



등록특허 10-2509562



(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\*

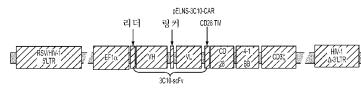
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 23 항

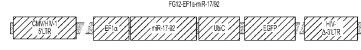
심사관 : 신영신

(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 세 (뒷면에 계속)

**대 표 도**

도 1a



도 1b

포를 투여하는 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 펜실베니아주 메리온 스테이션 베어드  
로드409

**뢰브, 안드레아스**

미국 02143 매사추세츠주 소머빌 아파트먼트 #9 바  
우 스트리트 50

**마우스, 마셀라**

미국 19010 펜실베니아주 브린 모어 하빌랜드 드라  
이브705

**솔러, 존**

미국 19072 펜실베니아주 나버스 길핀 로드 410

**오카다, 히데호**

미국 15206 펜실베니아주 피츠버그 비치우드 불러  
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 RIDPENDETKEYGPIFQG (서열 23)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 RGGVY (서열 24)를 포함하는 CDR3을 포함하고,

##### (b) 경쇄 가변 영역이

- (i) 서열 KSSQSLLSDGKTYLN (서열 26)을 포함하는 CDR1;
- (ii) 서열 LVSKLDS (서열 27)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 WQGTHFPGT (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 쇄, CD28, CD3 앱실론, 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 뉴클레오티드 서열, 또는 그와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 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 폴리펩티드 쇄로서 발현되거나; 또는

(vi) 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 분자가 서열 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 그와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열; 또는 서열 10 또는 서열 100의 뉴클레오티드 서열, 또는 그와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 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 RIDPENDETKEYGPIFQG (서열 23)를 포함하는 CDR2; 및

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

## (b) 경쇄 가변 영역이

- (i) 서열 KSSQSLLSDGKTYLN (서열 26)을 포함하는 CDR1;
- (ii) 서열 LVSKLDS (서열 27)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 WQGTHFPGT (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 RIDPENDETKEYGPIFQG (서열 23)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 RGGVY (서열 24)를 포함하는 CDR3을 포함하고,

## (b) 경쇄 가변 영역이

- (i) 서열 KSSQSLLSDGKTYLN (서열 26)을 포함하는 CDR1;
- (ii) 서열 LVSKLDS (서열 27)를 포함하는 CDR2; 및
- (iii) 서열 WQGTHFPGT (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 백터이며,

- (i) 백터가 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 및 레트로바이러스 백터로 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 펩지교종, 역형성 상의 세포종, 맥락총 암종, 역형성 신경절교종, 송파체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/횡문근양 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 펩지교종, 역형성 상의세포종, 맥락총 암종, 역형성 신경절교종, 송파체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/횡문근양 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 펩지교종, 역형성 상의세포종, 맥락총 암종, 역형성 신경절교종, 송파체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/횡문근양 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 펩지교종, 역형성 상의세포종, 맥락총 암종, 역형성 신경절교종, 송파체모세포 종, 수질상세포종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/횡문근양 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 펩지교종, 역형성 상의세포종, 맥락총 암종, 역형성 신경절교종, 송파체모세포 종, 수질상세포종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/횡문근양 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, 백터.

### 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, 이를 출원 각각의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

### 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.

### 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.

### 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; and Okada et al., 2011, J Clin Oncol 29:330-336). 그러나, 온전한 속주-면역 활성에 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 암 종에서 자주 검출되고 있다. EGF 수용체 유전자 내에서의 자발적인 재배열이 원발성 인간 교모세포종 종양에서

처음으로 확인되었고, 거의 모든 종례에서 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 뉴클레오티드 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 다행성 교모세포종 (GBM)을 포함한 많은 종양 유형에서 관찰되었지만, 정상 조직에서는 거의 관찰되지 않는다. EGFRvIII은 GBM 종례의 24% 내지 67%에서 발현되고, ≥1년 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 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 (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub> 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 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 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 신호전달 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 도메인을 포함한다.

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  $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_n$  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  $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_n$  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 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 쇄로서 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 CDR3를 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 차극 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 (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub> 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, 백터는 시험관내 전사된 백터, 예를 들어 본원에 기재된 핵산 분자의 RNA를 전사하는 백터이다. 한 실시양태에서, 백터 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, 백터 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 백터를 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 백터로 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 세포내로 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 정후)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 펩지교종, 역형성 상의세포종, 맥락종 암종, 역형성 신경절교종, 송과체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 비정형 기형양/횡문근양 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 백터, 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 강건한 치료 효과를 도시하는 영상이다.

도 5a 내지 5c는 CAR-T 세포에서 공동-형질도입된 miR-17-92가 재-시험감염된 신경교종 세포에 대항하여 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 특이 적이고도 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 지정되기도 함) 및 클론 74 (CAR7로서 지정되기도 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 (cm<sup>3</sup>, 상단 좌측 패널), 및 종양 방사휘도 (radiance) 평균 (p/s/cm<sup>3</sup>/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 초과의 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 포함하는 것을 의미하는데, 이는 이러한 변동이 본원에 개시된 방법을 수행하는 데 적당하기 때문이다.

[0052]

용어 "키메라 항원 수용체" 또는 다른 한편으론 "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 쇄이다. 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 세포외 항원 인식 도메인; 막횡단 도메인; 및 자극성 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포외 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 세포외 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 세포외 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 세포외 항원 인식 도메인의 N-말단에서 리더 서열을 추가로 포함하며, 이러한 리더 서열은 세포성 막에 대한 CAR의 세포성 프로세싱 및 국재화 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 액손 2-7의 프레임내 결실로부터 비롯되고, EGFR의 세포외 도메인 내의 액손 1과 8의 연접부에 신규 글리신 잔기가 생성됨으로써, 종양 특이적 에피토프가 창출된다. EGFRvIII은 GBM의 24% 내지 67%에서 발현되지만, 정상 조직에서는 그렇지 않다. EGFRvIII은 유형 III 돌연변이체, 엘타-EGFR, EGFRde2-7, 및  $\Delta$ EGFR로서 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 쇄, 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')<sub>2</sub>, 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 경쇄의 가변 영역을 포함하는 하나 이상의 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 지칭하는데, 상기 경쇄 및 경쇄 가변 영역은 짧은 가요성 폴리펩티드 링커를 통하여 연속적으로 연결되고, 단일 쇄 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), 단일 쇄 항체 (scFv) 및 인간화 항체를 포함한, 연속되는 폴리펩티드 쇄의 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 폴리펩티드 쇄 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 폴리펩티드 쇄 중 더 작은 것을 지칭한다. 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ ) 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 수득하였다.

[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 계놈 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 얹매이는 것은 아니지만, EGFRvIII에 대항한 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-암 성) 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- $\beta$ 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 웨티드가 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 뱃타, 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 엘타, CD3 앱실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d DAP10 및 DAP12로부터 유래된 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0076] 용어 "제타" 또는 또 다른 한편으론 "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 한편으론 "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, 중식이지만, 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, 이류노글로불린-유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린(integrin), 신호전달 램프구성 활성화 분자 (SLAM 단백질), 및 활성화 NK 세포 수용체. 이러한 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, 램프구 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 뉴클레오티드의 규정된 서열 (예를 들어, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 규정된 서열을 갖는 생물학적 과정 중의 기타 종합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 제공되는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA 내의 뉴클레오티드의 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 베전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이란 또한, 이러한 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 일부 베전에서 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, 폴라스미드 및 바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 수많은 벡터가 당해 분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "전이 벡터"는 자가 복제성 폴라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 세포 내로의 핵산의 전이를 촉진시키는 비-폴라스미드 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, 렌티바이러스성 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, 폴라스미드 (예를 들어, 있는 그대로의 폴라스미드 또는 리포솜에 함유된 폴라스미드) 및 바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노 관련 바이러스)를 포함한다.

[0089] 용어 "렌티바이러스"는 렌트로바리다에(Retroviridae)과의 한 속이다. 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 렌트로바이러스들 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 계놈의 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 문자, 예를 들어 두 핵산 문자, 예컨대 두 DNA 문자 또는 두 RNA 문자, 또는 두 폴리펩티드 문자 간의 소단위 서열 동일성을 지칭한다. 이러한 두 문자 모두에서의 소단위위치가 동일한 단량체성 소단위에 의해 점유된 경우; 예를 들어, 두 DNA 문자 각각에서의 위치가 아데닌에 의해 점유된 경우, 이들 문자는 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 매치되거나 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 이뮤노글로불린 쇄 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 종 (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 상태로부터의 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에서 자연적으로 존재하는 핵산 또는 웨티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그의 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된, 상기 동일한 핵산 또는 웨티드는 "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 이종 핵산 서열 간의 기능적 연쇄를 지칭하는데, 이로써 이종 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 판독 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 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 형태 또는 이종 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 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 자연 뉴클레오티드의 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 [Batter 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 "웨티드", "폴리웨티드" 및 "단백질"은 상호 교환적으로 사용되고, 웨티드 결합에 의해 공유적으로 연결된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 웨티드는 2개 이상의 아미노산을 함유해야만 하고, 단백질의 서열 또는 웨티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에 대한 제한은 없다. 폴리웨티드는 웨티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 어떠한 웨티드 또는 단백질도 포함한다. 본 원에 사용된 바와 같은 상기 용어는 단쇄 (이는 또한 당해 분야에서, 예를 들어 웨티드, 올리고웨티드 및 올리고미로서 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, 동종-이량체, 이종-이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 자연 웨티드, 재조합 웨티드, 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 웨티드 링커를 지칭한다. 한 실시양태에서, 가요성 폴리펩티드 링커는 Gly/Ser 링커이고, 아미노산 서열 (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> (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 (Gly4 Ser)4 (서열 113) 또는 (Gly4 Ser)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 m<sup>7</sup>G 캡으로 명명됨)은 전사의 개시 직후 전핵성 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 조정할 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 조정할 수 있다.
- [0109] 본원에 사용된 바와 같은, "폴리아데닐화"는 메신저 RNA 분자에 대한 폴리아데닐릴 부분 또는 그의 변형된 변이체의 공유적 연쇄를 지칭한다. 전핵 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 전핵생물에서는, 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 쇄는 RNA 중합효소와 연합된 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 안정한 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, 차도 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 뮤린 scFv 항체 단편이다. 또 다른 측면에서, CAR의 EGFRvIII 항원 결합 도메인은, 그것이 유래되는 scFv의 뮤린 서열과 비교해서 인간화되는 scFv 항체 단편이다. EGFRvIII에 대항하여 예시되는 모 뮤린 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, 뮤린 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 폴리펩티드가 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 헌지 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, 헌지, 막횡단 도메인, 및 세포내 자극 도메인을 포함한다. 한 측면에서, EGFRvIII CAR 구축물은 임의의 리더 서열, EGFRvIII과 특이적으로 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 헌지, 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. 뮤린 scFv 도메인을 함유하는 특이적 EGFRvIII CAR 구축물은 서열 1 및 서열 2에 제공된다.
- [0135] 예시되는 리더 서열은 서열 13으로서 제공된다. 예시되는 헌지/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 도메인은 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 구축물을 서열 42를 포함한다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 48이다. 한 측면에서, 핵산 구축물을 서열 54를 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물을 서열 60을 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물을 서열 66을 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물을 서열 72를 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물을 서열 78을 포함한다. 한 측면에서, 핵산 구축물을 서열 84를 포함한다.

[0138] 목적하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 당해 분야에 공지된 재조합 방법을 이용하여, 예컨대 예를 들어, 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브리리를 스크리닝하거나, 상기를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 유전자를 유도시키거나, 또는 표준 기술을 이용하여 상기를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 수득할 수 있다. 또 다른 한편으론, 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.

#### 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 조작함으로써 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 연접부를 포함한 14개 아미노산 웨პ티드 (LEEKKGNYVVTIDHC; 서열 101)로 면역시킴으로써 EGFRvIII에 대항하여 생성시켰는데, 야생형 EGFR과의 겸출 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 연접부 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; 이를 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다), 화장판 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; 이를 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):535-60]; [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]; 이를 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. 이를 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. 이를 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, 원터(Winter)와

그 동료의 방법 (문헌 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeven 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, 화장판 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 셔플링 (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), 쇄내 폴딩이 방지된다. 기능적 에피토프 결합 부위를 형성하기 위하여 상기 두 가변 영역을 합치기 위해서는 쇄간 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 초과의 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 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub> (서열 37) (여기서, n은 1 이상의 양성 정수이다)를 포함한다. 한 실시양태에서, 링커는 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>(서열 113) 또는 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> (서열 114)일 수 있다. 링커 길이 상의 변동은 활성을 보유하거나 증강시켜, 활성 연구에서 탁

월한 효능을 초래할 수 있다.

[0155] 안정성 및 돌연변이

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°C, 약 0.25°C, 약 0.5°C, 약 0.75°C, 약 1°C, 약 1.25°C, 약 1.5°C, 약 1.75°C, 약 2°C, 약 2.5°C, 약 3°C, 약 3.5°C, 약 4°C, 약 4.5°C, 약 5°C, 약 5.5°C, 약 6°C, 약 6.5°C, 약 7°C, 약 7.5°C, 약 8°C, 약 8.5°C, 약 9°C, 약 9.5°C, 약 10°C, 약 11°C, 약 12°C, 약 13°C, 약 14°C, 또는 약 15°C 초과하는 열 안정성을 갖는다.

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°C 또는 3°C 이상 개선될 수 있다. 한 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 통상적인 항체와 비교해서 1°C 개선된 열 안정성을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 항-EGFRvIII 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 통상적인 항체와 비교해서 2°C 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°C 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<sub>m</sub>을 측정할 수 있다. T<sub>m</sub>을 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<sub>m</sub>, 온도 변성 및 온도 응집과 같은 측정치를 이용하여 뮤린 scFv에 대항하여 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 챠린지 검정이다. "열 챠린지 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 활성을 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 챠린지시킬 수 있다. 이와 같이 챠린지된 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 융점 ( $T_m$ )을 측정함으로써 평가한다. 융점은 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. 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 ( $\Delta C_p$ )는 그의 열 전이 전 및 후의 조성물의 비열을 결정함으로써 측정한다. 열 안정성은 또한, 전개의 갑스(Gibbs) 자유 에너지 ( $\Delta G$ ), 전개의 엔탈피 ( $\Delta H$ ), 또는 전개의 엔트로피 ( $\Delta S$ )를 포함한 열역학적 안정성의 기타 파라미터를 측정 또는 결정함으로써 평가할 수 있다. 상기 생화학적 검정 중 한 가지 이상 (예를 들어, 열 챠린지 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

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 젤의 반고체 비드를 채우는데, 이는 이온과 소분자는 그의 내부 내로 허용하지만 대부분자는 그렇지 못하다. 단백질 조성물을 칼럼 상부에 적용하는 경우, 조밀하고 풀딩된 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 젤로부터 용출됨에 따라, 이러한 분획을 별개로 정량화할 수 있다 (예를 들어, 광 산란에 의해 수행된다). 따라서, 조성물의 % 응집은 특정 분획의 농도를, 젤에 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

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 플라스몬 공명을 이용한다. 표면 플라스몬 공명은, 예를 들어 비아코어(BIAcore) 시스템 [파마시아 바이오센서 AB (Pharmacia Biosensor AB; 스웨덴 옵살라 및 미국 뉴저지주 퍼스카타웨이)]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., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627]; [Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131]; 및 [Johnnson, 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 뉴클레오티드의 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 뉴클레오티드 (또는 10개 아미노산)인 영역 전반에 걸쳐, 또는 보다 바람직하게 길이가 100 내지 500개 또는 1000개 또는 그 초과의 뉴클레오티드 (또는 20, 50, 200개 또는 그 초과의 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. 디풀트 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 닉터 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 캡 길이 폐널티 및 4의 캡 폐널티를 이용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 흔입시킨 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 블로솜 (Blossom) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 캡 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 이용하여, GCG 소프트웨어 패키지 ([www.gcg.com](http://www.gcg.com)에서 입수 가능함) 내의 GAP 프로그램 내로 흔입시킨 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 세포외 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 쇄, CD28, CD3 앱실론, 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 헌지, 예를 들어 인간 단백질로부터의 헌지를 통하여, CAR의 세포외 영역, 예를 들어 CAR의 항원 결합 도메인에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 헌지는 인간 Ig (이뮤노글로불린) 헌지, 예를 들어 IgG4 헌지, 또는 CD8a 헌지일 수 있다. 한 실시양태에서, 헌지 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, 헌지 또는 스페이서는 IgG4 헌지를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 헌지 또는 스페이서는 다음 아미노산 서열의 헌지를 포함한다:

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW  
YVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
TISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TPPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM  
(서열 104).

[0190] 일부 실시양태에서, 헌지 또는 스페이서는 다음 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 헌지를 포함한다:

GAGACCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGGAGCTTCCTGGCCGG  
ACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGGCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGGA  
CCCCCGAGGTGACCTGTGTGGACGTGCTCCAGGAGGACCCGAGGTCCA  
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACACGCCAAGACCAAGCCCCGG  
GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA  
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCC  
AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG  
TGTACACCCCTGCCCTAGCCAAGAGGGAGATGACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGAC  
CTGCCTGGTAAGGGCTTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAAC  
GGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCAAGCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA  
GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA  
CGTCTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAACTACACCCAGAAGA  
GCCTGAGCCTGTCCCTGGCAAGATG (서열 105).

[0192] 한 측면에서, 헌지 또는 스페이서는 IgD 헌지를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 헌지 또는 스페이서는 다음 아미노산 서열의 헌지를 포함한다:

RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGEEKKEKEKEEQQERET  
 KTPECPSTSHTQPLGVYLLPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEAGKVPTG  
 GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTPRSLWNAGTSVTCTLNHPQLPQRLMALREPAQA  
 PVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG  
 STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH (서열 106).

[0194]

[0195]

일부 실시양태에서, 헌지 또는 스페이서는 다음 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 헌지를 포함한다:

AGGTGGCCGAAAGTCCCAGGCCAGGCATCTAGTGTCCACTGCACAGCCCCA  
 GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACCGCGCAATACT  
 GGCGTGGCGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAACAGGAAGA  
 GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGCGTCTATC  
 TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTACATGT  
 TTCGTCGTGGCTCTGACCTGAAGGATGCCATTGACTTGGAGGTTGCCGGAAA  
 GGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGGAGGCCATTCAATGGCTCT  
 CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTCCGAGATCCCTGGAACGCCGGACCTC  
 TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCACAGCGTCTGATGCCCTAG  
 AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTGCCAGTAGTG  
 ATCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTTTATGCGAAGTGTCCGGTTAGCCGCC  
 AACATCTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG  
 CTCCAGCCGGCCCCACCCAGCCGGTTCTACCACATTCTGGCCTGGAGTGTC  
 TTAAGGGTCCCAGCACACCTAGCCCCAGCCACATACACCTGTGTTGTC  
 CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTAGGAGTCTGGAGGTTCCACG  
 TGACTGACCATT (서열 107).

[0196]

[0197]

한 측면에서, 막횡단 도메인은 재조합할 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 GGGGSGGGS (서열 108)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (서열 109)의 뉴클레오티드 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 활성 또는 헬퍼 활성일 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 쇄를 사용하는 것이 필요하지 않다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 정도로, 이러한 절단된 부분은 온전한 쇄 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 일제히 개시하는 작용을 하는 공-수용체 및 T 세포 수용체 (TCR)의 세포질 서열뿐만 아니라 이를 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 엘타, 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 초과의 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 제타 쇄 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 초과의 공동자극성 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 5 또는 그 초과의 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 QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (서열 102)의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD27의 신호전달 도메인은 다음 핵산 서열에 의해 코딩된다:

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC  
GCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACCGCGACTTCGCA  
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 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) (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 단일 쇄 가변 도메인을 포함하는 세포외 영역; 헌지 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 결찰되는 유전자의 일부를 함유하는 것이다. 함께 결찰되는 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 계놈이 세포에서 안정적인 RNA 바이러스의 5' UTR일 수 있다. 다른 실시양태에서, mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 저연시키기 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 생성물을 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 전핵 세포에서의 발현에 적합하지 않은 장(long) 콘카타머성(concatameric) 생성물을 생성시킨다. 3' UTR의 말단에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사로 인해, 이것이 전사 후에 폴리아데닐화되는 경우에도 전핵성 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 문자 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 결찰 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 뉴클레오티드에서 300개 내지 400개 뉴클레오티드 (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 뉴클레오티드, 앱타머(aptamer) 및 기타 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 폴리(A) 중합효소를 이용하여 ATP 유사체를 폴리(A) 꼬리 내로 흔입할 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 뉴클레오텍터(Amaxa Nucleofector)-II (아막사 바이오 시스템즈 (Amaxa Biosystems; 독일 퀸른))], [ECM 830 (BTX) (하바드 인스트루먼츠 (Harvard Instruments; 미국 매사추세츠주 보스턴)))] 또는 유전자 펄서 (Gene Pulser) II [바이오래드 (BioRad; 미국 콜로라도주 덴버)], 다천공기 (Multiporator) [에펜도르트 (Eppendorf; 독일 함부르크)], 리포택션을 이용한 양이온성 리포솜 매개된 형질감염, 중합체 폐막화, 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).

### CAR을 코딩하는 핵산 구축물

[0233] 본 발명은 본원에 기재된 하나 이상의 CAR 구축물을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 한 측면에서, 이러한 핵산 분자는 예전저 RNA 전사체로서 제공된다. 한 측면에서, 핵산 분자는 DNA 구축물로서 제공된다.

[0234] 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 문자는 서열 79의 서열, 또는 그의 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0241] 목적하는 문자를 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 수득할 수 있다. 또 다른 한편으론, 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-1a (EF-1a)이다. 그러나, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 조기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV) 장 말단 반복 서열 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 앱스티안-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 프로모

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 결 수 있거나, 또는 발현이 요망되지 않는 경우에는 상기 발현을 끌 수 있는 문자 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 플랭킹하여 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 아세틸트랜스페라제, 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 수득할 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 가장 높은 수준의 발현을 나타내는 최소 5' 플랭킹 영역을 수반한 구축물이 프로모터로서 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고, 이를 사용하여 프로모터-구동된 전사를 조정할 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, 리포액션, 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 콜리이드성 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 이층 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 혼탁제로서 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 이층 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 발생되는 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 수득할 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 시그마 (Sigma; 미국 미주리주 세인트 루이스)로부터 수득할 수 있고; 디세틸 포스페이트 ("DCP")는 케이엔케이 라보라토리즈 (K & K Laboratories; 미국 뉴욕주 플레인뷰)로부터 수득할 수 있으며; 콜레스테롤 ("Choi")은 칼바이오켐-베링거(Calbiochem-Behring)로부터 수득할 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 기타 지질은 애반티 폴라 리피드, 인크. (Avanti Polar Lipids, Inc.; 미국 앤라배마주 버밍햄)로부터 수득할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질의 스톡 용액을 약 -20°C 하에 저장할 수 있다. 클로로포름이 유일한 용매로서 사용되는데, 이는 이것이 메탄올 보다 더 용이하게 증발되기 때문이다. "리포솜"은 봉입된 지질 이층 또는 응집체의 발생에 의해 형성된 각종 단일 및 다중막 지질 비히클을 포함하는 일반적 용어이다. 리포솜은 인지질 이층 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 혼탁되는 경우에 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 밀폐된 구조가 형성되기 전에 자가-재배열을 진행하고, 물과 용해된 용질을 지질 이층 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, 리포택타민-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 웨브 티드의 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 웨нт바이러스성 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.

## T 세포의 공급원

[0260] 확장 및 유전적 변형 이전에, T 세포의 공급원을 대상체로부터 수득한다. 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, 끌수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직 및 종양을 포함한 수많은 공급원으로부터 수득할 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)<sup>TM</sup> 분리를 이용하여 대상체로부터 수집된 혈액 유닛(unit)으로부터 수득할 수 있다. 하나의 바람직한 측면에서, 특정 개체의 순환성 혈액으로부터의 세포는 성분채집술 (apheresis)에 의해 수득한다. 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, 플라스마리트(PlasmaLyte) A, 또는 완충제를 수반하거나 수반하지 않는 기타 식염수 용액에 재현탁시킬 수 있다. 또 다른 한편으론, 성분채집술 샘플의 바람직하지 못한 성분을 제거할 수 있고, 세포를 배양 배지에 직접 재현탁시킬 수 있다.

[0262]

한 측면에서, T 세포는, 예를 들어 PERCOLLTM 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심 세정에 의해, 적혈구를 용해시키고 단구를 고갈시킴으로써 말초혈 림프구로부터 단리한다. T 세포의 특이적 아집단, 예컨대 CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및 CD45RO+ T 세포는 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 추가로 단리할 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 단리한다. 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 단리하는 데 있어서, 기타 세포 유형과 비교해서 T 세포가 거의 없는 어떠한 상황 하에서도 T 세포를 단리할 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 칵테일을 이용하는 유동 세포법 또는 음성 자기 면역흡착을 통한 선별 및/또는 세포 분류이다. 예를 들어, 음성 선별에 의해 CD4+ 세포를 강화시키기 위해, 모노클로날 항체 칵테일은 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 한편으론, 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 단리하기 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 것) 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, 백혈병 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 다양으로 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  $5 \times 10^6$  개/ml이다. 다른 측면에서, 사용된 농도는 약  $1 \times 10^5$  개/ml 내지  $1 \times 10^6$  개/ml, 및 그 사이의 모든 정수 값일 수 있다.

[0267] 다른 측면에서, 세포는 2 내지 10°C 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 얹매이는 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 혼탁시킬 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°C의 속도로 -80°C로 동결시키고 액체 질소 저장 탱크의 증기 상 하에 저장하는 것을 포함한다. 기타 제어식 동결 방법을 사용할 수 있을 뿐만 아니라 -20°C 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 면역제거제, 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, 이를 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, 브리오스 타틴)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 (Diaclone; 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 한편으론, 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, 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 놓축시켜, 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- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF- $\beta$ , 및 TNF- $\alpha$ 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, 플라스마네이트, 및 환원제, 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 배지는 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -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 세트로 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% CO<sub>2</sub>가 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 단리한 경우에는, 이러한 서브세트를 더 많은 정도로 확장시키는 것이 유익할 수 있다.

[0282] 추가로, CD4 및 CD8 마커 이외에도, 기타 표현형별 마커가 상당히 다양하지만, 대부분의 경우에는 세포 확장 공정의 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 블로트 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- $\zeta$  세포질 도메인 및 내인성 TCR- $\zeta$  쇄를 함유하는 CAR은 TCR- $\zeta$  쇄에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블로팅함으로써 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  $\alpha$ CD3/  $\alpha$ CD28 aAPC로 자극한 다음, 분석하고자 하는 프로모터의 제어 하에 GFP를 발현하는 렌티바이러스성 벡터로 형질도입시킨다. 예시되는 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1 $\alpha$ , 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 한편으론,  $CD4^+$  T 세포와  $CD8^+$  T 세포의 혼합물을 0일째에  $\alpha$ CD3/  $\alpha$ CD28 코팅된 자기 비드로 자극하고, 1일째에 2A 리보솜 스키핑(skipping) 서열을 이용하여 eGFP와 함께 CAR을 발현하는 비시스템트로닉(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 장기 배양 물에 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  $\alpha$ CD3/  $\alpha$ 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 기준에, 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)<sup>TM</sup> 형광성 비드 [인비트로젠 (Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈베드)]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°C 하에 51Cr [NaCr04로서; 뉴 잉글랜드 뉴클레어 (New England Nuclear; 미국 매사추세츠주 보스톤)]을 부하하고, 완전 RPMI에서 2회 세척하며, 미세액가 판내로 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°C에서 인큐베이션한지 4시간 후, 각 웰로부터의 상등액을 수거한다. 이어서, 감마 입자 기 [파카드 인스트루먼트 캄파니 (Packard Instrument Co.; 미국 매사추세츠주 월섬)]를 이용하여 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 을 측정한다. 각 조건을 적어도 세 번 되풀이하여 수행하고, 다음 식을 이용하여 용해 비율 (%)을 계산한다: % 용해 =  $(\text{ER-SR})/(\text{TR-SR})$  (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.

