쇄로써 발현된다.
- [0027] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 추가로, 리더 서열, 예를 들어 본원에 기재된 리더 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 리더 서열은 서열 13의 아미노산 서열, 또는 서열 13의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 리더 서열, 예를 들어 본원에 기재된 리더 서열, 예를 들어 서열 13, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열의 리더 서열; 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3을 포함하는 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 표 2 또는 서열 11에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열; 힌지 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지 영역, 예를 들어 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열의 힌지 영역; 막횡단 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 막횡단 도메인, 예를 들어 서열 15의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 갖는 막횡단 도메인; 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 일차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함하는 단리된 CAR 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인, 예를 들어 서열 16의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인, 또는 서열 102, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 갖는 CD27 공동자극 도메인, 및/또는 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 서열 17 또는 서열 99의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인, 예를 들어 서열 16의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인 또는 서열 102의 서열을 갖는 CD27 공동자극 도메인, 및/또는 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 서열 17 또는 서열 99의 서열을 갖는 CD3 제타

자극 도메인을 포함한다.

[0029] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85 또는 서열 90의 아미노산 서열, 또는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85 또는 서열 90의 아미노산 서열 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 20개 또는 30개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 60개, 50개 또는 40개 미만의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85 또는 서열 90의 아미노산 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이루어진다). 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 서열 1 또는 서열 2의 아미노산 서열, 또는 서열 1 또는 서열 2의 아미노산 서열 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 20개 또는 30개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 60개, 50개 또는 40개 미만의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 1 또는 서열 2의 아미노산 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이루어진다). 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 서열 73의 아미노산 서열, 또는 서열 73의 아미노산 서열 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 20개 또는 30개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 60개, 50개 또는 40개 미만의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 73의 아미노산 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이루어진다). 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 서열 79의 아미노산 서열, 또는 서열 79의 아미노산 서열 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 20개 또는 30개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 60개, 50개 또는 40개 미만의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 79의 아미노산 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이루어진다).

[0030] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하는 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 1개 이상, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR과 1개 이상, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR을 포함하는 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원 (예를 들어, 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80)에 기재된 경쇄 가변 영역 및/또는 본원 (예를 들어, 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80)에 기재된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80의 아미노산 서열의 경쇄와 중쇄를 포함하는 scFv이다. 특정 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 또는 80의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 scFv이고, 본원, 예를 들어 표 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역은 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커를 통하여 본원, 예를 들어 표 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역에 부착된다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 (Gly₄-Ser)_n 링커 (여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6, 바람직하게 4 (서열 110)이다)를 포함한다. scFv의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은, 예를 들어 다음 배향 중 어느 것으로도 존재할 수 있다: 경쇄 가변 영역-링커-중쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역-링커-경쇄 가변 영역.

[0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 한 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 한 실시양태에서, 벡터는 추가로, 프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 프로모터는 EF-1 프로모터이다. 한 실시양태에서, EF-1 프로모터는 서열 97의 서열을 포함한다.

- [0033] 한 실시양태에서, 벡터는 시험관내 전사된 벡터, 예를 들어 본원에 기재된 핵산 분자의 RNA를 전사하는 벡터이다. 한 실시양태에서, 벡터 내의 핵산 서열은 추가로, 폴리(A) 꼬리(tail), 예를 들어 본원에 기재된 폴리 A 꼬리, 예를 들어 약 150개의 아데노신 염기를 포함하는 (서열 111) 폴리 A 꼬리를 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터 내의 핵산 서열은 추가로, 3' UTR, 예를 들어 본원에 기재된 3' UTR, 예를 들어 인간 베타-글로불린으로부터 유래된 3' UTR의 하나 이상의 반복 서열을 포함하는 것을 포함한다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 세포, 예를 들어 인간 T 세포, 예를 들어 본원에 기재된 인간 T 세포이다. 한 실시양태에서, 인간 T 세포는 CD8+ T 세포이다.
- [0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 T 세포를, CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질도입하는 것을 포함하는, 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명은 또한, 외인성 RNA를 일시적으로 발현하는 RNA-조작된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 세포, 예를 들어 T 세포의 집단을 생성시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 세포 내로 도입하는 것을 포함하며, 상기 RNA는 본원에 기재된 CAR 분자를 코딩하는 핵산을 포함한다.
- [0037] 또 다른 측면에서, 본 발명은 특정 포유동물에게, CAR 분자를 발현하는 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물에 항-종양 면역을 제공하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 세포는 자가 T 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 동종 T 세포이다. 한 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은 EGFRvIII의 발현과 연관된 질환이 있는 포유동물에게, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, EGFRvIII의 발현과 연관된 질환 (예를 들어, EGFRvIII의 발현과 연관된, 증식성 질환, 전암성 병태 및 비-암 관련 징후)이 있는 포유동물을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0039] 한 실시양태에서, 상기 질환은 본원에 기재된 질환이다. 한 실시양태에서, EGFRvIII과 연관된 질환은 교모세포종이다. 한 실시양태에서, EGFRvIII과 연관된 질환은 암, 예를 들어 다형성 교모세포종 (GBM), 역형성 성상세포종, 거대 세포 교모세포종, 신경교육종, 역형성 핍지교종, 역형성 상의세포종, 맥락종 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/형문근양 종양, 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐 암종), 유방 암종, 전립선 암종, 난소 암종, 결장직장 암종 및 방광 암종, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암, 및 상기 암 중 어느 것의 전이이다.
- [0040] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는, CAR 분자를 발현하는 세포의 효능을 증가시키는 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 작용제와 조합하여 투여한다.
- [0041] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는, CAR 분자를 발현하는 세포의 투여와 연관된 하나 이상의 부작용을 완화시키는 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 작용제와 조합하여 투여한다.
- [0042] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는, EGFRvIII과 연관된 질환을 치료하는 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 작용제와 조합하여 투여한다.
- [0043] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 본원에 기재된 용량 및/또는 투여 스케줄로 투여한다.
- [0044] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 상기 질환, 예를 들어 암, 예를 들어 본원에 기재된 암에 대한 1차 치료로서 투여한다. 또 다른 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 상기 질환, 예를 들어 암, 예를 들어 본원에 기재된 암에 대한 2차, 3차, 4차 치료로서 투여한다.
- [0045] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 CAR을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 본 발명의 CAR의 단리된 폴리펩티드 분자, 본 발명의 CAR을 포함하는 벡터, 및 의약, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 CAR을 포함하는 세포에 관한 것이다.
- [0046] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 CAR을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 본 발명의 CAR의 단리된 폴리펩티드

분자, 본 발명의 CAR을 포함하는 벡터, 및 EGFRvIII을 발현하는 질환, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 EGFRvIII을 발현하는 질환의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 CAR을 포함하는 세포에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1a 및 1b는 3C10-CAR 및 miR-17-92에 대한 렌티바이러스 벡터의 일련의 개략적 다이어그램이다. 도 1a는 3C10-CAR 발현성 벡터 pELNS-3C10-CAR을 도시한 것이고, 도 1b는 miR-17-92-발현성 렌티바이러스 벡터를 도시한 것이다.

도 2a 내지 2c는 인간 T 세포에서 렌티바이러스적으로 형질도입된 3C10-CAR 및 miR-17-92의 기능적 발현을 나타내는 일련의 영상이다. CD3+ T 세포는 pELNS-3C10-CAR 단독으로, 또는 pELNS-3C10-CAR과 FG12-EF1a-miR-17/92 둘 다로 형질도입하였다.

도 3a 내지 3d는 CAR-T-세포에서의 miR17-92의 공동-발현이 TGF- β 및 TMZ의 억제 효과에 대한 저항성을 부여한다는 것을 입증하는 일련의 영상이다. CAR-T-세포 (흰색 막대), 및 miR-17-92로 공동-형질도입된 세포 (흑색 막대)를, TGF- β 및 TMZ의 표시된 농도의 존재 하에 EGFRvIII을 발현하는 APC와 함께 공동-배양하였다.

도 4a 및 4b는 U87-EGFRvIII 종양을 보유하고 있는 마우스에서 CAR-T-세포의 강력한 치료 효과를 도시하는 영상이다.

도 5a 내지 5c는 CAR-T 세포에서 공동-형질도입된 miR-17-92가 재-시험감염된 신경교종 세포에 대하여 개선된 보호를 부여한다는 것을 입증하는 일련의 영상이다.

도 6은 대표적인 EGFRvIII CAR (외관 순서상 각각 서열 1, 121 및 2)의 비교를 보여주는 영상이다.

도 7은 EGFRvIII CAR로 형질도입된 인간 T-세포가 EGFRvIII-발현성 U87 인간 GBM 세포 (U87-EGFRvIII)의 특이적이고도 강력한 용해를 나타냈다는 것을 보여주는 영상이다.

도 8은 모든 항-EGFRvIII CART가 종양 세포를 제거하지만, 구축물 3C10.BBz CART는 종양을 7일째에 가장 신속하게 제거한다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 9는 인간화 EGFRvIII의 VH 및 VL 서열 (외관 순서상 각각 서열 122-127)을 보여주는 표이다.

도 10은 EGFRvIII + 세포주와 결합하는 가용성 인간화 scFv 구축물의 시험관내 결합을 보여주는 그래프이다.

도 11은 EGFR 야생형 세포주와 결합하는 가용성 인간화 scFv 구축물의 시험관내 결합을 보여주는 그래프이며, 클론 73 (CAR6으로서 지칭되기도 함) 및 클론 74 (CAR7로서 지칭되기도 함)가 더 안전한 프로파일을 보여준다.

도 12는 Jurkat 세포의 일시적 형질감염 및 Fc 융합 단백질로의 검출에 있어서 EGFRvIII 및 야생형 EGFR에 대한 유린 CAR9 및 인간 CAR10의 특이성을 비교한 그래프이다.

도 13은 포화량의 EGFRvIII로 염색된, 인간화 EGFRvIII CAR 구축물 mCAR19 (대조군), CAR10, CAR9, 및 CAR6을 이용한 공여자 T 세포의 일차 T 세포 형질도입을 보여주는 그래프이다.

도 14는 BHK-EGFRvIII에 의한 인간화 EGFRvIII CAR 구축물의 루시페라제 활성을 보여주는 그래프이다 (야생형 세포에 의해서는 그렇지 못하다).

도 15는 인간화 EGFRvIII CAR 구축물이 U87vIII 시험감염에 반응하여 증식되지만, 야생형 EGFR에 대한 배경 증식이 없다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 16은 인간화 EGFRvIII CAR 구축물이 U87vIII 시험감염의 존재 하에 시험관내에서 증식된다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 17은 인간화 EGFRvIII CAR 구축물, 2173 (CAR6) 및 CAR9가 EGFRvIII 발현성 세포를 특이적으로 사멸시키지만, 야생형 EGFR 세포는 그렇지 않은, 4시간 51-크롬 방출 종양 사멸 검정을 보여주는 그래프이다.

도 18은 인간화 EGFRvIII CAR 구축물 (CAR6)로 형질도입된 CAR+ T 세포로 처리된 마우스에서 생체내에서 종양 크기의 진행 (cm³, 상단 좌측 패널), 및 종양 방사휘도(radiance) 평균 (p/s/cm²/sr, 상단 우측 패널) 및 카플란-마이어(Kaplan-meier) 생존 곡선 (하단)의 진행을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] **정의**
- [0049] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야에서의 통상의 기술자에게 흔히 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0050] 단수 형태의 용어는 1개 또는 1개 초과 (즉, 1개 이상)을 지칭한다. 한 예로서, "요소"는 1개의 요소 또는 1개 초과 요소의 요소를 의미한다.
- [0051] 측정 가능한 값, 예컨대 양, 지속 시간 등을 언급하는 경우의 용어 "약"은 명시된 값으로부터의 $\pm 20\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 10\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 5\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 1\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포괄하는 것을 의미하는데, 이는 이러한 변동이 본원에 개시된 방법을 수행하는 데 적당하기 때문이다.
- [0052] 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 또 다른 한편으로 "CAR"은 적어도 세포의 항원 결합 도메인; 막횡단 도메인; 및 다음에 정의되는 바와 같은 자극성 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인 (본원에서 "세포내 신호전달 도메인"으로서 지칭되기도 함)을 포함하는 재조합 폴리펩티드 구축물을 지칭한다. 한 측면에서, 자극성 분자는 T 세포 수용체 복합체와 연합된 제타 체이다. 한 측면에서, 세포질 신호전달 도메인은 다음에 정의되는 바와 같은 하나 이상의 공동자극성 분자로부터 유래된 하나 이상의 기능적 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 공동자극성 분자는 4-1BB (즉, CD137) 및/또는 CD28로부터 선택된다. 한 측면에서, CAR은 세포의 항원 인식 도메인; 막횡단 도메인; 및 자극성 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포의 항원 인식 도메인; 막횡단 도메인; 및 공동자극성 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인 및 자극성 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포의 항원 인식 도메인; 막횡단 도메인; 및 하나 이상의 공동자극성 분자(들)로부터 유래된 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극성 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포의 항원 인식 도메인; 막횡단 도메인; 및 하나 이상의 공동자극성 분자(들)로부터 유래된 2개 이상의 기능적 신호전달 도메인 및 자극성 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 CAR 융합 단백질의 아미노-말단 (N-말단)에서 임의의 리더 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포의 항원 인식 도메인의 N-말단에서 리더 서열을 추가로 포함하며, 이러한 리더 서열은 세포성 막에 대한 CAR의 세포성 프로세싱 및 국제화 동안 항원 인식 도메인 (예를 들어, scFv)으로부터 임의로 절단된다.
- [0053] 용어 "신호전달 도메인"은 세포 내의 정보를 전달함으로써 작용하여, 제2의 메신저를 생성시키거나 또는 이러한 메신저에 대해 반응하여 이펙터로서 기능함으로써 규정된 신호전달 경로를 통하여 세포성 활성을 조절하는, 단백질의 기능적 부분을 지칭한다.
- [0054] 용어 "EGFR"은 인간 및 비-인간 형태를 포함한, 모든 포유동물의 성숙한 전장 표피 성장 인자 수용체를 지칭한다. 1186개 아미노산 인간 EGFR이 문헌 [Ullrich et al., Nature 309:418-425 (1984)] 및 유전자은행 수탁 번호 AF125253 및 스위스프로트(SwissProt) 수탁 번호 P00533-2에 기재되어 있다.
- [0055] 용어 "EGFRvIII"은 표피 성장 인자 수용체 변이체 III을 지칭한다. EGFRvIII은 인간 종양에서 관찰되는 EGFR의 가장 흔한 변이체이지만, 정상 조직에서는 거의 관찰되지 않는다. 이러한 단백질은 엑손 2-7의 프레임내 결실로부터 비롯되고, EGFR의 세포의 도메인 내의 엑손 1과 8의 연결부에 신규 글리신 잔기가 생성됨으로써, 종양 특이적 에피토프가 창출된다. EGFRvIII은 GBM의 24% 내지 67%에서 발현되지만, 정상 조직에서는 그렇지 않다. EGFRvIII은 유형 III 돌연변이체, 델타-EGFR, EGFRde2-7, 및 ΔEGFR로서 공지되기도 하고, 이는 미국 특허 번호 6,455,498, 6,127,126, 5,981,725, 5,814,317, 5,710,010, 5,401,828, 및 5,212,290에 기재되어 있다. EGFRvIII의 발현은 염색체 결실로부터 비롯될 수 있고, 이는 또한, 이상한 대체 스플라이싱으로부터 비롯될 수 있다 (문헌 [Sugawa et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:8602-8606] 참조).
- [0056] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하는 이뮤노글로불린 분자로부터 유래된 단백질, 또는 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날, 다중 또는 단일 체, 또는 온전한 이뮤노글로불린일 수 있고, 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 항체는 이뮤노글로불린 분자의 사량체일 수 있다.
- [0057] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체, 또는 그의 재조합 변이체의 적어도 한 부분을 지칭하고, 항원 결합 도메인, 예를 들어 특정 표적, 예컨대 항원에 대한 항체 단편의 인식과 특이적 결합을 부여하기에 충분한, 온전한 항체

의 항원성 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, scFv 항체 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예컨대 sdAb (VL 또는 VH), 카멜리드(camelid) VHH 도메인, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중-특이적 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 용어 "scFv"는 경쇄의 가변 영역을 포함하는 하나 이상의 항체 단편 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 하나 이상의 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 지칭하는데, 상기 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 짧은 가요성 폴리펩티드 링커를 통하여 연속적으로 연결되고, 단일쇄 폴리펩티드로서 발현될 수 있으며, 상기 scFv는 그것이 유래되는 온전한 항체의 특이성을 보유하고 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 scFv는 VL 및 VH 가변 영역을 어느 한 순서로, 예를 들어 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단 끝을 기준으로 하여 어느 한 순서로 가질 수 있고, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 또는 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.

[0058] 항체 또는 그의 항체 단편을 포함하는 본 발명의 CAR 조성물의 일부는 각종 형태로 존재할 수 있는데, 항원 결합 도메인은, 예를 들어 단일 도메인 항체 단편 (sdAb), 단일쇄 항체 (scFv) 및 인간화 항체를 포함한, 연속되는 폴리펩티드쇄의 일부로서 발현된다 (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). 한 측면에서, 본 발명의 CAR 조성물의 항원 결합 도메인은 항체 단편을 포함한다. 추가 측면에서, CAR은 scFv를 포함하는 항체 단편을 포함한다.

[0059] 용어 "항체 중쇄"는 그의 자연 발생적 입체 형태에서 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드쇄 중 더 큰 것을 지칭하고, 이는 정상적으로, 항체가 속하는 부류를 결정한다.

[0060] 용어 "항체 경쇄"는 그의 자연 발생적 입체 형태에서 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드쇄 중 더 작은 것을 지칭한다. 카파 (κ) 및 람다 (λ) 경쇄는 2개의 주요 항체 경쇄 이소형을 지칭한다.

[0061] 용어 "재조합 항체"는 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성되는 항체, 예컨대 예를 들어 박테리오파지 또는 효모 발현 시스템에 의해 발현된 항체를 지칭한다. 상기 용어는 또한, 항체를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되었던 항체를 의미하는 것으로 이해되어야 하고, DNA 분자는 이러한 항체를 구체화하는 아미노산 서열 또는 항체 단백질을 발현하며, 이러한 DNA 또는 아미노산 서열은 당해 분야에서 이용 가능하고 널리 공지되어 있는 재조합 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 이용하여 획득하였다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 일으키는 분자로서 정의된다. 이러한 면역 반응은 항체 생성 또는 특이적 면역학적-적격 세포의 활성화 중 어느 하나, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 사실상 모든 단백질 또는 펩티드를 포함한, 어떠한 거대분자도 항원으로서 제공될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 더욱이, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 통상의 기술자는 면역 반응을 유발시키는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 어떠한 DNA도, 본원에 사용되는 바와 같은 그 용어로서의 "항원"을 코딩한다는 것을 이해할 것이다. 더욱이, 통상의 기술자는 항원이 특정 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 코딩될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명이 2개 이상의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하지만, 이에 제한되지 않고, 이들 뉴클레오티드 서열이, 목적하는 면역 반응을 유발시키는 폴리펩티드를 코딩하기 위하여 각종 조합으로 배열된다는 것은 용이하게 명백하다. 더욱이, 통상의 기술자는 항원이 "유전자"에 의해 코딩될 필요가 전혀 없다는 것을 이해할 것이다. 항원이 합성적으로 생성될 수 있거나 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있거나, 또는 이것이 폴리펩티드 이외의 거대분자일 수 있다는 것은 용이하게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 기타 생물학적 성분을 지닌 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 유체를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0063] 용어 "항-종양 효과"는 각종 수단에 의해 분명히 나타날 수 있는 생물학적 효과를 지칭하는데, 이는 예를 들어, 종양 용적의 감소, 종양 세포 수의 감소, 전이 수의 감소, 수명 증가, 종양 세포 증식의 감소, 종양 세포 생존 저하, 또는 암성 병태와 연관된 각종 생리학적 증상의 완화를 포함하지만, 그에 제한되지 않는다. "항-종양 효과"는 또한 우선, 종양의 발생을 방지하는 데 있어서의 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 능력에 의해 분명히 나타낼 수 있다.

[0064] 용어 "자가"는 동일한 개체로부터 유래되어, 이것이 나중에 그 개체 내로 재도입되는 모든 물질을 지칭한다.

[0065] 용어 "동종"은 물질이 도입되는 개체와 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 모든 물질을 지칭한다. 하나 이상의 유전자 자리에서의 유전자가 동일하지 않은 경우, 둘 이상의 개체는 서로 동종인 것으로 간주된다. 일부 측면에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종 물질은 항원과 관련하여 상호 작용하기에 충분히 유전적으로 다를 수

있다.

[0066] 용어 "이종"은 상이한 종의 동물로부터 유래된 이식편을 지칭한다.

[0067] 용어 "암"은 이상한 세포의 신속하고도 제어되지 않는 성장을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 암 세포는 국소적으로 확산되거나 또는 혈류와 림프계를 통하여 신체의 다른 부분으로 확산될 수 있다. 각종 암의 예는 본원에 기재되어 있고, 교모세포종, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "EGFRvIII의 발현과 연관된 질환"은 각종 암, 예컨대 예를 들어, 교모세포종 (교모세포종 줄기 세포 포함); 유방, 난소 및 비소세포 폐 암종; 두경부 편평 세포 암종; 수모세포종, 결장직장암, 전립선암, 및 방광 암종의 종양 세포를 포함한, EGFRvIII을 발현하는 세포와 연관된 병태 또는 EGFRvIII의 발현과 연관된 질환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특별한 이론이나 기전에 얽매어는 것은 아니지만, EGFRvIII에 대한 항원-특이적 반응을 유발시킴으로써, 본원에 개시된 CAR은 다음 중 한 가지 이상을 제공하는 것으로 여겨진다: EGFRvIII-발현성 종양 세포를 표적화하여 파괴시키고; 종양을 감소시키거나 없애며; 면역 세포를 종양 부위에 침윤시키는 것을 촉진시키고; 항-종양 반응을 증강/확장시킨다. EGFRvIII은 정상 (즉, 비-암성) 조직에서는 검출 가능한 수준으로 발현되지 않기 때문에, 본 발명의 CAR은 유리하게도, 정상 조직 및 세포를 표적화/파괴시키는 것을 실질적으로 피하는 것으로 고려된다.

[0069] 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체 또는 항체 단편의 결합 특징에 상당한 영향을 미치지 않거나 또는 이를 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 당해 분야에 공지된 표준 기술, 예컨대 부위-지시된 돌연변이 유발 및 PCR-매개된 돌연변이 유발에 의해 본 발명의 항체 또는 항체 단편 내로 도입할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체시키는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 계열은 당해 분야에 정의되었다. 이들 계열은 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소루이신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 따라서, 본 발명의 CAR 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 계열로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체시킬 수 있고, 이와 같이 변경된 CAR은 본원에 기재된 기능적 검정을 이용하여 시험할 수 있다.

[0070] 용어 "자극"은 자극성 분자 (예를 들어, TCR/CD3 복합체)를 그의 동족 리간드와 결합시킴으로써 신호 변환 현상, 예컨대 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 변환 (이에 제한되지 않는다)을 매개함으로써 유도된 일차 반응을 지칭한다. 자극은 특정 분자의 변경된 발현, 예컨대 TGF- β 의 하향 조절 및/또는 세포골격 구조의 재편성 등을 매개할 수 있다.

[0071] 용어 "자극성 분자"는 T 세포 신호전달 경로의 적어도 일부 측면을 위해 자극성 방식으로 TCR 복합체의 일차 활성화를 조절하는 일차 세포질 신호전달 서열(들)을 제공하는 T 세포에 의해 발현된 분자를 지칭한다. 한 측면에서, 일차 신호는, 예를 들어 펩티드가 부하된 MHC 분자를 수반한 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 개시되고, 증식, 활성화, 분화 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 T 세포 반응의 매개를 초래한다. 자극성 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열 ("일차 신호전달 도메인"으로서 지칭되기도 함)은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 공지되는 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 본 발명에 특히 사용되는 ITAM 함유 일차 세포질 신호전달 서열의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"로서 공지되기도 함) 및 CD66d로부터 유래된 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 특이적 CAR에서, 본 발명의 어느 하나 이상의 CAR 내의 세포내 신호전달 도메인은 세포내 신호전달 서열, 예를 들어 CD3-제타의 일차 신호전달 서열을 포함한다. 본 발명의 특이적 CAR에서, CD3-제타의 일차 신호전달 서열은 서열 17로서 제공된 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기이다. 본 발명의 특이적 CAR에서, CD3-제타의 일차 신호전달 서열은 서열 99로서 제공된 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기이다.

[0072] 용어 "항원 제시 세포" 또는 "APC"는 그의 표면 상에 주요 조직적합성 복합체 (MHC)와 복합체를 형성한 외래 항원을 디스플레이하는 보조 세포 (예를 들어, B-세포, 수지상 세포 등)와 같은 면역계 세포를 지칭한다. T-세포

는 그들의 T-세포 수용체 (TCR)를 이용하여 이들 복합체를 인식할 수 있다. APC는 항원을 프로세싱하고 이들을 T-세포에 제시한다.

- [0073] 본원에 사용된 용어로서의 "세포내 신호전달 도메인"은 분자의 세포내 부분을 지칭한다. 이러한 세포내 신호전달 도메인은 CAR 함유 세포, 예를 들어 CART 세포의 면역 이펙터 기능을 증진시키는 신호를 발생한다. 예를 들어, CART 세포에서 면역 이펙터 기능의 예는 세포용해 활성 및 헬퍼 활성 (시토카인의 분비 포함)을 포함한다.
- [0074] 특정 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예시되는 일차 세포내 신호전달 도메인은 일차 자극 또는 항원 의존성 자극에 대해 책임이 있는 분자로부터 유래된 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극성 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시되는 공동자극성 세포내 신호전달 도메인은 공동자극성 신호 또는 항원 비의존성 자극에 대해 책임이 있는 분자로부터 유래된 것을 포함한다. 예를 들어, CART의 경우, 일차 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 수용체의 세포질 서열을 포함할 수 있고, 공동자극성 세포내 신호전달 도메인은 공-수용체 또는 공동자극성 분자로부터의 세포질 서열을 포함할 수 있다.
- [0075] 일차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 공지되는 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. ITAM 함유 일차 세포질 신호전달 서열의 예는 CD3 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d DAP10 및 DAP12로부터 유래된 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 용어 "제타" 또는 또 다른 한편으로 "제타 쇄", "CD3-제타" 또는 "TCR-제타"는 유전자은행 수탁 번호 BAG36664.1로서 제공된 단백질, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기로서 정의되고, "제타 자극 도메인" 또는 또 다른 한편으로 "CD3-제타 자극 도메인" 또는 "TCR-제타 자극 도메인"은 T 세포 활성화에 필요한 초기 신호를 기능적으로 전송하기에 충분한 제타 쇄의 세포질 도메인으로부터의 아미노산 잔기로서 정의된다. 한 측면에서, 제타의 세포질 도메인은 유전자은행 수탁 번호 BAG36664.1의 잔기 52 내지 164, 또는 그의 기능적 오르소로그(ortholog)인, 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기를 포함한다. 한 측면에서, "제타 자극 도메인" 또는 "CD3-제타 자극 도메인"은 서열 17로서 제공된 서열이다. 한 측면에서, "제타 자극 도메인" 또는 "CD3-제타 자극 도메인"은 서열 99로서 제공된 서열이다.
- [0077] 용어 "공동자극성 분자"는 공동자극성 리간드와 특이적으로 결합함으로써, T 세포에 의한 공동자극성 반응 (예를 들어, 증식이지만, 이에 제한되지 않는다)을 매개하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공동자극성 분자는 유효한 면역 반응에 요구되는 항원 수용체 또는 그들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 공동자극성 분자는 MHC 부류 I 분자, BTLA 및 톨(Toll) 리간드 수용체뿐만 아니라 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 공동자극성 세포내 신호전달 도메인은 공동자극성 분자의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. 공동자극성 분자는 다음 단백질 계열로 나타낼 수 있다: TNF 수용체 단백질, 이뮤노글로불린-유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린(integrin), 신호전달 림프구성 활성화 분자 (SLAM 단백질), 및 활성화 NK 세포 수용체. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFR, HVEM, 림프구 기능-관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKP80, CD160, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다.
- [0079] 세포내 신호전달 도메인은 이것이 유래되는 분자의 전체 세포내 부분 또는 전체 천연 세포내 신호전달 도메인, 또는 그의 기능적 단편을 포함할 수 있다.
- [0080] 용어 "4-1BB"는 유전자은행 수탁 번호 AAA62478.2로서 제공된 아미노산 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기를 수반한 TNFR 초분자군의 구성원을 지칭하고; "4-1BB 공동자극 도메인"은 유전자은행 수탁 번호 AAA62478.2의 아미노산 잔기 214-255, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기로서 정의된다. 한 측면에서, "4-1BB 공동자극 도메인"은 서열 16으로서 제공된 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 등가의 잔기이다.
- [0081] 용어 "코딩"은 뉴클레오타이드의 규정된 서열 (예를 들어, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 규정된 서열을 갖는 생물학적 과정 중의 기타 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 제공되는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA 내의 뉴클레오타이드의 특이적 서열의 고유 특성, 및 이들로부터 비롯된 생물학적 특

성을 지칭한다. 따라서, 유전자, cDNA, 또는 RNA는, 그 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역으로 인해 세포 또는 기타 생물학적 시스템에서 단백질이 생성된다면, 이러한 단백질을 코딩한다. 코딩 가닥 (그의 뉴클레오티드 서열은 mRNA 서열과 동일하고 통상적으로 서열 목록에 제공된다)과, 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용된 비-코딩 가닥 둘 다가, 그 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 기타 생성물을 코딩하는 것으로서 지칭될 수 있다.

[0082] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로의 변성 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이란 또한, 이러한 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.

[0083] 용어 "유효량" 또는 "치료상 유효량"은 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 특별한 생물학적 결과를 달성하는데 유효한, 본원에 기재된 바와 같은 화합물, 제제, 물질 또는 조성물의 양을 지칭한다.

[0084] 용어 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템 내부로부터의 모든 물질 또는 이들 내부에서 생성된 모든 물질을 지칭한다.

[0085] 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템 외부로부터 도입된 모든 물질 또는 이들 외부에서 생성된 모든 물질을 지칭한다.

[0086] 용어 "발현"은 프로모터에 의해 구동된 특별한 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역을 지칭한다.

[0087] 용어 "전이 벡터"는 단리된 핵산을 포함하고, 이러한 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는데 사용될 수 있는 물질의 조성을 지칭한다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 연합된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 수많은 벡터가 당해 분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "전이 벡터"는 자가 복제성 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 세포 내로의 핵산의 전이를 촉진시키는 비-플라스미드 및 비-바이러스성 화합물, 예컨대 예를 들어, 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 추가로 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스성 전이 벡터의 예는 아데노바이러스성 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스성 벡터, 렌티바이러스성 벡터 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0088] 용어 "발현 벡터"는 발현될 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현에 충분한 시스-작용성 요소를 포함하고; 발현을 위한 기타 요소가 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 당해 분야에 공지된 모든 것을 포함하고, 이는 재조합 폴리뉴클레오티드를 혼입한 코스미드, 플라스미드 (예를 들어, 있는 그대로의 플라스미드 또는 리포솜에 함유된 플라스미드) 및 바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노 관련 바이러스)를 포함한다.

[0089] 용어 "렌티바이러스"는 레트로비리다에(Retroviridae)과의 한 속이다. 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스들 중에서 독특하고; 이들은 상당량의 유전 정보를 숙주 세포의 DNA 내로 전달할 수 있으므로, 유전자 전달 벡터의 가장 유효한 방법 중 하나이다. HIV, SIV, 및 FIV가 모두, 렌티바이러스의 예이다.

[0090] 용어 "렌티바이러스성 벡터"는 렌티바이러스 게놈의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 지칭하고, 이는 특히, 문헌 [Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]에 제공된 바와 같은 자기-불활성화 렌티바이러스성 벡터를 포함한다. 임상에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 기타 예는, 예를 들어 옥스포드 바이오메디카 (Oxford BioMedica)로부터의 LENTIVECTOR® 유전자 전달 기술, 렌티젠(Lentigen)으로부터의 LENTIMAX™ 벡터 시스템 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 렌티바이러스성 벡터의 비-임상 유형이 또한 이용 가능하고, 통상의 기술자에게 공지될 것이다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 두 중합체성 분자, 예를 들어 두 핵산 분자, 예컨대 두 DNA 분자 또는 두 RNA 분자, 또는 두 폴리펩티드 분자 간의 소단위 서열 동일성을 지칭한다. 이러한 두 분자 모두에서의 소단위위치가 동일한 단량체성 소단위에 의해 점유된 경우; 예를 들어, 두 DNA 분자 각각에서의 위치가 아데닌에 의해 점유된 경우, 이들 분자는 그 위치에서 상동성이거나 동일하다. 두 서열 간의 상동성은 매칭되거나 상동성인 위치의 수에 비례하는 함수인데; 예를 들어, 두 서열 내의 위치의 절반 (예를 들어, 길이가 10개 소단위인 중합체 내의 5개 위치)이 상동성인 경우, 이들 두 서열은 50% 상동성이고; 위치의 90% (예를 들어, 10개 중 9개)가 매칭되거나 상동성인 경우, 이들 두 서열은 90% 상동성이다.

- [0092] "인간화" 형태의 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는, 키메라 이뮤노글로불린, 그의 이뮤노글로불린쇄 또는 단편 (예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 항체의 기타 항원-결합성 아서열)이다. 대부분의 경우, 인간화 항체 및 그의 항체 단편은, 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기로 대체시킨 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체 또는 항체 단편)이다. 일부 경우에는, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체시킨다. 더욱이, 인간화 항체/항체 단편은 수용자 항체에서 발견되지 않거나, 또는 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 또는 항체 단편 성능을 추가로 정련시키고 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체 또는 그의 항체 단편은 1개 이상, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 CDR 영역에 상응하고, FR 영역의 모두 또는 상당 부분은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체 또는 항체 단편은 또한, 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 추가의 상세 내역에 대해서는, 문헌 ([Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986]; [Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988]; [Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992])을 참조할 수 있다.
- [0093] 용어 "인간" 항체는 완전 인간 항체를 지칭할 뿐만 아니라 유효한 인간 항체를 지칭한다. "완전 인간"은 완전 분자가 인간 기원의 것이거나 또는 항체 또는 이뮤노글로불린의 인간 형태와 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 이뮤노글로불린, 예컨대 항체 또는 항체 단편을 지칭한다. "유효한 인간" 항체는 이러한 항체가 정상 인간에서 면역원성 반응을 유발시키지 않도록 하기에 충분한 수의 인간 아미노산 위치를 포함하는 항체이다.
- [0094] 용어 "단리된"은 자연 상태에서부터의 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에서 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그의 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된, 상기 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는 비-천연 환경, 예컨대 예를 들어, 숙주 세포에 존재할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 맥락에서, 흔히 발생하는 핵산 염기에 대한 다음 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하며, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하며, "U"는 우리딘을 지칭한다.
- [0096] 용어 "작동적으로 연결된" 또는 "전사 제어"는 조절성 서열과 이중 핵산 서열 간의 기능적 연쇄를 지칭하는데, 이로써 이중 핵산 서열이 발현된다. 예를 들어, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 배치되는 경우, 이러한 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 작동적으로 연결된다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우, 이러한 프로모터는 상기 코딩 서열과 작동적으로 연결된다. 작동적으로 연결된 DNA 서열은 서로 연속될 수 있고, 예를 들어 연결시킬 필요가 있는 경우, 두 단백질 코딩 영역은 동일한 관독 프레임 내에 있다.
- [0097] 용어 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는, 예를 들어 피하 (s.c.), 정맥내 (i.v.), 근육내 (i.m.), 또는 흉골내 주사, 종양내 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0098] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 단일 가닥 형태 또는 이중 가닥 형태의, 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 그의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 지니고 자연 발생적 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 자연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 달리 표시되지 않는 한, 특별한 핵산 서열은 또한, 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 변성 코돈 치환물), 대립 유전자, 오르소로그, SNP 및 상보적 서열뿐만 아니라 명쾌하게 표시된 서열을 암시적으로 포괄한다. 구체적으로 언급하면, 변성 코돈 치환은 선택된 1개 이상 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치를 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환시킨 서열을 생성시킴으로써 달성될 수 있다 [Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)].
- [0099] 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호 교환적으로 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유적으로 연결된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 2개 이상의 아미노산을 함유해야만 하고, 단백질의 서열 또는 펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에 대한 제한은 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 어떠한 펩티드 또는 단백질도 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 상기 용어는 단쇄 (이는 또한 당해 분야에서, 예를 들어 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로서 흔히 지칭된다)와 보다 장쇄 (이는 일반적으로, 당해 분야에서 많은 유형의 단백질로서 지칭된다) 둘

다를 지칭한다. "폴리펩티드"는 예를 들어, 특히 생물학상 활성 단편, 실질적으로 상동성인 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동중-이량체, 이중-이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질 등을 포함한다. 폴리펩티드는 자연 펩티드, 재조합 펩티드, 또는 그의 조합물을 포함한다.

- [0100] 용어 "프로모터"는 폴리뉴클레오티드 서열의 특이적 전사를 개시하는 데 요구되는, 세포의 합성 조직 또는 도입된 합성 조직에 의해 인식된 DNA 서열을 지칭한다.
- [0101] 용어 "프로모터/조절성 서열"은 이러한 프로모터/조절성 서열과 작동적으로 연결된 유전자 생성물의 발현을 위해 요구되는 핵산 서열을 지칭한다. 일부 경우에, 상기 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 기타 경우에 상기 서열은 증강인자 서열, 및 유전자 생성물의 발현을 위해 요구되는 기타 조절성 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절성 서열은, 예를 들어 유전자 생성물을 조직 특이적 방식으로 발현하는 것일 수 있다.
- [0102] 용어 "구성적 프로모터"는 특정 유전자 생성물을 코딩하거나 구체화하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결된 경우에, 상기 유전자 생성물을, 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건 하에 이러한 세포에서 생성시키는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0103] 용어 "유도성 프로모터"는 특정 유전자 생성물을 코딩하거나 구체화하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결된 경우에, 상기 유전자 생성물을, 프로모터에 상응하는 유도제가 세포 내에 존재하는 경우에만 실질적으로 이러한 세포에서 생성시키는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0104] 용어 "조직-특이적 프로모터"는 특정 유전자 생성물을 코딩하거나 구체화하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결된 경우에, 상기 유전자 생성물을, 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 실질적으로 이러한 세포에서 생성시키는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0105] scFv의 맥락에서 사용된 바와 같은 용어 "가요성 폴리펩티드 링커" 또는 "링커"는 가변 중쇄 영역과 가변 경쇄 영역을 함께 연결하기 위하여, 단독으로 또는 조합하여 사용된 글리신 및/또는 세린 잔기와 같은 아미노산으로 이루어진 펩티드 링커를 지칭한다. 한 실시양태에서, 가요성 폴리펩티드 링커는 Gly/Ser 링커이고, 아미노산 서열 (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (서열 112) (여기서, n은 1 이상의 양성 정수이다)을 포함한다. 예를 들어, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 및 n=6, n=7, n=8, n=9 및 n=10. 한 실시양태에서, 가요성 폴리펩티드 링커는 (Gly₄Ser)₄ (서열 113) 또는 (Gly₄Ser)₃ (서열 114)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 링커는 (Gly₂Ser), (GlySer) 또는 (Gly₃Ser) (서열 112)의 다수 반복 서열을 포함한다. 또한, WO2012/138475 (본원에 참조로 포함된다)에 기재된 링커가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0106] 본원에 사용된 바와 같은, 5' 캡 (또한, RNA 캡, RNA 7-메틸구아노신 캡 또는 RNA m⁷G 캡으로 명명됨)은 전사의 개시 직후 진행성 메신저 RNA의 "전방" 또는 5' 말단에 부가되었던, 변형된 구아닌 뉴클레오티드이다. 이러한 5' 캡은 첫 번째로 전사된 뉴클레오티드에 연결되는 말단 기로 이루어진다. 그의 존재는 리보솜에 의한 인식과 RNase로부터의 보호에 있어 결정적이다. 캡 부가는 전사와 커플링되고, 공동-전사적으로 일어나므로, 각각은 다른 것에 영향을 미친다. 전사의 개시 직후, 합성되는 mRNA의 5' 말단은 RNA 중합효소와 연합된 캡-합성화 복합체에 의해 결합된다. 이러한 효소적 복합체는 mRNA 캡핑에 요구되는 화학적 반응을 촉매한다. 합성은 다-단계 생화학적 반응으로서 진행된다. 캡핑 부분을 변형시켜 mRNA의 기능성, 예컨대 그의 안정성 또는 번역 효율을 조절할 수 있다.
- [0107] 본원에 사용된 바와 같은, "시험관내 전사된 RNA"는 시험관내에서 합성된 RNA, 바람직하게 mRNA를 지칭한다. 일반적으로, 이와 같이 시험관내에서 전사된 RNA는 시험관내 전사 벡터로부터 생성된다. 이러한 시험관내 전사 벡터는 시험관내 전사된 RNA를 생성하기 위해 사용되는 주형을 포함한다.
- [0108] 본원에 사용된 바와 같은, "폴리(A)"는 폴리아데닐화에 의해 mRNA에 부착된 일련의 아데노신이다. 일시적 발현을 위한 구축물의 바람직한 실시양태에서, 폴리A는 50 내지 5000 (서열 115), 바람직하게 64 초과, 보다 바람직하게 100 초과, 가장 바람직하게 300 또는 400 초과이다. 폴리(A) 서열은 화학적 또는 효소적으로 변형시켜 mRNA 기능성, 예컨대 국제화, 안정성 또는 번역 효율을 조절할 수 있다.
- [0109] 본원에 사용된 바와 같은, "폴리아데닐화"는 메신저 RNA 분자에 대한 폴리아데닐릴 부분 또는 그의 변형된 변이체의 공유적 연쇄를 지칭한다. 진행 유기체에서, 대부분의 메신저 RNA (mRNA) 분자는 3' 말단에서 폴리아데닐화된다. 3' 폴리(A) 꼬리는 효소, 즉 폴리아데닐레이트 중합효소의 작용을 통하여 전-mRNA에 부가된 아데닌 뉴클레오티드의 긴 서열 (종종 수백)이다. 보다 고등 진핵생물에서는, 폴리(A) 꼬리를, 폴리아데닐화 신호인 특이적 서열을 함유하는 전사체 상으로 부가한다. 폴리(A) 꼬리 및 이와 결합된 단백질은 엑소뉴클레아제에 의한

분해로부터 mRNA를 보호하는 데 도움을 준다. 폴리아데닐화는 또한, 전사 종결, 핵으로부터의 mRNA의 수송, 및 번역에 중요하다. 폴리아데닐화는 DNA가 RNA로 전사된 직후에 핵에서 발생하지만, 부가적으로 세포질에서 나중에 발생할 수도 있다. 전사가 종결된 후, mRNA 세는 RNA 중합효소와 연관된 엔도뉴클레아제 복합체의 작용을 통하여 절단된다. 절단 부위는 통상적으로, 절단 부위 근처에 염기 서열 AAUAAA가 존재하는 것을 특징으로 한다. mRNA를 절단한 후, 아데노신 잔기를 절단 부위의 자유 3' 말단에 부가한다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같은, "일시적"은 일정 시간, 일 또는 주 동안 비-통합된 트랜스진의 발현을 지칭하는데, 이러한 발현 기간은 숙주 세포 내의 안정적인 플라스미드 레플리콘(replicon) 내에 함유되거나 또는 게놈 내로 통합되는 경우에는, 유전자의 발현 기간 보다 짧다.

[0111] 용어 "신호 변환 경로"는 신호를 세포의 한 부분으로부터 세포의 또 다른 부분으로 전달하는 데 있어서 일정 역할을 하는 각종 신호 변환 분자들 간의 생화학적 관계를 지칭한다. "세포 표면 수용체"는 신호를 수용하고 신호를 세포의 막 전반에 걸쳐 전달할 수 있는 분자 및 분자 복합체를 포함한다.

[0112] 용어 "대상체"는 면역 반응이 유발될 수 있는 살아 있는 유기체 (예를 들어, 포유동물, 인간)를 포함한다.

[0113] 용어 "실질적으로 정제된" 세포는 기타 세포 유형이 본질적으로 없는 세포를 지칭한다. 실질적으로 정제된 세포는 또한, 그의 자연 발생적 상태에서는 정상적으로 연합되는 기타 세포 유형으로부터 분리시킨 세포를 지칭한다. 일부 경우에, 실질적으로 정제된 세포 집단은 균질한 세포 집단을 지칭한다. 다른 경우에, 상기 용어는 간단히, 그의 자연 상태에서는 자연적으로 연합되는 세포로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 측면에서, 세포는 시험관내에서 배양한다. 다른 측면에서, 세포는 시험관내에서 배양하지 않는다.

[0114] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료적"은 치료를 의미한다. 치료적 효과는 특정 질환 상태의 감소, 억제, 차단 또는 박멸에 의해 획득된다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "예방"은 특정 질환 또는 질환 상태의 방지 또는 이에 대한 보호적 치료를 의미한다.

[0116] 본 발명의 맥락에서, "종양 항원" 또는 "과증식성 장애 항원" 또는 "과증식성 장애와 연관된 항원"은 특이적 과증식성 장애에 통상적인 항원을 지칭한다. 특정 측면에서, 본 발명의 과증식성 장애 항원은 원발성 또는 전이성 흑색종, 흉선종, 림프종, 육종, 폐암, 간암, 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 비-호지킨 림프종, 백혈병, 자궁암, 자궁경부암, 방광암, 신장암 및 선암종, 예컨대 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 암으로부터 유래된다.

[0117] 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 전이시키거나 도입하는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염되거나, 형질전환되거나 또는 형질도입된 세포이다. 이 세포는 일차 대상체 세포 및 그의 자손을 포함한다.

[0118] 용어 "특이적으로 결합하는"은 특정 샘플에 존재하는 동족 결합 파트너 (예를 들어, T 세포 상에 존재하는 자극성 및/또는 공동자극성 분자) 단백질을 인식하고 이와 결합하는 항체 또는 리간드를 지칭하지만, 이러한 항체 또는 리간드는 상기 샘플 중의 다른 분자는 실질적으로 인식하지 않거나 결합하지 않는다.

[0119] 범위: 본 개시내용 전반에 걸쳐, 본 발명의 각종 측면은 범위 포맷으로 제시될 수 있다. 범위 포맷의 설명은 단지 편리함과 간결함을 위한 것이고, 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로서 해석되지 않아야 하는 것으로 이해해야 한다. 따라서, 특정 범위의 설명은 구체적으로 개시된 가능한 모든 아범위뿐만 아니라 그러한 범위 내의 개별적 수치를 갖는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 특정 범위, 예를 들어 1 내지 6의 범위의 설명은 구체적으로 개시된 아범위, 예컨대 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등뿐만 아니라 그러한 범위 내의 개별적 수치, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 또 다른 예로서, 95-99% 동일성과 같은 범위는 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 것을 포함하고, 96 내지 99%, 96 내지 98%, 96 내지 97%, 97 내지 99%, 97 내지 98% 및 98 내지 99% 동일성과 같은 아범위를 포함한다. 이는 상기 범위의 폭에 상관없이 적용된다.

[0120] **설명**

[0121] 항-EGFRvIII 키메라 항원 수용체 (CAR)를 이용하는, 암과 같은 질환의 치료를 위한 사용 방법 및 성분의 조성물이 본원에 제공된다.

[0122] 한 측면에서, 본 발명은 EGFRvIII 단백질과 특이적으로 결합하도록 조작된 항체 또는 항체 단편을 포함하는 수

많은 키메라 항원 수용체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 CAR을 발현하도록 조작된 세포 (예를 들어, T 세포)를 제공하는데, CAR T 세포 ("CART")는 항종양 특성을 나타낸다. 한 측면에서 세포는 CAR로 형질전환시키고, 이러한 CAR은 세포 표면 상에 발현된다. 일부 실시양태에서, 세포 (예를 들어, T 세포)는 CAR을 코딩하는 바이러스성 벡터로 형질도입한다. 일부 실시양태에서, 바이러스성 벡터는 레트로바이러스성 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스성 벡터는 렌티바이러스성 벡터이다. 이러한 일부 실시양태에서, 세포는 CAR을 안정적으로 발현할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 (예를 들어, T 세포)는 CAR을 코딩하는 핵산, 예를 들어 mRNA, cDNA, DNA로 형질감염시킨다. 이러한 일부 실시양태에서, 세포는 CAR을 일시적으로 발현할 수 있다.

[0123] 한 측면에서, CAR의 EGFRvIII 단백질 결합성 부분은 scFv 항체 단편이다. 한 측면에서, 상기 항체 단편은 이들이 등가의 결합 친화성을 보유하고 있다는 점에서, 예를 들어 항원이 유래되는 IgG 항체와, 거의 동등한 수준의 효능을 지닌 동일한 항원과 결합한다는 점에서 기능적이다. 한 측면에서, 상기 항체 단편은 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 면역 반응의 활성화, 그의 표적 항원으로부터의 신호-변환 유래의 억제, 키나제 활성의 억제 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않을 수 있는 생물학적 반응을 제공한다는 점에서 기능적이다.

[0124] 한 측면에서, CAR의 EGFRvIII 항원 결합 도메인은 무린 scFv 항체 단편이다. 또 다른 측면에서, CAR의 EGFRvIII 항원 결합 도메인은, 그것이 유래되는 scFv의 무린 서열과 비교해서 인간화되는 scFv 항체 단편이다. EGFRvIII에 대항하여 예시되는 무린 모노클로날 항체 (3C10)의 생성은 문헌 [Okamoto et al., British J. Cancer 1996, 73:1366-1372]에 개시되어 있다. EGFRvIII에 대항하여 예시되는 완전 인간 항체 (139)는 본원에 참조로 포함된 문헌 [Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy, 23:1043-1953]에 개시되어 있다. 한 측면에서, 무린 서열에 대한 scFv는 서열 11을 포함한다. 이러한 마우스 scFv의 인간화는 임상 환경을 위해 요망될 수 있는데, 마우스-특이적 잔기는 EGFRvIII 치료, 예를 들어 EGFRvIII 구축물로 형질도입된 T 세포로의 치료를 받고 있는 환자에서 인간-항-마우스 항원 (HAMA) 반응을 유도시킬 수 있다.

[0125] 한 측면에서, CAR의 항-EGFRvIII 결합 도메인 부분은, 그의 서열을 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화시킨 트랜스진에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 본 발명의 전체 CAR 구축물은, 그의 전체 서열을 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화시킨 트랜스진에 의해 코딩된다. 코돈 최적화는 코딩 DNA에서의 동의 코돈 (즉, 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈)의 발생 빈도가 상이한 종에서 편재된다는 발견을 지칭한다. 이러한 코돈 축중(degeneracy)으로 인해 동일한 폴리펩이드가 각종 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다. 각종 코돈 최적화 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 적어도 미국 특허 번호 5,786,464 및 6,114,148에 개시된 방법을 포함한다.

[0126] 한 측면에서, CAR의 항-EGFRvIII 결합 도메인은 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38에 제공된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 44에 제공된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 50에 제공된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 56에 제공된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 62에 제공된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 68에 제공된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 74에 제공된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 80에 제공된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 86에 제공된 scFv 부분을 포함한다.

[0127] 한 측면에서, 본원에 개시된 CAR은 세포내 신호전달 도메인을 수반한 특이적 항체의 항원 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 쇄, 4-1BB 및 CD28 신호전달 모듈 및 그의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0128] 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 EGFRvIII과 결합한다. 한 측면에서, CAR은 서열 43에 제공된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 서열 49에 제공된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 서열 55에 제공된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 서열 61에 제공된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 서열 67에 제공된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 서열 73에 제공된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 서열 79에 제공된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 서열 85에 제공된 서열을 포함한다.

[0129] 한 측면에서, CAR은 CD137 (4-1BB) 신호전달 도메인, CD28 신호전달 도메인, CD3제타 신호 도메인, 및 그의 모든 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 CD137 (4-1BB) 또는 CD28, CD3제타 신호 도메인, 및 그의 모든 조합물 이외의 하나 이상의 공동자극성 분자(들)의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

- [0130] 더욱이, 본 발명은 CAR 조성물 및 그의 의약에 있어서의 용도, 또는 특히, EGFRvIII을 발현하는 세포 또는 조직을 포함하는 질환, 암 또는 모든 악성 종양 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0131] 본 발명은 또한, 예를 들어 CAR-발현성 세포, 예를 들어, T 세포에서 miR-17-92를 과발현하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 한 측면에서, miR-17-92의 트랜스진-유래된 과발현은 종양-유도된 면역억제 및 화학요법에 대항하여 개선된 저항성을 지닌 CAR-형질도입된 T-세포를 제공함으로써, 장시간 지속되는 치료 효과를 증진시킨다.
- [0132] **키메라 항원 수용체 (CAR)**
- [0133] 본 발명은 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 DNA 구축물을 포괄하는데, 이러한 CAR은 EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 항체 단편, 예를 들어 EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 인간 항체 단편을 포함한다. 한 측면에서, EGFRvIII은 인간 EGFRvIII이고, 항체 단편을 코딩하는 핵산 서열은, 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열과 연속되고, 이러한 핵산 서열과 동일한 판독 프레임 내에 있다. 세포내 신호전달 도메인은 공동자극성 신호전달 도메인 및/또는 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 제타 쇄를 포함할 수 있다. 공동자극성 신호전달 도메인은 공동자극성 분자의 세포내 도메인의 적어도 일부를 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다.
- [0134] 구체적 측면에서, 본 발명의 CAR 구축물은 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 scFv 도메인을 포함하며, 이러한 scFv는 서열 13에 제공된 바와 같은 임의의 리더 서열이 선행될 수 있고, 그 다음에 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108에 제공된 바와 같은 임의의 힌지 서열, 서열 15에 제공된 바와 같은 막횡단 영역, 서열 16 또는 서열 102를 포함하는 세포내 신호전달 도메인, 및 서열 17 또는 서열 99를 포함하는 CD3 제타 서열이 배열될 수 있으며, 상기 도메인들은 단일 융합 단백질을 형성하기 위하여 연속되고 동일한 판독 프레임 내에 있다. 또한, 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 각각의 scFv 단편, 및 서열 13 내지 17의 각각의 도메인의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 본 발명에 포함된다. 또한, 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 각각의 scFv 단편, 및 서열 13 내지 16 및 서열 99의 각각의 도메인의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 본 발명에 포함된다. 한 측면에서, EGFRvIII CAR 구축물은 임의의 리더 서열, EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막횡단 도메인, 및 세포내 자극 도메인을 포함한다. 한 측면에서, EGFRvIII CAR 구축물은 임의의 리더 서열, EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막횡단 도메인, 및 공동자극 도메인과 일차 자극 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 인간화 scFv 도메인을 함유하는 특이적 EGFRvIII CAR 구축물은 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85, 및 서열 90에 제공된다. 무린 scFv 도메인을 함유하는 특이적 EGFRvIII CAR 구축물은 서열 1 및 서열 2에 제공된다.
- [0135] 예시되는 리더 서열은 서열 13으로서 제공된다. 예시되는 힌지/스페이서 서열은 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108로서 제공된다. 예시되는 막횡단 도메인 서열은 서열 15로서 제공된다. 4-1BB 단백질의 공동자극 도메인의 예시되는 서열은 서열 16으로서 제공된다. CD27 단백질의 공동자극 도메인의 예시되는 서열은 서열 102로서 제공된다. CD3제타 도메인 서열의 예시되는 일차 신호전달 도메인은 서열 17로서 제공된다. CD3제타 도메인 서열의 또 다른 예시되는 일차 신호전달 도메인은 서열 99로서 제공된다.
- [0136] 한 측면에서, 본 발명은 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 핵산 구축물을 포괄하는데, 이러한 핵산 분자는 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열과 연속되고, 이러한 핵산 서열과 동일한 판독 프레임 내에 존재하는, 예를 들어 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86 중 하나 이상으로부터 선택된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 39, 서열 45, 서열 51, 서열 57, 서열 63, 서열 69, 서열 75, 서열 81, 및 서열 98로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 제공된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 39에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인 서열 45에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 51에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 57에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 63에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 69에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 75에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 81에 의해 코딩된다.
- [0137] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명은 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 핵산 구축물을 포괄하는데, 이

러한 핵산 분자는 서열 42, 서열 48, 서열 54, 서열 60, 서열 66, 서열 72, 서열 78, 서열 84, 및 서열 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-EGFRvIII 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 서열은 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열과 연속되고, 이러한 핵산 서열과 동일한 판독 프레임 내에 존재한다. CAR에 사용될 수 있는 예시되는 세포내 신호전달 도메인은, 예를 들어 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에, CAR은 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 세포내 신호전달 도메인의 모든 조합을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 핵산 구축물은 서열 42를 포함한다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 48이다. 한 측면에서, 핵산 구축물은 서열 54를 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물은 서열 60을 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물은 서열 66을 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물은 서열 72를 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물은 서열 78을 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물은 서열 84를 포함한다.

[0138] 목적하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 당해 분야에 공지된 재조합 방법을 이용하여, 예컨대 예를 들어, 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝하거나, 상기를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 유전자를 유도시키거나, 또는 표준 기술을 이용하여 상기를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 분리함으로써 획득할 수 있다. 또 다른 한편으로, 관심 핵산을 클로닝하기 보다는 합성적으로 생성시킬 수 있다.

[0139] 본 발명은 세포 내로 직접적으로 형질도입시킬 수 있는 CAR을 발현하는 레트로바이러스성 및 렌티바이러스성 벡터 구축물을 포함한다.

[0140] 본 발명은 또한, 세포 내로 직접적으로 형질감염시킬 수 있는 RNA 구축물을 포함한다. 형질감염에 사용하기 위한 mRNA를 생성시키는 방법은 특이적으로 설계된 프라이머를 이용하여 주형을 시험관내 전사 (IVT)한 다음, 폴리A를 부가하여, 3' 및 5' 비번역 서열 ("UTR"), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 유입 부위 (IRES), 발현시키고자 하는 핵산, 및 폴리A 꼬리 (전형적으로, 길이가 50 내지 2000개 염기이다)를 함유하는 구축물을 생성시키는 것을 포함한다. 이로써 생성된 RNA는 상이한 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 주형은 CAR에 대한 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, RNA CAR 벡터는 전기천공에 의해 T 세포 내로 형질도입한다.

[0141] 항원 결합 도메인

[0142] 한 측면에서, 본 발명의 CAR은 항원 결합 도메인으로서 달리 지칭된 표적-특이적 결합성 요소를 포함한다. 부분의 선택은 표적 세포의 표면을 규정하는 리간드의 유형과 수에 좌우된다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 특별한 질환 상태와 연관된 표적 세포 상의 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서, 본 발명의 CAR 내의 항원 결합 도메인에 대한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예는 바이러스성, 박테리아성 및 기생충 감염, 자가면역 질환 및 암 세포와 연관된 것을 포함한다.

[0143] 한 측면에서, CAR-매개된 T-세포 반응은 목적 항원과 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 조합함으로써 관심 항원을 CAR 내로 지시할 수 있다.

[0144] 한 측면에서, 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR의 부분은 EGFRvIII을 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 인간 EGFRvIII을 표적으로 한다. 예를 들어, 마우스 모노클로날 항체 (IgG2b) 3C10는 마우스를, EGFRvIII-특이적 융합 연결부를 포함한 14개 아미노산 펩티드 (LEEKKGNYVTDHC; 서열 101)로 면역시킴으로써 EGFRvIII에 대항하여 생성시켰는데, 야생형 EGFR과의 검출 가능한 결합 없이 EGFRvIII을 고도로 특이적으로 인식하는 것으로 입증되었다 [Okamoto et al., British J. Cancer 1996, 73:1366-1372]. 따라서, 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 아미노산 서열, 예를 들어 EGFRvIII 융합 연결부 도메인 내에 글리신 잔기가 부가된 아미노산 서열을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 서열 101의 아미노산 서열 내의 하나 이상의 아미노산 서열을 표적으로 한다.