#### 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, 회소돌기아교세포, 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 펩지교종, 역형성 상의세포종, 맥락총 암종, 역형성 신경절교종, 송파체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 및 비정형 기형양/횡문근양 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 중례의 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 펫지교종 (AO) 및 역형성 희소돌기성상세포종 (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 피사를 특징으로 한다. 이를 병변의 고도로 증식 성인 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)은 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. 텔모양세포의 성상세포종은 어린이의 가장 흔한 성상세포 종양이고, 성인에게 영향을 미치는 확산성, 섬유성 성상세포종과는 임상적 및 조직병리학적으로 상이하다. 텔모양세포의 성상세포종은 확산성, 섬유성 성상세포종과 동일한 계놈 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] 펫지교종과 희소돌기성상세포종 (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. 펫지교종과 희소돌기성상세포종은 WHO 등급 III 역형성 펫지교종 또는 역형성 희소돌기성상세포종으로 진행될 수 있거나, 또는 WHO 등급 IV GBM으로 진행될 수 있다. 따라서, 희소돌기아교세포 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. 맥락총 종양은 또한, 어린이의 침습성 천막상 뇌실내 종양에서부터 성인의 양성 소뇌교각부 종양까지, 심실 시스템에서 우선적으로 발생하는 다양한 종양 군이다. 맥락총 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 발생될 수 있는 WHO 등급 III/IV (3%)로 다양하다.

[0301] 신경초종은 말초 신경에서 발생되는 양성 종양이다. 신경초종은 두개 신경, 특히 8번재 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 백터에 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 펩지교종, 역형성 상의세포종, 맥락총 암종, 역형성 신경절교종, 송파체모세포종, 수질상피종, 상의모세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 및 비정형 기형양/횡문근양 종양, 비소세포 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 생체외 면역 및/또는 생체내 요법을 위한 특정 유형의 백신일 수 있다. 한 측면에서, 포유동물은 인간이다.
- [0313] 생체외 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] 생체외 과정은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 다음에 보다 상세히 논의된다. 간략하게 언급하면, 세포를 포유동물 (예를 들어, 인간)로부터 단리하고, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 백터로 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 한편으론, 세포가 수용자와 관련하여 동종, 동계 또는 이종일 수 있다.
- [0315] 조혈 줄기 및 전구 세포의 생체외 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 생체외 확장하기 위한 어떠한 특별한 방법으로도 제한되지 않는다. 간략하게 언급하면, T 세포의 생체외 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 f1t3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드를 세포의 배양 및 확장에 사용할 수 있다.
- [0316] 생체외 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 세포은 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 EGFRvIII를 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.

### 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 초과의) 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, 시톡신, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신(rapamycin), 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 시토카인 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(tensin), 예를 들어 항-테나신 항체, 예를 들어 <sup>211</sup>At-표지된 항-테나신 항체와 조합하여 치료 요법에 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 면역조정제, 예컨대 인터페론 알파, 인터페론 베타, TGF- $\beta$ 2 웨პ티드 억제제, 또는 폴리-ICLC와 조합하여 치료 요법에 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현성 세포는 WT1 전사 인자 웨პ티드 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 [카소덱스(Casodex)®], 블레오마이신 술페이트 [블레녹산(Blenoxane)®], 부술판 [밀레란(Myleran)®], 부술판 주사제 [부술페스(Busulfex)®], 카페시타빈 [젤로다(Xeloda)®], N4-펜톡시카르보닐-5-데옥시-5-플루오로시티딘, 카르보플라틴 [파라플라틴(Paraplatin)®], 카르무스틴 (BiCNU)®, 클로람부실 [류케란(Leukeran)®], 시스플라틴 [플라티놀(Platinol)®], 클라드리빈 [류스타틴(Leustatin)®], 시클로포스파미드 [시톡산(Cytosan)® 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 [다우노노좀(DaunoXome)®], 엑사메타손, 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, 쟈시타빈 (디플루오로데옥시시티딘), 히드록시우레아 [히드레아(Hydrea)®], 아다루비신 [이다마이신(Idamycin)®], 이포스파미드 (IFEX)®, 이리노테칸 [캄프토사르(Camptosar)®], L-아스파라기나제 (ELSPAR)®, 류코보린 칼슘, 멜팔란 [알케란(Alkeran)®], 6-머캅토푸린 [푸리네톨(Purinethol)®], 메토트렉세이트 [폴렉스(Folex)®], 미톡산트론 [노반트론(Novantrone)®], 밀로타르그, 파클리탁셀 [탁솔(Taxol)®], 퀴닉스 (이트롭90/MX-DTPA), 펜토스타틴, 카르무스틴 이식체를 수반한 폴리페프로산 20 [글리아델(Gliadel)®], 타목시펜 시트레이트 [놀바텍스(Nolvadex)®], 테니포시드 [부몬(Vumon)®], 6-티오구아닌, 티오텐파, 티라파자민 [티라존(Tirazone)®], 주사용 토토테칸 히드로클로라이드 [히캄프틴(Hycamptin)®], 빈블라스틴 [벨반(Velban)®], 빙크리스틴 [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)®, 테스메틸도판(Desmethyldopan)®, 하에만타민(Haemanthamine)®, 노르도판(Nordopan)®, 우라실 질소 머스터드(Uracil nitrogen mustard)®, 우라실로스트(Uracilllost)®, 우라실모스타자(Uracilmostaza)®, 우라무스틴(Uramustine)®, 우라무스틴®], 클로르메틴 [무스타르겐(Mustargen)®], 시클로포스파미드 [시톡산®], 네오사르®, 클라펜(Clafen)®, 엔독산(Endoxan)®, 프로시톡스(Procytox)®, 레빔무네(Revimmune)™, 이포스파미드 [미톡사나(Mitoxana)®], 멜팔란 (알케란)®, 클로람부실 (류케란)®, 피포브로만 [아메델(Amedel)®, 베르시트(Vercyte)®], 트리에틸렌멜라민 [헤멜(Hemel)®, 헥살렌(Hexalen)®, 헥사스타트(Hexastat)®], 트리에틸렌티오포스포르아민, 테모졸로미드 [테모다르(Temodar)®], 티오텐파 [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)®]; 테모졸로미드 [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 (부술페스® 및 밀레란)®, 카르보플라틴 (파라플라틴)®, 로무스틴 [CCNU로서 공지되기도 함, CeeNU®]; 시스플라틴 (CDDP로서 공지되기도 함, 폴라티놀® 및 폴라티놀®-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 [이펙스(Ifxex)®]; 프레드누무스틴; 프로카르바진 [마탈란(Matulane)®]; 메클로르에타민 (질소 머스터드, 무스틴 및 메클로로에타민 히드로클로라이드로서 공지되기도 함, 무스타르겐)®, 스트렙토조신 [자노사르(Zanosar)®]; 티오텐파 [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 라보라토리즈(Abbott Laboratories)], ABT-627 [아트라센탄(Atrasentan)] [애보트 라보라토리즈/신레이(Xinlay)®, ABT-869 (애보트 라보라토리즈), 액티미드(Actimid) [CC4047, 포말리도미드(Pomalidomide) [셀젠 코포레이션(Celgene Corporation)], AdGVPDF.11D [젠텍(GenVec)], ADH-1 [엑스헤린(Exherin)] [아드헤렉스 테크놀로지(Adherex Technologies)], AEE788 [노바르티스(Novartis)], AG-013736 [액시티닙(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

행루이 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 스큅(Bristol-Myers Squibb)], BMS-582664 [브리바닙(Brivanib)] (브리스톨-마이어스 스큅), BMS-690514 (브리스톨-마이어스 스큅), 칼시트리올(Calcitriol), CCI-779 [토리셀(Torisel)] [와이어스(Wyeth)], CDP-791 [임클론 시스템즈(ImClone Systems)], 세플라토닌(Ceflatonin) [호모하링토닌(Homoharringtonine)/HHT] [켐제넥스 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)] [콜라게네스 파마슈티칼즈(Collagenex Pharmaceuticals)], 콤브레타스타틴(Combretastatin) [옥시겐(Oxigene)], CP-751,871 [페기투무맙(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), 디술피람(Disulfiram) [안타부세(Antabuse)], E7820 [에이사이리미티드(Eisai Limited)], E7080 (에이사이리미티드), EMD 121974 [실렌기티드(Cilengitide)] (EMD 파마슈티칼즈), ENMD-1198 [엔트레메드(EntreMed)], ENMD-2076 (엔트레메드), 엔도스타르(Endostar) [심세레(Simcere)], 에르비툭스(Erbitux) [임클론(ImClone)/브리스톨-마이어스 스큅], EZN-2208 [엔존 파마슈티칼즈(Enzon Pharmaceuticals)], EZN-2968 (엔존 파마슈티칼즈), GC1008 [젠파임(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), MEDI1522 [아베그린(Abegrin)] [메드임뮨(MedImmune)], MLN518 [탄두티닙(Tandutinib)] [밀레늄(Millennium)], 네오바스타트(Neovastat) [AE941/베네핀(Benefin)] [아에테르나 젠타리스(Aeterna Zentaris)], 넥사바르(Nexavar) [바이엘/오닉스(Onyx)], NM-3 (젠파임 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.)], 판谮 캡슐(Panzem Capsules) (2ME2) (엔트레메드), 판谮 NCD (2ME2) (엔트레메드), PF-02341066 (화이자), PF-04554878 (화이자), PI-88 [프로젠 인더스트리즈(Progen Industries)/메디젠 바이오테크놀로지(Medigen Biotechnology)], PKC412 (노바르티스), 폴리페논 E (녹차 추출물) [폴리페노 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)], 테트라티오몰리브레이트(Tetrathiomolybdate) [시그마-알드리히(Sigma-Aldrich)], TG100801 타르게젠(TargeGen), 탈리도미드(Thalidomide) (셀젠 코포레이션), 틴자파린 소듐(Tinzaparin Sodium), TKI258 (노바르티스), TRC093 [트라콘 파마슈티칼즈 인크.(Tracon Pharmaceuticals Inc.)], VEGF 트랩(Trap) [아플리베르셉트(Aflibercept)] [레제네론 파마슈티칼즈(Regeneron Pharmaceuticals)], VEGF 트랩-아이(Trap-Eye) (레제네론 파마슈티칼즈), 베글린(Veglin) [바스젠 더라퓨틱스(VasGene Therapeutics)], 보르테조맙(Bortezomib) (밀레늄), XL184 [액셀릭시스(Exelixis)], XL647 (액셀릭시스), XL784 (액셀릭시스), XL820 (액셀릭시스), XL999 (액셀릭시스), 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(Brivanib 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-아미노프로파노에이트]; 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(Brivanib) (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-페리디닐메틸)아미노]-3-페리딘카르복사미드 (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-페리딘카르복사미드 (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 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6a $\alpha$ )-옥타하드로-2-메틸시클로펜타[c]피롤-5-일]메톡시]-4-퀴나졸린아민 (XL647, CAS 781613-23-8); 4-메틸-3-[[1-메틸-6-(3-페리디닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-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(tyrphostin) 46, EKB-569, 에를로티닙(erlotinib) [타르세바(Tarceva)®], 제피티닙(gefitinib) [이레사(Iressa)®], 에르비툭스(erbitux), 니모투주맙(nimotuzumab), 라파티닙(lapatinib) [티케르브(Tykerb)®], 세툭시맙(cetuximab) (항-EGFR mAb), <sup>188</sup>Re-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 세툭시맙(Cetuximab) [에르비툭스(Erbtitux)®]; 파니투무맙(Panitumumab) [벡티비스(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)®, 제피트닙(Gefitinib) (이레사)®, N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-[(3'S')-테트라하드로-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-페라졸릴)메틸]-N-[(1R)-1-페닐에틸]-7H-피롤로[2,3-d]페리미딘-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-인디졸-5-일]아미노]-5-메틸피롤로[2,1-f][1,2,4]트리아진-6-일]-카르밤산, (3S)-3-모르폴리닐메틸 에스테르 (BMS599626); N-(3,4-디클로로-2-플루오로페닐)-6-메톡시-7-[(3a $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6a $\alpha$ )-옥타하드로-2-메틸시클로펜타[c]피롤-5-일]메톡시]-4-퀴나졸린아민 (XL647, CAS 781613-23-8); 및 4-[4-[(1R)-1-페닐에틸]아미노]-7H-피롤로[2,3-d]페리미딘-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<sup>4,9</sup>]헥사트리아콘

타-16, 24, 26, 28-테트라엔-12-일]프로필]-2-메톡시시클로헥실 디메틸포스파네이트; 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]파리미딘-7-일}-2-메톡시페닐)메탄올 (AZD8055); 2-아미노-8-[트랜스-4-(2-히드록시에톡시)시클로헥실]-6-(6-메톡시-3-파리디닐)-4-메틸-파리미딘-7(8H)-온 (PF04691502, CAS 1013101-36-4); 및  $N^2$ -[1,4-디옥소-4-[[4-(4-옥소-8-페닐-4H-1-벤조페란-2-일)모르폴리늄-4-일]메톡시]부틸]-L-아르기닐글리실-L- $\alpha$ -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)파페라진-1-일]메틸]티에노[3,2-d]파리미딘-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]프로페오니트릴 (BEZ 235 또는 NVP-BEZ 235로서 공지되기도 하고 PCT 공개 번호 WO 06/122806에 기재됨); 4-(트리플루오로메틸)-5-(2,6-디모르폴리노파리미딘-4-일)파리딘-2-아민 (BKM120 또는 NVP-BKM120으로서 공지되기도 하고 PCT 공개 번호 WO2007/084786에 기재됨); 토자세르틴(Tozasertib) (VX680 또는 MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-파리디닐)-6-퀴놀리닐]메틸렌]-2,4-티아졸리딘디온 (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(아세틸옥시)-1-[(디-2-프로페닐아미노)메틸렌]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-옥타히드로-11-히드록시-4-(메톡시메틸)-4a,6a-디메틸-시클로펜타[5,6]나프토[1,2-c]파란-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); 폐리포신(Perifosine) (KRX0401); 4-도테실-N-1,3,4-티아디아졸-2-일-벤젠술폰아미드 (PHT-427, CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-일)-1-에틸-7-[(3S)-3-파페리디닐메톡시]-1H-이미다조[4,5-c]파리딘-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]파란-6-온 [팔로미드(palomid) 529, P529, 또는 SG-00529]; 트리시르빈(Tricirbine) (6-아미노-4-메틸-8-( $\beta$ -D-리보파라노실)-4H,8H-파롤로[4,3,2-de]파리미도[4,5-c]파리다진); ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -[[5-(3-메틸-1H-인다졸-5-일)-3-파리디닐]옥시]메틸]-벤젠에탄아민 (A674563, CAS 552325-73-2); 4-[(4-클로로페닐)메틸]-1-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-4-파페리딘아민 (CCT128930, CAS 885499-61-6); 4-(4-클로로페닐)-4-[4-(1H-파라졸-4-일)페닐]-파페리딘 (AT7867, CAS 857531-00-1); 및 아르체신(Archemix) (RX-0201, CAS 663232-27-7)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0335] 칼슘 의존성 포스파타제 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, 전예, 동시에 또는 후예) 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 램프조직구증식증 (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- $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , 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  $\alpha$ 의 억제제, 및 IL-6의 억제제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. TNF  $\alpha$  억제제의 한 예는 엔타네르셉트(entanercept)이다. IL-6 억제

제의 한 예는 토실리주맙(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, 이필리무맙(ipilimumab) (MDX-010 및 MDX-101로서 지칭되기도 하고, 에르보이(Yervoy)®로서 시판됨; 브리스톨-마이어스 스냅; 트레멜리무맙(Tremelimumab) (화이자로부터 입수 가능한 IgG2 모노클로날 항체; 이전에는 티실리무맙(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, 니볼루맙(nivolumab) (BMS-936558 또는 MDX1106으로서 지칭되기도 함; 브리스톨-마이어스 스냅)은 PD-1을 특이적으로 차단하는 완전 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. 니볼루맙 (클론 5C4) 및 PD-1과 특이적으로 결합하는 기타 인간 모노클로날 항체는 US 8,008,449 및 WO2006/121168에 개시되어 있다. 피딜리주맙 (Pidilizumab) [CT-011; 큐어 텍(Cure Tech)]은 PD-1과 결합하는 인간화 IgG1k 모노클로날 항체이다. 피딜리주맙 및 기타 인간화 항-PD1 모노클로날 항체는 WO2009/101611에 개시되어 있다. 램브롤리주맙(Lambrolizumab) (MK03475로서 공지되기도 함; 머크)은 PD1과 결합하는 인간화 IgG4 모노클로날 항체이다. 램브롤리주맙 및 기타 인간화 항-PD1 항체는 US 8,354,509 및 WO2009/114335에 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 WO2010/077634 내의 서열 20 및 21에 제시된다) 및 MDX-1 105 (BMS-936559로서 지칭되기도 함, 및 예를 들어, WO2007/005874에 개시된 항-PD-L1 결합성 작용제)를 포함한다. AMP-224 [B7-DCIg; 앰플리뮨(Amplimmune); 예를 들어, WO2010/027827 및 WO2011/066342에 개시됨]는 PD1과 B7-H1 간의 상호 작용을 차단시키는 PD-L2 Fc 융합 가용성 수용체이다. 기타 항-PD1 항체는 특히 AMP 514 (앰플리뮨), 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.

#### 제약 조성물 및 치료

[0340] 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; 퀼레이트제, 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, 벡터 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*), 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*), 하에모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*), 네이세리아 메닌기티데스 (*Neisseria meningitidis*), 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 단리한다. 이들 T 세포 단리물은 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 실시에 따라서 수행할 수 있다.

### 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 실시에는 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**

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 생착과 영속성을 평가하도록 실험을 설계하였다. 3가지 상이한 형태의 CAR을 시험하는데, 이는 2가지 상이한 단일 쇄 가변 단편 (EGFRvIII 항원과 결합하는 CAR의 부분)과 세포내 신호전달 도메인 (CD28을 수반하는 및 수반하지 않는 CD3 제타 및 4-1BB)을 포함한다.

**[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 이종 이식 모델이다. 생착한 후, 인간 T 세포를 NSG 마우스에서 대략 2개월 동안 유지시키거나 또는 치명적인 이종 GVHD (xGVHD)가 발생할 때까지 유지시킬 수 있는데, 이는 주입된 인간 T 세포의 용량과 공여자에 좌우된다.**

간략하게 언급하면, 렌티바이러스성 플랫폼을 이용하여, 항-EGFRvIII 모노클로날 항체 3C10로부터 유래된 scFv 가 혼입된 신규 CAR (3C10 CAR)을 창출시켰다. 이러한 CAR을 시험관내 및 이종 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 7 일 내지 11일째에 매일 테모졸로미드 (1 mg/1회 용량)를 복강내 주사하고; 7일 및 17일째에 3C10 CAR로 생체외 형질도입되거나 또는 증강된 그린 형광 단백질 (EGFP)-벡터로 모의 형질도입된  $2 \times 10^6$  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')<sub>2</sub> mAb (3C10CAR에 대해 특이적임) 및 스트렙타비딘-피코에리트린 (PE)을 이용한 면역조직화학에 의해, CAR-형질도입된 T-세포의 침윤을 평가하였다. 정맥내 주입된 CAR-T-세포는 강렬한 PE 신호에 근거하여 종양을 심하게 침윤시키는 것으로 보이는 반면, 스트렙타비딘-PE로 염색되었지만 항-F(ab')<sub>2</sub> 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**

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 이종 이식 실험에 사용되었다.

##### **[0360] 생물학적 시스템의 구조 및 특징**

**[0361] EGFRvIII에 대항하여 유도된 많은 모노클로날 및 폴리클로날 Ab가 야생형 EGFR 또는 기타 비-특이적 단백질에 대한 교차 반응성을 지니고 있긴 하지만, EGFRvIII-특이적 융합 연접부를 포함한 14개의 아미노산 웨티드로 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 벡터가 T 세포의 형질도입에 사용되었다.**

##### **[0362] 마우스 주입을 위한 세포 제조**

마우스 내로 주입하기 위한 세포는 인간 T 세포이다. 펜실베니아 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 벤쿠버)]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  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신을 수반하는 RPMI에서 확장시킨다. 벡터 형질도입이 24시간 후에 발생하는데, 패키지된 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

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

[0366] 임상 등급 CART

CART-EGFRvIII T 세포를 임상 세포 및 백신 제조 설비 (CVPF)에서 제조하는데, 세포 생성물은 자가 T 립프구이다. 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 10<sup>8</sup>/ml의 최종 농도). 냉동 보존된 EGFRvIII CAR T-세포 생성물을  $\leq -130$  °C로 모니터링된 냉동고에 저장한다. 그 실험 결과가 다음에 기재된다.

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

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.

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 연접부에 신규 글리신 잔기가 생성됨으로써, 종양 특이적 에피토프가 창출된다. EGFRvIII은 GBM의 24% 내지 67%에서 발현되지만, 정상 조직에서는 그렇지 않다.

GBM에 대한 효과적인 CAR 요법을 개발하기 위하여, EGFRvIII을 표적으로 하는 3가지 신규 렌티바이러스성 CAR 구축물을 생성하였다. 이들 벡터 각각은 EGFRvIII-특이적 뮤린 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 헌지, 4-1BB 및 CD3  $\zeta$  도메인과 커플링시킨다 (각각 3C10BBz28-CAR 및 3C10BBz-CAR). 139 scFv는 CD8a 헌지, 4-1BB 및 CD3  $\zeta$  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/ $\gamma$ c(-/-) (NSG) 마우스에게 생체외에서 1) 139BBz-CAR; 2) 3C10BBz-CAR; 3) 3C10BBz28-CAR; 4) 인간 CD19를 표적으로 하는 대조군 CD19BBz-CAR로 형질도입된 1 x 10<sup>6</sup> 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 대항하여 일부 동종 반응을 명확하게 보여주었지만, 이를 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 총 종양이 박멸되었다는 것을 제안한다 (도 8). 중요하게도, 3C10BBz-CART 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 항종양 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.

### 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 형질도입하여, 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, 복력, 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 얹매이는 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 정후가 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 대항한 양자 전이 요법의 효능을 개선하기 위하여, T-세포 수용체 CD3ζ 쇄 신호전달 모듈 및 CD137 (4-1BB)과 CD28의 공동자극성 모티프와 직렬로 캐플링된 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. EGFRvIII를 안정적으로 발현하는 U87 GBM 세포 (U87-EGFRvIII)에 대항한 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 $\alpha$  프로모터는 3C10-유래된 scFv, CD28 막횡단 (TM) 뿐만 아니라 4-1BB 및 세포내 도메인 (ICD) 및 CD3 $\zeta$  도메인을 통합하는 CAR 융합 단백질을 구동시킨다. FG12-기반 자기-불활성화 (SIN) 벡터를 이용하여 렌티바이러스성 miR-17-92 구축물 (FG12-EF1a-miR-17/92)를 또한 창출시켰다 (도 1b 참조). 이러한 벡터에서는, EF-1 $\alpha$  프로모터가 miR-17-92를 구동시키고, 인간 UbiC 프로모터는 형질도입된 세포의 추적을 위해 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 $\alpha$ ; 인간 신장 인자 1 $\alpha$ -소단위 프로모터, VH; 3C10 이뮤노글로불린의 중쇄 내의 가변 영역, VL; 3C10 이뮤노글로불린의 경쇄 내의 가변 영역, HIV-1  $\Delta$ -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 트랜스진의 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 트랜스진-유래된 miR-17-92 둘 다를 발현하는 인간 T-세포를 수득하기 위하여, 다음 2개의 렌티바이러스 성 벡터를 순차적으로 감염시킴으로써 CD3 $^+$  T-세포를 pELNS-3C10-CAR 및 FG12-EF1a-miR-17/92로 공동-형질도입하였다. pELNS-3C10-CAR로 초기 형질도입한지 24시간 후, 상기 T-세포를 FG12-EF1a-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, 트랜스진-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 균락 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 대항한 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 대항하여 배경 수준의 용해만을 나타내진 하였지만, CAR로 형질도입된 T-세포는, 모 U87 세포에 대항해서는 배경 수준의 세포독성 효과만을 나타내면서도 EGFRvIII 발현성 U87 인간 GBM 세포 (U87-EGFRvIII)를 강력하고도 특이적으로 용해시킨 것으로 입증되었다 (도 2c). 이들 12h  $^{51}$ Cr-방출 검정에서는, CAR-T-세포를 miR-17-92로 공동-형질도입하면, U87-EGFRvIII 표적 세포에 대항한 그들의 특이적 세포독성 활성이 상당히 증강되지 않았다.

[0387] miR-17-92 공동-형질도입은 TGF- $\beta$  와 테모졸로미드 (TMZ - 표준 치료 요법)에 의한 억제 효과에 대해 증강된 IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\beta$ 에 노출시킨 경우에 개선된 IFN- $\gamma$  생성, 세포 증식 및 덜한 정도의 아폽토시스성 사멸을 부여하는지를 평가하기 위한 실험을 수행하였다.

[0390] CAR-T-세포를 TGF- $\beta$  또는 TMZ 없이 EGFRvIII-형질도입된 인공 항원 제시 세포 (aAPC)로 자극하는 경우, 상기 세포는 공동-형질도입을 수반하거나 수반하지 않으면서 유사한 수준의 IFN- $\gamma$ 를 발현하였다. 그러나, 상기 세포를 단계적 상승 용량의 TGF- $\beta$  또는 TMZ에 노출시킨 경우에는, miR-17-92 공동-형질도입을 수반하지 않은 CAR-T-세포가 상당히 감소된 수준의 IFN- $\gamma$ 를 생성시킨 반면, 공동-형질도입된 CAR-T-세포는 IFN- $\gamma$ 의 고 수준 생성을 유지하였다 (도 3a). 흰색 막대 및 흑색 막대는 각각 CAR-T-세포 (miR-17-72를 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- $\gamma$ 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 아폽토시스성 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 부가하는 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 아폽토시스에 대해 보다 저항성으로 될 수 있었는지를 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위하여, 아넥신 V $^+$  및 프로파이드 아이오다이드 (PI) $^+$  CAR-T-세포의 유동-세포계수 평가를 증가 농도의 TMZ에서 수행하였다 (도 3c 및 3d). 초기 아폽토시스성 (아넥신 V $^+$ PI $^-$ ), 아폽토시스성/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 아폽토시스성 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/γc(-/-) (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 x 10<sup>6</sup>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 대항한 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 CD3ζ 쇄, 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<sup>+</sup> T 세포에서, miR-17-92 발현은 태고난 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 얹매이는 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, 이를 T-세포를 수회 주사하는 것이, 바이러스 백터를 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-13Rα2 (문헌 [Kong et al., 2012, Clin Cancer Res 18:5949-5960]; [Kahlion

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 대항한 CAR을 개발하였다. 어떠한 특별한 이론에 얹매이는 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 이종 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 트랜스진의 공동-발현을 달성하기 위한 대체 접근 방식으로서, 단일 전자체로서 3C10-CAR 유전자와 miR-17-92 유전자 둘 다를 발현하는 pELNS-기반 렌티바이러스성 백터를 구축하였다. 이러한 단일 "직렬식" 백터를 사용하는 것이 2개의 백터-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" 백터의 형질도입 효율은 2개의 백터 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 전기 천공을 조합하는 것이 실행 가능한 전략일 수 있다.

[0404] 본 연구에서는, 40% 내지 60%의 CD3<sup>+</sup> CAR-T-세포가 CD4<sup>+</sup>였고, CD4<sup>+</sup> CAR-T-세포는 U87-EGFRvIII 세포를 EGFRvIII-특이적 방식으로 효과적으로 용해시킨 것으로 또한 밝혀졌다. 페르포린<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-세포가 페르포린/그랜자임 B 경로를 통하여 세포독성 활성을 매개하지만, Fas/FasL 경로를 통해서는 그렇지 않다고 보고되었다 (Porakishvili et al., 2004, *Haematologica* 89:435-443). 따라서, 본 연구에서는 CD4<sup>+</sup> 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.

#### 실시예 3: CAR 서열

[0408] 뮤린 모노클로날 항체 (mAb) 3C10은 EGFRvIII-특이적 융합 연접부를 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 쇄 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 애피토프와의 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 헌지/CD8TM/4-1BB/CD3 제타 pELNS 렌티바이러스성 백본 (이는 EF1a 프로모터에 의해 발현된다) 내로 클로닝함으로써 생성시켰다.

#### 3C10scFv-CD28BB제타 CAR (아미노산) (서열 1)

```

MALPV TALLPL ALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASV KLSCTGSGFNIEDY
YIH WVKQRTEQGLEWIGRIDPENDET KYGPIFQGRATITADTSSNTV YLQLSS LTS
EDTAV YYC AFRGGVY WGP GTT LTVSSGGGGSGGGGSGGGSHMDVV M TQSPL
TLSVAIGQ SASISCKSSQ SLLSDGKTYLNWLLQPGQSPKRLISL VSKL DSGVPDRFTG
SGSGTDF TL RIS RVEA EDLG IYY CWQGT HFP GTFGGGT KLEIKA STTPAPR
PPT PAP TIASQPLSLR PEA CRPA AGGA VHT RGLDFACDFW VL VVGGV LAC YSL
LVTVA FII FWVRS KRS RLLHSDY MNMTPR RGP TRKHY QPY APP RDFA AYRSKR
GRKKLLYIFKQPFMRP VQT TQEE DGC S C R FPEEE EG GCE LRV KFSRSADAPAYKQ
GQNQLYNE NLGR REEY DVLDK RRG RDPEMGGK PRRKNP QEGLYN ELQ KDKMAEA
YSEIGMKGER RRGKGHD GLY QGLSTAT KDTY DALH M QAL PPR

```

#### [0411]

[0412]

### 3C10scFv-BBz CAR (아미노산) (서열 2)

MALPVTALLPLALLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVJKLSCTGSGFNIE  
DYYIHWWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSE  
DTAVYYCAFRRGGVYWGPCTTLTVSSGGGSGGGSGGGSHMDVVMTQSPL  
TLSVAIGQSASISCKSSQSLLSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLISLVSKLDGVPD  
RFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGYYCWCQGTHFPGTFGGGTKLEIKASTTTPAPR  
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSL  
VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP  
AYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK  
MAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0413]

[0414]

### 3C10scFv-CD28BB제타 CAR (핵산) (서열 18)

atggcccttaccagtgaccgcctgtccgtccggctggcctgtgtccacgcgcagggggatccagattcagctgcag  
caatctggggcagaacttgtaagccaggggcctcagtcaagctgtccgtccacagggtctggcttacattgaagactactat  
tcactgggtgaaggcagaggactgaacaggcctggaatggattgaaaggattgtacgttgcagaatgtatgaaactaaatatggcc  
aatattccaggggcaggccactataacagcagacacatcctccaacacagtctacactcagcgcctgacatctgagga  
cactgcccgttactgtgccttcgcgg  
gggtgggtccggagggtgtgggtcacatatggatgtgtatgacccagtctccactcactctatcggtgccattggac  
aatcagccctccatctctgtcaagtcaagtcaagtcagacgcctttagatgtatgaaagacatattgtatgggtttacagaggccaggcc  
ctccaaagcgccctaactctctgggtctaaactggactctggagtcctgcacagggtactggcactggatcaggac  
agatttcacactgagaatcagcagactggaggctgaggattggaaattttattgtggcaaggtaacatttctggacgtt  
cggtggaggggaccaagctggagataaaagctgaccacgacgcccagcgcgcgcgaccaccaacacccggccaccatcg  
cgtcgcagccctgtccctgcggccagaggcgtgcccagcggcggggggggcgcagtgacacgcggggctggacttcgcctgt  
gatttttgggtctgggtgggtggagtcctggctgtatagctgttagtaacagtggccattttctgggtg  
aggagaagaggaggcaggctcgtcacagtactacatgaaacatgactccccccgcggccacccgcacaggcattacc  
agccctatccccaccacgcgacttcgcagcctatgccttacacggggcagaaagaaactctgtatattcaacaaccatt  
tatgagaccagtacaaactactcaagagggatgttagtgcgcattttccagaagaagaaggaggatgtgaactga  
gagtgaagttcagcaggagcgcagacgcggccgcgtacaaggcggccagaaccagctataacgcgtcaatctggacgaagag  
aggagtacgtttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccct  
cgagggcgttacatgaaactgcagaaagataagtgccggggccctacagttagatgggtgatgaaaggcgagcgcgg  
agggggcaaggggcacgtggccattaccagggtctcagtgccaccaaggacacccatcagcgccttacatgcaggcc  
tgcggcc

[0415]

[0416]

3C10scFv-BBz CAR (핵산) (서열 19)

Atggccttaccagtgaccgcctgctcctgccgtggccttgctgtccacgcgcaggccggatccgagattcagctgca  
 gcaatctggggcagaacttgtaagccaggccctcagtcagactgtcctgcacaggtctggcgttcaacattgaagactactat  
 attcaactgggtgaaggcagaggactgaacacaggccctgaaatggattgaaaggattgtctgagaatgtaaactaaatatggc  
 ccaatattccaggcaggccactataacacgacacatcctccaacacagtctacactgcaactcagcgcctgacatctgaggacact  
 gccgtctattactgtgccttcgcggtgagactctactggggccaggaaccactctcacagtctcctcaggaggtgg  
 gtccgggtgggtccggaggtgggttcacatatggatgtgtgatgaccaggactctccactactctatcggtgccattg  
 gacaatcagcctccatctcttgcagaactcaagtcagactcagcccttagatgtatggaaagacatattgaattgggtttacagaggc  
 caggccagtcctcaaaagcgcctaaatctctggtaactggactctggagtcctgacagggttactggcagtgatggatcagg  
 gacagatttcacactgagaatcagcagactggaggctgaggattggaaattttattgtggcaggtacacatttcctggacgttcg  
 gtggagggaccaagctggagataaaagctagcaccacgcgcagccgcgaccaccaacacccggcgcacc  
 atcgcgtcgagccctgtccctgcgcgcaggcgtgcggccagcggcgccccggcgcactgcacacgaggggctgg  
 acttcgcctgtgatatctacatctggcgcccttgcggacttgcgggttccttcctgtcactggttatcacccttactgcaa  
 acggggcagaaagaactctgtatattcaaaaccatttagagaccagactacaagaggaagatggctgttagc  
 tggcggattccagaagaagaaggaggatgtgaaactggactgagatgtggcagcggcagacgcgcggcgtacaaggcagg  
 ccagaaccagctataacgagctcaatcttaggacgaagagaggactacgtttggacaagagacgtggccgg  
 accctgagatggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggc  
 tacagttagatggatgaaaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
 cacctacgacgccttcacatgcaggccctgcggccctgc  
 [0417]

[0417]

"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 헌지, 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)

MALPV TALLLPL ALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNL  
 AWYQQKPGKAPKRLIYAASNLQSGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYC  
 LQHHSYPLTSGGT KVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLR  
 LS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTNYADSVKGRFTISRD  
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGTLTVSSASTTPAPRP  
 PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLV  
 ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPA  
 YKQGQNQLYNENLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRKNPQEGLYNELQKDKM  
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0420]

### 139scFv-BBz CAR (핵산) (서열 20)

Atggccttaccagtgaccgcctgtccctggcgctggcctgtgtccacgcgcgcagggccggatccgacatccagatgacccaga  
gccttagcagcctgagcgcgcagcgtggcgacagactgaccatcacctgtcggccagccaggcatcagaaca  
acctggccttgtatcagcagaaggccggcaaggcccccaagagactgtatctacgtgcgcagcaatctgcagagcggcgtgc  
cagcagattcacggaaaggcgctccggcaccaggttacccctgtatcgccgcgcagccggaggacttcgcacact  
actgcctgcagcaccacagctaccctgtgaccagcggcggaggcaccaaggfagatcaagcggaccggcagcaccagc  
ggcagcggcaagcctggcagcggcggaggaaagcggagggtcaggtgtccatctggccggcgactggcgcagcctggc  
ctgagactgagctgtccgcagcggcttacccctcgtcagcagactacgcctgtctgggtccggcaggctctggaaag  
ggccttggaaatgggtgtccgcacatcagcggctgtccggccaccaactacgcgcacagcgtgaagggccggttcaccatcagcgg  
gacaacagaagaacaccctgtatctcgtcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgcgtgtactactgtgcgg  
cagcagcgggtggagcggactggggccaggcacactgttcgtcacagtgtcttagcgcgtactgcaccacgcgcagcgcgcgc  
gaccaccaacaccggcgcaccatcgcgtcgcagccctgtccctgcgcgcagaggcgtccggcagcggcgggggg  
cgcaactgcacacgagggggctggacttcgcctgtatctacatctggcgccttggccggacttgtgggtcctctgtcactg  
gttaccccttactgcacacggggcagaaagaactccctgtatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagagga  
agatggctgttagctgcgatttcagaagaagaagaaggaggatgtactgagactgtgaagttcagcaggagcgcagacgcggccgc  
gtacaaggcggccagaaccagctataacgagactcaatctggacgaagagaggatcgtatgttttggacaagagacgtggccgg  
gaccctgagatggggaaagccgagaagaaggacccctcggagggcgtacaatgtcaactgcagaaagataagatggcggagg  
cctacagttagattggatgaaaggcggcggcggaggggcaagggcgtacaatgtcaactgcagaaagataagatggcggagg  
gacacccatcagcgccttcacatgcggccctgcggccctgcgt

### *CAR* 성분

### 핵산 서열:

3C

AGCTGCTGCACAGGTTCTGGCTAACATTGAAGACTACTATATTCACTGGGTG  
AAGCAGAGGACTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGAGGATTGATCCTGAGAATG  
ATGAAACTAAATATGGCCAATATTCCAGGGCAGGGCACTATAACAGCAGACAC  
ATCCTCCAACACAGTCTACCTGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG  
TCTATTACTGTGCCTTCGCGGTGGAGTCTACTGGGGGCCAGGAACCACTCTCACA  
GTCTCCTCAGGAGGTGGTGGTCCGGTGGTGGTCCGGAGGTGGTGGTCA  
TATGGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCACTCTATCGGTTGCCATTGGACAATC  
AGCCTCCATCTCTGCAAGTCAGTCAGAGCCTTTAGATAGTGTGAAAGACAT  
ATTGAAATTGGTTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCTTAATCTCTG  
GTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGAC  
AGATTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGAAATTATTATT  
GCTGGCAAGGTACACATTTCCTGGGACGTTGGAGGGACCAAGCTGGAGAT  
AAAA

AAAAA

[0427]

- 139 scFv 뉴클레오티드 서열 (인간화); (서열 5)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAG  
 TGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACAAACCTGGCCTGGTATCA  
 GCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTGCAG  
 AGCGCGTGGCCAGCAGATTCAACCGAAGCGGCTCCGGCACCGAGITTCACCCCTGA  
 TCGTGTCCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCAC  
 AGCTACCCCTTGACCAGCGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGCA  
 GCACCAGCGGCAGCGCAAGCCTGGCAGCGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCT  
 GGAATCTGGCGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCC  
 GCCAGCGGCTTCACCTCAGCAGCTACGCCATGTCTGGTCCGGCAGGCTCCTGG  
 AAAGGGCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGCTCTGGCGGCTCCACCAACTAC  
 GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTCAACATCAGCCGGACAACAGCAAGAACACCC  
 TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGACTACTGTGCC  
 GGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTA  
 GC

[0428]

- 리더 (핵산 서열); (서열 6)

ATGGCCTTACCAAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC  
 CGCCAGGCCG

[0430]

- 헌지 (핵산 서열); (서열 7)

ACACACGCCAGCGCCGACCACCAACACCGGCCACCATCGCGTCGC  
 AGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCCTGCCAGCGCGGGGGCGAGT  
 GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

[0432]

- 막횡단 (핵산 서열); (서열 8)

ATCTACATCTGGCGCCCTGGCCGGACTTGTGGGTCTTCTCCTGTCACT  
 GGTTATCACCTTACTGC

[0434]

- 4-1BB 세포내 도메인 (핵산 서열); (서열 9)

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGAC  
 CAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGA  
 AGAAGGAGGATGTGAACTG

[0436]

[0437]

- CD3 제타 (핵산 서열); (서열 10)

AGAGTGAAGTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACAAGCAGGCCAG  
 AACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT  
 TGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA  
 AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACGTGAGAAAGATAAGATGGCGG  
 AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGC  
 ACGATGGCCTTACCAAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC  
 CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC

[0438]

- CD3 제타 (핵산 서열; NCBI 참조 서열 NM\_000734.3); (서열 100)

AGAGTGAAGTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGCCAG  
 AACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT  
 TGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA  
 AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACGTGAGAAAGATAAGATGGCGG  
 AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGC  
 ACGATGGCCTTACCAAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC  
 CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC

[0440]

아미노산 서열:

[0441]

- 3C10 scFv 아미노산 서열 (마우스); (서열 11)

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVKQRTEQGLEWIGRIDPEN  
 DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCAFRRGGVYWGPGLTL  
 TVSSGGGGSGGGGGGGSHMDVVMTQSPLTLSVAIGQSASISCKSSQSLLDSDG  
 KTYLNWLLQRPGQSPKRLISLVSKLDSGPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGI  
 YYCWQGTHFPGTFGGGTKLEIK

[0443]

- 139 scFv 아미노산 서열 (인간); (서열 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNLAWYQQKPGKAPKRLIYAAASNLQ  
 SGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGS  
 TSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP  
 GKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY  
 CAGSSGWSEYWGQGTLTVSS

[0445]

- 리더 (아미노산 서열) (서열 13)

MALPV TALLPL ALLLHAARP

[0447]

- 헌지 (아미노산 서열) (서열 14)

TTTPAPR PPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACD

[0450] ● 막횡단 (아미노산 서열) (서열 15)

IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC

[0451]

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

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0453]

[0454] ● CD3 제타 도메인 (아미노산 서열) (서열 17)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGKPRRKNPQE  
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0455]

[0456] ● CD3 제타 도메인 (아미노산 서열; NCBI 참조 서열 NM\_000734.3) (서열 99)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGKPRRKNPQE  
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:

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEN  
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCAFRRGGVYWGPGBT

LTVSS; (서열 21);

[0462]

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

[0463]

● VL:

DVVMTQSPLTLSVAIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLISL  
VSKLDGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHFPGTFGGGTKLEIK;  
(서열 25);

[0464]

[여기서, CDR1은 KSSQSLLDSDGKTYLN (서열 26)이고, CDR2는 LVSKLD (서열 27)이며, CDR3은 WQGTHFPGT (서열 28)이다].

[0465]

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

[0468]

● VH:

EIQLQQSGAELVKPGASVQLSCTGS~~GF~~**NIEDYY**IHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEN  
 DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCAF**RGGVY**WPGPTT  
 LTVSS;(서열 29);

[0469]

[0470] [여기서, CDR1은 **GFNIEDY** (서열 30)이고, CDR2는 **DPENDE** (서열 31)이며, CDR3은 **RGGVY** (서열 32)이다].

[0471]

● VL:

DVVMTQSPLTLSVAIGQSASISCKSS**QSLLDSDGKTY**LNWLLQRPGQSPKRLISL  
 VSKLDGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLG~~I~~YYCW**QGT**HFP**G**TFGGTKLEIK;  
 (서열 33);

[0472]

[0473] [여기서, CDR1은 **SQSLLDSDGKTY** (서열 34)이고, CDR2는 **LVS** (서열 35)이며, CDR3은 **GTHFPG** (서열 36)이다].

[0474]

#### 실시예 5: 뮤린 항-EGFRvIII 항체의 인간화

[0475]

뮤린 EGFRvIII 항체를 인간화하는 것이 임상적 환경에 요망되는데, 여기서 마우스-특이적 잔기는 뮤린 CAR 구축물로 형질도입된 T 세포로의 치료를 받은 환자에서 인간-항-마우스 항원 (HAMA) 반응을 유도시킬 수 있다. 하이브리도마 유래된 뮤린 EGFRvIII 항체의 VH 서열과 VL 서열은 공개된 문헌으로부터 추출하였다 (Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy, 23:1043-1053, 상기 참조). 인간화는 뮤린 EGFRvIII 항체로부터의 CDR 영역을 인간 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 뒷받침하는 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 뮤린 서열로부터 보존하였다. 추가로, 인간 J 요소 JH6 및 JK4를 중쇄와 경쇄에 각각 사용하였다. 이로써 생성된 인간화 항체의 아미노산 서열은 도 9에 도시된 경쇄의 경우에는 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 아니라 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, 추가 검증을 위한 가용성 scFv를 생성시켰다. VL 도메인과 VH 도메인이 scFv 내에서 보여지는 순서는 다양하였고 (즉, VL-VH, 또는 VH-VL 배향), "G<sub>4</sub>S" 소단위 (서열 37)의 4개 카페 [여기서, 각 소단위는 서열 GGGGS (서열 37)를 포함한다]를 사용하여 상기 프레임워크를 연결시켰다. 도 9는 카바트 등 및 코티아 등 (상기 참조)에 의해 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 허용하는 요소 (앰피실린 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. 이를 가용성 scFv를 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  $\mu$ g의 플라스미드로 형질감염시켰다. 세포를 37°C, 125 rpm, 8% CO<sub>2</sub> 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)900 PF 필터 유닛 (w/0.8/0.2  $\mu$ m 슈퍼 막, PALL) 내로 여과시켰다. 대략 400  $\mu$ l의 Ni-NTA 아가로즈 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  $\mu$ 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 EC<sub>50</sub>

[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 혼탁 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 회석시켰다. 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 EC<sub>50</sub>은 도 10에 도시된 바와 같이 약 5 nM인 것으로 결정되었다. 모든 인간화 EGFRvIII scFv 변이체는 한 자릿수의 EC<sub>50</sub> 값 내지 낮은 두 자릿수 nM EC<sub>50</sub> 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, 뮤린 3C10과 비교해서 개선된 안전성 프로파일을 표시한다. 이들 연구에 근거하여, 물론 2173이 실시예 8에 나타낸 바와 같이, 추가의 임상 특성화를 위해 선별되었다.

#### 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)<sub>4</sub> (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.

[0495] 이를 클론은 모두, CD3제타 쇄로부터 유래된 공동자극 도메인의 신호 도메인 상의 Q/K 잔기 변화를 함유하였다.

[0496] <표 2>

[0497] 인간화 EGFRvIII CAR 구축물

명칭	서열 번호	서열
<b>CAR 1</b>		
CAR1 scFv 도메인	38	eiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpfqgrvitadtstntvymelsslrsedtavyycarfrrgvwywgqgtvtvssgggsg ggssggggsggggsdvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpg qppkrllsvskldsgvpdrfsgsgsldftltisslqaedvavyycwqgthfpftfgggtkv eik
CAR1 scFv 도메인 nt	39	gaaatccagctggtcaatcgggagctgaggtaaagaagccgggagccacccgtcaagatct catgcaagggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccg ggaaaaggcctggaatggatggcagaatcgacccagaaacgacgaaactaagtacgga ccgatttccaaggaagagtgacttacccgcatactcaaccaataccgtctacatggAAC tgagctcgctccgtccgaagatactgcagtgtattactgtgccttcggaggggtgtactg gggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggaggcggagggcggaggaggcgggag cggaggcgggtggctcggtggcggaggaaagcgcacgtggatgaccgcgtccggactc cctcgccgtgagccctcgaggagaggcgactatcaattgcaagtgcgtccagtcactctgga ttccgatggtaaaacgtaccccaactggctgcagcaaaagccaggcagccacccaaacgg tgatctcccttggtccaaactggatagcggagtgcctgcggcttcgggtccggtagcgg gaccgacttcacccgtacgtcactgcaggcggaggacgtggcagtgtactactgct ggcaggagaaccactccctggcacccttggaggtggcacaagggtggagatcaag
CAR1 가용성 scFv - nt	40	atggcccccctgtcaccgcctgtcgtccgcgtggcttctgcgtccacgcgcgtggcc aaatccagctggtcaatcgggagctgaggtaaagaagccggagccacccgtcaagatctc atgcaagggtcggttggattcaacatcgaggactacttactgcgtggcagcaagctccgg

[0498]

		gaaaaggcctggaatggatggcagaatcgaccaggaaaacgacgaaactaagtacggac cgatttccaaggaaagagtgactatcaccgcccatactcaaccaataccgtctacatggact gagctcgctccgtccgaagatactgcagtgtattactgtgccttcggggaggggtactgg ggccaaggaaactactgtcactgtcgtcaggaggcgagggcgaggggggggggggggggg ggaggcggtggctcggtgg ctcgccgtgaggctcgagagagggggactatcaattcaagtcgtccacttctggatt ccgatggtaaaacgtacactcaactggctgcagcaaaaaggccaggccagccacccaaacggtt gatctccctgtgtccaaactggatagcggtgcctgaccgcttcgggtccggtagcg accgacttcacccgtacgatcactgcaggggaggacgtggcagtgtactactgctg gcagggaaccactccctggcacccttggagggggcacaagggtggagatcaagggatcg caccaccatcaccatcatcatc
CAR1 가-용-성 scFv - aa	41	Malpv tallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsfniedyyihwvqqap gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstnvyamelsslrisedtavyycafrrgvy wgqgttvvssggggssggggssggggssgggsvvmtqspdslavslgeratinckssql ldsdgktylnwlqqkpgqppkrislvsksldsgvpdrfsgsgsldftltisslqaedvavyy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhh
CAR 1 – 완전 – nt 렌티바이 러스	42	atggccctccctgtcaccggccctgtcttcgcgtcttcgtccacgcgcgtcgcccg agatccagctggcagtcggagactgaagtcaaaaaggcctggcacaaccgtcaagatctcg tgcaaggatcagggtcaacatcgaggactactacatccatgggtcaacaggcaccgg aaaaggcctggaggtggatggggaggattgacccagaaaatgacgaaaccaagtgacc gatcttccaaggacgggtgaccatcacggctgacacttccactaaccgtctacatggact ctcgagccctcggaagataccgcgggtactactgcgcctttagagggtggagactactgg ggacaaggactaccgtcaccgtgtcgtcagggtggcggaggatcaggcggaggcggctcc ggggaggaggaaagcggagggtggctcgacgtggatgacgcagtcaccggactcc ttggcggtgagggctgggtgaacgcgcactatcaactgcagactccagactgtctgg ctccgatggaaagacttatctcaattggctcaacagaaggcctggcagccggaaagagac tcatctcaactggtgagcaagctggatagcggagtggcagatcggtttcggatgggctcag gcaccgacttccctgactattccctccctcaaggcggaggatgtggcgtactactgtgg cagggactcactccggggacccctcggtggaggcactaagggtggagatcaaaccactac ccagcaccgaggccaccacccacccggctctaccatgcctccagcctctgcccgtc cggaggcatgagaccgcagctggtgcccgtcataccggggctlgacttcgcctgc

[0499]

		gatactctacatctggccctctggctgtacttgcgggtctgcgtcttactctgtact ctttactgtaaagcgcggtcggaaagaagctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactaaggaggaggacggctgtcatgcgggtcccaagaggaggagaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgcctccagccataagcaggggcag aaccgcgtctacaacgactcaatcttgcggagagaggatgcacgtgtccgacaagc gagaggacggggccagaatggggcggaaagcgcgcgagaaaatcccaagaggc ctgtacaacgactccaaaggataagatggcagaagcctatacgagattggatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaggccacgcggactgtaccaggactcagcaccgcacca aggacacatctgacgccttcacatgcggccctgcgcctcg
CAR 1 – 완전 - aa	43	malpvtallplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedvihwvqqap gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslsedtavyycarfregg vyywggggttvssggggggggggggggggggggdvvmtqspdslavslgeratinckss qslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsqsgsgtfdltisslqaedva vyywcqgthfpqfgggtkveikttppaprppptaptiasqplslrpeacrpaaaggavhtrg ldfaacdiywiplaqtcgvllslvitlyckrgrkklyifkqpfmrvpvtqeedgscrfpe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyneelngrreeydvldkrgrdpemggkprrk npqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkgdglyqqlstatkdydalhmqalpp r
<b>CAR 2</b>		
CAR2 scFv 도메인	44	dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsg vpdrfsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpqfpggtkveikgggggggggg ggggggggseiqqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslsedtavyycarfreggyvwwgqgtvt vss
CAR2 scFv 도메인 - nt	45	gatgtctgtatgacccagtcggccactccctcgactgtccttggagaacggccaccatc aactgcaaatcgagccagtactgtctggactcagacggaaagacccatctcaacttgc gcagaagccgtggccagccaccgaagcgcctgtactccctgtgtccaaagctggactcggc gtccggacaggtagcggtagcggctcgggaaccgcacttgcacttgcatttagctgc caagctgaagatgtggccgtctactgtctggcagggaccacttcccccggaccatttggc ggaggaactaaagtcgaaatcaaaggaggaggcggatcagggtggaggaggcagcggagg aggaggagcggccgtggccgtccgaaattcaacttgcataactccgggtccgggtgaag

[0500]