[0145] 항원 결합 도메인은 항원과 결합하는 어떠한 도메인일 수도 있는데, 이는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 재조합 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 및 그의 기능적 단편을 포함하지만, 이에 제한되지 않고, 기능적 단편은 단일-도메인 항체, 예컨대 중쇄 가변 도메인 (VH), 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 카멜리드 유래된 나노바디의 가변 도메인 (VHH), 및 항원 결합 도메인으로서 기능하는 것으로 당해 분야에 공지된 대체 스캐폴드(scaffold), 예컨대 재조합 피브로넥틴 도메인 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에, 항원 결합 도메인은, CAR이 궁극적으로 사용될 것인 동일한 종으로부터 유래되는 것이 유익하다. 예를 들어, 인간에게 사용하는 경우, CAR의 항원 결합 도메인이 항체 또는 항체 단편의 항원 결합 도메인에 대한 인간 또는 인간화 잔기를 포함하는 것이 유익할 수 있다.

- [0146] 따라서, 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 인간 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 또 다른 측면에서, 항원 결합 도메인은 인간화 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 1개, 2개, 또는 3개 모두); 및 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 1개, 2개, 또는 3개 모두)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원에 기재된 경쇄 가변 영역 및/또는 본원에 기재된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역, 예를 들어 본원에 기재된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 scFv이다. 특정 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 본원에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 본원에 제공된 아미노산 서열과 85 내지 99% (예를 들어, 90 내지 99%, 또는 95-99%) 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 본원에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개 이상의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30개, 20개 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 본원에 제공된 아미노산 서열과 85 내지 99% (예를 들어, 90 내지 99%, 또는 95-99%) 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR은 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85, 및 서열 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열로부터 선택된다.
- [0147] 일부 측면에서, 비-인간 항체는 인간화되는데, 항체의 특이적 서열 또는 영역은 인간에서 자연적으로 생성된 항체 또는 그의 단편과의 유사성을 증가시키도록 변형된다. 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 인간화된다.
- [0148] 인간화 항체는 CDR-이식화 (예를 들어, 유럽 특허 번호 EP 239,400; 국제 공개 번호 WO 91/09967; 및 미국 특허 번호 5,225,539, 5,530,101, 및 5,585,089 참조; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다), 화장관 만들기 또는 재포장하기 (예를 들어, 유럽 특허 번호 EP 592,106 및 EP 519,596; 문헌 [Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498]; [Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814]; 및 [Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973] 참조; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다), 연쇄 셔플링 (shuffling) (예를 들어, 미국 특허 번호 5,565,332 참조; 그 전문이 본원에 참조로 포함된다), 및 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2005/0042664, 미국 특허 출원 공개 번호 US2005/0048617, 미국 특허 번호 6,407,213, 미국 특허 번호 5,766,886, 국제 공개 번호 WO 9317105; 문헌 [Tan et al., 2002, J. Immunol., 169:1119-25]; [Caldas et al., 2000, Protein Eng., 13(5):353-60]; [Morea et al., 2000, Methods, 20:267-79]; [Baca et al., 1997, J. Biol. Chem., 272:10678-84]; [Roguska et al., 1996, Protein Eng., 9(10):895-904]; [Couto et al., 1995, Cancer Res., 55:5973s-5977]; [Couto et al., 1995, Cancer Res., 55(8):1717-22]; [Sandhu 1994 Gene, 150(2):409-10]; 및 [Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol., 235(3):959-73]; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 개시된 기술을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 당해 분야에 공지된 각종 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 종종, 프레임워크 영역 내의 프레임워크 잔기는 항원 결합성을 변경시키기 위하여, 예를 들어 개선시키기 위하여, CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환될 것이다. 이들 프레임워크 치환은 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 확인되는데, 예를 들어 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 CDR과 프레임워크 잔기의 상호 작용의 모델링, 및 특별한 위치에서의 색다른 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인된다 (예를 들어, Queen et al., 미국 특허 번호 5,585,089; 및 문헌 [Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323] 참조; 이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다).
- [0149] 인간화 항체 또는 항체 단편은 비인간인 공급원으로부터 그 안에 남아있는 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종, "유입" 잔기로서 지칭되는데, 이는 전형적으로, "유입" 가변 도메인으로부터 취한다. 본원에 제공된 바와 같이, 인간화 항체 또는 항체 단편은 비인간 이뮤노글로불린 분자로부터의 하나 이상의 CDR, 및 프레임워크 영역을 포함하며, 이러한 프레임워크를 차지하는 아미노산 잔기는 완전히 또는 대개 인간 생식세포계로부터 유래된다. 항체 또는 항체 단편을 인간화하는 다수의 기술이 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 이는 본질적으로, 인간 항체의 CDR 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환시킴으로써, 즉 CDR-이식화 (EP 239,400; PCT 공개 번호 WO 91/09967; 및 미국 특허 번호 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640; 이들 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다)함으로써, 윈터(Winter)와

그 동료의 방법 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라서 수행할 수 있다. 이러한 인간화 항체 및 항체 단편에서는, 실질적으로 온전한 인간 가변 도메인이 아닌 것을 비인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환시켰다. 인간화 항체는 종종, 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 프레임워크 (FR) 잔기를 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기에 의해 치환시킨 인간 항체이다. 항체 및 항체 단편의 인간화는 또한, 화장관 만들기 또는 재포장하기 (EP 592,106 및 EP 519,596; 문헌 [Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498]; [Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994)]; 및 [Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)]), 또는 연쇄 서플링 (미국 특허 번호 5,565,332) (이들 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 의해 달성할 수 있다.

[0150] 인간화 항체를 제조하는데 사용될, 경쇄와 중쇄 둘 다의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 저하시키기 위한 것이다. 소위 "최량 적합 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대항하여 스크리닝한다. 이어서, 설치류 항체의 서열에 가장 근접한 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 (FR)로서 허용한다 (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987); 이들 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특별한 아군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특별한 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크를 여러 개의 상이한 인간화 항체에 사용할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조; 이들 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다).

[0151] 일부 측면에서, 항체 단편을 포함하는 본 발명의 CAR 조성물의 일부는 표적 항원에 대한 고 친화성을 보존하고 다른 유리한 생물학적 특성을 지니면서 인간화된다. 본 발명의 한 측면에 따라서, 인간화 항체 및 항체 단편은 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 각종 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 입수 가능하고, 통상의 기술자에게 친숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 예상되는 3차원 입체 형태적 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 입수 가능하다. 이들 디스플레이를 검사하여, 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서의 잔기의 예상 역할을 분석할 수 있는데, 예를 들어 표적 항원과 결합할 수 있는 후보 이뮤노글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 수용자 및 유입 서열로부터 선별하고 합하여, 목적하는 항체 또는 항체 단편 특징, 예컨대 표적 항원에 대한 친화성 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합성에 영향을 미치는 데 직접적이고도 가장 실질적으로 관여한다.

[0152] 한 측면에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은, 예를 들어 Fv, Fab, 또는 (Fab')₂, 또는 이-관능성 (예를 들어, 이중-특이적) 혼성체 항체이다 (예를 들어, 문헌 [Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)]). 한 측면에서, 본원에 제공된 항체 단편은 scFv이다. 한 측면에서, scFv는 EGFRvIII 단백질과 결합하지만, 야생형 EGFR과는 그렇지 못하다. 일부 경우에, 인간 scFv는 효모 디스플레이 라이브러리로부터 유래될 수도 있다.

[0153] 일부 경우에, scFv는 당해 분야에 공지된 방법에 따라서 제조할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., (1988) Science 242:423-426] 및 [Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조). ScFv 분자는 가요성 폴리펩티드 링커를 이용하여 VH 영역과 VL 영역을 함께 연결함으로써 생성시킬 수 있다. scFv 분자는 최적화된 길이 및/또는 아미노산 조성을 갖는 링커 (예를 들어, Ser-Gly 링커)를 포함한다. 링커 길이는 scFv의 가변 영역이 폴딩하고 상호 작용하는 방식에 상당한 영향을 미칠 수 있다. 사실상, 짧은 폴리펩티드 링커가 이용된 경우 (예를 들어, 5 내지 10개 아미노산), 쇠내 폴딩이 방지된다. 기능적 에피토프 결합 부위를 형성하기 위하여 상기 두 가변 영역을 합치기 위해서는 쇠간 폴딩이 또한 요구된다. 링커 배향과 크기의 예에 관해서는, 예를 들어 다음 문헌을 참조할 수 있다 [Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, 및 PCT 공개 번호 WO2006/020258 및 WO2007/024715; 본원에 참조로 포함된다].

[0154] scFv는 그의 VL 영역과 VH 영역 사이에 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과인 아미노산 잔기의 링커를 포함할 수 있다. 이러한 링커 서열은 어떠한 자연 발생적 아미노산도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 아미노산 글리신 및 세린을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 링커 서열은 글리신 및 세린 반복 서열의 세트, 예컨대 (Gly₄Ser)_n (서열 37) (여기서, n은 1 이상의 양성 정수이다)를 포함한다. 한 실시양태에서, 링커는 (Gly₄Ser)₄ (서열 113) 또는 (Gly₄Ser)₃ (서열 114)일 수 있다. 링커 길이 상의 변동은 활성을 보유하거나 증강시켜, 활성 연구에서 탁

월한 효능을 초래할 수 있다.

[0155] 안정성 및 돌연변이

[0156] 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv 분자 (예를 들어, 가용성 scFv)의 안정성은 통상적인 대조군 scFv 분자 또는 전장 항체의 생물물리학적 특성 (예를 들어, 열 안정성)을 참조로 하여 평가할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간화 scFv는 본원에 언급된 검정에서 대조군 결합성 분자 (예를 들어, 통상적인 scFv 분자) 보다 약 0.1℃, 약 0.25℃, 약 0.5℃, 약 0.75℃, 약 1℃, 약 1.25℃, 약 1.5℃, 약 1.75℃, 약 2℃, 약 2.5℃, 약 3℃, 약 3.5℃, 약 4℃, 약 4.5℃, 약 5℃, 약 5.5℃, 약 6℃, 약 6.5℃, 약 7℃, 약 7.5℃, 약 8℃, 약 8.5℃, 약 9℃, 약 9.5℃, 약 10℃, 약 11℃, 약 12℃, 약 13℃, 약 14℃, 또는 약 15℃ 초과하는 열 안정성을 갖는다.

[0157] 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 개선된 열 안정성을 연속해서, 전체 EGFRvIII CAR 구축물에 부여하면, EGFRvIII CAR 구축물의 치료 특성이 개선된다. 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 열 안정성은 통상적인 항체와 비교해서 약 2℃ 또는 3℃ 이상 개선될 수 있다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 통상적인 항체와 비교해서 1℃ 개선된 열 안정성을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 통상적인 항체와 비교해서 2℃ 개선된 열 안정성을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 통상적인 항체와 비교해서 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15℃ 개선된 열 안정성을 갖는다. 예를 들어, 본원에 개시된 scFv 분자와, scFv VH 및 VL이 유래되는 항체의 scFv 분자 또는 Fab 단편 간을 비교할 수 있다. 열 안정성은 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, T_m을 측정할 수 있다. T_m을 측정하는 방법, 및 단백질 안정성을 결정하는 기타 방법이 다음에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0158] scFv 상의 돌연변이 (가용성 scFv의 인간화 또는 직접 돌연변이 유발을 통하여 유발됨)는 scFv의 안정성을 변경시키고, scFv 및 EGFRvIII CAR 구축물의 전반적인 안정성을 개선시킨다. 인간화 scFv의 안정성을, T_m, 온도 변성 및 온도 응집과 같은 측정치를 이용하여 묶인 scFv에 대하여 비교한다. 돌연변이체 scFv의 결합 능력은 본 실시예에 기재된 검정을 이용하여 결정할 수 있다.

[0159] 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 인간화 과정으로부터 발생하는 한 가지 이상의 돌연변이를 포함하므로, 이와 같이 돌연변이된 scFv는 EGFRvIII 구축물에 개선된 안정성을 부여해 준다. 또 다른 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 인간화 과정으로부터 발생하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10가지 이상의 돌연변이를 포함하므로, 이와 같이 돌연변이된 scFv는 EGFRvIII 구축물에 개선된 안정성을 부여해 준다.

[0160] 단백질 안정성을 평가하는 방법

[0161] 항원 결합 도메인의 안정성은, 예를 들어 다음에 기재된 방법을 이용하여 평가할 수 있다. 이러한 방법으로, 다수의 열 전개(unfolding) 전이를 결정할 수 있는데, 안정성이 가장 낮은 도메인이 처음으로 전개되거나 또는 협력해서 전개되는 다도메인 단위 (예를 들어, 단일 전개 전이를 나타내는 다도메인 단백질)의 전반적인 안정성 역치를 제한한다. 안정성이 가장 낮은 도메인은 수많은 부가 방식으로 확인할 수 있다. 돌연변이 유발을 수행하여, 전반적인 안정성을 제한하는 도메인을 프로빙할 수 있다. 부가적으로, 다도메인 단백질의 프로테아제 저항성은, 안정성이 가장 낮은 도메인이 DSC 또는 기타 분광법을 통하여 본질적으로 전개되는 것으로 공지된 조건 하에 수행할 수 있다 [Fontana, et al., (1997) Fold. Des., 2: R17-26; Dimasi et al. (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692]. 일단 안정성이 가장 낮은 도메인이 확인되면, 이러한 도메인 (또는 그의 일부)을 코딩하는 서열을 본 방법에서 시험 서열로서 이용할 수 있다.

[0162] a) 열 안정성

[0163] 조성물의 열 안정성은 당해 분야에 공지된 수많은 비-제한적 생물물리학적 또는 생화학적 기술을 이용하여 분석할 수 있다. 특정의 실시양태에서, 열 안정성은 분석적 분광법에 의해 평가한다.

[0164] 예시되는 분석적 분광 방법은 시차 주사 열량측정법 (DSC)이다. DSC는 대부분의 단백질 또는 단백질 도메인의 전개를 동반하는 열 흡수에 대해 민감한 열량계를 이용한다 (예를 들어, 문헌 [Sanchez-Ruiz, et al., Biochemistry, 27:1648-52, 1988] 참조). 단백질의 열 안정성을 결정하기 위하여, 이러한 단백질의 샘플을 열량계 내로 삽입하고, Fab 또는 scFv가 전개될 때까지 온도를 상승시킨다. 단백질이 전개되는 온도가 전반적인 단백질 안정성을 표시한다.

- [0165] 또 다른 예시되는 분석적 분광 방법은 원편광 이색성 (CD) 분광법이다. CD 분광측정법은 증가 온도의 함수로서의 조성물의 광학 활성을 측정한다. 원편광 이색성 (CD) 분광법은 구조적 비대칭으로 인해 야기되는 좌편광 대 우편광의 흡수 차이를 측정한다. 무질서하거나 전개된 구조로 인해, 정돈되거나 폴딩된 구조의 것과 매우 상이한 CD 스펙트럼이 생긴다. 이러한 CD 스펙트럼은 증가 온도의 변성 효과에 대한 단백질의 민감도를 반영하므로, 단백질의 열 안정성을 표시한다 (문헌 [van Mierlo and Steemsma, J. Biotechnol., 79(3):281-98, 2000] 참조).
- [0166] 열 안정성을 측정하기 위한 또 다른 예시되는 분석적 분광 방법은 형광 방출 분광법이다 (상기 문헌 [van Mierlo and Steemsma] 참조). 열 안정성을 측정하기 위한 또 다른 예시되는 분석적 분광 방법은 핵 자기 공명 (NMR) 분광법이다 (예를 들어, 상기 문헌 [van Mierlo and Steemsma] 참조).
- [0167] 특정 조성물의 열 안정성은 생화학적으로 측정할 수 있다. 열 안정성을 평가하는 것으로 예시되는 생화학적 방법은 열 켈린지 검정이다. "열 켈린지 검정"에서는, 조성물을 특정 범위의 상승 온도에 일정 시간 동안 둔다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 시험 scFv 분자, 또는 scFv 분자를 포함하는 분자를 특정 범위의 증가 온도에, 예를 들어 1 내지 1.5시간 동안 둔다. 이어서, 단백질의 활성을 관련 생화학적 검정에 의해 검정한다. 예를 들어, 이러한 단백질이 결합성 단백질 (예를 들어, scFv 또는 scFv-함유 폴리펩티드)인 경우, 그 결합성 단백질의 결합 활성은 기능적 또는 정량적 ELISA에 의해 결정할 수 있다.
- [0168] 상기 검정은 이. 콜라이 (*E. coli*) 및 고 처리량 스크리닝을 이용하여 고 처리량 포맷 및 본 실시예에 개시된 포맷으로 수행할 수 있다. 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv, 변이체의 라이브러리는 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 창출시킬 수 있다. 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv, 발현을 유도시킬 수 있고, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv를 열 켈린지시킬 수 있다. 이와 같이 켈린지된 시험 샘플을 대상으로 하여, 결합에 관하여 검정할 수 있고, 안정한 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv를 확대하여, 추가로 명확히 규명할 수 있다.
- [0169] 열 안정성은 상기 기술 중 어느 것 (예를 들어, 분석적 분광 기술)을 이용하여 조성물의 용점 (T_m)을 측정함으로써 평가한다. 용점은 조성물의 분자의 50%가 폴딩된 상태에 있는 열 전이 곡선의 중간점에 있는 온도이다 (예를 들어, 문헌 [Dimasi et al. (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692] 참조). 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv에 대한 T_m 값은 약 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C이다. 한 실시양태에서, IgG에 대한 T_m 값은 약 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C이다. 한 실시양태에서, 다가 항체에 대한 T_m 값은 약 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C이다.
- [0170] 열 안정성은 또한, 분석적 열량측정 기술 (예를 들어, DSC)을 이용하여 조성물의 비열 또는 열 용량 (C_p)을 측정함으로써 평가한다. 조성물의 비열은 1몰의 물의 온도를 1°C씩 상승시키는 데 요구되는 에너지 (예를 들어, kcal/mol)이다. 큰 C_p 가 변성되거나 불활성인 단백질 조성물의 특징이기 때문이다. 조성물의 열 용량 상의 변화 (ΔC_p)는 그의 열 전이 전 및 후의 조성물의 비열을 결정함으로써 측정한다. 열 안정성은 또한, 전개의 깁스(Gibbs) 자유 에너지 (ΔG), 전개의 엔탈피 (ΔH), 또는 전개의 엔트로피 (ΔS)를 포함한 열역학적 안정성의 기타 파라미터를 측정 또는 결정함으로써 평가할 수 있다. 상기 생화학적 검정 중 한 가지 이상 (예를 들어, 열 켈린지 검정)을 이용하여, 조성물의 50%가 그의 활성 (예를 들어, 결합 활성)을 보유하고 있는 온도 (즉, T_c 값)를 결정한다.
- [0171] 또한, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv에 대한 돌연변이는 돌연변이되지 않은 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv와 비교해서 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 열 안정성을 변경시킨다. 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv를 항-EGFRvIII CAR 구축물 내로 혼입하는 경우, 항-EGFRvIII 결합

도메인, 예를 들어 인간화 scFv는 전반적인 항-EGFRvIII CAR 구축물에 열 안정성을 부여한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv에 열 안정성을 부여해 주는 단일 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv에 열 안정성을 부여해 주는 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv에서의 다수의 돌연변이는 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 열 안정성에 대한 부가 효과를 지니고 있다.

[0172] b) % 응집

[0173] 조성물의 안정성은 응집하려고 하는 그의 경향을 측정함으로써 결정될 수 있다. 응집은 수많은 비-제한적 생화학적 또는 생물물리학적 기술에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 조성물의 응집은 크로마토그래피, 예를 들어 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)를 이용하여 평가할 수 있다. SEC는 크기를 기준으로 하여 분자를 분리시킨다. 칼럼에 중합체성 겔의 반고체 비드를 채우는데, 이는 이온과 소분자는 그의 내부 내로 허용하지만 대분자는 그렇지 못하다. 단백질 조성물을 칼럼 상부에 적용하는 경우, 조밀하고 폴딩된 단백질 (즉, 응집되지 않은 단백질)은 큰 단백질 응집체에 이용 가능하기보다는 더 큰 용적의 용매를 통하여 분배된다. 결과적으로, 큰 응집체는 칼럼을 통하여 보다 신속하게 이동되고, 이러한 방식으로 혼합물은 그의 성분으로 분리되거나 분획화될 수 있다. 각 분획이 겔로부터 용출됨에 따라, 이러한 분획을 별개로 정량화할 수 있다 (예를 들어, 광 산란에 의해 수행된다). 따라서, 조성물의 % 응집은 특정 분획의 농도를, 겔에 적용된 단백질의 총 농도와 비교함으로써 결정할 수 있다. 안정한 조성물은 본질적으로 단일 분획으로서 상기 칼럼으로부터 용출되고, 용출 프로파일 또는 크로마토그램에서 거의 단일 피크로서 나타난다.

[0174] c) 결합 친화도

[0175] 조성물의 안정성은 그의 표적 결합 친화도를 결정함으로써 평가할 수 있다. 결합 친화도를 결정하는 광범위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 결합 친화도를 결정하는 것으로 예시되는 방법은 표면 플라즈몬 공명을 이용한다. 표면 플라즈몬 공명은, 예를 들어 비아코어(BIAcore) 시스템 [파마시아 바이오센서 AB (Pharmacia Biosensor AB; 스웨덴 웁살라 및 미국 뉴저지주 피스카타웨이)]을 이용하여 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도 상의 변경을 검출함으로써 실시간 생체특이적 상호 작용을 분석할 수 있게 해주는 광학 현상이다. 추가 설명에 관해서는, 다음 문헌을 참조할 수 있다 (문헌 [Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26]; [Jonsson, U., i (1991) Biotechniques 11:620-627]; [Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131]; 및 [Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277]).

[0176] 한 측면에서, CAR의 항원 결합 도메인은 본원에 기재된 항원 결합 도메인 아미노산 서열과 상동성인 아미노산 서열을 포함하고, 이러한 항원 결합 도메인은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 항체 단편의 목적하는 기능적 특성을 보유하고 있다. 한 특이적 측면에서, 본 발명의 CAR 조성물은 항체 단편을 포함한다. 추가 측면에서, 그러한 항체 단편은 scFv를 포함한다.

[0177] 각종 측면에서, CAR의 항원 결합 도메인은 하나 또는 양 가변 영역 (예를 들어, VH 및/또는 VL) 내의, 예를 들어 하나 이상의 CDR 영역 내의 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역 내의 1개 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 조작한다. 한 구체적 측면에서, 본 발명의 CAR 조성물은 항체 단편을 포함한다. 추가 측면에서, 그러한 항체 단편은 scFv를 포함한다.

[0178] 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 추가로 변형시켜, 이들이 아미노산 서열 (예를 들어, 야생형으로부터의 아미노산 서열) 면에서는 다양해지지만 목적하는 활성 면에서는 그렇지 않다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 예를 들어, "비-필수" 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환을 초래하는 부가의 뉴클레오티드 치환이 단백질에 대해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 분자 내의 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 계열로부터의 또 다른 아미노산 잔기로 대체시킬 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 일련의 아미노산을, 측쇄 계열 구성원의 순서 및/또는 조성 면에서 상이한 구조상 유사한 일련의 아미노산으로 대체시킬 수 있는데, 예를 들어 특정 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체시키는 보존적 치환을 수행할 수 있다.

[0179] 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 계열은 당해 분야에 정의되었는데, 이는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소루이신) 및 방향족

측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다.

[0180] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 맥락에서 % 동일성은 동일한 2개 이상의 서열을 지칭한다. 비교 원도우 전반에 걸쳐, 또는 다음 서열 비교 알고리즘 중 하나를 이용하여 측정된 바와 같은 지명된 영역 전반에 걸쳐, 또는 수동 정렬과 가시적 검사에 의해 최대 상응도를 위해 비교 및 정렬되는 경우, 두 서열이 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 명시된 비율(%) (예를 들어, 명시된 영역 전반에 걸쳐, 또는 명시되지 않은 경우에는, 전체 서열에 걸쳐 60% 동일성, 임의로 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성)을 갖는다면, 이러한 두 서열은 "실질적으로 동일하다". 임의로, 동일성은 길이가 적어도 약 50개 뉴클레오타이드 (또는 10개 아미노산)인 영역 전반에 걸쳐, 또는 보다 바람직하게 길이가 100 내지 500개 또는 1000개 또는 그 초과 뉴클레오타이드 (또는 20, 50, 200개 또는 그 초과 아미노산)인 영역 전반에 걸쳐 존재한다.

[0181] 서열 비교를 위해, 전형적으로 1개 서열이 참조 서열로서 작용하는데, 이를 시험 서열과 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 이용하는 경우에는, 시험 서열과 참조 서열을 컴퓨터 내로 입력하고, 필요한 경우 아서열 좌표를 설계하며, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 설계한다. 디폴트 프로그램 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 대체 파라미터를 설계할 수 있다. 이때, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터를 근거로 하여, 참조 서열과 비교해서 시험 서열에 대한 % 서열 동일성을 계산한다. 비교를 위해 서열을 정렬하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 비교를 위해 서열을 최적으로 정렬하는 것은, 예를 들어 문헌 [Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444]의 유사성 방법에 관한 조사에 의해, 이들 알고리즘 [GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA; 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지, 제네틱스 컴퓨터 그룹 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group; 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 닥터 575)]의 컴퓨터 이행에 의해, 또는 수동 정렬과 가시적 검사에 의해 (예를 들어, 문헌 [Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology] 참조) 수행할 수 있다.

[0182] % 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하는 데 적합한 알고리즘의 2가지 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이며, 이는 문헌 ([Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402]; 및 [Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410])에 각각 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터를 통하여 공개적으로 입수 가능하다.

[0183] 두 아미노산 서열 간의 % 동일성은 또한, PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 이용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입시킨 문헌 [E. Meyers and W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17]의 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다. 또한, 두 아미노산 서열 간의 % 동일성은 Blossom (Blossom) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 이용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (www.gcg.com에서 입수 가능함) 내의 GAP 프로그램 내로 혼입시킨 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453] 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다.

[0184] 한 측면에서, 본 발명은 기능상 등가의 분자를 생성시키는 출발 항체 또는 단편 (예를 들어, scFv) 아미노산 서열의 변형을 고려한다. 예를 들어, CAR에 포함된 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 VH 또는 VL은 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 출발 VH 또는 VL 프레임워크 영역의 적어도 약 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 보유하도록 변형될 수 있다. 본 발명은 기능상 등가의 분자를 생성하기 위하여, 전체 CAR 구축물의 변형, 예를 들어 CAR 구축물의 각종 도메인의 하나 이상의 아미노산 서열 내에서의 변형을 고려한다. 이러한 CAR 구축물은 출발 CAR 구축물의 적어도 약 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 보유하도록 변형될 수 있다.

[0185] **막횡단 도메인**

[0186] 막횡단 도메인과 관련하여, 각종 실시양태에서, CAR은 이러한 CAR의 세포의 도메인에 부착되는 막횡단 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 막횡단 도메인은 막횡단 영역에 인접한 하나 이상의 부가 아미노산, 예를 들어 그로부터 막횡단 도메인이 유래되는 단백질의 세포외 영역과 연관된 하나 이상의 아미노산 (예를 들어, 상기 세포외 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15개 이하의 아미노산) 및/또는 그로부터 막횡단 도메인이 유래되는

단백질의 세포내 영역과 연관된 하나 이상의 부가 아미노산 (예를 들어, 상기 세포내 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15개 이하의 아미노산)을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 사용되는 CAR의 다른 도메인 중 하나와 연관되는 것이다. 일부 경우에, 막횡단 도메인은 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에 대한 상기 도메인의 결합을 피하기 위한, 예를 들어 수용체 복합체의 기타 구성원과의 상호 작용을 최소화하기 위한 아미노산 치환에 의해 선별되거나 변형될 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 CART 세포 표면 상의 또 다른 CAR과 동종-이량체를 형성할 수 있다. 상이한 측면에서, 막횡단 도메인의 아미노산 서열은 동일한 CART에 존재하는 천연 결합 파트너의 결합 도메인과의 상호 작용을 최소화하도록 변형되거나 치환될 수 있다.

[0187] 막횡단 도메인은 자연 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 자연인 경우, 상기 도메인은 어떠한 막-결합된 단백질이나 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 CAR이 표적과 결합될 때마다 세포내 도메인(들)으로 신호전달할 수 있다. 본 발명에서 특별히 사용하기 위한 막횡단 도메인은, 예를 들어 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 적어도 막횡단 영역(들)을 포함할 수 있다.

[0188] 일부 경우에, 막횡단 도메인은 힌지, 예를 들어 인간 단백질로부터의 힌지를 통하여, CAR의 세포의 영역, 예를 들어 CAR의 항원 결합 도메인에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지는 인간 Ig (이뮤노글로불린) 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지, 또는 CD8a 힌지일 수 있다. 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 서열 14의 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이러한 서열로 이루어진다). 한 측면에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 막횡단 도메인을 포함한다 (예를 들어, 이러한 서열로 이루어진다).

[0189] 한 측면에서, 힌지 또는 스페이서는 IgG4 힌지를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 다음 아미노산 서열의 힌지를 포함한다:

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM
(서열 104).

[0190]

[0191] 일부 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 다음 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 힌지를 포함한다:

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGG
ACCCAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA
CCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG
GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
TGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
GGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA
GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (서열 105).

[0192]

[0193] 한 측면에서, 힌지 또는 스페이서는 IgD 힌지를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 다음 아미노산 서열의 힌지를 포함한다:

RWPESPKAQASSVPTAQPPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
KTPECPSTHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG
GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQA
PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG
STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYSYVTDH (서열 106).

[0194]

[0195]

일부 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 다음 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 힌지를 포함한다:

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA
GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT
GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA
GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT
TTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGA
GGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT
CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC
TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG
AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG
ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCC
AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG
CTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC
TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTC
CCATGAAGATAGCAGGACCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACG
TGA CTGACCATT (서열 107).

[0196]

[0197]

한 측면에서, 막횡단 도메인은 재조합될 수 있는데, 이러한 경우 이는 주로 소수성 잔기, 예컨대 루이신 및 발린을 포함할 것이다. 한 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중선이 재조합 막횡단 도메인의 각 말단에서 발견될 수 있다.

[0198]

임의로, 예를 들어 길이가 2 내지 10개 아미노산인 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커는 CAR의 막횡단 도메인과 세포질 영역 간에 연쇄를 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중선이 적합한 링커의 한 예이다. 예를 들어, 한 측면에서, 링커는 GGGSGGGGS (서열 108)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 GGTGGCGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTCC (서열 109)의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다.

[0199]

세포질 도메인

[0200]

CAR의 세포질 도메인 또는 영역은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 신호전달 도메인은 일반적으로, CAR이 도입된 면역 세포의 정상 이펙터 기능 중 한 가지 이상의 활성화에 대해 책임이 있다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 특수 기능을 지칭한다. 예를 들어, T 세포의 이펙터 기능은 시토카인의 분비를 포함한 세포용해 활성화 또는 헬퍼 활성화일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 변환시키고 세포가 특수 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 일부를 지칭한다. 통상적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 이용될 수 있긴 하지만, 많은 경우에 있어서 전체 체를 사용하는 것이 필요하지 않다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 정도로, 이러한 절단된 부분은 온전한 체 대신 사용될 수 있는데, 단 이는 이펙터 기능 신호를 변환시켜야 한다. 따라서, 용어 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 변환시키기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 어떠한 절단된 부분도 포함하는 것을 의미한다.

[0201]

본 발명의 CAR에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 항원 수용체 진입기전 후에 신호 변환을 일체화 개시하는 작용을 하는 공-수용체 및 T 세포 수용체 (TCR)의 세포질 서열뿐만 아니라 이들 서열의 모든 유도체

또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 지닌 모든 재조합 서열을 포함한다.

- [0202] TCR 단독을 통하여 발생된 신호는 T 세포의 완전한 활성화를 위해 불충분하고, 이차 및/또는 공동자극성 신호가 또한 요구되는 것으로 공지되어 있다. 따라서, T 세포 활성화는 2가지 별개 부류의 세포질 신호전달 서열, 즉 TCR을 통한 항원-의존성 일차 활성화를 개시하는 것 (일차 세포내 신호전달 도메인)과, 이차 또는 공동자극성 신호를 제공하기 위해 항원-비의존성 방식으로 작용하는 것 (이차 세포질 신호전달 도메인, 예를 들어 공동자극 도메인)에 의해 매개되는 것으로 여겨질 수 있다.
- [0203] 일차 신호전달 도메인은 TCR 복합체의 일차 활성화를 자극성 방식으로 또는 억제성 방식으로 조절한다. 자극성 방식으로 작용하는 일차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 공지되는 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.
- [0204] 본 발명에서 특별히 사용되는 ITAM 함유 일차 세포내 신호전달 도메인의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d의 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR, 예를 들어 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 및 서열 85로 이루어진 군으로부터 선택된 CAR은 CD3-제타의 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 일차 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 일차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM 도메인, 예를 들어 천연 ITAM 도메인과 비교해서 변경된 (예를 들어, 증가되거나 감소된) 활성을 갖는 돌연변이된 ITAM 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 일차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM-함유 일차 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 최적화된 및/또는 절단된 ITAM-함유 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 일차 신호전달 도메인은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과 ITAM 모티프를 포함한다.
- [0205] CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인 그 자체를 포함할 수 있거나 또는 본 발명의 CAR의 맥락에서 유용한 기타 목적하는 세포내 신호전달 도메인(들)과 조합할 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타쇄 부분 및 공동자극성 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 공동자극성 신호전달 도메인은 공동자극성 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다. 공동자극성 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응을 위해 요구되는 항원 수용체 또는 그의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다. 예를 들어, CD27 공동자극은 시험관내에서 인간 CART 세포의 팽창, 이펙터 기능 및 생존을 증강시키고, 생체내에서 인간 T 세포 영속성과 항종양 활성을 증대시키는 것으로 입증되었다 [Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706].
- [0206] 본 발명의 CAR의 세포질 부분 내의 세포내 신호전달 서열은 서로 무작위 순서 또는 명시된 순서로 연결될 수 있다. 임의로, 예를 들어 길이가 2 내지 10개 아미노산 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산)인 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커는 세포내 신호전달 서열 간에 연쇄를 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 글리신-세린 이중선이 적합한 링커로서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 단일 아미노산, 예를 들어 알라닌, 글리신이 적합한 링커로서 사용될 수 있다.
- [0207] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 5 또는 그 초과 공동자극성 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 5 또는 그 초과 공동자극성 신호전달 도메인은 링커 분자, 예를 들어 본원에 기재된 링커 분자에 의해 분리된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개의 공동자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 분자는 글리신 잔기이다. 일부 실시양태에서, 링커는 알라닌 잔기이다.
- [0208] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인과 CD28의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인과 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, 4-1BB의 신호전달 도메인은 서열 16의 신호전달 도메인이다. 한 측면에서, CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열 17의 신호전달 도메인이다.
- [0209] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인과 CD27의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, CD27의 신호전달 도메인은 QRRKYRSNKGESPVPEAPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (서열 102)의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD27의 신호전달 도메인은 다음 핵산 서열에 의해 코딩된다:

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
GCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA
GCCTATCGCTCC (서열 103).

[0210]

[0211]

한 측면에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 제2의 CAR, 예를 들어 동일한 표적 (EGFRvIII) 또는 상이한 표적에 대한 상이한 항원 결합 도메인을 포함하는 제2의 CAR을 추가로 포함할 수 있다.

[0212]

또 다른 측면에서, 본 발명은 CAR-발현성 세포, 예를 들어 CART 세포의 집단을 제공한다. 일부 실시양태에서, CAR-발현성 세포의 집단은 상이한 CAR을 발현하는 세포의 혼합물을 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, CART 세포의 집단은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 제1 세포; 및 상이한 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 제1 세포에 의해 발현된 CAR 내의 항-EGFRvIII 결합 도메인과 상이한 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, CAR-발현성 세포의 집단은, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 항-EGFRvIII 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제1 세포; 및 EGFRvIII 이외의 표적에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR-발현성 세포의 집단은, 예를 들어 일차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제1 세포; 및 이차 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함한다.

[0213]

또 다른 측면에서, 본 발명은 집단 내의 하나 이상의 세포가 본원에 기재된 항-EGFRvIII 도메인을 갖는 CAR을 발현하고, 제2 세포가 또 다른 작용제, 예를 들어 CAR-발현성 세포의 활성을 증강시키는 작용제를 발현하는, 세포 집단을 제공한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 상기 작용제는 억제성 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 억제성 분자, 예를 들어 PD1은 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 반응을 증가시킬 수 있는 CAR-발현성 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제성 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TGFR 베타를 포함한다.

[0214]

RNA 형질감염

[0215]

시험관내 전사된 RNA CAR을 생성시키는 방법이 본원에 개시되어 있다. 본 발명은 또한, 세포 내로 직접적으로 형질감염될 수 있는 CAR 코딩 RNA 구축물을 포함한다. 형질감염에 사용하기 위한 mRNA를 생성시키는 방법은 특히적으로 설계된 프라이머를 이용하여 주형을 시험관내 전사 (IVT)한 다음, 폴리A를 부가하여, 3' 및 5' 비번역 서열 ("UTR"), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 유입 부위 (IRES), 발현시키고자 하는 핵산, 및 폴리A 꼬리 (전형적으로, 길이가 50 내지 2000개 염기이다) (서열 116)를 함유하는 구축물을 생성시키는 것을 포함할 수 있다. 이로써 생성된 RNA는 상이한 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 한 측면에서, 주형은 CAR에 대한 서열을 포함한다.

[0216]

한 측면에서, EGFRvIII CAR은 메신저 RNA (mRNA)에 의해 코딩된다. 한 측면에서, EGFRvIII CAR을 코딩하는 mRNA는 CART 세포의 생성을 위해 T 세포 내로 도입된다.

[0217]

한 실시양태에서, 시험관내 전사된 RNA CAR은 일시적 형질감염의 형태로서 세포 내로 도입될 수 있다. 상기 RNA는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)-발생된 주형을 이용하여 시험관내 전사에 의해 생성된다. 모든 공급원으로부터의 관심 DNA를 PCR에 의해, 적당한 프라이머 및 RNA 중합효소를 이용하여 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 직접 전환시킬 수 있다. DNA의 공급원은, 예를 들어 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열, 또는 DNA의 다른 적당한 공급원일 수 있다. 시험관내 전사를 위한 목적하는 주형은 본 발명의 CAR이다. 예를 들어, 상기 RNA CAR에 대한 주형은 항-종양 항체의 단일쇄 가변 도메인을 포함하는 세포의 영역; 힌지 영역, 막횡단 도메인 (예를 들어, CD8a의 막횡단 도메인); 및 예를 들어, CD3-제타의 신호전달 도메인과 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함한다.

[0218]

한 실시양태에서, PCR을 위해 사용될 DNA는 개방 판독 프레임을 함유한다. 이러한 DNA는 유기체의 게놈으로부터의 자연 발생적 DNA 서열로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산은 5' 및/또는 3' 비번역 영역 (UTR)의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 핵산은 엑손 및 인트론을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, PCR을 위해 사용될 DNA는 인간 핵산 서열이다. 또 다른 실시양태에서, PCR을 위해 사용될 DNA는 5' 및 3' UTR을 포함한 인간 핵산 서열이다. 상기 DNA는 또 다른 한편으로, 자연 발생적 유기체에서는 정상적으로 발현되지 않는 인공 DNA 서열일 수 있다. 예시되는 인공 DNA 서열은 융합 단백질을 코딩하는 개방 판독 프레임을 형성하기 위해 함께 결합되는 유전자의 일부를 함유하는 것이다. 함께 결합되는 DNA의 일부는 단일 유기체로부터 또는 둘 이상의 유기체로부터 유래될 수 있다.

- [0219] PCR을 이용하여, 형질감염을 위해 사용되는 mRNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성시킨다. PCR을 수행하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는, PCR을 위한 주형으로서 사용될 DNA의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 갖도록 설계된다. 본원에 사용된 바와 같은, "실질적으로 상보적"은 프라이머 서열 내의 염기의 대다수 또는 전부가 상보적이거나, 또는 1개 이상의 염기가 비-상보적이거나 미스매치되는 뉴클레오티드의 서열을 지칭한다. 실질적으로 상보적인 서열은 PCR을 위해 사용된 어닐링 조건 하에 의도된 DNA 표적과 어닐링되거나 혼성화될 수 있다. 상기 프라이머는 DNA 주형의 어느 부분과도 실질적으로 상보적이 되도록 설계할 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함한, 세포에서 정상적으로 전사되는 핵산의 일부 (개방 판독 프레임)를 증폭시키도록 설계할 수 있다. 프라이머는 또한, 특별한 관심 도메인을 코딩하는 핵산의 일부를 증폭시키도록 설계할 수 있다. 한 실시양태에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함한, 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭시키도록 설계한다. PCR에 유용한 프라이머는 당해 분야에 널리 공지되어 있는 합성 방법에 의해 생성시킬 수 있다. "정배향 프라이머"는 증폭시켜야 하는 DNA 서열의 상류에 있는 DNA 주형 상의 뉴클레오티드와 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드의 영역을 함유하는 프라이머이다. "상류"는 코딩 가닥을 기준으로 하여 증폭시키고자 하는 DNA 서열에 대한 위치 5'를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. "역배향 프라이머"는 증폭시켜야 하는 DNA 서열의 하류에 있는 이중 가닥 DNA 주형과 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드의 영역을 함유하는 프라이머이다. "하류"는 코딩 가닥을 기준으로 하여 증폭시키고자 하는 DNA 서열에 대한 위치 3'를 지칭하기 위해 본원에 사용된다.
- [0220] PCR에 유용한 어떠한 DNA 중합효소도 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 시약 및 중합효소는 수많은 공급원으로부터 시판되고 있다.
- [0221] 안정성 및/또는 번역 효율을 증진시킬 수 있는 능력을 지닌 화학적 구조가 사용될 수도 있다. RNA는 바람직하게, 5' 및 3' UTR을 갖는다. 한 실시양태에서, 이러한 5' UTR은 길이가 1개 내지 3000개 뉴클레오티드이다. 코딩 영역에 부가될 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTR의 상이한 영역과 어닐링되는 PCR용 프라이머를 설계하는 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 상이한 방법에 의해 변경시킬 수 있다. 이러한 접근 방식을 이용하여, 통상의 기술자는 전사된 RNA의 형질감염 후 최적의 번역 효율을 달성하는 데 요구되는 5' 및 3' UTR 길이를 변형시킬 수 있다.
- [0222] 5' 및 3' UTR은 관심 핵산에 대한 자연 발생적, 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 또 다른 한편으로, 관심 핵산에 대해 내인성이 아닌 UTR 서열은 이러한 UTR 서열을 정배향 및 역배향 프라이머 내로 혼입시킴으로써 또는 주형의 기타 모든 변형에 의해 가할 수 있다. 관심 핵산에 대해 내인성이 아닌 UTR 서열을 사용하는 것이 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변형시키는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열 내의 AU-풍부 요소가 mRNA의 안정성을 저하시킬 수 있는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 3' UTR은 당해 분야에 널리 공지되어 있는 UTR의 특성에 근거하여 전사된 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택하거나 설계할 수 있다.
- [0223] 한 실시양태에서, 5' UTR은 내인성 핵산의 코작(Kozak) 서열을 함유할 수 있다. 또 다른 한편으로, 관심 핵산에 대해 내인성이 아닌 5' UTR을 상기 언급된 바와 같은 PCR에 의해 가하는 경우, 컨센서스 코작 서열은 상기 5' UTR 서열을 가함으로써 재설계할 수 있다. 코작 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 효율적인 번역을 가능하게 하기 위해 모든 RNA에 요구되는 것으로 여겨지지 않는다. 많은 mRNA에 대한 코작 서열에 관한 요구 사항은 당해 분야에 공지되어 있다. 다른 실시양태에서, 5' UTR은 그의 RNA 게놈이 세포에서 안정적인 RNA 바이러스의 5' UTR일 수 있다. 다른 실시양태에서, mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 지연시키기 위하여 3' 또는 5' UTR 내에 각종 뉴클레오티드 유사체를 사용할 수 있다.
- [0224] 유전자 클로닝에 대한 필요성 없이도 DNA 주형으로부터 RNA의 합성을 가능하게 하기 위해서는, 전사 프로모터를 전사하고자 하는 서열의 상류에 있는 DNA 주형에 부착시켜야 한다. RNA 중합효소에 대한 프로모터로서 기능하는 서열을 정배향 프라이머의 5' 말단에 가하는 경우, 이러한 RNA 중합효소 프로모터는 전사시켜야 하는 개방 판독 프레임의 상류에 있는 PCR 생성물 내로 혼입되어 진다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 T7 중합효소 프로모터이다. 기타 유용한 프로모터는 T3 및 SP6 RNA 중합효소 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오티드 서열은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0225] 바람직한 실시양태에서, mRNA는 세포 내에서의 mRNA의 리보솜 결합, 번역 개시 및 안정성을 결정하는 5' 말단 및 3' 폴리(A) 꼬리 상에 양 캡을 갖는다. 환상 DNA 주형, 예를 들어 플라스미드 DNA 상에서, RNA 중합효소는 진행 세포에서의 발현에 적합하지 않은 장(long) 콘카타머성(concatameric) 생성물을 생성시킨다. 3' UTR의 말단에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사로 인해, 이것이 전사 후에 폴리아데닐화되는 경우에도 진행성 형질감염

에 유효하지 않는 정상 크기의 mRNA가 생성된다.

- [0226] 선형 DNA 주형 상에서는, 파지 T7 RNA 중합효소가 주형의 마지막 염기를 벗어나서 전사체의 3' 말단을 연장시킬 수 있다 [Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)].
- [0227] 폴리A/T 연장물을 DNA 주형 내로 통합시키는 통상적인 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA 내로 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 유발시킬 수 있는데, 이는 박테리아성 세포로부터 수득된 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 다른 일탈로 고도로 오염되는 이유이다. 이로써, 클로닝 과정은 힘들고 시간 소모적일 뿐만 아니라 종종 신뢰할 수 없다. 이는 클로닝을 이용하지 않고 폴리A/T 3' 연장물을 이용하여 DNA 주형을 구축할 수 있는 방법이 고도로 바람직한 이유이다.
- [0228] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 절편은 PCR 동안 폴리T 꼬리, 예컨대 100T 꼬리 (서열 117) (크기는 50 내지 5000 T (서열 118)일 수 있다)를 함유하는 역배향 프라이머를 이용함으로써 생성될 수 있거나, 또는 PCR 후에 다른 어떠한 방법 (DNA 절찰 또는 시험관내 재조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다)에 의해서도 생성될 수 있다. 폴리(A) 꼬리는 또한, RNA에 대한 안정성을 제공하고 그의 분해를 저하시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 꼬리의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 긍정적으로 상관이 있다. 한 실시양태에서, 폴리(A) 꼬리는 100개 내지 5000개의 아데노신 (서열 119)이다.
- [0229] RNA의 폴리(A) 꼬리는 폴리(A) 중합효소, 예컨대 이. 콜라이 폴리A 중합효소 (E-PAP)를 이용하여 시험관내 전사 후에 추가로 연장될 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리(A) 꼬리의 길이를 100개 뉴클레오타이드에서 300개 내지 400개 뉴클레오타이드 (서열 120)로 증가시키면, RNA의 번역 효율이 약 2배 정도 증가된다. 부가적으로, 상이한 화학적 기를 3' 말단에 부착시키면, mRNA 안정성이 증가될 수 있다. 이러한 부착은 변형된/인공 뉴클레오타이드, 앵타머(aptamer) 및 기타 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 폴리(A) 중합효소를 이용하여 ATP 유사체를 폴리(A) 꼬리 내로 혼입할 수 있다. ATP 유사체가 RNA의 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다.
- [0230] 5' 캡이 또한, RNA 분자에 대한 안정성을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 이러한 5' 캡은 당해 분야에 공지되고 본원에 기재된 기술을 이용하여 제공된다 [Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)].
- [0231] 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 또한, 내부 리보솜 유입 부위 (IRES) 서열을 함유할 수 있다. 이러한 IRES 서열은 mRNA에 대한 캡-비의존성 리보솜 결합을 개시하고 번역 개시를 촉진시켜 주는 모든 바이러스성, 염색체성 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 세포 투과성과 생육성을 촉진시켜 주는 인자, 예컨대 당, 펩티드, 지질, 단백질, 항산화제 및 계면활성제를 함유할 수 있는, 세포 전기천공에 적합한 모든 용질이 포함될 수 있다.
- [0232] RNA는 수많은 상이한 방법, 예를 들어 전기천공 [아막사 뉴클레오펙터(Amaxa Nucleofector)-II (아막사 바이오시스템즈 (Amaxa Biosystems; 독일 쾰른))], [ECM 830 (BTX) (하바드 인스트루먼트즈 (Harvard Instruments; 미국 매사추세츠주 보스턴))] 또는 유전자 펄서 (Gene Pulser) II [바이오래드 (BioRad; 미국 콜로라도주 덴버)], 다천공기 (Multiporator) [에펜도르트 (Eppendorf; 독일 함부르크)], 리포펙션을 이용한 양이온성 리포솜 매개된 형질감염, 중합체 피막화, 펩티드 매개된 형질감염, 또는 바이오리스틱(biolistic) 입자 전달 시스템, 예컨대 "유전자 총"을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 시판중인 방법 중 어느 것을 이용하여 표적 세포 내로 도입할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)] 참조).
- [0233] **CAR을 코딩하는 핵산 구축물**
- [0234] 본 발명은 본원에 기재된 하나 이상의 CAR 구축물을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 한 측면에서, 이러한 핵산 분자는 메신저 RNA 전사체로서 제공된다. 한 측면에서, 핵산 분자는 DNA 구축물로서 제공된다.
- [0235] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이며, 상기 CAR은 항-EGFRvIII 결합 도메인 (예를 들어, 인간화 항-EGFRvIII 결합 도메인); 막횡단 도메인; 및 자극 도메인, 예를 들어 공동자극성 신호전달 도메인 및/또는 일차 신호전달 도메인, 예를 들어 제타 쇄를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 본원에 기재된 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 및 서열 80으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항-EGFRvIII 결합 도메인이다. 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 공동자극 도메인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태

에서, 공동자극 도메인은 OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 신호전달 도메인이다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 서열 16의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인이다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인과 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 102의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열, 및 서열 17 또는 서열 99의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 이러한 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열은 동일한 프레임 내에서 단일 폴리펩티드 쇄로서 발현된다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 힌지 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지에 의해 막횡단 도메인에 연결된다. 한 실시양태에서, 힌지 영역은 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0236] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 13의 리더 서열; 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 (또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열)을 갖는 scFv 도메인; 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108 (또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열)의 힌지 영역; 서열 15의 서열 (또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열)을 갖는 막횡단 도메인; 서열 16의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인 또는 서열 102의 서열 (또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열)을 갖는 CD27 공동자극 도메인; 및 서열 17 또는 서열 99의 서열 (또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열)을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함하는 CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0237] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 핵산 분자에 의해 코딩된 단리된 폴리펩티드 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이러한 단리된 폴리펩티드 분자는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85, 및 서열 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 서열 73의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 서열 79의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0238] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-EGFRvIII 결합 도메인; 막횡단 도메인; 및 자극 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR) 분자를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이며, 상기 항-EGFRvIII 결합 도메인은 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0239] 한 실시양태에서, 상기 코딩된 CAR 분자는 공동자극 도메인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 이러한 공동자극 도메인은 OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 신호전달 도메인이다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 서열 16의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇄, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인이다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인과 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16의 서열 및 서열 17의 서열을 포함하며, 이러한 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열은 동일한 프레임 내에서 단일 폴리펩티드 쇄로서 발현된다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인은 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인에 연결된다. 한 실시양태에서, 힌지 영역은 서열 14를 포함한다. 한 실시양태에서, 힌지 영역은 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108을 포함한다.

[0240] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 13의 리더 서열; 서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 서열 80 및 서열 86으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 갖는 scFv 도메인; 서열 14 또는 서열 104 또는 서열 106 또는 서열 108의 힌지 영역; 서열 15의 서열을 갖는 막횡단 도메인; 서열 16의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인 또는 서열 102의 서열을 갖는 CD27 공동자극 도메인; 및 서열 17 또는 서열 99의 서열을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함하는 코딩된 CAR 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 코딩된 CAR 분자는 서열 43, 서열 49, 서열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 서열 85, 및 서열 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 CAR 분자는 서열 73의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 CAR 분자는 서열 79의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

실시양태에서, 코딩된 CAR 분자는 서열 79의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

- [0241] 목적하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 당해 분야에 공지된 재조합 방법을 이용하여, 예컨대 예를 들어 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝하거나, 상기를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 유전자를 유도시키거나, 또는 표준 기술을 이용하여 상기를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 획득할 수 있다. 또 다른 한편으로, 관심 유전자를 클로닝하기 보다는 합성적으로 생성시킬 수 있다.
- [0242] 본 발명은 또한, 본 발명의 DNA를 삽입한 벡터를 제공한다. 레트로바이러스, 예컨대 렌티바이러스로부터 유래된 벡터가 장기간 유전자 전이를 달성하는 데 적합한 도구이며, 이는 이들이 트랜스진의 장기간 안정한 통합과 딸 세포에서의 그의 증식을 허용하기 때문이다. 렌티바이러스성 벡터는 비-증식성 세포, 예컨대 간세포를 형질 도입시킬 수 있다는 점에서 종양-레트로바이러스, 예컨대 뮤린 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 부가의 이점을 지니고 있다. 이들 바이러스는 또한, 면역원성이 낮다는 부가의 이점을 지니고 있다.
- [0243] 간략하게 요약하면, CAR을 코딩하는 자연 또는 합성 핵산의 발현은 전형적으로, CAR 폴리펩티드 또는 그의 일부를 코딩하는 핵산을 프로모터에 작동적으로 연결시키고, 그 구축물을 발현 벡터 내로 혼입시킴으로써 달성된다. 벡터는 진핵생물의 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열, 및 목적하는 핵산 서열의 발현을 조절하는 데 유용한 프로모터를 함유한다.
- [0244] 본 발명의 발현 구축물은 또한, 표준 유전자 전달 프로토콜을 이용하여, 핵산 면역과 유전자 요법에 사용될 수 있다. 유전자 전달을 위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466 참조; 그들의 전문이 본원에 참조로 포함된다). 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.
- [0245] 핵산은 수많은 유형의 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 특히 관심있는 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 발생 벡터, 및 서열 분석용 벡터를 포함한다.
- [0246] 추가로, 발현 벡터는 바이러스성 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스성 벡터 기술은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)], 및 기타 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 하나 이상의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선별성 마커를 함유한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193).
- [0247] 포유동물 세포 내로 유전자 전이시키기 위한 수많은 바이러스 기반 시스템이 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선별된 유전자를 벡터 내로 삽입하고, 당해 분야에 공지된 기술을 이용하여 레트로바이러스성 입자에 패키징한다. 이어서, 재조합 바이러스를 단리하고, 이를 생체내 또는 생체외에서 대상체의 세포에 전달할 수 있다. 수많은 레트로바이러스성 시스템이 당해 분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 수많은 아데노바이러스 벡터는 당해 분야에 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0248] 부가의 프로모터 요소, 예를 들어 증강인자는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 출발 부위의 30 내지 110 bp 상류에 있는 영역에 위치하지만, 수많은 프로모터가 또한 출발 부위의 하류에 있는 기능적 요소를 함유하는 것으로 최근에 밝혀졌다. 프로모터 요소들 간의 간격은 종종 가요성이므로, 요소들이 서로 역위되거나 이동하는 경우에도 프로모터 기능은 보존된다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서는, 활성이 감소되기 시작하기 전에 50 bp 떨어지도록 프로모터 요소들 간의 간격을 증가시킬 수 있다. 프로모터에 따라서, 개개의 요소들은 전사를 활성화시키기 위하여 협력하거나 또는 독립적으로 기능할 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0249] 적합한 프로모터의 한 가지 예는 즉발형 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은 그와 작동적으로 연결된 모든 폴리뉴클레오티드 서열의 고 수준의 발현을 구동할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장 성장 인자-1 α (EF-1 α)이다. 그러나, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV) 장 말단 반복 서열 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡슈타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 즉발형 프로모터, 라우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 기타 구성적 프로모터 서열뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터, 예컨대 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터

터, 및 크레아틴 키나제 프로모터 (이에 제한되지 않는다)가 사용될 수도 있다. 추가로, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되지 않아야 한다. 유도성 프로모터가 또한, 본 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터를 사용하면, 발현이 요망되는 경우에는 작동적으로 연결되는 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켤 수 있거나, 또는 발현이 요망되지 않는 경우에는 상기 발현을 끌 수 있는 분자 스위치가 제공된다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0250] CAR 폴리펩티드 또는 그의 일부의 발현을 평가하기 위하여, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 또한, 바이러스성 벡터를 통하여 형질감염 또는 감염시키고자 하는 세포 집단으로부터 발현성 세포의 확인 및 선별을 촉진시키기 위한 선별성 마커 유전자 또는 리포터 유전자를 함유하거나 둘 다를 함유할 수 있다. 다른 측면에서, 선별성 마커는 별도의 DNA 조각 상에 수반될 수 있고, 공동-형질감염 과정에 사용될 수 있다. 선별성 마커와 리포터 유전자 둘 다는 적당한 조절성 서열과 플랜킹하여 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 할 수 있다. 유용한 선별성 마커는, 예를 들어 항생제 내성 유전자, 예컨대 neo 등을 포함한다.

[0251] 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고 조절성 서열의 기능성을 평가하기 위한 리포터 유전자를 사용한다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 유기체 또는 조직에는 존재하지 않거나 또는 이러한 유기체 또는 조직에 의해서는 발현되지 않고, 그의 발현이 일부 용이하게 검출 가능한 특성, 예를 들어 효소적 활성에 의해 분명히 나타나는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA를 수용자 세포 내로 도입한 후 적합한 시간에 검정한다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제를 코딩하는 유전자, 또는 그린 형광성 단백질 유전자를 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82] 참조). 적합한 발현 시스템은 널리 공지되어 있고 공지된 기술을 이용하여 제조하거나 또는 상업적으로 획득할 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 가장 높은 수준의 발현을 나타내는 최소 5' 플랜킹 영역을 수반한 구축물이 프로모터로서 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고, 이를 사용하여 프로모터-구동된 전사를 조절할 수 있는 능력에 관하여 작용제를 평가할 수 있다.

[0252] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 발현 벡터의 맥락에서, 이러한 벡터는 당해 분야의 어떠한 방법에 의해서도 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포 내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 전이될 수 있다.

[0253] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미소주사, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생성시키는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York] 참조). 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 바람직한 방법은 인산칼슘 형질감염이다.

[0254] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스성 벡터, 및 특히 레트로바이러스성 벡터는 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포 내로 삽입하기 위하여 가장 광범위하게 사용되어 왔던 방법이다. 기타 바이러스성 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362 참조).

[0255] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단은 콜리이드성 분산 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 및 지질-기반 시스템 (수중유 에멀션, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜 포함)을 포함한다. 시험관내 및 생체내에서 전달 비히클로서 사용하기 위해 예시되는 콜로이드성 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포)이다.

[0256] 비-바이러스성 전달 시스템이 활용되는 경우에는, 예시되는 전달 비히클이 나노입자, 예를 들어 리포솜 또는 기타 적합한 서브-마이크론 크기의 전달 시스템이다. 핵산을 숙주 세포 내로 도입하기 위하여 지질 제제를 사용하는 것이 고려된다 (시험관내, 생체외 또는 생체내). 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 연합될 수 있다. 지질과 연합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 피막화될 수 있거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜과 올리고뉴클레오티드 둘 다와 연합되는 연결성 분자를 통하여 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 봉입되거나, 리포솜과 복합체를 형성하거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 중의 현탁제로서 함유되거나, 미셀에 함유되거나 이와 복합체를 형성하거나, 또는 그 밖에 지질과 연합될 수 있

다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 연합된 조성물은 용액 중의 어떠한 특별한 구조로도 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중 구조로 존재하거나, 미셀로서 존재하거나, 또는 "붕괴된" 구조와 함께 존재할 수 있다. 이들은 또한, 간단히 용액 중에 산재되어, 가능하게는 크기 또는 외형 면에서 균일하지 않는 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생적 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에 자연적으로 발생하는 지방 비말뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체, 예컨대 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜 및 알데히드를 함유하는 화합물 부류를 포함한다.

[0257] 사용하기에 적합한 지질은 상업적 공급원으로부터 취득할 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPG")은 시그마 (Sigma; 미국 미주리주 세인트 루이스)로부터 취득할 수 있고; 디세틸 포스페이트 ("DCP")는 케이앤케이 라보라토리즈 (K & K Laboratories; 미국 뉴욕주 플레인뷰)로부터 취득할 수 있으며; 콜레스테롤 ("Choi")은 칼바이오클-베링거(Calbiochem-Behring)로부터 취득할 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 기타 지질은 애반티 폴라 리피드, 인크. (Avanti Polar Lipids, Inc.; 미국 앨라배마주 버밍햄)로부터 취득할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질의 스톡 용액을 약 -20℃ 하에 저장할 수 있다. 클로로포름이 유일한 용매로서 사용되는데, 이는 이것이 메탄올 보다 더 용이하게 증발되기 때문이다. "리포솜"은 붕괴된 지질 이중 또는 응집체의 발생에 의해 형성된 각종 단일 및 다중막 지질 비히클을 포괄하는 일반적 용어이다. 리포솜은 인지질 이중 막과 내부 수성 매질을 수반한 소포 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 다중막 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질 층을 갖고 있다. 이들은 인지질이 과량의 수성 용액에 현탁되는 경우에 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 밀폐된 구조가 형성되기 전에 자가-재배열을 진행하고, 물과 용해된 용질을 지질 이중 사이에 봉입시킨다 (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나, 정상적인 소포 구조 보다는 용액 중에 상이한 구조를 갖는 조성물이 또한 포괄된다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조로 추정되거나 또는 단지 지질 분자의 비균일한 응집체로서 존재할 수 있다. 또한, 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0258] 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 도입하거나 또는 그 밖에 세포를 본 발명의 억제제에 노출시키기 위해 사용된 방법에 상관없이, 숙주 세포 내에서의 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위하여, 각종 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정은, 예를 들어 통상의 기술자에게 널리 공지된 "분자 생물학적" 검정, 예컨대 서던(Southern) 및 노던(Northern) 블롯팅, RT-PCR 및 PCR; "생화학적" 검정, 예컨대 예를 들어, 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범위 내에 속하는 작용제를 확인하기 위한 본원에 기재된 검정에 의해, 특별한 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 검정을 포함한다.

[0259] 본 발명은 추가로, CAR 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 한 측면에서, CAR 벡터는 세포, 예를 들어 T 세포 내로 직접적으로 형질도입시킬 수 있다. 한 측면에서, 벡터는 클로닝 또는 발현 벡터이며, 예를 들어 하나 이상의 플라스미드 (예를 들어, 발현 플라스미드, 클로닝 벡터, 미니서클, 미니벡터, 미소쌍 염색체), 레트로바이러스성 및 렌티바이러스성 벡터 구축물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 벡터이다. 한 측면에서, 벡터는 CAR 구축물을 포유동물 T 세포에서 발현할 수 있다. 한 측면에서, 포유동물 T 세포는 인간 T 세포이다.

[0260] T 세포의 공급원

[0261] 확장 및 유전적 변형 이전에, T 세포의 공급원을 대상체로부터 취득한다. 용어 "대상체"는 면역 반응이 유발될 수 있는 살아있는 유기체 (예를 들어, 포유동물)를 포함하는 것으로 의도된다. 대상체의 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트, 및 그의 트랜스제닉 종을 포함한다. T 세포는 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직 및 종양을 포함한 수많은 공급원으로부터 취득할 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, 당해 분야에서 입수 가능한 수많은 T 세포주를 사용할 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, T 세포는 통상의 기술자에게 공지된 수많은 기술, 예컨대 피콜(Ficoll)TM 분리를 이용하여 대상체로부터 수집된 혈액 유닛(unit)으로부터 취득할 수 있다. 하나의 바람직한 측면에서, 특정 개체의 순환성 혈액으로부터의 세포는 성분채집술 (apheresis)에 의해 취득한다. 이러한 성분채집술 생성물은 전형적으로, 림프구 (T 세포 포함), 단구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 함유한다. 한 측면에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고, 후속 처리 단계를 위해 세포를 적당한 완충액 또는 매질에 놓아둘 수 있다. 본 발명의 한 측면에서, 세포를 인산염 완충 식염수 (PBS)로 세척한다. 대체 측면에서, 세척 용액에는 칼슘이 결여되고, 마그네슘이 결여될 수 있거나 또는 2가 양이온 전부는 아니지만, 많은 것이 결여될 수 있다. 칼슘의 부재 하에서의 초기 활성화 단계로 인해, 확대된 활성화가 초래될 수 있다. 통상의 기술자에게 용이하게 인지되는 바와 같이, 세척 단계는 통상의 기술자에게 공지된 방법, 예컨대 제조업자의 지시에 따라서 반-자동화 "관류" 원심분리기 [예를 들어, 코브(Cobe) 2991 세포 처리기, 박스터 시토메이트(Baxter CytoMate), 또는 해모네틱스 셀 세이버(Haemonetics Cell Saver) 5]를 사용함으로써 달성할

수 있다. 세척 후, 세포를 각종 생체적합성 완충제, 예컨대 예를 들어, Ca-무함유, Mg-무함유 PBS, 플라스마라이트(PlasmaLyte) A, 또는 완충제를 수반하거나 수반하지 않는 기타 식염수 용액에 재현탁시킬 수 있다. 또 다른 한편으로, 성분채집술 샘플의 바람직하지 못한 성분을 제거할 수 있고, 세포를 배양 배지에 직접 재현탁시킬 수 있다.

[0262] 한 측면에서, T 세포는, 예를 들어 PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심 세정에 의해, 적혈구를 용해시키고 단구를 고갈시킴으로써 말초혈 림프구로부터 분리한다. T 세포의 특이적 아집단, 예컨대 CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및 CD45RO+ T 세포는 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 추가로 분리할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, T 세포는 목적하는 T 세포의 양성 선별에 충분한 시간 동안, 항-CD3/항-CD28 (예를 들어, 3x28)-접합된 비드, 예컨대 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와 함께 인큐베이션함으로써 분리한다. 한 측면에서, 시간은 약 30분이다. 추가 측면에서, 시간은 30분 내지 36시간의 범위이거나 이 보다 더 길고, 그들 사이의 모든 정수 값이다. 추가 측면에서, 시간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 또한 또 다른 바람직한 측면에서, 시간은 10 내지 24시간이다. 한 측면에서, 인큐베이션 시간은 24시간이다. 보다 긴 인큐베이션 시간을 이용하여, 종양 조직으로부터 또는 면역기능저하 개체로부터 종양 침윤성 림프구 (TIL)을 분리하는 데 있어서, 기타 세포 유형과 비교해서 T 세포가 거의 없는 어떠한 상황 하에서도 T 세포를 분리할 수 있다. 추가로, 보다 긴 인큐베이션 시간을 이용하면, CD8+ T 세포의 포획 효율이 증가될 수 있다. 따라서, 상기 시간을 단순히 단축시키거나 연장시킴으로써, T 세포를 CD3/CD28 비드와 결합시킬 수 있고/있거나 T 세포에 대한 비드의 비를 증가 또는 감소시킴으로써 (본원에 추가로 기재되는 바와 같음), T 세포의 아집단을 배양 초기에 또는 공정 동안의 다른 시점에서 그에 대해 우선적으로 선별하거나 그에 대항하여 선별할 수 있다. 부가적으로, 상기 비드 또는 기타 표면 상에서의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가 또는 감소시킴으로써, T 세포의 아집단을 배양 초기에 또는 다른 목적하는 시점에서 그에 대해 우선적으로 선별하거나 그에 대항하여 선별할 수 있다. 통상의 기술자는 본 발명의 맥락에서 선별 수 회전을 사용할 수도 있다는 것을 인식할 것이다. 특정 측면에서, 이러한 선별 과정을 수행하고, "선별되지 않은" 세포를 활성화 및 확장 공정에 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "선별되지 않은" 세포를 대상으로 하여 또한, 추가의 선별 회전을 수행할 수 있다.

[0263] 음성 선별에 의해 T 세포 집단을 강화시키는 것은 음성적으로 선별된 세포에 독특한 표면 마커에 대해 유도된 항체의 조합물을 이용하여 달성될 수 있다. 한 가지 방법은 음성적으로 선별된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 유도된 모노클로날 항체의 카테일을 이용하는 유동 세포법 또는 음성 자기 면역흡착을 통한 선별 및/또는 세포 분류이다. 예를 들어, 음성 선별에 의해 CD4+ 세포를 강화시키기 위해, 모노클로날 항체 카테일은 전형적으로, CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 측면에서, 전형적으로 CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+, 및 FoxP3+을 발현하는 조절성 T 세포를 강화시키거나 또는 이러한 세포에 대해 양성적으로 선별하는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 한편으로, 특정 측면에서, T 조절성 세포는 항-C25 접합된 비드 또는 기타 유사한 선별 방법에 의해 고갈된다.

[0264] 한 실시양태에서, IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, 그랜자임(granzyme) B, 및 페르포린(perforin), 또는 기타 적당한 분자, 예를 들어 기타 시토카인 중 하나 이상을 발현하는 T 세포 집단을 선별할 수 있다. 세포 발현에 관하여 스크리닝하는 방법은, 예를 들어 PCT 공개 번호 WO 2013/126712에 기재된 방법에 의해 결정할 수 있다.

[0265] 양성 또는 음성 선별에 의해 목적하는 세포 집단을 분리하기 위하여, 세포 및 표면 (예를 들어, 비드와 같은 입자)의 농도를 다양하게 할 수 있다. 특정 측면에서, 세포와 비드가 반드시 최대로 접촉되도록, 비드와 세포가 함께 혼합되는 용적을 상당히 감소시키는 것이 (예를 들어, 세포의 농도를 증가시키는 것이) 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 20억 개 세포/ml의 농도를 사용한다. 한 측면에서, 10억 개 세포/ml의 농도를 사용한다. 추가 측면에서, 1억 개 초과 세포/ml의 농도를 사용한다. 추가 측면에서, 1천만 개, 1천5백만 개, 2천만 개, 2천5백만 개, 3천만 개, 3천5백만 개, 4천만 개, 4천5백만 개 또는 5천만 개 세포/ml의 농도를 사용한다. 또한 한 측면에서, 7천5백만 개, 8천만 개, 8천5백만 개, 9천만 개, 9천5백만 개 또는 1억 개 세포/ml의 농도를 사용한다. 추가 측면에서, 1억2천5백만 개 또는 1억5천만 개 세포/ml의 농도를 사용할 수 있다. 고 농도를 사용하면, 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장이 증가될 수 있다. 추가로, 고 농도의 세포를 사용하면, 많은 종양 세포가 존재하는 샘플 (예를 들어, 혈액병 혈액, 종양 조직 등)으로부터, 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 지닐 수 있으므로 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고 농도의 세포를 이용하면, 정상적으로는 보다 약한 CD28 발현을 나타내는 CD8+ T 세포를 보다 효율적으로 선별할 수 있다.

[0266] 관련 측면에서, 보다 저 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포와 표면 (예를 들어, 비드와

같은 입자)의 혼합물을 상당히 희석시킴으로써, 입자와 세포 간의 상호 작용을 최소화한다. 이로써, 입자와 결합될 목적 항원을 다량으로 발현하는 세포가 선별된다. 예를 들어, CD4⁺ T 세포는 보다 고 수준의 CD28을 발현하고, 희석 농도에서는 CD8⁺ T 세포 보다 더 효율적으로 포획된다. 한 측면에서, 사용된 세포의 농도는 5×10^6 개/ml이다. 다른 측면에서, 사용된 농도는 약 1×10^5 개/ml 내지 1×10^6 개/ml, 및 그 사이의 모든 정수 값일 수 있다.

[0267] 다른 측면에서, 세포는 2 내지 10℃ 또는 실온에서 다양한 속도 하에 다양한 시간 동안 로테이터(rotator) 상에서 인큐베이션할 수 있다.

[0268] 자극하기 위한 T 세포는 또한, 세척 단계 후에 동결시킬 수 있다. 특정 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단 중의 과립구를 제거하고 어느 정도는 단구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장과 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포를 동결 용액에 현탁시킬 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터가 당해 분야에 공지되어 있고 본 맥락에서 유용할 것이지만, 한 가지 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS; 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% 플라스마라이트-A, 31.25% 텍스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO를 함유하는 배양 배지; 또는 예를 들어, 헤스판(Hespan) 및 플라스마라이트 A를 함유하는 기타 적합한 세포 동결 배지를 사용한 다음, 세포를 분당 1℃의 속도로 -80℃로 동결시키고 액체 질소 저장 탱크의 증기 상 하에 저장하는 것을 포함한다. 기타 제어식 동결 방법을 사용할 수 있을 뿐만 아니라 -20℃ 하에 또는 액체 질소에서 즉시 비제어식 동결을 사용할 수 있다.

[0269] 특정 측면에서, 냉동보존된 세포를 해동하고, 본원에 기재된 바와 같이 세척하며, 본 발명의 방법을 이용하여 활성화하기 이전에 실온에서 1시간 동안 정지시켜 두었다.

[0270] 또한, 본 발명의 맥락에서, 본원에 기재된 바와 같이 확장된 세포가 필요해지기 이전의 특정 시간에 대상체로부터의 혈액 샘플 또는 성분채집술 생성물의 컬렉션이 고려된다. 따라서, 확장시키고자 하는 세포의 공급원을 필요한 어느 시점에 수집할 수 있고, 목적하는 세포, 예컨대 T 세포를, T 세포 요법으로부터 이득을 얻을 것인 수많은 질환 또는 병태, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 질환 또는 병태에 대하여 나중에 T 세포 요법에 사용하기 위하여 단리 및 동결시킬 수 있다. 한 측면에서, 혈액 샘플 또는 성분채집술은 일반적으로, 건강한 대상체로부터 취한다. 특정 측면에서, 혈액 샘플 또는 성분채집술은 일반적으로, 질환 발생 위험이 있지만, 아직까지는 질환이 발생하지 않은 건강한 대상체로부터 취하고, 나중에 사용하기 위하여 관심 세포를 단리 및 동결시킨다. 특정 측면에서, T 세포를 확장시키고, 동결시키며, 나중에 사용할 수 있다. 특정 측면에서, 샘플은 본원에 기재된 바와 같은 특별한 질환의 진단 직후, 어떠한 치료도 받기 이전에 환자로부터 수집한다. 추가 측면에서, 작용제, 예컨대 나탈리주맙(natalizumab), 에팔리주맙(efalizumab), 항바이러스제, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트 및 FK506, 항체 또는 기타 면역 제거제, 예컨대 CAMPATH, 항-CD3 항체, 시톡산, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 및 방사선 요법으로의 치료를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 수많은 관련 치료 양식 이전에, 세포를 대상체로부터의 성분채집술 또는 혈액 샘플로부터 단리한다.

[0271] 본 발명의 추가 측면에서, T 세포는 대상체에게 기능적 T 세포를 남겨두는 치료 후에 직접적으로 환자로부터 수득한다. 이와 관련하여, 특정 암 치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물로의 치료 후, 치료 직후 환자가 이러한 치료로부터 정상적으로 회복될 것 같은 기간 동안, 수득된 T 세포의 질은 최적일 수 있거나 또는 생체외에서 확장할 수 있는 그의 능력을 개선시킬 수 있는 것으로 관찰되었다. 마찬가지로, 본원에 기재된 방법을 이용하는 생체외 조작 후, 이들 세포는 증강된 생착(engraftment)과 생체내 확장을 위해 바람직한 상태일 수 있다. 따라서, 본 발명의 맥락 내에서, 이러한 회복기 동안, T 세포, 수지상 세포, 또는 조혈 계통의 기타 세포를 포함한 혈액 세포를 수집하는 것이 고려된다. 추가로, 특정 측면에서, 가동화 (예를 들어, GM-CSF를 이용한 가동화) 및 컨디셔닝 요법을 이용하여, 특히 요법 후 규정된 시간대 동안, 특별한 세포 유형의 재증식, 재순환, 재생 및/또는 확장이 선호되는 대상체에서 특정 상태를 창출시킬 수 있다. 예시되는 세포 유형은 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 기타 면역계 세포를 포함한다.

[0272] **T 세포의 활성화 및 확장**

[0273] T 세포는 일반적으로, 예를 들어 미국 특허 번호 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 특허 출원 공개 번호 20060121005에 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 활성화

및 확장시킬 수 있다.

[0274] 일반적으로, 본 발명의 T 세포는 CD3/TCR 복합체 관련 신호를 자극하는 작용제 및 T 세포의 표면 상에 공동자극성 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 확장될 수 있다. 특히, T 세포 집단은 본원에 기재된 바와 같이, 예컨대 항-CD3 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편, 또는 표면 상에 고정화된 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이온 투과 담체 (ionophore)와 연계해서 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)과의 접촉에 의해 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자를 공동자극하기 위하여, 이러한 보조 분자와 결합하는 리간드를 사용한다. 예를 들어, T 세포 집단을, T 세포의 증식을 자극하기에 적당한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉시킬 수 있다. CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포의 증식을 자극하기 위하여, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 (항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28 [디아클론 (Diacclone; 프랑스 브장송)]을 포함함)를 당해 분야에 흔히 공지된 기타 방법으로 사용할 수 있다 [Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999].

[0275] 특정 측면에서, T 세포에 대한 일차 자극성 신호와 공동자극성 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각 신호를 제공하는 작용제는 용액 중에 있거나 표면과 커플링될 수 있다. 표면과 커플링되는 경우, 상기 작용제는 동일한 표면과 커플링되거나 (즉, "시스" 형태) 별도의 표면과 커플링될 수 있다 (즉, "트랜스" 형태). 또 다른 한편으로, 하나의 작용제는 표면과 커플링될 수 있고 다른 작용제는 용액 중에 있을 수 있다. 한 측면에서, 공동자극성 신호를 제공하는 작용제는 세포 표면과 결합되고, 일차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 용액 중에 있거나 표면과 커플링된다. 특정 측면에서, 양 작용제가 용액 중에 있을 수 있다. 한 측면에서, 작용제는 수용성 형태로 존재한 다음, 표면, 예컨대 Fc 수용체를 발현하는 세포, 또는 상기 작용제와 결합하게 될 항체 또는 기타 결합성 작용제와 가교 결합될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명에서 T 세포를 활성화하고 확장하는데 사용하도록 고려되는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 번호 20040101519 및 20060034810을 참조할 수 있다.

[0276] 한 측면에서, 상기 2개의 작용제를 동일한 비드 상에 (즉, "시스") 또는 별개의 비드 상에 (즉, "트랜스") 고정화시킨다. 한 예로서, 일차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합성 단편이고, 공동자극성 신호를 제공하는 작용제는 항-CD28 항체 그의 항원-결합성 단편이며; 양 작용제는 등가의 분자량으로 동일한 비드에 공동-고정화시킨다. 한 측면에서, CD4+ T 세포 확장과 T 세포 성장을 위해서는, 비드에 결합된 각 항체의 1:1 비가 사용된다. 본 발명의 특정 측면에서, 1:1의 비를 이용하여 관찰된 확장과 비교해서 T 세포 확장 상의 증가가 관찰되도록, 비드와 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비를 사용한다. 한 특별한 측면에서, 1:1의 비를 이용하여 관찰된 확장과 비교해서 약 1배 내지 약 3배의 증가가 관찰된다. 한 측면에서, 비드와 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100의 범위 및 그 사이의 모든 정수 값이다. 본 발명의 한 측면에서, 항-CD3 항체 보다 더 많은 양의 항-CD28 항체가 입자와 결합되는데, 즉 CD3:CD28의 비는 1 미만이다. 본 발명의 특정 측면에서, 비드와 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비는 2:1 초과이다. 한 특별한 측면에서, 비드와 결합된 항체의 1:100 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드와 결합된 항체의 1:75 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가 측면에서, 비드와 결합된 항체의 1:50 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드와 결합된 항체의 1:30 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 바람직한 측면에서, 비드와 결합된 항체의 1:10 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드와 결합된 항체의 1:3 CD3:CD28 비가 사용된다. 또한 한 측면에서, 비드와 결합된 항체의 3:1 CD3:CD28 비가 사용된다.

[0277] 1:500 내지 500:1 및 그 사이의 모든 정수 값의 입자 대 세포의 비를 사용하여 T 세포 또는 기타 표적 세포를 자극할 수 있다. 통상의 기술자가 용이하게 인지할 수 있는 바와 같이, 입자 대 세포의 비는 표적 세포를 기준으로 한 입자 크기에 좌우될 수 있다. 예를 들어, 작은 크기의 비드는 소수의 세포와만 결합할 수 있는 반면, 보다 큰 비드는 더 많은 세포와 결합할 수 있었다. 특정 측면에서, 세포 대 입자의 비는 1:100 내지 100:1의 범위 및 그 사이의 모든 정수 값이고, 추가 측면에서 상기 비는 1:9 내지 9:1 및 그 사이의 모든 정수 값을 포함하고, 이를 사용하여 T 세포를 자극할 수도 있다. T 세포 자극을 초래하는, 항-CD3-커플된 입자 및 항-CD28-커플된 입자 대 T 세포의 비는 상기 언급된 바와 같이 다양할 수 있지만, 특정의 바람직한 값은 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1을 포함하고, 하나의 바람직한 비는 T 세포당 적어도 1:1 입자이다. 한 측면에서, 1:1 또는 그 미만의 입자 대 세포의 비를 사용한다. 한 특별한 측면에서, 바람직한 입자:세포 비는 1:5이다. 추가 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극 일수에 따라서 다양할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 입자 대 세포의 비는 1일째에 1:1 내지 10:1이고, 부가의 입자를 매일 또는 격일로 세포에 가하고, 그 후 10일까지는 1:1 내지

1:10의 최종 비로 가한다 (부가하는 날의 세포 치를 기준으로 함). 한 특별한 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극 1일째에 1:1이고, 자극 3일째와 5일째에는 1:5로 조정한다. 한 측면에서, 자극 1일째에는 1:1의 최종 비를 기준으로 하고, 자극 3일째와 5일째에는 1:5의 최종 비를 기준으로 하여 입자를 매일 또는 격일로 가한다. 한 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극 1일째에는 2:1이고, 자극 3일째와 5일째에는 1:10으로 조정한다. 한 측면에서, 자극 1일째에는 1:1의 최종 비를 기준으로 하고, 자극 3일째와 5일째에는 1:10의 최종 비를 기준으로 하여 입자를 매일 또는 격일로 가한다. 통상의 기술자는 각종의 다른 비도 본 발명에 사용하는 데 적합할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 특히, 비는 입자 크기 및 세포 크기와 유형에 따라서 다양할 것이다. 한 측면에서, 사용하는 데 가장 전형적인 비는 1일째에 대략 1:1, 2:1 및 3:1이다.

[0278] 본 발명의 추가 측면에서, 세포, 예컨대 T 세포를 작용제-코팅된 비드와 합하고, 이러한 비드와 세포를 연속해서 분리시킨 다음, 세포를 배양한다. 또 다른 측면에서, 배양하기 이전에, 상기 작용제-코팅된 비드와 세포를 분리시키지 않고 함께 배양한다. 추가 측면에서, 비드와 세포를 먼저, 자기력과 같은 힘을 적용함으로써 농축시켜, 세포 표면 마커의 결찰을 증가시킴으로써 세포 자극을 유도시킨다.

[0279] 한 예로서, 항-CD3 및 항-CD28이 부착되는 상자성 비드 (3x28 비드)를 T 세포와 접촉되게 함으로써 세포 표면 단백질을 결찰시킬 수 있다. 한 측면에서, 상기 세포 (예를 들어, 10^4 내지 10^9 개 T 세포)와 비드 (예를 들어, 1:1 비의 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)를 완충제, 예를 들어 PBS (2가 양이온, 예컨대 칼슘 및 마그네슘을 수반하지 않음)에서 합한다. 다시 언급하면, 통상의 기술자는 어떠한 세포 농도도 사용될 수 있다는 것을 용이하게 인지할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포는 샘플 중에 매우 드물 수 있고 샘플의 0.01%만을 차지할 수 있거나 또는 전체 샘플 (즉, 100%)이 관심 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 어떠한 세포 수도 본 발명의 맥락 내에 있다. 특정 측면에서, 세포와 입자의 최대 접촉을 보장하기 위해서는, 입자와 세포가 함께 혼합되는 용적을 상당히 감소시키는 것이 (즉, 세포의 농도를 증가시키는 것이) 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 약 20억 개 세포/ml의 농도를 사용한다. 한 측면에서, 1억 개 초과 세포/ml의 농도를 사용한다. 추가 측면에서, 1천만 개, 1천5백만 개, 2천만 개, 2천5백만 개, 3천만 개, 3천5백만 개, 4천만 개, 4천5백만 개 또는 5천만 개 세포/ml의 농도를 사용한다. 또한 한 측면에서, 7천5백만 개, 8천만 개, 8천5백만 개, 9천만 개, 9천5백만 개 또는 1억 개 세포/ml의 농도를 사용한다. 추가 측면에서, 1억2천5백만 개 또는 1억5천만 개 세포/ml의 농도를 사용할 수 있다. 고 농도를 사용하면, 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장이 증가될 수 있다. 추가로, 고 농도의 세포를 사용하면, 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포를 보다 효율적으로 포획할 수 있다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 지닐 수 있으므로 특정 측면에서 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고 농도의 세포를 이용하면, 정상적으로는 보다 약한 CD28 발현을 나타내는 CD8+ T 세포를 보다 효율적으로 선별할 수 있다.

[0280] 본 발명의 한 측면에서, 상기 혼합물은 수 시간 (약 3시간) 내지 약 14일 동안 또는 그 사이의 모든 시간 정수 값 동안 배양할 수 있다. 한 측면에서, 혼합물은 21일 동안 배양할 수 있다. 본 발명의 한 측면에서, 비드와 T 세포는 약 8일 동안 함께 배양한다. 한 측면에서, 비드와 T 세포는 2 내지 3일 동안 함께 배양한다. T 세포의 배양 시간이 60일 이상일 수 있도록, 자극 수회 주기가 요망될 수도 있다. T 세포 배양에 적당한 조건은 혈청 (예를 들어, 태아 소 또는 인간 혈청), 인터루킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , 및 TNF- α 를 포함한, 증식 및 생육성에 필요한 인자, 또는 통상의 기술자에게 공지된 세포의 성장을 위한 기타 어떠한 부가제도 함유할 수 있는 적당한 배지 [예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640, 또는 X-비보(vivo) 15, (론자(Lonza))]를 포함한다. 세포의 성장을 위한 기타 부가제는 계면활성제, 플라즈마네이트, 및 환원제, 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 배지는 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-비보 15, 및 X-비보 20; 아미노산, 소듐 피루베이트 및 비타민이 부가되거나, 혈청 무함유이거나 또는 적당한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 규정된 호르몬 세트에 보충시킨 최적화제; 및/또는 T 세포의 성장과 확장을 위해 충분한 양의 시토카인(들)을 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험용 배양물에만 포함되고, 대상체 내로 주입될 세포의 배양물에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 지지하는 데 필요한 조건, 예를 들어 적당한 온도 (예를 들어, 37°C) 및 대기 (예를 들어, 5% CO₂가 부가된 공기) 하에 유지시킨다.

[0281] 다양한 자극 시간에 노출되었던 T 세포는 상이한 특징을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 성분 채집된 말초혈 단핵 세포 생성물은 세포독성 또는 억제인자 T 세포 집단 (TC, CD8+) 보다 더 큰 헬퍼 T 세포 집단 (TH, CD4+)을 갖는다. CD3 수용체와 CD28 수용체를 자극함으로써 T 세포를 생체외에서 확장시키면, 약 8일 내지 9일 이전에는 주로 TH 세포로 이루어지는 T 세포 집단이 생성되지만, 약 8일 내지 9일 후, T 세포 집단은 점점 더 증가하는 TC 세포 집단을 포함한다. 따라서, 치료 목적에 따라서, 주로 TH 세포를 포함하는 T 세포 집

단을 대상체에게 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, TC 세포의 항원-특이적 서브세트를 분리한 경우에는, 이러한 서브세트를 더 많은 정도로 확장시키는 것이 유리할 수 있다.

[0282] 추가로, CD4 및 CD8 마커 이외에도, 기타 표현형별 마커가 상당히 다양하지만, 대부분의 경우에는 세포 확장 과정의 과정 동안에 재현 가능한 수준으로 다양하다. 따라서, 이러한 재현 가능성으로 인해, 활성화된 T 세포 생성물을 특이적 목적에 맞게 할 수 있다.

[0283] 일단 EGFRvIII CAR이 구축되면, 각종 검정을 이용하여 분자의 활성, 예컨대 항원 자극 후 T 세포를 확장시킬 수 있는 능력, 재자극의 부재 하에 T 세포 확장을 지속시킬 수 있는 능력, 및 시험관내 및 동물 모델에서 적당한 항암 활성 (이에 제한되지 않는다)을 평가할 수 있다. EGFRvIII CAR의 효과를 평가하는 검정은 다음에 추가로 상세히 기재되어 있다.

[0284] 일차 T 세포에서의 CAR 발현의 웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 단량체 및 이량체의 존재를 검출할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조). 매우 간략하게 언급하면, CAR을 발현하는 T 세포 (CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포의 1:1 혼합물)를 시험관내에서 10일 초과하여 확장시킨 다음, 용해시키고 환원성 조건 하에 SDS-PAGE한다. 전장 TCR- ζ 세포질 도메인 및 내인성 TCR- ζ 쇄를 함유하는 CAR은 TCR- ζ 쇄에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅함으로써 검출한다. 동일한 T 세포 서브세트를 비-환원성 조건 하에 SDS-PAGE 분석을 위해 사용하여 공유 이량체 형성을 평가할 수 있다.

[0285] 항원 자극 후 CAR⁺ T 세포의 시험관내 확장은 유동 세포법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포의 혼합물을 α CD3/ α CD28 aAPC로 자극한 다음, 분석하고자 하는 프로모터의 제어 하에 GFP를 발현하는 렌티바이러스성 벡터로 형질도입시킨다. 예시되는 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1 α , 유비퀴틴 C, 또는 포스포글리세로키나제 (PGK) 프로모터를 포함한다. 배양 6일째에 유동 세포법에 의해 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ T 세포 서브세트에서 GFP 형광을 평가한다 (예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조). 또 다른 한편으로, CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포의 혼합물을 0일째에 α CD3/ α CD28 코팅된 자기 비드로 자극하고, 1일째에 2A 리보솜 스킵핑(skiping) 서열을 이용하여 eGFP와 함께 CAR을 발현하는 비시스템로닉(bicistronic) 렌티바이러스성 벡터를 사용하여 CAR로 형질도입시킨다. 배양물을, 세척 후 항-CD3 및 항-CD28 항체의 존재 하에 hCD32 및 4-1BBL을 발현하는 K562 세포 (K562-BBL-3/28), 또는 EGFRvIII⁺ U-87 세포 (U-87-EGFRvIII) 또는 야생형 U-87 세포 (U-87 야생형)로 재자극한다. 외인성 IL-2를 100 IU/ml로 상기 배양물에 격일로 가한다. 비드-기반 를 이용하여 유동 세포법에 의해 GFP⁺ T 세포를 계산한다 (예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)] 참조).

[0286] 재자극의 부재 하에 지속된 CAR⁺ T 세포 확장을 또한 평가할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)] 참조). 간략하게 언급하면, 0일째에 α CD3/ α CD28 코팅된 자기 비드로 자극하고, 1일째에 표시된 CAR로 형질도입한 후, 코울터 멀티사이저(Coulter Multisizer) III 입자 기를 이용하여 배양 8일째에 평균 T 세포 용적 (f1)을 측정한다.

[0287] 세포 증식과 시토카인 생성을 평가하는 것은 기존에, 예를 들어 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)]에 기재되었다. 간략하게 언급하면, CAR-매개된 증식을 평가하는 것은, 최종 T 세포:표적 세포 비 1:1을 위하여, 세척된 T 세포를 표적 세포, 예컨대 EGFRvIII 또는 EGFR 야생형 (wt)을 발현하는 U87MG, BHK 또는 CHO 세포, 또는 CD32 및 CD137을 발현하는 세포 (KT32-BBL)와 혼합함으로써 미세역가 판에서 수행한다. 항-CD3 (클론 OKT3) 및 항-CD28 (클론 9.3) 모노클로날 항체를, T-세포 증식을 자극하기 위한 양성 대조군으로서 제공하기 위하여 KT32-BBL 세포와 함께 배양물에 가하는데, 이는 이들 신호가 생체외에서 장기 간 CD8⁺ T 세포 확장을 지지하기 때문이다. 제조업자에 의해 기재된 바와 같은 유동 세포법 및 카운트브라이트 (CountBright)TM 형광성 비드 [인비트로젠 (Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드)]를 이용하여 T 세포를 배양물에서 계산한다. eGFP-2A 연결된 CAR-발현성 렌티바이러스성 벡터를 이용하여 조작되는 T 세포를 사용하여 GFP 발현에 의해 CAR⁺ T 세포를 확인한다. GFP를 발현하지 않는 CAR⁺ T 세포에 대해서는, 바이오티닐화 재조합 EGFRvIII 단백질 및 이차 아비딘-PE 접합체를 이용하여 CAR⁺ T 세포를 검출한다. T 세포 상에서의 CD4⁺ 및 CD8⁺ 발현을 또한, 특이적 모노클로날 항체 [BD 바이오사이언스(Biosciences)]로 동시에 검출한다. 제조업자의 지시에 따라서 인간 TH1/TH2 시토카인 세포 비드 어레이 키트 (BD 바이오사이언스; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)를 이용하여 재자극한 후 24시간째에 수집된 상등액 상에서 시토카인 측정을 수행한다. FACS칼리버

(FACScalibur) 유동 세포기를 이용하여 형광을 평가하고, 제조업자의 지시에 따라서 데이터를 분석한다.

- [0288] 세포독성은 표준 51Cr-방출 검정에 의해 평가할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)] 참조). 간략하게 언급하면, 표적 세포 (EGFRvIII 또는 EGFR 야생형 (wt)을 발현하는 U87MG, BHK 또는 CHO 세포)에, 자주 진탕시키면서 2시간 동안 37℃ 하에 51Cr [NaCrO4로서; 뉴 잉글랜드 뉴클레어 (New England Nuclear; 미국 매사추세츠주 보스턴)]을 부하하고, 완전 RPMI에서 2회 세척하며, 미세역가 판 내로 도말한다. 이펙터 T 세포를 완전 RPMI 중의 웰에서 표적 세포와 혼합하는데, 이펙터 세포:표적 세포 (E:T)의 비를 다양하게 한다. 배지만을 함유하거나 (자발적 방출, SR) 또는 트리톤-X 100 세정제의 1% 용액을 함유하는 (총 방출, TR) 부가 웰을 또한 제조한다. 37℃에서 인큐베이션한지 4시간 후, 각 웰로부터의 상등액을 수거한다. 이어서, 감마 입자 기 [파카드 인스트루먼트 캄파니 (Packard Instrument Co.; 미국 매사추세츠주 윌섬)]를 이용하여 방출된 ⁵¹Cr을 측정한다. 각 조건을 적어도 세 번 되풀이하여 수행하고, 다음 식을 이용하여 용해 비율 (%)을 계산한다: % 용해 = (ER-SR)/(TR-SR) (여기서, ER은 각 실험 조건에 대해 방출된 평균 51Cr을 나타낸다). 또 다른 세포독성 검정, 예컨대 실시예 8에 기재된 바와 같은 유동-기반 세포독성 검정을 또한 사용할 수 있다.
- [0289] 방아벌레 (Click beetle) 레드 및 방아벌레 그린 루시페라제를 이용하여, 종양 진행과 T 세포 수송을 동시에 추적할 수 있는데, 이는 각각이 동일한 루시페린 기질을 이용하지만, 가시광선 스펙트럼의 반대편 말단에서 빛을 방출하기 때문이다.
- [0290] 본원의 실시예 섹션에 기재된 검정뿐만 아니라 당해 분야에 공지되어 있는 검정을 포함한 기타 검정을 또한 이용하여, 본 발명의 EGFRvIII CAR 구축물을 평가할 수 있다.
- [0291] **EGFRvIII 발현성 질환 및 장애에 대한 치료적 적용**
- [0292] EGFRvIII은 표피 성장 인자 수용체의 종양-특이적, 리간드-비의존성, 구성적으로 활성인 변이체이다. 본 발명은 EGFRvIII과 연관된 질환 및 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. EGFRvIII과 연관된 질환 또는 장애의 한 예는 신경교종이다.
- [0293] 신경교종은 신경교 세포 (예를 들어, 신경 세포를 둘러싸고 있고 이를 지지해주며, 희소돌기아교세포, 성상세포, 미세신경교 세포 및 뇌실막 세포를 포함하는 세포)에서 시작하는 중추 신경계의 암을 지칭한다. 신경교종은 발생률과 악성도 둘 다 측면에서 특히 심각하고, 그들의 상세한 병리학적 조직 유형에 따라서 7가지 이상의 유형, 예컨대 교모세포종 및 역형성 성상세포종으로 분류된다. 원발성 뇌종양의 악성도를 결정하는 경우에는, 질환 병기 (종양 크기, 원위부 전이의 존재)와 조직학적 악성도를 사용한다. 조직학적 악성도는 뇌종양 치료에 관한 지침 [(2002) Kanehara & Co., Ltd.]에 따라서 4가지 수준, 즉 G1 내지 G4로 분류되고, 이들은 각각 WHO1 내지 WHO4에 상응한다. 그 수가 클수록 악성도는 더 높아진다. 예를 들어 교모세포종의 악성도는 G4 (WHO4)인 반면, 역형성 성상세포종의 악성도는 G3 (WHO3)이며, G3과 G4 둘 다는 악성으로서 분류된다. 따라서, 일부 실시양태에 따라서, 본 발명의 방법은 악성 신경교종을 표적으로 한다. 다른 측면에서, 본 발명은 다형성 교모세포종 (GBM)을 표적으로 한다. 추가 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 역형성 성상세포종, 거대 세포 교모세포종, 신경교육종, 역형성 핍지교종, 역형성 상의세포종, 맥락층 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 및 비정형 기형양/황문근양 종양을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 기타 신경교종의 치료에 사용될 수 있다.
- [0294] 교모세포종은 성인에서 가장 흔한 원발성 뇌종양이다. 미국에서 매년 악성 원발성 뇌종양으로 진단된 18,000명의 환자 중 절반 이상이 다형성 교모세포종 환자이다. 다형성 교모세포종은 높은 증식 지수, 미세혈관성 증식 및 병소 괴사를 수반하는 고도로 세포성인 역형성 종양이다. 징후와 증상들은 여러 요인 (뇌 내에서의 종양의 크기, 성장을 및 국재화)에 좌우되고, 이는 주로 두통, 발작, 신경학적 결손, 정신 상태의 변화로써 나타난다. 다형성 교모세포종 예후는 여전히 암울하다. 대다수 환자에 대한 생존 시간은 2년 미만이다. 카르노브스키 (Karnofsky) 수행 상태 (KPS)는 가장 중요한 예후 인자 중 하나이다: KPS>70인 환자는 증례의 대략 18%에서 18개월째 살아있는데, 이는 더 낮은 KPS 스코어를 나타내는 환자의 13%와 비교된다. 원발성 다형성 교모세포종은 신경교 세포로부터 새롭게 발생되고, 전형적으로 임상 병력이 6개월 미만이며, 나이 든 환자에서 더 흔하며 소세포 조직학을 제시한다. 이차 다형성 교모세포종은 기존의 저 악성도 성상세포종으로부터 수개월 또는 수년에 걸쳐 발생되고, 주로 더 어린 사람에게 영향을 미치며 거대 세포 조직학을 제시한다.
- [0295] 악성 신경교종은 또한, 고 악성도 신경교종으로서 공지되어 있다. 이는 뇌와 척수에 영향을 미칠 수 있다. 일부 측면에서, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여, 뇌 악성 신경교종, 예를 들어 역형성 성상세포종 (AA), 다

형성 교모세포종 (GBM), 역형성 핍지교종 (AO) 및 역형성 회소돌기성상세포종 (AOA) 중에서 선택되는 것을 보유하고 있는 대상체를 치료할 수 있다. 일부 측면에서, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 다형성 교모세포종 (GBM)을 보유하고 있는 대상체를 치료할 수 있다.

[0296] 다형성 교모세포종은 성상세포종의 가장 악성 병기이고, 대부분의 환자에 대한 생존 시간은 2년 미만이다. 조직학적으로, 이들 종양은 높은 증식 지수, 내피 증식 및 병소 괴사를 특징으로 한다. 이들 병변의 고도로 증식성인 성질은 다수의 분열촉진 효과로부터 비롯되는 것으로 예상된다. GBM의 특징 중 하나는 내피 증식이다. 다수의 혈관형성성 성장 인자와 그들의 수용체가 GBM에서 발견된다.

[0297] 성상세포종의 생물학적 서브세트가 있는데, 이는 이들 종양에서 관찰된 임상적 이질성을 반영할 수 있다. 이들 서브세트는 소아 확산성 형태인 뇌간 신경교종, 종종 악성 과정을 따르는 섬유성 성상세포종을 포함한다. 뇌간 GBM은 더 젊은 환자에게 영향을 미치는 성인 GBM과 유전적 특색을 공유한다. 다형성 황색성상세포종 (PXA)는 주로 젊은 성인에게 영향을 미치는 표재성 저 악성도 성상세포 종양이다. 이들 종양이 기괴한 조직학적 외관을 지니고 있긴 하지만, 이들은 전형적으로 느리게 자라는 종양이므로, 외과적 치료를 받을 수 있다. 그러나, 일부 PXA는 GBM으로서 재발될 수 있다. 털모양세포의 성상세포종은 어린이의 가장 흔한 성상세포 종양이고, 성인에게 영향을 미치는 확산성, 섬유성 성상세포종과는 임상적 및 조직병리학적으로 상이하다. 털모양세포의 성상세포종은 확산성, 섬유성 성상세포종과 동일한 계통 변경을 갖고 있지 않다. 뇌실막하 거대 세포 성상세포종 (SEGA)은 통상적으로 결절성 경화증 (TS)과 연관되는 뇌실 주위의 저 악성도 성상세포 종양이고, TS 환자의 뇌실 안을 막처럼 싸고 있는 소위 "캔들-구테링(candle-gutterings)"과 조직학적으로 동일하다. TS 내의 다른 종양성 병변과 유사하게, 이들은 느리게 자라고 있고, 진짜 신생물보다는 과오종에 더 가까울 수 있다. 유아기의 결합 조직 형성 대뇌 성상세포종 (DCAI) 및 결합 조직 형성 유아 신경절교종 (DIGG)은 1세 또는 2세 시기의 어린이에게 영향을 미치는 크고, 표재성이며, 통상적으로 낭포성의 양성 성상세포종이다.

[0298] 핍지교종과 회소돌기성상세포종 (혼합 신경교종)은 임상적 및 생물학적으로 확산성의 섬유성 성상세포종과 가장 밀접하게 관련이 있는 확산성의 주로 CNS 신경교 종양이다. 그러나, 이 종양은 성상세포종보다 훨씬 덜 흔하고, 일반적으로 확산성 성상세포종 보다 더 우수한 예후를 지닌다. 핍지교종과 회소돌기성상세포종은 WHO 등급 III 역형성 핍지교종 또는 역형성 회소돌기성상세포종으로 진행될 수 있거나, 또는 WHO 등급 IV GBM으로 진행될 수 있다. 따라서, 회소돌기아교세포 종양을 초래하는 유전적 변화가 아직까지도 GBM에 대한 또 다른 경로를 구성한다.

[0299] 상의세포종은 어린이의 침습성 뇌실내 종양에서부터 성인의 양성 척수 종양까지 다양한, 임상적으로 다양한 신경교종 군이다. 상의세포종이 GBM으로 전이되는 것은 드물다. 맥락충 종양은 또한, 어린이의 침습성 천막상 뇌실내 종양에서부터 성인의 양성 소뇌교각부 종양까지, 심실 시스템에서 우선적으로 발생하는 다양한 종양 군이다. 맥락충 종양은 리-프라우메니(Li-Fraumeni) 증후군과 폰 히펠-린다우(von Hippel-Lindau) (VHL) 질환이 있는 환자에서 가끔 보고되었다.

[0300] 수모세포종은 주로 어린이의 후두와(posterior fossa)에서 발생하는 악성의 원시 종양이다. 이들 종양은 젊은 성인에서도 발생한다. 수모세포종은 종종, 외과적으로 절제한 후, 화학요법 및/또는 방사선으로 치료한다. 이들은 국소적으로 재발되거나 또는 가끔 후두와에서 척추로 드롭(drop) 전이로서 재발될 수 있다. 수막종은 수막에 발생하고 하층 뇌를 압박하는 흔한 두개내 종양이다. 전형적으로는 양성인 것으로 간주되고 솔직히 드문 경우에만 악성이긴 하지만, 이들 종양을 관리하는 것은 종종, 임상적 문제를 제기한다. 수막종의 조직학적 등급은 대다수 양성인 WHO 등급 I/IV (82%); 덜 일반적으로 비정형인 WHO II/IV (15%); 및 드물게, 역형성 또는 악성으로서 발생할 수 있는 WHO 등급 III/IV (3%)로 다양하다.

[0301] 신경초종은 말초 신경에서 발생하는 양성 종양이다. 신경초종은 두개 신경, 특히 8번째 두개 신경의 전정 부분에서 발생하는데 (전정 신경초종, 청신경종), 여기서 이들은 소뇌교각부 덩어리로서 존재한다. 혈관모세포종은 내피 세포, 혈관 주위 세포 및 소위 간질 세포로 구성되는 불확실한 기원의 종양이다. 이러한 양성 종양은 젊은 성인의 소뇌와 척수에서 가장 자주 발생한다. 다발성 혈관모세포종은 폰 히펠-린다우병 (VHL)의 특징이다. 혈관주위세포종 (HPC)는 국소적으로 침습성이 강한 행위를 표시할 수 있고 전이될 수 있는 경막 종양이다. 경막-기반 혈관주위세포종 (HPC)의 조직형성은 장기간 논란이 되어 왔는데, 일부 저자는 이를 별개의 실체로서 분류하고 있고, 다른 저자는 이를 수막종의 하위 유형으로서 분류하고 있다.

[0302] 원발성 뇌종양과 전이성 뇌종양 둘 다의 증상은 종종, 뇌에서의 위치와 종양의 크기에 좌우된다. 뇌의 각종 영역이 특이적 기능에 대해 책임이 있기 때문에, 임상적 증상은 상당히 다양할 것이다. 뇌의 전두엽 내의 종양은 쇠약과 마비, 기분 장애, 사고 곤란, 혼란과 방향 감각 상실, 및 넓은 감정적인 기분 변동을 유발시킬 수 있다.

두정엽 종양은 발작, 저림 또는 마비, 필기 곤란, 간단한 수학 문제를 수행할 수 없음, 특정의 움직임 곤란, 및 터치 감각의 상실을 유발시킬 수 있다. 후두엽 종양은 각 시야의 절반에서의 시력 상실, 시각적 환각, 및 발작을 유발시킬 수 있다. 측두엽 종양은 발작, 지각 및 공간 장애, 및 수용 실어증을 유발시킬 수 있다. 종양이 소뇌에서 발생하는 경우, 그 사람은 운동 실조, 조정 능력의 상실, 두통 및 구토를 수반할 수 있다. 시상 하부의 종양은 감정 변화, 및 더위와 추위에 대한 인식의 변화를 유발시킬 수 있다. 또한, 시상 하부 종양은 어린이의 성장과 영양에 영향을 미칠 수 있다. 소뇌를 제외하고, 뇌의 한쪽에 있는 종양은 신체의 반대편 쪽에 증상과 장애를 야기시킨다.

[0303] 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여, EGFRvIII을 발현하는 세포 또는 조직을 갖고 있는 것으로서 명확히 규명되었거나 또는 EGFRvIII을 발현하는 세포 또는 조직을 갖고 있는 것으로 추정되는 대상체를 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따르는 치료로부터 이득을 얻는 대상체는 신경교종에 걸린 대상체, 또는 신경교종을 갖고 있는 것으로 추정되는 대상체를 포함하며, 이는 예를 들어, 두통, 오심 및 구토, 발작, 시력 상실, 통증, 쇠약, 사지의 마비, 및/또는 증가된 두개내 압력에 따른 결과로서의 두개 신경 장애 중 한 가지 이상이 존재함으로써 입증된다. 특별한 실시양태에서, 치료하고자 하는 신경교종은 다형성 교모세포종이다. 이러한 실시양태에 따라서, 다형성 교모세포종은 뇌 또는 척수 내에 존재할 수 있다.

[0304] 본 발명은 EGFRvIII-발현성 세포를 포함하는 세포 집단을, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 CAR-발현성 세포, 예를 들어 T 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 증식을 억제하거나 또는 EGFRvIII-발현성 세포 집단을 감소시키는 방법을 제공한다. 특이적 실시양태에서, 본 발명은 EGFRvIII-발현성 암 세포 집단을, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 본 발명의 CAR-발현성 세포, 예를 들어 T 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 증식을 억제하거나 또는 EGFRvIII을 발현하는 암 세포 집단을 감소시키는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 EGFRvIII-발현성 암 세포 집단을, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본 발명의 EGFRvIII CART 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 증식을 억제하거나 또는 EGFRvIII을 발현하는 암 세포 집단을 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 EGFRvIII CART 세포는 음성 대조군과 비교해서 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 신경교종 또는 또 다른 암에 대한 동물 모델 또는 이를 보유한 대상체에서 세포 및/또는 암 세포의 양, 수, 양 또는 비율(%)을 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 65% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 감소시킨다. 한 측면에서, 대상체는 인간이다.

[0305] 본 발명은 또한, EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 장애를 예방, 치료 및/또는 관리할 필요가 있는 대상체에게, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포를 투여하는 것을 포함하는, 상기 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 장애 (예를 들어, 교모세포종)를 예방, 치료 및/또는 관리하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 대상체는 인간이다.

[0306] 본 발명은 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 암의 재발을 방지할 필요가 있는 대상체에게, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포를 투여하는 것을 포함하는, 상기 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 암의 재발을 방지하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 암의 재발을 방지할 필요가 있는 대상체에게, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포의 유효량을, 또 다른 요법의 유효량과 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0307] 한 측면에서, 본 발명은 포유동물 T 세포에서 발현하기 위하여 프로모터와 작동적으로 연결된 EGFRvIII CAR을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 한 측면에서, 본 발명은 EGFRvIII-발현성 종양을 치료하는데 사용하기 위한 EGFRvIII CAR을 발현하는 재조합 T 세포를 제공한다. 항-EGFRvIII CAR을 발현하는 재조합 T 세포는 EGFRvIII CART로 명명된다. 한 측면에서, 본 발명의 EGFRvIII CART는 종양 세포를, 그의 표면 상에 발현된 본 발명의 하나 이상의 EGFRvIII CAR과 접촉시킬 수 있으므로, EGFRvIII CART가 항원에 대해 반응하여 활성화되고 이러한 CART는 종양 세포를 표적으로 하며 종양의 성장이 억제된다.

[0308] 한 측면에서, 본 발명은 EGFRvIII-발현성 종양 세포를 본원에 기재된 EGFRvIII CAR T 세포와 접촉시켜, 이러한 CART가 항원에 반응하여 활성화되고 암 세포를 표적으로 하는 것을 포함하는 (여기서, 종양의 성장이 억제된다), 상기 EGFRvIII-발현성 종양 세포의 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다. 한 측면에서, 상기 활성화된 CART는 암 세포를 표적으로 하고 이를 사멸시킨다.

[0309] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 대상체에게 본원에 기재된 EGFRvIII CAR T 세포를 투여하여, 이러한 대상체 내의 암을 치료하는 것을 포함한다. 본 발명의 EGFRvIII CAR T 세포에 의해 치료될 수 있는 암의 한 예는 EGFRvIII의 발현과 연관된 암이다. 한 측면에서, EGFRvIII의 발현과 연관된 암은 교모세포종이다.

- [0310] 한 측면에서, EGFRvIII과 연관된 암은 다형성 교모세포종 (GBM), 역형성 성상세포종, 거대 세포 교모세포종, 신경교육종, 역형성 피지교종, 역형성 상피세포종, 맥락종 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상피모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 및 비정형 기형양/형문근양 종양, 비소 세포 폐 암종, 폐 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 난소 암종, 결장직장 암종 및 방광 암종, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0311] 본 발명은 T 세포가 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 이를 유전자 변형시키고, 이러한 CAR T 세포를, 세포성 요법을 필요로 하는 수용자에게 주입하는, 특정 유형의 세포성 요법을 포함한다. 주입된 세포는 상기 수용자 내의 종양 세포를 사멸시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR-변형된 T 세포는 생체내에서 복제하여, 지속된 종양 제어를 유발시킬 수 있는 장기간 영속성을 초래할 수 있다. 각종 측면에서, 환자 또는 그의 자손에게 투여된 T 세포는, T 세포를 환자에게 투여한지 적어도 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 후 동안 상기 환자에게 영속된다.
- [0312] 한 측면에서, 본원에 기재된 CAR-변형된 T 세포는 포유동물에서 생체의 면역 및/또는 생체내 요법을 위한 특정 유형의 백신일 수 있다. 한 측면에서, 포유동물은 인간이다.
- [0313] 생체의 면역과 관련하여, 상기 세포를 포유동물에게 투여하기 이전에 다음 중 한 가지 이상이 시험관내에서 발생한다: i) 세포가 확장하거나, ii) CAR을 코딩하는 핵산을 세포 내로 도입하거나 또는 iii) 세포를 냉동 보존한다.
- [0314] 생체의 과정은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 다음에 보다 상세히 논의된다. 간략하게 언급하면, 세포를 포유동물 (예를 들어, 인간)로부터 단리하고, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터로 유전자 변형시킨다 (예를 들어, 시험관내에서 형질도입시키거나 형질감염시킨다). 이러한 CAR-변형된 세포를 포유동물 수용자에게 투여하여 치료적 이득을 제공할 수 있다. 포유동물 수용자는 인간일 수 있고, CAR-변형된 세포는 상기 수용자와 관련하여 자가일 수 있다. 또 다른 한편으로, 세포가 수용자와 관련하여 동종, 동계 또는 이종일 수 있다.
- [0315] 조혈 줄기 및 전구 세포의 생체의 확장 과정은 미국 특허 번호 5,199,942 (이는 본원에 참조로 포함된다)에 기재되어 있고, 본 발명의 세포에 적용할 수 있다. 기타 적합한 방법이 당해 분야에 공지되어 있으므로, 본 발명은 세포를 생체의 확장하기 위한 어떠한 특별한 방법으로도 제한되지 않는다. 간략하게 언급하면, T 세포의 생체의 배양 및 확장은 (1) 말초혈 채취물 또는 골수 외식편으로부터, 특정 포유동물로부터의 CD34+ 조혈 줄기 및 전구 세포를 수집하는 단계; 및 (2) 이러한 세포를 생체외에서 확장시키는 단계를 포함한다. 미국 특허 번호 5,199,942에 기재된 세포성 성장 인자 이외에도, 기타 인자, 예컨대 flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드를 세포의 배양 및 확장에 사용할 수 있다.
- [0316] 생체의 면역 관점에서 세포-기반 백신을 이용하는 것 이외에도, 본 발명은 또한, 환자에서 항원에 대항하여 유도된 면역 반응을 유발시키기 위한 생체내 면역을 위한 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0317] 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포를, 면역기능 저하된 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 활용할 수 있다. 특히, 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 EGFRvIII의 발현과 연관된 질환, 장애 및 병태의 치료에 사용된다. 특정 측면에서, 본 발명의 세포는 EGFRvIII의 발현과 연관된 질환, 장애 및 병태를 발생시킬 위험이 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은 EGFRvIII의 발현과 연관된 질환, 장애 및 병태를 치료하거나 예방시킬 필요가 있는 대상체에게, 치료상 유효량의 본 발명의 CAR-변형된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 상기 EGFRvIII의 발현과 연관된 질환, 장애 및 병태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0318] 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 단독으로 투여하거나, 또는 희석제 및/또는 기타 성분, 예컨대 IL-2 또는 기타 시토카인 또는 세포 집단 또는 기타 약물 치료, 예를 들어 본원에 기재된 약물 치료와 조합하여 제약 조성물로서 투여할 수 있다.
- [0319] 본 발명은 또한, EGFRvIII-발현성 세포를 포함하는 세포 집단을, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 증식을 억제하거나 또는 EGFRvIII-발현성 세포 집단을 감소시키는 방법을 제공한다. 구체적 측면에서, 본 발명은 EGFRvIII-발현성 암 세포 집단을, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 증식을 억제하거나 또는 EGFRvIII을 발현하는 암 세포 집단을 감소시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 EGFRvIII-발현성 암 세포 집단을, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포와 접촉시키는 것을 포함

하는, 증식을 억제하거나 또는 EGFRvIII을 발현하는 암 세포 집단을 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 측면에서, 본 발명의 EGFRvIII CART 세포는 음성 대조군과 비교해서 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 신경교종 또는 또 다른 암에 대한 동물 모델 또는 이를 보유한 대상체에서 세포 및/또는 암 세포의 양, 수, 양 또는 비율(%)을 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 65% 이상, 75% 이상, 85% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 감소시킨다. 한 측면에서, 대상체는 인간이다.

[0320] 본 발명은 또한, EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 질환을 예방, 치료 및/또는 관리할 필요가 있는 대상체에게, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포를 투여하는 것을 포함하는, 상기 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 질환 (예를 들어, 교모세포종)을 예방, 치료 및/또는 관리하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 대상체는 인간이다.

[0321] 본 발명은 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 암의 재발을 방지할 필요가 있는 대상체에게, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포를 투여하는 것을 포함하는, 상기 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 암의 재발을 방지하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 상기 방법은 EGFRvIII-발현성 세포와 연관된 암의 재발을 방지할 필요가 있는 대상체에게, EGFRvIII-발현성 세포와 결합하는 본원에 기재된 EGFRvIII CART 세포의 유효량을, 또 다른 요법의 유효량과 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0322] 조합 요법

[0323] 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 기타 공지된 작용제 및 요법과 조합하여 사용할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, "조합하여" 투여하는 것은 장애로 인해 대상체가 고통받고 있는 동안 이러한 대상체에게 2가지 (또는 그 초과) 상이한 치료를 전달하는 것을 의미하는데, 예를 들어 이러한 2가지 이상의 치료는 대상체가 장애로 진단받은 후 및 장애를 치료하거나 없애기 전 또는 기타 이유로 인해 치료를 중단하기 전에 전달된다. 일부 실시양태에서, 한 가지 치료의 전달은 두 번째 치료의 전달이 시작될 때에도 여전히 이루어지므로, 투여 측면에서 중복이 있다. 이는 종종 본원에서 "동시" 또는 "동시 전달"로서 지칭된다. 다른 실시양태에서, 한 가지 치료의 전달은 다른 치료의 전달이 시작되기 전에 종결된다. 어느 한 경우의 일부 실시양태에서, 치료는 조합 투여로 인해 보다 유효하다. 예를 들어, 두 번째 치료가 더 유효한데, 예를 들어 적은 양의 두 번째 치료를 이용해서 등가의 효과가 관찰되거나, 또는 두 번째 치료가 첫 번째 치료의 부재 하에서 투여된 경우에 관찰되는 것 보다 더 큰 정도로, 두 번째 치료가 증상을 저하시키거나, 또는 첫 번째 치료를 이용한 경우와 유사한 상황이 관찰된다. 일부 실시양태에서, 특정 증상, 또는 장애와 관련된 기타 파라미터 상의 저하가, 다른 치료의 부재 하에서 전달된 한 가지 치료를 이용한 경우에 관찰되는 것 보다 더 크도록 전달된다. 두 치료의 효과는 부분적으로 부가적이거나, 완전히 부가적이거나, 또는 부가적인 것 보다 더 클 수 있다. 전달된 첫 번째 치료의 효과가 두 번째 치료를 전달할 때에도 여전히 검출 가능하도록 전달이 이루어질 수 있다.