[0501]

		ggatcgggtggcggaggctcagaatccagctggtcagtcaggtgccgaagtgaagaag cctggggccacggtaagatctctgtcaaggggacggattcaacatcgaggattactacat ccattgggtcaacaggcccctgcaaggctgaaatggatggaaaggatcgaccccgaa gaatgacgagactaagtacggcccgatcttcaaggacgggtgaccatcactgcagacactt caaccaacaccgtctacatggactctctcgctgctccgaggacaccggctgtactact gtgtttcagaggaggactactggggacagggaaacgaccgtgaccgtcagtcaccact accccagcaccgaggccaccccccgtctaccatgcctccagccctgtccctcg tccggaggcatgttagacccgcagctggggccgtcataccgggtcttgacttcgc gcatatctacatttggccctctggctgtacttgcgggtctgctgtttcactctgtatca ctctttactgtaaagcgcggcggactaagctgtatcatcttaagcaacccttcatgaggc gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatccgggtccagaggaggaggagg gctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagccataagcagg gaaccagctctacaacgactcaatctggcgagagaggactacgacgtgctggacaag ggagaggacgggacccagaaatggggggagccgcgcagaaagaatcccaagagg cctgtacaacgagctccaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgtatgaaag gggaacgcagaagaggcAACGACGACTGTACCGAGGACTCAGCACGCCACC aaggacacatgacgtctcacatgcaggccctgcgcctcg
CAR 2 - 완전 - aa	49	malptallplallhaarpdvvmtpspdslavslgeratin <u><b>cssqsllsdgktyln</b></u> wlq qkpgqppkrlis <u><b>lvs</b></u> <u><b>kldsgvpdrfsgsgsgtdftl</b></u> tlsslqaedvavyy <u><b>cwqgthfp</b></u> <u><b>gtfg</b></u> ggtkveikggggsgggsgggsgggseilqlvqsgaevkkpbatvkisckgsgfmied <u><b>yyih</b></u> wvqqapkglewmgr <u><b>idpendetky</b></u> <u><b>pifqgr</b></u> rvitadtstntvymelssrsed tavyyca <u><b>frggvy</b></u> wgqgttvsssttppaprpptapfiasqplslrpeacrpaaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtgvllsllvitlyckrgrklliyifkqpfmrpvqtqeedgcscrpe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprkr npqeglynelqdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalpp r
<b>CAR 3</b>		
CAR3 scFv 도메인	50	eiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfmiedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk ygpifqghvtisadtsintvylqsslkasdtamyycafrrgvywgqgttvssggggsg ggggggggggggdsvvmtqspislpvtlgqspasisckssqslsdgktylnwlqrrpg qsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyyccwqgthfpfgggtkv

		eik
CAR3 scFv 도메인 nt	51	gagattcagctggccaaagcggcgcagaagtgaaaaagccaggaaatcggtgcgcac gctgtaaagggtccggctcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccag gaaaggggctggaatggatggacggattgacccggagaacgacgacaaaccagaatcgac cgatcttcaaggacacgtgactatctccggacaccagcatcaatacgggtacccatcaatg gtcctcaactcaaggcctcgatacccgatgtactactgcgcgttcagaggaggcgctactg gggacaaggactactgtgactgtcatcaggagggtggaggaagcggaggagggtggctcg ggcggaggfggatcgggaggagggtccgatgtggatgacccagtcggacttgc tcccggtgaccctcgacagcctgctagcatctcgatcaatccctgcgcaatccctgctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcggccctggccagagcccgagaaggctt atctcgctggatgcaagctggatagcggatgccccgaccggatcagcggctcagggtcagg aaccgattcaccttgaagatctcccgctggaaagccgaagatgtcgagactactgtctgg cagggtactacttcccgccggaccccttggatggcggactaaggctcgagattaag
CAR 3 - 가용성 scFv - nt	52	atggccctccctgtcaccgcctgtctccgcgtggcttctgcctccacgcgcgtcgcccg agattcagctggccaaagcggcgcagaagtgaaaaagccaggaaatcggtgcgcac ctgtaaagggtccggctcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgc aaggggctggaatggatggacggattgacccggagaacgacgacaaaccagaatcgac atcttcaaggacacgtgactatctccggacaccagcatcaatacgggtacccatgt cctcaactcaaggcctcgatacccgatgtactactgcgcgttcagaggaggcgctactgg gacaaggactactgtgactgtcatcaggagggtggaggaagcggaggagggtggctcg cgagggtggatcgggaggagggtccgatgtggatgacccagtcggacttgc ccggatgaccctcgacagcctgctagcatctcgatcaatccctgcgcaatccctgc gacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcggccctggccagagcccgagaaggctt tctcgctggatgcaagctggatagcggatgccccgaccggatcagcggctcagggtcagg accgattcaccttgaagatctcccgctggaaagccgaagatgtcgagactactgtcg agggtactacttcccgccggaccccttggatggcggactaaggctcgagattaaggctc acaccatcacccatcacccac
CAR 3 - 가용성 scFv - aa	53	<u>malpvtallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslriscckgsfni</u> edyyihwvrqmp gklewmgridpendetkygipifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrrg vywgqgttvssggggsgggsgggsgggsgggdvvmtqsplspvlgqpasisckss qslldsdgktylnwlqqrpqqsprllslnskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgv

		yycwqgthfpgrfggkveikgshhhhhhh
CAR 3 – 완전 - nt	54	atggccctccctgtcaccgcctgctccgcgtggcttcgtctccacgcgcgtggcccg aatccagctggcacaagcggagccgaggtgaagaagccggagaatccctgcgcacatctc gtgtaaagggttccggcttaacatcgaggattactacatccatcggtgagacagatggccgg caaaggctggatggatggccgcacgcacccggagaacgacaaaccaatacgacc aatcttccaaggacatgtactatcccgatcacccatcaacactgtctactgcgcgtgg gctcgctcaaggcgtcgataccgcacatgcactactgcgcattcagaggagggtgtactgg gccaggcactacggcgtaccgtcctcgagggtggagggtcaggaggcggaggctgg gcccgtggaggatcaggcggaggagaaggcatgtgtcatgactcaatcccactgcact gcctgtactctggggcaaccggcttccatctcatgcaagtcaagcacaatcgctgcactcc gacggaaaaacctacctaattggcttcagcagcgcaccgcactgcctcgaggctgat ctcactcgtcgaagctgactccggggatcccgaggatcggttagcggaaagcggatcggg ccgacttacgttgaagattacgcgggttggaaagccgaggacgtggaggctattactgcgtgc aggggacccacttcccgggacttcggaggaggacccaaagtgcgagattaagaccactac cccagcaccgcaggccaccaccgcctccatgcctccacgcctctgtccctgcgc cgaggcactgttagaccgcagctggggccgtgcataccgggtcttgacttcgtgc gatatctacatttggccctctggctgtacttgcggggctctgtcttactcgatcact ctttactgtaaagcgcggcggtaagaagctgtctgatcttaagcaaccctcatgaggctgt gcagactactcaagaggaggacggcgttcatgcggcgtccagaggaggagaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgcctcagctacaagcaggcc aaccagcttacaacgactcaatcttgcggcggagagaggatcgcacgtgtggacaagc gagaggacgggacccagaatggcgaaaaggcgcagaagaatcccaagagg ctgtacaacgactccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgcgatggatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgcggactgtaccaggactcagcaccc aggacacccatgacgccttcacatgcggccctgcggccctgg
CAR 3 – 완전 - aa	55	malpvtallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfnied <b>yyih</b> wvrqmp gklewmgr <b>idpendetkygpfqgh</b> vtisadtsintvylqwsslkasdtamyycaf <b>rg</b> <b>gvv</b> wqggttvssggggsgggsgggsgggsgvmtqspislpvqlgqpasis <b>ks</b> <b>sqslldsdgktyln</b> wlqqrpgqsprrlis <b>lvskl</b> dsvpdrfsgsgsgtdflkisrvead gvyycc <b>wqgthfpgr</b> fgggtkveikttppaprpptpaptiasqlsrlpeacrpaggavhtr glfdacdiyiwaplagtcgvlllsvitlyckrgrklliyifkqpfmrpvqtqeedgscrfp

[0504]

		eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreydvlkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqdkmaeayseigmkgerrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
<b>CAR 4</b>		
CAR4 scFv 도메인	56	dvvmtqsplspvtlgqpasisckssqsllsdgktylnwlqqrpgqsprrlsksldsgv pdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyywcqgthfpgtfggtkveikggggsgggsg ggggsgggsejqlvqsgaevkkpgelesrksgsfniedyyihwvrqmpgkglewmg ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrrgvywgqggtv tvss
CAR4 scFv 도메인 nt	57	gacgtcgtcatgaccagagcccgctgtcaactgcctgtgaccctggccagccggcgtccat tagctgcaaattctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtacttgaactcgctccaa cagcgccctggcaatcccaaggccgcttatctcactcgtcagcaagctcgatagcgggtgc ccagacagatttccggctcgatccggactgatccactctgaagatctcgccgggtggaa gccgaggatgtggaggtactattgctggcagggcactcactcccccggacgttggcgg aggaactaaggcgtcagatcaaaggaggaggtggatcaggcggaggtggagcggaggag gaggaagcgggtggaggttccgaaatccagctgtcaatcaggagccgaggtgaaga agccgggagaatccctcgcatctcgcaagggctcggtcaacatcgaggattactac atccacttgggtggcagatgccggaaaggggtggatggatggacgtcattgaccgg aaaatgtgaaaccatacggcgaatcttcaaggcgtaccattagcgtgacactt ccatcaacaccgtgtaccctcagtggctctactgaaggcgtggacactgccaatgtact tgcattcagaggaggggtctactggggacaggcaccaccgtgaccgtgagctcc
CAR4 – 가용성 scFv - nt	58	atggccctccctgtcaccggccctgtctgtcccgctggctttctgtccacgcggcgtggccg acgtcgtcatgaccagagcccgctgtcaactgcctgtgaccctggccagccggcgtccatta gctgcaaatccctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtacttgaactcgctccaa agcgccctggcaatcccaaggccgcttatctcactcgtcagcaagctcgatagcgggtgc cagacagatttccggctcgatccggactgttacttgcgtggcagggcactcactcccccggacgttggcga ccgaggatgtggaggtactattgctggcagggcactcactcccccggacgttggcga ggaactaaggcgtcagatcaaaggaggaggtggatcaggcggaggtggagcggaggagg aggaagcgggtggaggttccgaaatccagctgtcaatcaggagccgaggtgaagaa gccgggagaatccctcgcatctcgcaaggcgtggctcaacatcgaggattactacat ccactgggtggcagatgccggaaaggggttggatggatggacgtcattgaccggaa

[0505]

		aatatgtgaaaccaaatacggccaatcttccaaggccacgtgaccattagcgctgacacttc catcaacacccgtgtacccctcagtggcctcactgaaggcgctggacactgcccattactgt gcattcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctccggctgc atcaccatcatcaccaccatcac
CAR4 – 가용성 scFv -aa	59	<u>malpvtallplallhaarpdvvmtpqsplspvlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqq</u> rpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgtdftlkisrveaedvgvyyvcwqgthfpqtfgg tkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyi hwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam yycafrggvywgqggttvssgshhhhhh
CAR 4 – 완전 - nt	60	atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgcgtcttcgtctccacgcggctggcccg acgtcgcatgacccaatcccctctccctgcggcgtcaccctgggtcagccggcgtcgatctc atgcaaaagctcacagtcctgtggattcgacggaaaacctacttgaactggctccaaca gaggccgggtcagtcctcgacactgtatcgctggtagcaagactcgactcggtgtgc cggtatcggttcctcggtcaggatcgccaccgactttacgctcaagatccgagatggagg ccgaggatgtggagtgtactattgtggcaggacacgcatttcccgccggacccttggagg gggactaagggtggaaatcaaggaggtggcggatcaggcggaggaggcagcggccgg gtggatcaggaggcggagggtcagagatccagtcgttccaaagcggagcagaggtgaga agccaggcgtatccctcgcatatcgatcggacgggtcaacattgaagattactacat ccactgggtgcggcaatgcacggaaagggttggatggatggacggatcgacccaga aatatgtgaaactaagtacggaccgtatccaaaggacacgtcactatctcccgacacttc gatcaacacccgtgtacccctcagtggtggcgttgcataaggcgttcaacattgtactactgt gccttcggcggaggactactggggacagggactactgtgaccgtgtccaccactac cccacccggccaccacccacccggcttccatcgccctccagccctgtccctgcgtc cgaggcatgtatcccgacgtgtggggccgtgcataccgggttgcacttcgttgc gatatctacattttggccctctggctggacttgcggggctctgtcttgcactgtact ctttactgtaaagccgttgcggaaagactgtgttgcatactttaaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggcgttgcattgcgggttccagaggaggaggaaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaatcgccgcagcgcagatgcctcagcataagcaggccag aaccagcttacacaactcaatcttggcggagagaggactacgacgtgtggacaagcgc gagaggacgggaccaggaaatggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaagg

[0506]

		ggaacgcagaagaggcaaaggccacgcggactgtaccagggactcagcaccgcacca aggacacatatgacgcttcacatgcaggccctggccctcg
CAR 4 – 완전 - aa	61	malpv talllplallhaarpdvvmtqspislpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlq qrpqqsprrlslyskldsgvpdrfsgsgsldflkisrveaedvgvyyycwqgthfpqtf ggtkvekgggggggggggggggggseiqlvqsgaevkkpgeislriskgfniedy yihwvrqmpkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkas tamyycafrygvyywgqgtvtssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaaggavhr gldfacdiyiwiplagtcgvllslyitlyckrgrklllyifkqpfpqfmrpvqttqeedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyneinlgrreedydvlkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqqlstatkdydalhmqalp pr
<b>CAR 5</b>		
CAR5 scFv 도메인	62	eiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapkglewmgridpendet kygpifqgrvitadtstntvymelsslrsedtavycafrggvywgqgttvssgggsg ggggggggggggggdvvmtqspislpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpg qsprrlslyskldsgvpdrfsgsgsldflkisrveaedvgvyyycwqgthfpqtfgggtkv eik
CAR5 scFv 도메인 nt	63	gaaatccagctgtcagagcggagccgaggtaaagaaccgggtgctaccgtgaagatt catgcaaggatcggttcaacatcgaggattactacatccactgggtcagcaggacca ggaaaaggacttaatggatggccggatcgaccggaaatgacgagactaagtacggcc ctatcttcaaggacgggtgacgtacccgcagacactacgaccaacaccgttatatggAAC tctcgccctgaggctcgaaagatactgcgtgtactactgtgcgttgcggagggtgtactgg ggacagggtaccacccgtcaccgtgtcatcgccgggtggaggctccggtgaggagggtca ggaggccgttggaaagcggaggccgcgcgcgtgtcatgactcaatcgccgtgtcg ctgcccgtactctggacaaccccggtcatcagctgcaatcctcgactgtactgtact ccgatggaaagactacactcaactggctgcagcaacgcggccaggccaaatcccaagacgct gatctcggtgtcaagactggactcagggtgcggaccgggtctccggagcgggtcg gcacggatttcaactcaagactccagactggaaagccgaggatgtggactactgtct ggcagggaaccatccctggaaacttggccggaggactaaggctgagattaa
CAR5 - 기용-성	64	atggccctccctgtcaccgcctgtctgttccgtgtcttcgtctccacgcgcgtccggcc aaatccagctgtcagagcggagccgaggtaaacaaccgggtctaccgtgaagattca

[0507]

scFv - nt		tgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatggccggatcgaccggaaatgacgagactaagtacggccct atctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtatatgaaactc tcgtccctgaggccgaagatactccgtgtactacttgtcgcttcggaggtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcggcggtggaggctccgggtggaggagggtcag gaggcggtgaaagcgaggaggccgcagcgacgtgtcatgactcaatcgccgtcgc tgccgtcactctggacaaccccgccatcgcaactgcaacgcccaggccatcccaagacgc cgatggaaagactaccaactggctgcagcaacgcccaggccatcccaagacgc atctcggtggactcaagctggactcagggtgcggccggatctccggagcgggtcggg cacggattactctcaagatctccagacttggaaagccgaggatgtggagttactactgt gcagggaaaccatccctggaactttggcgaggactaaggcgagattaaaggagcc accatcatcatcaccaccac
CAR5 - 가용성 scFv -aa	65	<u>malpvtallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpbatvkisckgsgfniedyyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelsslrsedtavycafrrgvy wgqggtvssggggssggggssgggsvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqsl ldsdgktylnwlqrrpgqsprrlisvskldsgvpdrfsgsgtdftlkisrveadvygvyy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhh
CAR 5 – 완전 - nt	66	atggccctccctgtcaccggccctgtcgttccgtggcttctgtccacgcccgtccggccgg aaatccagtcgtcagagccggaggtaaaaaaccgggtgtaccgtgaagattca tgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatggccggatcgaccggaaatgacgagactaagtacggccct atctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtatatgaaactc tcgtccctgaggccgaagatactccgtgtactacttgtcgcttcggaggtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcggcggtggaggctccgggtggaggagggtcag gaggcggtgaaagcgaggaggccgcagcgacgtgtcatgactcaatcgccgtcgc tgccgtcactctggacaaccccgccatcgcaactgcaacgcccaggccatcccaagacgc cgatggaaagactaccaactggctgcagcaacgcccaggccatcccaagacgc atctcggtggactcaagctggactcagggtgcggccggatctccggagcgggtcggg cacggattactctcaagatctccagacttggaaagccgaggatgtggagttactactgt gcagggaaaccatccctggaactttggcgaggactaaggcgagattaaaccactac cccagcaccgaggccacccacccggctaccatcgcccccagctctgtccctcgctc

		cgaggcatgttagacccgcagctggggccgtgcataccgggtctgacttcgcctgc gatatactacattggccctctggctggacttgcggggctctgccttactcgatcact cttactgtaaaggcggcgtcgaagaagctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggcgttcatgcgggtcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgcctacaaggcagggcag aaccagctacaacgaactcaatctggcggagagaggactgcacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccagaggcgc ctgtacaacgagctccaaaggataagatggcagaaggctatgcgagattgtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggcacgcggactgtaccaggactcagcaccgcacca aggacacatatgcgtcacatgcaggccctgcgcctcg
CAR 5 – 완전 - aa	67	malptallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvki cks gsf nied <b>dyvih</b> wvqqap gkglewmgr <b>idpendetkygpifqgr</b> vitadtstntvymelsslr sedtavyycarf <b>rgg</b> <b>vwgqgtvtvssggggssgggssgggssdvvmqsp</b> l pvtlgq pasic <b>ks</b> <b>qslldsdgktyln</b> wlqqrpgqsprrlis <b>lvs</b> kldsgvpdrfsgsgsdftlkisr veaedvg vyyc <b>wqgthfpgt</b> fggtkveikttppaprpptaptiasqplslrpeacrp aaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtgcgvlls l vlyckrgrk llyifkqpfmrvqttqeedgcscr p e eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrrgrd p emggkprk npqeglynelqdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtdalhmqalpp r
<b>CAR 6</b>		
CAR6 scFv 도메인	68	eiqlvqsgaevkkpgeslr iscks gsf nied yyihwv rqmpk gkglewmgr <b>idpendetk</b> ygpifqghv tisadtsintvylq wss l kasdt amyycafrggv ywqgtv tvssgggsg ggssggggsggggsvvmtqspd slavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqkpg qppkr l islvskldsgvpdrfsgsgsdftltisslqaedvavyy c wqgthfpgt fggktv eik
CAR6 scFv 도메인 nt	69	gaaatccagctggcagtcaggcggcggaggtaagaaggcgggagactgcgtgagaatct cgtcaaggcgtcgggtcaacatcgaggactactacattcactggcgtaggcagatccg ggaaaggactgaaatggatggccggatcgcaccagaaaatgac gaaacc aatac cgg ccgattttcaaggccacgtgactatcagcgcagacacgaggcatcaacactgttacccatg ggcctcgcttaaggccagcgtaccgtatgtactactgcgcattcagaggcggggtgact gggacaaggaaaccactgtgaccgtgagcaggcgggatggcggctcgggagggtgg

[0509]

		agcgaggaggagggtccggcggtggaggatcagatgtcgtatgacccagtcccgactccctcgctgtctcactggcgagcgccgaccatcaactgeaaatcgagccagtcgttgcactccgatgaaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaaccccaagcgctcatctcgctgtcaaaaactcgattcggagtgccagaccgctctcggggtccggagcgaaactgactttacttgaccattcctcaactgeagccgaggatgtggcgttactgtgcagggcacgcattccctggaaaccttcggggcgaactaagggtggaaatcaag
CAR6 - 가용성 scFv - nt	70	atggccctccctgtcaccgcctgctgtcccgctggctctgtctccacgcgcgtcgcccgaaatccagctgtgcagtcaggccgaggatcagaagccggagagtcgtgagaatctcgtcaaggcgctgggttcaacatcgaggactactacattcactgggtcaggcagatgcgggaaaggactggaatggatggatggccgatgcaccagaaaatgacgaaaccaaatacgcccgatttcaaggccacgtgactatcagcgcagacacgcatcaacactgtctacccctcagtgctctcgcttaaggccagcgtacccgtatgtactactgcgcattcagaggccgggtgtactgggacaaggaccactgtgaccgtgagcagccggagggtggcggctcggggagggtggagcgaggaggatccggcggtgggactatcgtgatgaccgtcccgactcctcgctgtctcaactggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaatcgagccagtcgttggactccgatgaaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaaccccaagccgtcatctcgctgtgtcaaaactcgattcggagtgccagaccgttctcgggtccggagcggactgacttactttgaccattcctcaactgeagccgaggatgtggcgttactgtggcagggcacgcattccctggaaaccttcgggtggcggactaagggtggaaatcaagggatcacaaccatcatcaccatcaccat
CAR6 - 가용성 scFv - aa	71	<u>malpytallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslriskgsgfiedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrrgvywgqgttvssggggssggssggssggssdvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrllsvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgifgggtkveikgshhhhhhh</u>
CAR6 – 완전 - nt	72	atggccctccctgtcaccgcctgctgtcccgctggctctgtctccacgcgcgtcgcccgagattcagtcgtcaatcgaggccgaggatcaagaagccaggagatccttgcggatctcatgtcaaggtagccgttaacatcgaggattactacatccactgggtgaggcagatgcggggaaaggactcgaatggatggacggatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacggccgtatcttccaaggccatgtgactattagcgcgcatactcaataaccgtgtatctgaatggctcattgaaaggccatgcagataccgcgtactactgtgttcagaggagggtctactgggaa

[0510]

[0511]

		ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrrggywqggttv tvss
CAR7 scFv 도메인 nt	75	gacgtggatgacccaatgcgcagattccctggcagtgtccctggcgaaacgcgcactatt aactgcaaatcgcacagtccctgtgattccgcacggaaagacactacctaattggctcagc agaagccaggacaaccgccaagagactgatccctgtgtcaaagctggactcggag gcctgatecggtctcggttagcgggacggcactctgaccatctcgactcc ggctgaggacgtggccgtgtattactgtggcagggtactcacttccggcacitcggagg ggcaccacggatggagattaaaggaggaggcgaagcggaggtggaggatcggagg tggagcggcggaggaggcggagatccagctgtccaaatcggagcggaaatgaga agccggagagtcacttgcataatcgcaagggtggctcaacatcgaggattactaca tccattgggtccgcagatgcctgttgcataaggactggaatggatgggaggattgaccggaa aacgacgaaactaagtgacggaccatcttcagggcacgtgactatctccgctgataacctca atcaataactgtctacccatggcctcgctgaaagcaagcgcacaccggcgtactactgc ccttccggggaggaggatgtacttggccaaggcaccacggtcacggcactcc
CAR7 - 가용성 scFv - nt	76	atggccctccgtcaccgcctgtcgttccgtggctctctgtccacgcggctggcccg acgtggatgacccaatgcgcagattccctggcagtgtccctggcgaaacgcgcactatta actgcaaatcgcacagtccctgtgattccgcacggaaagacactacctaattggctcagca gaagccaggacaaccgccaagagactgatccctgtgtcaaagctggactcggag cctgatcggtctcggttagcgggacggcaccgactctgaccatctcgactcc gctgaggacgtggccgtgtattactgtggcagggtactcacttccggcacttccgg gcaccacggatggagattaaaggaggaggcgaagcggaggtggaggatcggagg gggacggcggaggaggcggagatccagctgtccaaatcggagcggaaatgaa gcccggagacttagatctcatgcacgggtcggtcaacatcgaggattactac ccattgggtccgcagatgcctgttgcataaggactggaatggatgggaggattgaccggaa aacgacgaaactaagtgacggaccatcttcagggcacgtgactatctccgctgataacctca atcaataactgtctacccatggcctcgctgaaagcaagcgcacaccggcgtactactgc ccttccggggaggaggatgtacttggccaaggcaccacggtcacggcactcc tcaccaccatcaccatcatcac
CAR7 - 가용성	77	<u>malpvtallplalllhaarpdvvmtpspdslavslgeratinckssqslldsgktylnwlqq</u> kpgqppkrislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavycwqgthfpftfggg

[0512]

scFv - aa		tkveikggggggggggggggggggseiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyi hwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam yycafrrggywqgqttvssgshhhhhhhh
-----------	--	--

CAR 7 완전 - nt	78	atggccctccctgtcacccgcctgtcgttccgctggcttctgtccacgcgcgtcgcccg acgtggtgatgactcagtcgctgactcgctggctgtccctggagagcggcactatca attgcaagtcatcccagtcgtctggattccgacggaaaacctcaccaatggctcagca aaaaccggacagccccaagcgctcatcgctgggtgtccaaagtggacagcggcgt ccagaccgcttcccggtcggaaagcggtaactgttacgctgaccatctatccccaag cgaggatgtggcgtactactgttggcagggcagcgttccggcactttggaggag ggaccaaggcgaatcaaggaggaggagggtggctcgccggaggaggctggaggagg aggatcaggaggcgggtgaagcgagattcaactggccagagcggcgcagaatcaagaa gccgggtgaatcgtcagacaatcgccgaaaggatcggttcaacatcgaggactacat tcactggcagacaatcgccgaaaggctggatggatgggaggatcgaccgg aaacgatgaaaccaagtacggacaatcttcaaggacgtgaccattcggcggacacct caatcaacactgtgtacccctggactacttacggccatgtacttgc cgcttcccgagggggtgtactggggacaggactactgtgaccgtgtcatccaccactac cccagcaccggggccaccaccaccggcttaccatcgccctccagcctgtccctgc cgaggatgttagccgcagctgggtggccgtcataccgggtctgacttcgcctgc gatatctacattggccctctggctggacttgcggggctctgtgttactcgtgatact ctttactgtaaaggcggcgtcggaaagactgtgtacatcttaagcaaccctcatgaggctgt gcagactactcaagaggaggacggcgttcatgcgggtcccagaggaggaggaggc ctgcgaactgcgcgtaaattcagecgcagcgcagatgcctcagctacaagcaggcag aaccagctacaacgaactcaatcttgcggagaggactacgcacgtgctggacaacgc gagaggacgggacccagaaatggcgggaagcgcgcagaaagaatccccaaaggaggc ctgtacaacgagctccaaaggataagatggcagaagctatagcggatggatgatgaaagg ggaacgcagaagggcaaaggccacgcggactgtaccaggactcagcaccgcacca aggacacctatgacgccttcacatgcagccctggcctcg
CAR 7 완전 - aa	79	malpvtallplallhaarpdvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlq qkpgqppkrlis <b>lvs</b> ksldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyy <b>cwqgthfpgtfg</b> ggtkveikggggggggggggggggggggseiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedy

[0513]

		<b>vihwvrqmpkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasd</b> tamyycaf <u>rggvv</u> wqggtvsssttpaprptpaptiasqlsrlpeacrpagggavhtr gldfacdiyiwiaplagtcgvllslyitckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeegcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelngrreeydvlkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtyalhmqalp pr
<b>CAR 8</b>		
CAR8 scFv 도메인	80	dvvmtqsplspvtlgqpasisckssqsllsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvsklldsgv pdrfsgsgsldftlkisrveaedvgvyyccwqgthfpgtfgggtkveikggggsgggsg ggggggggseiqlvqsgaevkkgatvksckgsgfniedyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycarfrrgvywgqgtv vss
CAR8 scFv 도메인 nt	81	gatgtggcatgacgcagtcaccactgtccctccctgtgacccttggacagccagcgtcatt agctgcaagtcatccaatccctgtcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagc aaagacccggcagagccctaggagactcatctcgatggatcaagactggacagccggatgt ccggacccggatccggatccggatccggacggacttcactctgaagatttcacgggggaa gctgaggatgtggagatgtactactgtcggcagggaaaccattccctggactttggcgg ggaaactaaggcgaatcaaggagggatggctcgggaggagccggatcggggagg cgggagccggaggatccgaatccaaatccactgtccagtcaggagccgaatgt accgggagccaccgtcaaaatccactgtcaaggatccggatccaaatccggactactac ccactgggtgcagcaagctccggcaaggactggatggatggggcatccggac gaacgacaaaccatacggccgatccaaaggccggatccggactccggac ctcaactaactgttgcacatggactgtcggatccctgcgtccgaagataactgc actgtcactactgtcggctccggatccggactggggacaggccaccactgt actgtcagctcg
CAR8 - 가용성 scFv - nt	82	atggccctccctgtcaccgcctgtcgctccgtcgctctgtccacgcgcctcgcccg atgtggcatgacgcagtcaccactgtccctccctgtgacccttggacagccagcgtcgat gctgcaagtcatccaatccctgtcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagca aagacccggcagagccctaggagactcatctgtggatcaagactggacagccggatgt ccggacccggatccggatccggatccggacggacttcactctgaagatttcacgggg ctgaggatgtggagatgtactactgtcggcagggaaaccattccctggactttggcgg gaactaaggcgaatcaaggagggatggctcgggaggagccggatcggggaggc

[0514]

		gggagccggaggagggtccaaatccaacttgtccagtcaggagccaaatgaa ccggagccaccgtcaaaatcagctgtaaaggatcgggatcaatatcgaggactactacat cactgggtcagcaagctccggcaaaaggactggatggatggggcgcacccagag aacgacaaaccaaatacggccgatctccaaggcggtgaccatcaccggacaccc caactaacactgttatggagctgagctccctgcgcctccaaagatactgcagtcactactg cgcctccgcgtgtactggggacaggcaccactgtactgtcagctcggggtcc accatcatcaccaccaccatcac
CAR8 - 가-용-성 scFv - aa	83	<u>malpvttllplalllhaarpdvvmtqspislpvtlgqpasisckssqsllsdgktylnwlqq</u> rpgqsprllislvskldsgvprdfsgsgsgtdflkisrveaedvgvyyvcwqgthfpfgtfgg tkveikggggsggggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyi hwvqqapgkglewmgridpendetkygpfqgrvitadtstntvymelsslrsestdavy ycafrrggyvwwqggttvssgshhhhhh
CAR 8 – 완전 - nt	84	atggccctccctgtcaccggccctgctgctccgctggcttctgctccacgcccctggcc atgtggcatgacgcagtcaccactgtccctccctgtgacccttggacagccacgctgcatt gctcaagtcatccaaatccctgctgattcggatggaaagacccatctcaactggctgcacca aagacccggcagagccctaggagactcatctcgatggatggaaagacttgcggacaggcggatgg cgacccggatggatggactgtactactgtctggcagggaaaccatccctggcactttggcggag ctgaggatgtggagtgactactgtctggcagggaaaccatccctggcactttggcggag gaactaaaggtcgaatcaaggaggaggagggtcgccggagggccatggggggagg ggagccggaggaggagggtccgaatccaacttgtccagtcaggagccaaatgaa ccggagccaccgtcaaaatcagctgtaaaggatcgggatcaatatcgaggactactacat cactgggtcagcaagctccggcaaaaggactggatggatggggcgcacccagag aacgacaaaccaaatacggccgatctccaaggcggtgaccatcaccggacaccc caactaacactgttatggagctgagctgagctccctgcgcctccaaagatactgcagtcactactg cgcctccgcgtgtactggggacaggcaccactgtactgtcagctcggcaccactac cccagcaccgaggccaccacccggcttaccatcgctccctggcgcctctgatccctgc cgaggcatgtagaccggcagctggggccgtcataccggggcttgcacttgcctgc gatatctcatttggggccctctggctgtacttgcggggcttgccttactctgtatca cttactgtaaaggccggcgtcgaagaactgtctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcc gcagactactcaagaggaggacggcgttcatgcgggtcccaaggaggaggaaggccg

[0515]

		ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaaggcaggcag aaccagctcatacacaactcaatctggtcggagagaggagtacgcacgtgcggacaagcg gagaggacgggacccagaaatggcgggaagccgcgcagaagaatccccagaggc ctgtacaacgcgacttacaaaggataagatggcagaagcctatagcggagattggatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgcggactgtaccaggactcagcaccgcacca aggacacccatgacgccttcacatgcagggcctggcctcg
CAR 8 – 완전 - aa	85	malpvtallplallhaarpdvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlq qrpqqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgtdftlkisrveaedvgvyyycwqgthfpqtf ggtkveikggggsgggsgggsggggseiqlvqsgaevkkpgatvkiscckgsgfnied yyihwvqqapkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelsslrsed tavyycarfqggywqggttvvssttppaprpptaptiasqplslrpeacrpaaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtgcgvllsllvityckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnlqylnlgrreedydvlkrrgrdpemggkprrk npqeglynelqdkmaeayseigmkgerrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
<b>CAR 9</b>		파우스 항-EGFRvIII 클론 3C10
CAR9 scFv 도메인	86	eiqlqqsgaelvkpgasvklscfgfniedyyihwvkqrteqglewigridpendetkyg pifqgratidtssntvylqlssltedtavyycafrrggywqpgtltvssggggsgggsg gggshmdvvmtqspltsvaigqssasisckssqslldsdgktylnwlqrpqspkrlls skldsgvpdrftgsgsgtdftlrisrveaedlgiyycwqgthfpqtfqggtkleik
CAR9 scFv 도메인 nt	98	gagatccagctccaacagagcggagccgaactggtaaaccgggagcgtcggtgaagtgt catgcactggatggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccc agcaggggcttggatggatggatggacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtgcc ctatctccaaggacggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacccctac ttccagctgacctccggagacactggctgtactctgcgccttcagaggaggctgtactg gggaccaggaccatgtgaccgtgtcccgccggaggcggatcaggaggaggagctc aggcggctggccgtcgacatggacgtgtcatgactcgtccctgtgaccctgtcggtgg caatggacagacgcatccatctgtcaagagtcacagtcgtctggattccgacggaa agacttatctgaactggctgtccaaagaccaggccaaatccgaaacgccttatctccctgg gtcgaaactcgactcggtgtccggatcggtttaccggtagcgggtccggacggacttca ctctccgcatttcggagggtggaaageggaggatctcggatctactactgtggcaggaaacc

		acttccctggactttggaggccgaaactaagctggaaatcaag
CAR9 - 가용성 scFv - nt	87	atggccctccctgtcaccccccgtctgtccctggcttctgtccacgcgcctcgcccg agatccagctcaacacagagccggagccgaactggtaaaaccggggatcgctggtaagttgc atgcactggatcggtcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga gcagggctggatggatcgacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtgccgg tatcttcaaggacggccaccattacgggtacacgtcaagcaataccgttacccctgg tccagccgtaccccgaggacactgcccgtactactgcgccttcagaggaggcgtactgg ggaccaggaaccatgttgcggatcgacggggatcgatcaggaggaggaggtca ggcggtggccgtcgacatggacgttgcgtactcgttacgtccctggatccctgg aattggacagagccatccatctgtcaagagactcacgtcgttgcgttccgcgg gacttatactgaactggctgtccaaagaccaggccatccggaaacgccttacccctgg tcgaaactcgactcggtgtccggatcggttacccgttagccggatccggccacggactt ctccgcatttcgagggtggaaagccggaggatctggatctactactgttgcggagg cttccctggactttggaggccgaaactaagctggaaatcaagggtagccatcaccat ccaccatcat
CAR9 - 가용성 scFv - aa	88	<u>malpvtallplallhaarpeiqlqqsgaelvkpgasvklscfgfniedyyihwvkqrte</u> qglewigridpendetkygpifqgratidtssntvylqlssltedtavyycarfrrgvywg pgtltvssggggggggggggggshmdvvtqspstlsvaigqssasisckssqldsdgk ylnwllqrpgqspkrllsvskldsgvpdrftgsgsgtdftlrisrveaedlgiyycwqgthfp gtfgggtkleikgshhhhhhh
CAR 9 – 완전 - nt	89	atggccctccctgtcaccccccgtctgtccctggcttctgtccacgcgcctcgcccg agatccagctcaacacagagccggagccgaactggtaaaaccggggatcgctggtaagttgc atgcactggatcggtcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga gcagggctggatggatcgacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtgccgg tatcttcaaggacggccaccattacgggtacacgtcaagcaataccgttacccctgg tccagccgtaccccgaggacactgcccgtactactgcgccttcagaggaggcgtactgg ggaccaggaaccatgttgcggatcgacggggatcgatcaggaggaggaggtca ggcggtggccgtcgacatggacgttgcgtactcgttacgtccctggatccctgg aattggacagagccatccatctgtcaagagactcacgtcgttgcgttccgcgg gacttatactgaactggctgtccaaagaccaggccatccggaaacgccttacccctgg tcgaaactcgactcggtgtccggatcggttacccgttagccggatccggccacggactt

[0517]

		ctccgcattcgagggtggaagcggaggatctcggtactactactgtggcagggAACCA cttccctggactttggaggcggactaagctggaaatcaagaccactacccagcaccga ggccacccacccggctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgt gaccggcagctggggccgtcataccggggctgtactgcctgcgatatactacattt ggccctctggactgtcgccgtctgtactgtactgtactgtactgtactgtactgtactgt cggtcggagaagctgtactgtactgtactgtactgtactgtactgtactgtactgtactgt gaggaggcggcgtcataccggggctgtactgcctgcgactgtcgaactgtcgaactgtc gtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcataagcagggcagaaccagacttaca acgaactcaatctggcggagagaggactgcacgtgtggacaagcggagaggcgg acccagaaatggccggagaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcgttacaaccc ctccaaaaggataagatggcagaagcctatacgagatggatgaaagggaaacgcagaa gaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgtcttcacatgcaggccctggccctgg CAR 9 – 완전 - aa 90 malpvtallplallhaarpeiqlqqsgaelvkpgasvksctgsfniedyvihwvkqrte qglewigridpendetkygpifqgratidtssntvylqlssltsedtavyycarfgyvw gpgtltvssggggsgggsgggshmdvvmtqspltsvaigqasisckssqslldsdg ktylnwllqrpgqspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgtdftlrisrveaedlgiyycwqgt hfpqtfgggtkleiktttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyw aplagtcgvllsllvitlyckrgrkllifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeggcelrv kfsrsadapaykqgqnqlynelnlrreedydvlkrrgrdpemggkprknpqeglynel qkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR10		항-EGFRvIII 클론 139
CAR10 scFv 도메인	91	djqmtqspsslasvgdrvtitcrasqgirnnlawyqqkpgkapkrliyaasnlnqsgvpsrf gsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveikrtgstsgsgkpgsgegsev qvlesggglvqpggslrlscaasgftssyamswrvqapkglewvsaisgsggstnyads vkgrftisrdnskntlylqmnslaedtavyycagssgwseywgqgltvss
CAR9 scFv 도메인 nt	92	gatatccaaatgactcagagccctcatccctgagccgcagcgtcgagacagggtgaccat cacgtgcgggcatccaaaggcattagaataacttggcgtggatcagcaaaaaccaggaa aggcccccgaagcgcctgatctacgcggccctcaacccctcagtcaggagtgcctcgccctc accggggagcggtagcggactgagttacccttatcgtgtccctgcagccagaggactc gcgcacctactactgcctccagcatcactcgtacccttgacttcggagggcgaaccaaggc

		gaaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccgtaaacccggatgggagaaggatcg gaagtccaaagtgtggagagcggaggcggactcgtaacactggccggtcgcggctc agctgtggccgtcggtttactttcagctcgatcgatgtcatgggtcgccaggtccgg gaaaggggctggaatgggtgtccctatccgcgtggtaaggacccaattacggccac tccgtgaagggacgcttaccatcaccgtcaacggataactcaagaataactctgtacccatgatga actcgctgagagcggaggacaccgcagtgactactgcegcaggtaagcggctggccga atactggggacaggcaccctcgactgtcagctcc
CAR10 - 가용성 scFv - nt	93	atggccctccctgtcaccgcctgctgtcccgctggcttctgtccacgcggctcgcccg atatccaaatgactcagagcccttcatccctgagcggcagcgtcgagacagggtgaccatc acgtgcggggcatccaaaggcattagaaataacttggcggtatcagcaaaaaccaggaaa ggccccgaagcgcctgatctacgcggcctcaacccctcagtcaggagtgcgcctcg ccgggagcggtagcggactgagittacccttacgtgtccctgcagecagaggactcg cgacctactactgcctccagcatactcgtaaccctgacttcgggaggcggaaaccaaggctcg aaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccgtaaacccggatgggagaaggatcgga agtccaaagtgtggagagcggaggcggactcgtaacactggcggtcgctcgccctcag ctgtgcgcgtcggtttactttcagctcgatgtcatgggtcgccaggctccggaa aaggggctggaatgggtgtccctatccgcgtggtaaggcacaattacgcccactc cgtgaagggacgcttaccatcaccgtcaacggataactcaagaataactctgtacccatgaa ctcgcgtgagagcggaggacaccgcagtgactactgcegcaggtaagcggctggccaa tactggggacaggcaccctcgactgtcagctcccataccatcaccaccatcac
CAR10 - 가용성 scFv - aa	94	<u>malpvtallplallhaarpdiqmtqspssl</u> sasvgdrvtitcrasqirnnlawyqqkpk apkrluyaasnlsqgvpsrftgsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggikveik rtgstsgsgkpgsgegsevqvlesggglvqpggslrlscaasgftssyamswvrqapgkg lewsaisgsgstnyadsvkgrftisrdsnksntlylqmnslraedtavyycagssgwsey wgqgtlvtvsshhhhhh
CAR 10 완전 - nt	95	atggccctccctgtcaccgcctgctgtcccgctggcttctgtccacgcggctcgcccg atatccaaatgactcagagcccttcatccctgagcggcagcgtcgagacagggtgaccatc acgtgcggggcatccaaaggcattagaaataacttggcggtatcagcaaaaaccaggaaa ggccccgaagcgcctgatctacgcggcctcaacccctcagtcaggagtgcgcctcg ccgggagcggtagcggactgagittacccttacgtgtccctgcagccaggactcg cgacctactactgcctccagcatactcgtaaccctgacttcgggaggcggaaaccaaggctcg

		aatcaaacgcactggctcgacgtcagggccgtaaaccggatcggagaaggatcgga agtccaagtgcggagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgggtcgctcgccgtcag ctgtgccgcgtcggtttacttcagctgtacgtatgtcatgggtcgccaggctccggaa aaggggctgaaatgggtgtccgtatccgctcggtgaaagcaccaattacgcgcactc cgtgaaggggacgcgttccatctcgtacggataactccaagaataactctgtacccatgaa ctcgctgagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctggccgaa tactggggcagggcaccctcgtaactgtcagctccaccactacccagcaccgaggccac ccacccggcttccatccatcgcctccagcctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccg cagctgggtggggccgtgcataccgggttgcacttcgcctgcgatatctacattgggcccc tctggctgtacttgccgggtctgtctactcgtgatcactttactgtaaagcgcggctg gaagaagctgtcatcttaagcaaccctcatgaggcctgtcagactactcaagagga ggacggctgtcatgcggccatccagggaggaggaggaggcgtcgaactgcgcgtgaa attcagccgcagcgcagatgtccagccataagcaggggcagaaccagctacaacgaa ctcaatctggcggagaggaggtacgacgtgtggacaagcggagaggacggaccca gaaatggcgggaagccgcgcaagaagaatcccaagagggctgtacaacgagctcaa aaggataagatggcagaagctatagcgagatggatgaaagggaaacgcagaagagc aaaggccacgcggactgtaccaggactcagcaccgcaccaaggacacctatgacgctc ttcacatgcaggccctgcgcctcg
CAR 10 완전 - aa	96	malpv talllplallhaarpdiqmtqspsslsasvgydrvitcrasqgirnnlawyqqkpgk apkrliyaasnqlqsgvpsrftgsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsggtkveik rtgstsgsgkpgsggegsevqvlesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapkgk lewsaisgsggstnyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyycagssgwsey wgqgtlvtvsssttppaprptpaptiasqplslrpearcpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrkklyifkqpfmrvpqtqeedgcsclfpeeeeggcelrvkfsrs adapaykqgqnqlynelnlgrreeydvlkrrgrdpemggkprknpqeglynelqdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0520]

[0521]

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

[0522]

EF1 알파 프로모터

GTGAGGCTCCGGTCCCCGTCACTGGCAGAGCGCACATGCCACAGTCCCCGAG  
 AAGTTGGGGGGAGGGGTCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG  
 TAAACTGGGAAAGTGTGATGCGTGTACTGGCTCCGCCTTTCCCGAGGGTGGGGGA  
 GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTCGCAACGGGTTGC  
 CGCCAGAACACAGGTAAGTGCCTGGTGGTCCCGGGGCTGGCCTTTACGG  
 GTTATGCCCTTGCCTGAATTACTCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTG  
 ATCCCGAGCTCGGGTTGGAAGTGGGTGGAGAGTTCGAGGCCTGCGCTTAAGG  
 AGCCCCCTCGCCTCGTGTAGTTGAGGCCTGGCCTGGCGCTGGGCCCGCG  
 TGCGAATCTGGTGGCACCTCGCGCCTGCTCGCTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCA  
 TTTAAAATTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTCTGGCAAGATAAGTCTTGAA  
 ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTCGGTTTGGGCCGCGGCCGAC  
 GGGGCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTGGCGAGGCGGGCCTGCGAGCGCGC  
 CACCGAGAACATGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGC  
 CTCGCGCCGCGTGTATGCCCGCCCTGGCGCAAGGCTGGCCGGTGGCACC  
 AGTTGGCTGAGCGGAAAGATGGCCGCTCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA  
 TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTAGTCACCCACACAAAGGAAA  
 AGGGCCTTCCGTCCTCAGCGTCGCTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC  
 GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTGAGTACGTCGTCTTAGGTTGGGG  
 GGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTA  
 GGCCAGCTGGCACTGATGTAATTCCCTGGAATTGCCCTTTGAGTTGGAT  
 CTTGGTTCATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTCTCCATTCAAGG  
 TGTCGTGA(서열 97).

[0523]

*CAR9*, *CAR10* 및 선별 인간화 *EGFRvIII* CAR 구축물의 표면 발현 및 FACS에 의한 염색

[0524]

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

[0525]

Jurkat E6 세포를, 아마사 셀라인 뉴클레오팩터 키트 V (론자; 독일 펠른 AG) 및 프로그램 X-001을 이용하여 *CAR9* 벡터 또는 *CAR10* 벡터로 전기천공시켰다. 형질감염시킨 그 다음 날,  $0.5 \times 10^6$  개 세포를 0.2 ml FACS 완충액 (5% FBS를 함유하는 DPBS 완충액)에서 V자형 96 웰 판 [그赖이너 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 재현시키며, 4°C 하에 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충액으로 3회 세척하고, 2  $\mu$ l의 PE 항-인간 IgG Fc [잭슨 임무노리서치 라보라토리즈 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 미국 펜실베니아주 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.

[0526]

도 12에 도시된 바와 같이, Jurkat 세포에서 발현된 *CAR9*의 *EGFRvIII*-Fc 융합 단백질에 대한 결합성은 야생형 *EGFR*-Fc에 대한 것 보다 대략 1,000배 정도 더 강력하다. 더욱이, *CAR10*을 발현하는 CART 구축물은 *CAR9*와 비교해서 *EGFRvIII*에 대한 결합성이 상당히 더 낮은 것으로 (대략 40배) 나타난다. 이는 뮤린 *CAR9*가 *EGFRvIII*과 결합하긴 하지만, 야생형 *EGFR*과도 여전히 일부 결합성을 보유하고 있다는 것을 제안한다. 더욱이, 이는 *CAR9*가 *CAR10* 구축물 보다 *EGFRvIII*에 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,  $0.5 \times 10^6$  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  $\mu$ 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 낮은데, 이는 EGFR wt 단백질로의 염색에 대한 아래쪽으로의 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 실시해 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 (탈파립화)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] **재유도된 인간화 EGFRvIII-특이적 CAR T 세포의 생성**
- [0539] 인간화 EGFRvIII-특이적 CAR 렌티바이러스성 전이 벡터를 사용하여, VSVg 가짜형 렌티바이러스성 입자 내로 패키지된 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 활성화 시킨 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 보전하기 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 성상세포종-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 혼합한지 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 세포측정법에 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.

## 결과

[0544] EGFRvIII 표적 세포를 인식할 수 있는 인간화 CART-EGFRvIII 세포의 능력을 시험하기 위한 Jurkat 리포터 검정

[0545] 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 세포측정법에 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 뮤린 CAR9과 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, 뮤린 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. 이를 조작된 세포주는 사멸 검정을 위한 표적으로서 제공되었다. 다음 3개의 이펙터 CAR T 세포를 사용하여 표적 세포 사멸 특이성을 결정하였다: 1) 뮤린 3C10을 발현하도록 형질도입된 인간 T 세포 (CAR9), 2) 뮤린 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, EGFRvIII를 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, EGFRvIII를 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), EGFRvIII를 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 IFNg를 유도시켰고, 2) 어떠한 CAR T 세포 집단도 EGFR wt 발현성 세포에 반응해서는 IFNg를 유도시키지 못하였다는 것을 명백하게 입증해준다. 중요하게도, 이들 데이터는 상기 사례 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**

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 이종 면역기능저하 NOD/SCID/공통-감마 쇄/-/- 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  $1 \times 10^6$  개)의 CAR6 형질도입된 세포가 투여 처리된 마우스에서도, 종양 성장이 용량의존적 방식으로 마우스에서 현저하게 저하되었다.

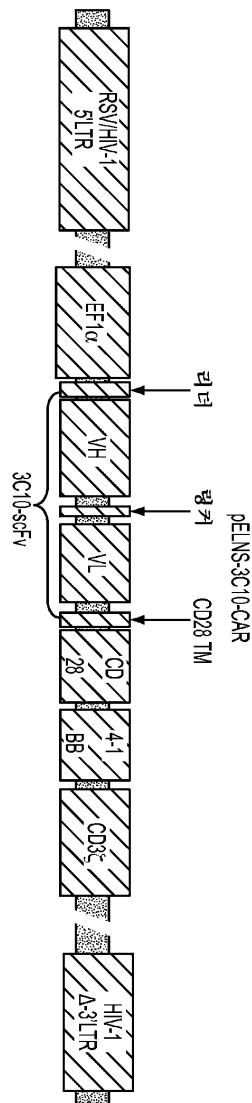
본 실시예에서는, EGFRvIII, GFP+Luc+를 발현하는  $1 \times 10^6$  개 U87vIII 인간 신경교종을 세척하고, 이를  $100 \mu\text{l}$  식염수 중에서 30마리의 NSG 면역기능저하 마우스 ( $N =$  군당 10마리)의 옆구리에 피하 주사하였다. 인간 T 세포를 항-CD3/28 코팅된 비드로 자극하고, 인간화 EGFRvIII CAR scFv #2173 (CAR6)으로 렌티바이러스적으로 형질도입하였다. 형질도입, 생체외 확장 및 비드 제거 후, CAR 형질도입된 T 세포 (유동 세포측정법에 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 전이 한지 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,  $0.5 \times 10^6$  개 및  $1.0 \times 10^6$  개 CAR6 T-세포가 투여된 군은 실험 30일자로, 각각 30% 및 90%가 생존하였다.

**[0561] 등가**

본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특히 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