[0324] 본원에 기재된 CAR-발현성 세포와 한 가지 이상의 부가 치료제를 동일한 조성물 또는 별개의 조성물 중에서 동시에 투여하거나 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 순차적으로 투여하는 경우, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포를 먼저 투여하고, 부가의 작용제를 두 번째로 투여할 수 있거나, 또는 투여 순서를 바꿀 수 있다.

[0325] 추가 측면에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 수술, 화학요법, 방사선 요법, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트 및 FK506; 항체 또는 기타 면역제거제, 예컨대 CAMPATH, 항-CD3 항체 또는 기타 항체 요법, 시토킨, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신(rapamycin), 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 시토킨 및 방사선 요법과 조합하여 치료 요법에 사용할 수 있다. 악성 신경교종에 대한 예시되는 면역요법 접근 방식은 문헌 [Johnson et al. 2010 Curr Neurol Neurosci Rep 10:259-266]에 개시되어 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 세포의 매트릭스 단백질을 표적으로 하는 작용제, 예컨대 텐신(tenscin), 예를 들어 항-테나신 항체, 예를 들어 ²¹¹At-표지된 항-테나신 항체와 조합하여 치료 요법에 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 면역조절제, 예컨대 인터페론 알파, 인터페론 베타, TGF-β2 펩티드 억제제, 또는 폴리-ICLC와 조합하여 치료 요법에 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 WT1 전사 인자 펩티드 백신, 예컨대 문헌 [Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971]에 기재된 백신과 조합하여 치료 요법에 사용할 수 있다.

[0326] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 화학요법제와 조합하여 사용할 수 있다. 예시되는 화학요법제는 알킬화제, 백금-기반 작용제, 혈관형성 억제제 (예를 들어, VEGF 경로 억제제), 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, EGF 경로 억제제), mTOR 억제제를 포함한다.

[0327] 조합 요법에 사용하기 위해 고려된 일반적인 화학요법제는 아나스트로졸 [아리미덱스(Arimidex)®], 비칼루타미

드 [카소텍스(Casodex)®], 블레오마이신 술페이트 [블레녹산(Blenoxane)®], 부술판 [밀레란(Myleran)®], 부술판 주사제 [부술팩스(Busulfex)®], 카페시타빈 [젤로다(Xeloda)®], N4-펜톡시카르보닐-5-데옥시-5-플루오로 시티딘, 카르보플라틴 [파라플라틴(Paraplatin)®], 카르무스틴 (BiCNU)®, 클로람부실 [류케란(Leukeran)®], 시스플라틴 [플라티놀(Platinol)®], 클라드리빈 [류스타틴(Leustatin)®], 시클로포스파미드 [시톡산(Cytosar)® 또는 네오사르(Neosar)®], 시타라빈, 시토신 아라비노시드 [시토사르-U(Cytosar-U)®], 시타라빈 리포솜 주사제 [데포시트(DepoCyt)®], 다카르바진 [DTIC-돔(DTIC-Dome)®], 닥티노마이신 [액티노마이신 D; 코스메간 (Cosmegen)], 다우노루비신 히드로클로라이드 [세루비딘(Cerubidine)®], 다우노루비신 시트레이트 리포솜 주사제 [다우노좀(DaunoXome)®], 액사메타손, 도세탁셀 [탁소테레(Taxotere)®], 독소루비신 히드로클로라이드 [아드리아마이신(Adriamycin)®, 루벡스(Rubex)®], 에토포시드 [베페시드(Vepesid)®], 플루다라빈 포스페이트 [플루다라(Fludara)®], 5-플루오로우라실 [아드루실(Adrucil)®, 에푸텍스(Efudex)®, 플루타미드 [에울렉신 (Eulexin)®], 테자시티빈, 켄시타빈 (디플루오로테옥시시티딘), 히드록시우레아 [히드레아(Hydrea)®], 아다루비신 [이다마이신(Idamycin)®], 이포스파미드 (IFEX)®, 이리노테칸 [캄프토사르(Camptosar)®], L-아스파라기 나제 (ELSPAR)®, 류코보린 칼슘, 멜팔란 [알케란(Alkeran)®], 6-머캅토프린 [푸리네톨(Purinethol)®], 메토 트렉세이트 [폴렉스(Folex)®], 미톡산트론 [노반트론(Novantrone)®], 밀로타그, 파클리탁셀 [탁솔(Taxol)®], 피닉스 (이트롭90/MX-DTPA), 펜토스타틴, 카르무스틴 이식체를 수반한 폴리페프로산 20 [글리아델(Gliadel)®], 타목시펜 시트레이트 [놀바텍스(Nolvadex)®], 테니포시드 [부몬(Vumon)®], 6-티오구아닌, 티오테파, 티라파자민 [티라존(Tirazone)®], 주사용 토포테칸 히드로클로라이드 [히캄프틴(Hycamptin)®], 빈 블라스틴 [벨반(Velban)®], 빈크리스틴 [온코빈(Oncovin)®], 및 비노렐빈 [나벨빈(Navelbine)®]을 포함한다.

[0328] 예시되는 알킬화제는 질소 머스터드, 에틸렌이민 유도체, 알킬 술포네이트, 니트로소우레아 및 트리아젠; 우라실 머스터드 [아미노우라실 머스터드((Aminouracil Mustard)®, 클로르에타민아실(Chlorethaminacil)®, 데메틸도판(Demethyldopan)®, 데스메틸도판(Desmethyldopan)®, 하에만타민(Haemanthamine)®, 노르도판 (Nordopan)®, 우라실 질소 머스터드(Uracil nitrogen mustard)®, 우라실로스트(Uracillost)®, 우라실모스타 자(Uracilmostaza)®, 우라무스틴(Uramustin)®, 우라무스틴®], 클로르메틴 [무스타르겐(Mustargen)®], 시클로포스파미드 [시톡산®, 네오사르®, 클라펜(Clafen)®, 엔독산(Endoxan)®, 프로시톡스(Procytox)®, 레빔무네(Revimmune)™], 이포스파미드 [미톡사나(Mitoxana)®], 멜팔란 (알케란)®, 클로람부실 (류케란)®, 피포르만 [아메델(Amedel)®, 베르시트(Vercyte)®], 트리에틸렌멜라민 [헤멜(Hemel)®, 헥살렌(Hexalen)®, 헥사 스타트(Hexastat)®], 트리에틸렌티오포스포아민, 테모줄로미드 [테모다르(Temodar)®], 티오테파 [티오플렉스(Thioplex)®], 부술판 [부실벡스(Busilvex)®, 밀레란®], 카르무스틴 (BiCNU)®, 로무스틴 (CeeNU)®, 스트렙토조신 [자노사르(Zanosar)®], 및 다카르바진 (DTIC-돔)®를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 부가의 예시되는 알킬화제는 옥살리플라틴 [엘록사틴(Eloxatin)®]; 테모줄로미드 [테모다르(Temodar)® 및 테모달 (Temodal)®]; 닥티노마이신 [액티노마이신-D로서 공지되기도 함, 코스메겐(Cosmegen)®]; 멜팔란 [L-PAM, L-사르코리신 및 페닐알라닌 머스터드로서 공지되기도 함, 알케란®]; 알트레타민 [헥사메틸멜라민 (HMM)으로서 공지되기도 함, 헥살렌(Hexalen)®]; 카르무스틴 (BiCNU)®; 벤다무스틴 [트레안다(Treanda)®]; 부술판 (부술팩스® 및 밀레란)®; 카르보플라틴 (파라플라틴)®; 로무스틴 [CCNU로서 공지되기도 함, CeeNU®]; 시스플라틴 (CDDP로서 공지되기도 함, 플라티놀® 및 플라티놀®-AQ); 클로람부실 (류케란)®; 시클로포스파미드 (시톡산® 및 네오사르)®; 다카르바진 (DTIC, DIC 및 이미다졸 카르복사미드로서 공지되기도 함, DTIC-돔)®; 알트레타민 [헥사메틸멜라민 (HMM)으로서 공지되기도 함, 헥살렌®]; 이포스파미드 [이팩스(Ifex)®]; 프레드누무스틴; 프로카르바진 [마툴란(Matulane)®]; 메클로르에타민 (질소 머스터드, 무스틴 및 메클로로에타민 히드로클로라이드로서 공지되기도 함, 무스타르겐)®; 스트렙토조신 [자노사르(Zanosar)®]; 티오테파 [티오포스포아미드, TESPA 및 TSPA로서 공지되기도 함, 티오플렉스®]; 시클로포스파미드 [엔독산®, 시톡산®, 네오사르®, 프로시톡스®, 레빔무네®]; 및 벤다무스틴 HCl (트레안다)®를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0329] 예시되는 백금 기반 작용제는 카르보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라틴을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0330] 예시되는 혈관형성 억제제는 A6 [앙스트롬 파마슈티칼즈(Angstrom Pharmaceuticals)], ABT-510 [애보트 라보라 토리즈(Abbott Laboratories)], ABT-627 [아트라센탄(Atrasentan)] [애보트 라보라토리즈/신레이(Xinlay)], ABT-869 (애보트 라보라토리즈), 액티미드(Actimid) [CC4047, 포말리도미드(Pomalidomide)] [셀젠 코퍼레이션 (Celgene Corporation)], AdGVPEDF.11D [젠벡(GenVec)], ADH-1 [엑스헤린(Exherin)] [아드헤렉스 테크놀로지 (Adherex Technologies)], AEE788 [노바르티스(Novartis)], AG-013736 [엑시티닙(Axitinib)] [화이자 (Pfizer)], AG3340 [프리노마스타트(Prinomastat)] [아고우론 파마슈티칼즈(Agouron Pharmaceuticals)], AGX1053 [안지오제넥스(AngioGenex)], AGX51 (안지오제넥스), ALN-VSP (ALN-VSP 02) [알니람 파마슈티칼즈 (Alnylam Pharmaceuticals)], AMG 386 [암젠(Amgen)], AMG706 (암젠), 아파티닙(Apatinib) (YN968D1) [지양수

헝루이 메디슨(Jiangsu Hengrui Medicine)], AP23573 [리다포롤리무스(Ridaforolimus)/MK8669] [아리아드 파마슈티칼즈(Ariad Pharmaceuticals)], AQ4N [노바베아(Novavea)], ARQ 197 [아르쿨레(ArQule)], ASA404 [노바르티스/안티소마(Antisoma)], 아티프리모드(Atiprimod) [칼리스토 파마슈티칼즈(Callisto Pharmaceuticals)], ATN-161 [아테누온(Attenuon)], AV-412 [아베오 파마슈티칼즈(Aveo Pharmaceuticals)], AV-951 (아베오 파마슈티칼즈), 아바스틴(Avastin) [베바시주맙(Bevacizumab)] [제넨텍(Genentech)], AZD2171 [세디라닙(Cediranib)/레센틴(Recentin)] [아스트라제네카(AstraZeneca)], BAY 57-9352 [텔라티닙(Telatinib)] [바이엘(Bayer)], BEZ235 (노바르티스), BIBF1120 [베링거 인겔하임 파마슈티칼즈(Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)], BIBW 2992 (베링거 인겔하임 파마슈티칼즈), BMS-275291 [브리스톨-마이어스 스킵(Bristol-Myers Squibb)], BMS-582664 [브리바닙(Brivanib)] (브리스톨-마이어스 스킵), BMS-690514 (브리스톨-마이어스 스킵), 칼시트리올(Calcitriol), CCI-779 [토리셀(Torisel)] [와이어스(Wyeth)], CDP-791 [임클론 시스템즈(ImClone Systems)], 세플라토닌(Ceflatonin) [호모하링토닌(Homoharringtonine)/HHT] [켄제넥스 더라퓨틱스(ChemGenex Therapeutics)], 셀레브렉스(Celebrex) [셀레콕시(Celecoxib)] (화이자), CEP-7055 [세팔론(Cephalon)/사노피(Sanofi)], CHIR-265 [키론 코포레이션(Chiron Corporation)], NGR-TNF, COL-3 [메타스타트(Metastat)] [콜라게넥스 파마슈티칼즈(Collagenex Pharmaceuticals)], 콤브레타스타틴(Combretastatin) [옥시젠(Oxigene)], CP-751,871 [피기투무맙(Figitumumab)] (화이자), CP-547,632 (화이자), CS-7017 [다이이치 산쿄 파마(Daiichi Sankyo Pharma)], CT-322 [안지오셉트(Angiocept)] [아드넥서스(Adnexus)], 쿠르쿠민(Curcumin), 달테파린(Dalteparin) [프라그민(Fragmin)] (화이자), 디설파피람(Disulfiram) [안타부세(Antabuse)], E7820 [에이사이 리미티드(Eisai Limited)], E7080 (에이사이 리미티드), EMD 121974 [실렌기티드(Cilengitide)] (EMD 파마슈티칼즈), ENMD-1198 [엔트레메드(EntreMed)], ENMD-2076 (엔트레메드), 엔도스타르(Endostar) [심세레(Simcere)], 에르비투스(Erbix) [임클론(ImClone)/브리스톨-마이어스 스킵], EZN-2208 [엔존 파마슈티칼즈(Enzon Pharmaceuticals)], EZN-2968 (엔존 파마슈티칼즈), GC1008 [젠자임(Genzyme)], 제니스테인(Genistein), GSK1363089 [포레티닙(Foretinib)] [글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)], GW786034 [파조파닙(Pazopanib)] (글락소스미스클라인), GT-111 [바스쿨라 바이오제닉스 리미티드(Vascular Biogenics Ltd.)], IMC--1121B [라무시루맙(Ramucirumab)] (임클론 시스템즈), IMC-18F1 (임클론 시스템즈), IMC-3G3 (임클론 LLC), INCB007839 [인사이트 코포레이션(Incyte Corporation)], INGN 241 [인트로젠 더라퓨틱스(Introgen Therapeutics)], 이레사(Iressa) [ZD1839/제피티닙(Gefitinib)], LBH589 [파리닥((Faridak)/파노비노스트스트(Panobinostat)] (노바르티스), 루센티스(Lucentis) [라니비주맙(Ranibizumab)] (제넨텍/노바르티스), LY317615 [엔자스타우린(Enzastaurin)] [일라이 릴리 앤드 캄파니(Eli Lilly and Company)], 매쿠젠(Macugen) [페갑타닙(Pegaptanib)] (화이자), MEDI522 [아베그린(Abegrin)] [메드임문(MedImmune)], MLN518 [탄두티닙(Tandutinib)] [밀레늄(Millennium)], 네오바스타트(Neovastat) [AE941/베네펜(Benefin)] [아에테르나 젠타리스(Aeterna Zentaris)], 넥사바르(Nexavar) [바이엘/오닉스(Onyx)], NM-3 (젠자임 코포레이션), 노스카핀(Noscapine) [코우가르 바이오테크놀로지(Cougar Biotechnology)], NPI-2358 [네레우스 파마슈티칼즈(Nereus Pharmaceuticals)], OSI-930 (OSI), 팔로미드(Palomid) 529 [팔로마 파마슈티칼즈, 인크.(Paloma Pharmaceuticals, Inc.)], 판젠크 캡슐(Panzem Capsules) (2ME2) (엔트레메드), 판젠크 NCD (2ME2) (엔트레메드), PF-02341066 (화이자), PF-04554878 (화이자), PI-88 [프로젠 인더스트리즈(Progen Industries)/메디젠 바이오 테크놀로지(Medigen Biotechnology)], PKC412 (노바르티스), 폴리페논 E (녹차 추출물) [폴리페논 E 인터내셔널, 인크.(Polypheno E International, Inc.)], PPI-2458 [프라에시스 파마슈티칼즈(Praecis Pharmaceuticals)], PTC299 [PTC 더라퓨틱스(PTC Therapeutics)], PTK787 [바탈라닙(Vatalanib)] (노바르티스), PXD101 [벨리노스타트(Belinostat)] [쿠라젠 코포레이션(CuraGen Corporation)], RAD001 [에베롤리무스(Everolimus)] (노바르티스), RAF265 (노바르티스), 레고라페닙(Regorafenib) (BAY73-4506) (바이엘), 레블리미드(Revlimid) [셀젠(Celgene)], 레타아네(Retaane) [알콘 리서치(Alcon Research)], SN38 [리포소말(Liposomal)] [네오팜(Neopharm)], SNS-032 (BMS-387032) [수네시스(Sunesis)], SOM230 [파시레오티드(Pasireotide)] (노바르티스), 스쿠알라민(Squalamine) [제나에라(Genaera)], 수라민(Suramin), 수텐트(Sutent) (화이자), 타르세바(Tarceva) (제넨텍), TB-403 [트롬보제닉스(Thrombogenics)], 템포스타틴(Tempostatin) [콜라드 바이오파마슈티칼즈(Collard BioPharmaceuticals)], 테트라티오몰리브데이트(Tetrathiomolybdate) [시그마-알드리히(Sigma-Aldrich)], TG100801 타르게젠(TargeGen), 탈리도미드(Thalidomide) (셀젠 코포레이션), 틴자파린 소듐(Tinzaparin Sodium), TKI258 (노바르티스), TRC093 [트라콘 파마슈티칼즈 인크.(Tacon Pharmaceuticals Inc.)], VEGF 트랩(Trap) [아플리베르셉트(Aflibercept)] [레제네론 파마슈티칼즈(Regeneron Pharmaceuticals)], VEGF 트랩-아이(Trap-Eye) (레제네론 파마슈티칼즈), 베글린(Veglin) [바스젠 더라퓨틱스(VasGene Therapeutics)], 보르테조미브(Bortezomib) (밀레늄), XL184 [엑셀릭시스(Exelixis)], XL647 (엑셀릭시스), XL784 (엑셀릭시스), XL820 (엑셀릭시스), XL999 (엑셀릭시스), ZD6474 (아스트라제네카), 보리노스타트

(Vorinostat) [머크(Merck)], 및 ZSTK474를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0331]

예시되는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 수용체 억제제는 베바시주맙(Bevacizumab) [아바스틴(Avastin)®], 악시티닙(axitinib) [인리타(Inlyta)®]; 브리바닙 알라니네이트(Brivinib alaninate) [BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-플루오로-2-메틸-1H-인돌-5-일옥시)-5-메틸피롤로[2,1-f][1,2,4]트리아진-6-일옥시)프로판-2-일)-2-아미노프로판노에이트]; 소라페닙(Sorafenib) [넥사바르(Nexavar)®]; 파조파닙(Pazopanib) [보트리엔트(Votrient)®]; 수니티닙 말레이트(Sunitinib malate) [수텐트(Sutent)®]; 세디라닙(Cediranib) (AZD2171, CAS 288383-20-1); 바르가테프(Vargatef) (BIBF1120, CAS 928326-83-4); 포레티닙(Foretinib) (GSK1363089); 텔라티닙(Telatinib) (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); 아파티닙(Apatinib) (YN968D1, CAS 811803-05-1); 이마티닙(Imatinib) [글리벡(Gleevec)®]; 포나티닙(Ponatinib) (AP24534, CAS 943319-70-8); 티보자닙(Tivozanib) (AV951, CAS 475108-18-0); 레고라페닙(Regorafenib) (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); 바탈라닙(Vatalanib) 디히드로클로라이드 (PTK787, CAS 212141-51-0); 브리바닙(Brivinib) (BMS-540215, CAS 649735-46-6); 반데타닙(Vandetanib) [카프렐사(Caprelsa)® 또는 AZD6474]; 모테사닙(Motesanib) 디포스페이트 [AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-디히드로-3,3-디메틸-1H-인돌-6-일)-2-((4-피리디닐메틸)아미노)-3-피리딘카르복사미드 (PCT 공개 번호 WO 02/066470에 기재됨)]; 도비티닙(Dovitinib) 디락트산 (TKI258, CAS 852433-84-2); 린파닙(Linfanib) (ABT869, CAS 796967-16-3); 카보잔티닙(Cabozantinib) (XL184, CAS 849217-68-1); 레스타우르티닙(Lestaurtinib) (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-디메틸에틸)-2-옥사졸릴]메틸]티오]-2-티아졸릴]-4-피페리딘카르복사미드 (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-아미노-1-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피롤로[2,1-f][1,2,4]트리아진-5-일)메틸)피페리딘-3-올 (BMS690514); N-(3,4-디클로로-2-플루오로페닐)-6-메톡시-7-[(3a α ,5 β ,6a α)-옥타히드로-2-메틸시클로헥센[c]피롤-5-일]메톡시-4-퀴나졸린아민 (XL647, CAS 781613-23-8); 4-메틸-3-[[1-메틸-6-(3-피리디닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노]-N-[3-(트리플루오로메틸)페닐]-벤즈아미드 (BHG712, CAS 940310-85-0); 및 아플리베르셉트(Aflibercept) [에일레아(Eylea)®]를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0332]

예시되는 EGF 경로 억제제는 티르포스틴(tyrophostin) 46, EKB-569, 에를로티닙(erlotinib) [타르세바(Tarceva)®], 제피티닙(gefitinib) [이레사(Iressa)®], 에르비투스(erbitux), 니모투주맙(nimotuzumab), 라파티닙(lapatinib) [티케르브(Tykerb)®], 세툽시맙(cetuximab) (항-EGFR mAb), ¹⁸⁸Re-표지된 니모투주맙(nimotuzumab) (항-EGFR mAb), 및 WO 97/02266, EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0 520 722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, US 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 및 WO 96/33980에 일반적이고도 구체적으로 개시되어 있는 화합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시되는 EGFR 항체는 세툽시맙(Cetuximab) [에르비투스(Erbitux)®]; 파니투무맙(Panitumumab) [벡티빅스(Vectibix)®]; 마투주맙(Matuzumab) (EMD-72000); 트라스투주맙(Trastuzumab) [헤르셉틴(Herceptin)®]; 니모투주맙(Nimotuzumab) (hR3); 잘루투무맙(Zalutumumab); 테라(Thera)CIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); 및 ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시되는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제는 에를로티닙 히드로클로라이드 (타르세바)®, 제피티닙(Gefitinib) (이레사)®; N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-[[[3'-'S']-테트라히드로-3-푸라닐]옥시]-6-퀴나졸리닐]-4-(디메틸아미노)-2-부텐아미드, [토복(Tovok)®]; 반데타닙(Vandetanib) [카프렐사(Caprelsa)®]; 라파티닙(Lapatinib) [티케르브(Tykerb)®]; (3R,4R)-4-아미노-1-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피롤로[2,1-f][1,2,4]트리아진-5-일)메틸)피페리딘-3-올 (BMS690514); 카네르티닙(Canertinib) 디히드로클로라이드 (CI-1033); 6-[4-[(4-에틸-1-피페라지닐)메틸]페닐]-N-[(1R)-1-페닐에틸]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-아민 (AEE788, CAS 497839-62-0); 무브리티닙(Mubritinib) (TAK165); 펠리티닙(Pelitinib) (EKB569); 아파티닙(Afatinib) (BIBW2992); 네라티닙(Neratinib) (HKI-272); N-[4-[[1-[(3-플루오로페닐)메틸]-1H-인다졸-5-일]아미노]-5-메틸피롤로[2,1-f][1,2,4]트리아진-6-일]-카르바산, (3S)-3-모르폴리닐메틸 에스테르 (BMS599626); N-(3,4-디클로로-2-플루오로페닐)-6-메톡시-7-[[[3a α ,5 β ,6a α)-옥타히드로-2-메틸시클로헥센[c]피롤-5-일]메톡시-4-퀴나졸린아민 (XL647, CAS 781613-23-8); 및 4-[4-[(1R)-1-페닐에틸]아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-6-일]-페놀 (PKI166, CAS 187724-61-4)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0333]

예시되는 mTor 억제제는 라파마이신 [라파무네(Rapamune)®], 및 그의 유사체 및 유도체; SDZ-RAD; 템시롤리무스(Temsirolimus) [토리셀(Torisel)®; CCI-779로서 공지되기도 함]; 리다포롤리무스(Ridaforolimus) [이전에 데페롤리무스 (deferolimus)로서 공지됨, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-디히드록시-19,30-디메톡시-15,17,21,23,29,35-헥사메틸-2,3,10,14,20-펜타옥소-11,36-디옥사-4-아자트리시클로[30.3.1.0^{4,9}] 헥사트리아콘

타-16,24,26,28-테트라엔-12-일]프로필]-2-메톡시시클로헥실 디메틸포스포네이트; 또한 AP23573 및 MK8669로서 공지되고, PCT 공개 번호 WO 03/064383에 기재됨]; 에베롤리무스(Everolimus) [아피니토르(Afinitor)® 또는 RAD001]; 라파마이신 [AY22989, 시롤리무스(Sirolimus)®]; 시마피모드(Simapimod) (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-비스[(3S)-3-메틸모르폴린-4-일]피리도[2,3-d]피리미딘-7-일}-2-메톡시페닐)메탄올 (AZD8055); 2-아미노-8-[트랜스-4-(2-히드록시에톡시)시클로헥실]-6-(6-메톡시-3-피리디닐)-4-메틸-피리도[2,3-d]피리미딘-7(8H)-온 (PF04691502, CAS 1013101-36-4); 및 N²-[1,4-디옥소-4-[[4-(4-옥소-8-페닐-4H-1-벤조피란-2-일)모르폴리늄-4-일]메톡시]부틸]-L-아르기닐글리실-L-α-아스파르틸-L-세린-, 내부 염 (SF1126, CAS 936487-67-1)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0334] 예시되는 포스포이노시티드 3-키나제 (PI3K) 억제제는 4-[2-(1H-인다졸-4-일)-6-[[4-(메틸술포닐)피페라진-1-일]메틸]티에노[3,2-d]피리미딘-4-일]모르폴린 (GDC 0941로서 공지되기도 하고 PCT 공개 번호 WO 09/036082 및 WO 09/055730에 기재됨); 2-메틸-2-[4-[3-메틸-2-옥소-8-(퀴놀린-3-일)-2,3-디히드로이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]페닐]프로피오니트릴 (BEZ 235 또는 NVP-BEZ 235로서 공지되기도 하고 PCT 공개 번호 WO 06/122806에 기재됨); 4-(트리플루오로메틸)-5-(2,6-디모르폴리노피리미딘-4-일)피리딘-2-아민 (BKM120 또는 NVP-BKM120으로서 공지되기도 하고 PCT 공개 번호 WO2007/084786에 기재됨); 토자세르티브(Tozasertib) (VX680 또는 MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-피리디닐)-6-퀴놀리닐]메틸렌]-2,4-디아졸리딘온 (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(아세틸옥시)-1-[(디-2-프로페닐아미노)메틸렌]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-옥타히드로-11-히드록시-4-(메톡시메틸)-4a,6a-디메틸-시클로펜타[5,6]나프토[1,2-c]피란-2,7,10(1H)-트리온 (PX866, CAS 502632-66-8); 및 8-페닐-2-(모르폴린-4-일)-크로멘-4-온 (LY294002, CAS 154447-36-6)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시되는 단백질 키나제 B (PKB) 또는 AKT 억제제는 8-[4-(1-아미노시클로부틸)페닐]-9-페닐-1,2,4-트리아졸로[3,4-f][1,6]나프티리딘-3(2H)-온 (MK-2206, CAS 1032349-93-1); 페리포신(Perifosine) (KRX0401); 4-도데실-N-1,3,4-티아디아졸-2-일-벤젠술포나미드 (PHT-427, CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-일)-1-에틸-7-[(3S)-3-피페리디닐메톡시]-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-4-일]-2-메틸-3-부틴-2-올 (GSK690693, CAS 937174-76-0); 8-(1-히드록시에틸)-2-메톡시-3-[(4-메톡시페닐)메톡시]-6H-디벤조[b,d]피란-6-온 [팔로미드(palomid) 529, P529, 또는 SG-00529]; 트리시르빈(Tricirbine) (6-아미노-4-메틸-8-(β-D-리보푸라노실)-4H,8H-피롤로[4,3,2-de]피리미도[4,5-c]피리다진); (αS)-α-[[[5-(3-메틸-1H-인다졸-5-일)-3-피리디닐]옥시]메틸]-벤젠에탄아민 (A674563, CAS 552325-73-2); 4-[(4-클로로페닐)메틸]-1-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-4-피페리딘아민 (CCT128930, CAS 885499-61-6); 4-(4-클로로페닐)-4-[4-(1H-피라졸-4-일)페닐]-피페리딘 (AT7867, CAS 857531-00-1); 및 아르헉신(Archexin) (RX-0201, CAS 663232-27-7)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0335] 칼슘 의존성 포스포타제 칼시네우린을 억제하는 약물 (시클로스포린 및 FK506) 또는 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제하는 약물 (라파마이신) (문헌 [Liu et al., Cell 66:807-815, 1991]; [Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991]; [Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993])을 사용할 수도 있다. 추가 측면에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, 화학요법제 (예컨대, 플루다라빈)을 이용하는 T 세포 제거 요법, 외부-빔 방사선 요법 (XRT), 시클로포스파미드, 및/또는 항체, 예컨대 OKT3 또는 CAMPATH와 연계해서 (예를 들어, 전에, 동시에 또는 후에) 환자에게 투여할 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 세포 조성물은 B-세포 제거 요법, 예컨대 CD20과 반응하는 작용제, 예를 들어 리툭산 투여 후에 투여한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 대상체에게 고 용량의 화학요법을 이용한 표준 치료에 이어 말초혈 줄기 세포 이식을 받게 할 수 있다. 특정의 실시양태에서, 이식 후, 대상체에게 본 발명의 확장된 면역 세포를 주입한다. 부가의 실시양태에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여한다.

[0336] 한 실시양태에서, 대상체에게 CAR-발현성 세포의 투여와 연관된 부작용을 저하 또는 완화시켜 주는 작용제를 투여할 수 있다. CAR-발현성 세포의 투여와 연관된 부작용은 CRS, 및 혈구탐식성 림프조직구성숙증 (HLH) [또한, 대식세포 활성화 증후군 (MAS)으로 명명됨]을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. CRS의 증상은 고열, 오심, 일시적 저혈압, 저산소증 등을 포함한다. 따라서, 본원에 기재된 방법은 본원에 기재된 CAR-발현성 세포를 대상체에게 투여하고, CAR-발현성 세포를 이용한 치료로부터 비롯되는 가용성 인자의 상승 수준을 관리하는 작용제를 추가로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체에서 상승된 가용성 인자는 IFN-γ, TNF α, IL-2 및 IL-6 중 하나 이상이다. 따라서, 상기 부작용을 치료하기 위해 투여된 작용제는 이들 가용성 인자 중 하나 이상을 중화시키는 작용제일 수 있다. 이러한 작용제는 스테로이드, TNF α의 억제제, 및 IL-6의 억제제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. TNF α 억제제의 한 예는 엔타네르셉트(entanercept)이다. IL-6 억제

제의 한 예는 토실리주맵(Tocilizumab) (toc)이다.

[0337] 한 실시양태에서, 대상체에게 CAR-발현성 세포의 활성을 증강시키는 작용제를 투여할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 이러한 작용제는 억제성 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 일부 실시양태에서, 억제성 분자, 예를 들어 프로그램된 사멸 1 (PD1)은 면역 이펙터 반응을 서서히 증가시킬 수 있는 CAR-발현성 세포의 능력을 저하시킬 수 있다. 억제성 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TGFR 베타를 포함한다. 예를 들어, DNA, RNA 또는 단백질 수준을 억제함으로써 억제성 분자를 억제하는 것은 CAR-발현성 세포 성능을 최적화시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 억제성 핵산, 예를 들어 억제성 핵산, 예를 들어 dsRNA, 예를 들어 siRNA 또는 shRNA를 사용하여, CAR-발현성 세포 중의 억제성 분자의 발현을 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 억제제는 shRNA이다. 특정 실시양태에서, 억제성 분자는 CAR-발현성 세포 내에서 억제된다. 이들 실시양태에서, 억제성 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자는 CAR의 특정 성분, 예를 들어 모든 성분을 코딩하는 핵산과 연결된다. 한 실시양태에서, 억제성 신호의 억제제는, 예를 들어 억제성 분자와 결합하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 예를 들어, 상기 작용제는 PD1, PD-L1, PD-L2 또는 CTLA4와 결합하는 항체 또는 항체 단편 [예를 들어, 이필리무맵(ipilimumab) (MDX-010 및 MDX-101로서 지칭되기도 하고, 에르보이(Yervoy)®로서 시판됨; 브리스톨-마이어스 스킵; 트레멜리무맵(Tremelimumab) (화이자로부터 입수 가능한 IgG2 모노클로날 항체; 이전에는 티실리무맵(ticilimumab), CP-675,206으로서 공지됨)]일 수 있다.

[0338] PD1은 CD28, CTLA-4, ICOS, 및 BTLA를 또한 포함하는 CD28 계열의 수용체의 억제성 구성원이다. PD-1은 활성화된 B 세포, T 세포 및 골수성 세포 상에서 발현된다 (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). PD1에 대한 2개의 리간드, 즉 PD-L1과 PD-L2는 PD1과의 결합시 T 세포 활성화를 하향 조절하는 것으로 밝혀졌다 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1은 인간의 암에 풍부하다 (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). 면역 억제는 PD1과 PD-L1 간의 국소 상호 작용을 억제함으로써 역전시킬 수 있다. PD1, PD-L1 및 PD-L2의 항체, 항체 단편 및 기타 억제제는 당해 분야에서 입수 가능하고, 본원에 기재된 CD123 CAR과 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 니볼루맵(nivolumab) (BMS-936558 또는 MDX1106으로서 지칭되기도 함; 브리스톨-마이어스 스킵)은 PD-1을 특이적으로 차단하는 완전 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. 니볼루맵 (클론 5C4) 및 PD-1과 특이적으로 결합하는 기타 인간 모노클로날 항체는 US 8,008,449 및 W02006/121168에 개시되어 있다. 피딜리주맵(Pidilizumab) [CT-011; 큐어 테크(Cure Tech)]은 PD-1과 결합하는 인간화 IgG1k 모노클로날 항체이다. 피딜리주맵 및 기타 인간화 항-PD1 모노클로날 항체는 W02009/101611에 개시되어 있다. 람브롤리주맵(Lambrolizumab) (MK03475로서 공지되기도 함; 머크)은 PD1과 결합하는 인간화 IgG4 모노클로날 항체이다. 람브롤리주맵 및 기타 인간화 항-PD1 항체는 US 8,354,509 및 W02009/114335에 개시되어 있다. MDPL3280A (제넨텍/로슈)는 PD-L1과 결합하는 인간 Fc 최적화 IgG1 모노클로날 항체이다. MDPL3280A 및 PD-L1에 대한 기타 인간 모노클로날 항체는 미국 특허 번호 7,943,743 및 미국 공개 번호 20120039906에 개시되어 있다. 기타 항-PD-L1 결합성 작용제는 YW243.55.S70 (중쇄 및 경쇄 가변 영역은 W02010/077634 내의 서열 20 및 21에 제시된다) 및 MDX-1 105 (BMS-936559로서 지칭되기도 함, 및 예를 들어, W02007/005874에 개시된 항-PD-L1 결합성 작용제)를 포함한다. AMP-224 [B7-DCIg; 앰플리문(Amplimmune); 예를 들어, W02010/027827 및 W02011/066342에 개시됨]는 PD1과 B7-H1 간의 상호 작용을 차단시키는 PD-L2 Fc 융합 가용성 수용체이다. 기타 항-PD1 항체는 특히 AMP 514 (앰플리문), 예를 들어 US 8,609,089, US 2010028330, 및/또는 US 20120114649에 개시된 항-PD1 항체를 포함한다. CAR-발현성 세포의 활성을 증강시키는 작용제는, 예를 들어 제1 도메인과 제2 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있는데, 이러한 제1 도메인은 억제성 분자 또는 그의 단편이고, 제2 도메인은 양성 신호와 연관되는 폴리펩티드, 예를 들어 CD28, ICOS, 및 그의 단편, 예를 들어 CD28 및/또는 ICOS의 세포내 신호전달 도메인인 양성 신호와 연관되는 폴리펩티드이다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 CAR을 발현하는 동일한 세포에 의해 발현된다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 세포, 예를 들어 항-EGFRvIII CAR을 발현하지 않는 T 세포에 의해 발현된다.

[0339] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포의 활성을 증강시키는 작용제는 miR-17-92이다.

[0340] 제약 조성물 및 치료

[0341] 본 발명의 제약 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 CAR-발현성 세포, 예를 들어 복수 개의 CAR-발현성 세포를, 하나 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 슈크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트제, 예컨대

EDTA 또는 글루타치온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 한 측면에서, 정맥내 투여용으로 제제화된다.

[0342] 본 발명의 제약 조성물은 치료하고자 (또는 예방하고자) 하는 질환에 적당한 방식으로 투여할 수 있다. 투여 양 및 투여 횟수는 환자의 상태, 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 요인에 의해 결정될 것이지만, 적당한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있다.

[0343] 한 실시양태에서, 제약 조성물은, 예를 들어 내독소, 미코플라스마(mycoplasma), 복제 적격한 렌티바이러스 (RCL), p24, VSV-G 핵산, HIV gag, 잔류 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드, 마우스 항체, 풀링된 인간 혈청, 소 혈청 알부민, 소 혈청, 배양 배지 성분, 박터 패키징 세포 또는 플라스미드 성분, 박테리아 및 진균으로 이루어진 군으로부터 선택된 오염물질이 실질적으로 없는, 예를 들어 이러한 오염물질이 검출 가능한 수준이 아니다. 한 실시양태에서, 상기 박테리아는 알칼리게네스 파에칼리스 (*Alcaligenes faecalis*), 캔디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 에스케리차 콜라이 (*Escherichia coli*), 하에모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*), 네이세리아 메닝기티데스 (*Neisseria meningitides*), 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumonia*), 및 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 군 A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이다.

[0344] "면역학상 유효량", "항종양 유효량", "종양 억제성 유효량" 또는 "치료량"이 표시되는 경우, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자 (대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이 정도, 및 상태에 있어서의 개별적인 차이를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 일반적으로, 본원에 기재된 T 세포를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^9 개 세포/체중 kg의 투여량으로 투여할 수 있고, 일부 경우에는 10^5 내지 10^6 개 세포/체중 kg의 투여량 (이들 범위 내의 모든 정수 값을 포함한다)으로 투여할 수 있는 것으로 언급될 수 있다. T 세포 조성물은 또한, 이들 투여량을 수회 투여할 수 있다. 상기 세포는 면역요법에 흔히 공지되어 있는 주입 기술을 이용함으로써 투여할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988] 참조).

[0345] 특정 측면에서, 활성화된 T 세포를 대상체에게 투여한 다음, 혈액을 다시 채취하고 (또는 성분채집술을 수행하고), 본 발명에 따라서 그로부터 T 세포를 활성화시키며, 환자에게 이들 활성화되고 확장된 T 세포를 다시 주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 과정은 몇 주마다 여러 번 수행할 수 있다. 특정 측면에서, T 세포는 10cc 내지 400cc의 혈액 채취액으로부터 활성화시킬 수 있다. 특정 측면에서, T 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 또는 100cc의 혈액 채취액으로부터 활성화시킨다.

[0346] 대상 조성물을 투여하는 것은 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 주입 또는 이식을 포함한 편리한 모든 방식으로 수행할 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 환자에게 경동맥, 피하, 피내, 종양내, 결절내, 수질내, 근육내, 정맥내 (i.v.) 주사 또는 복강내 투여할 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 환자에게 피내 또는 피하 주사에 의해 투여한다. 한 측면에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 정맥내 주사에 의해 투여한다. 이러한 T 세포의 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위 내로 직접 주사할 수 있다.

[0347] 특별히 예시적 측면에서, 대상체에게 백혈구성분 채집술을 수행할 수 있는데, 여기서는 백혈구를 생체외에서 수집하거나, 강화시키거나 또는 고갈시켜 관심 세포, 예를 들어 T 세포를 선별 및/또는 분리한다. 이들 T 세포 분리물은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 확장시킬 수 있고, 본 발명의 하나 이상의 CAR 구축물이 도입됨으로써 본 발명의 CAR T 세포를 창출할 수 있도록 처리할 수 있다. 이를 필요로 하는 대상체에게 연속해서, 고 용량의 화학요법을 이용한 표준 치료에 이어 말초혈 줄기 세포 이식을 받게 할 수 있다. 특정 측면에서, 상기 이식 후 또는 이식과 동시에, 대상체에게 본 발명의 확장된 CAR T 세포를 주입한다. 부가 측면에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여한다.

[0348] 환자에게 투여될 상기 치료의 투여량은 치료하고자 하는 병태의 정확한 성질과 치료 수용자에 따라서 다양할 것이다. 인간에게 투여하기 위한 투여량의 스케일링은 당해 기술분야에서 허용된 실시예에 따라서 수행할 수 있다.

[0349] 실시예

[0350] 본 발명은 다음 실험 실시예를 참조로 하여 추가로 상세히 기재된다. 이들 실시예는 단지 예시 목적으로 제공되고, 달리 명시되지 않는 한은 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 어떠한 방식으로든 다음 실시예로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 하고, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백한 모든 변동을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0351] 추가의 기재 없이도, 통상의 기술자는 전술된 설명과 다음의 예시되는 실시예를 이용하여, 본 발명의 화합물을

제조 및 활용할 수 있고 청구된 방법을 실시할 수 있는 것으로 여겨진다. 다음 작동 실시예는 본 발명의 각종 측면을 구체적으로 지적하고, 어떠한 방식으로든지 본 개시내용의 나머지 부분을 제한하는 것으로서 해석되지 않아야 한다.

[0352] **실시예 1: EGFRvIII+ 교모세포종으로 진단된 환자에서 EGFRvIII-표적화 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된 재유도된 자가 T 세포**

[0353] 다음 실험은 항체-기반 키메라 항원 수용체 (CAR)를 이용하여 표면 단백질 EGFRvIII에 대해 재유도된 인간 T 세포가 NSG 마우스에서 다형성 교모세포종의 EGFRvIII+ 모델을 제거하는 데 있어서 유효할 것인지에 역점을 두기 위해 설계되었다. 또한, 이들 세포의 생장과 영속성을 평가하도록 실험을 설계하였다. 3가지 상이한 형태의 CAR을 시험하는데, 이는 2가지 상이한 단일쇄 가변 단편 (EGFRvIII 항원과 결합하는 CAR의 부분)과 세포내 신호전달 도메인 (CD28을 수반하는 및 수반하지 않는 CD3 제타 및 4-1BB)을 포괄한다.

[0354] 면역결핍성 NOD/scid/γcnull (NSG) 마우스는 인간 종양 세포주 (EGFR+이고, EGFRvIII+가 되도록 조작된 버전을 갖는 뇌종양 주 U87)와 인간 T 세포를 이식하기 위한 우수한 이중 이식 모델이다. 생착한 후, 인간 T 세포를 NSG 마우스에서 대략 2개월 동안 유지시키거나 또는 치명적인 이중 GVHD (xGVHD)가 발생할 때까지 유지시킬 수 있는데, 이는 주입된 인간 T 세포의 용량과 공여자에 좌우된다.

[0355] 간략하게 언급하면, 렌티바이러스성 플랫폼을 이용하여, 항-EGFRvIII 모노클로날 항체 3C10로부터 유래된 scFv가 혼입된 신규 CAR (3C10 CAR)을 창출시켰다. 이러한 CAR을 시험관내 및 이중 마우스 모델에서 시험하였다. NOD/scid/γc(-/-) (NSG) 마우스 모델은, 주입된 인간 T 세포의 장기 영속성을 평가하는 것을 포함한, CAR 요법의 전임상 평가에 광범위하게 사용되어 왔다. 뇌에 7일 U87-EGFRvIII 종양을 보유하고 있는 NSG 마우스에게 7일 내지 11일째에 매일 테모졸로미드 (1 mg/1회 용량)를 복강내 주사하고; 7일 및 17일째에 3C10 CAR로 생체의 형질도입되거나 또는 증강된 그린 형광 단백질 (EGFP)-백터로 모의 형질도입된 2×10^6 개의 인간 T-세포를 정맥내 주입하였다. 21일째, CAR-형질도입된 T-세포가 투여된 모든 마우스에서는 BLI 신호가 검출될 수 없었던 반면, 모의-형질도입된 T-세포로 처리된 마우스는 테모졸로미드에 의한 일시적인 항종양 효과 후에 5마리 마우스 중 4마리에서 종양의 재증식이 나타났다. 별개의 실험에서는, CAR-T-세포로 처리된 마우스를 21일째에 희생시켰고, 비오틴-접합된 항-F(ab')₂ mAb (3C10CAR에 대해 특이적임) 및 스트렙타비딘-피코에리트린 (PE)을 이용한 면역조직화학에 의해, CAR-형질도입된 T-세포의 침윤을 평가하였다. 정맥내 주입된 CAR-T-세포는 강력한 PE 신호에 근거하여 종양을 심하게 침윤시키는 것으로 보이는 반면, 스트렙타비딘-PE로 염색되었지만 항-F(ab')₂ mAb로는 염색되지 않은 대조군 조직은 배경 신호만을 나타내었다.

[0356] 이들 실험에 이용된 재료 및 방법은 다음과 같다.

[0357] **재료 및 방법**

[0358] *NSG 마우스 모델*

[0359] 면역결핍성 NOD/scid/γcnull (NSG) 마우스의 집락은 최근에 확립되었다. NSG 마우스에게는 T 및 B 세포와 천연 킬러 세포가 결여되고, 이는 또한 손상된 수지상 세포 기능을 갖고 있다. 활성화된 T 세포의 생착은 기존의 NOD/scid/β2Mnull 마우스 모델 보다는 NSG 마우스에서 탁월한 것으로 확인되었다. 따라서, NSG 모델이 인간 이중 이식 실험에 사용되었다.

[0360] *생물학적 시스템의 구조 및 특징*

[0361] EGFRvIII에 대하여 유도된 많은 모노클로날 및 폴리클로날 Ab가 야생형 EGFR 또는 기타 비-특이적 단백질에 대한 교차 반응성을 지니고 있긴 하지만, EGFRvIII-특이적 융합 연결부를 포함한 14개의 아미노산 펩티드로 마우스를 면역시킴으로써 최초로 발생되었던 모노클로날 항체 (mAb) 3C10이, 야생형 EGFR에 대해서는 무시할만한 수준으로 검출 가능한 결합을 나타내면서 EGFRvIII를 고도로 특이적으로 인식하는 것으로 입증되었다 (Okamoto et al., 1996 *Br J Cancer* 73:1366-1372). 연구 등급의 렌티바이러스성 백터가 T 세포의 형질도입에 사용되었다.

[0362] *마우스 주입을 위한 세포 제조*

[0363] 마우스 내로 주입하기 위한 세포는 인간 T 세포이다. 펜실베이니아 인간 면역학 코어 (Pennsylvania Human Immunology Core) 대학에 의해 건강한 자발적 공여자를 대상으로 하여 백혈구성분 채집술함으로써, 인간 단핵 세포 강화된 성분채집술 생성물을 수득한다. 대학 윤리 심의위원회가 승인한 프로토콜 하에 모든 시편을 수집

하고, 각 공여자로부터 고지에 입각한 서면 동의서를 받는다. 로제타셉(RosetteSep) 인간 T 세포 강화 각테일 [스템셀 테크놀로지 (Stemcell Technologies; 캐나다 밴쿠버)]을 이용하여 T 세포를 음성적으로 선별한다. T 세포를 TRP 실험실로 옮기는데, 여기서는 상기 세포를 연구 등급 CD3/28 비드로 활성화시키고, 글루타민, 10% FBS, 20 mM 헤페스(Hepes), 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 수반하는 RPMI에서 확장시킨다. 벡터 형질도입이 24시간 후에 발생하는데, 패키징된 렌티벡터가 활성화 배양물에 직접 부가된다. 5일째에 세포를 탈비드화하고, 농도를 0.7E6 내지 2E6개 세포/ml로 유지하면서, 크기 상의 변화 (f1)와 총 세포 계수를 위해 코울터 멀티사이저(Coulter Multisizer) 3 [벡크만 코울터 (Beckman Coulter; 미국 캘리포니아주 풀러턴)]을 이용하여 확장을 모니터링한다. CAR-형질도입된 T 세포에 대한 형질도입 효율은 염소 항-마우스 항체 (GAM; 3C10-기반 CAR의 경우) 또는 염소-항-인간 항체 (GAH; 139-기반 CAR의 경우)로 염색함으로써 유동 세포측정법에 의해 시험한다. 연구 0일째에 마우스 1마리당 1백만개의 CAR+ T 세포를 마우스의 꼬리 정맥에 주사한다.

[0364] 테모졸로미드 (TMZ) 처리

[0365] 두개내 U87-EGFRvIII 종양을 보유하고 있고 0일째에 CAR+ T 세포를 투여한 마우스에게 연속해서, 0일 내지 4일째에 TMZ를 5일 동안 매일 복강내 주사하였는데, TMZ는 6.67 mg/ml로 DMEM에 용해시킨다. 각 마우스에게 50 µl TMZ 용액 (333 마이크로그램/1회 용량; 대략 17 mg/kg/1회 용량)을 복강내 주사하였다.

[0366] 임상 등급 CART

[0367] CART-EGFRvIII T 세포를 임상 세포 및 백신 제조 설비 (CVPF)에서 제조하는데, 세포 생성물은 자가 T 림프구이다. CD3+ T-세포는 역류 원심 세정을 통하여 단구를 고갈시킴으로써 백혈구성분 채집술 생성물로부터 강화시킨다. 0일째, 항-CD3/CD28 mAb 코팅된 자기 비드를 이용하여 상기 강화된 T 세포를 활성화시키면서 상기 제조 공정을 개시한다. T 세포 배양물을 EGFRvIII CAR 렌티바이러스 벡터에 노출시키고 확장시킨다. 이러한 T 세포 제조 공정은 정적 조직 배양물에서 개시된 다음 (0일에서 5일까지), 관류 조건 하에 부가의 확장이 필요한 경우에는 웨이브(Wave) 생물반응기에 옮긴다. 배양이 끝날 무렵, 세포를 자기 비드로부터 꺼내고, 세척하며, 농축시킨 다음 냉동 보존한다. 변형된 T 세포 생성물을, 제어 속도 냉동고를 이용하여 세포 수에 의존적인 용적의 냉동 백 내에서 냉동 보존한다 (최대 10⁸/ml의 최종 농도). 냉동 보존된 EGFRvIII CAR T-세포 생성물을 ≤-130 °C로 모니터링된 냉동고에 저장한다. 그 실험 결과가 다음에 기재된다.

[0368] CAR-T-세포에 의한 두개내 EGFRvIII-발현성 교모세포종의 박멸

[0369] 교모세포종 (GBM)은 가장 흔하고 가장 악성인 원발성 뇌종양이며, 미국에서 매년 대략 12,000명의 암 관련 사망에 대해 책임이 있다. GBM 환자는 화학요법 (테모졸로미드)과 방사선 요법 (RT)의 조합 치료 후의 평균 생존 기간이 15개월 보다 짧다. 자가 T-세포, 특히 키메라 항원 수용체 (CAR)로 형질도입된 T-세포를 이용한 양자 세포 전이 (ACT) 요법이 최근 혈액암 시도에서 장래성이 있는 것으로 밝혀졌다. CART 세포를 이용한 ACT가 GBM 환자에게 특히 적합할 수 있는데, 이는 생체외에서 제조된 세포의 특이성, 수 및 기능적 표현형을, 생체내 면역에 의해 유도된 천연 T-세포 보다 더 우수하게 조작하고 제어할 수 있기 때문이다.

[0370] 표피 성장 인자 수용체 변이체 III (EGFRvIII)은 인간 종양에서 관찰된 EGFR의 가장 흔한 변이체이지만, 정상 조직에서는 거의 관찰되지 않는다. 이러한 단백질은 엑손 2-7의 프레임내 결실로부터 비롯되고, EGFR의 세포외 도메인 내의 엑손 1과 8의 연결부에 신규 글리신 잔기가 생성됨으로써, 종양 특이적 에피토프가 창출된다. EGFRvIII은 GBM의 24% 내지 67%에서 발현되지만, 정상 조직에서는 그렇지 않다.

[0371] GBM에 대한 효과적인 CAR 요법을 개발하기 위하여, EGFRvIII을 표적으로 하는 3가지 신규 렌티바이러스성 CAR 구축물을 생성하였다. 이들 벡터 각각은 EGFRvIII-특이적 무린 모노클로날 항체 (mAb) 3C10 또는 "139"로 명명된 EGFRvIII-특이적 인간화 모노클로날 항체 (mAb)로부터 유래된 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 코딩한다 (도 6). 3C10 scFv는 CD28 막횡단 및 세포내 도메인을 수반하거나 수반하지 않으면서, CD8a 힌지, 4-1BB 및 CD3ζ 도메인과 커플링시킨다 (각각 3C10BBz28-CAR 및 3C10BBz-CAR). 139 scFv는 CD8a 힌지, 4-1BB 및 CD3ζ 도메인과 커플링시킨다 (139BBz-CAR). 이들 CAR 각각으로 형질도입된 인간 T-세포는 EGFRvIII-발현성 U87 인간 GBM 세포 (U87-EGFRvIII)를 특이적이고도 강력하게 용해시키는 것으로 입증되었다 (도 7 참조). 뇌에 7일 U87-EGFRvIII 종양을 보유하고 있는 면역기능저하 NOD/scid/γc(-/-) (NSG) 마우스에게 생체외에서 1) 139BBz-CAR; 2) 3C10BBz-CAR; 3) 3C10BBz28-CAR; 4) 인간 CD19를 표적으로 하는 대조군 CD19BBz-CAR로 형질도입된 1 x 10⁶ 개의 인간 T-세포를 정맥내 주입하였다. 이들 마우스에게 또한, 7일 내지 11일째에 매일 테모졸로미드 (330 mcg/1회 용량)을 복강내 주사하였다. 생물발광 영상화 (BLI)에 의해 종양 성장을 모니터링하였는데, 이는 U87-EGFRvIII 세포가 또한 루시페라제를 발현하기 때문이다. 식염수로만 처리된 모든 마우스는 신속한 종양 성장으

로 인해 21일경에 사망하였고, ACT를 수반하지 않는 테모졸로미드 치료는 U87-EGFRvIII 종양을 억제하였지만, 박멸하지는 못하였다. CD19BBz-CAR-T-세포와 테모졸로미드가 투여된 마우스는 U87-EGFRvIII에 대하여 일부 동종 반응을 명확하게 보여주었지만, 이들 마우스에서는 종양이 지속적으로 성장하였다. 또 다른 한편, 139BBz-CAR-, 3C10BBz-CAR-, 또는 3C10BBz28-CAR-형질도입된 T-세포가 투여된 모든 마우스에서는, BLI 신호가 21일경에 기준선 수준 아래로 감소하였는데, 이는 종 종양이 박멸되었다는 것을 제안한다 (도 8). 중요하게도, 3C10BBz-CAR 세포가 투여된 마우스에서는 3C10BBz28 또는 139BBz CART 세포가 투여된 마우스에서보다 더 신속하게 종양이 제거되었는데, 이는 3C10을 BBz와 조합하면, 환자에게 더 우수한 반응이 제공될 수 있다는 것을 제안한다. 종양 성장과 말초 면역 반응을 모니터링하여, 상기 3가지 EGFRvIII-CAR 벡터 중 어느 것이 장기간 항 종양 효과에 대해 다른 것보다 탁월한지를 결정하였다.

[0372] 본원에 제시된 결과는 테모졸로미드를 이용한 표준 치료 화학요법을 동시에 받은 GBM 환자에서 EGFRvIII-표적화 CAR-T-세포를 이용한 ACT의 제I상 임상 시험의 개발을 강력하게 뒷받침해준다.

[0373] 임상 설계

[0374] EGFRvIII+로 새로이 진단된 GBM 환자에서 CART-EGFRvIII T 세포의 안전성, 관용성 및 생착 잠재성을 결정하기 위한 단일-암 개방-표지 시험적 연구를 설계하였다. 일반적으로, 모든 대상체에게 자가 CART-EGFRvIII T 세포를 투여하였다. 적격한 대상체에게 백혈구 성분 채집술을 수행하여 CART-EGFRvIII 제조를 위한 다수의 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 수득하였다. T 세포를 PBMC로부터 정제하고, 인간화 3C10-CAR 렌티바이러스성 벡터로 형질도입하며, 시험관내에서 확장시키고 적당한 용량 분취액에서 냉동보존한다. 주입될 세포는 0일째 주입하기 직전에 병상에서 해동한다.

[0375] 대상체에서 혈액 시험을 수행하여 CART EGFRvIII 세포의 안전성, 및 생착과 영속성을 4주 (28일)에 걸쳐 규칙적인 간격으로 평가한다. 3C10-CAR 벡터를 함유하는 순환성 T 세포의 서브세트는 주입 후 각종 시간에 평가하고 기준선 샘플과 비교한다. 28일 후, 병력, 신체 검사, 뇌 MRI 및 혈액 시험을 이용하여, 또는 표준 치료에 따라서 대상체를 6개월까지는 매월 평가한다.

[0376] 연구 혈액 시험을 이들의 방문과 동시에 수행한다. 6개월 후, 2년 동안 2개월 마다 환자를 추적한다. 2년 시점 후에는, 대상체에게 전화로 매년 추적하기 위한 롤-오버(roll-over) 연구를 들어가고, 유전자 전이 연구에 관한 FDA 규정에 의해 요구되는 바와 같은, 장기간 건강상의 문제점, 예컨대 새로운 악성 종양의 발생의 진단에 관하여 평가하기 위해 13년 더 설문지 조사를 한다.

[0377] 어떠한 특별한 이론에 얽매는 것은 아니지만, EGFRvIII 단백질의 고도로 제한된 발현 때문에, T 세포의 종양을 벗어나 적중하는 어떠한 종류의 활성화도 전혀 예상되지 않는 것으로 여겨진다. 바람직하게, CART-EGFRvIII의 1회 주입제 만을 투여하므로, 알레르기-유형 반응 역시 예상되지 않는다. 그러나, 직면할 수 있는 하나의 독성은 종양 부위에서 T 세포 활성화로부터의 방관자 염증이다. 뇌부종의 증상과 징후가 근접하게 모니터링되고 관리될 것이다. 일부 실시양태에서, T 세포 활성화로부터의 방관자 염증은 소염제, 예컨대 스테로이드제를 투여함으로써 치료할 수 있다.