도면 1a

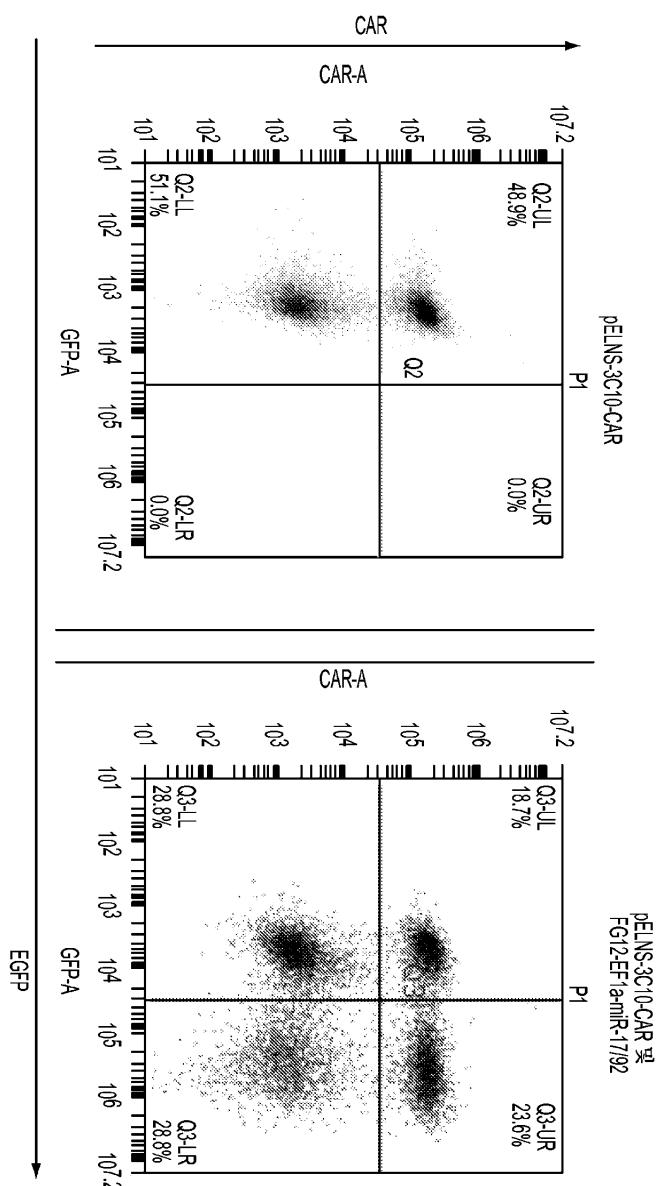


도면 1b

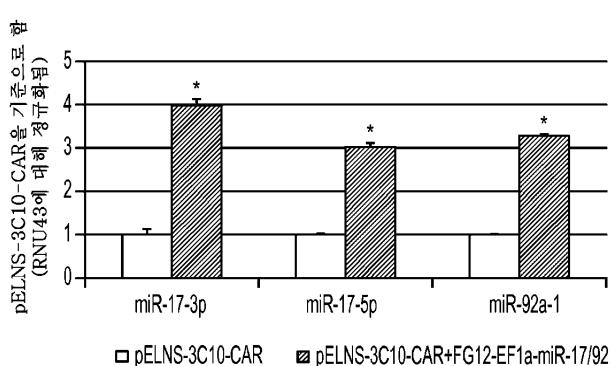


FG12-EE1a-miR-17/92

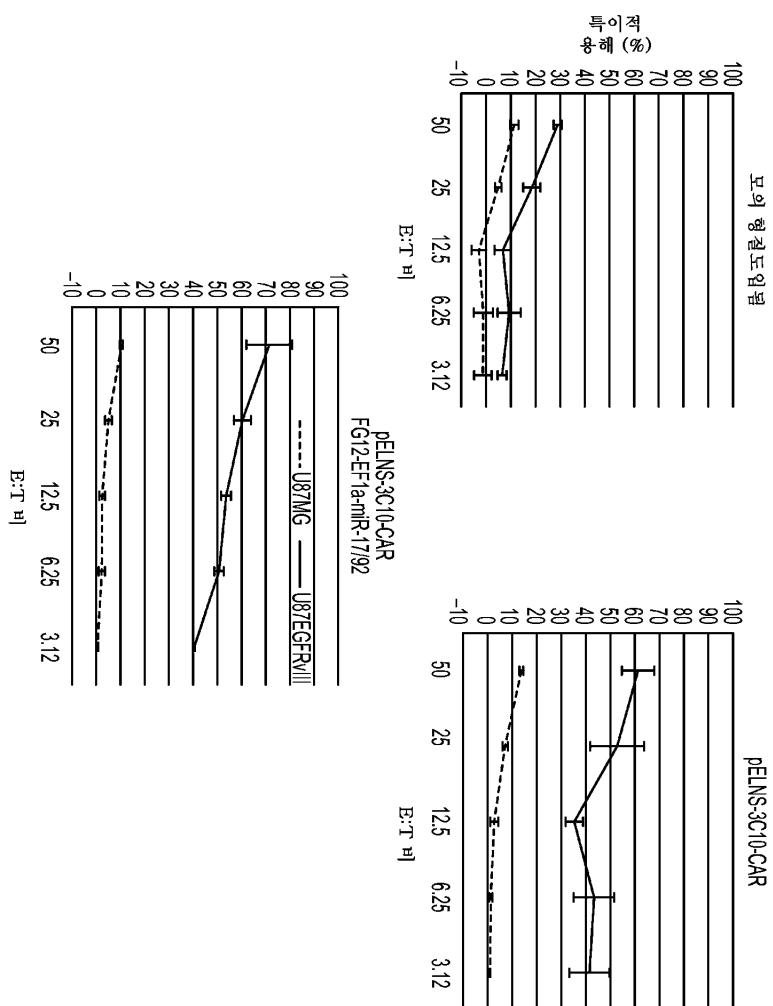
도면2a



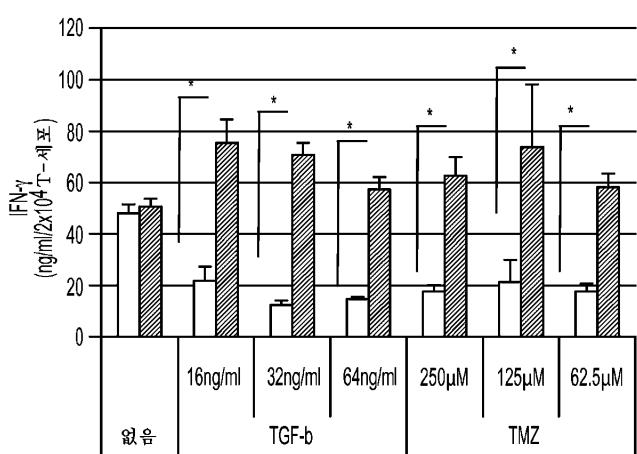
도면2b



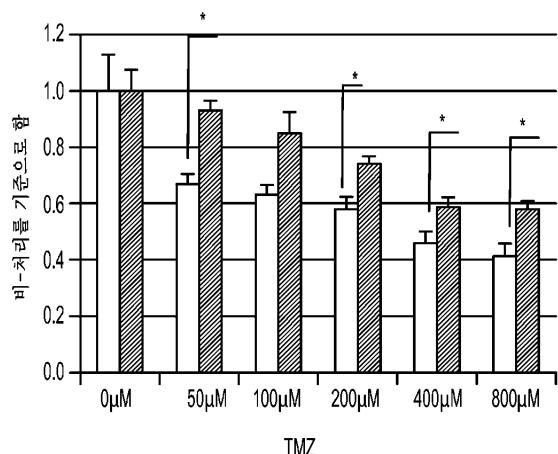
도면2c



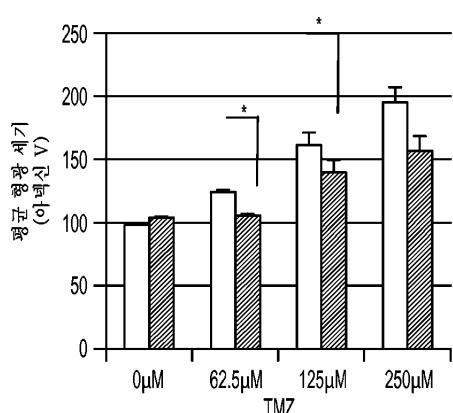
도면3a



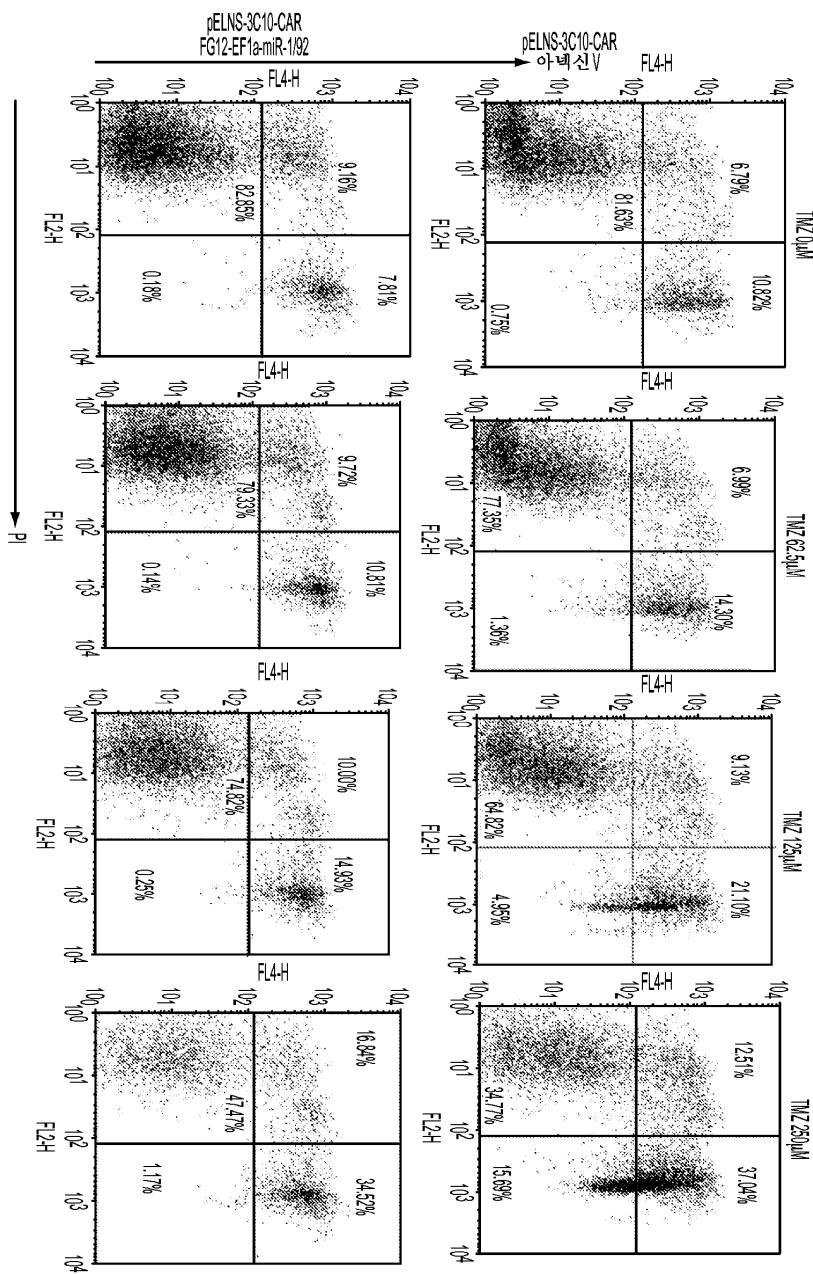
도면3b



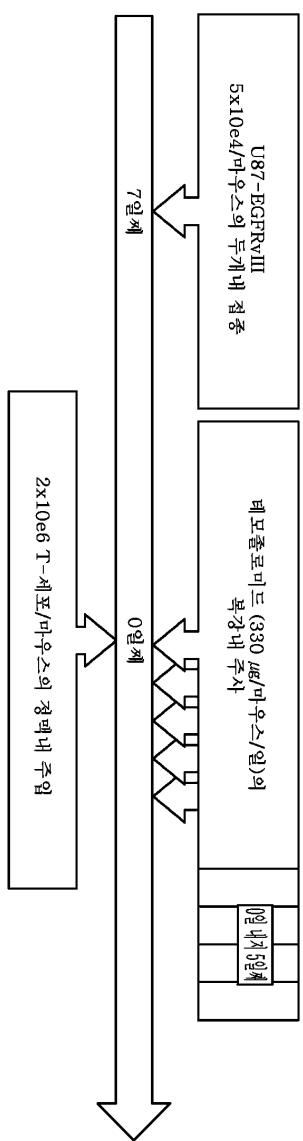
도면3c



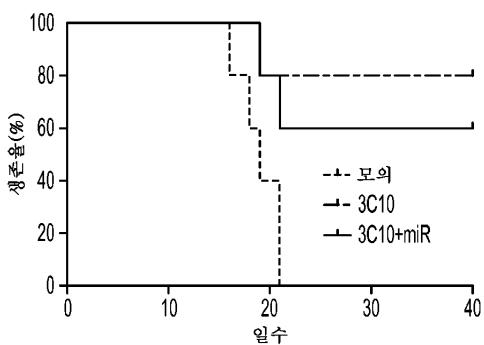
## 도면3d



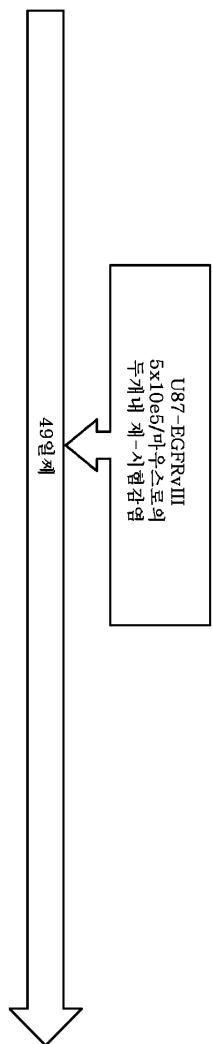
도면4a



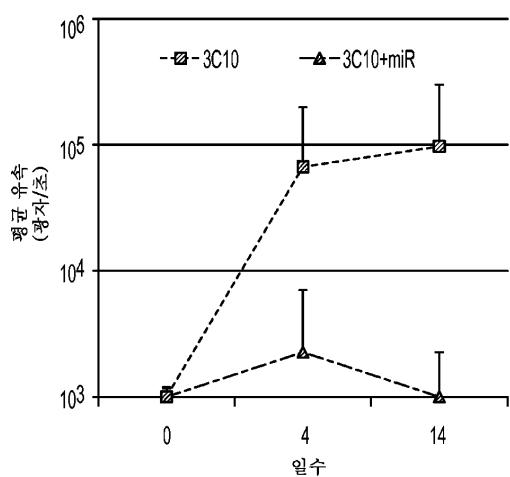
도면4b



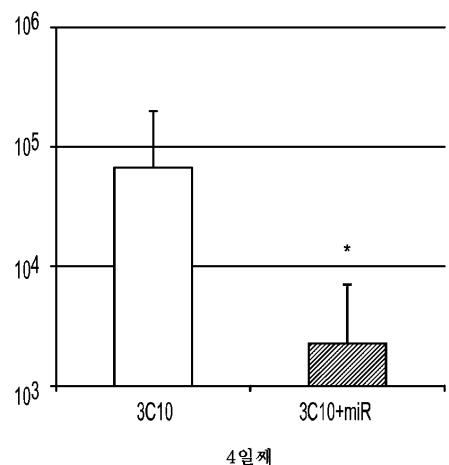
도면5a



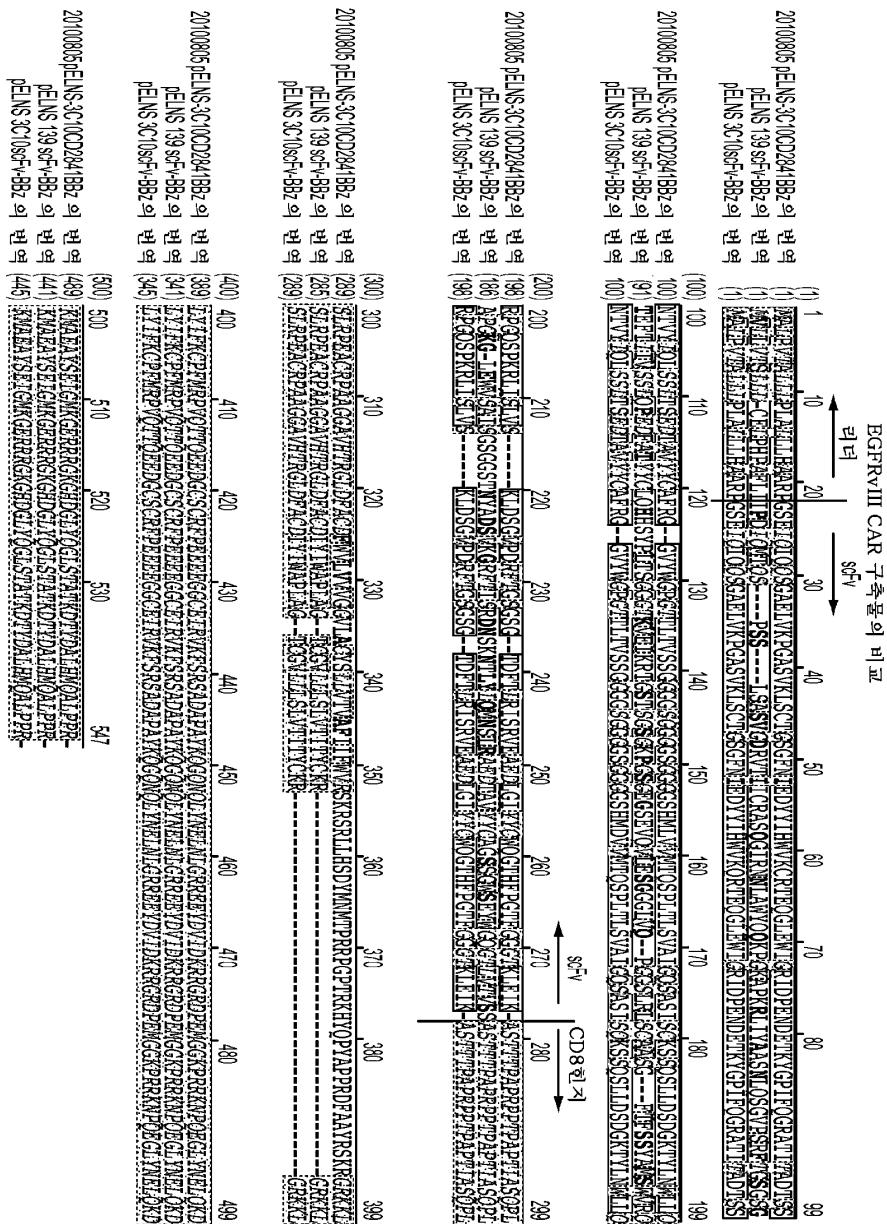
도면5b



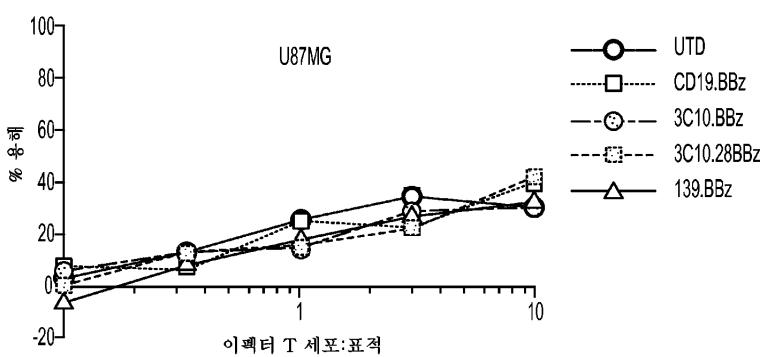
도면5c



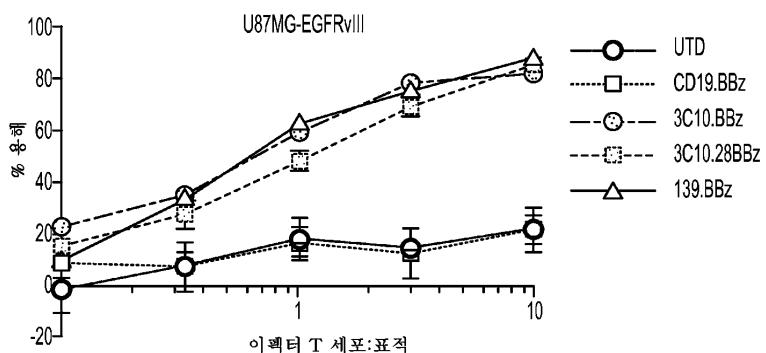
## 도면6



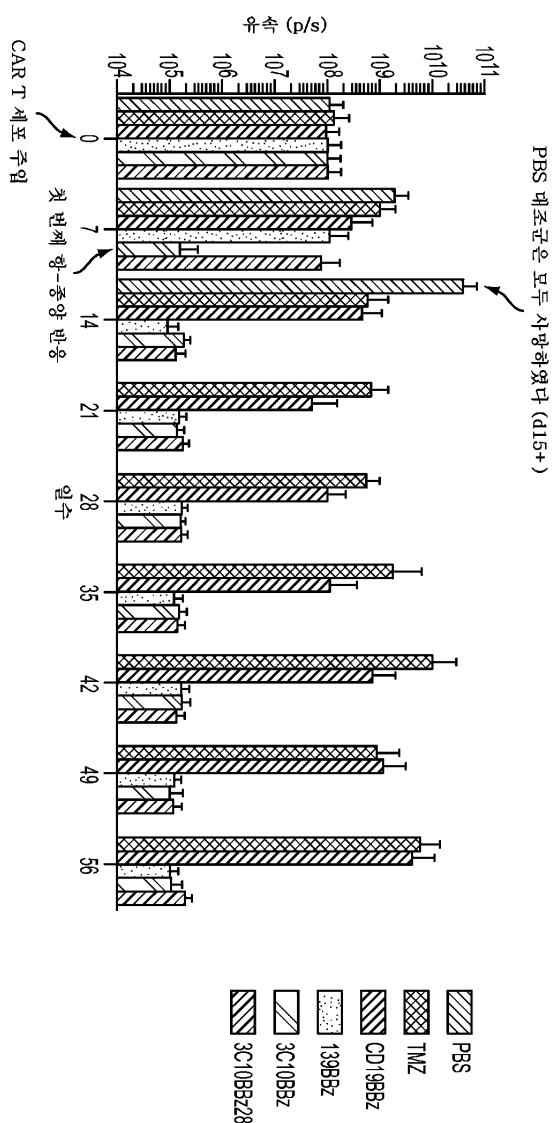
### 도면7a



도면7b



도면8



도면9

CDR 쪽의 코티아 CDR 쪽의 카바트	CDR H1	CDR H1	CDR H2	CDR H2
카바트 네뷸링				
뮤린 3C0Vh	I	I	G	G
WHAJh1	I	I	G	G
WHSJh1	I	I	G	G

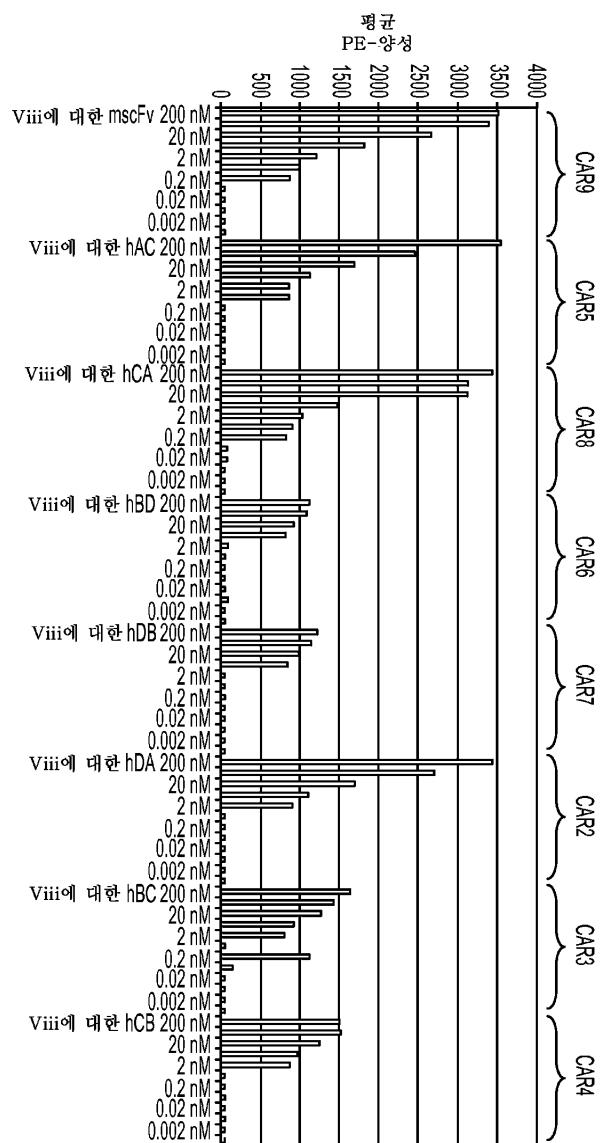
CDR 쪷의 코티아 CDR 쪷의 카바트	CDR H3	CDR H3	CDR H3	CDR H3
카바트 네뷸링				
뮤린 3C0Vh	R A T I T A D T S S N T V Y L O I S S L T S E D T A V Y Y C A F R G G	V Y W G P G T T I T V S S	V Y W G Q G T T V T V S S	V Y W G Q G T T V T V S S
WHAJh1	R V T I T A D T S S N T V Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A F R G G			
WHSJh1	H V T I S A D T S S I N T V Y L O W S S L K A S D T A M Y Y C A F R G G			

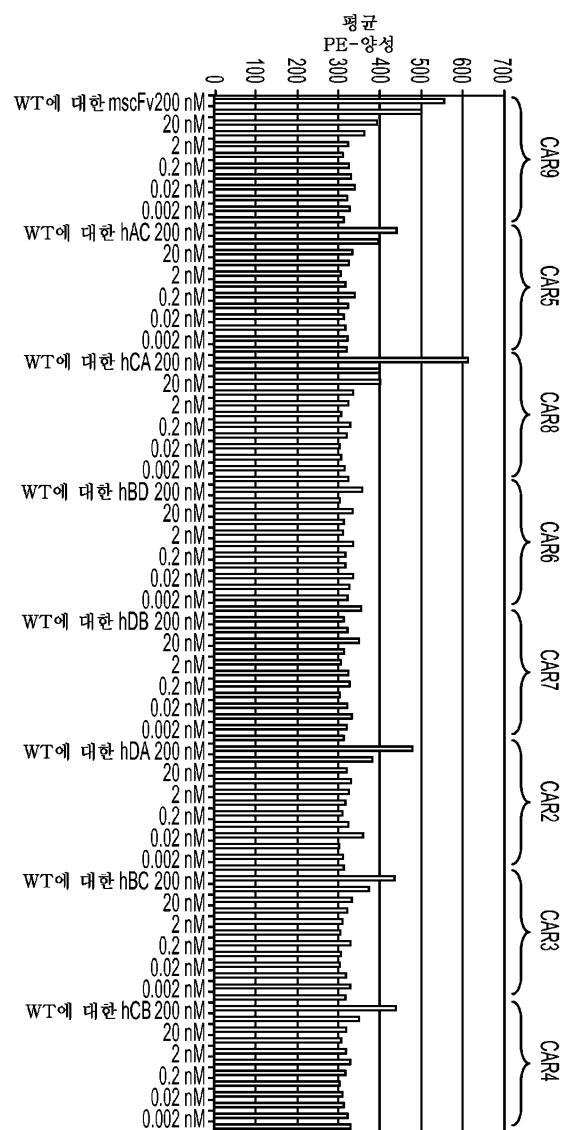
CDR 쪷의 코티아 CDR 쪷의 카바트	CDR 1	CDR 1	CDR 2	CDR 2
카바트 네뷸링				
뮤린 3C0Vh	D V V M T Q S P I T I S V A I G Q S A S I S C K S S Q S I L I D S D G K T Y I N N I L Q R P Q S P K R I S I V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E
WHAJh1	D V V M T Q S P I S P V T I G Q P A S I S C K S S Q S I L I D S D G K T Y I N N I L Q R P Q S P R I S I V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E
WHSJh1	D V V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S I L I D S D G K T Y I N N I L Q R P Q S P K R I S I V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E	V S K I D S G V P D R E

CDR 쪷의 코티아 CDR 쪷의 카바트	CDR 3	CDR 3	CDR 3	CDR 3
카바트 네뷸링				
뮤린 3C0Vh	T G S G S G T D F T R I S R V E A D I G I Y C W Q G T H E P	G T F G G G T K L E I K	G T F G G G T K V E I K	G T F G G G T K V E I K
WHAJh1	S G S G S G T D F T I K I S R V E A D V G V Y C W Q G T H E P			
WHSJh1	S G S G S G T D F T I S S L Q A E D V A V Y C W Q G T H E P			

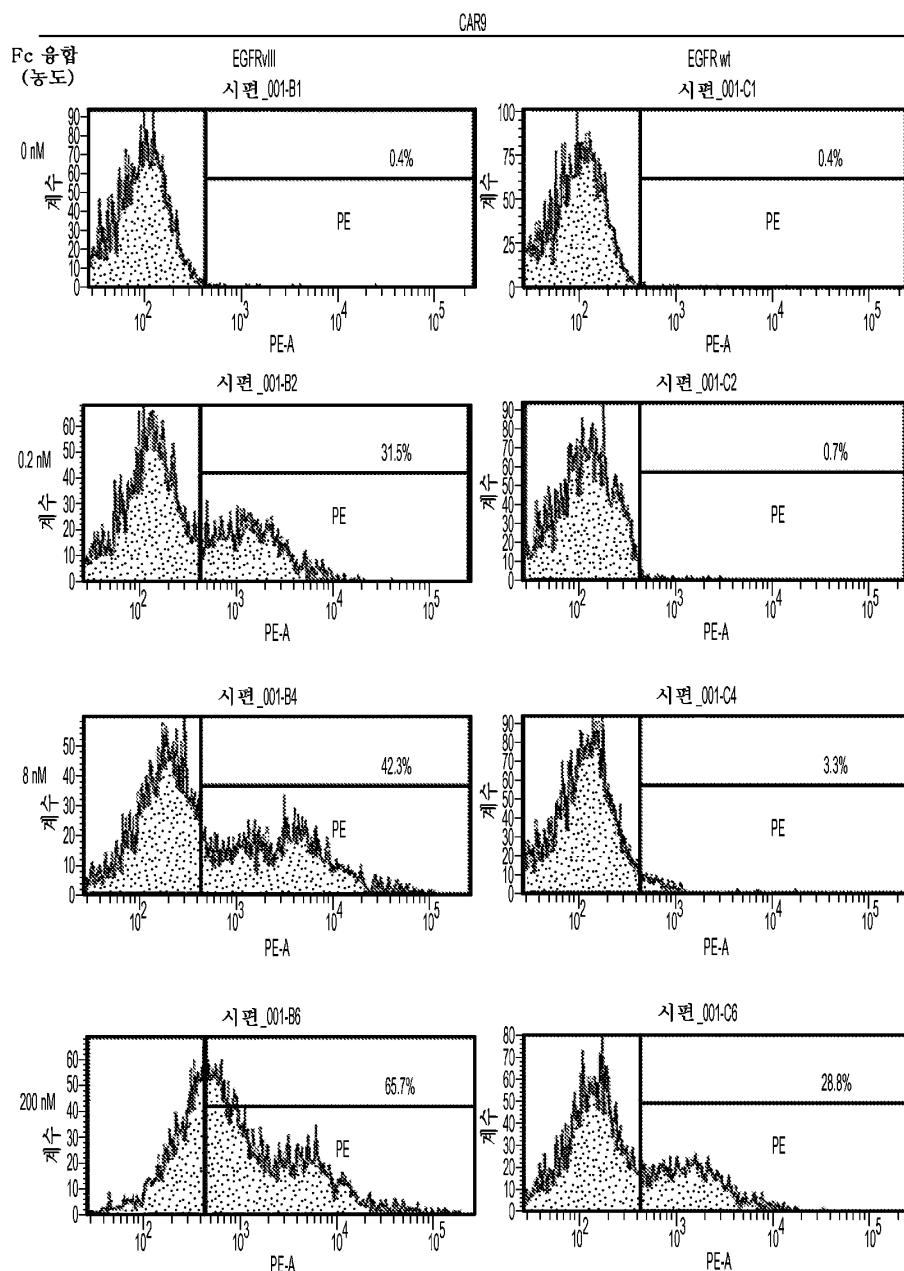
## 도면10



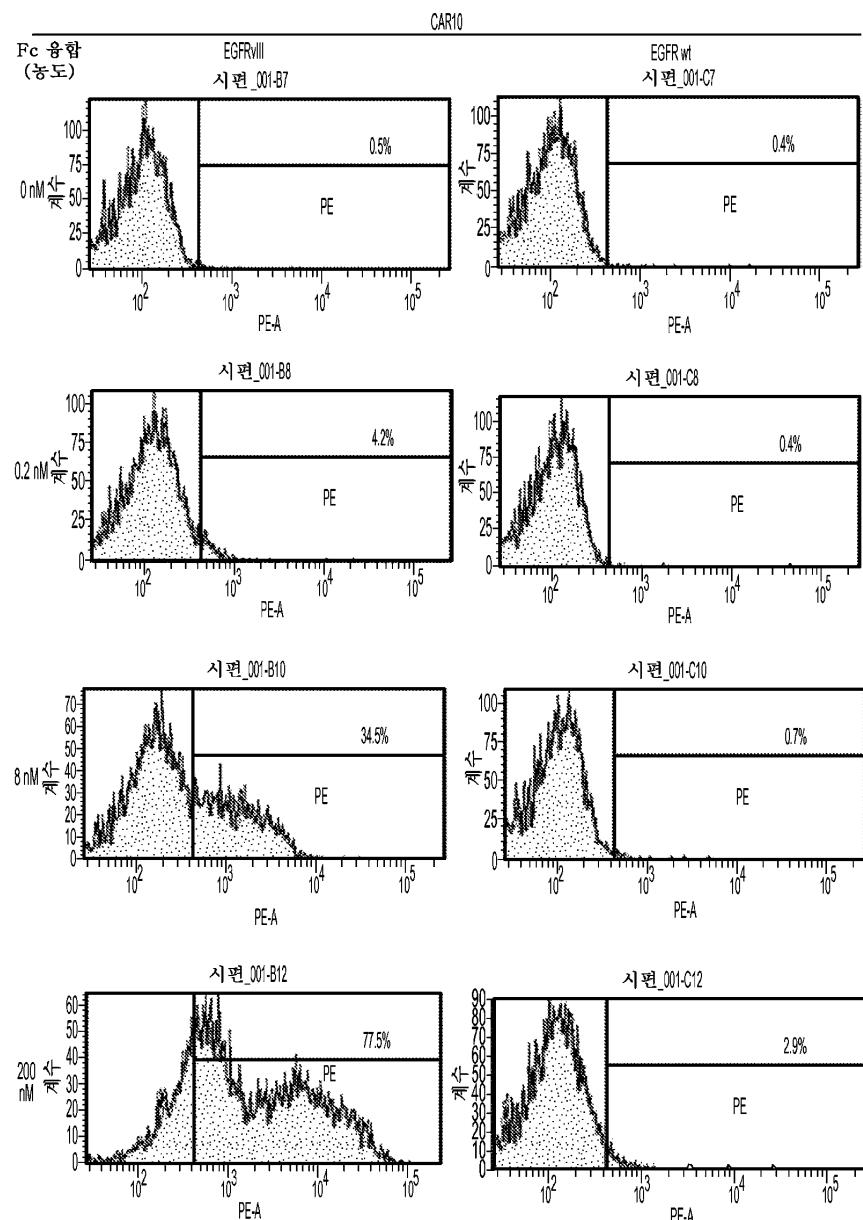
도면11



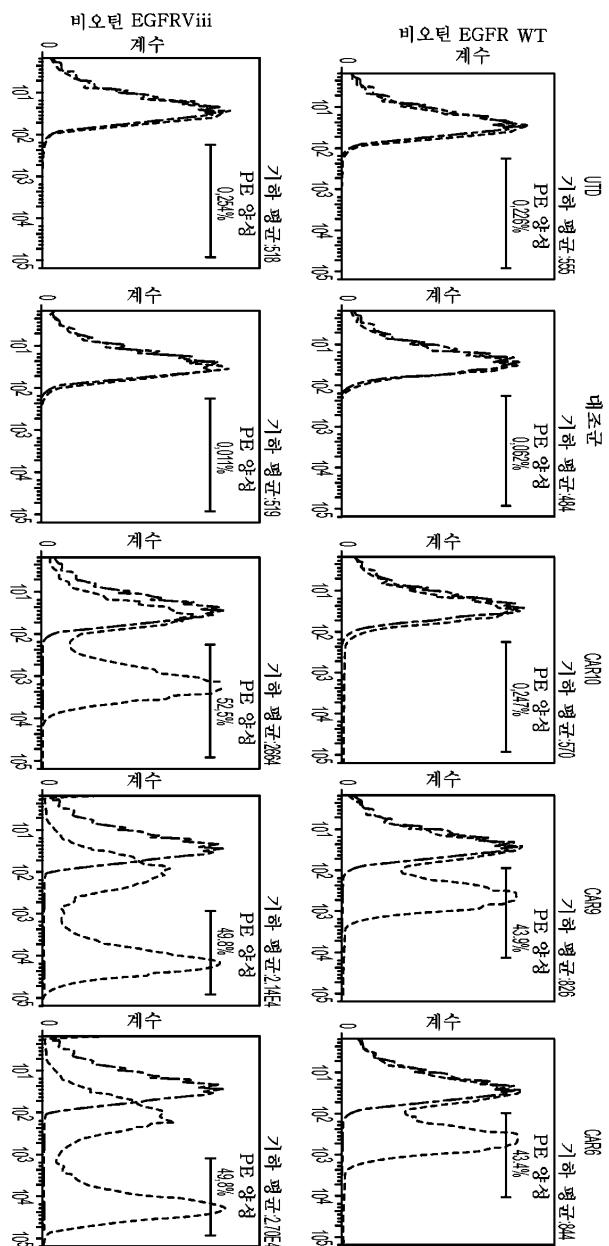
## 도면 12a



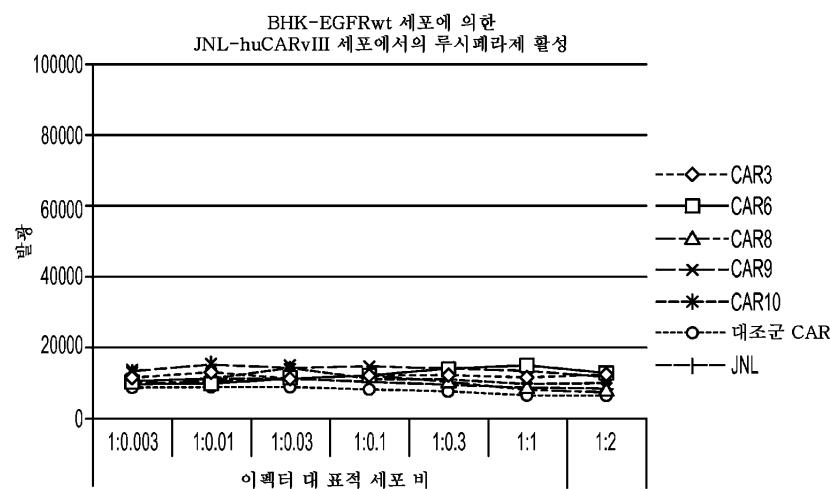
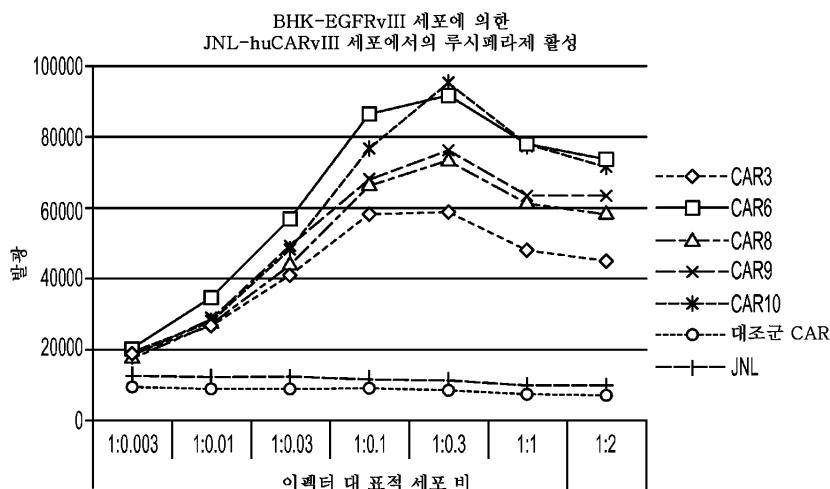
## 도면 12b



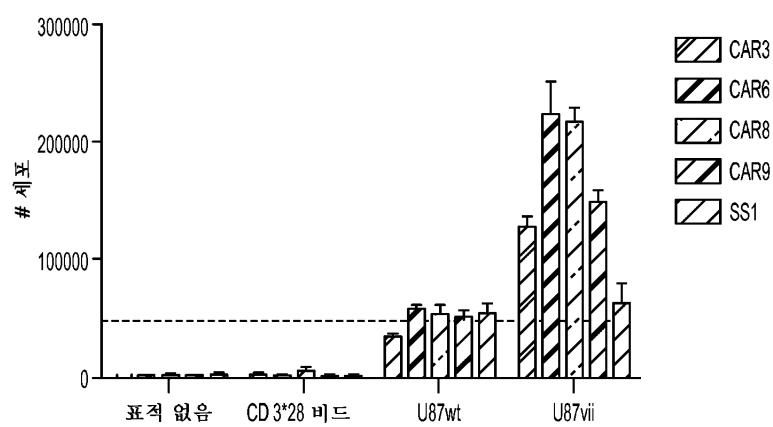
도면13



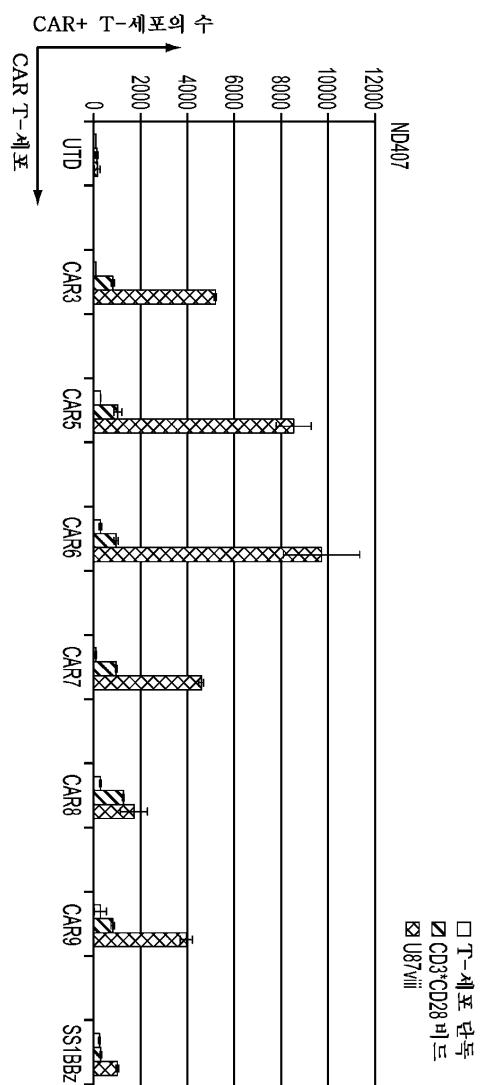
## 도면14



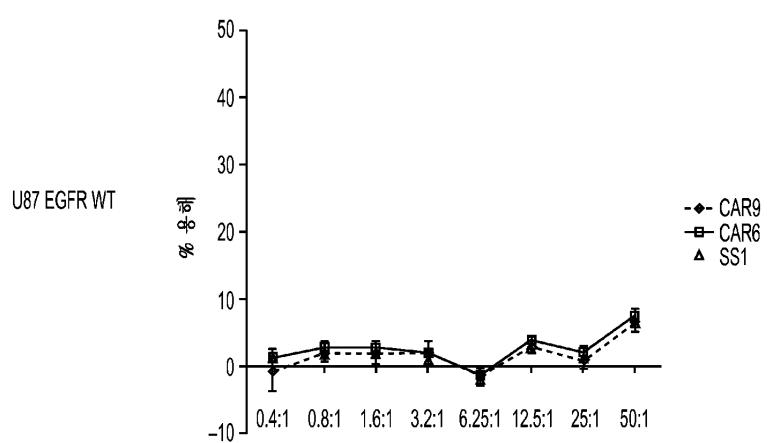
## 도면15



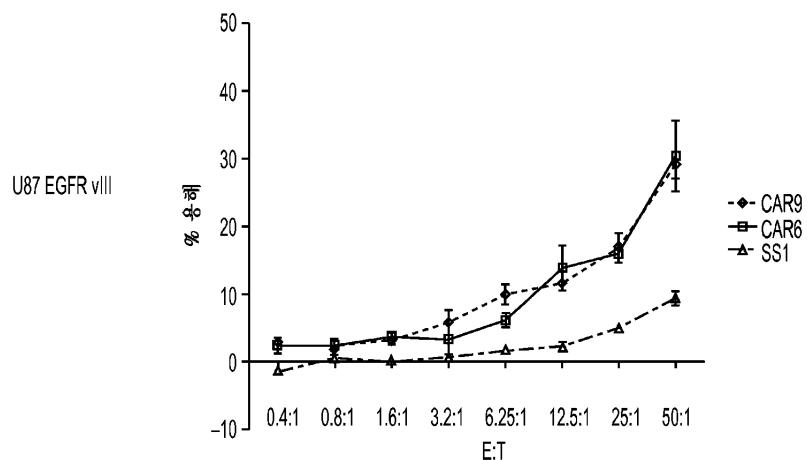
도면16



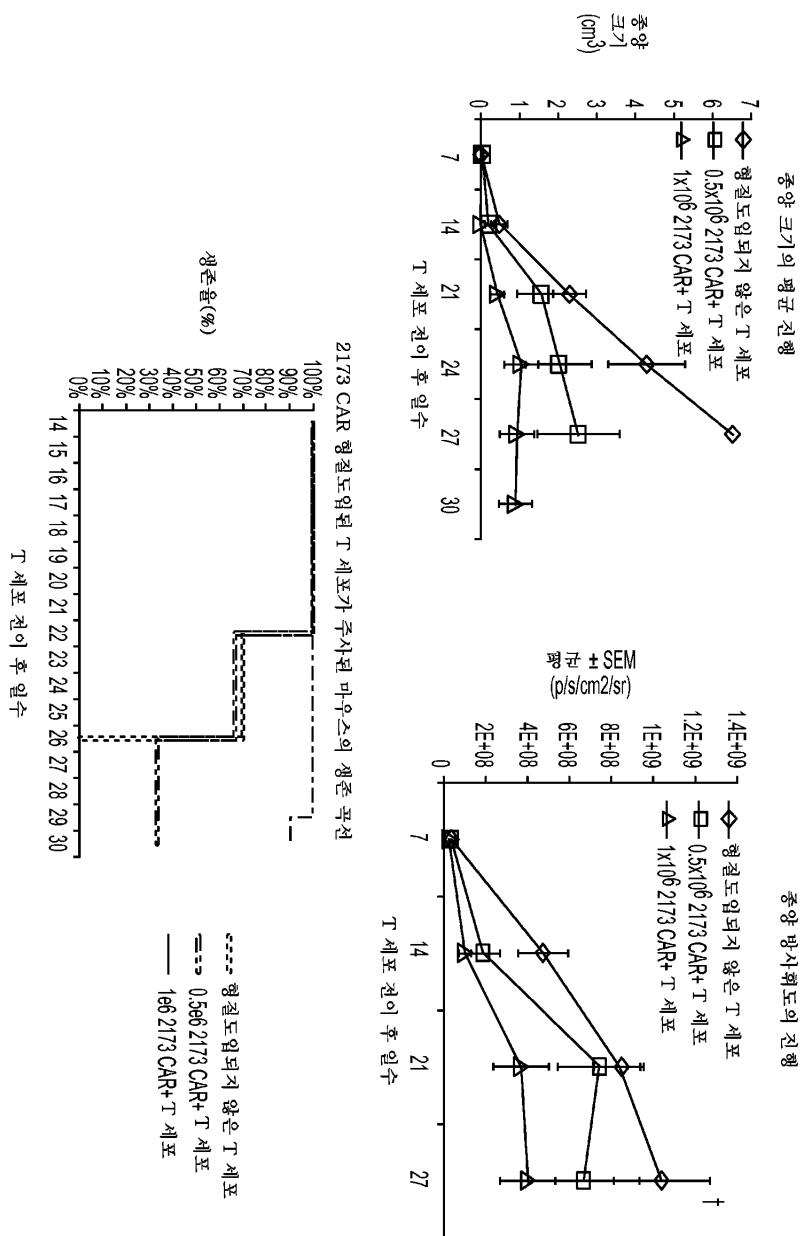
도면17a



도면 17b



## 도면18



## 서열목록

SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; NOVARTIS AG

TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM

OF HIGHER EDUCATION

&lt;120&gt; TREATMENT OF CANCER USING HUMANIZED ANTI-EGFRVIII

CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

&lt;130&gt; N2067-7000WO

&lt;140&gt;&lt;141&gt;&lt;150&gt; 61/888, 255

&lt;151&gt; 2013-10-08

&lt;150&gt; 61/767, 071

&lt;151&gt; 2013-02-20

&lt;160&gt; 127

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 535

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt;

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

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly

130	135	140	
Gly Gly Ser 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 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 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 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 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 Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser 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
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 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
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 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
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 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 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 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 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 tgtagcaatc tggggcagaa cttgtgaagc caggggcctc agtcaagctg	60
tcctgcacag gttctggctt caacattgaa gactactata ttactgggt gaagcagagg	120
actgaacagg gcctggaatg gatttggagg attgatcctg agaatgtga aactaaat	180
ggcccaatata tccagggcag ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagtctac	240

ctgcaactca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc ctttcgcgg	300
ggagtctact gggggccagg aaccactctc acagtctcct caggaggtgg tggttccgg	360
gggtgggtt ccggaggtgg tggttcacat atggatgtt tgatgaccca gtctccact	420
actctatcgg ttgcattgg acaatcagcc tccatcttt gcaagtcaag tcagagcctc	480
ttagatagt atgaaagac atatgtt tgggttac agaggccagg ccagtctcca	540
aagcgcctaa tctctgtt gtctaaactg gactctggag tccctgacag gttcactggc	600
agtggatcag ggacagattt cacactgaga atcagcagag tggaggctga ggatttggga	660

atttattt gctggcaagg tacacattt cctggacgt tcggggagg 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 ctgagcgcga gcgtggcga cagagtgacc	60
atcacctgtc gggccagcca gggcatcaga aacaacctgg cctggatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagagact gatctacgct gccagcaatc tgcagagcgg cgtgcccagc	180

agattcaccg gaagcggctc cggcaccgag ttcaccctga tcgtgtccag cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag caccacagct accctctgac cagcggcga	300
ggcaccaagg tggagatcaa gcggaccggc agcaccagcg gcagcggcaa gcctggcagc	360
ggcgaggaa gcgaggcaca ggtgctggaa tctggcgcg gactggtgca gcctggcgc	420
agcctgagac ttagctgtgc cgccagcggc ttcacccatca gcagctacgc catgtcttgg	480
gtccggcagg ctccctggaaa gggcctggaa tgggtgtccg ccatcagcgg ctctggcggc	540
tccaccaact acgcccacag cgtgaaggcgc cggttacca tcagccggga caacagcaag	600

aacaccctgt atctgcagat gaacagcctg agagccgagg acaccgcgt gtactactgt	660
cccgccagca gccccgtggag cgagtaactgg ggccaggcaca cactggtac agtgtctagc	720

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 6

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccg	63

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 135

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 7

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccctg	60
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg	120
gacttcgcct gtgtat	135

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

oligonucleotide"

<400> 8

atctacatct	ggcgccctt	ggccggact	tgtgggtcc	tttcctgtc	actggttatc	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	gaaaagaaact	cctgtatata	ttcaaacaac	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	cccgctaca	agcagggcc	gaaccagctc	60
tataacgagc	tcaatctagg	acgaagagag	gagtacgatg	ttttggacaa	gagacgtggc	120
cgggaccctg	agatgggggg	aaagccgaga	aggaagaacc	ctcaggaagg	cctgtacaat	180
gaactgcaga	aagataagat	ggcggaggcc	tacagtgaga	ttggatgaa	aggcgagcgc	240

cggagggggca	aggggcacga	tggccttac	cagggtctca	gtacagccac	caaggacacc	300
tacgacgccc	ttcacatgca	ggccctgecc	cctcg			336

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 243

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus sp.

&lt;400&gt; 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 Ser 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 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 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 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

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 Cys Glu Leu

35 40

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 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

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1605

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 18

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggatccg agattcagct gcagcaatct gggcagaac ttgtgaagcc agggcctca	120
gtcaagctgt cctgcacagg ttctggcttc aacattgaag actactatat tcactggtg	180
aagcagagga ctgaacaggg cctggaatgg attggaagga ttgatcctga gaatgatgaa	240
actaaatatg gccaaatatt ccagggcagg gccactataa cagcagacac atcctccaac	300
acagtctacc tgcactcg cagcctgaca tctgaggaca ctggcgta ttactgtgcc	360

tttcgcgtg gagtctactg ggggccagga accactctca cagtctcctc aggaggtgg	420
ggttccgtg gtggtggttc cggaggtggt ggttcacata tggatgttgt gatgaccag	480

tctccactca ctctatcggt tgccattgga caatcagcct ccatctcttca caagtcaagt	540
cagagcctct tagatagtga tgaaaagaca tatttgaatt ggttggataca gaggccaggc	600
cagtcctcaa agccctaat ctctctgggt tctaaactgg actctggagt ccctgacagg	660
ttcactggca gtggatcagg gacagatttca acactgagaa tcagcagagt ggaggctgag	720
gatttggaa ttatttattt ctggcaaggta acacattttc ctgggacgtt cggtggaggg	780
accaagctgg agataaaagc tagcaccacg acgccagcgc cgccaccacc aacaccggcg	840
ccaccatcg cgtcgagcc cctgtccctg cgcccaaggc cgtgccggcc agcggcgggg	900

ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttgc gcctgtgatt ttgggtgct ggtgggttt	960
ggtggttcc tggcttgcta tagcttgcta gtaacagtgg ccttattttt tttctgggtg	1020
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcgc	1080
ggcccccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcg	1140
tccaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac aaccattttt gagaccagta	1200
caaactactc aagaggaaga tggctgttagc tgccgatttca cagaagaaga agaaggagga	1260
tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacaa gcagggccag	1320

aaccagcttataacgagct caatcttagga cgaagagagg agtacgatgt ttggacaag	1380
agacgtggcc gggaccctga gatgggggaa aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc	1440
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tggatgaaa	1500
ggcgagcgc ggggggcaaa gggcacgt ggccttacc aggtctcag tacagccacc	1560
aaggacacct acgacgcct tcacatgcag gcccgtcccc ctgc	1605

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1473

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 19

atggccttac cagtgaccgc cttgtccctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgcagg	60
ccggatccg agattcagct gcagcaatct gggcagaac ttgtgaagcc agggcctca	120

gtcaagctgt cctgcacagg ttctggctc aacattgaag actactatat tcactgggtg 180  
 aagcagagga ctgaacaggg cctggaatgg attggaagga ttgatcctga gaatgatgaa 240  
 actaaatatg gccaatatt ccagggcagg gccactataa cagcagacac atcctcaac 300  
 acagtctacc tgcaactcgag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtcc 360  
 tttcgcggtg gagtctactg ggggccagga accactctca cagtctcctc aggaggtggt 420

ggttccggtg gtggtggttc cgaggtggt ggttacata tggatgttgt gatgacccag 480  
 tctccactca ctctatcggt tgccattgga caatcagcct ccatctcttg caagtcaagt 540  
 cagagcctct tagatagtga tggaaagaca tatttgaatt ggttgttaca gaggccaggc 600  
 cagtcctcaa agcgctaat ctctctggtg tctaaactgg actctggagt ccctgacagg 660  
 ttcactggca gtggatcagg gacagattc acactgagaa tcagcagagt ggaggctgag 720  
 gatttggaa ttattatttgc tgccaaggta acacatttc ctggacgtt cggtggaggg 780  
 accaagctgg agataaaagc tagcaccacg acgccagcgc cgccgaccacc aacaccggcg 840

cccacatcg cgtgcagcc cctgtccctg cgcccgagg cgtgccggcc agcggcgcccc 900  
 ggcgcagtgc acacgaggg gctggacttc gcctgtata tctacatctg ggcgcccttg 960  
 gccgggactt gtggggctt tctctgtca ctggttatca cccttactg caaacggggc 1020  
 agaaagaac tcctgtatatttcaaaacaa ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 1080  
 gaggaagatg gctgttagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140  
 gtgaagttaa gcaggagcgc agacgcccc gcgtacaagc agggccagaa ccagcttat 1200  
 aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgtatgtt tggacaagag acgtggccgg 1260

gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320  
 ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagatg ggatgaaagg cgagcgccgg 1380  
 agggcaagg ggcacgatgg ctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440  
 gaccccttc acatgcaggc cctgccccct cgc 1473

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 1465

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 20

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgggatccg acatccagat gacccagagc cctagcagcc tgagcggccag cgtgggcac	120
agagtgacca tcacctgtcg ggccagccag ggcatacagaa acaacctggc ctggatcag	180
cagaagcccg gcaaggcccc caagagactg atctacgctg ccagcaatct gcagagccgc	240
gtgcccagca gattcacccg aaggcgctcc ggcaccgagt tcaccctgat cgtgtccagc	300
ctgcagcccg aggacttcgc cacctactac tgcctgcagc accacagcta ccctctgacc	360
agcggcggag gcaccaaggt ggagatcaag cggaccggca gcaccagcgg cagcggcaag	420
cctggcagcg gcgagggaag cgaggtccag gtgctggaat ctggcggcgg actggcag	480
cctggcggca gcctgagact gagctgtgcc gccagggct tcacccatc cagctacgcc	540
atgtcttggg tccggcaggc tcctggaaag ggcctggaaat ggggttccgc catcagccgc	600
tctggcggct ccaccaacta cgccgacagc gtgaagggcc ggttcaccat cagccggac	660
aacagcaaga acaccctgta tctgcagatg aacagcctga gagccgagga caccggcgtg	720
tactactgtg cccgcaggcag cgggtggagc gagtactggg gccagggcac actggtcaca	780
gtgtctagcg ctgcaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gcccaccatc	840
cggtcgcagc ccctgtccct gcccagag gcgtgcccggc cagcggcggg gggcgcagt	900
cacacgaggg ggctggactt cgcctgtat atctacatct gggccccc tt ggccggact	960
tgtgggtcc ttccctgtc actggttatc accctttact gcaaacgggg cagaaagaaa	1020
ctcctgtata tattcaaaca accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat	1080
ggctgttagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagt	1140
agcaggagcg cagacgcccc cgcgtacaag cagggccaga accagctta taacgagctc	1200
aatctaggac gaagagagga gtacgtat ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag	1260
atgggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa	1320
gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcggccg gagggcaag	1380
ggcacatg gccttacca gggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgcctt	1440
cacatgcagg ccctgcccc tcgt	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
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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

&lt;400&gt; 26

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

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

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

&lt;400&gt; 27

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1	5		
---	---	--	--

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /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 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

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

&lt;400&gt; 36

Gly Thr His Phe Pro Gly

1

5

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

&lt;400&gt; 37

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser 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 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

225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

<210> 39

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 39

gaaatccagc tggccaatc gggagctgag gtcaagaagc cgggagccac cgtcaagatc	60
tcatcaagg ggtcggtt caacatcgag gactactaca ttcaactgggt gcagcaagct	120
ccggaaaag gcctggaatg gatggcaga atcgaccag aaaacgacga aactaagtac	180
ggaccgattt tccaaggaag agtgaactatc accgcccata cttaaccaa taccgttac	240
atggaaactga gctcgctccg gtccgaagat actgcagtgt attactgtgc ctttcggtt	300
gggggttact ggggccaagg aactactgtc actgtctcg t caggaggcgg agggtcggaa	360
ggagggcgggaa gcgaggcgg tggctcggtt ggccggaggaa ggcacgttgtt gatgacccag	420

tccccggact ccctcgccgt gagcctcgga gagagggcga ctatcaattt caagtctcc	480
cagtcacttc tggattccga tggtaaaacg tacctaact ggctgcagca aaagccaggg	540
cagccaccca aacgggtat ctcccttgc tccaaactgg atagcggagt gcctgaccgc	600
ttctcggtt ccggtagcgg gaccgacttc accctgacga tcagctact gcaggcggag	660
gacgtggcag tgtactactg ctggcaggaa acccaattcc ctggcacctt tggaggtggc	720
accaagggtgg agatcaag	738

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 40

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgtggctc ttctgctcca cgccgctgg	60
cccgaaatcc agctggtcca atcgggagct gaggtcaaga agccgggagc caccgtcaag	120
atctcatgca aggggtcggtt attcaacatc gaggactact acattcactg ggtgcagcaa	180
gctccggaa aaggcctgga atggatggc agaatcgacc cagaaaacga cgaaactaag	240
tacggaccga tttccaagg aagagtgtact atcaccgccc atacttcaac caataccgtc	300
tacatggAAC tgagctcgct ccggccggaa gatactgcag tgtattactg tgccttcg	360

ggaggggtgt	actggggcca	aggaactact	gtcactgtct	cgtcaggagg	cgagggtcg	420
ggaggaggcg	ggagccgagg	cgtggctcg	ggtggcggag	gaagcgacgt	ggtgtatgacc	480
cagtccccgg	actccctcgc	cgtgagcctc	ggagagaggg	cgactatcaa	ttgcaagtcg	540
tcccagtac	ttctggattc	cgtatggtaaa	acgtacactca	actggctgca	gcaaaagcca	600
ggcagccac	ccaaacggtt	gatctccctt	gtgtccaaac	tggatagcgg	agtgcctgac	660
cgcttctcg	gttccggtag	cgggaccgac	ttcaccctga	cgatcagctc	actgcaggcg	720
gaggacgtgg	cagtgtacta	ctgctggcag	ggaaccact	tccctggcac	ctttggaggt	780

ggcaccaagg	tggagatcaa	gggatcgac	caccatcacc	atcatcatca	c	831
------------	------------	-----------	------------	------------	---	-----