[0378] **실시예 2: miR-17-92의 공동-형질도입은 인간 교모세포종 이종이식편을 보유하고 있는 마우스에서 항-EGFRvIII 키메라 항원 수용체로 형질도입된 T-세포의 항-종양 활성을 증강시킨다**

[0379] miR-17-92 발현은 T-세포의 유형-1 표현형과 증강된 생존을 부여해준다. 그러한 miR-17-92는 교모세포종 (GBM) 환자로부터 유래된 T-세포에서 하향 조절되는 것으로 보고되었다. 키메라 항원 수용체로 형질도입된 T-세포 (CAR-T-세포)를 이용하여 GBM에 대한 양자 전이 요법의 효능을 개선하기 위하여, T-세포 수용체 CD3ζ 및 신호전달 모듈 및 CD137 (4-1BB)과 CD28의 공동자극성 모티프와 직렬로 커플링된 표피 성장 인자 수용체 변이체 III (EGFRvIII)-특이적 단일-쇄 가변 단편 (scFv)으로 이루어진 CAR 및 miR-17-92에 대한 신규 렌티바이러스성 벡터 (pELNS-3C10-CAR)를 구축하였다. EGFRvIII을 안정적으로 발현하는 U87 GBM 세포 (U87-EGFRvIII)에 대한 항원-특이적이고 강력한 세포독성 활성 이외에도, miR-17-92로 공동-형질도입된 CAR-T-세포는 miR-17-92 공동-형질도입을 수반하지 않은 CAR-T-세포와 비교해서 전환 성장 인자 (TGF)-β와 테모졸로미드의 T-세포 억제 효과에 대한 개선된 저항성을 나타내었다. 두개내 U87-EGFRvIII 이종이식편을 보유하고 있는 마우스에서는, 트랜스진-유래된 miR-17-92 발현을 수반하거나 수반하지 않는 CAR-T-세포가, 제어되지 않는 어떠한 CAR-T-세포의 성장도 명확히 보여주지 않으면서 유사한 수준의 강력한 치료 효과를 입증하였다. 그러나, 이들 마우스의 뇌를 U87-EGFRvIII 세포로 다시 시험감염시키면, 공동-형질도입된 CAR-T-세포가 투여된 마우스는 miR-17-92 공동-형질도입을 수반하지 않은 CAR-T-세포로 처리된 마우스와 비교해서 개선된 보호를 나타내었다. 이들 데이터는

miR-17-92가 CAR 내에 통합되어 GBM 환자 내에서의 효능을 개선시킬 수 있다는 것을 뒷받침해준다.

[0380]

그 실험 결과가 다음에 기재된다.

[0381]

EGFRvIII-특이적 CAR 및 miR-17-92에 대한 렌티바이러스성 벡터의 구축

[0382]

인간 EGFRvIII-특이적 모노클로날 항체 (mAb) 3C10으로부터 유래된 단일-쇄 가변 단편 (scFv)을 통하여 EGFRvIII을 인식하는 CAR에 대한 렌티바이러스성 벡터 (pELNS-3C10-CAR)를 생성시켰다 (도 1a 참조). 이러한 구축물에서, EF-1 α 프로모터는 3C10-유래된 scFv, CD28 막형단 (TM) 뿐만 아니라 4-1BB 및 세포내 도메인 (ICD) 및 CD3 ζ 도메인을 통합하는 CAR 융합 단백질을 구동시킨다. FG12-기반 자기-불활성화 (SIN) 벡터를 이용하여 렌티바이러스성 miR-17-92 구축물 (FG12-EF1 α -miR-17/92)를 또한 창출시켰다 (도 1b 참조). 이러한 벡터에서는, EF-1 α 프로모터가 miR-17-92를 구동시키고, 인간 UbiC 프로모터는 형질도입된 세포의 추적에 의해 증강된 그린 형광 단백질 (EGFP) 마커 유전자를 구동시킨다. 도식에 사용된 약어는 다음과 같다: RSV/HIV-1 5' LTR; 혼성체 RSV 프로모터-R/U5 장 말단 반복 서열, EF-1 α ; 인간 신장 인자 1 α -소단위 프로모터, VH; 3C10 이뮤노글로불린의 중쇄 내의 가변 영역, VL; 3C10 이뮤노글로불린의 경쇄 내의 가변 영역, HIV-1 Δ -3' LTR; U3 영역에 결실을 수반한 자기-불활성화 3' 장 말단 반복 서열, CMV/HIV-1 5' LTR; 혼성체 CMV 프로모터-R/U5 장 말단 반복 서열, UbiC; 유비퀴틴 C 프로모터.

[0383]

CAR 및 miR-17-92로 형질도입된 인간 T-세포의 시험관내 특성화

[0384]

건강한 공여자-유래된 CD3⁺ T-세포를 pELNS-3C10-CAR로 형질도입시키고, 이 세포를 대상으로 하여, 항-마우스 (Fab')₂ 항체 및 EGFP 각각에 의해 3C10-CAR 및 miR-17-92의 발현을 알아보기 위하여 유동 세포측정법에 의해 트랜스젠의 발현 수준을 평가하였다 (도 2a, 좌측). 인간 T-세포 상에서 3C10-유래된 scFv에 대해 특이적인 항-마우스 F(ab')₂ Ab를 이용하여, 그들의 표면 상에서 3C10-유래된 scFv를 발현하는 T-세포의 거의 절반 (48.9%)을 검출하였다.

[0385]

CAR과 트랜스젠-유래된 miR-17-92 둘 다를 발현하는 인간 T-세포를 수득하기 위하여, 다음 2개의 렌티바이러스성 벡터를 순차적으로 감염시킴으로써 CD3⁺ T-세포를 pELNS-3C10-CAR 및 FG12-EF1 α -miR-17/92로 공동-형질도입하였다. pELNS-3C10-CAR로 초기 형질도입한지 24시간 후, 상기 T-세포를 FG12-EF1 α -miR-17-92로 형질도입하였다. 총 T-세포의 대략 1/4 정도 (23.6%)가 CAR과 EGFP 둘 다를 발현한 것으로 관찰되었다 (도 2a, 우측). 후속 시험관내 연구를 위하여, 바이오티닐화 항-마우스 F(ab')₂ Ab 및 항-비오틴 MACS를 이용하여, CAR-형질도입된 T-세포 (CAR-T-세포)를 강화시켰다. 공동-형질도입의 효율에 근거하여 (도 2a, 우측), CAR-T-세포의 적어도 50%가 또한 EGFR을 발현하였다 (이에 따라, 트랜스젠-유래된 miR-17-92도 발현하였다). 실시간 PCR에 의해, CAR 단독으로 형질도입된 T-세포와 비교해서 F(ab')₂ Ab-강화되고, miR-17-92-공동-형질도입된 CAR-T-세포에서 3 내지 4배 더 높은 수준의 miR-17-92 발현이 검출되었다 (도 2b). 도 2b는 qRT-PCR에 의해 측정된 형질도입된 T 세포에서의 miR-17-92 군락 구성원, miR-17-3p, miR-17-5p 및 miR-92a-1의 발현 수준을 명확하게 보여준다. 유사한 결과를 나타내는 3가지 실험 중 하나로부터의 세 번 되풀이한 측정치의 평균 \pm SD 값이 도시되어 있다. *는 스튜던트(student) t 시험을 이용한 두 군 간의 $p < 0.05$ 를 표시한다. 도 2c는 ⁵¹Cr-표지된 U87-EGFRvIII 또는 대조군 U87 세포에 대한 각종 E:T 비에서 12-h ⁵¹Cr-방출 검정에 의해 평가된 형질도입된 T 세포의 EGFRvIII 특이적 세포독성 활성을 도시한 것이다. 대조군 세포는 모의 (EGFP)-형질도입된 T-세포이다. 값은 세 번 되풀이한 웰에서의 평균 \pm SD를 표시한다.

[0386]

모의-형질도입된 T-세포가 모 U87 (EGFRvIII-음성) 세포와 U87-EGFRvIII 세포 둘 다에 대하여 배경 수준의 용해만을 나타내긴 하였지만, CAR로 형질도입된 T-세포는, 모 U87 세포에 대해서는 배경 수준의 세포독성 효과만을 나타내면서도 EGFRvIII 발현성 U87 인간 GBM 세포 (U87-EGFRvIII)를 강력하고도 특이적으로 용해시킨 것으로 입증되었다 (도 2c). 이들 12h ⁵¹Cr-방출 검정에서는, CAR-T-세포를 miR-17-92로 공동-형질도입하면, U87-EGFRvIII 표적 세포에 대한 그들의 특이적 세포독성 활성이 상당히 증강되지 않았다.

[0387]

miR-17-92 공동-형질도입은 TGF- β 와 테모졸로미드 (TMZ - 표준 치료 요법)에 의한 억제 효과에 대해 증강된 IFN- γ 방출 및 저항성을 부여해준다

[0388]

기존의 연구에서는 (문헌 [Sasaki et al., 2010, J. Transl Med 8:17]), miR-17-92 트랜스제닉 마우스로부터 유래된 CD4⁺ T 세포가, 야생형 마우스로부터 유래된 대응물과 비교한 경우에 증가된 IFN- γ 생성을 명확하게 보

여주었고; 인간 Jurkat T 세포를 miR-17-92로 형질감염시키면, 활성화-유도된 세포 사멸 (AICD)에 대해 증강된 저항성이 초래된다.

[0389] CAR-T-세포를 miR-17-92로 공동-형질도입하는 것이, 이들을 화학요법제 TMZ 또는 면역억제성 시토카인 TGF- β 에 노출시킨 경우에 개선된 IFN- γ 생성, 세포 증식 및 덜한 정도의 아포토시스성 사멸을 부여하는 지를 평가하기 위한 실험을 수행하였다.

[0390] CAR-T-세포를 TGF- β 또는 TMZ 없이 EGFRvIII-형질도입된 인공 항원 제시 세포 (aAPC)로 자극하는 경우, 상기 세포는 공동-형질도입을 수반하거나 수반하지 않으면서 유사한 수준의 IFN- γ 를 발현하였다. 그러나, 상기 세포를 단계적 상승 용량의 TGF- β 또는 TMZ에 노출시킨 경우에는, miR-17-92 공동-형질도입을 수반하지 않은 CAR-T-세포가 상당히 감소된 수준의 IFN- γ 를 생성시킨 반면, 공동-형질도입된 CAR-T-세포는 IFN- γ 의 고 수준 생성을 유지하였다 (도 3a). 흰색 막대 및 흑색 막대는 각각 CAR-T-세포 (miR-17-92를 수반하지 않음) 및 miR-17-92 공동-형질도입된 CAR-T 세포로부터의 결과를 나타낸다. 도 3a는 96h 공동-배양의 마지막 24h 동안 형질도입된 T 세포에 의해 생성된 IFN- γ 를 나타낸다. 도 3b는 3일 공동-배양 과정 후 WST1 검정에 의해 평가한 군 간의 상대적 증식 수준을 나타낸다. 도 3c 및 3d는 아넥신(Annexin)-V 및 PI에 의해 평가된 CAR-T-세포의 아포토시스성 사멸을 나타낸다. 도 3c는 TMZ에 노출된 CAR-T-세포 상에서의 아넥신-V에 대한 평균 형광성 세기를 나타낸다. 값은 세 번 되풀이한 웰에서의 평균 \pm SD를 표시한다 (*은 $P < 0.05$ 를 표시한다). 도 3d는 유사한 결과를 수반하는 3가지 실험 중 한 가지에서 아넥신-V+ 및/또는 PI+에 대한 유동 세포계수 히스토그램을 나타낸다.

[0391] 배양물 중의 TMZ의 존재 하에 CAR-T-세포의 증식에 대한 miR-17-92 공동-형질도입의 효과를 평가하기 위한 실험을 수행하였다. EGFRvIII-발현성 aAPC를 이용하여 CAR-T-세포의 증식을 유도시키는 실험을 설계하였고, 그 증식은 WST-1 검정에 의해 평가하였다 (도 3b). TMZ를 이용하지 않고서도, miR-17-92-공동-형질도입된 CAR-T-세포는 대조군 CAR-T-세포와 비교해서 더 신속한 증식 속도 경향을 명확히 보여주었지만, 그 차이는 유의적이지 않았다. CAR-T-세포 증식에 대한 TMZ의 강한 영향력을 구체적으로 평가하기 위하여, 도 3b에서는, TMZ를 수반하지 않는 동일한 세포의 증식을 기준으로 하여 각 군에서의 세포의 증식 속도를 도시하였다. 증가 농도의 TMZ를 배양물에 추가하는 경우, 성장 억제 정도는 대조군 CAR-T-세포와 비교해서 miR-17-92 공동-형질도입된 CAR-T-세포에서 상당히 덜하였다.

[0392] miR-17-92-공동-형질도입으로 인해 CAR-T-세포가 TMZ-유도된 아포토시스에 대해 보다 저항성으로 될 수 있었는 지를 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위하여, 아넥신 V⁺ 및 프로피듐 아이오다이드 (PI)⁺ CAR-T-세포의 유동-세포계수 평가를 증가 농도의 TMZ에서 수행하였다 (도 3c 및 3d). 초기 아포토시스성 (아넥신 V⁺PI⁻), 아포토시스성/괴사성 (아넥신 V⁺PI⁺) 및 괴사성 (아넥신 V⁻PI⁺) 세포와 miR-17-92-공동-형질도입된 CAR-T-세포 둘 다를 용량-의존적으로 증가시키면, 대조군 CAR-T-세포와 비교해서 덜한 정도의 아포토시스성 변화가 입증된 것으로 관찰되었다.

[0393] CAR-T-세포를 TMZ와 조합하여 정맥내 주사하면, NSG 마우스에서 확립된 U87-EGFRvIII 종양의 완전한 차도가 초래된다

[0394] 확립된 (7일) 두개내 U87-EGFRvIII 종양을 보유하고 있는 면역기능저하 NOD/scid/ γ c(-/-) (NSG) 마우스에서 CAR-T-세포의 효능을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. miR-17-92 공동-형질도입된 CAR-T-세포, miR-17-92의 공동-형질도입을 수반하지 않은 CAR-T-세포, 또는 모의-형질도입된 T-세포의 단일 정맥내 주입제 (마우스 1마리 당 2×10^6 개)를 마우스의 꼬리 정맥 내로 투여하였다. 새로이 진단된 GBM 환자에게는 통상적으로 TMZ 요법을 투여하기 때문에, T-세포 주입 당일에 시작하여 5일 동안 TMZ를 매일 복강내 주사 투여하도록 실험을 설계하였다 (도 4a). 도 4b는 카플란-마이어 분석을 나타낸다. CAR-T 세포 (miR-17-92의 공동-형질도입을 수반하거나 수반하지 않음)로 처리된 마우스의 평균 생존율은 모의 형질도입된 T 세포로 처리된 마우스와 비교해서 상당히 더 높았다 ($p < 0.05$). TMZ 처리 자체는 효과가 없었는데, 이는 TMZ 및 모의-형질도입된 T-세포를 투여한 모든 대조군 마우스가 상기 T-세포 주입 후 3주 (21일) 이내에 사망하였기 때문이다 (도 4b). CAR-T-세포로 처리된 5마리 마우스 중 1마리와, miR-17-92 공동-형질도입된 CAR-T-세포로 처리된 5마리 마우스 중 2마리가 22일경에 종양 진행으로 인해 사망하긴 하였지만, 이들 군 내의 다른 마우스 모두는 40일을 초과하여 생존하였다. 이 결과는 유사한 결과를 나타내는 2가지 독립적인 실험 중 한 가지로부터의 것이다. miR-17-92-공동-형질도입된 CAR-T-세포가 투여된 마우스의 생존율과 miR-17-92 공동-형질도입을 수반하지 않은 CAR-T-세포가 투여된 마우스의 생존율 간에는 통계상 유의적 차이가 없었다 (log-순위 시험: $p=0.5485$).

- [0395] miR-17-92 공동-형질도입된 CAR-T-세포는 마우스 내의 U87-EGFRvIII 종양에 대한 영속적인 보호를 부여해준다
- [0396] 도 4에 제시된 실험에서 마우스에 주입된 CAR-T-세포가 U87-EGFRvIII 종양에 대항하여 숙주의 장기간 보호를 제공할 수 있는지를 결정하기 위하여, 49일째에 뇌의 반대측 반구 내에 U87-EGFRvIII 세포를 접종하여 생존자를 재-시험감염시켰다 (도 5). 이와 같이 재-시험감염된 종양 세포가 CAR-T-세포로 처리된 3마리 마우스 모두에서 성장하였지만, miR-17-92 공동-형질도입된 CAR-T-세포로 처리된 마우스 중 어느 것도 배경 수준을 벗어난 BLI 신호를 명확히 보여주지 않았다. 이들 결과는 miR-17-92 군락의 공동-형질도입이 CAR-T-세포의 장기간 영속성을 부여해줌으로써, 종양 성장에 대항하여 숙주를 장기간 보호해준다는 사실을 강력하게 제안하고 있다. 마우스 2개 군으로부터의 종양-유래된 평균 양자 유속 \pm SD의 지속적인 측정. 처리군에서 종양-보유 마우스와 병행해서 영상화된 비-종양-보유 마우스에서 관찰된 수준을 근거로 하여, 배경 발광 수준 (10^3 p/s 이하)을 규정하였다.
- [0397] miR-17-92는 CAR 내에 통합되어 효능을 개선시킬 수 있다
- [0398] 본원에 제시된 결과는 3C10 scFv를 CD3 ζ 체, CD 137 (4-1BB) 및 CD28과 통합하는 신규 항-EGFRvIII-CAR (3C10-CAR)로 형질도입된 T-세포에서의 miR-17-92 공동-발현의 효과를 입증해준다. 이러한 결과는 miR-17-92의 공동-발현이 TGF- β 및 테모졸로미드의 T-세포 성장-억제성 효과에 대한 개선된 저항성을 부여한다는 것을 나타낸다. 생체내에서, 3C10-CAR과 miR-17-92 둘 다로 공동-형질도입된 T-세포는 3C10-CAR 단독으로 형질도입된 T-세포와 비교해서 더 영속적인 치료 효과를 입증하였다.
- [0399] 본 연구에서 miR-17-92의 렌티바이러스성 형질도입은, 형질도입된 T-세포에서 miR-군락의 이소성 과발현을 부여해준다. 그러나, 생리학적 조건 하에서, T-세포에서의 내인성 miR-17-92의 발현 수준은 엄격하게 조절되는 것으로 여겨진다. 인간 CD8 $^+$ T 세포에서, miR-17-92 발현은 타고난 본래의 세포에서는 고 수준으로 검출되지만, 세포가 분화됨에 따라 감소된다 (Salaun et al., 2011, J Transl Med 9:44). 림프구성 맥락수막염 바이러스 감염의 마우스 모델에서는, miR-17-92가 T-세포 활성화 후에 강력하게 상향 조절되지만, 클로날 확장 후에는 하향 조절되고, 기억 발생 동안에는 추가로 침묵하였다 (Wu et al., 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970). 이와 같이 참조된 연구에서는, 신속한 T-세포 확장과 그들의 IFN- γ 발현을 위해 miR-17-92가 필요하다. 그러나, miR-17-92의 과발현으로 인해, 단명 말단 이펙터 세포로의 분화가 왜곡된다. miR-17-92를 하향 조절하지 못하면, 기억 세포가 점차적으로 상실되고 결함있는 중추 기억 세포가 발생한다 (Wu et al., 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970). 이들 관찰 결과는 본원에 제시된 결과와 반드시 일치하지는 않는데, 이는 miR-17-92-공동-형질도입된 CAR-T-세포의 영속성과 재-시험감염된 U87-EGFRvIII 세포로부터 숙주를 보호해줄 수 있는 그들의 효율적인 능력이 관찰되었기 때문이다. 어떠한 특별한 이론에 얽매는 것은 아니지만, 상기 관찰 결과는 CAR 및 miR-17-92에 제공된 동시-자극성 분자의 조합 효과에 기인하는 것으로 여겨진다.
- [0400] miR-17-92가 발암성 miR로서 보고되긴 하였지만 (문헌 [van Haaften and Agami, 2010, Genes & Development 24:1-4]), miR-17-92 과발현 자체는 림프구에서 발암성이 아닌 것으로 공지되어 있다 (Xiao et al., 2008, Nat Immunol 9:405-414). 실제로, 본 연구에서는 miR-17-92-형질도입된 T-세포의 제어되지 않는 증식이 관찰되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 더 우수한 안전성을 보장하기 위한 대체 접근 방식으로서, 렌티바이러스성 안정한 전이 대신, T-세포를 miR-17-92 자체로 일시적으로 형질도입하고, 이들 T-세포를 수회 주사하는 것이, 바이러스 벡터를 통합하는 것과 관련된 안전성 문제없이 합리적인 접근 방식을 나타낼 수 있다 (Zhao et al., 2010, Cancer Research 70:9053-9061).
- [0401] GBM 요법을 위한 EGFRvIII-표적화 CAR와 관련하여, 최근 문헌 ([Morgan et al., 2012, Hum Gene Ther 23:1043-1053])에서는, γ -레트로바이러스성 CAR 중의 7개의 상이한 항-EGFRvIII mAb (3C10 및 인간 139 포함)로부터 유래된 scFv 서열을 평가하였다. 이들 CAR을 시험관내에서 특성화한 결과, EGFRvIII-발현성 표적 세포에 반응해서는 특이적인 IFN- γ 생성을 산출하였지만, 야생형 EGFR 유전자를 발현하는 세포에 반응해서는 그렇지 않은 3개 클론 중 2개로서 3C10 및 139가 밝혀졌다.
- [0402] EGFRvIII이 GBM 환자 집단에서만 발현되고, 심지어 "EGFRvIII-양성" 증례에서도 GBM 세포 분획에서만 발현된다는 것을 인식하는 것이 또한 중요하다 (Heimberger et al., 2005, Clin. Cancer Res. 11:1462-1466). 단일 표적으로서 EGFRvIII을 표적으로 하는 면역요법은 이러한 면역요법-표적화된 항원을 하향 조절시킨 GBM 세포의 증식을 초래하는 것으로 예상될 것이다 (Sampson et al., 2010, J Clin Oncol 28:4722-4729). 수많은 기존의 연구는 GBM-관련 항원, 예컨대 IL-13R α 2 (문헌 [Kong et al., 2012, Clin Cancer Res 18:5949-5960]; [Kahlon

et al., 2004, Cancer Res. 64:9160-9166]), HER-2 (문헌 [Ahmed et al., 2010, Clinical Cancer Research 16:474-485]) 및 EphA2 (문헌 [Chow, K.K. et al. T Cells Redirected to EphA2 for the Immunotherapy of Glioblastoma. Mol Ther (2012)])에 대한 CAR을 개발하였다. 어떠한 특별한 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 유효한 CAR 요법은 궁극적으로, GBM-유도된 억제 기전에 저항할 수 있고 다수의 항원을 표적으로 할 수 있는 T-세포를 이용해야 하므로, 주입된 T-세포는 이중 항원-발현 프로파일을 나타내면서 GBM에 대항하여 유효하고 지속적인 치료 효과를 나타낼 것으로 여겨진다.

[0403] 본원에 제시된 결과는 pELNS-3C10-CAR 및 FG12-EF1a-miR-17/92로 공동-형질도입된 T-세포를 이용하는 경우의 이득을 입증해준다. CAR과 miR-17-92 트랜스건의 공동-발현을 달성하기 위한 대체 접근 방식으로서, 단일 전사체로서 3C10-CAR 유전자와 miR-17-92 유전자 둘 다를 발현하는 pELNS-기반 렌티바이러스성 벡터를 구축하였다. 이러한 단일 "직렬식" 벡터를 사용하는 것이 2개의 벡터-기반 접근 방식과 비교해서 비교적 간단한 형질도입 과정 및 쉬운 조절 과정 관점에서 이점을 가질 수 있다. 더욱이, CAR을 발현하는 모든 T-세포는 또한, miR-17-92를 발현해야 한다. 그러나, "직렬식" 벡터의 형질도입 효율은 2개의 벡터 접근 방식에 의한 것 보다 더 낮은 것으로 예상되는데, 이는 삽입물의 크기가 증가함에 따라 렌티바이러스의 역가는 감소하기 때문인 것으로 밝혀졌다. 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 3C10-CAR 유전자의 렌티바이러스성 형질도입과 miR-17-92의 전기천공을 조합하는 것이 실행 가능한 전략일 수 있다.

[0404] 본 연구에서는, 40% 내지 60%의 $CD3^+$ CAR-T-세포가 $CD4^+$ 였고, $CD4^+$ CAR-T-세포는 U87-EGFRvIII 세포를 EGFRvIII-특이적 방식으로 효과적으로 용해시킨 것으로 또한 밝혀졌다. 페르포린⁺ $CD4^+$ T-세포가 페르포린/그랜자임 B 경로를 통하여 세포독성 활성을 매개하지만, Fas/FasL 경로를 통해서도 그렇지 않다고 보고되었다 (Porakishvili et al., 2004, Haematologica 89:435-443). 따라서, 본 연구에서는 $CD4^+$ CAR-T-세포가 페르포린과 그랜자임 B를 발현하여, U87-EGFRvIII 세포에 대항하여 관찰된 용해 활성을 매개하는 것으로 여겨진다.

[0405] 요약하면, 본 연구는 miR-17-92를 통합하는 CAR 요법을 평가하기 위한 강력한 토대를 제공한다.

[0407] 실시예 3: CAR 서열

[0408] 무린 모노클로날 항체 (mAb) 3C10은 EGFRvIII-특이적 융합 연결부를 포함한 14개의 아미노산 펩티드 (PEP3)로 마우스를 면역시킴으로써 최초로 발생되었는데, 이는 야생형 EGFR에 대한 검출 가능한 어떠한 결합도 나타내지 않으면서 EGFRvIII을 고도로 특이적으로 인식하는 것으로 입증되었다 (Okamoto et al., British J. Cancer 1996, 73:1366-1372). 연속해서, mAb 3C10의 단일 체 가변 단편 (scFv)을 생성시켰고, 3C10 scFv에 대한 cDNA를 수득하였다. 본래의 mAb의 결합 활성도 및/또는 항원-특이성이 종종, scFv 형태에서는 상실될 수 있긴 하지만, 3C10 scFv는 EGFRvIII-특이적 에피토프와의 그의 선택적 반응성을 보유하였다 (Nakayashiki et al., Jpn. J. Cancer Res. 2000, 91:1035-1043).

[0409] EGFRvIII CAR은 CD28, 4-1BB, 및 CD3 제타를 수반한 3C10scFv (마우스)를 pELNS 렌티바이러스성 백본 플라스미드 (EF1 프로모터) 내로 클로닝함으로써 구축하였다. 또 다른 EGFRvIII CAR은 상기 3C10scFv를 CD8a 힌지/CD8TM/4-1BB/CD3 제타 pELNS 렌티바이러스성 백본 (이는 EF1a 프로모터에 의해 발현된다) 내로 클로닝함으로써 생성시켰다.

[0410] 3C10scFv-CD28BB제타 CAR (아미노산) (서열 1)

```

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDY
YIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTS
EDTAVYYCAFRGGVYWGPGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSHMDVVMVMTQSPL
TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTG
SGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHTFPGTFGGGKLEIKASTTTPAPR
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGVLACYSL
LVTVAFIHFVWRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
    
```

[0411]

[0412] 3C10scFv-BBz CAR (아미노산) (서열 2)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIE
 DYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYVLQLSSLTSE
 DTAVYYCAFRGGVYWPGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMQSP
 TLSVAIGQSASISCKSSQSLLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPD
 RFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHTFPGTFGGGTKLEIKASTTTTPAPR
 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL
 VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP
 AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0413]

[0414] 3C10scFv-CD28BB제타 CAR (핵산) (서열 18)

atggccttaccagtaccgccttgctcctgccgctggccttgctcctccacgccccaggccggatccgagattcagctgcag
 caatctggggcagaacttgtagccaggccctcagtcgaagctgctcctgcacaggttctgcttcaacattgaagactactatat
 tcactgggtgaagcagaggactgaacaggccctggaatggattggaaggattgctcctgagaatgatgaaactaaatatgccc
 aatattccaggcaggccactataacagcagacacatcctccaacacagtctacctgcaactcagcagcctgacatctgagga
 cactgccgtctattactgtgcctttcgcggtggagtctactggggccagggaaccactctcacagtctcctcaggagggtggtggtccggt
 ggtggtggttccggagggtggtggttcacatatggatggtggtgtagccagctctccactcactctatcggttgccattggac
 aatcagcctccatctcttgcaagtcaagtcagagcctcttagatagtgatggaaagacatattgaattggtgttacagaggccaggccagt
 ctccaaagcgcctaactctctggtgtctaaactgactctggagtcctgacaggttactggcagtgatcaggggac
 agattcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatttgggaatttatttctgctgcaaggtacacatttctgggacgtt
 cgggtggagggaaccaagctggagataaaagctagcaccacgacgccagcggcgaccaccaacaccggcggccaccatcg
 cgtcgcagcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcgggggcgagtcacacgagggggctggacttcgcctgt
 gatttttgggtgctggtggtggtggtggtgagtcctggcttgcctagctgtagtaacagtgcccttatttttctgggtg
 aggagtaagaggagcaggtcctgcacagtgactacatgaacatgactccccccggcccccggccaccgcaagcattacc
 agccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgtccaaacggggcagaagaactcctgtatatattcaacaaccatt
 tatgagaccagtacaactactcaagaggagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaggaggatgtgaactga
 gagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagag
 aggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaagccgagaaggagaagaccct
 caggaaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgggg
 aggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacgccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccc
 tgccccctcgc

[0415]

[0416] 3C10scFv-BBz CAR (핵산) (서열 19)

Atggccttaccagtgaccgcctgtcctgccgtggccttgcctccacgccgcccagggccggaatccgagattcagctgca
gcaatctggggcgagaacttgtgaagccagggggcctcagtcgaagctgtcctgcacaggttctggcttcaacattgaagactactat
attcactgggtgaagcagaggactgaacagggcctggaatggattggaaggattgatcctgagaatgatgaaactaaatatggc
ccaatatccaggggcagggccactataacagcagacacatctccaacacagtctacctgcaactcagcagcctgacatctgaggacact
ggcgtctattactgtgcctttcgcgggtggagtctactgggggccagggaaccactctcacagtctcctcaggaggtgggtg
gttccgggtggtggtgtccggagggtggtggttcacatatggaattgtgatgccaggtctccactactctatcggttgccattg
gacaatcagcctccatctcttgcaagtcgaagtcagagcctcttagatagtgatggaagacataattgaaftggtgttacagaggc
caggccaggtctccaagcgcctaatatctctggtgtctaaactggactctggagtcctgcacaggttactggcagtgatcagg
gacagatttcactgagaatcagcagagtgaggcgtgaggatttgggaatttattattgctggcaaggtagacatttctgggacgttcg
gtggaggggaccaagctggagataaaagctagcaccacgacgccagcggcgcgaccaccaacaccggcgccccacc
atcgcgctgcagcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgagggggctgg
acttcgcctgtgatatctacatctggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctctgtcactggttatcaccctttactgcaa
acggggcagaaagaactcctgtatatttcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagagggaagatggctgtagc
tgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaaattcagcaggagcgcgacgcgccccgcgtacaagcaggg
ccagaaccagctctataacgagctcaatctaggcgaagagaggagtacgatgttttgacaagagagctggccggg
accctgagatgggggggaaagccgagaagggaagcctcaggaaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcc
tacagtgagattgggatgaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaagga
cacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc

[0417]

[0418] "139"로 명명된 scFv 단편은 EGFRvIII에 대한 인간 항체이다 (Morgan et al., 2012 Hum Gene Ther 23(10):1043-53). 이러한 139 scFv를 포함하는 EGFRvIII CAR은 상기 139 scFv를 초기에 합성함으로써 생성시켰다. 139 scFv에 대한 서열을 리더 서열, CD8 힌지, 막횡단 (TM) 도메인, 및 목적하는 신호전달 도메인과 함께 클로닝하였다. 예를 들어, 139 scFv에 대한 서열을 4-1BB 및 CD3 제타에 대한 신호전달 도메인과 함께 클로닝하였다. 렌티바이러스 생성을 위하여 pELNS 벡터로부터 CAR 구축물 (139scFv-BBZ)이 발현된다.

[0419] 139scFv-BBz CAR (아미노산) (서열 3)

MALPVTALLPLALLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGIRNNL
AWYQQKPGKAPKRLIYAASNLQSGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSSLQPEDFATYYC
LQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGTLVTVSSASTTTPAPRP
PTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLV
ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYDALHMOALPPR

[0420]

[0421] 139scFv-BBz CAR (핵산) (서열 20)

Atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccgctggccttgcctcctcacgccgccagggccggtccgacatccagatgaccaga
 gccctagcagcctgagcggcagcgtgggcacagagtgaccatcacctgtcgggccagccagggcatcagaaca
 acctggcctggatcagcagaagcccgccaaggcccccagagactgatctacgctgccagcaatctgcagagcggcgtgcc
 cagcagattaccgggaagcggctccggcaccgagttaccctgatcgtgtccagcctgcagcccaggacttcgccactact
 actgcctgcagcaccacagctacctctgaccagcggcggagggaccaagggtggagatcaagcggaccggcagcaccagc
 ggcagcggcaagcctggcagcggcggaggggaagcagggtccagggtgctggaatctggcggcggactggtgcagcctggcggcagc
 ctgagactgagctgtgccggcagcggcttacccttcagcagctacgccatgtcttgggtccggcaggtcctctggaag
 ggcctggaatgggtgtccgccatcagcggctctggcggctccaccaactacgccgacagcgtgaaggccgggttcacatcagccgg
 gacaacagcaagaacaccctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgccgtgtactactgtgccgg
 cagcagcgggtggagcgtactggggccagggcacactgtgtcacagtgtctagcgtagcaccacgacgccagcggcgc
 gaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtgcagcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggcagcggcgggggg
 cgcagtgcacacgagggggctggaacttcgcctgtgatctacatctgggcgcccttgccgggacttggggctccttctcctgtcactg
 gttatcacctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaccatttatgagaccagtacaaactactcaagga
 agatggctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggtgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacccccgc
 gtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgg
 gacctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggagg
 cctacagtgaagtgatgaaaggcagcggcggaggggcgaaggccacgatggcctttaccagggtctcagtagcaccaccaag
 gacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgt

[0422]

[0423] CAR 성분

[0424] 핵산 서열:

[0425] ● 3C10 scFv 뉴클레오티드 서열 (마우스); (서열 4)

GAGATTTCAGCTGCAGCAATCTGGGGCAGAACTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCA
 AGCTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTGAAGACTACTATATTCAGTGGGTG
 AAGCAGAGGACTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATTGATCCTGAGAATG
 ATGAAACTAAATATGGCCCAATATTCCAGGGCAGGGCCACTATAACAGCAGACAC
 ATCCTCCAACACAGTCTACCTGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG
 TCTATTACTGTGCCCTTTCGCGGTGGAGTCTACTGGGGGCCAGGAACCACTCTCACA
 GTCTCCTCAGGAGGTGGTGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCGGAGGTGGTGGTTCACA
 TATGGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCACTCTATCGGTTGCCATTGGACAATC
 AGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACAT
 ATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTCTCTG
 GTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGAC
 AGATTTACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTATT
 GCTGGCAAGGTACACATTTTCCTGGGACGTTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGAT
 AAAA

[0426]

[0427]

- 139 scFv 뉴클레오타이드 서열 (인간화); (서열 5)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG
TGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCA
GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTGCAG
AGCGGCGTGCCCAGCAGATTACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGA
TCGTGTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCAC
AGCTACCCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGGCA
GCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCT
GGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGG
AAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCAACTAC
GCCGACAGCGTGAAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC
TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC
GGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTA
GC

[0428]

[0429]

- 리더 (핵산 서열); (서열 6)

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCG

[0430]

[0431]

- 힌지 (핵산 서열); (서열 7)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
AGCCCCGTGTCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

[0432]

[0433]

- 막횡단 (핵산 서열); (서열 8)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACT
GGTTATCACCCCTTTACTGC

[0434]

[0435]

- 4-1BB 세포내 도메인 (핵산 서열); (서열 9)

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA
AGAAGGAGGATGTGAACTG

[0436]

- [0437] ● CD3 제타 (핵산 서열); (서열 10)
- AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0438]
- [0439] ● CD3 제타 (핵산 서열; NCBI 참조 서열 NM_000734.3); (서열 100)
- AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0440]
- [0441] 아미노산 서열:
- [0442] ● 3C10 scFv 아미노산 서열 (마우스); (서열 11)
- EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVVKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDYAVYYCAFRGGVYWGPGTTL
TVSSGGGGSGGGSGGGSGHMDVVMQTQSPLTSLVAIGQSASISCKSSQSLDSDG
KTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGI
YYCWQGTHFPGTFGGGTKLEIK
- [0443]
- [0444] ● 139 scFv 아미노산 서열 (인간); (서열 12)
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRNNLAWYQQKPGKAPKRLIYAASNQ
SGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGS
TSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
GKGLEWVSAISGSGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CAGSSGWSEYWGQGTLLTVSS
- [0445]
- [0446] ● 리더 (아미노산 서열) (서열 13)
- MALPVTALLLPLALLLHAARP
- [0447]
- [0448] ● 힌지 (아미노산 서열) (서열 14)
- [0449] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0450] ● 막형단 (아미노산 서열) (서열 15)

IYIWAPLAGTTCGVLLLSLVITLYC

[0451]

[0452] ● 4-1BB 세포내 도메인 (아미노산 서열) (서열 16)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0453]

[0454] ● CD3 제타 도메인 (아미노산 서열) (서열 17)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0455]

[0456] ● CD3 제타 도메인 (아미노산 서열; NCBI 참조 서열 NM_000734.3) (서열 99)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0457]

[0458] 서열 11의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 4로서 제공된다. 서열 12의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 5로서 제공된다. 서열 13의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 6으로서 제공된다. 서열 14의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 7로서 제공된다. 서열 15의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 8로서 제공된다. 서열 16의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 9로서 제공된다. 서열 17의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 10으로서 제공된다. 서열 1의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 18로서 제공된다. 서열 2의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 19로서 제공된다. 서열 3의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 20으로서 제공된다. 서열 99의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열 100으로서 제공된다.

[0459] **실시예 4: EGFRvIII CAR에 대한 예측된 CDR 명칭**

[0460] 카바트(Kabat) 하에 EGFRvIII CAR에 대한 예측된 CDR 명칭은 다음과 같다:

[0461] ● VH:

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVWKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDYAVYYCAFRGGVYWGPQT
LTVSS;(서열 21);

[0462]

[0463] [여기서, CDR1은 DYYIH (서열 22)이고, CDR2는 RIDPENDETKYGPIFQG (서열 23)이며, CDR3은 RGGVY (서열 24)이다].

[0464] ● VL:

DVVMTQSPLTSLVAIGQSASISCKSSQSLLSDGKTYLNLWLLQRPGQSPKRLISL
VSKLDSGVDPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIIYCWQGTHTFPGTFFGGGTKLEIK;
(서열 25);

[0465]

[0466] [여기서, CDR1은 KSSQSLLSDGKTYLN (서열 26)이고, CDR2는 LVSKLDS (서열 27)이며, CDR3은 WQGTHTFPGT (서열 28)이다].

[0467] 코티아(Chothia) 하에 EGFRvIII CAR에 대한 예측된 CDR 명칭은 다음과 같다:

- [0468] ● VH:
- EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVWKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCAFRGGVYWGP GTT
LTVSS;(서열 29);
- [0469]
- [0470] [여기서, CDR1은 GFNIEDY (서열 30)이고, CDR2는 DPENDE (서열 31)이며, CDR3은 RGGVY (서열 32)이다].
- [0471] ● VL:
- DVVMVTQSPLTLSVAIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISL
VSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHTFPGTFGGG TKLEIK;
(서열 33);
- [0472]
- [0473] [여기서, CDR1은 SQSLDSDGKTY (서열 34)이고, CDR2는 LVS (서열 35)이며, CDR3은 GTHTFPG (서열 36)이다].
- [0474] **실시예 5: 무린 항-EGFRvIII 항체의 인간화**
- [0475] 무린 EGFRvIII 항체를 인간화하는 것이 임상적 환경에 요망되는데, 여기서 마우스-특이적 잔기는 무린 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포로의 치료를 받은 환자에서 인간-항-마우스 항원 (HAMA) 반응을 유도시킬 수 있다. 하 이브리도마 유래된 무린 EGFRvIII 항체의 VH 서열과 VL 서열은 공개된 문헌으로부터 추출하였다 (Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy, 23:1043-1953, 상기 참조). 인간화는 무린 EGFRvIII 항체로부터의 CDR 영역을 인 간 생식세포계 수용자 프레임워크 VH1_1-f 또는 VH5_5a 뿐만 아니라 VK2_A17 또는 VK4_B3 (vBASE 데이터베이스) 상으로 이식함으로써 달성하였다. 이러한 CDR 영역 이외에도, CDR 영역의 구조적 완전성을 뒷받 침하는 것으로 여겨지는 여러 프레임워크 잔기, 즉 VK2 #36, #49, VK4 #2, #36, #46, #49, VH1 #2, #24, #76, #94 및 VH5 #2, #24, #73, #76, #94를 상기 무린 서열로부터 보존하였다. 추가로, 인간 J 요소 JH6 및 JK4를 중쇄와 경쇄에 각각 사용하였다. 이로써 생성된 인간화 항체의 아미노산 서열은 도 9에 도시된 경쇄의 경우에 는 VK2_A17/Hz1 및 VK4_B3/Hz1로 명명되었고, 중쇄의 경우에는 VH1_1-f/Hz1, VH5_5-a/Hz1로 명명되었다. 잔기 넘버링은 카바트 (상기 문헌 [Kabat E.A. et al., 1991] 참조)에 따른다. CDR 정의에 관해서는, 카바트뿐만 아 니라 코티아 (상기 문헌 [Chothia et al., 1987] 참조) 둘 다를 사용하였다. 마우스 EGFRvIII으로부터 보유된 프레임워크 잔기는 박스 안의 볼드체/이탤릭체로 제시되고, CDR 잔기에는 밑줄이 그어져 있다.
- [0476] 도 9에 제시된 바와 같은 인간화 경쇄와 중쇄 서열을 근거로 하여, 총 8개의 프레임워크 조합물을 사용하여, 추 가 검증을 위한 가용성 scFv를 생성시켰다. VL 도메인과 VH 도메인이 scFv 내에서 보여지는 순서는 다양하였고 (즉, VL-VH, 또는 VH-VL 배향), "G₄S" 소단위 (서열 37)의 4개 카피 [여기서, 각 소단위는 서열 GGGGS (서열 37)를 포함한다]를 사용하여 상기 프레임워크를 연결시켰다. 도 9는 카바트 등 및 코티아 등 (상기 참조)에 의 해 계산된 VH 서열과 VL 서열 내의 CDR을 개시한다.
- [0477] 클로닝:
- [0478] 마우스 및 인간화 VL 도메인과 VH 도메인을 코딩하는 DNA 서열을 수득하였고, 상기 구축물에 대한 코돈을, 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*)로부터의 세포에서 발현하기 위해 최적화하였다.
- [0479] VL 및 VH 도메인을 코딩하는 서열을, 포유동물 세포에서의 분비에 적합한 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 이러한 발현 벡터의 요소는 프로모터 [시토메갈로바이러스 (CMV) 증강인자-프로모터], 분비를 촉진시키기 위한 신호 서열, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결인자 [소의 성장 호르몬 (BGH) 유전자], 에피솜 복제와 원핵생물에 서의 복제를 허용하는 요소 (예를 들어, SV40 기점 및 ColE1, 또는 당해 분야에 공지된 기타), 및 분비를 허용 하는 요소 (엠포실린 내성 유전자 및 제오신 마커)를 포함한다.
- [0480] **실시예 6: 인간화 항-EGFRvIII 가용성 scFv 단편의 특성화**
- [0481] 가용성 scFv 단편은 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 상기 언급된 바와 같이 생성하였다. 이들 가용성 scFv 를 특성화 연구에 사용하여, scFv의 안정성, 세포 표면 발현 및 결합 특성을 조사하였다.
- [0482] scFv 발현 및 정제
- [0483] 각 scFv 구축물의 형질감염을 위해, 대략 3e8개의 293F 세포를, 형질감염 시약으로서 PEI를 3:1 (PEI:DNA)의 비

로 사용하여 100 μ g의 플라스미드로 형질감염시켰다. 세포를 37°C, 125 rpm, 8% CO₂ 하에 진탕 플라스크 내에서 100 ml EXPi293 발현 배지 (인비트로젠)에서 성장시켰다. 6일 후에 배양물을 수거하고, 이를 단백질 정제에 사용하였다.

[0484] 3500 g 하에 20분 동안 침강시킴으로써 293F 세포를 수거하였다. 상등액을 수집하고, 이를 배큐캡(VacuCap)90 PF 필터 유닛 (w/0.8/0.2 μ m 슈퍼 막, PALL) 내로 여과시켰다. 대략 400 μ l의 Ni-NTA 아가로스 비드 [퀴아젠 (Qiagen)]를 상등액에 가하였다. 혼합물을 회전시키고 4°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이를 정제 칼럼 상으로 부하하고, 20 mM 히스티딘을 수반한 세척 완충액으로 세척하였다. 단백질을 300 mM 히스티딘을 수반한 500 μ l 용출 완충액으로 용출시켰다. 샘플을 4°C 하에 밤새 PBS 완충액에 대항하여 투석하였다. 나노드롭 (nanodrop) 2000c를 이용하여 단백질 샘플을 정량화하였다.

[0485] 인간 EGFR 야생형 또는 EGFRvIII을 발현하는 세포에 대한 정제된 scFv의 FACS 결합에 의한 EC₅₀

[0486] 다음 실험을 수행하여, 모든 인간화 EGFRvIII scFv 변이체가 EGFRvIII에 대해서는 거의 동등한 수준의 결합성을 지니고 있지만, 야생형 EGFR과는 결합하지 않는다는 것을 입증하였다.

[0487] HEK293F 현탁 세포를 야생형 hEGFR 또는 hEGFRvIII으로 일시적으로 형질감염시키고, 형질감염시킨지 2일 후에 수거하였다. 웰당 대략 5e5개 세포를 BD 팔콘(Falcon) 96 웰 판으로 옮겼다. 세포를 900 rpm 하에 [소르발 레전드(Sorval Legend) XT 원심분리기] 3분 동안 침강시켰다. 상등액을 제거하였다. 항-EGFRvIII scFv 단백질 샘플을 5% FBS를 수반한 DPBS에 희석시켰다. 샘플을 상기 웰 내로 가하고, 혼합하며 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 5% FBS를 수반한 DPBS에서 2회 세척하였다. 세포를 항-폴리 His PE (R&D)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하고, 2회 세척한 후 FACS 분석하였다 (BD 바이오사이언스로부터의 LSRII).

[0488] hEGFRvIII에 대한 마우스 scFv (m3C10)의 EC₅₀은 도 10에 도시된 바와 같이 약 5 nM인 것으로 결정되었다. 모든 인간화 EGFRvIII scFv 변이체는 한 자릿수의 EC₅₀ 값 내지 낮은 두 자릿수 nM EC₅₀ 범위 (5 내지 50 nM)를 나타내었다. 더욱이, 야생형 EGFR 발현성 세포주에 대한 구축물 2173 및 2174의 인지할 만한 결합이 전혀 검출되지 않았는데, 이는 도 11에 도시된 바와 같이, 무린 3C10과 비교해서 개선된 안전성 프로파일을 표시한다. 이들 연구에 근거하여, 클론 2173이 실시예 8에 나타난 바와 같이, 추가의 임상 특성화를 위해 선별되었다.

[0489] **실시예 7: 인간화 EGFRvIII CAR 구축물**

[0490] 최종 CAR 구축물에 사용될 scFv는 실시예 1에 기재된 인간화 프레임워크 서열로부터 유래되었다. VL 도메인과 VH 도메인이 scFv 내에서 보여지는 순서는 다양하였다 (즉, VL-VH, 또는 VH-VL 배향). (G4S)₄ (서열 113) 링커를 사용하여 가변 도메인을 연결시켜 표 1에 제시된 scFv를 창출하였다.

[0491] <표 1>

[0492] VH 및 VL 배향과 링커 길이를 나타내는 인간화 EGFRvIII scFv 구축물 (표는 서열 37로서 "G4S"를 개시한다)

구축물 ID	길이 aa	주석
108358	277	VH1-VK4, 4G4S
108359	277	VK4-VH1, 4G4S
108360	277	VH5-VK2, 4G4S
108361	277	VK2-VH5, 4G4S
107276	277	VH1-VK2, 4G4S
111046	278	VH5-VK4, 4G4S
111048	278	VK4-VH5, 4G4S
107277	277	VK2-VH1, 4G4S
107275		
mEGFRvIII 3C10	274	VH-VL, 3G4S+HM
EGFRvIII 139	269	VL-VH,

[0493]

[0494] 인간화 scFv 단편의 서열은 다음 표 2에 제공된다 (서열 38, 서열 44, 서열 50, 서열 56, 서열 62, 서열 68, 서열 74, 및 서열 80). 이들 scFv 단편을 부가 서열인 서열 13 내지 17과 함께 사용하여, 서열 43, 서열 49, 서

열 55, 서열 61, 서열 67, 서열 73, 서열 79, 및 서열 85를 수반하는 완전한 CAR 구축물을 생성하였다.

이들 클론은 모두, CD3제타 세포로부터 유래된 공동자극 도메인의 신호 도메인 상의 Q/K 잔기 변화를 함유하였다.

<표 2>

인간화 EGFRvIII CAR 구축물

명칭	서열 번호	서열
CAR 1		
CAR1 scFv 도메인	38	eiqlvqsgaevkkpgatvkisksgsfniedyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvtitadtstntvymelsslrseavvycafrggvywgqgtvtvssgggsgg ggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratinckssqllsdgktylnwlqkpg qppkrlislvsksldsgvpdrfsqsgsgtdftlisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkv eik
CAR1 scFv 도메인 nt	39	gaaatccagctggccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccaccgtcaagatct catgcaagggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccg ggaaaaggcctggaatggatgggcagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacgga ccgattttccaaggaagagtactatcaccgccgatacttcaaccaataccgtctcatggaac tgagctcgctccggtccgaagatactgcagtgattactgtgcctttcgcgagggggtgactg gggccaaggaaactactgtcactgtctcgcaggagcgcgagggtcgggagggagcgggag cggagggcgtggtcgggtggcgagggaagcgacgtggtgatgaccagtcgccgggactc cctgcgctgagcctcggagagagggcgactatcaattgcaagtcgtccagtcacttctgga ttccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccaggcgaccaccaaacggt tgatctccctgtgtccaaactggatagcggagtgctgaccgttctcgggtccggtagcgg gaccgacttaccctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtggtactactgct ggcagggaaccacttccctggcacctttggaggtggcaccaggtggagatcaag
CAR1 가용성 scFv - nt	40	atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctgggtcttctgctccacgccgctcggcccg aatccagctggccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccaccgtcaagatctc atgcaagggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccgg

		gaaaaggcctggaatggatgggcagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacggac cgattttccaaggagagtgactatcaccgccgatacttcaaccaataccgtctacatggaaact gagctcgctccgggtccgaagatactgcagtgattactgtgcctttcgaggagggtgactgg ggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggaggcgagggtcgggaggaggcgaggc ggaggcggtggtcgggtggcgagggaagcgacgtggtgatgaccagtcctccggactcc ctgcccgtgagcctcgagagaggcgactatcaattgcaagtcgtccagtcacttctggatt ccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccaggcgaccaccaaagcgtt gatctcccttgtgtccaaactggatagcggagtgctgaccgttctcggttccggtagcggg accgacttaccctgacgatcagctcactgcaggcgaggacgtggcagtgactactgtctg gcagggaaccacttccctggcacctttggaggtggcaccagggtggagatcaagggatcg caccaccatcaccatcatcatcac
CAR1 가용성 scFv - aa	41	<u>Malpvtalllplallhaarpeiqlvqsgaevkkgpatvkisksgsfniedyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrstedavyycfrgvy wgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqpsdslavslgeratinckssql ldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdfilitsslqaedvavy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh
CAR1 - 완전 - nt 렌터바이 러스	42	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttcgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg agatccagctggtgcagtcgggagctgaagtcaaaaagcctggcgcaaccgtcaagatctg tgcaaggatcagggttcaacatcgaggactactacatccattgggtgcaacaggcacccgg aaaaggcctggagtggtgaggaggattgaccagaaaatgacgaaaccaagtacggacc gatcttcaaggacgggtgacctcacggctgacacttccactaacaccgtctacatggaact ctcgagccttcgctcggaagataccgcggtgtactactgcgccttagaggtggagtactgg ggacaagggactaccgtcaccgtgtcgtcaggtggcgaggatcaggcgaggcggtcc ggtggaggaggaaagcgaggaggtggtccgacgtggtgatgacgcagtcaccggactcc ttggcgtgagcctgggtgaacgcgcactatcaactgaagagctccagagcttgcctgga ctccgatgaaaagacttatctcaattggctgcaacagaagcctggccagccgcaaaagagac tcatctactggtgagcaagctggatagcggagtgccagatcggttttcgggatcgggctcag gcaccgacttaccctgactatttctccctccaagccgaggatgtggccgtctactactgttg caggggactcacttccggggaccttcggtggaggcactaaggtggagatcaaaaccactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatgcctccagcctctgctcctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcataccggggtcttgacttgcctgc

[0499]

		gatactacatttgggccctctgctggtacttgcgggctctgctgctttcactcgtgatcact ctttacttaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgagcctgt gcagactactcaagaggagacggctgtcatccgggtccagaggaggaggaagcgg ctgcgaactcgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggtacgacgtgctggacaagcg gagagacgggaccagaaatggcggggaagccgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccacca aggacacctatgacgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 1 – 완전 - aa	43	malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgsfnie <u>dvvih</u> wvqqap gkglewm <u>gridpendetkvpifqgr</u> rvitadtstntvymelssrsedtavyyca <u>frgg</u> <u>vyw</u> qgttvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqspdslavslgeratinck <u>ss</u> <u>qslldsdgktyln</u> wlqqkpgppkrlis <u>lvskldsg</u> vpdfsgsgsgtdftltisslqaedva vyycw <u>qgthfpgt</u> fgggtkveikttppaprpptaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkllyifkpfmrpvqtteedgcscrpe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemggkprrk npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 2		
CAR2 scFv 도메인	44	dvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsg vpdfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggsgsgsgsg ggsgsgsgseiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgsfniedyihwvqqapgkglewm gridpendetkvpifqgrvitadtstntvymelssrsedtavyycafrggywqgttvt vss
CAR2 scFv 도메인 - nt	45	gatgtcgtgatgaccagtcgccagactccctcgagtgctcttgggagaaacggccaccatc aactgcaaatcgagccagtcactgctggactcagacggaaagacctactcaactggctgca gcagaagcctggccagccaccgaagcgctgatctccctggtccaagctggactcgggc gtcccgagacaggttagcggtagcggctcgggaaccgacttactctgaccattagctcgtc caagctgaagatgtggcggtctactactgctggcaggggaccacttccccgggaccttggc ggaggaaactaaagtcgaaatcaaaggaggagcgatcaggtggaggaggcagcggagg aggaggagcgcggtggcggtccgaaatcaactgtgcaatccgtgccgaggtgaag

[0500]

		aaacctgggtgccactgtcaagatctcgtgtaaggatcgggattcaatatcaggactactaca tccactgggtgcaacaggcgccaggaaaggattggagtgatgggtcgcacgcacccgga aaacgatgagactaagtacggaccgatctccaaggccgggtcacgactactgcggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacgccgtgtactactg cgcatcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcg
CAR2 - 가용성 scFv - nt	46	atggccctccctgtcaccgccctgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg atgtcgtgatgaccagtcgccagactccctgcagtgctcttgggagaacgggccaccatca actgcaaatcgagccagtcactgctggactcagacggaagacctacctaactggctgcag cagaagcctggccagccaccgaagcgcctgatctccctggtgtccaagctggactcggcgct cccggacaggttttagcggtagcggctcgggaaccgacttcaacttgaccattagctcgtcca agctgaagatgtggcggtctactactgtggcaggggaccacttccccgggacctttggcg ggggaactaaagtcgaaatcaaggaggagcggatcagggtgaggaggcagcggaggga ggaggagcggcggtggcggtccgaaattcaacttgtgcaatccggtgccgaggtgaaga aacctgggtgccactgtcaagatctcgtgtaaggatcgggattcaatatcaggactactacat ccactgggtgcaacaggcgccaggaaaggattggagtgatgggtcgcacgcacccgga aaacgatgagactaagtacggaccgatctccaaggccgggtcacgactactgcggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacgccgtgtactactg cgcatcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcggggtcac atcaccaccatcatcaccac
CAR2 - 가용성 scFv - aa	47	<u>malpvtalllplallhaar</u> pdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq kpgqppkrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkiacksgsfniedyi hwwqqapgkglewmgridpendetkygpfqgrvtitadtstntvymelsslrstedavy ycafrggywgqgtvtvssgshhhhhhhh
CAR 2 - 완전 - nt	48	atggccctccctgtcaccgccctgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acgtggatgactcaaaagccagattccttggctgtctcccttgagaaagagcaacgatcaa ttgcaaaagctcgagtcctgttggactccgatggaaaaacctacctaactggctgcagca gaagccgggacaaccaccaaagcggctgatttcctcgtgtccaagctggacagcggcgtg ccggatcgttctcgggacgcggctcgggaaccgattttactctactatttctcactgcaagc ggaggacgtggcggtgtattactgctggcagggcactcacttccgggtacttttggaggagg taccaaaagtcgaaatcaagggtgaggcgggagcggaggaggcgggtcggaggaggga

[0501]

		ggatcgggtggcggaggctcagaaatccagctgggtgcagtcaggtgccgaagtgaagaag cctggggccacgggtgaagatctcgtgcaaggggagcggattcaacatcaggattactacat ccattgggtgcaacaggcccctggcaaagggtggaatggatgggaaggatcgaccccgga gaatgacgagactaagtacggcccgatctccaaggacgggtgacctactgcagacactt caaccaacaccgtctacatggaactctcctcgtgcgtccgaggacaccgcccgtgtactact gtgctttcagaggaggagtctactggggacagggaacgacctgacctcagctcaaccact accccgacaccgaggccaccccccggctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcg tccggagcatgtagaccgcagctgggtggggcgtgcataccggggtcttgacttcgcct gcgatatctacattggcccctctggctgggtactgcggggtcctgctgctttcactcgtgatca ctctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgagccct gtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggttcccagaggaggaggaaaggcg gctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgacgcagatgctccagcctacaagcaggggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgagagaggagtacgctgctggacaagc ggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgagaaaatccccaaggagg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag gggaacgcagaaggcgaaggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccacc aaggacacatgatgcgtcttcacatgcaggccctgcccctcgg
CAR 2 - 완전 - aa	49	malpvtalllplallhaarpdvmtqspdslavslgeratinc <u>kssqslldsdgktyln</u> wlq qkpgppkrlis <u>lvskldsg</u> vpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyyc <u>wqgthfpgtfg</u> ggtkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkiskgsgfnied <u>vyih</u> wvqqapgkglewm <u>gridpendetkypifggr</u> vtitadtstntvymelssrled tavyyca <u>frggvy</u> wgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgscrfpe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreedyldkrrgrdpemggkprrk npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 3		
CAR3 scFv 도메인	50	eiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyyc <u>afrggv</u> wgqgtvtvsaggsgsg ggsgggsgggsgggsgdvmtqspslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpg qsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlki srveaedvgyycwqgthfpgtfgggtkv

[0502]

		eik
CAR3 scFv 도메인 nt	51	gagattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgaagccagggaatcgttgcgcacatca gctgtaaagggtccggcttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccag gaaaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggac cgatcttcaaggacacgtgactatctccggacaccagcatcaatacgggtgacctccaatg gtcctcactcaaggcctcgataccgcgatgtactactgcgcgttcagaggagcgtctactg gggacaagggactactgtgactgtctcatcaggagggtggggaagcggaggaggtggctcg ggcggagggtggatcggaggaggagggtccgatgtgtgtgacccagtcgccactgtcgc tcccggtgacctcgacagcctgtagcatctcgtgcaaatcctcgcaatccctgctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgcctggccagagcccagaaggctt atctcgtggtgtcaaaagctggatagcgggtgtcccaccgggttcagcggctcagggtcagg aaccgattcaccttgaagatctcccgctgggaagccgaagatgtcggagtctactactgtgg cagggtactcactccggggaccttgggtggcgactaagggtcgagattaag
CAR 3 - 가용성 scFv - nt	52	atggccctccctgtcaccgcccgtgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg agattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgaagccagggaatcgttgcgcacatcag ctgtaaagggtccggcttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccagga aaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggaccg atcttcaaggacacgtgactatctccggacaccagcatcaatacgggtgacctccaatggt cctcactcaaggcctcgataccgcgatgtactactgcgcgttcagaggagcgtctactggg gacaagggactactgtgactgtctcatcaggagggtggggaagcggaggaggtggctcggg cggagggtggatcgggaggaggagggtccgatgtgtgtgacccagtcgccactgtcgtc ccggtgacctcgacagcctgtagcatctcgtgcaaatcctcgcaatccctgctggactcg gacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgcctggccagagcccagaaggctta tctcgtggtgtcaaaagctggatagcgggtgtcccaccgggttcagcggctcagggtcagga accgattcaccttgaagatctcccgctgggaagccgaagatgtcggagtctactactgtggc agggtactcactccggggaccttgggtggcgactaagggtcgagattaagggtcacacc atcatcaccatcaccaccac
CAR 3 - 가용성 scFv - aa	53	malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslrisccksgsfniedyihwvrqmp gkglewmgripndetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkadtamyycfrgg vywgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsvmtqspslpvtlqgpasisckss qslldsdgktylnwlqprgqsprrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgv

[0503]

		yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh
CAR 3 – 완전 - nt	54	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtcttctgctccacgccgctcggcccg aaatccagctggtgcaaagcggagccgaggtgaagaagcccgagaatccctgcgcatctc gtgtaagggttccggctttaacatcaggattactacatccactgggtgagacagatgccggg caaaggtctggaatggatgggcccacgcacccggagaacgacgaaaccaaatacggacc aatcttcaaggacatgtgactatttccgcgatacctccatcaacactgtctactgcagtgga gctcgtcaaggcgtcggataccgccatgtactactgcgcattcagaggaggtgtgactggg gccagggcactacggtcaccgtgtcctcgggaggtggagggtcaggaggcggaggtcgg gcggtggagatcaggcggaggagggaagcgtgtggtcatgactcaatccccactgtcact gcctgtcactctggggcaaccggcttccatctcatgcaagtcaagccaatcgtctgcgactcc gacggaaaaacctacctaattggcttcagcagcggccaggcctcgcctcggaggctgat ctcactcgtgtcgaagcttgactccgggtgccggatcggttagcggaaagcgatcgggga ccgacttcacgttgaaagtagccgggtggaagccgagacgtgggagtctattactgtggtc aggggaccacttccggggactttcggaggaggaccaaagtcgagatfaagaccactac cccagcaccgagggccaccacccggctcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggtcttgacttgcctgc gatactacatttgggcccctctggctggtacttgcgggtcctgctgcttactcgtgatcact cttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggagggacggctgtcatgccggttccagaggagggaaggcgg ctgcgaaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgactgtgctgacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcggggaagccgcgagaaagaatccccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaagg ggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 3 – 완전 - aa	55	malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgeSlrisksgfniedvvihwvrqmp gkglewmgridpendetkvgpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrg gvvwwgqgttvvssgggsgggsgggsgggsgggsvmtqspislpvtlqpasisck sqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadv gvyycwqgthfpgtfgggtkveiktttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfp

[0504]

		eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 4		
CAR4 scFv 도메인	56	dvvmtqspslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqrrpgqsprrlslvskldsgv pdrfsgsgsgtdflkisirveadvgyvycwqgthfpgtfgggkveikggsgsgsgsgsg ggsgsgsgseiqlvqsgaevkkpgeslriscksgsfniedyihwvrqmpgkglewmg ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamycafrggyvvgqgttv tvss
CAR4 scFv 도메인 nt	57	gacgtcgtcatgacccagagcccgtgtcactgcctgtgacctgggccagccggcgtccat tagctgcaaatcctcgcaatccctgtctgactcagacggaaaaacgtacttgaactggctcaa cagcgccctgggcaatcccaaggcggttatctactcgtcagcaagctcgatagcgggtgc ccagacagattttcgggctcgggatcgggactgatttactctgaagatctgcgggtggaa gccgaggtgtgggagtgtactattgtctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcgg aggaaactaaggtcgagatcaaaggaggaggtggatcagcgagggtgggagcggaggag gaggaaagcggtgtggaggttccgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaaga agccgggagaatccctgcgcatctcgtcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactac atccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttggatggatgggacgattgacctgg aaaatgatgaaaccaatacgggccaatcttccaaggccagtgaccattagcgctgacactt ccatcaacaccgtgtacctcagtggtcctcactgaaggcgtcggacactgccatgtactactg tgcattcagaggagggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctcc
CAR4 – 가용성 scFv - nt	58	atggccctccctgtcaccgcccgtgtgcttccgtggctcttctgctccacgcccgtcggccc acgtcgtcatgacccagagcccgtgtcactgcctgtgacctgggcccagccggcgtccatta gctgcaaatcctcgcaatccctgtctgactcagacggaaaaacgtacttgaactggctcaac agcgccctgggcaatcccaaggcggttatctactcgtcagcaagctcgatagcgggtgcc cagacagattttcgggctcgggatcgggactgatttactctgaagatctcgggtggaag ccgaggtgtgggagtgtactattgtctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcgg ggaaactaaggtcgagatcaaaggaggaggtggatcagcgagggtgggagcggaggagg aggaaagcggtgtggaggttccgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaagaa gccgggagaatccctgcgcatctcgtcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactacat ccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttggatggatgggacgattgacctggga

[0505]

		aaatgatgaaaccaaatacgggccaatctccaaggccacgtgaccattagcgtgacacttc catcaaacaccgtgtaccttcagtggtcctcactgaaggcgtcggacactgcatgtactactgt gcattcagaggagggtctactggggacaggccaccaccgtgaccgtgagctccggctcgc atcacatcatcaccaccatcac
CAR4 – 가용성 scFv -aa	59	<u>malpvtalllplallhaarpdvmtqspislptlqgpasickssqslldsdgktylnwlqq</u> rpgqsprrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaevgvyycwqgthfpgtfggg tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeIsrisksgsfniedyi hwvrmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam yycfrggyvwgqgtvtvssgshhhhhhhh
CAR 4 – 완전 - nt	60	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acgtcgtcatgaccaatcccctctctccctgccggtcaccctgggtcagccggcgtcgtatctc atgcaaaaagctcacagtcctgctggattcggagcggaaaaacactacttgaactggctccaaca gagggccgggtcagtcctccctcgcagactgactctgctggtgagcaagctcgtactcgggtgtgc cggatcgggttctccgggtcaggatcgggcaccgactttacgtcaagattcgagagtggagg ccgaggatgtgggagtgtactattgctggcagggcacgcattccccgggacctttggaggc gggactaaggtggaaatcaaggagggtggcggatcagcggagggagcagcggcggag gtggatcaggaggcggagggtcagagatccagctgggtccaaagcggagcagagggtgaaga agccaggcagtgctccttcgcatttcgtgcaaggagcggcttcaacattgaagattactacat ccactgggtgcggcaaatgccaggaaagggtctggaatggatgggacggatcaccaga aaatgatgaaactaagtacggaccgatcttccaaggacacgtcactatctccgcgacacttc gatcaaacaccgtgtacctccagtggagcagctgaaagcctccgacaccgctatgtactactgt gccttccgaggaggtctactggggacaggggactactgtgaccgtgtcgtccaccactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctgggtgggcccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgc gatatctacatttggccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgggtcggaaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggaggaaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgactgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaagaatcccaaggaggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg

[0506]

		ggagacgcagaaggagcgaaggccgacctgtaccaggcgactcacgcccccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 4 – 완전 - aa	61	malpvtalllplallhaarpdvmtqpslsipvltgqpasisckssqslldsdgktylnwlq qrpgsqprrlislvskldsgvpdrfsgsgstdftlkisrveadvgyyycwqgthfpgtfg ggtkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfniedy yihwvrqmpkgglewmgridpendetkvypifqghvhtisadtsintvyqlwsslkasd tamyycafrggvwywgqgttvsvssttppaprpptaptiasqplsipeacrpaaggavhtr glfdfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgkrkllyifkqpfmrvpqttgeedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeyvdlkrrgrdpemggkprr knpeqglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 5		
CAR5 scFv 도메인	62	eieqlvqsgaevkkpgatvkiskcgsfniedyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvritadtstntnymelsslrstedavyycafrrggvwywgqgttvsvssggsgsg ggsgsgggsgggsgsdvmtqpslsipvltgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpg qsprllislvsklsgvpdrfsgsgstdftlkisrveadvgyyycwqgthfpgtfggggtkv eik
CAR5 scFv 도메인 nt	63	gaaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattt catgcaagggatcgggctcaacatcagaggattactacatccactgggtgcagcagggacca ggaaaaaggacttgaaftggatgggcccggatcgaccggaaaatgacgagactaatgacggcc ctatctccaaggacgggtgacgataccgcagacactagcacaacaccgtctatatggaac tctcgtccctgagggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgttcgcggaggtgtgactgg ggacaggggtaccaccgtcaccgtgtcatcgggcggtggaggctccgggtggaggagggtca ggaggcggtggaagcggaggagcggcgagcgactgtgtcatgactcaatcgccgtctgcg ctgccctgactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctcgagtcactgcttgact ccgatggaagacctactctcaactggctgcagcaacgccaggccaatccccagacgcct gatctcgttgtgtcaaaagtggactcagggtgccggaccggttctccgggagcggggtcgg gcacgggatttactctcaagatctccagagtggaaagccgaggatgtggagtgctactactgct ggcaggggaaccatttccctggaactttggcggagggaactaaggctcgagattaa
CAR5 - 가용성	64	atggccctccctgtgaccgcccctgctgcttccgtggctcttctgctccacgccgtcgccccc aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgtaacctggaagattta

[0507]

scFv - nt		<p>tgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatgggcccggatcgaccggaaaatgacgagactaagtacggccct atctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccacaccgtctatatggaactc tcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggaggtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcggcggtggaggctccggtggaggagggtcag gaggcggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatcgccgtgtcgc tgcccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctcgagtcactgctgactc cgatggaaagacctacctaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcctg atctcgttggtgtcaaaagctggactcaggggtccggaccggttctccggagcgggtcggg cacggattcactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtggagtgctactactgtg gcagggaaccatttccctggaacttttggcggaggaaactaaggtcgagattaaaggagcc accatcatcatcaccaccaccac</p>
CAR5 - 가용성 scFv -aa	65	<p><u>malpvtallplallhaarpeiqlvqsgaevkkgpatvkisksgsfniedyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpfqgrvtitadtstntvymelssrsedavyycafrgvy wgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqpslslpvtlqgpasisckssqsl ldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgyvy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</p>
CAR 5 – 완전 - nt	66	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgtcgcccg aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaacgggtgctaccgtgaagatttca tgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatgggcccggatcgaccggaaaatgacgagactaagtacggccct atctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccacaccgtctatatggaactc tcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggaggtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcggcggtggaggctccggtggaggagggtcag gaggcggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatcgccgtgtcgc tgcccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctcgagtcactgcttgactc cgatggaaagacctacctaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcctg atctcgttggtgtcaaaagctggactcaggggtccggaccggttctccggagcgggtcggg cacggattcactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtggagtgctactactgtg gcagggaaccatttccctggaacttttggcggaggaaactaaggtcgagattaaaccactac cccagcaccgagggccaccaccgggtcctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtc</p>

[0508]

		cggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgc gatatctacattggggccctctggctggtacttgcggggtcctgctgttctactcgtgatcact ctttactgtaagcgcgggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaaggaggagcgctgttcatgccggttccagaggaggaggaaaggcgg ctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggctgggaagccgcgagaaagaatcccaaggaggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaaggagcaaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 5 – 완전 - aa	67	malpvtalllplallhaarpeiqlvqsgaevkkgatvkiacksgsfni <u>edvvi</u> hvvqqap gkglewm <u>gridpendetkvgpifqgr</u> vtitadtstntvymelssrsedtavyyc <u>frgg</u> <u>vv</u> wgqgttvvssgggsgggsgggsgggsgdvmqtqslslpvtlqgpasick <u>ss</u> <u>qslldsdgktyln</u> wlqqrpgqsprlls <u>lvskldsg</u> vpdrfsgsgsgtdftlksrveadv vyyc <u>wqgthfpgtf</u> gggtkveikttpprptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklliyfkqpfmrpvqttqeedgcscrfe eeeggcelrvkfsadapaykqgqnqlynelnlgrreedvldkrrrdpemggkprrk npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 6		
CAR6 scFv 도메인	68	eiqlvqsgaevkkgeslrisksgsfniedyihwvrqmpgkglewmgridpendetk ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgttvvssgggsg ggsgsgggsgggsgdvmqtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqkpg qppkrllsvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlsslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkv eik
CAR6 scFv 도메인 nt	69	gaaatccagctggtgcagtcaggcgccgaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatct cgtgcaagggtcggggtcaacatcgaggactactactcattcagggtcaggcagatgccg ggaaaaggactggaatggatggccggatcgaccagaaaatgacgaaaccaatacggg ccgattttcaaggccacgtgactatcagcgacagacagcatcaactgtctacctccagt ggtcctcgttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagaggcggggtgtact ggggacaagggaaccactgtgaccgtgagcagcggagggtggcggctcgggaggggtggg

[0509]

		agcggaggaggaggtccggcgggtggaggatcagatgtcgtgatgacccagtcgccgact ccctcgtgtctcactggcgagcgcgcgacatcaactgcaaatcgagccagtcgtgttg gactccgatggaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaacctccaagcg gctcatctcgttgtgtcaaaactcgattcgggagtgccagaccgttctcggggccgggag cggaaactgactttactttgaccatttcctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg gcagggcacgcatttcctggaaccttcgggtggcggaaactaagggtggaatcaag
CAR6 - 가용성 scFv - nt	70	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtctccacgccgctcggccc aaatccagctggtgcagtcaggcgcgaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatctc gtgcaagggtcgggttcaacatcgaggactactacattcactgggtcaggcagatgccgg gaaaggactggaatggatggcgccgagtcgaccagaaaatgacgaaacaaatacgggc cgatttttaaggccacgtgactatcagcgcagacacgagcatcaacactgtctacctccagt gtcctcgttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagaggcgggtgtactg gggacaaggaaacctgtgaccgtgagcagcggaggtggcgctcgggaggaggtggga gcggaggaggaggttccggcgggtggaggatcagatgtcgtgatgacccagtcgccgactc ctcgtgtctcactggcgagcgcgcgacatcaactgcaaatcgagccagtcgctgttg actccgatggaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccagacaacctccaagcgg ctcatctcgttgtgtcaaaactcgattcgggagtgccagaccgttctcggggccgggagc ggaactgactttactttgaccatttcctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg cagggcacgcatttcctggaaccttcgggtggcggaaactaagggtggaatcaaggatcaca ccaccatcatccatcaccaccat
CAR6 - 가용성 scFv - aa	71	<u>malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkpgeslrisksgfniedyyihwvrqmp</u> <u>gkglewmgripndetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrgg</u> <u>vywqgttvsvsgggsgggsgggsgggsgggsvvmtqspdslavslgeratinckss</u> <u>qslldsdgktylnwlqkpgppkrlislvskldsgvpdrfsrgsgtdfilitsslqaedvav</u> <u>yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</u>
CAR6 - 완전 - nt	72	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtctccacgccgctcggccc agattcagctcgtgcaatcgggagcgggaagtcaagaagccaggagtccttgcggatctca tgcaagggtagcggctttaacatcgaggattactacatccactgggtgaggcagatgccggg gaagggactggaatggatgggacggatcaccagaaaacgacgaaactaagtacgggtcc gatctccaaggccatgtgactattagcggcgtacttcaatcaataccgtgtatctgcaatggtc ctcattgaaagcctcagataccgcgatgtactactgtgcttcaaggagggtctactgggga

[0510]

		cagggaactaccgtgactgtctcgtccggcggaggcgggtcaggaggtggcggcagcggga ggaggagggtccggcggagggtgggtccgacgtcgtgatgaccagagccctgacagcctg gcagtgagcctgggcgaaagagctaccattaactgcaaatgctgcagagcctgctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagaaaaagcctggccagccaccgaagcgctt atctcactgggtgtcgaagctggattcgggagtgcccgatcgcttctccggctgggatcgggt actgacttcaccctcactatctcctcgttcaagcagaggacgtggccgtctactactgctggca gggaacccactttccgggaaccttcggcggaggacgaaagtggagatcaagaccactacc ccagcaccgagggcaccaccccggtcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcagttagaccgcagctgggtgggcccgtgcataccggggtctgacttcgctgcg atatctacatttggcccctctggctggtacttgcgggctcctgctgttctactcgtgatcactct ttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgagggcctgtg cagactactcaagaggagacggctgtcatgcccgttccagaggagggaagggcgct gcgaactgcgctgaaattcagccgagcgagatgctcagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaagaatcccaagaggcgct gtacaacgagctccaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg gaacgcagaagaggcaaaaggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccacca ggacacctatgacgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR6 – 완전 – aa	73	malpvtalllplallhaarpeiqvlvqsgaevkkpgeslriscgsgfniedvvihwvrqmp gkglewmg gridpendetkvgpifggh vtisadtsintvylqwsslkasdtamyyc afrg gvv wgqgtvtvssggggsgggsgggsgggsgggsvvmtqspdslavslgeratin cks sqslldsdgktyln wlqqkpgppkrlis lvsklds gvpdfsgsgsgtdftltisslqaedv avyyc wggtghfpgt fgggtkveikttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqtteedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 7		
CAR7 scFv 도메인	74	dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsg vpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwggtghfpgtfgggtkveikgggsgggsg ggsgsgggseiqlvqsgaevkkpgeslriscgsgfniedyvihwvrqmpgkglewmg

[0511]

		ridpendetkygpiqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgggttv tvss
--	--	--

CAR7 scFv 도메인 nt	75	gacgtggtgatgacccaatcgccagattccctggcagtgctccctggcggaacgcgccactatt aactgcaaactgacacagtccttgccttgattccgacggaagacacacacattgggtccagc agaagccaggacaaccgccaaagagactgatctccctggtgtcaagctggactcgggagt gcctgatcgggtctcgggtagcgggagcggcaccgacttactctgacatctctgactcca ggctgaggagtggtccgtgtattactgttggcagggtactcactttccgggcactttcggaggc ggcaccaggtggagattaaaggaggagcggaagcggagggtggaggatcgggaggtgg tgggagcggcgaggaggagcgagatccagctcgtccaatcgggagcggaagtgaaga agcccgaggagtgacttagaatctcatgcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactaca tcattgggtcggcagatgcctgtaaaaggactggaatggatggggaggattgacccgaa aacgcagaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgctgatacctca atcaatactgtctacccagtggtcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcg cctccggggaggagtgactggggccaaggcaccacgggtcacggtcagctcc
CAR7 - 가용성 scFv - nt	76	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtcttctgctccacgccgctcggccc acgtggtgatgacccaatcgccagattccctggcagtgctccctggcggaacgcgccactatta actgcaaatgacagtccttgccttgattccgacggaagacacacacattgggtccagca gaagccaggacaaccgccaaagagactgatctccctggtgtcaagctggactcgggagt cctgatcgggtctcgggtagcgggagcggcaccgacttactctgacatctctgactccag gctgaggacgtggcgtgtattactgttggcagggtactcactttccgggcactttcggaggcg gcaccaaggtggagattaaaggaggagcggaagcggagggtggaggatcgggaggtggt gggagcggcgaggaggagcgagatccagctcgtccaatcgggagcggaagtgaagaa gccccgaggagtgacttagaatctcatgcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactacat ccattgggtcggcagatgcctgtaaaaggactggaatggatggggaggattgacccgaa aacgcagaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgctgatacctca atcaatactgtctacccagtggtcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcg cctccggggaggagtgactggggccaaggcaccacgggtcacggtcagctccggtccca tcaccaccatcaccatcatcac
CAR7 - 가용성	77	<u>malpvtalllplalllhaar</u> pdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq kpgqppkrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdftlisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg

[0512]

scFv - aa		tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslriscksgfniedyyi hwwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam yycafrggyvwgqgtvtvssgshhhhhhhh
-----------	--	---

CAR 7 완전 - nt	78	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgcccgtcggcccg acgtggatgactcagtcgcctgactcgtggctgtgtcccttgagagcgggaccatca attgcaagtcacccagtcgctgctggattccgacgggaaaacctcaattggctgcagca aaaaccgggacagcctcctcaagcggctcatcagcctgggtccaagtgacagcggcgtg ccagaccgcttctcgggtcgggaagcgggtactattcacgctgacctctcatccctccaag cggagatgtggcagtctactactgttggcaggcacgcatttccgggcacttttggaggag ggaccaaggtcgaatatcaaggaggaggtggctcggcgaggaggcgggaggagg aggatcaggaggcgggtggaagcgaattcaactggtccagagcggcgagaagtcaagaa gccgggtgaatcgctcagaatctcgtgcaaggatcgggattcaactcagaggactactacat tactgggtcagacaaatgccggcgaagggtggaatggatgggaggatcgaccccgga aaacgatgaaaccaagtacggaccaatctccaaggcacgtgaccttccggcgacacct caatcaactgtgtacctccagtggagctcacttaaggccagcgataccgcatgtactattg cgcttccggagggtgtactggggacagggcactactgtgaccgtgtcatccactactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcgtgcataccggggtcttgacttgcctgc gatattacatttggcccctctggtggtacttgcgggtcctgctgcttctactcgtgatcact ctttactgtaagcgggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgagcctgt gcagactactcaaggaggacggctgttcatgccggtccagaggagggaaggcgg ctgcgaactgcggtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttgggtcggagaggagtagcagctgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatggcggaagccgcgagaaagaatcccaaggggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaagg ggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccacca aggacacctatgagctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 7 완전 - aa	79	malpvtalllplallhaarpdvmtqspdslavslgeratinc <u>kssqslldsgktyln</u> wlq qkpgppprklis <u>lvskl</u> ds gvpdrfsgsgsgtdftlisslqaedvavyyc <u>wqgthfp</u> gtfg ggtkveikgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslriscksgfniedy

[0513]

		<p>vihwvrqmpgkglewmgridpendetkypifqghvtisadtsintvylqwsslkasd tamyycafrggvvywgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr glrdfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr</p>
CAR 8		
CAR8 scFv 도메인	80	<p>dvvmtqspslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqrpqgsprrlisvskldsgv pdrfsgsgsgtdfllkisirveadvgyycwqgthfpgtfgggtkveikggsgsgggsg ggsgsgggseiqlvqsgaevkkgpatvkiscksgsfniedyihwvqqapgkglewm gridpendetkypifqgrvtitadtstntvymelssrsedtavyycfrggvvywgqgtvt vss</p>
CAR8 scFv 도메인 nt	81	<p>gatgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatt agctgcaagtcacccaatccctgctcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagc aaagaccgggtcagagccctaggagactcatctggtgtcaaaagctggacagcggagtg ccggaccggtttccggttcgggatcgggacggacttactctgaagatttcacgggtggaa gctgaggtatggtggagtgtactactgctggcaggggaaccatttccctggcacttttggcggg gggaactaaggtcgaaatcaaggaggaggtggtcgggaggagcggatcggcgaggagg cgggagcggcgaggaggggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaa accgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaatcagaggactactacat ccactgggtgcagcaagctccgggcaaggactggagtggtggggcgcatcgaccaga gaacgacgaaaccaatacggcccgtatcttcaaggcggtgacctacccgggacac ctcaactaactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagctactact gcgccttccggtggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcg</p>
CAR8 - 가용성 scFv - nt	82	<p>atggccctccctgtcaccgcccgtgctgtccgctggctcttctgctccacgccgtcgcccg atgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatta gctgcaagtcacccaatccctgctcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagca aagaccgggtcagagccctaggagactcatctggtgtcaaaagctggacagcggagtg cggaccggtttccggttcgggatcgggacggacttactctgaagatttcacgggtggaag ctgaggtatggtggagtgtactactgctggcaggggaaccatttccctggcacttttggcgag gaactaaggtcgaaatcaaggaggaggtggtcgggaggagcggatcggcgaggaggc</p>

[0514]

		<p>gggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaaa ccgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaatcagaggactactacac cactgggtgcagcaagctccggcgaaggactggagtggatgggcgcatcgacccagag aacgacgaaccaatacggcccgatcttccaaggcggtgacctaccgaggacacct caactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactcagcttactactg cgccttcgcggtggtgtgtactgggacagggcaccactgtgactgtcagctcgggtccc accatcatcaccaccacatcac</p>
CAR8 - 가용성 scFv - aa	83	<p><u>malpvtaillplallhaarpdvmtqslslpvtlqgpasickssqslldsdgktylnwlqq</u> rpgqsrprrlslvskldsgvpdrfsgsgsgtdflki srveadvgyycwqgthfpgtfggg tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgsfhiedyyi hwwqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelsslrsestavy ycafrggvywgqgttvsvss<u>shhhhhhhh</u></p>
CAR 8 - 원전 - nt	84	<p>atggccctccctgtcaccgcccgtctgctccgctgctcttctgctccacgcccgtcggcccg atgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgagacagccagctcgatta gtcgcaagtcatccaatccctgctcgattcggatggaaagacctatctcaactggctgcagca aagacccggtcagagccctaggagactatctcgttggtgtcaaaagctggacagcggagtgc cggaccggtttccggttcgggatcggggacggacttcaactgaagattcacgggtggaag ctgaggatgtgggagtgtactactgctgacagggaacccatttccctggcacttttggcggag gaactaagggtcgaatacagggaggaggtggtcgggaggaaggcgatcggcgaggaggc gggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaaa ccgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaatcagaggactactacac cactgggtgcagcaagctccggcgaaggactggagtggatgggcgcatcgacccagag aacgacgaaccaatacggcccgatcttccaaggcggtgacctaccgaggacacct caactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactcagcttactactg cgccttcgcggtggtgtgtactgggacagggcaccactgtgactgtcagctcaccactac cccagcaccgagccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgc gatctctacatttgggccctctgctggtacttgcggggtcctgctgctttactcgtgatcact ctttactgtaagcgggtcggaggaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaaggaggagcggctgtcatgccggttccagaggaggaggaaggcgg</p>

[0515]

		ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttgctcgagagaggagtagcacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatggcgaggagccgcgagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctctcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 8 – 완전 - aa	85	malpvtalllplalllhaarpdvmtqspislvpvtlqgpasisc <u>kssqslldsdgktyln</u> wlq qrpgqsprrlis <u>lvskldsg</u> vdpdrfsgsgsgtdflkisirveaedvgvyyc <u>wqgthfpgtfg</u> ggtkveikggggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkgpavtkiskgsgfnied <u>vyih</u> vwqapgkglewm <u>gridpendetkvgpifggr</u> vtitadtstntvymelssrsed tavyycafr <u>ggv</u> wgqgtvtvsttppaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvlslvitlyckrkklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreedyldkrrgrdpemggkprk npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqlstatkdydalhmqalpp r
CAR 9		마우스 항-EGFRvIII 클론 3C10
CAR9 scFv 도메인	86	eiqlqqsgaelvkgasvklscetgsgfniedyyihwvkqrteqglewigridentkyg pifqgratitadtssntvylqlssltedtavyycafrggywpggttlvssggsgggsgg gggshmdvmtqspitlsvaigqsasisckssqslldsdgktylnwllqrpgqspkrlisl skldsgvpdrftgsgsgtdflrisrveaedlgiyycwqgthfpgtfgggtkleik
CAR9 scFv 도메인 nt	98	gagatccagctccaacagagcggagccgaactgggtcaaacgggagcgtcgggtgaagtgt catgcactggatcggttcaacatcgaggattactacactcactgggtcaagcaacgcaccg agcaggggcgtggaatggatcgacggatcgacccgaaaacgatgaaaccaagtacgggc ctatctccaaggacgggcccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagct ttcagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggagcgtgtactg gggaccaggaaccactttgacctgtccagcggagggcgtggtacggaggaggagcctc aggcggtggcggtcgacatggacgtggtcatgactcagtcctccgctgacctgtcgggtgg caattggacagagcgcatcatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctgattccgacggaa agacttatctgaactggctgctccaaagaccagggaatcaccgaaacgccttatccctggt gtcgaactcgactcgggtgtgccggatcggtttaccggtagcgggtccggcacggactca ctctccgcatctcagggtggaaagcggagatcgggatctactactgttggcaggggaacc

[0516]

		acttcctgggacttttggaggcggaactaagctggaaatcaag
CAR9 - 가용성 scFv - nt	87	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg agatccagctccaacagagcgagccgaactggtaaacgggagcgctcgggaagttgtc atgcactggatcgggctcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga gcaggggctggaatggatcgacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcc tatctccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctcagctt tccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgcttcagaggagcgctgtactgg ggaccaggaaccactttgaccgtgtccagcgagcgcggtgatcaggaggaggaggtca ggcgggtggcggtcgacatggacgtggtcatgactcagtcgccgctgacctgtcgggtggc aattggacagagcgcatccatctcgtgcaagagctcacagtgcgtgctggattccgacgaaa gacttatctgaactggctgctccaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctgggtg tcgaaactgactcgggtgtgccggatcggtttaccggtagcgggtccggcacggacttact ctccgatttcgagggtggaagcggaagatctcgggtactactactgttgcaagggaacca cttcctgggacttttggaggcggaactaagctggaaatcaagggtagccatcaccatcacca ccaccatcat
CAR9 - 가용성 scFv - aa	88	<u>malpvtalllplallhaarpeiq</u> lqqsgaelvkpgasvklsgsgfniedyyihwvkqrte qglewigrdpendetkygpifqgratitadtsntvylqlssltseavvycafrgvywg pgttltvssggsgsgsgsgshmdvmtqspitlsvaigqsasisckssqllldsdgkt ylnwllqrpqspkrlislvsklsgvpdrftgsgsgtdflrisrveadlgiyycwqgthfp gtfgggtkleik <u>gshhhhhhhh</u>
CAR 9 - 완전 - nt	89	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg agatccagctccaacagagcgagccgaactggtaaacgggagcgctcgggaagttgtc atgcactggatcgggctcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga gcaggggctggaatggatcgacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcc tatctccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctcagctt tccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgcttcagaggagcgctgtactgg ggaccaggaaccactttgaccgtgtccagcgagcgcggtgatcaggaggaggaggtca ggcgggtggcggtcgacatggacgtggtcatgactcagtcgccgctgacctgtcgggtggc aattggacagagcgcatccatctcgtgcaagagctcacagtgcgtgctggattccgacgaaa gacttatctgaactggctgctccaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctgggtg tcgaaactgactcgggtgtgccggatcggtttaccggtagcgggtccggcacggacttact

[0517]

		ctccgcatttcgaggggtggaagcggaggtatcgggatctactactgttggcaggggaacca cttccctgggacttttggaggcgggaactaagctggaaatcaagaccactaccccgacccga ggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgta gacccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctcgatatactatttg ggccccctggtggtacttgcggggctcgtgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcg cggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaa gaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctcgaaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgagatgctccacctacaagcaggggcagaaccagctctaca acgaactcaatctgtgcggagagaggtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg accagaaatggcggggaagccgcgagaagaatccccagaggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagtggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaa gaggcaaaaggccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 9 – 완전 - aa	90	malpvtallplallhaarpeiqlqsgaelvkpgasvklstgsgfniedvvihwvkqrte qglewigridentkvpifqgratitadtssntvylqlssltsedtavyycafrggvvyw gpgttltvssgggsgggsgggshmdvmtqsphtlsvaigqsasisc kssqsllds g ktvln wllqrpqspkrlis lvsklds gvprftgsgsgtdflrisrveadlgiyy cwqgt hfpgtf gggklttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrldfacdiyw aplagtcgvllslvitlyckrgrklliyfkqpfmrpvqqtqeedgcscrfeeeggcclrv kfsrsadapaykqgnqlynelnlgrrreedvldkrrgrdpemggkprknpqeglynel qkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR10		항-EGFRvIII 클론 139
CAR10 scFv 도메인	91	diqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirnlawyqqkpgkapkriyaasnlqsgvpsrft gsgsgteflivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggkveikrtgstsrgkpgsggegsev qvlesggglvqpgslrlscaasgftssyamswvrqapgkglewvsaisgsgstnyads vkgrftisrdnskntlylqmnsraedtavyycagssgwseywgqgtlvtvss
CAR9 scFv 도메인 nt	92	gatatcaaatgactcagagcccttcatccctgagcgccagcgtcggagacagggtgacat cacgtgccggcatccaaggcattagaaataactggcgtggtatcagaaaaaccaggaa aggccccgaagcgcctgatctacggcctccaaccttcagtcaggagtccctcgcgttc accgggagcggtagcggaaactgagtttacccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttc gcgactactactgcctccagcatcactcgtacccgttgacttcgggagcggaaccaagggtc

[0518]

		gaaatcaaacgcactggctcgacgtcaggggtccggtaaaccgggatcgggagaaggatcg gaagtcgaagtgcctggagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgggtcgtcgggctc agctgtgccgctcgggttttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcaggctccgg gaaaggggctggaatgggtgtccgtatttccgctcgggtggaagcaccattacgccgac tccgtgaaggacgcttcaccatctcacgggataactccaagaatactgtacctccagatga actcgtgagagccgagggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctggtccga atactggggacagggcaccctcgtcactgtcagctcc
CAR10 - 가용성 scFv - nt	93	atggccctccctgtcaccgccctgctgtccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg atatccaaatgactcagagccctcatccctgagcgcagcgtcgagacagggtgacctc acgtgccgggcatccaaggcattagaataacttggcgtggtatcagcaaaaccaggaaa ggccccgaagcgcctgatctacgcggcctccaaccttcagtcaggagtccctcgcgcttca ccgggagcggtagcggaaactgagttacccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggactcg cgacctactactgcctccagcatcactcgtaccctgtgactcgggaggcggaaaccaaggtcg aaatcaaacgcactggctcgacgtcaggggtccggtaaaccgggatcgggagaaggatcggga agtccaagtgcctggagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgggtcgtcgcggctcag ctgtgccgctcgggttttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcaggctccggga aaggggctggaatgggtgtccgtatttccgctcgggtggaagcaccattacgccgactc cgtgaaggacgcttcaccatctcacgggataactccaagaatactgtacctccagatgaa ctcgtgagagccgagggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctggtccgaa tactggggacagggcaccctcgtcactgtcagctcccatcaccatcaccaccacatcac
CAR10 - 가용성 scFv - aa	94	<u>malpvtaillplalllhaar</u> pdqmtqspsslsasvdrvttitcrasqgirnlnlawyqqkpgk apkrliyaasnlqsgvpsrftgsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhsypltsgggkveik rtgtsrgskpgsggsevqvlesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapkg lewwsaisgsggstnyadsvkgrfiisrdnskntlylqmnsraedtavvycagssgwsey wgqgtlvtvss <u>hhhhhhhh</u>
CAR 10 완전 - nt	95	atggccctccctgtcaccgccctgctgtccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg atatccaaatgactcagagccctcatccctgagcgcagcgtcgagacagggtgacctc acgtgccgggcatccaaggcattagaataacttggcgtggtatcagcaaaaccaggaaa ggccccgaagcgcctgatctacgcggcctccaaccttcagtcaggagtccctcgcgcttca ccgggagcggtagcggaaactgagttacccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggactcg cgacctactactgcctccagcatcactcgtaccctgtgactcgggaggcggaaaccaaggtcg

[0519]

		aaatcaaacgactggctcgacgtcaggggtccgtaaacgggatcgggagaaggatcggga agtccaagtgtctggagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgggtcgtcgggtcag ctgtgccgctcgtcgggttttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcaggctccggga aaggggctggaatgggtgtccgctatttccgctcgggtggagcaccattacgcccactc cgtgaaggagcgttcacatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaa ctgctgagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctgggtccgaa tactggggacagggcaccctcgtcactgtcagctccaccactacccagcaccgaggccac ccaccccggtcctaccatcgccctccagcctctgtccctgcgtccggagcatgtagacccg cagctgggtgggcccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccc tctggtgtgtacttgcgggtcctgctgtttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcg gaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgagcctgtgcagactactcaagagga ggacggtgttcatgccggtcccagaggaggaaggcggctgcgaactgcgctgaa attcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttgctcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca gaaatgggcgggaagccgcgcagaagaatcccaaggggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtgaaagggaacgagaagagc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctc ttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 10 완전 - aa	96	malpvtalllplallhaarpdiqmtqspsslsasvdrvitierrasqgirnlnlawyqqkpgk apkrliyaasnlqsgvpsrftsgsgteftlivsslpqpedfatyyclqhsypltsgggtkveik rtgstsgsgkpgsggsevqvlesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkg lewvsaisgsggstnyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsiraedtavvyycagssgwsey wgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvllslvitlyckrgrklliyfkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrs adapaykqgnqlynelnlgrreedyldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0520]

[0521]

이어서, CAR scFv 단편을 렌티바이러스성 벡터 내로 클로닝하여 단일 코딩 프레임 내에서 및 발현용 EF1 알파 프로모터 (서열 97)를 이용하여 전장 CAR 구축물을 창출하였다.

[0522] EF1 알파 프로모터

GTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAG
AAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG
TAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGC
CGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGCCCTCTTTACGG
GTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG
ATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG
AGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG
TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCA
TTTAAAATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGAC
GGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGC
CACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGC
CTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACC
AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAA
AGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC
GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGG
GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTA
GGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGAT
CTTGGTTTCACTTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGG
TGTCGTGA(서열 97).

[0523]

[0524] *CAR9*, *CAR10* 및 선별 인간화 *EGFRvIII* CAR 구축물의 표면 발현 및 FACS에 의한 검색

[0525] 다음 실험은 Jurkat 세포와 일차 T 세포 둘 다에서 EGFRvIII 기반 시험관내 결합 연구에 대하여 친화성 차이가 있는 것으로 보인다는 것을 나타내었다.

[0526] Jurkat E6 세포를, 아막사 셀라인 뉴클레오펙터 키트 V (론자; 독일 쾰른 AG) 및 프로그램 X-001을 이용하여 CAR9 벡터 또는 CAR10 벡터로 전기천공시켰다. 형질감염시킨 그 다음 날, 0.5×10^6 개 세포를 0.2 ml FACS 완충액 (5% FBS를 함유하는 DPBS 완충액)에서 V자형 96 웰 판 [그라이너 바이오-온 (Greiner Bio-One; 독일)]의 각 웰 내로 도말하고, 실온 하에 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 침강시키고, 상이한 농도의 EGFRvIII-Fc 또는 EGFRwt-Fc를 수반하는 0.2 ml의 FACS 완충액에 재현탁시키며, 4°C 하에 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충액으로 3회 세척하고, 2 μ l의 PE 항-인간 IgG Fc [잭슨 임뮤노리서치 라보라토리즈 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브)]를 수반하는 0.2 ml의 FACS 완충액과 함께 4°C 암실에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 0.2 ml의 FACS 완충액으로 3회 세척한 후, FACSDiva 소프트웨어 (BD 바이오사이언스; 미국 캘리포니아주 산호세)를 이용하여 LSRII (BD 바이오사이언스; 미국 캘리포니아주 산호세) 기계 상에서 세포를 분석하였다. 면역형광 염색을 살아있는 세포의 상대적 log 형광으로서 분석하였고, PE 양성 세포의 비율(%)을 측정하였다.

[0527] 도 12에 도시된 바와 같이, Jurkat 세포에서 발현된 CAR9의 EGFRvIII-Fc 융합 단백질에 대한 결합성은 야생형 EGFR-Fc에 대한 것 보다 대략 1,000배 정도 더 강력하다. 더욱이, CAR10을 발현하는 CART 구축물은 CAR9와 비교해서 EGFRvIII에 대한 결합성이 상당히 더 낮은 것으로 (대략 40배) 나타난다. 이는 묶린 CAR9가 EGFRvIII과 결합하긴 하지만, 야생형 EGFR과도 여전히 일부 결합성을 보유하고 있다는 것을 제안한다. 더욱이, 이는 CAR9가 CAR10 구축물 보다 EGFRvIII에 대한 결합 친화성이 더 높다는 것을 강력하게 표시한다.

- [0528] 일차 T 세포에서의 추가 실험 결과, 유사한 결과가 산출되었다. 간략하게 언급하면, 일차 인간 CD3+ T 세포를 항-CD3/CD28 비드로 24시간 동안 자극한 다음, 3:1의 MOI로 CAR9, CAR10, CAR6 또는 대조군 CAR을 코딩하는 렌티바이러스성 벡터로 형질도입하였다. 본 실험에는 또한, 모의 형질도입된 T 세포 집단이 포함되었다. 이들 세포가 휴지기에 들어갈 때까지 배양물 중에서 약 8 내지 9일 동안 확장시켰다. 이 시점에서, 0.5×10^6 개 세포를 V자형 96 웰 판의 각 웰 내로 도말하였다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, 생/사 시약 (PBS 중의 1:1000)으로 얼음 상에서 30분 동안 염색하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척하고, $1 \mu\text{g/ml}$ 바이오티닐화 EGFRvIII 또는 EGFR wt 단백질과 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 세포를 2회 세척하고, 1:1000 희석도의 스트렙타비딘-PE를 수반한 0.2 ml의 FACS 완충액과 함께 얼음 상에서 15분 동안 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 세포를 LSRII 상에서 분석하였다. 면역형광 염색을 살아있는 세포의 상대적 log 형광으로서 분석하였고, PE 양성 세포의 비율(%)을, 양성 집단의 기하 평균과 연계해서 측정하였다.
- [0529] 도 13에 도시된 바와 같이, CAR9 및 CAR6 CAR는, 심지어 모든 구축물이 동등하게 형질도입되긴 하지만 (모두에 대한 형질도입 효율 약 50%), 포화량의 EGFRvIII 단백질이 검출을 위해 사용되는 경우에는, EGFRvIII 결합성에 대한 기하 평균이 CAR10 (단지 2K) 보다 10배 더 높은 것으로 나타났다 (CAR9의 경우에는 21K이고, CAR6의 경우에는 27K이다). 유사하게, EGFR wt 단백질에 대한 특이성은 약 10배 더 낮는데, 이는 EGFR wt 단백질로의 염색에 대한 아래쪽으로서의 로그 이동으로써 도시된 바와 같다. 이는 CAR9 및 CAR6이 일차 T 세포에서 발현되는 경우에 CAR10과 비교해서 EGFRvIII 단백질에 대한 더 강력한 친화성을 지니고 있다는 것을 표시하고 이들이 임상에서 더 효과적이라는 것을 제안하는 상기 Jurkat 세포에서의 발견 내용을 부가로 뒷받침해준다.
- [0530] 인간화 CAR 구축물의 패널의 기능적 분석을 실시예 8에 기재되는 바와 같이 수행하였다.
- [0531] **실시예 8: T 세포에서 인간화 EGFRvIII-특이적 CAR 구축물의 분석**
- [0532] CAR 기술을 통하여 표적화 EGFRvIII의 실행 가능성을 평가하기 위하여, 인간화 EGFRvIII scFv 단편을 2가지 상이한 입체 배치로 CD3제타 쇄와 4-1BB 공동자극성 분자를 수반하는 렌티바이러스성 CAR 발현 벡터 내로 클로닝하였다. EGFRvIII+ 및 EGFR wt 표적에 반응하여 EGFRvIII CAR 형질도입된 T 세포의 이펙터 T 세포 반응의 양과 질에 근거하여 최적의 구축물을 선별한다. 이펙터 T 세포 반응은 세포성 확장, 증식, 증가, 시토카인 생성 및 표적 세포 사멸 또는 세포용해 활성 (탈과립화)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0533] **재료 및 방법**
- [0534] *CAR 기능의 초기 특성화를 위한 Jurkat 리포터 세포주의 생성*
- [0535] 일차 T 세포 형질도입 및 활성화에 대한 대안으로서, Jurkat-NFAT 리포터 세포주를 사용하여 CAR 구축물의 기능적 활성을 평가할 수 있다. Jurkat T 세포주 (E6-1)를 NFAT-루시페라제 리포터 구축물로 형질감염시키고, PMA 및 이오노마이신 자극 후 NFAT 리포터의 강력한 유도에 근거하여 추가 특성화하기 위한 안정한 클로날 세포주 (JNL)를 선별하였다. 이러한 JNL 세포를 5:1의 MOI로 렌티바이러스성 벡터로 형질도입한 다음, 5 내지 7일 동안 확장시켰다. 검정에 사용하기 전, 형질도입된 세포의 비율(%) (세포 표면 상에 EGFRvIII CAR을 발현함) 및 이러한 세포의 발현의 상대적 형광 세기를, LSRII 상에서의 유동 세포계수 분석에 의해 결정한다. 히스토그램 플롯으로부터, 형질도입된 비율을 그들의 상대적 형광 세기와 비교함으로써, CAR의 상대적 발현 수준을 조사할 수 있다.
- [0536] *인간화 EGFRvIII-특이적 CAR JNL 세포의 T 세포 활성화를 평가한다*
- [0537] JNL 리포터 세포주에서 T 세포 활성화를 평가하기 위하여, JNL 또는 CAR-형질도입된 JNL 세포를 청정한 바닥이 있는 96 웰 블랙 판 내에 웰당 50,000개 세포로 도말한다. 표적 세포 (BHK 모 세포, 또는 EGFRvIII 또는 EGFR wt를 발현하도록 조작된 BHK 세포)를 상기 웰에 가하여, 1:2, 1:1, 1:0.3, 1:0.1, 1:0.03, 1:0.01 및 1:0.003의 이펙터 대 표적 (E:T) 비를 창출한다. PMA 및 이오노마이신이 활성화를 위한 양성 대조군으로서 사용된다. 세포를 37°C 하에 16 내지 24시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션이 끝날 무렵, 등 용적의 브라이트-글로(Bright-Glo) 루시페라제 검정 시약을 각 웰에 가한다. 상기 판을 실온 하에 10분 동안 인큐베이션한 다음, 발광계를 이용하여 발광을 측정한다.
- [0538] *제유도된 인간화 EGFRvIII-특이적 CAR T 세포의 생성*
- [0539] 인간화 EGFRvIII-특이적 CAR 렌티바이러스성 전이 벡터를 사용하여, VSVg 가짜형 렌티바이러스성 입자 내로 패키징된 게놈 물질을 생성한다. 렌티바이러스성 전이 벡터 DNA를, VSVg의 3가지 패키징 성분인 gag/pol 및 rev

와 혼합하여 (리포펙타민 시약과 조합된다), 이들을 함께 293T 세포 내로 형질감염시킨다. 24시간 및 48시간 후, 배지를 수집하고, 여과한 다음, 초원심분리 또는 크로마토그래피함으로써 농축시킨다. 이로써 생성되는 바이러스성 제제를 -80°C 하에 저장한다. 형질도입되는 단위의 수는 SupT1 세포 상에서 적정함으로써 결정한다.

[0540] 재유도된 EGFRvIII-특이적 CART 세포는, CD3x28 비드와 24시간 동안 맞물리게 함으로써 신선한 T 세포를 활성화시킨 다음, 적당한 수의 형질도입성 단위를 가하여 목적하는 비율의 형질도입된 T 세포를 수득함으로써 생성한다. 이들 변형된 T 세포가 휴지기에 들어가고 크기가 줄어들 때까지 (약 300 f1) (이때, 이들은 나중의 분석을 위해 냉동 보존된다) 상기 T 세포를 확장시킬 수 있다. 코울터 멀티사이저 III을 이용하여 세포 수와 크기를 측정한다. 냉동 보존하기 전에, 형질도입된 세포의 비율(%) (세포 표면 상에 EGFRvIII CAR을 발현함) 및 이러한 세포의 발현의 상대적 형광 세기를, LSRII 상에서의 유동 세포계수 분석에 의해 결정한다. 히스토그램 플롯으로부터, 형질도입된 비율을 그들의 상대적 형광 세기와 비교함으로써, CAR의 상대적 발현 수준을 조사할 수 있다.

[0541] 인간화 EGFRvIII 재유도된 CAR T 세포의 세포용해 활성, 증식 능력 및 시토카인 분비를 평가한다

[0542] 시토카인을 사멸, 증식 및 분비시킬 수 있는 인간화 EGFRvIII-특이적 CAR T 세포의 기능적 능력을 평가하기 위하여, 세포를 해동시키고 밤새 회복시켜 두었다. 상기 인간화 구축물 이외에도, 뮤린 CAR9를 비교 목적으로 사용한 반면, SS1-BBz는 배경 CAR/T 세포 효과에 대한 비-표적화 발현된 CAR로서 사용하였다. 이러한 유동 기반 세포독성 검정을 위해, 표적 세포를 CSFE로 염색하여 그들의 존재를 정량화한다. 표적 세포를 또한, EGFRvIII 발현을 알아보기 위하여 염색하여 유사한 표적 항원 수준을 확인하였다. EGFRvIII CAR T 세포의 세포용해 활성은 10:1, 3:1, 1:1, 0.3:1 및 0:1의 이펙터:표적 세포 비의 적정 하에 측정하는데, 여기서 이펙터는 항-EGFRvIII CAR을 발현하는 T 세포로서 정의되었다. 적당한 수의 T 세포를 일정한 수의 표적 세포와 혼합함으로써 검정을 개시하였다. 4 또는 16시간 후, 각 혼합물의 총 용적을 제거하고, 각 웰을 세척하였다. CD3을 알아보기 위하여 T 세포를 염색하고, 모든 세포는 생/사 마커 7AAD로 염색하였다. 최종 세척 후, 펠릿화 세포를, 미리 결정된 수의 계수성 비드를 수반한 특이적 용적으로 재현탁시켰다. 세포 염색 데이터를 LSRII 유동 세포 측정법에 의해 수집하고, 결과를 정량화해주는 비드를 이용하여 플로우조(FlowJo) 소프트웨어로 분석하였다.

[0543] 인간화 CAR-EGFRvIII T 세포의 세포 증식과 시토카인 생성을 측정하기 위하여, 세포를 해동시키고 밤새 회복시켜 두었다. 상기 인간화 CAR-EGFRvIII 이외에도, 뮤린 CAR9를 비교 목적으로 사용한 반면, SS1-BBz는 배경 CAR/T 세포 효과에 대한 비-표적화 발현된 CAR로서 사용하였다. T 세포는 EGFRvIII을 발현하거나 발현하지 않는 정상세포종-유래된 교모세포종 세포주인 U87에 대하여 유도된다. 또한, CD3x28 비드를 사용하여, 제2 라운드의 내인성 면역학적 신호에 반응하는 T 세포의 잠재력을 평가하였다. 증식을 분석하기 위하여, T 세포를 CSFE로 염색하였다. 증식으로 인해, CSFE 염색이 희석되었는데, 이는 부모의 표지가 지금 2개의 딸 세포로 분리되는 것을 반영한다. 검정은 1:1 및 1:0의 이펙터:표적 비 만을 시험하였는데, 이펙터는 통상의 비율로 항-EGFRvIII 키메라 수용체를 발현하도록 정규화된 총 T 세포 (CD4 및 8)로서 정의되었다. 검정은 세포를 혼합한 지 24시간 후에 두 번 되풀이하여 수행하였다. 시토카인 생성을 위하여 상등액을 제거하였다. 5일 후, T 세포를 생/사 바이올렛 (인비트로젠)으로 생/사를 알아보기 위하여 염색한 다음, CAR 발현을 알아보기 위하여 염색하고 CD4 또는 CD8 세포로서 표현형 검사되었다. 최종 세척 후, 펠릿화 세포를, 미리 결정된 수의 BD 계수성 비드를 수반한 특이적 용적으로 재현탁시켰다. 세포 염색 데이터를 LSRII 유동 세포 측정법에 의해 수집하고, 결과를 정량화해주는 비드를 이용하여 플로우조 소프트웨어로 분석하였다. 특이적 수의 비드를 기준을 하여 계수된 세포의 수에, 아직 계수되어야 할 비드의 분율을 곱함으로써 총 세포 계수치를 결정하였다.

[0544] 결과

[0545] EGFRvIII 표적 세포를 인식할 수 있는 인간화 CART-EGFRvIII 세포의 능력을 시험하기 위한 Jurkat 리포터 검정

[0546] 표적 맞물림 후 활성화를 유도시킬 수 있는 CART 구축물의 능력은 JNL 리포터 세포주를 이용하여 측정하였다. 이러한 JNL 세포주는 CAR의 표적 맞물림 후에 유도되는 NFAT-루시페라제 리포터 구축물로 조작한다. JNL 세포를 각종 CAR-EGFRvIII 구축물 (CAR9, CAR3, CAR6, CAR8 및 CAR10)로 형질도입하였다. 형질도입 효율은 유동 세포 측정법에 의해 평가하였는데, 상기 구축물 모두에 대해 약 45 내지 52%인 것으로 밝혀졌다. 이어서, JNL-CAR-EGFRvIII 세포를 3가지 상이한 표적 세포 (BHK 모, BHK-EGFRvIII 또는 BHK-EGFR wt)를 이용하여 7개의 상이한 E:T 비로 자극하였다. JNL 모 세포, 및 대조군 CAR을 발현하는 JNL 세포가 부가 대조군으로서 포함되었다. 도 14에서의 결과는 상당한 표적 유도된 활성화가, 시험된 모든 구축물에 대하여 1:0.01 정도로 낮은 비에서 발생될 수 있다는 것을 보여주며, CAR6 및 CAR10은 보다 높은 E:T 비에서 가장 많은 활성화를 유도한다. EGFR wt 발현성 세포를 이용하거나 또는 대조군 CAR 발현성 JNL 세포에 의해서는 상당한 활성화가 전혀

관찰되지 않았다. 이들 데이터는 EGFRvIII 표적에 대한 상기 CAR 구축물의 특이성과 EGFR wt 표적에 대한 교차-반응성의 결여를 명확하게 보여준다.

[0547] **인간화 EGFRvIII CAR 구축물을 이용한 일차 인간 T 세포의 형질도입 및 확장**

[0548] 건강한 공여자로부터의 전혈 또는 성분채집술 생성물로부터 CD3+ T 세포를 수득하였다. 상기 언급된 바와 같이, T 세포를 CD3xCD28 비드로 24시간 동안 자극한 다음, 3의 MOI 하에 진한 렌티바이러스성 상등액으로 형질도입시킨다. 세포를 배양물 중에서 8 내지 10일 동안 확장시켰다.

[0549] 인간화 EGFRvIII CAR들의 세포 표면 발현은 거의 동등한 수준이고, 그들의 발현 수준은 무린 CAR9와 매우 유사하다. 각 인간화 EGFRvIII-특이적 CAR 형질도입된 T 세포의 세포 표면 발현 염색 패턴을 플롯하는 히스토그램의 오버레이(overlay) 및 이들 프로파일로부터 계산된 평균 형광 세기 (MFI)는, 형질도입된 세포의 비율(%)과 매우 상관이 있다.

[0550] **인간화 EGFRvIII CART 세포를 자극할 수 있는 EGFRvIII 표적 세포의 능력을 시험하기 위한 증식 검정**

[0551] 표적 맞물림에 반응하여 증식할 수 있는 EGFRvIII 특이적 CAR T 세포의 능력을 증식 검정에서 평가하였다. 유동 세포측정법에 의해 아집단을 계산하였다. 공여자 T 세포를 인간화 CAR, 무린 CAR9 또는 SS1 (메소텔린 표적화)로 형질도입하였다. CAR을 표적 세포와 1:1 또는 1:0으로 혼합하고, 5일 동안 공동-배양하였다. 도 15는 항원 특이적 방식으로 증식할 수 있는 ND407 EGFRvIII CAR T 세포의 능력을 도시한 것이다. 점선 막대는 시딩된 T 세포의 수를 표시하고, 비교적으로 말하자면, U87을 표적으로 하는 T 세포 수의 증가는 전혀 검출되지 않은 반면, U87-EGFRvIII과의 맞물림으로 인해, EGFRvIII CAR T 세포 집단에 대해 특이적인 증식이 유도되었다. ND407에 대해 상대적 반응은, CAR6 및 CAR8이 CAR9 또는 CAR3 보다 더 강력하다는 것을 표시하였다. CD3x28 비드의 결과는 그들의 자극이 활성화 제2 라운드 상에서 증식을 구동시키기에 충분하지 않았다는 것을 표시하는데, 이는 전혀 자극이 없는 것과 유사하다.

[0552] ND407 T 세포를 사용하여, CAR+ T 세포를 우선적으로 확장할 수 있는 그들의 능력을 알아보기 위하여 상이한 huEGFRvIII CAR들을 스크리닝하였다. 도 16은 CAR5 및 CAR6이 각 공여자에서 가장 강력한 CAR+ 확장을 일관되게 나타낸다는 것을 도시한 것이다. CAR+ 증가는 표적과의 성공적인 맞물림, 항원 인식의 활성화 유도된 세포 사멸의 증식 및 생존에 따른 결과이다.

[0553] **EGFRvIII 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 인간화 EGFRvIII CART 세포의 능력을 시험하기 위한 사멸 검정**

[0554] 표적을 사멸시킬 수 있는 EGFRvIII 특이적 CAR T 세포의 능력을 크롬 방출 검정에서 시험하였다. 인간 교모세포종 세포주인 U-87MG를 조작하여 EGFR 야생형 수용체 또는 EGFRvIII 돌연변이체를 발현시켰다. 이들 조작된 세포주는 사멸 검정을 위한 표적으로서 제공되었다. 다음 3개의 이펙터 CAR T 세포를 사용하여 표적 세포 사멸 특이성을 결정하였다: 1) 무린 3C10을 발현하도록 형질도입된 인간 T 세포 (CAR9), 2) 무린 3C10의 인간화 버전을 발현하도록 형질도입된 인간 T 세포 (CAR6으로서 지칭됨) 및 3) 메소텔린, SS1에 대해 특이적인 CAR로 형질도입된 인간 T 세포. 모든 이펙터 세포가 30% CAR+ 형질도입을 발현하도록 정규화시켰다. 표적 세포를 크롬-51로 표지시키고, 공동-배양 직전에 세척하였다. 이펙터와 표적을 표시된 비 (E:T) 하에 함께 혼합하고, 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0555] 도 17(a)의 결과는 야생형 EGFR 수용체를 발현하는 U-87 세포와 혼합된 CAR T 세포가 50:1의 E:T 까지는 배경 이상의 세포 사멸을 전혀 나타내지 않았다는 것을 보여준다. 그러나, 도 17(b)의 결과는 이와는 달리, EGFRvIII을 발현하는 U-87 세포와 혼합된 EGFRvIII 특이적 CAR T 세포, CAR9 또는 CAR6이 6.25:1 내지 50:1 이하의 E:T 비에서 특이적 사멸을 나타냈다는 것을 보여준다. 메소텔린 특이적 CAR T 세포를 이펙터로서 사용한 경우에는 상당한 사멸이 전혀 관찰되지 않았다. 이들 데이터는 CAR9 및 CAR6 T 세포에 의한, EGFRvIII을 발현하는 표적 세포의 표적 사멸에 대한 특이성을 명확하게 보여주지만, 야생형 EGFR을 발현하는 세포의 사멸에 대해서는 그렇지 않거나 또는 비-특이적 CAR T 세포, SS1에 의해서도 그렇지 않다.

[0556] **항-종양 반응을 증진시키고 특이성을 명확하게 보여줄 수 있는 인간화 EGFRvIII CART 세포의 능력을 시험하기 위한 시토카인 검정**

[0557] 표적 맞물림에 반응하여 시토카인을 유도시킬 수 있는 EGFRvIII 특이적 CAR T 세포의 능력을 공동-배양 검정에서 평가하였다. CAR T 세포를 각종 표적:이펙터 비 (0.3:1, 1:1, 3:1 및 10:1) 하에 18 내지 24시간 동안 표적 발현성 세포와 함께 공동-배양하였다. 표적 세포는 EGFR wt 내인성 단백질을 발현하는 U87 세포 (U87 wt), EGFRvIII을 과발현하는 U87 세포 (U87-vIII), BHK (어린 햄스터 신장 세포) 모 세포, 인간 EGFR wt 단백질을

과발현하는 BHK 세포 (BHK wt), 또는 인간 EGFRvIII 단백질을 과발현하는 BHK 세포 (BHK-vIII)를 포함하였다. 18 내지 24시간 후, 배양물로부터 상등액을 제거하고, 세포계수 비드 검정 (CBA)을 이용하여 시토카인을 분석하였다. 그 결과는 1) CAR6 및 CAR9 T 세포가 EGFRvIII-발현성 세포에 반응하여 유사한 수준의 IFN γ 를 유도시켰고, 2) 어떠한 CAR T 세포 집단도 EGFR wt 발현성 세포에 반응해서는 IFN γ 를 유도시키지 못하였다는 것을 명백하게 입증해준다. 중요하게도, 이들 데이터는 상기 사멸 및 증식 데이터와 함께, CAR6 및 CAR9가 EGFRvIII에 대한 기능적 특이성을 나타내고 항-종양 면역 반응을 증진시킬 수 있는 능력을 지니고 있다는 것을 표시한다.

[0558] **실시예 9: 인간화 항-EGFRvIII CART 세포는 마우스에서의 종양 조직량을 감소시킨다**

[0559] 인간화 항-EGFRvIII CAR T 세포는 마우스 내의 생체내에서 종양 조직량을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, #2173 (CAR6) 인간화 항-EGFRvIII 키메라 항원 수용체 (CAR) 렌티바이러스적으로 형질도입된 인간 T 림프구를, 생체내에서 확립된 U87vIII 신경교종 종양으로 처리된 이중 면역기능저하 NOD/SCID/공통-감마 쇠-/- 마우스에 정맥내 전달하였다. 공여자-매칭된 비-CAR 형질도입된 T 세포의 종양이 투여된, 5일 확립된 U87vIII 피하 옆구리 종양이 있는 대조군 마우스는, 캘리퍼를 이용하는 직접적인 피하 종양 측정에 의해서 (최대 길이 x 최대 폭) 그리고 스펙트럼 생체내 영상화 시스템 (IVIS)에 의해 측정된 광자 방출에 의해서 신속하게 성장하였다. 심지어 적은 수 (0.5 내지 1×10^6 개)의 CAR6 형질도입된 세포가 투여 처리된 마우스에서도, 종양 성장이 용량 의존적 방식으로 마우스에서 현저하게 저하되었다.

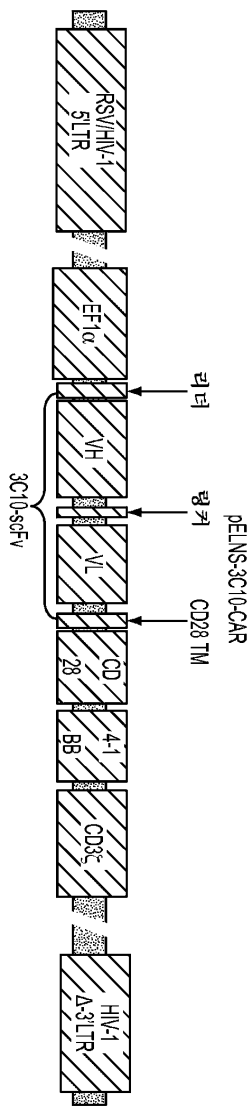
[0560] 본 실시예에서는, EGFRvIII, GFP+Luc+를 발현하는 1×10^6 개 U87vIII 인간 신경교종을 세척하고, 이를 $100 \mu\text{l}$ 식염수 중에서 30마리의 NSG 면역기능저하 마우스 ($N =$ 군당 10마리)의 옆구리에 피하 주사하였다. 인간 T 세포를 항-CD3/28 코팅된 비드로 자극하고, 인간화 EGFRvIII CAR scFv #2173 (CAR6)으로 렌티바이러스적으로 형질도입하였다. 형질도입, 생체의 확장 및 비드 제거 후, CAR 형질도입된 T 세포 (유동 세포측정법에 의한 약 50% CAR+)를 세척하고, 종양 이식한지 5일 후에 꼬리 정맥을 통하여 $100 \mu\text{l}$ 식염수 중에서 주사하였다. 종양 성장을 캘리퍼 측정 (상단 좌측) 및 루시페린-유도된 광자 방출 (상단 우측)에 의해 평가하였다. T 세포 전이한지 7일 후 및 종양 주사한지 12일 후에 측정을 시작하였다. SEM이 도 18에 제시되어 있다 ($N =$ 군당 10마리 마우스). 각 군의 생존율을 도 18에서 카플란 마이어 곡선으로써 플롯한다 (하단). 대조군 T 세포가 투여된 모든 마우스는 26일경에 사망하였고, 0.5×10^6 개 및 1.0×10^6 개 CAR6 T-세포가 투여된 군은 실험 30일자로, 각각 30% 및 90%가 생존하였다.

[0561] **등가**

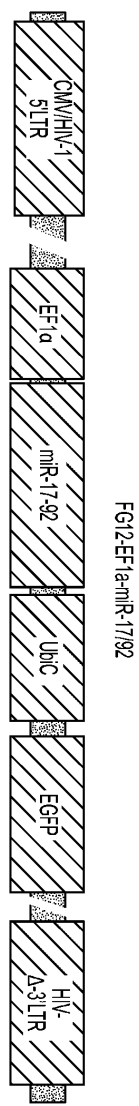
[0562] 본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특허 출원 및 공개문헌의 개시내용은 그들의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명이 구체적 측면을 참조로 하여 개시되긴 하였지만, 본 발명의 다른 측면 및 변동이 본 발명의 진정한 요지 및 범위를 벗어나지 않고서도 통상의 기술자에게 권장될 수 있다는 것은 명백하다. 첨부된 청구범위는 상기 측면과 등가 변동 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

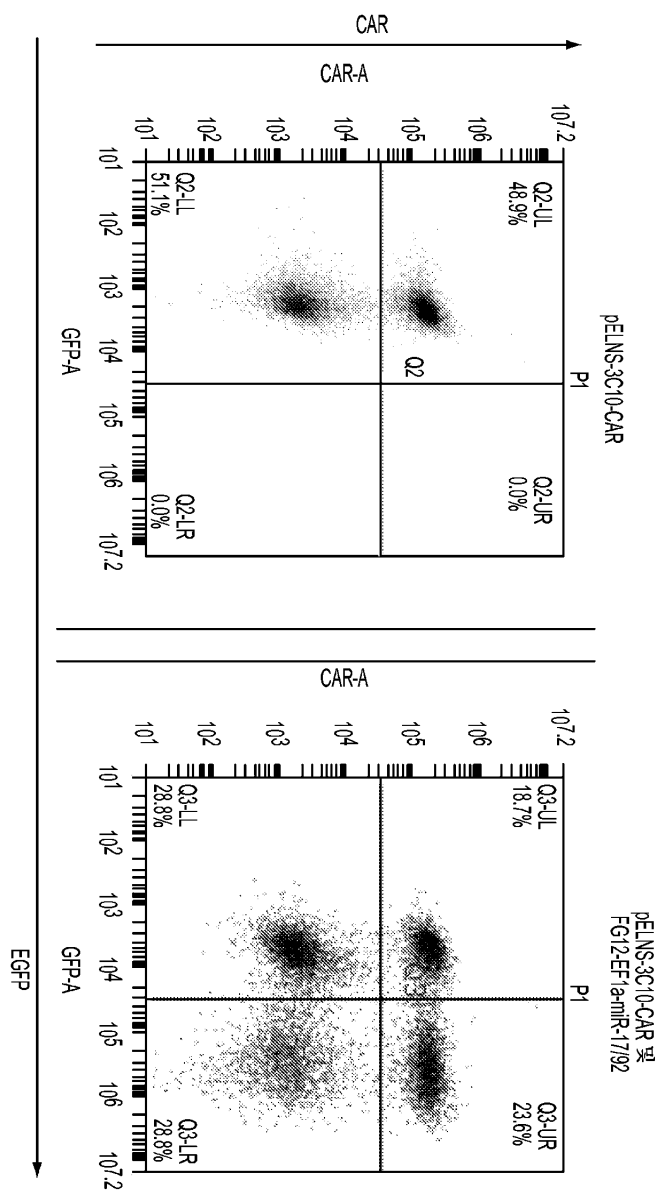
도면1a



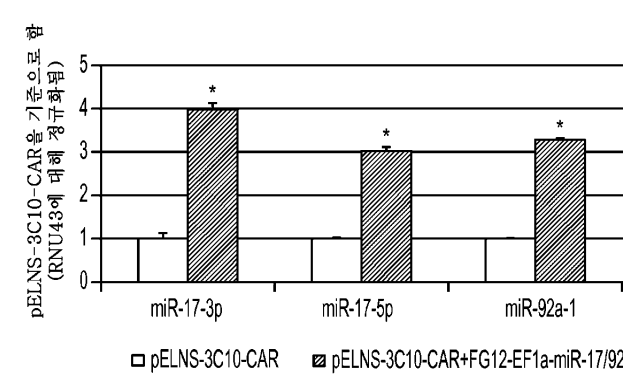
도면1b



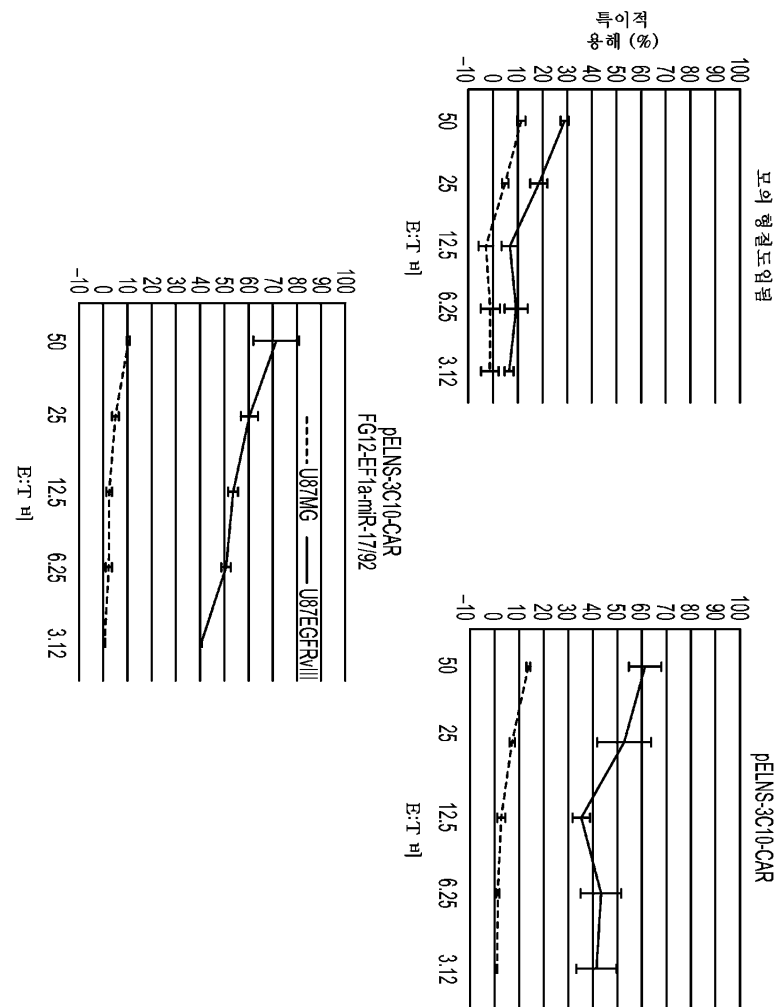
도면2a



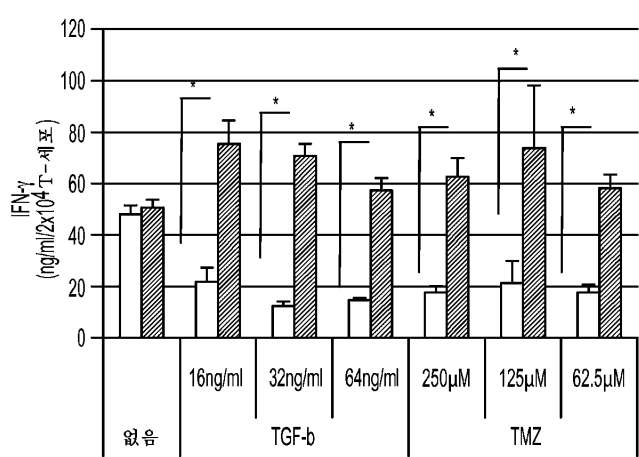
도면2b



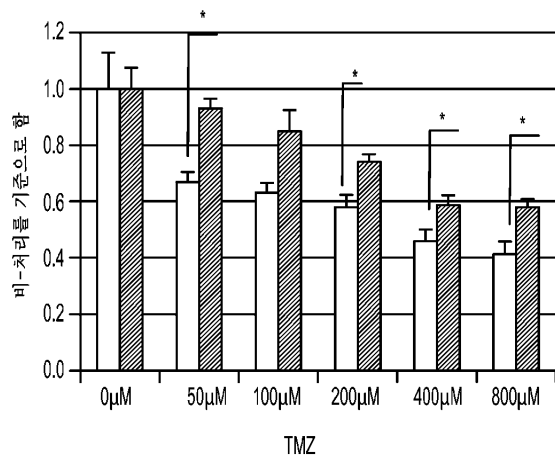
도면2c



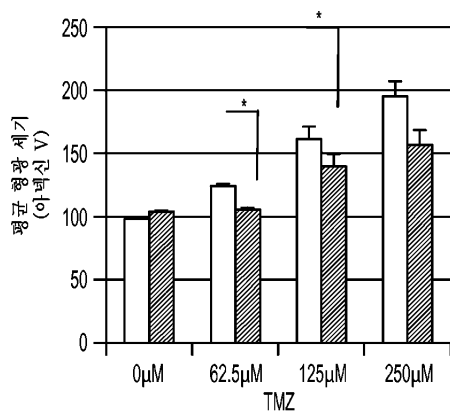
도면3a



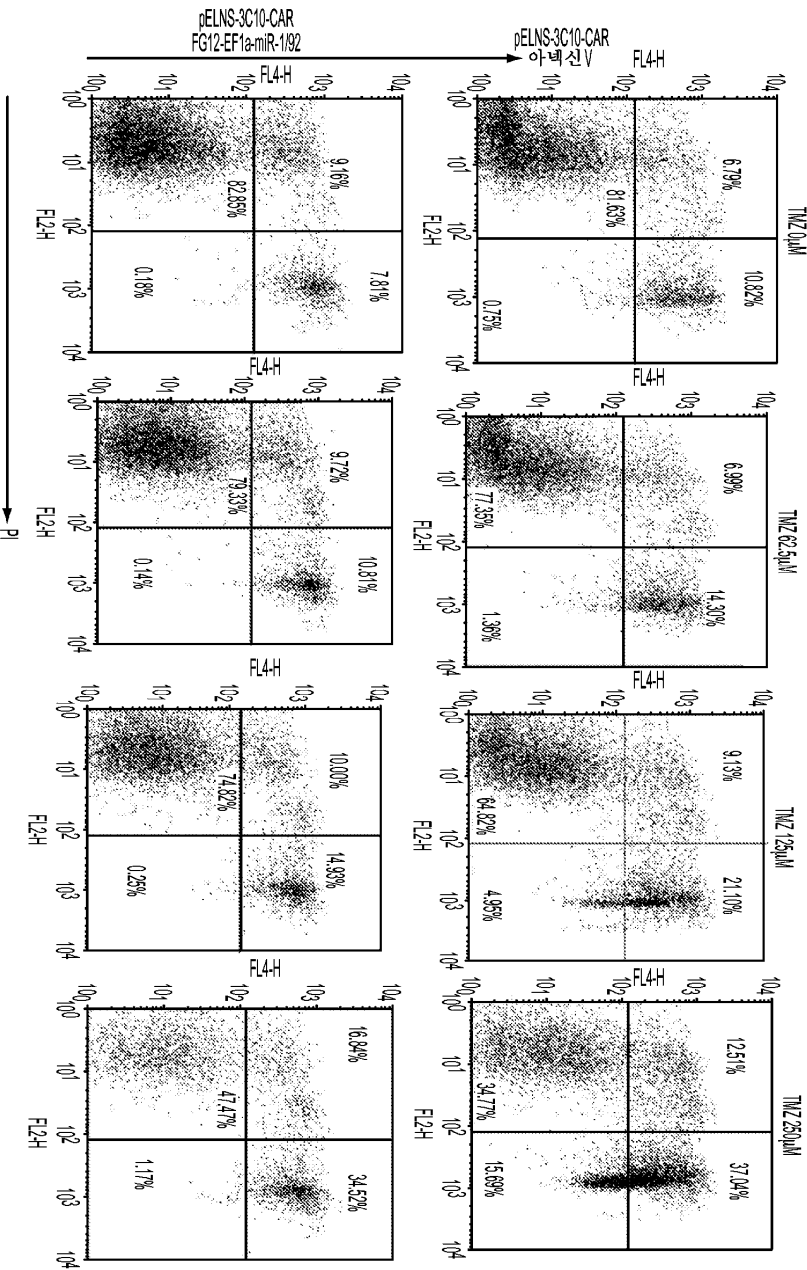
도면3b



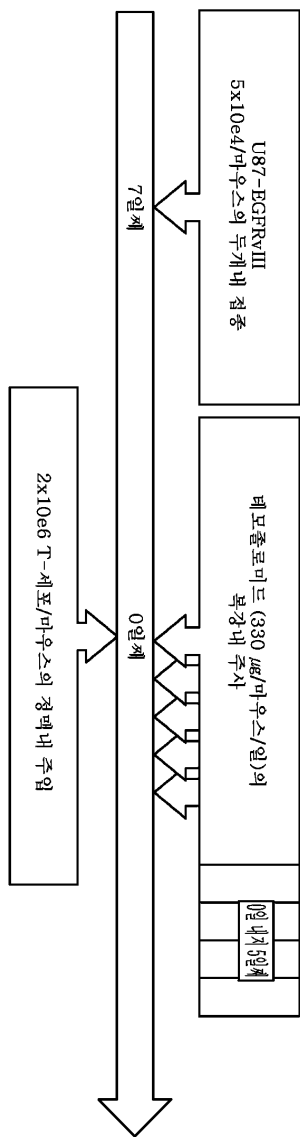
도면3c



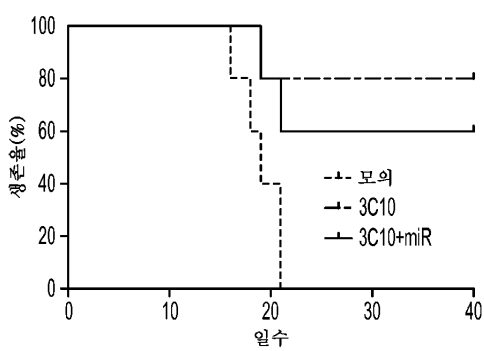
도면3d



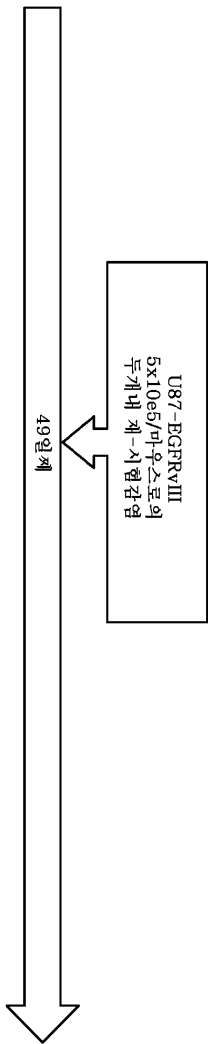
도면4a



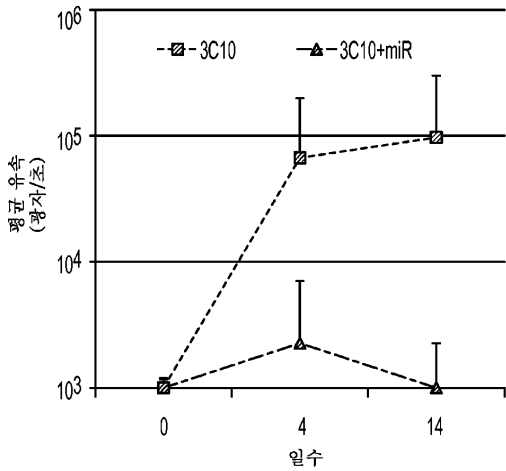
도면4b



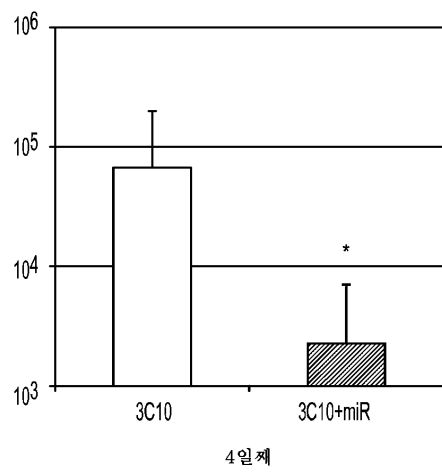
도면5a



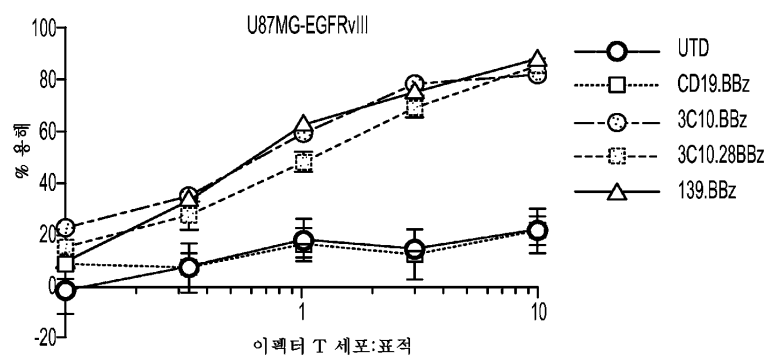
도면5b



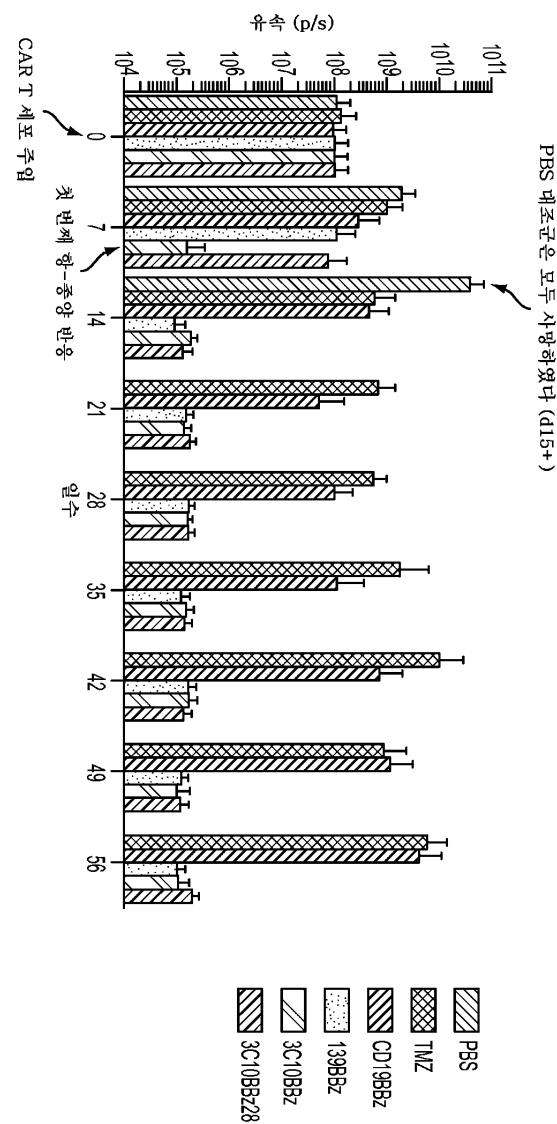
도면5c



도면7b



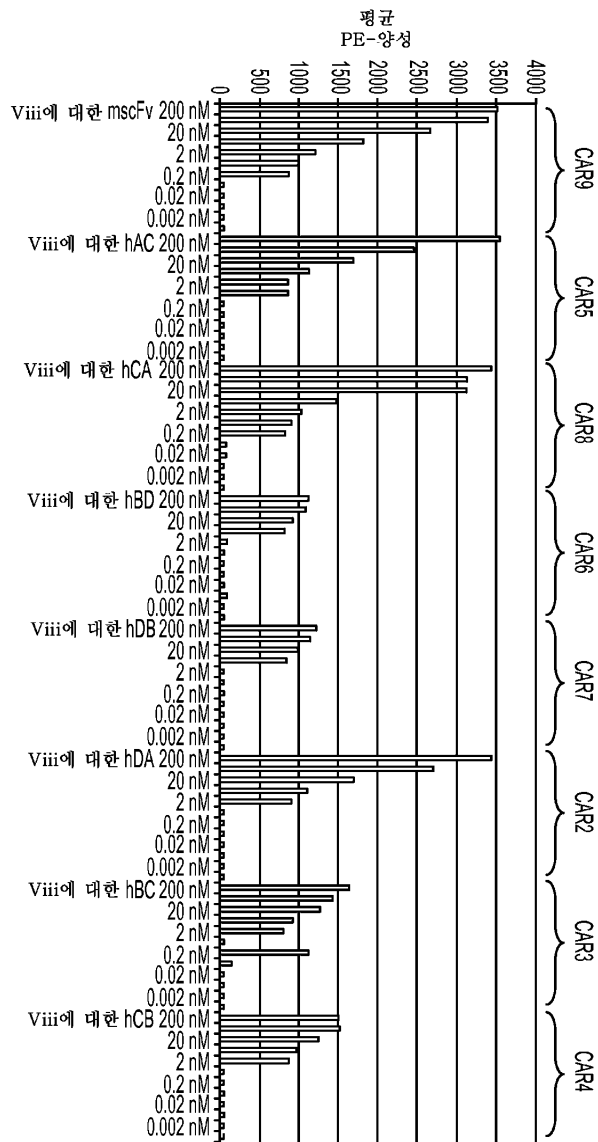
도면8



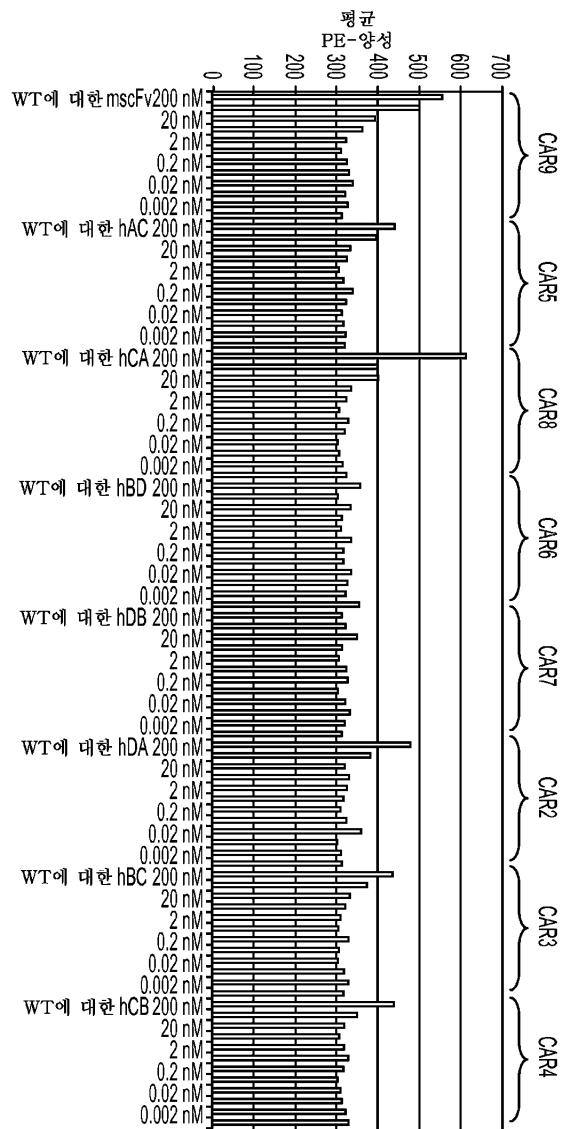
도면9

CDR 2의 코타아		CDRH1		CDRH2	
CDR 2의 카바트		CDRH1		CDRH2	
카바트 넘버링					
무린 3C0W	ELQLQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYIH	WVKQRTEDQGLEWIGRIDP		ENDETKYGPILFQGG	
WH14H21	ELQLVQSGAEVKKPGATVKISCKGSGFNIEDYIH	WVQQAPEGKGLEWNGRIDP		ENDETKYGPILFQGG	
WH55H21	ELQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGFNIEDYIH	WVRQMPGKGLEWNGRIDP		ENDETKYGPILFQGG	
CDR 2의 코타아		CDRH3			
CDR 2의 카바트		CDRH3			
카바트 넘버링					
무린 3C0W	RATITADTSSNTVYLQLSLTSEDTAVYYCAFRGG	VYNGPGETTLTVSS			
WH14H21	RVTITADTSSNTVYMELSSLRSEDTAVYYCAFRGG	VYNGQGTTVTVSS			
WH55H21	HVTISADTSSNTVYLQWSSLKASDTAMYYCAFRGG	VYNGQGTTVTVSS			
CDR 2의 코타아		CDRL1		CDRL2	
CDR 2의 카바트		CDRL1		CDRL3	
카바트 넘버링					
무린 3C0W	DVVMTQSPFLTSLVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNNWDLQRPQSPKRLISL	VSKLDGVPDR			
WH2AT4H21	DVVMTQSPFLSPVTLGVPASISCKSSQSLDSDGKTYLNNWDLQRPQSPKRLISL	VSKLDGVPDR			
WH4B3H21	DVVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSLDSDGKTYLNNWDLQRPQSPKRLISL	VSKLDGVPDR			
CDR 2의 코타아		CDRL3			
CDR 2의 카바트		CDRL3			
카바트 넘버링					
무린 3C0L	TSGSGTDFTLRISRVEADLGIIYCWQGTHFP	GTFGGGTXLEIK			
WH2AT7H21	S GSGSGTDFTLKISRVEADVGVYCWQGTHFP	GTFGGGTXVEIK			
WH4B3H21	S GSGSGTDFTLTSSLDADVAVYCWQGTHFP	GTFGGGTXVEIK			

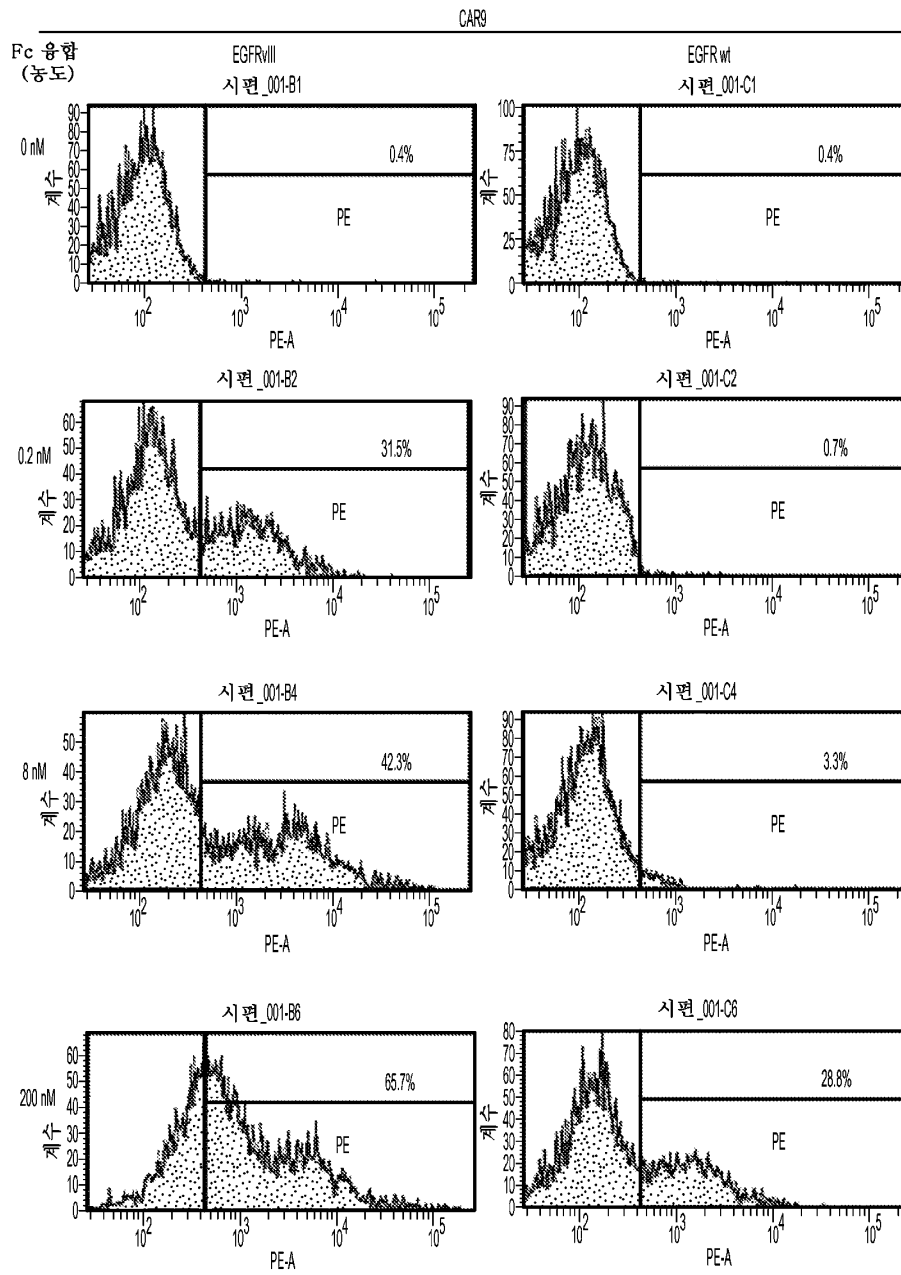
도면10



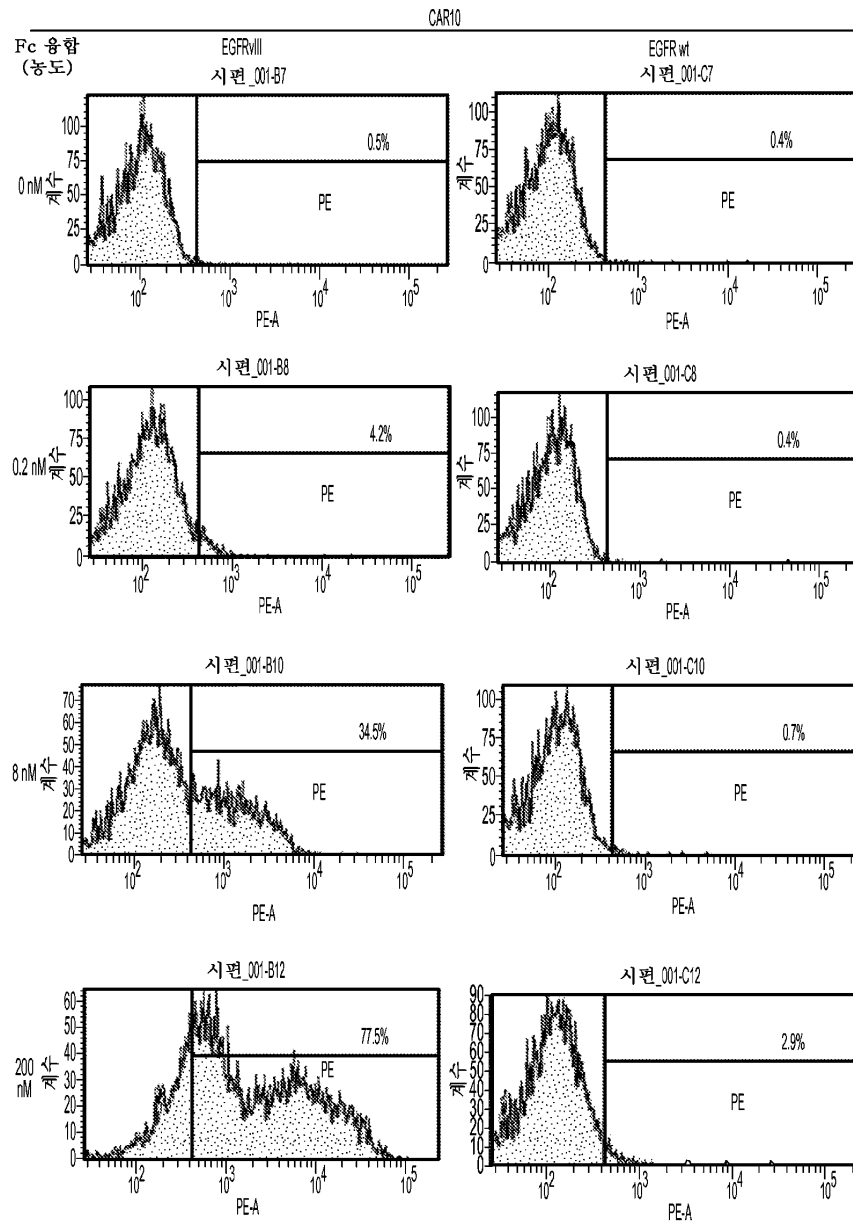
도면11



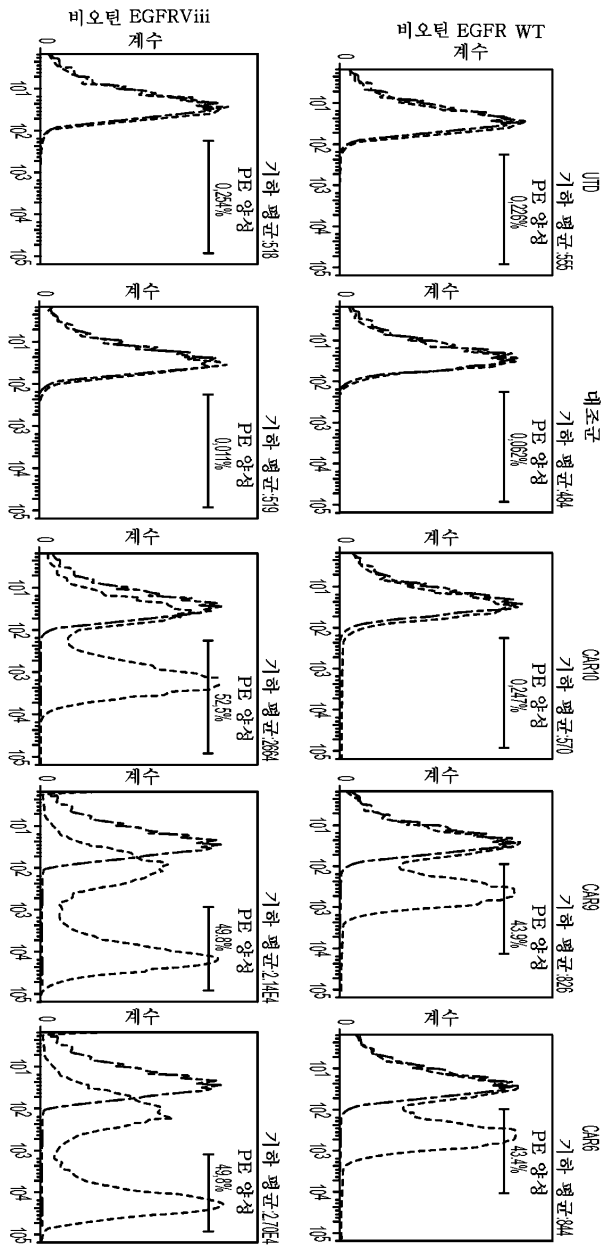
도면12a



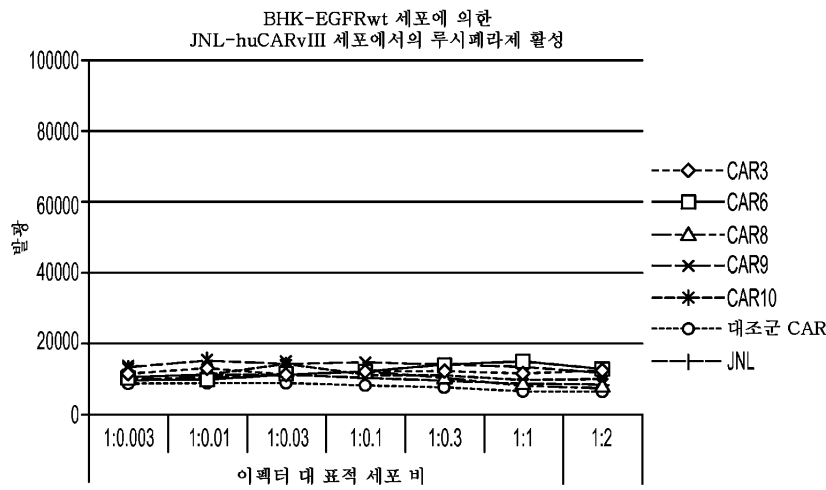
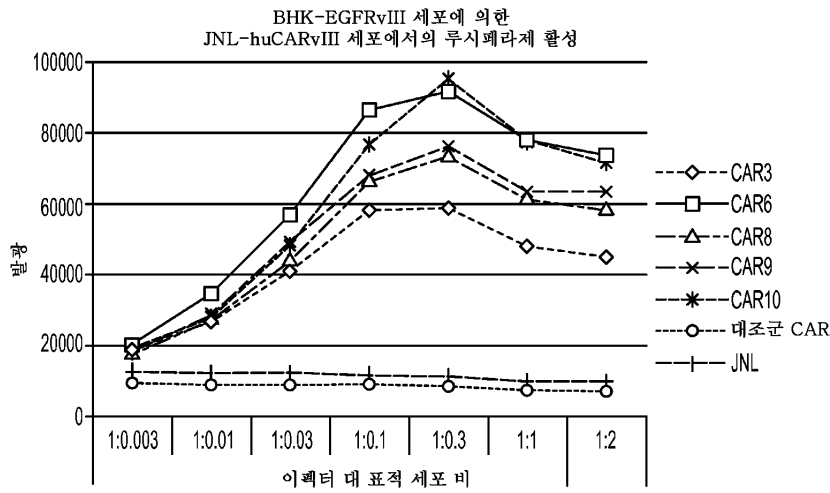
도면12b



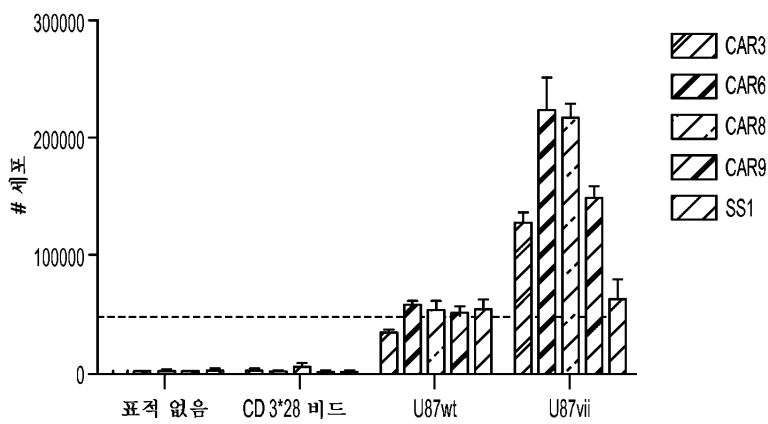
도면13



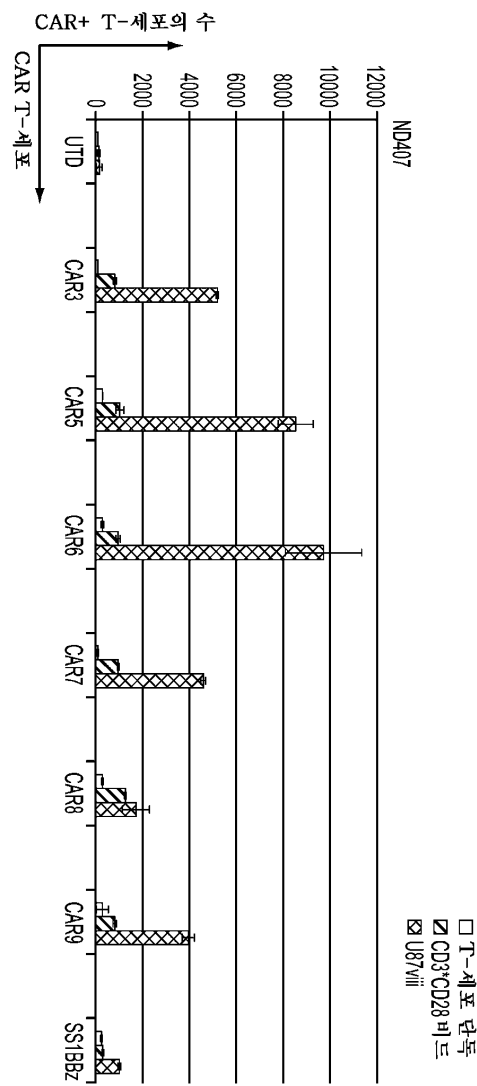
도면14



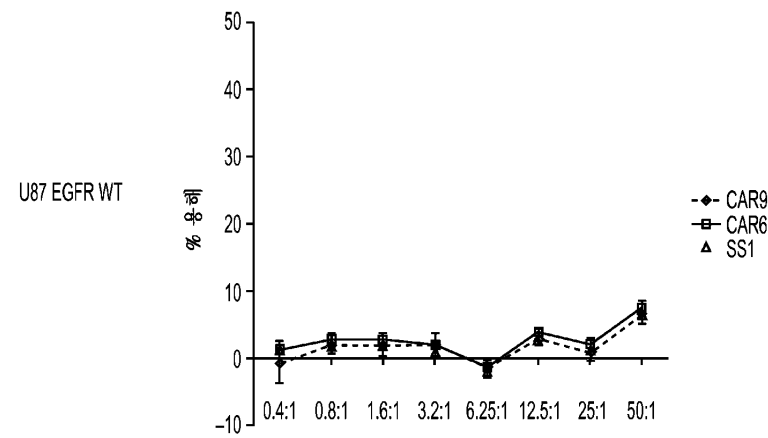
도면15



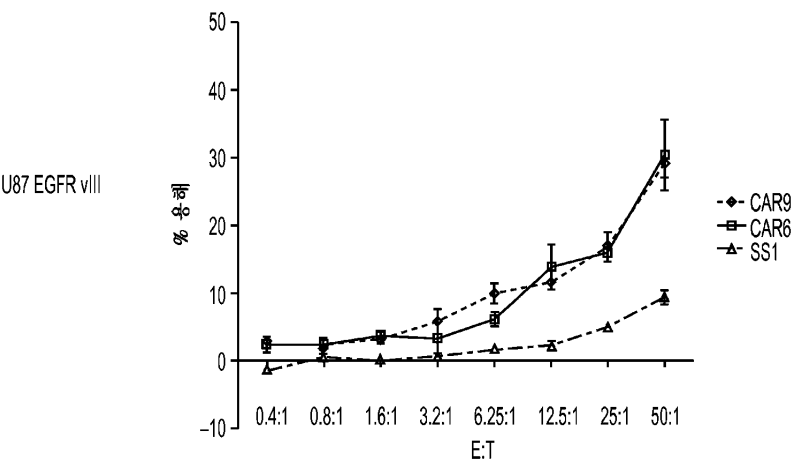
도면16



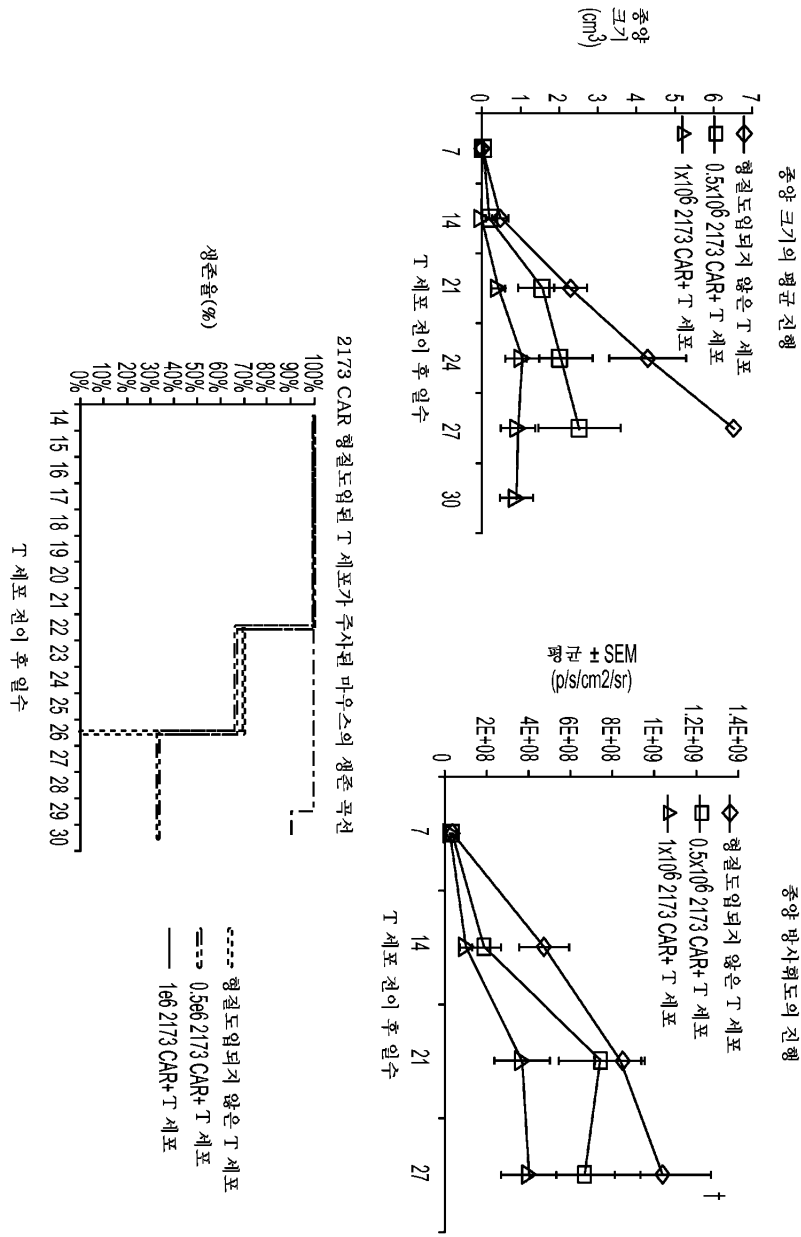
도면17a



도면17b



도면18



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM
OF HIGHER EDUCATION

<120> TREATMENT OF CANCER USING HUMANIZED ANTI-EGFRVIII
CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

<130> N2067-7000WO

<140><141><150> 61/888,255

<151> 2013-10-08

<150> 61/767,071

<151> 2013-02-20

<160> 127

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 535

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

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

<400> 1

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 Gly Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala

20 25 30

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser

35 40 45

Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr

50 55 60

Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu

65 70 75 80

Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp

85 90 95

Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu

100 105 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly

115 120 125

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

130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser
 165 170 175
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu

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

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

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

 370 375 380

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
385 390 395 400
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
405 410 415
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
420 425 430
Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
435 440 445
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
450 455 460
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
465 470 475 480
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
485 490 495
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
500 505 510
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
515 520 525
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
530 535
<210> 2
<211> 491
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 2
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 Gly Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
20 25 30

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser
 35 40 45
 Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr
 50 55 60
 Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu
 65 70 75 80
 Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp
 85 90 95
 Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
 100 105 110
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser
 165 170 175
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
 180 185 190
 Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser
 195 200 205
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 225 230 235 240
 Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr
 245 250 255
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ser Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu

275 280 285
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335

 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys 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> 3
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

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

<400> 3

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 Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala

195 200 205

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

210 215 220

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

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

 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 340 345 350
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 355 360 365
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 370 375 380
 Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 385 390 395 400

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

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

465	470	475	480
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
485			
<210> 4			
<211> 729			
<212> DNA			
<213> Mus sp.			
<400> 4			
gagattcagc tgcagcaatc tggggcagaa cttgtgaagc caggggcctc agtcaagctg 60			
tcctgcacag gtctctggctt caacattgaa gactactata ttcactgggt gaagcagagg 120			
actgaacagg gcctggaatg gattggaagg attgatcctg agaatgatga aactaaatat 180			
ggcccaatat tccagggcag ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagtctac 240			
ctgcaactca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc ctttcgcggt 300			
ggagtctact gggggccagg aaccactctc acagtctcct caggaggctg tggttccggt 360			
ggtggttggt ccggaggctg ttggtcacat atggatgttg tgatgaccca gtctccactc 420			
actctatcgg ttgccattgg acaatcagcc tccatctctt gcaagtcaag tcagagcctc 480			
ttagatagtg atggaaagac atatttgaat tggttgttac agaggccagg ccagtctcca 540			
aagcgcctaa tcctctctgt gtctaaactg gactctggag tccctgacag gticactggc 600			
agtggatcag ggacagattt cacactgaga atcagcagag tggaggctga ggatttgga 660			
atattattatt gctggcaagg tacacatttt cctgggacgt tcggtggagg gaccaagctg 720			
gagataaaa 729			
<210> 5			
<211> 720			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic			
polynucleotide"			
<400> 5			
gacatccaga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60			
atcacctgtc gggccagcca gggcatcaga aacaacctgg cctgggtatca gcagaagccc 120			
ggcaaggccc ccaagagact gatctacgct gccagcaatc tgcagagcgg cgtgccccagc 180			

agattcaccg gaagcggctc cggcaccgag ttcacctga tcgtgtccag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag caccacagct accctctgac cagcggcgga 300
ggcaccaagg tggagatcaa gcggaccggc agcaccagcg gcagcggcaa gcctggcagc 360
ggcgagggaa gcgaggtcca ggtgctggaa tctggcggcg gactggtgca gcctggcggc 420
agcctgagac tgagctgtgc cgccagcggc ttcacctca gcagctacgc catgtcttgg 480
gtccggcagg ctcttgaaa gggcctggaa tgggtgtccg ccatcagcgg ctctggcggc 540
tccaccaact acgccgacag cgtgaagggc cggttcacca tcagccggga caacagcaag 600

aacacctgt atctgcagat gaacagcctg agagccgagg acaccgccgt gtactactgt 660
gccggcagca gcgggtggag cgagtactgg ggccagggca cactggtcac agtgtctagc 720

<210> 6

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 6

atggccttac cagtgcaccg cttgtctctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccg 63

<210> 7

<211> 135

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 7

accacgacgc cagcgccgag accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagccctg 60
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
gacttcgcct gtgat 135

<210> 8

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

oligonucleotide"

<400> 8

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggtcc ttctcctgc actggttacc 60

accctttact gc 72

<210> 9

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 9

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 10

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 10

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggccca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggccgaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgcc ttacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 11

<211> 243

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

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

115 120 125

Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val

130 135 140

Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

180 185 190

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

195 200 205

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys

210 215 220
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

225 230 235 240
Glu Ile Lys

<210> 12

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn

195 200 205

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

210 215 220

Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

225 230 235 240

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

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> 14

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

35 40 45

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 16

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

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 17

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

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 18

<211> 1605

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 18

atggccttac cagtaccgc cttgtcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccgggatccg agattcagct gcagcaatct ggggcagaac ttgtgaagcc aggggcctca 120

gtcaagctgt cctgcacagg ttctggcttc aacattgaag actactatat tctactgggtg 180

aagcagagga ctgaacaggg cctggaatgg attggaagga ttgatcctga gaatgatgaa 240

actaaatatg gcccaatatt ccagggcagg gccactataa cagcagacac atcctccaac 300

acagtctacc tgcaactcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgcc 360

ttctgcggtg gagtctactg ggggccagga accactctca cagtctcttc aggaggtggt 420
 ggttccggtg gtggtggttc cggaggtggt gggtcacata tggatgttgt gatgaccag 480

 tctccactca ctctatcggt tgccattgga caatcagcct ccatctcttg caagtcaagt 540
 cagagcctct tagatagtga tggaaagaca tatttgaatt ggttggttaca gaggccaggc 600
 cagtctccaa agcgctaat ctctctggtg tctaaactgg actctggagt ccctgacagg 660
 ttacttgcca gtggatcagg gacagatttc aactgagaa tcagcagagt ggaggtgag 720
 gatttgggaa ttattatttg ctggcaaggt acacattttc ctgggacgtt cgggtggagg 780
 accaagctgg agataaaagc tagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 840
 cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 900

 ggcgagctgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt 960
 ggtggagtcc tggtttgcta tagcttgcta gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg 1020
 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcccccc 1080
 gggccacccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 1140
 tccaaacggg gcagaaaaga actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta 1200
 caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga 1260
 tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccggtacaa gcagggccag 1320

 aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag 1380
 agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc 1440
 ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa 1500
 ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc aggttctcag tacagccacc 1560
 aaggacacct acgacgcctt tcacatgcag gcctgcccc ctcgc 1605

 <210> 19
 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

 polynucleotide"
 <400> 19
 atggccttac cagtaccgc cttgtctctg ccgtggcct tgctgtcca cgccgccagg 60
 ccgggatccg agattcagct gcagcaatct ggggcagaac ttgtgaagcc aggggcctca 120

gtcaagctgt cctgcacagg ttctggcttc aacattgaag actactatat tcaactgggtg 180
aagcagagga ctgaacaggg cctggaatgg attggaagga ttgatcctga gaatgatgaa 240
actaaatatg gcccaatatt ccagggcagg gccactataa cagcagacac atcctccaac 300
acagtctacc tgcaactcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgcc 360
tttcgcggtg gagtctactg ggggccagga accactctca cagtctctc aggaggtggt 420

ggttccggtg gtggtgggtc cggaggtggt gggtcacata tggatgttgt gatgaccag 480
tctccactca ctctatcgtt tgccattgga caatcagcct ccatctcttg caagtcaagt 540
cagagcctct tagatagta tggaaagaca tatttgaatt ggttggttaca gaggccaggc 600
cagtctccaa agcgcctaatt ctctctgggt tctaaactgg actctggagt ccctgacagg 660
ttcactggca gtggatcagg gacagatttc aactgagaa tcagcagagt ggaggctgag 720
gatttgggaa ttattatttg ctggcaaggt acacattttc ctgggacgtt cgggtggagg 780
accaagctgg agataaaagc tagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 840

cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 900
ggcgcagtcg acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgccttg 960
gccgggactt gtgggtcct tctcctgtca ctggttatca cctttactg caaacggggc 1020
agaaagaaac tctgtatat attcaaaca ccatatatga gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140
gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc gcgtacaagc agggccagaa ccagctctat 1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1260

gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320
ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcgg 1380
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccacca ggacacctac 1440
gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgc 1473

<210> 20
<211> 1465
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 20

atggccttac cagtgaccgc cttgtctctg ccgctggcct tgctgtcca cgccgccagg 60

ccgggatccg acatccagat gaccagagc cctagcagcc tgagcgccag cgtgggcgac 120

agagtgacca tcacctgtcg ggccagccag ggcatcagaa acaacctggc ctggtatcag 180

cagaagcccc gcaaggcccc caagagactg atctacgtg ccagcaatct gcagagcggc 240

gtgccagca gattcaccgg aagcggctcc ggaccagagt tcacctgat cgtgtccagc 300

ctgcagcccc aggacttcgc cacctactac tgcctgcagc accacagcta ccctctgacc 360

agcggcggag gcaccaaggt ggagatcaag cggaccggca gcaccagcgg cagcggcaag 420

cctggcagcg gcgaggggaag cgaggtccag gtgtggaat ctggcggcgg actggtgcag 480

cctggcggca gcctgagact gagctgtgcc gccagcggct tcaccttcag cagctacgcc 540

atgtcttggg tccggcaggc tcttgaaag ggctggaat gggtgtccgc catcagcggc 600

tctggcggct ccaccaacta cgccgacagc gtgaagggcc gggtcaccat cagccgggac 660

aacagcaaga acacctgta tctgcagatg aacagcctga gagccgagga caccgccgtg 720

tactactgtg ccggcagcag cgggtggagc gagtactggg gccagggcac actggtcaca 780

gtgtctagcg ctagcaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc 840

gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg 900

cacacgaggg ggctggactt cgctgtgat atctacatct gggcgccctt ggccgggact 960

tgtggggctc ttctcctgtc actggttacc accctttact gcaaacgggg cagaaagaaa 1020

ctcctgtata tattcaaa accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat 1080

ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc 1140

agcaggagcg cagacgcccc cgcgtacaag cagggccaga accagctcta taacgagctc 1200

aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggacctgag 1260

atggggggaa agccgagaag gaagaacct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 1320

gataagatgg cggaggccta cagtgagatt ggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag 1380

gggcacgatg gcctttacca gggctctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt 1440

cacatgcagg ccctgcccc tcgct 1465

<210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 22

Asp Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 23

Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 24

Arg Gly Gly Val Tyr

1 5

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25

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

1 5 10 15

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

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

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 26
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 27
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 28

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr

1 5

<210> 29

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 29

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr

1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 31

Asp Pro Glu Asn Asp Glu

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 32

Arg Gly Gly Val Tyr

1 5

<210> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 33

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

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 34

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

1 5 10

<210> 35

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

Leu Val Ser

1

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 36

Gly Thr His Phe Pro Gly

1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 37

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 38

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 38

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr

20 25 30

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

<210> 39

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 39

```
gaaatccagc tggccaatc gggagctgag gtcaagaagc cgggagccac cgtcaagatc      60
tcatgcaagg ggtcgggatt caacatcgag gactactaca ttactgggt gcagcaagct      120
ccgggaaaag gcctggaatg gatgggcaga atcgaccag aaaacgacga aactaagtac      180
ggaccgattt tccaaggaag agtgactatc accgccgata cttcaacaa taccgtctac      240
atggaactga gtcgctccg gtccaagat actgcagtgt attactgtgc ctttcgcgga      300
ggggtgtact ggggccaagg aactactgtc actgtctcgt caggaggcgg agggtcggga      360
ggaggcggga gcggaggcgg tggctcgggt ggcgaggaa gcgacgtggt gatgaccag      420
```

```
tccccggact ccctcgccgt gaggctcgga gagaggcgca ctatcaattg caagtcgtcc      480
cagtcacttc tggattccga tggtaaaacg tacctcaact ggctgcagca aaagccaggg      540
cagccaccca aacggttgat ctcccttggt tccaaactgg atagcggagt gcctgaccgc      600
ttctcgggtt ccggtagcgg gaccgacttc accctgacga tcagctcact gcaggcggag      660
gacgtggcag tgtactactg ctggcaggga acccacttcc ctggcacctt tggaggtggc      720
accaaggtgg agatcaag      738
```

<210> 40

<211> 831

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 40

```
atggccctcc ctgtcaccgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg      60
cccgaaatcc agctggtcca atcgggagct gaggtcaaga agccgggagc caccgtcaag      120
atctcatgca aggggtcggg attcaacatc gaggactact acattcactg ggtgcagcaa      180
gtcctgggaa aaggcctgga atggatgggc agaatcgacc cagaaaacga cgaaactaag      240
tacggaccga ttttccaagg aagagtgact atcaccgccg atacttcaac caataccgtc      300
tacatggaac tgagctcgct ccggtccgaa gatactgcag tgtattactg tgcctttcgc      360
```

ggaggggtgt actggggcca aggaactact gtcactgtct cgtcaggagg cggagggtcg 420
 ggaggaggcg ggagcggagg cggtaggctcg ggtggcggag gaagcgacgt ggtgatgacc 480
 cagtccccgg actccctcgc cgtgagcctc ggagagaggg cgactatcaa ttgcaagtcg 540
 tcccagtcac ttctggattc cgtaggtaaa acgtacctca actggctgca gcaaaagcca 600
 gggcagccac ccaaacggtt gatctccctt gtgtccaaac tggatagcgg agtgcctgac 660
 cgcttctcgg gttccggtag cgggaccgac ttcacctga cgatcagctc actgcaggcg 720
 gaggacgtgg cagtgtacta ctgctggcag ggaaccact tccctggcac ctttgaggt 780

ggcaccaagg tggagatcaa gggatgcac caccatcacc atcatcatca c 831

<210> 41

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 41

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 Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr
 145 150 155 160

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

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

<210> 42

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

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

<400> 42

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgagatcc agctggtgca gtcgggagct gaagtcaaaa agcctggcgc aaccgtcaag	120
atctcgtgca aaggatcagg gttcaacatc gaggactact acatccattg ggtgcaacag	180
gcacccggaa aaggcctgga gtggatgggg aggattgacc cagaaaatga cgaaaccaag	240

tacggaccga tcttccaagg acgggtgacc atcacggctg acacttccac taacaccgtc 300
tacatggaac tctcgagcct tcgctcggaa gataccgcgg tgtactactg cgcctttaga 360

ggtaggtct actggggaca agggactacc gtcaccgtgt cgtcaggtgg cggaggatca 420
ggcggaggcg gctccggtgg aggaggaagc ggaggaggtg gctccgacgt ggtgatgacg 480
cagtaccgg actccttggc ggtgagcctg ggtgaacgcg ccactatcaa ctgaagagc 540
tcccagagct tgctggactc cgatggaaag acttatctca attggctgca acagaagcct 600
ggccagccgc caaagagact catctcactg gtgagcaagc tggatagcgg agtgccagat 660
cggttttcgg gatcgggctc aggcaccgac ttcacctga ctatttctc cctccaagcc 720
gaggatgtgg ccgtctacta ctgttggcag gggactcact tcccggggac cttcggtgga 780

ggcactaagg tggagatcaa aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggtcct 840
accatgcct cccagcctc gtcctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg 900
gccgtgcata cccgggtct tgacttcgc tgcgatctt acatttgggc ccctctggct 960
ggtacttgcg gggctctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg 1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacc ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag 1080
gaggacggct gttcatgccg gttccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg 1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac 1200

gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac 1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacagctc 1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaaggga acgcagaaga 1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac 1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg 1470

<210> 43

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 43

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

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

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

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

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

260 265 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
275 280 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
340 345 350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380

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

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
465 470 475 480
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 44

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 44

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205

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

245

<210> 45

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 45

gatgtcgtga tgaccagtc cccagactcc ctgcagtggt ccttgggaga acgggccacc	60
atcaactgca aatcgagcca gtcactgtg gactcagacg gaaagaccta cctcaactgg	120
ctgcagcaga agcctggcca gccaccgaag cgctgatct ccttgggtgc caagtggac	180
tctggcgctcc cggacaggtt tagcggtagc ggctcgggaa cgcacttcac tctgaccatt	240
agctcgctcc aagctgaaga tgtggcggtc tactactgct ggcaggggac ccacttcccc	300
gggacctttg gcggaggaac taaagtcgaa atcaaaggag gaggcggatc aggtggagga	360
ggcagcggag gaggagggag cggcgggtggc ggctccgaaa ttcaacttgt gcaatccggt	420
gccgaggtga agaaacctgg tgccactgtc aagatctcgt gtaagggatc gggattcaat	480
atcgaggact actacatcca ctgggtgcaa caggcgccag gaaagggatt ggagtggatg	540
ggtcgcacgc acccggaata cgatgagact aagtacggac cgatcttcca aggccgggtc	600
acgatcactg cggataacct cactaatacc gtgtatatgg agctctcgtc actgagaagc	660
gaagatacgg ccgtgtacta ctgcgcattc agaggagggtg tgtactgggg ccaggaact	720
actgtgaccg tgcgtcgc	738

<210> 46

<211> 831

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 46

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc tctgtctcca cgccgtcgg 60
cccgatgtcg tgatgacca gtccccagac tcctctgcag tctccttggg agaacgggcc 120
accatcaact gcaaatcgag ccagtcactg ctggactcag acgaaaagac ctacctaac 180
tggctgcagc agaagcctgg ccagccaccg aagcgctga tctccctggt gtccaagctg 240
gactcgggcg tcccggacag gtttagcggg agcggctcgg gaaccgactt cactctgacc 300

attagctcgc tccaagctga agatgtggcg gtctactact gctggcaggg gaccacttc 360
cccgggacct ttggcggagg aactaaagtc gaaatcaaag gaggaggcgg atcaggtgga 420
ggaggcagcg gaggaggagg gagcggcggg ggcggtccg aaattcaact tgtgcaatcc 480
ggtgccgagg tgaagaaacc tgggtccact gtcaagatct cgtgtaaggg atcgggattc 540
aatatcgagg actactacat cactgggtg caacaggcgc caggaaaggg attggagtgg 600
atgggtcgca tcgaccgga aaacgatgag actaagtacg gaccgatctt ccaaggccgg 660
gtcacgatca ctgcggatac ctccactaat accgtgtata tggagctctc gtcactgaga 720

agcgaagata cgccctgtga ctactgcga ttcagaggag gtgtgtactg gggccaggga 780
actactgtga ccgtgtcgtc ggggtcacat caccaccatc atcatcacca c 831

<210> 47

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 47

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu

20 25 30

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln

35 40 45

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

50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

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

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

 210 215 220
 Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
 225 230 235 240
 Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser His His His
 260 265 270
 His His His His His
 275
 <210
 > 48
 <211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 48

```
atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgtggctc ttcgtctcca cgccgctcgg      60
cccgactgg tcatgactca aagcccagat tccttggtg tctcccttgg agaaagagca      120
acgatcaatt gcaaaagctc gcagtccttg ttggactccg atggaaaaac ctacctcaac      180
tggctgcagc agaagccggg acaaccacca aagcggctga tttccctcgt gtccaagctg      240
gacagcggcg tgccgcatcg cttctcgggc agcggctcgg gaaccgattt tactctcact      300
```

```
atttcgtcac tgcaagcgga ggacgtggcg gtgtattact gctggcaggg cactcacttc      360
ccgggtactt ttggtggagg taccaaagtc gaaatcaagg gtggaggcgg gagcggagga      420
ggcgggtcgg gaggaggagg atcgggtggc ggaggctcag aaatccagct ggtgcagtca      480
ggtgccgaag tgaagaagcc tggggccacg gtgaagatct cgtgcaaggg gagcggattc      540
aacatcgagg attactacat ccattgggtg caacaggccc ctggcaaagg gctggaatgg      600
atgggaagga tcgacccga gaatgacgag actaagtacg gcccgatctt ccaaggacgg      660
gtgaccatca ctgcagacac ttcaaccaac accgtctaca tggaactctc ctgctgcgc      720
```

```
tccgaggaca ccgccgtgta ctactgtgct ttcagaggag gactctactg gggacaggga      780
acgaccgtga ccgtcagctc aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatgcct cccagcctct gtccttgctt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg      900
gccgtgcata cccgggtctt tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct      960
ggtacttgcg gggctcctgt gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg      1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacct ttcattaggc ctgtgcagac tactcaagag      1080
gaggacggct gttcatgccg gttccagag gaggaggaag gcggtgcga actgcgcgtg      1140
```

```
aaattcagcc gcagcgaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac      1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac      1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc      1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga      1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac      1440
gtctttcaca tgcaggccct gccgcctcgg      1470
```

<210> 49

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 49

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu

20 25 30

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln

180 185 190

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn
195 200 205

Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr
210 215 220

Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
225 230 235 240

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270

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

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
340 345 350

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

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

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

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

435 440 445
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
465 470 475 480
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 50

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 50

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

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

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

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

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

<210> 51

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 51

gagattcagc tggctccaaag cggcgcagaa gtgaaaaagc caggggaatc gttgcgcac	60
agctgtaaag gttccggtt caacatcgag gactattaca tccattgggt gcggcagatg	120
ccaggaaagg ggctggaatg gatgggacgg attgaccgg agaacgacga aaccaagtac	180
ggaccgatct ttcaaggaca cgtgactatc tccgccgaca ccagcatcaa tacggtgtac	240
ctccaatggt cctcactcaa ggctcggat accgcgatgt actactgcgc gttcagagga	300
ggcgtctact ggggacaagg gactactgtg actgtctcat caggaggtgg aggaagcgga	360
ggaggtggct cgggcggagg tggatcggga ggaggagggt ccatgtggt gatgaccag	420
tccccactgt cgctcccggt gaccctcgga cagcctgcta gcatctcgtg caaatcctcg	480
caatccctgc tggactcgga cggaaaaacg tacctcaatt ggctgcagca gcgcctggc	540

cagagcccgga gaaggcttat ctgctgggtg tcaaagctgg atagcgggtg gcccgaccgg 600
 ttcagcggtt cagggtcagg aaccgatttc accttgaaga tctcccgctt ggaagccgaa 660
 gatgtcggag tctactactg ctggcagggt actcacttcc cggggacctt tggtagcggc 720
 actaaggtcg agattaag 738

<210> 52

<211> 831

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 52

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca ccccgtcgg 60
 cccgagattc agctgttcca aagcggcgca gaagtgaaga agccagggga atcgttgcgc 120
 atcagctgta aaggttccgg cttcaacatc gaggactatt acatccattg ggtgcggcag 180
 atgccaggaa aggggttggg atggatggga cggattgacc cggagaacga cgaaaccaag 240
 tacggaccga tctttcaagg acacgtgact atctccgccg acaccagcat caatacgggtg 300

tacctcaat ggtcctcact caaggcctcg gataccgca tgtactactg cgcgttcaga 360
 ggaggcgtct actggggaca agggactact gtgactgtct catcaggagg tggaggaagc 420
 ggaggaggtg gctcgggcgg aggtggatcg ggaggaggag ggtccgatgt ggtgatgacc 480
 cagtccccac tgtcgtccc ggtgacctc ggacagcctg ctagcatctc gtgcaaatcc 540
 tcgcaatccc tctgtgactc ggacggaaaa acgtacctca attggctgca gcagcgcct 600
 ggccagagcc cgagaaggct tatctcgctg gtgtcaaagc tggatagcgg tgtgcccgc 660
 cggttcagcg gctcagggtc aggaaccgat ttcacattga agatctcccg cgtggaagcc 720

gaagatgtcg gagtctacta ctgctggcag ggtactcact tcccggggac ctttggtggc 780
 ggcaactaagg tcgagattaa gggctcacac catcatcacc atcaccacca c 831

<210> 53

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 53

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 Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe

35 40 45

Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys

65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

85 90 95

Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr

100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile

195 200 205

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

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala

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

275

<210

> 54

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 54

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgttggtc ttctgtcca cgcgctcgg	60
cccgaaatcc agctggtgca aagcggagcc gaggtgaaga agcccgagga atccctgcgc	120
atctctgtga agggttccgg cttaacatc gaggattact acatccactg ggtgagacag	180
atgccgggca aaggtctgga atggatgggc cgcacgacc cggagaacga cgaaacaaaa	240
tacggaccaa tcttccaagg acatgtgact atttccgagg atacctccat caacactgtc	300
tacttgacgt ggagctcgt caaggcgtcg gataccgcca tgtactactg cgcattcaga	360
ggaggtgtgt actggggcca gggcactacg gtcaccgtgt cctcgggagg tggagggtca	420
ggaggcggag gctcgggcgg tggaggatca ggcggaggag gaagcgtgt ggtcatgact	480
caatccccac tgtactgcc tgtactctg gggcaaccgg cttccatctc atgcaagtca	540
agccaatcgc tgcctgactc cgacggaaaa acctacctca attggcttca gcagcggcca	600
ggccagtgcg ctcgagggt gatctcactc gtgtcgaagc ttgactccgg ggtgccggat	660
cggtttagcg gaagcggatc ggggaccgac ttcacgttga agattagccg ggtggaagcc	720
gaggacgtgg gagtctatta ctgttggcag gggaccact tcccggggac ttccggagga	780
ggcaccaaag tcgagattaa gaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggtcct	840
accatgcct cccagcctct gtccttgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg	900
gccgtgcata cccgggttct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct	960
ggtacttgcg gggctctgct gctttcactc gtgatcactc ttactgtaa gcgcggtcgg	1020

aagaagctgc tgiacatctt taagcaaccc ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag 1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg 1140

aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac 1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac 1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc 1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaagggga acgcagaaga 1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac 1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg 1470

<210> 55

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 55

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 Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe

35 40 45

Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys

65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

85 90 95

Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr

100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

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

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

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

450

455

460

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

465

470

475

480

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

490

<210> 56

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 56

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

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

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

35

40

45

Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

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

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

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

<210> 57

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 57

gacgtcgtca tgaccagag cccgtgtca ctgctgtga ccctgggcca gccggcgtec	60
attagctgca aatcctcgca atccctgctc gactcagacg gaaaaacgta ctggaactgg	120
ctccaacagc gccctgggca atccccaagg cggcttatct cactcgtcag caagctcgat	180
agcgggtgcc cagacagatt ttccgggctcg ggatcgggca ctgatttcac tctgaagatc	240
tcgcgggtgg aagccgagga tgtgggagtg tactattgct ggcagggcac tcacttcccc	300
gggacgtttg gcggaggaac taaggtcgag atcaaaggag gaggtggatc aggccgaggt	360
gggagcggag gaggaggaag cgggtgtgga ggttccgaaa tccagctggt gcaatcagga	420
gccgaggtga agaagccggg agaatccctg cgcattctgt gcaagggtc gggttcaac	480
atcgaggatt actacatcca ctgggtgcgg cagatgccg gaaaggggtt ggaatggatg	540
ggacgcattg acccgaaaa tgatgaaacc aaatacgggc caatcttcca aggccacgtg	600
accattagcg ctgacattc catcaacacc gtgtacctc agtggctctc actgaaggcg	660
tcggacactg ccatgtacta ctgtgcattc agaggagggg tctactgggg acagggcacc	720
accgtgaccg tgagctcc	738

<210> 58

<211> 831

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 58

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgcgctcgg	60
cccagctcg tcatgacca gagcccgctg tctgtcctg tgacctggg ccagccggcg	120
tccattagct gcaaatctc gcaatccctg ctgcactcag acggaaaaac gtacttgaac	180
tggtccaac agcgccctgg gcaatccca aggcggctta tctactcgt cagcaagctc	240
gatagcgggtg tcccagacag attttcgggc tcgggatcgg gcactgattt cactctgaag	300
atctcgcggg tggaagccga ggatgtggga gtgtactatt gctggcaggg cactcacttc	360
cccgggacgt ttggcggagg aactaaggct gagatcaaag gaggaggtgg atcaggcgga	420
ggtgggagcg gaggaggagg aagcgggtgt ggaggttccg aaatccagct ggtgcaatca	480
ggagccgagg tgaagaagcc gggagaatcc ctgcgcatct cgtgcaaggg ctccggcttc	540

aacatcgagg attactacat ccactgggtg cggcagatgc cgggaaaggg gttggaatgg 600
atgggacgca ttgaccgga aaatgatgaa accaaatagc ggccaatctt ccaaggccac 660
gtgaccatta gcgctgacac ttccatcaac accgtgtacc ttcagtggtc ctcactgaag 720

gcgtcggaca ctgccatgta ctactgtgca ttcagaggag gggcttactg gggacagggc 780
accaccgtga ccgtgagctc cggctcgcat caccatcatc accaccatca c 831

<210> 59

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 59

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln

180 185 190

Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn

195 200 205

Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser

210 215 220

Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

His His His His His

275

<210

> 60

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 60

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgctt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg 60

cccgagctcg tcatgacca atccctctc tcctgccgg tcaccctggg tcagccggcg 120

tcgatctcat gcaaaagctc acagtccctg ctggattcgg acggaaaaac ctactgaac 180

tggtccaac agaggccggg tcagtcacct cgcagactga tctcgtggt gagcaagctc 240

gactcgggtg tgccgatcg gttctccggg tcaggatcgg gcaccgactt tacgtcaag 300

atctcgagag tggaggccga ggatgtggga gtgtactatt gctggcaggg cacgcatttc 360
 cccgggacct ttggaggcgg gactaagggtg gaaatcaagg gaggtggcgg atcaggcggga 420
 ggaggcagcg gcggaggtgg atcaggaggc ggagggtcag agatccagct ggtccaaagc 480
 ggagcagagg tgaagaagcc aggcgaggtcc ctctgcattt cgtgcaaagg gagcggcttc 540
 aacattgaag attactacat ccactgggtg cggcaaatgc caggaaaggg tctggaatgg 600
 atgggacgga tcgaccaga aaatgatgaa actaagtacg gaccgatctt ccaaggacac 660
 gtcactatct ccgcggacac ttcatcaac accgtgtacc tccagtggag cagcttgaaa 720

gcctccgaca ccgtatgta ctactgtgcc ttccgcggag gagtctactg gggacagggg 780
 actactgtga ccgtgtcgtc caccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct 840
 accatgcct cccagcctct gtcctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg 900
 gccgtgata cccgggtct tgaattgcc tgcgatctct acatttgggc ccctctggct 960
 ggtacttgcg gggctcctgt gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg 1020
 aagaagctgc tgtacatctt taagcaacc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag 1080
 gaggacggct gttcatgcc gttccagag gaggaggaag gcggtgcga actgcgcgtg 1140

aaattcagcc gcagcgaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac 1200
 gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac 1260
 ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc 1320
 caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga 1380
 ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctgagcaccg ccaccaagga cacctatgac 1440
 gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg 1470

<210> 61

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 61

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu

20 25 30

Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
 35 40 45
 Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln
 50 55 60
 Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125
 Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
 165 170 175
 Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln
 180 185 190
 Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn
 195 200 205
 Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
 210 215 220
 Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys
 225 230 235 240
 Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
 260 265 270
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser

275 280 285
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 290 295 300
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala

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

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

 435 440 445
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 450 455 460
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

 <210> 62
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

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

polypeptide"

<400> 62

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

210 215 220

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245

<210> 63

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 63

gaaatccagc tcgtgcagag cggagccgag gtcaagaaac cgggtgctac cgtgaagatt	60
tcatgcaagg gatcgggctt caacatcgag gattactaca tccactgggt gcagcaggca	120
ccaggaaaag gacttgaatg gatgggccgg atcgaccggg aaaatgacga gactaagtac	180
ggccctatct tccaaggacg ggtgacgatc accgcagaca ctagcaccaa caccgtctat	240
atggaactct cgtccctgag gtccgaagat actgccgtgt actactgtgc gtttcgcgga	300
ggtgtgtact ggggacaggg taccaccgtc accgtgtcat cgggcggtgg aggctccggt	360
ggaggagggt caggaggcgg tggaagcgga ggaggcggca gcgacgtggt catgactcaa	420
tcgccgctgt cgctgccgt cactctggga caaccgcgt ccatcagctg caaatcctcg	480
cagtactgc ttgactcca tggaagacc tacctcaact ggctgcagca acgccaggc	540
caatcccaa gacgcctgat ctctgtgtg tcaaagctgg actcagggt gccggaccgg	600
ttctccggga gcgggtcggg cacggatttc actctcaaga tctccagagt ggaagccgag	660
gatgtgggag tctactactg ctggcaggga acccatttcc ctggaacttt tggcggagga	720
actaaggtcg agattaaa	738

<210> 64

<211> 831

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 64

atggccctcc ctgtcaccgc cctgtgtctt ccgttgctc ttctgtcca ccccgtcgg	60
cccgaatcc agctcgtgca gagcggagcc gaggtcaaga aaccgggtgc taccgtgaag	120
atttcatgca agggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtgcagcag	180
gcaccaggaa aaggacttga atggatgggc cggatcgacc cggaaaatga cgagactaag	240
tacggcccta tttccaagg acgggtgacg atcaccgcag aactagcac caacaccgtc	300
tatatggaac tctcgtccct gaggtccgaa gatactgccg tgtactactg tgcgtttcgc	360
ggaggtgtgt actggggaca gggatcacc gtcaccgtgt catcgggcgg tggaggctcc	420
ggtggaggag ggtcaggagg cggtggaagc ggaggaggcg gcagcgacgt ggtcatgact	480
caatcgccgc tctcgtgcc cgtcactctg ggacaacccg cgtccatcag ctgcaaatcc	540
tcgcagtcac tcttgactc cgtatgaaag acctacctca actggctgca gcaacgcca	600
ggccaatccc caagacgct gatctcgttg gtgtcaaagc tggactcagg ggtgccggac	660
cgtttctcgc ggagcgggtc gggcacggat ttactctca agatctccag agtggaaagc	720
gaggatgtgg gacttacta ctgttgccag ggaacccatt tccctggaac ttttgccgga	780
ggaactaagg tcgagattaa agggagccac catcatcatc accaccacca c	831

<210> 65

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 65

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

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

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

130 135 140

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

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile

195 200 205

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

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala

225 230 235 240

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly

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

His His His His His

275

<210

> 66

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 66

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgttgctc ttctgtcca cgcgctcgg	60
cccgaatcc agctgtgca gagcggagcc gaggtcaaga aaccgggtgc taccgtgaag	120
atttcatgca agggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtgcagcag	180
gcaccaggaa aaggacttga atggatgggc cggatcgacc cggaaaatga cgagactaag	240
tacggcccta tttccaagg acgggtgacg atcaccgcag aactagcac caacaccgtc	300

tatatggaac tctgtccct gaggtccgaa gatactgccg tgtactactg tgcgtttcgc	360
ggaggtgtgt actggggaca ggggtaccacc gtaccgtgt catcgggcgg tggaggtcc	420
ggtggaggag ggtcaggagg cgggtggaagc ggaggaggcg gcagcgacgt ggtcatgact	480
caatcgccgc tgtcgtgcc cgtcactctg ggacaacccg cgtccatcag ctgcaaatcc	540
tcgcagtca tcttgactc cgatggaaag acctacctca actggctgca gcaacgccc	600
ggccaatccc caagacgct gatctcgttg gtgtcaaagc tggactcagg ggtgccggac	660
cggttctccg ggagcgggtc gggcacggat ttactctca agatctccag agtggaaagc	720

gaggatgtgg gacttacta ctgtggcag ggaaccatt tccctggaac ttttgccgga	780
ggaactaagg tcgagattaa aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggtcct	840
accatcgct cccagcctct gtccctgct cggaggcat gtagaccgc agctggtggg	900
gccgtgcata cccgggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct	960
ggtacttgcc gggctcgtct gctttcactc gtgactcctc ttactgtaa gcgcggtcgg	1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacc ttcatgagc ctgtgcagac tactcaagag	1080
gaggacggct gttcatgccg gttccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg	1140

aaattcagcc gcagcgaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac	1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac	1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc	1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga	1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctacgaccg ccaccaagga cacctatgac	1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg	1470

<210> 67

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 67

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 Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile

195 200 205

Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
225 230 235 240

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly
245 250 255

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270

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

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
340 345 350

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

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

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

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
435 440 445

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

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

485 490

<210> 68

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 68

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser
 130 135 140
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser

145 150 155 160
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys
 180 185 190

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

<210> 69

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 69

gaaatccagc tggatgcagtc aggcgccgag gtcaagaagc cgggagagtc gctgagaatc 60
 tcgtgcaagg gctcgggggtt caacatcgag gactactaca ttacttggtt caggcagatg 120
 ccgggaaagg gactggaatg gatgggccgg atcgacccag aaaatgacga aaccaaatac 180
 ggcccgattt ttcaaggcca cgtgactatc agcgagaca cgagcatcaa cactgtctac 240
 ctccagtggg cctcgcttaa ggccagcgat accgctatgt actactgcgc attcagaggc 300
 ggggtgtact ggggacaagg aaccactgtg accgtgagca gcggaggtgg cggctcggga 360

ggaggtggga gcggaggagg aggttccggc ggtggaggat cagatgtcgt gatgaccag 420
 tccccggact cctcgctgt ctactgggc gagcgcgca ccatcaactg caaatcgagc 480
 cagtgcgtgt tggactcca tggaaagact tatctgaatt ggctgcaaca gaaaccagga 540
 caacctccca agcggctcat ctgcttgtg tcaaaactcg attcgggagt gccagaccgc 600
 ttctcggggg ccgggagcgg aactgacttt actttgacca ttctctact gcaagcggag 660

gatgtggcgc tgiattactg ttggcagggc acgcatttcc ctggaacctt cgggtggcggg 720
actaaggtgg aaatcaag 738

<210> 70

<211> 834

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 70

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgttggtc ttctgtcca cgcgctcgg 60
cccgaatcc agctggtgca gtcaggcgcc gaggtcaaga agccgggaga gtcgctgaga 120
atctcgtgca agggctcggg gttcaacatc gaggactact acattcactg ggtcaggcag 180
atgccgggaa agggactgga atggatgggc cggatcgacc cagaaaatga cgaaacaaaa 240
tacgggccga tttttcaagg ccacgtgact atcagcgag acacagagcat caacactgtc 300

tacctccagt ggtcctcgt taagccagc gataccgcta tgtactactg cgcattcaga 360
ggcgggggtgt actggggaca aggaaccact gtgaccgtga gcagcggagg tggcggctcg 420
ggaggaggtg ggagcggagg aggaggttcc ggcggtggag gatcagatgt cgtgatgacc 480
cagtccccgg actccctcgc tgtctcactg ggcgagcgcg cgaccatcaa ctgcaaatcg 540
agccagtgcg tgttgactc cgatggaaaag acttatctga attggctgca acagaaacca 600
ggacaacctc ccaagcggt catctcgtt gtgtcaaac tcgattcggg agtgccagac 660
cgcttctcgg ggtccgggag cggaactgac ttactttga ccatttctc actgcaagcg 720

gaggatgtgg ccgtgtatta ctgttggcag ggcacgcatt tccctggaac cttcgtggc 780
ggaactaagg tggaatcaa gggatcacac caccatcatc accatcacca ccat 834

<210> 71

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 71

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

245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His
 260 265 270
 His His His His His His

275

<210> 72

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 72

atggccctcc ctgtaccgc cctgtctgtt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg 60
 cccgagattc agctctgca atcgggagcg gaagtcaaga agccaggaga gtccttgcgg 120
 atctcatgca agggtagcgg ctttaacatc gaggattact acatccactg ggtgaggcag 180
 atgccgggga agggactcga atggatggga cggatcgacc cagaaaacga cgaaactaag 240
 tacgggccga tcttccaagg ccatgtgact attagcgccg atacttcaat caataccgtg 300

tatctgcaat ggtcctcatt gaaagcctca gataccgca tgtactactg tgctttcaga 360
 ggaggggtct actggggaca gggaactacc gtgactgtct cgtccggcgg aggcgggtca 420
 ggaggtggcg gcagcggagg aggagggctc ggcgagggtg ggtccgacgt cgtgatgacc 480
 cagagccctg acagcctggc agtgagcctg ggcgaaagag ctaccattaa ctgcaaatcg 540
 tcgcagagcc tgctggactc ggacggaaaa acgtacctca attggctgca gcaaaagcct 600
 ggccagccac cgaagcgctt tatctcactg gtgtcgaagc tggattcggg agtgcccgat 660
 cgcttctccg gctcgggata ggggtactgac ttcacctca ctatctctc gcttcaagca 720

gaggacgtgg ccgtctacta ctgtggcag ggaaccact ttccgggaac cttcggcgga 780
 gggacgaaag tggagatcaa gaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct 840
 accatcgctt cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg 900
 gccgtgcata cccggggctt tgacttcgcc tgcgatctt acatttgggc ccctctggct 960
 ggtacttgcc gggctcctgt gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg 1020
 aagaagctgc tgtacatctt taagcaacc ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag 1080

gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg 1140

aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac 1200

gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac 1260

ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc 1320

caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattgta tgaaaggga acgcagaaga 1380

ggcaaaggcc acgacggact gtaccagga ctcagcacccg ccaccaagga cacctatgac 1440

gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg 1470

<210> 73

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 73

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 Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe

35 40 45

Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys

65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

85 90 95

Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr

100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

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

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

435 440 445
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 450 455 460
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490

<210> 74

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 74

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

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

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

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

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

<210> 75

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 75

gacgtggtga tgaccaatc gccagattcc ctggcagtgt ccctgggcga acgcgccact

60

attaactgca aatcgtcaca gtccttgctt gattccgacg gaaagaccta cctcaattgg 120
ctccagcaga agccaggaca accgccaag agactgatct ccctgggtgc aaagctggac 180
tcgggagtgc ctgatcggtt ctgggtagc gggagcggca ccgacttcac tctgaccatc 240
tcgtcactcc aggctgagga cgtggccgtg tattactgtt ggaggggtac tcactttccg 300
ggcactttcg gaggcggcac caaggtggag attaaaggag gaggcggaag cggaggtgga 360

ggatcgggag gtggtgggag cggcggagga gggagcgaga tccagctcgt ccaatcgga 420
gcggaagtga agaagcccgg agagtcactt agaatctcat gcaaggggtc gggttcaac 480
atcgaggatt actacatcca ttgggtccgc cagatgcctg gtaaaggact ggaatggatg 540
gggaggattg acccgaaaa cgacgaaact aagtacggac cgatctttca agggcacgtg 600
actatctccg ctgatactc aatcaatact gtctacctcc agtggctctc gctgaaagca 660
agcgacaccg cgatgtacta ctgcgccttc cggggaggag tgtactgggg ccaaggcacc 720
acggtcacgg tcagctcc 738

<210> 76

<211> 834

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 76

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgcgctcgg 60
cccagctgg tgatgaccca atcgccagat tccctggcag tgtccctggg cgaacgcgc 120
actattaact gcaaactgtc acagtccttg ctgtattccg acggaagac ctacctaat 180
tggtccagc agaagccagg acaaccgcca aagagactga tctccctggt gtcaaagctg 240
gactcgggag tgcctgatcg gttctcgggt agcgggagcg gcaccgactt cactctgacc 300

atctcgtcac tccaggctga ggacgtggcc gtgtattact gttggcaggg tactcacttt 360
ccgggcactt tcggaggcgg caccaaggtg gagattaaag gaggaggcgg aagcggaggt 420
ggaggatcgg gaggtgggtg gagcggcgga ggaggagcg agatccagct cgtccaatcg 480
ggagcggaag tgaagaagcc cggagagtca cttagaatct catgcaaggg gtcgggcttc 540
aacatcgagg attactacat ccattgggtc cgccagatgc ctggtaaagg actggaatgg 600
atggggagga ttgaccgga aaacgacgaa actaagtacg gaccgatctt tcaaggcac 660

gtgactatct ccgctgatac ctcaatcaat actgtctacc tccagtgggc ctgctgaaa 720

gcaagcgaca ccgcgatgta ctactgcgcc ttccggggag gagggtactg gggccaaggc 780

accacggtea cggtcagetc cggtcccat caccaccacc atcaccatca tcac 834

<210> 77

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 77

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu

20 25 30

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
165 170 175
Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln
180 185 190
Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn
195 200 205
Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
210 215 220
Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys
225 230 235 240
Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser His His His
260 265 270
His His His His His His
275

<210> 78

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 78

atggccctec ctgtaccgc cctgtctgtt ccgttggtc tctgtctcca cgccgtcgg	60
cccgactgg tgatgactca gtcgctgac tcgtggctg tgtcccttgg agagcgggcc	120
actatcaatt gcaagtcac ccagtcgtg ctggattccg acgggaaaac ctacctaat	180
tggctgcagc aaaaaccggg acagcctcca aagcggtca tcagcctgt gtccaagttg	240
gacagcggcg tgccagaccg cttctccgt tcgggaagcg gtactgattt cacgtgacc	300
atctcatccc tccaagcga ggatgtggca gtctactact gttggcaggg cagcatttt	360
ccgggcactt ttggaggagg gaccaaggtc gaaatcaagg gaggaggtg ctcgggcgga	420
ggaggctcgg gaggaggagg atcaggaggc ggtggaagcg agattcaact ggtccagagc	480

ggcgcagaag tcaagaagcc ggggtgaatcg ctacagaatct cgtgcaaagg atcgggattc 540
aacatcgagg actactacat tcaactgggtc agacaaatgc cgggcaaagg gctggaatgg 600
atggggagga tcgaccccca aaacgatgaa accaagtacg gaccaatctt ccaagggcac 660
gtgaccattt cggcggacac ctcaatcaac actgtgtacc tccagtggag ctacattaag 720

gccagcgata ccgcatgta ctattgcgtt ttccgcggag ggggtgtactg gggacagggc 780
actactgtga ccgtgtcatc caccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct 840
accatgcct cccagcctct gtccttgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg 900
gccgtgata cccggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct 960
gggtacttgcg gggctctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg 1020
aagaagctgc tgiacatctt taagcaacc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag 1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg 1140

aaattcagcc gcagcgaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac 1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac 1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc 1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaagggga acgcagaaga 1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctacgaccg ccaccaagga cacctatgac 1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg 1470

<210> 79

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 79

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu

20 25 30

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln

35 40 45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115

120

125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln

180

185

190

Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn

195

200

205

Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser

210

215

220

Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys

225

230

235

240

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

245

250

255

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala

260

265

270

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

275

280

285

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

290 295 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala

305 310 315 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

325 330 335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

340 345 350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

355 360 365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg

370 375 380
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn

385 390 395 400
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg

405 410 415
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro

420 425 430
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala

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

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

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

485 490

<210> 80

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 80

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Thr Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 81

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 81

gatgtggtca tgacgcagtc accactgtcc ctccccgtga cccttggaca gccagcgtcg	60
attagctgca agtcatccca atccctgctc gattcggatg gaaagaccta tctcaactgg	120
ctgcagcaaa gacccgggtca gagccctagg agactcatct cgttgggtgc aaagctggac	180
agcggagtgc cggaccggtt ttccggttcg ggatcgggga cggacttcac tctgaagatt	240
tcacgggtgg aagctgagga tgtgggagtg tactactgct ggcagggaac ccatttcctt	300
ggcacttttg gcggaggaac taaggtcgaa atcaaggag gaggtggctc gggaggaggc	360
ggatcgggcg gaggcgggag cggcggagga gggtccgaaa tccaacttgt ccagtcagga	420
gccgaagtga agaaaccggg agccaccgtc aaaatcagct gtaagggatc gggattcaat	480
atcgaggact actacatcca ctgggtgcag caagctccgg gcaaaggact ggagtggatg	540
gggcgcctcg acccagagaa cgacgaaacc aaatacggcc cgatcttcca agggcgggtg	600
accatcacgc cggacacctc aactaacact gtgtacatgg agctgagctc cctgcgctcc	660
gaagatactg cagtctacta ctgcgccttc cgcggtgggtg tgtactgggg acagggcacc	720
actgtgactg tcagctcg	738

<210> 82

<211> 831

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 82

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg	60
---	----

cccgatgtgg tcatgacgca gtcaccactg tccctccccg tgacccttgg acagccagcg 120
tcgattagct gcaagtcacg ccaatccctg ctcgattcgg atggaaagac ctatctcaac 180
tggctgcagc aaagaccggt tcagagccct aggagactca tctcgttggg gtcaaagctg 240
gacagcggag tgccggaccg gttttccggt tcgggatcgg ggacggactt cactctgaag 300

atttcacggg tggaagctga ggatgtggga gtgtactact gctggcaggg aaccatttc 360
cctggcactt ttggcggagg aactaaggtc gaaatcaagg gaggaggtgg ctcgggagga 420
ggcggatcgg gcggaggcgg gagcggcgga ggagggtccg aaatccaact tgtccagtca 480
ggagccgaag tgaagaaacc gggagccacc gtcaaatca gctgtaaggg atcgggattc 540
aatatcgagg actactacat ccactgggtg cagcaagctc cgggcaaagg actggagtgg 600
atggggcgca tcgaccaga gaacgacgaa accaaatag ccccgatctt ccaagggcgg 660
gtgaccatca ccgcggacac ctcaactaac actgtgtaca tggagctgag ctccctgcgc 720

tccgaagata ctgcagtcta ctactgcgc ttcgcggtg gtgtgtactg gggacagggc 780
accactgtga ctgtcagtc ggggtccac catcatcacc accaccatca c 831

<210> 83

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 83

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln

180 185 190

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr

245 250 255

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

260 265 270

His His His His His

275

<210

> 84

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 84

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc tctgtctcca cgccgtcgg	60
cccgatgtgg tcatgacga gtcaccactg tccctccccg tgacccttgg acagccagcg	120
tcgattagct gcaagtcatc ccaatccctg ctcgattcgg atggaaagac ctatctcaac	180
tggctgcagc aaagaccggg tcagagccct aggagactca tctcgttggg gtcaaagctg	240
gacagcggag tgccggaccg gttttccggg tcgggatcgg ggacggactt cactctgaag	300
atttcacggg tggaagctga ggatgtggga gtgtactact gctggcaggg aacccatttc	360
cctggcactt ttggcggagg aactaaggtc gaaatcaagg gaggaggtgg ctccgggagga	420
ggcggatcgg gcggaggcgg gagcggcgga ggagggtccg aaatccaact tgtccagtca	480
ggagccgaag tgaagaaacc gggagccacc gtcaaaatca gctgtaaggg atcgggattc	540
aatatcgagg actactacat ccactgggtg cagcaagctc cgggcaaagg actggagtgg	600
atggggcgca tcgaccaga gaacgacga accaaatag gcccgatctt ccaagggcgg	660
gtgaccatca ccgcggacac ctcaactaac actgtgtaca tggagctgag ctccctgcgc	720
tccgaagata ctgcagtcta ctactgcgc ttcgcgggtg gtgtgtactg gggacagggc	780
accactgtga ctgtcagctc gaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct	840
accatgcct cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg	900
gccgtgcata cccgggtct tgaattcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct	960
ggtacttgcg gggctctgt gctttcactc gtgatactc tttactgtaa gcgcggtcgg	1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag	1080
gaggacggct gttcatgccg gttccagag gaggaggaag gcggtgcga actgcgcgtg	1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac	1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac	1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc	1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaagggga acgcagaaga	1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctgagcaccg ccaccaagga cacctatgac	1440
gtctttcaca tgcaggccct gccgcctcgg	1470

<210> 85

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 85

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln

180 185 190

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn

195 200 205

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

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

485 490

<210> 86

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 86

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

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

Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val
 130 135 140
 Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

145 150 155 160
 Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
 165 170 175
 Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 180 185 190

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

<210> 87

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 87

atggccctcc ctgtaccgc cctgtctgtt ccgttggtc ttctgtcca cgccgtcgg	60
cccgagatcc agctccaaca gagcggagcc gaactggtca aaccgggagc gtcggtgaag	120
ttgtcatgca ctggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtcaagcaa	180
cgcaccgagc aggggctgga atggatcgga cggatcgacc ccgaaaacga tgaaaccaag	240
tacgggccta tcttccaagg acgggccacc attacggctg acacgtcaag caataccgtc	300
tacctccage ttccagcct gacctccgag gacactgccg tgtactactg cgccttcaga	360
ggaggcgtgt actggggacc aggaaccact ttgaccgtgt ccagcggagg cggatggatca	420
ggaggaggag gctcaggcgg tggcggctcg cacatggacg tggatcatgac tcagtccccg	480
ctgacctgt cggtggcaat tggacagagc gcatccatct cgtgcaagag ctcacagtgc	540
ctgtctggatt ccgacggaaa gacttatctg aactggctgc tccaaagacc agggcaatca	600
ccgaaacgcc ttatctcct ggtgtcgaaa ctgcactcgg gtgtgccgga tcggtttacc	660

ggtagcgggt ccggcacgga cttcactctc cgcatttcga gggtaggaagc ggaggatctc 720
 ggatctact actgttggca gggaaccac ttccctggga cttttggagg cggaactaag 780

ctggaaatca aggtagcca tcaccatcac caccaccatc at 822

<210> 88
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 88

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 Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 20 25 30

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

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

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

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

His His

<210> 89

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 89

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgttggtc tctgtctcca cgccgtctcg	60
cccgagatcc agctccaaca gagcggagcc gaactggtca aaccgggagc gtcggtgaag	120
ttgtcatgca ctggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtcaagcaa	180
cgcaccgagc aggggctgga atggatcgga cggatcgacc ccgaaaacga tgaaaccaag	240
tacgggccta tcttccaagg acgggccacc attacggctg acacgtcaag caataccgtc	300
tacctccagc tttccagcct gacctccgag gacactgccg tgtactactg cgccttcaga	360
ggaggcgtgt actggggacc aggaaccact ttgacctgtt ccagcggagg cgggtgatca	420
ggaggaggag gctcaggcgg tggcggctcg cacatggacg tggatcatgac tcagtccccg	480

ctgaccctgt cggtaggcaat tggacagagc gcatccatct cgtgcaagag ctacacagtcg 540
ctgctggatt ccgacggaaa gacttatctg aactggctgc tccaaagacc agggcaatca 600
ccgaaacgcc ttatctccct ggtgtcgaaa ctgactcgg gtgtgccgga tcggtttacc 660
ggtagcgggt ccggcacgga cttcactctc cgcatttcga gggtggaagc ggaggatctc 720
gggatctact actgttggca gggaaccac ttcctggga cttttggagg cggaactaag 780
ctggaaatca agaccactac cccagcaccg aggccacca ccccggtcc taccatgcc 840

tcccagcctc tgtccctgcg tccggaggca ttagacccg cagctggtgg ggccgtgcat 900
acccggggtc ttgacttcg ctgcgatatc tacatttggg cccctctggc tggacttgc 960
ggggtcctgc tgctttcact cgtgatcact ctttactgta agcgcggtcg gaagaagctg 1020
ctgtacatct ttaagcaacc cttcatgagg cctgtgcaga ctactcaaga ggaggacggc 1080
tgttcatgcc ggttccaga ggaggaggaa ggcggctgcg aactgcgct gaaattcagc 1140
cgcagcgag atgctccagc ctacaagcag ggcagaaacc agctctaca cgaactcaat 1200
cttggtcgga gagaggagta cgacgtgctg gacaagcgga gaggacggga cccagaaatg 1260

ggcgggaagc cgcgcagaaa gaatcccaa gagggcctgt acaacgagct ccaaaaggat 1320
aagatggcag aagcctatag cgagattggt atgaaagggg aacgcagaag aggcaaaggc 1380
cacgacggac tgtaccaggg actcagcacc gccaccaagg acacctatga cgctcttcac 1440
atgcaggccc tgccgctcg g 1461

<210> 90

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 90

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

50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys

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

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

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

 260 265 270
 Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
 275 280 285
 Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
 290 295 300

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 305 310 315 320
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly

325 330 335
 Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 340 345 350
 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 355 360 365
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 370 375 380
 Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn

385 390 395 400
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 405 410 415
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 420 425 430
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 435 440 445
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu

450 455 460
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 465 470 475 480
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 91

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr
100 105 110

Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Val
115 120 125

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp
145 150 155 160

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

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

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Ser Ser
210 215 220

Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

<210> 92

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 92

gatatccaaa tgactcagag cccctcatcc ctgagcgcca gcgtcggaga cagggtgacc 60

atcacgtgcc gggcatccca aggcattaga aataacttgg cgtggtatca gcaaaaacca 120

ggaaaggccc cgaagcgctt gatctacgcg gcctccaacc ttcagtcagg agtgcctcgc 180

cgcttcaccg ggagcggtag cggaaactgag ttaccctta tcgtgtcgtc cctgcagcca 240

gaggacttcg cgacctacta ctgcctccag catcactcgt acccgttgac ttcgggaggc 300

ggaaccaagg tcgaaatcaa acgcactggc tcgacgtcag ggtccggtaa accgggatcg 360

ggagaaggat cggaagtcca agtgctggag agcggaggcg gactcgtgca acctggcggg 420

tcgctcgggc tcagctgtgc cgcgtcgggt ttactttca gctcgtacgc tatgtcatgg 480

gtgcggcagg ctccgggaaa ggggctggaa tgggtgtccg ctatttcggg ctcggttgga 540

agcaccaatt acgccgactc cgtgaaggga cgcttcacca tctcacggga taactccaag 600

aatactctgt acctccagat gaactcgtg agagccgagg acaccgcagt gtactactgc 660

gcagggtcaa gcggctggtc cgaatactgg ggacagggca cctcgtcac tgtcagctcc 720

<210> 93

<211> 807

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 93

atggccctcc ctgtaccgc cctgtctgtt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg 60

cccgatatcc aaatgactca gagcccttca tcctgagcg ccagcgtcgg agacagggtg 120

accatcacgt gccgggcac ccaaggcatt agaataaact tggcgtggta tcagcaaaaa 180

ccaggaaagg cccgaagcg cctgatctac gcggcctcca accttcagtc aggagtcccc 240

tcgcgttca ccgggagcgg tagcggaact gagtttacc ttatcgtgtc gtccctgcag 300

ccagaggact tcgcgaccta ctactgcctc cagcatcact cgtaccggtt gacttcggga 360
ggcggaaacca aggtcgaaat caaacgcact ggctcgacgt cagggtccgg taaaccggga 420
tcgggagaag gatcggaagt ccaagtgtg gagagcggag gcggactcgt gcaacctggc 480

gggtcgctgc ggctcagctg tgccgcgtcg ggttttactt tcagctcgta cgctatgtca 540
tgggtcgggc aggtccggg aaaggggctg gaatgggtgt ccgctatttc cggtcgggt 600
ggaagcacca attacgccga ctccgtgaag ggacgcttca ccatctcacg ggataactcc 660
aagaatactc tgiacctca gatgaactcg ctgagagccg aggacaccgc agtgtactac 720
tgcgcagggt caagcggctg gtccgaatac tggggacagg gcaccctcgt cactgtcagc 780
tcccatcacc atcaccacca ccatcac 807

<210> 94

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 94

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His

100 105 110

His Ser Tyr Pro Leu Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

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

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

145 150 155 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser

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

180 185 190
Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser

195 200 205
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu

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

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

245 250 255
Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His

260 265

<210> 95

<211> 1452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 95

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60

cccgatatcc aaatgactca gagcccttca tccctgagcg ccagcgctcg agacagggtg 120

accatcacgt gccgggcatc ccaaggcatt agaaataact tggcgtggta tcagcaaaaa 180

ccaggaaagg cccgaagcg cctgatctac gcggcctcca accttcagtc aggagtgcc 240
 tcgcgcttca cgggagcgg tagcggaact gagtttacc ttatcgtgtc gtccctgcag 300
 ccagaggact tcgcgacct ctactgcctc cagcatcact cgtaccctgt gacttcggga 360
 ggcggaacca aggtcgaaat caaacgcact ggctcgacgt cagggtccgg taaaccggga 420
 tcgggagaag gatcggaagt ccaagtgtg gagagcggag gcggactcgt gcaacctggc 480
 gggctcgtgc ggctcagctg tgcccgctcg ggttttactt tcagctcgta cgctatgtca 540
 tgggtgcggc aggtccggg aaaggggctg gaatgggtgt ccgctatttc cggctcgggt 600

ggaagcacca attacccga ctccgtgaag ggacgcttca ccatctcac ggataactcc 660
 aagaatactc tgiacctca gatgaactcg ctgagagccg aggacaccgc agtgtactac 720
 tgcgcagggt caagcggctg gtccgaatac tggggacagg gcaccctcgt cactgtcagc 780
 tccaccacta cccagcacc gaggccacc acccggctc ctaccatgc ctccagcct 840
 ctgtccctgc gtccggaggc atgtagacc gcagctggtg gggccgtgca taccgggggt 900
 cttgacttcg cctgcgatat ctacatttg gccctcttg ctggtacttg cggggtcctg 960
 ctgctttcac tcgtgatcac tctttactgt aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc 1020

ttaagcaac ccttcatgag gcctgtgcag actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc 1080
 cggttcccag aggaggagga aggcggctgc gaactgcgcg tgaattcag ccgcagcgca 1140
 gatgtccag cctacaagca ggggcagaac cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg 1200
 agagaggagt acgacgtgt ggacaagcgg agaggacggg acccagaaat gggcggaag 1260
 ccgcgcagaa agaattccca agagggcctg tacaacgagc tccaaaagga taagatggca 1320
 gaagcctata gcgagattgg tatgaaagg gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga 1380
 ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag gacacctatg acgtcttca catgcaggcc 1440

ctgccgcctc gg 1452

<210> 96

<211> 484

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 96

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30

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

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

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

 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 245 250 255
 Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro

260 265 270
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
275 280 285

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

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

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
420 425 430
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
435 440 445
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
450 455 460
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
465 470 475 480

Leu Pro Pro Arg

<210> 97

<211> 1183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 97

gtgaggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga ggcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt	60
ggggggagggt gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga	120
aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccagggtt gggggagaaac cgtatataag	180
tgcagtagtc gccgtgaacg ttcttttttcg caacgggttt gccgccagaa cacaggttaag	240
tgccgtgtgt ggttcccgcg ggcctggcct ctttacgggt tatggccctt gcgtgccttg	300
aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg	360
gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agccccttcg cctcgtgctt gaggtaggc	420
ctggcctggg cgtcggggcc gccgcgtgcg aatctggttg caccttcgcg cctgtctcgc	480
tgctttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt	540
ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggtatgt cggtttttgg	600
ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tggtcggcga ggcggggcct	660
gcgagcgagg ccaccagaaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt	720
gcctggcctc gcgcccggt gtatgcgcc gccctgggag gcaaggctgg cccggctggc	780
accagttcgc tgagcgaaa gatggccgt tcccggccct gctgcaggga gctcaaaatg	840
gaggacgagg cgtcgggag agcgggagg tgagtcaccc acacaaagga aaagggcctt	900
tccgtcctca gccgtcgtt catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct	960
cgattagtgc tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc	1020
gatggagttt cccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat	1080
gtaattctcc ttggaatttg ccttttttga gtttggatct tggttcattc tcaagcctca	1140
gacagtgggt caaagttttt ttcttcatt tcaggtgtcg tga	1183

<210> 98

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 98

gagatccagc tccaacagag cggagccgaa ctggtcaaac cgggagcgtc ggtgaagttg	60
tcatgctactg gatcgggctt caacatcgag gattactaca tccactgggt caagcaacgc	120
accgagcagg ggctggaatg gatcggacgg atcgaccccg aaaacgatga aaccaagtac	180
gggcctatct tccaaggacg ggccaccatt acggtgaca cgtcaagcaa taccgtctac	240
ctccagcttt ccagcctgac ctccgaggac actgccgtgt actactgcgc cttcagagga	300
ggcgtgtact ggggaccagg aaccactttg accgtgtcca gcggaggcgg tggatcagga	360
ggaggaggct caggcgggtg cggctcgac atggacgtgg tcatgactca gtccccgctg	420
accctgtcgg tggcaattgg acagagcgca tccatctcgt gcaagagctc acagtcgctg	480
ctggattccg acggaaagac ttatctgaac tggctgctcc aaagaccagg gcaatcacgc	540
aaacgcctta tctccctggt gtcgaaactc gactcgggtg tgccggatcg gtttacgggt	600
agcgggtccg gcacggactt cactctccgc atttcgaggg tggaagcgga ggatctcggg	660
atctactact gttggcaggg aaccacttc cctgggactt ttggaggcgg aactaagctg	720
gaaatcaag	729

<210> 99

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

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

85

90

95

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

100

105

110

<210> 100

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 100

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

cgggacccgt agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac caggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 101

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 101

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys

1

5

10

<210> 102

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 102

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

<210> 103

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 103

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc cgcgcgcccc 60

gggccccacc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 104

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 104

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys Met
225 230

<210> 105

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 105

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggaccc

60

agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag 120

gtgacctgtg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac 180

gtggacggcg tggaggtgca caacccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240

acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300

tacaagtgtg aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360

gccaagggcc agcctcggga gccccagggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg 420

accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 480

gtggagtggg agagcaacgg ccagccccgag aacaactaca agaccacccc cctgtgtctg 540

gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag cgggtggcag 600

gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag 660

aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690

<210> 106

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 106

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys

35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
100 105 110

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
130 135 140

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
210 215 220

Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
225 230 235 240

Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
260 265 270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
275 280

<210> 107

<211> 847

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 107

agggtggcccg aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gcccaggca 60
gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc 120
ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc 180
cctgaatgtc catccatac ccagccgtg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag 240

gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag 300
gatgcccatt tgacttggga gggtgccgga aaggtagcca caggggggggt tgaggaaggg 360
ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac cttccgaga 420
tcctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcactctag cctgccccca 480
cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccagggcac cagttaagct tagcctgaat 540
ctgctcgcca gtagtgatcc ccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc 600
tttagccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc 660

ggcttcgctc cagcccgccc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggcctggagt 720
gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc 780
catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggttcc ctacgtgact 840
gaccatt 847

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 108

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 109

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 109

ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30

<210> 110

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223>

> /note="This sequence may encompass 1, 2, 3, 4, 5, or 6 'Gly Gly Gly Gly Ser' repeating units"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(30)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> /note="See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments"

<400> 110

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 111

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 111

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 150

<210> 112

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 112

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 113

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 114

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 114

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 115

<211> 5000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5000)

<223> /note="This sequence may encompass between 50 and 5,000 nucleotides"

<220><221> variation

<222> (51)..(5000)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5000)

<223> /note="Variant bases given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(5000)

<223> /note="See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments"

<400> 115

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3660
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3720
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000
<210> 116	
<211> 2000	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	

```

<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2000)
<223> /note="This sequence may encompass between 50 and 2,000
        nucleotides"
<220><221> variation
<222> (51)..(2000)
<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2000)
<223> /note="Variant bases given in the sequence have no
        preference with respect to those in the annotations
        for variant positions"
<400> 116
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      240

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      480
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      540
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      600
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      660

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      720
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1080

```

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2000

<210> 117

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 117

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 100

<210> 118

<211> 5000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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


```

        polynucleotide"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(5000)
<223> /note="This sequence may encompass between 50 and 5,000
        nucleotides"
<220><221> variation
<222> (51)..(5000)
<223> /replace=" "
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(5000)
<223> /note="Variant bases given in the sequence have no
        preference with respect to those in the annotations
        for variant positions"

<400> 118
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      60
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      120
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      180
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      240
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      300
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      360
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      420

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      480
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      540
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      600
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      660
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      720
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      780
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      840

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      900
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      960
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt     1020
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt     1080

```

[illegible]

[illegible]

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4680
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4740
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4800
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4860
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4920
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4980
tttttttttt tttttttttt	5000

<210> 119

<211> 5000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5000)

<223> /note="This sequence may encompass between 100 and 5,000
nucleotides"

<220><221> variation

<222> (101)..(5000)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5000)

<223> /note="Variant bases given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<400> 119

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360

[illegible]

[illegible]

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000

<210> 120

<211> 400

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(400)

<223> /note="This sequence may encompass between 100 and 400
nucleotides"

<220><221> variation

<222> (101)..(400)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(400)

<223> /note="Variant bases given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(400)

<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	400

<210> 121

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 121

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Ile Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ile Ile Ile Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Gly Ile Arg Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

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

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile
85 90 95

Val Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

His His Ser Tyr Pro Leu Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Phe Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu
130 135 140

Gly Ser Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
145 150 155 160

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
165 170 175

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
180 185 190

Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp
195 200 205

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
210 215 220

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
260 265 270

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

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

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

 Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 340 345 350
 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 355 360 365
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 370 375 380
 Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 385 390 395 400

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

 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 465 470 475 480
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

 <210> 122
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 122
 Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Ser Ser

<210> 123

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 123

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

85 90 95
Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 124

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 124

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

<210> 125

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 125

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

1 5 10 15

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

<210> 126

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 126

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

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

85 90 95
 Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 127

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 127

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

20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95
 Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110