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Ser 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His  
 260 265 270  
 His His His His  
 275

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;

&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 42

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

tacggaccga tctccaagg acgggtgacc atcacggctg acacttccac taacaccgtc	300
tacatggAAC tctcgagcct tcgctcgaa gataccggg tgtactactg cgccTTAGA	360

ggtgaggACT acTgggaca aggactacc gtcaccgtg cgtcaggTgg cgaggatca	420
ggcgaggcG gctccggTgg aggaggaAGC ggaggaggTg gctccgacgt ggtgatgacg	480
cagtacccgG actcTTggc ggtgagcTg ggtgacGcg ccactatcaa ctgcaagAGC	540
tcccagAGCT tgctggactC cgatggAAAG acttatCTCA attggCTGCA acagaAGCCT	600
ggccAGCCG CaaAGAGACT catCTactG gtgAGCAAGC tggatAGCgg agtGCCAGAT	660
cggtttcgg gatcgggctc aggacccGac ttCACCTGA ctatTTCTC cctccaAGCC	720
gaggatgtgg ccgtctacta ctgttggcag gggactact tcccgggac cttcggtgga	780

ggcactaagg tggagatcaa aaccactacc ccagcacGGA ggccacCCAC cccggctcct	840
accatgcct cccagcctct gtcCCTgcgt ccggaggcat gtagacCCGc agctggTgg	900
gccgtgcata cccggggtct tgacttcGCC tgcgataatct acatTTggc ccctctggct	960
ggtacttgCG gggTcTgCT gCTTCACTC gtgatcactC ttactgtAA gCGCGTcgG	1020
aagaAGtgc tgtacatCTT taagcaACCC ttcatgaggc ctgtgcAGAC tactcaAGAG	1080
gaggacggct gttcatgCCG gttcccAGAG gaggagGAAG gCGGCTGCGA actgcgcgtG	1140
aaattcGCC gcagcgcaga tgctccAGCC tacaAGcagg ggcagaACCA gctctacaAC	1200

gaactcaatC ttggTCggag agaggAGtAC gacgtgctgg acaAGcggAG aggacggac	1260
ccagaaatgg gCGGGAAGCC gCGcAGAAAG aatCCCAAG agggcCTgta caacgagCTC	1320
caaaaggATA agatggcAGA agcCTatAGC gagattggta tgaAAGGGGA acgcAGAAGA	1380
ggcaAAAGGCC acgacggact gtaccAGGGA ctcAGCACCG ccACCAAGGA cacCTatGAC	1440
gctttcaca tgcaGGCCt gcccCCTGG	1470

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Ser 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 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 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 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 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		

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser 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 tgaccaggc cccagactcc ctgcagatgt cttgggaga acgggccacc	60
atcaactgca aatcgagcca gtcactgctg gactcagacg gaaagaccta cctcaactgg	120
ctgcagcaga agcctggcca gccaccgaag cgccctgatct ccctgggtgc caagctggac	180
tccggcgtcc cggacaggtt tagcggttagc ggctcggaa ccgacttcac tctgaccatt	240
agctcgctcc aagctgaaga tgtggcggtc tactactgtc ggcaggggac ccactcccc	300
gggacctttg gcggaggaac taaagtgcga atcaaaggag gaggcggatc aggtggagga	360

ggcagcggag gaggagggag cggcggtggc ggctccgaaa ttcaacttgt gcaatccggt	420
gccgagggtga agaaacctgg tgccactgtc aagatcttgt gtaaggatc gggattcaat	480
atcgaggact actacatcca ctgggtgcaa caggcgccag gaaaggatt ggagtggatg	540
ggtcgcacatcg acccgaaaaa cgatgagact aagtacggac cgatcttcca aggccggtc	600
acgatcactg cggatacctc cactaatacc gtgtatatgg agctctgtc actgagaagc	660
gaagatacgg ccgtgtacta ctgcgcattc agaggaggtg tgtactggg ccaggaaact	720
actgtgaccg tgtcgtcg	738

<210> 46

<211> 831

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 46

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgcggcgc ttcgtctcca cgccgcgtgg	60
cccgatgtcg tggatgaccca gtcggccagac tccctcgca gtccttggg agaacggggcc	120
accatcaact gcaaattcgag ccagtcactg ctggactcag acggaaagac ctacctaacc	180
tggctgcagg agaaggctgg ccagccaccc aagcgcctga tctccctggt gtccaaagctg	240
gactcggcgc tccggacag gtttagcggt agcggctgg gaaccgactt cactctgacc	300

attagctcgc tccaagctga agatgtggcg gtctactact gctggcaggg gaccacttc	360
cccgccacct ttggccggagg aactaaagtc gaaatcaaag gaggaggcgg atcaggtgga	420
ggaggcagcg gaggaggagg gagcggcggt ggccgcgtccg aaattcaact tgtcaatcc	480
gggtgccgagg tgaagaaacc tggtgccact gtcaagatct cgtgttaaggg atcgggattc	540
aatatcgagg actactacat ccactgggtg caacaggcgc cagggaaaggg attggagtgg	600
atgggtcgca tcgacccgga aaacgatgag actaagtacg gaccgatctt ccaaggccgg	660
gtcacgtca ctgggatac ctccactaat accgtgtata tggagctctc gtcactgaga	720

agcgaagata cggccgtgta ctactgacca ttcagaggag gtgtgtactg gggccaggga	780
actactgtga ccgtgtcgcc 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 Thr			
115	120	125	
Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly			
130	135	140	
Gly Gly Ser 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			
275			
<210			
> 48			
<211> 1470			

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 48

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcg	60
cccgacgtgg tcatgactca aagcccatat tccttggctg tctcccttgg agaaagagca	120
acgatcaatt gcaaaagctc gcagtcctg ttggactccg atggaaaaac ctacctcaac	180
tggctgcagc agaagccggg acaaccacca aagcggctga ttccctcggt gtccaaagctg	240
gacagcggcg tgcggatcg cttctcggtc agcggctcgga acccgattt tactctact	300

atttcgtcac tcaagcgga ggacgtggcg gtgttattact gctggcaggg cactcacttc	360
ccgggtactt ttggggagg taccaaagtcc gaaatcaagg gtggaggcgagcgaggagga	420
ggcgggtcg gaggaggagg atcgggtggc ggaggctcag aaatccagct ggtgcagtc	480
ggtgccgaag tgaagaagcc tggggccacgtgtaaatct cgtcaaggg gagcggattc	540
aacatcgagg attactacat ccattgggtg caacaggccc ctggcaagg gctgaaatgg	600
atgggaagga tcgaccccgaaatgacgactaactacg gcccgtt ccaaggacgg	660
gtgaccatca ctgcagacac ttcaaccaac accgtctaca tgaaactctc ctcgctgcgc	720

tccgaggaca ccgcgtgtactgtctttcagaggag gagtctactggacaggaa	780
acgaccgtga ccgtcagtc aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctct	840
accatcgccctccaggctctgtccctgcgtccggaggcatgtacccgc agctgggtgg	900
gccgtgcata cccgggtcttgcgttgcgtatct acatgggc ccctctggct	960
ggtacttgcgggtctgtttcactcgtgtactc ttactgtaa ggcggctcg	1020
aagaagctgc tgcacatctt taagcaaccc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag	1080
gaggacggct gttcatgcgg gttccagag gaggaggaag ggcggctgcga actgcgcgt	1140

aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaaggcagg ggcagaacca gctctacaac	1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagttac gacgtgctgg acaagcggag aggacggac	1260
ccagaaatgg gcgaaagcc ggcgcagaaatgg aatcccaag agggcctgtcaacgagtc	1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagatggta taaaaggaa acgcagaaga	1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggatctcagcacccg ccaccaagga cacctatgac	1440
gctttcaca tgcaggccct ggcgcctcg	1470

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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 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 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 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
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
485	490	

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser 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 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			
225	230	235	240
Thr Lys Val Glu Ile Lys			
245			

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 51

gagattcagc tggccaaag cggcgccagaa gtgaaaaagc cagggaaatc gttgcgcata	60
agctgtaaag gttccggctt caacatcgag gactattaca tccattgggt gcggcagatg	120
ccagggaaagg ggcttggaaatg gatggggacgg attgaccgg agaacgcacga aaccaagtac	180
ggaccgatct ttcaaggaca cgtgactatc tccggccaca ccagcatcaa tacggtgtac	240
ctccaaatggt cctcactcaa ggcctcgat accgcgtatgt actactgcgc gttcagagga	300
ggcgctact gggacaagg gactactgtg actgtctcat caggaggtgg aggaagcgga	360

ggaggtggct cggcgagg tggatcgga ggaggagggt ccgtatgtgt gatgaccag	420
tccccactgt cgctccgggt gaccctcgga cagcctgcta gcatctcgta caaatcctcg	480
caatccctgc tggactcgga cggaaaaacg tacctaatt ggctgcagca ggcgcgtggc	540

cagagccgaa	gaaggcttat	ctcgctggtg	tcaaagctgg	atagcggtgt	gcccgaccgg	600
ttcagcgct	cagggtcagg	aaccgatttc	accttgaaga	tctccgcgt	ggaagccgaa	660
gatgtcgag	tctactactg	ctggcagggt	actcaactcc	cggggacctt	tggtggcggc	720
actaaggctcg	agattaag					738

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 52

atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcg	60
cccgagattc	agctggtcca	aagcggcgca	gaagtgaaaa	agccagggga	atcggtgcgc	120
atcagctgta	aaggtccgg	cttcaacatc	gaggactatt	acatccattt	ggtgccggcag	180
atgccaggaa	aggggctgga	atggatggga	cggttggacc	cgggaaacga	cgaacccaag	240
tacggaccga	tcttcaagg	acacgtgact	atctccgcgc	acaccagcat	caatacggtg	300

tacctccaaat	ggcctcact	caaggccctcg	gataccgcga	tgtactactg	cgcgttcaga	360
ggaggcgct	actggggaca	aggactact	gtgactgtct	catcaggagg	tggaggaagc	420
ggaggagggt	gctcgccgg	aggtggatcg	ggaggaggag	ggtccgatgt	gggtatgacc	480
cagtcccccac	tgtcgctccc	ggtgaccctc	ggacagccctg	ctagcatctc	gtgcaaatcc	540
tcgcaatccc	tgtggactc	ggacggaaaa	acgtacctca	attggctgca	gcagcgcct	600
ggccagagcc	cgagaaggct	tatctcgctg	gtgtcaaagc	tggatagcgg	tgtgccgcac	660
cggttcagcg	gctcagggtc	aggaaccgat	ttcaccttga	agatctcccg	cgtgaaagcc	720

gaagatgtcg	gagtctacta	ctgctggcag	ggtactca	tcccgccgac	ctttgggtggc	780
ggcactaagg	tcgagattaa	gggctcacac	catcatcacc	atcaccacca	c	831

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

polypeptide"

&lt;400&gt; 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 Val Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

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

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Ser 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His			
260	265	270	
His His His His His			
275			

&lt;210&gt;

&gt; 54

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 54

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcg	60
cccgaaatcc agctggtgca aagcggagcc gaggtgaaga agcccgaga atccctgcgc	120
atctcggtta agggttccgg cttaacatc gaggattact acatccactg ggtgagacag	180
atgccggca aaggcttgaa atggatggc cgcatcgacc cggagaacga cgaaaccaa	240
tacggaccaa tcttccaagg acatgtgact atttccggc atacctccat caacactgtc	300

tacttgcagt ggagctcgct caaggcgtcg gataccgcca tgtactactg cgcattcaga	360
ggaggtgtgt actggggcca gggcactacg gtcaccgtgt cctcgggagg tggagggtca	420
ggaggcggag gctcggcgg tggaggatca ggcggaggag gaagcgatgt ggtcatgact	480
caatccccac tgtcactgcc tgtcactctg gggcaaccgg ctccatctc atgcaagtca	540
agccaatcgc tgctcgactc cgacggaaaa acctacctca attggctca gcagcgcaca	600
ggccagtgcg ctcggaggct gatctcactc gtgtcgaagc ttgactccgg ggtgccggat	660
cggtttagcg gaagcggatc ggggaccgac ttcacgttga agattagccg ggtggaagcc	720

gaggacgtgg gagtcttatta ctgctggcag gggaccact tccggggac tttcggagga	780
ggcaccaaaag tcgagattaa gaccactacc ccagcaccga ggccacccac cccggctcct	840
accatcgctt cccagcctt gtcctcgct ccggaggcat gtagacccgc agctggtgg	900
gccgtgcata cccgggtct tgacttcgccc tgcgatatct acatttggc ccctctggct	960
ggtacttgcg gggcctgct gcttcactc gtgtcactc ttactgtaa ggcggcgtcg	1020

aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag 1080  
 gaggacggct gttcatgccg gttcccaagag gaggaggaag gcggtgcga actgcgcgtg 1140

aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaaggcagg ggcagaacca gctctacaac 1200  
 gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacggac 1260  
 ccagaaatgg gcggaaagcc gcgcagaaag aatccccaaag agggcctgta caacgagctc 1320  
 caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtt tgaaagggga acgcagaaga 1380  
 ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccc ccaccaagga cacctatgac 1440  
 gctttcaca tgcaaggccct gcccctcg 1470

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly Gly		
130	135	140
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr		
145	150	155
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
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly		
245	250	255
Thr Phe 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
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 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
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 Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly		
115	120	125
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
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
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"

&lt;400&gt; 57

gacgtcgta	tgaccagag	ccgcgtca	ctgcgtgt	ccctggcca	gccggcgtcc	60
attagctgca	aatccctcgca	atcccgtc	gactcagacg	aaaaaacgt	cttgaactgg	120
ctccaaacagc	gccctggca	atccccagg	cggcttatct	cactcgtag	caagctcgat	180
agcgtgtcc	cagacagatt	ttcgggtcg	ggatcggca	ctgatttac	tctgaagatc	240
tgcgggtgg	aagccgagga	tgtgggagt	tactattgt	ggcaggcac	tcacttcccc	300
gggacgttt	gcccggaaac	taaggtcgag	atcaaaggag	gaggtggatc	aggccggaggt	360

gggagcggag	gaggaggaag	cgggtggta	ggttccgaaa	tccagctgg	gcaatcagga	420
gccgaggtga	agaagccggg	agaatccctg	cgcattctcg	gcaaggcgtc	gggcttcaac	480
atcgaggatt	actacatcca	ctgggtgcgg	cagatgcgg	gaaagggtt	ggaatggatg	540
ggacgcattg	accggaaaaa	tgtgaaacc	aaatacggc	caatcttcca	aggccacgt	600
accattagcg	ctgacacttc	catcaacacc	gtgtaccttc	agtggcctc	actgaaggcg	660
tcggacactg	ccatgtacta	ctgtgcattc	agaggaggg	tctactggg	acagggcacc	720
accgtgaccg	ttagctcc					738

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 58

atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgttt	ccgctggctc	ttctgttcca	cgccgctcg	60
cccgacgtcg	tcatgaccca	gagcccgctg	tcactgcctg	tgaccctgg	ccagccggcg	120
tccattagct	gcaaattctc	gaaatccctg	ctcgactcag	acggaaaaac	gtacttgaac	180
tggctccaac	agcgcctgg	gcaatcccc	aggcggctt	tctcactcgt	cagcaagctc	240
gatagcggtg	tcccagacag	atttcgggc	tcggatcgg	gcactgattt	cactctgaag	300

atctcgccgg	tggaagccga	ggatgtggga	gtgtactatt	gctggcaggg	cactcacttc	360
cccgccacgt	ttggccggagg	aactaaggc	gagatcaaag	gaggaggtgg	atcaggcgg	420
ggtgggagcg	gaggaggagg	aagcggtgg	ggaggttccg	aatccagct	ggtgcaatca	480
ggagccgagg	tgaagaagcc	gggagaatcc	ctgcgcattc	cgtgcaaggg	ctcggcattc	540

aacatcgagg attactacat ccactgggtg cggcagatgc cggaaagggttggatgg 600  
 atggacgca ttgaccgga aatgatgaa accaaatacg ggccatctt ccaaggccac 660  
 gtgaccatta gcgtgacac ttccatcaac accgtgtacc ttcatggtc ctcaactgaag 720

gcgtcgaca ctgcatgta ctactgtca ttcagaggag gggctactggacaggc 780  
 accaccgtga ccgtgagctc cggctcgcat caccatcatc accaccatca c 831

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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 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

275

<210

> 60

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 60

atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcg	60
cccgacgtcg	tcatgaccca	atcccctctc	tccctgccc	tcaccctgg	tcagccggcg	120
tcgatctcat	gcaaaagctc	acagtccctg	ctggattcgg	acggaaaaac	ctacttgaac	180
tggctccaac	agaggccggg	tca	ctgatccc	cg	cagactga	240
gactcgggtg	tgccggatcg	gttctccggg	tcaggatcgg	gcaccgactt	tacgctcaag	300

atttcgagag tggaggccga ggatgtggga gtgtactatt gctggcaggg cacgcattc	360
cccgccgacct ttggggcgg gactaagggtg gaaatcaagg gaggtggcgg atcaggcggaa	420
ggaggcagcg gcggaggtgg atcaggaggc ggagggtcag agatccagct ggtccaaagc	480
ggagcagagg tgaagaagcc aggcgagtc cttcgattt cgtcaaaagg gagcggcittc	540
aacattgaag attactacat ccactgggtg cggcaaattc cagaaagggt tctggatgg	600
atggacgga tcgacccaga aatgatgaa actaagtacg gaccgatctt ccaaggacac	660
gtcactatct ccgcggacac ttgcataac accgtgtacc tccagtgag cagcttgaaa	720

gcctccgaca ccgctatgtt ctactgtgcc ttccgcggag gagtctactg gggacagggg	780
actactgtga ccgtgtcgcc caccactacc ccagcaccga gcccacccac cccggctcct	840
accatcgctt cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgcg agctgggtgg	900
gccgtgcata cccgggtct tgacttcgccc tgcatatctt acattggc ccctctggct	960
ggtacttgcg gggcctgcgt gcttcactc gtgatcactc ttactgtaa ggcgcgtcg	1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcatgagc ctgtgcagac tactcaagag	1080
gaggacggct gttcatgccc gttccagag gaggaggaag gcccgtgcga actgcgcgtg	1140

aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaaggcagg ggcagaacca gctctacaac	1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaaggcgag aggacggac	1260
ccagaaatgg gccccaaagcc ggcgcagaag aatccccaaag agggcctgtt caacgagctc	1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaaggaa acgcagaaga	1380
ggcaaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctgcacccg ccaccaagga cacctatgac	1440
gctttcaca tgcaggccct gcccctcg	1470

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 61

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala 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 Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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 Val Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 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
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 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
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
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
485	490	
<210> 62		
<211> 246		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser 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 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

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 63

gaaaatccagc tcgtgcagag cggagccgag gtcaagaaac cgggtgctac cgtgaagatt	60
tcatgcaagg gatcgggctt caacatcgag gattactaca tccactgggt gcagcaggca	120
ccagggaaaag gacttgaatg gatgggcccgg atcgaccggg aaaatgacga gactaagtac	180
ggccctatct tccaaggacg ggtgacgatc accgcagaca ctagcaccaa caccgtctat	240
atggaactct cgtccctgag gtccgaagat actgcccgtt actactgtgc gtttcgcgga	300
ggtgtgtact ggggacaggg taccaccgtc accgtgtcat cgggcgggtgg aggctccgggt	360

ggaggagggt caggaggccgg tggaagcgga ggaggccgca ggcacgtggc catgactcaa	420
tgcgcgctgt cgctgcccgt cactctggga caaccccggtt ccatcagctg caaatcctcg	480
cagtcactgc ttgactccga tgaaagacc tacctaact ggctgcagca acgcccaggc	540
caatccccaa gacgcctgat ctgcgttgggt tcaaagctgg actcagggtt gcccggaccgg	600
ttctccggga gcggtcggtt cacggattt actctcaaga tctccagagt ggaagccgag	660
gatgtggag tctactactg ctggcaggga acccatttcc ctggaacttt tggcggagga	720
actaaggctcg agattaaa	738

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 64

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctgg	60
cccgaaatcc agctcgtgca gagcggagcc gaggtcaaga aaccgggtgc taccgtgaag	120
atttcatgca agggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtgcagcag	180
gcaccaggaa aaggacttga atggatggc cggatcgacc cgaaaaatga cgagactaag	240
tacggcccta tcttccaagg acgggtgacg atcaccgcag acactagcac caacaccgtc	300

tatatggAAC tctcgccct gaggtccgaa gatactgccg tgtactactg tgcgtttcgc	360
ggaggtgtgt actggggaca gggtaaccacc gtcaccgtgt catcgccgg tggaggctcc	420
gggtggaggag ggtcaggagg cggtgaaAGC ggaggaggcg gcagcgaCgt ggtcatgact	480
caatcgccgc tgtcgctgcc cgtcaCTG ggacaacccg cgtccatcag ctgcaaATCC	540
tcgcagtac tgcTTgactc cgtatggaaAGC acctacCTCA actggctgca gcaacgcCca	600
ggccaaTccc caagacgcct gatctcgTTG gtgtcaaAGC tggactcagg ggtgccggac	660
cggttctccg ggagcgggtc gggcacggat ttcaCTCTCA agatctccag agtggaaGCC	720

gaggatgtgg gagtctacta ctgctggcag ggaaccatt tccctggaac ttttggcggA	780
ggaactaagg tcgagattaa agggagccac catcatcatc accaccacca C	831

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 65

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala 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 Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Ser 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His

260 265 270

His His His His

275

<210

> 66

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 66

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgtt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcg	60
cccgaaatcc agctcggtca gagcggagcc gaggtcaaga aaccgggtgc taccgtgaag	120
atttcatgca agggatcggtt cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtgcagcag	180
gcaccaggaa aaggacttga atggatgggc cgatcgacc cgaaaatga cgagactaag	240
tacggcccta tcttccaagg acgggtgacg atcaccgcag acactagcac caacaccgtc	300

tatatgaaac tctcgccct gaggtccgaa gatactgccg tgtactactg tgcgttcgc	360
ggaggtgtgt actggggaca gggtaccacc gtcaccgtgt catcgccgg tggaggtcc	420
ggtgaggagg ggtcaggagg cggtgaaagc ggaggaggcg gcagcgcacgt ggtcatgact	480
caatcgccgc tgcgctgcc cgtcactctg ggacaacccg cgtccatcag ctgcaaattcc	540
tcgcagtac tgcggactc cgatggaaag acctacctca actggctgca gcaacgcca	600
ggccaatccc caagacgcct gatctcggtt gtgtcaaaac tggactcagg ggtccggac	660
cggttctccg ggagcgggtc gggcacggat ttcaactctca agatctccag agtggaaagcc	720

gaggatgtgg gagtctacta ctgctggcag ggaaccatt tccctgaaac tttggcgg	780
ggaactaagg tcgagattaa aaccactacc ccagcacca ggcacccac cccgctcct	840
accatcgccct cccagcctct gtcctcggtt ccggaggcat gtagacccgc agctggtgg	900
gccgtgcata cccgggtct tgcgtatct acatgggc ccctctggct	960
ggtacttgcg gggcctgct gcttcactc gtgatcactc ttactgtaa ggcgggtcg	1020
aagaagctgc tgcgtatctt taagcaaccc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag	1080
gaggacggct gttcatgccc gttcccagag gaggaggaag ggcggctgcga actgcgcgt	1140

aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaaggcagg ggcagaacca gctctacaac	1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgtgg acaagcggag aggacggac	1260
ccagaaatgg gcgccaaagcc ggcgcagaaag aatccccaaag agggcctgtt caacgagctc	1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tggaaaggaa acgcagaaga	1380
ggccaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctgcacccg ccaccaagga cacctatgac	1440
gctcttcaca tgcaggccct gcccctcg	1470

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

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

115 120 125

Ser 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 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			
225	230	235	240
Thr Lys Val Glu Ile Lys			
245			

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 69

gaaatccagc tggcgcagtc aggcgcgcag gtcaagaagc cgggagagtc gctgagaatc	60
tgcgtcaagg gctcggtt caacatcgag gactactaca ttcactgggt caggcagatg	120
ccggaaagg gactggaatg gatggccgg atcgaccag aaaatgacga aaccaaatac	180
ggcccgattt ttcaaggcca cgtgactatc agcgcagaca cgagcatcaa cactgtctac	240
ctccagtggc cctcgcttaa ggccagcgat accgctatgt actactgcgc attcagaggc	300
gggggtgtact gggacaagg aaccactgtg accgtgagca gcgagggtgg cggctcgga	360

ggaggtggga gcggaggagg aggttccggc ggtggaggat cagatgtcgt gatgacccag	420
tccccggact ccctcgctgt ctcaactggc gagcgcgcga ccatcaactg caaatcgagc	480
cagtcgtgt tggactccga tggaaagact tatctgaatt ggctgcaaca gaaaccagga	540
caacctccca agcggctcat ctgcgttg tcaaaaactcg attcgggagt gccagaccgc	600
ttctcggtt ccgggagcgg aactgacttt actttgacca tttcctcact gcaagcggag	660

gatgtggccg tgtattactg ttggcagggc acgcattcc ctgaaacctt cggtggcggaa	720
actaagggtgg 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 ctgtcaccgc cctgctgttt ccgtggctc ttctgttcca cgccgtcg	60
cccgaaatcc agctggtgca gtcaggcgcc gaggtcaaga agccgggaga gtcgtgaga	120
atctcgtgca agggctcggtt gttcaacatc gaggactact acatttactg ggtcaggcag	180
atgcgggaa agggactgga atggatggc cggatcgacc cagaaaatga cgaacacaaa	240
tacggccga ttttcaagg ccacgtgact atcagcgac acacgagcat caacactgtc	300

tacccctcagg ggtcctcgct taaggccagg gataccgcta tgtactactg cgccattcaga	360
ggcgggggtgt actggggaca aggaaccact gtgaccgtga gcagcggagg tggcggctcg	420
ggaggaggtg ggagcggagg aggagggtcc ggccgtggag gatcagatgt cgtgtatgacc	480
cagcccccg actccctcgc tgtctactg ggccggcgcc cgaccatcaa ctgaaatcg	540
agccagtccgc tttggactc cgtatggaaag acttatctga attggctgca acagaaacca	600
ggacaacctc ccaagcggct catctcggtt gtgtcaaaac tcgattcggg agtggccagac	660
cgcttctcggtt ggtccggag cggaactgac ttacttga ccatttcctc actgcaagcg	720

gaggatgtgg ccgtgttta ctgttggcag ggcacgcatt tccctggAAC cttcggtggc	780
ggaactaagg tggaaatcaa 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 Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Ser 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	

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 72

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgcgtggctc ttctgctcca cgccgctcg	60
cccgagattc agctcgtgca atcgggagcg gaagtcaaga agccaggaga gtccttgcgg	120
atctcatgca agggtagcgg cttaacatc gaggattact acatccactg ggtgaggcag	180
atgccgggga agggactcga atggatggga cggatcgacc cagaaaacga cgaaactaag	240
tacggtccga tcttccaagg ccatgtgact attagcgccg atacttaat caataccgtg	300
tatctgcaat ggtcctcatt gaaaggctca gataccgcga tgtactactg tgctttcaga	360
ggaggggtct actggggaca gggactacc gtgactgtct cgtccggcgg aggccgggtca	420
ggaggtggcg gcagcggagg aggagggtcc ggcggaggtg ggtccgacgt cgtgtatgacc	480
cagagccctg acagcctggc agtgagcctg ggcgaaagag ctaccattaa ctgcaaatcg	540
tgcagagcc tgcgtggactc ggacggaaaa acgtacctca attggctgca gcaaaagcct	600
ggccagccac cgaaggcgcct tatctcactg gtgtcgaagc tggattcggg agtgcggat	660
cgcttctccg gtcgggatc gggtaactgac ttccacccctca ctatctcctc gttcaagca	720
gaggacgtgg ccgtctacta ctgctggcag ggaaccact ttccggaaac cttcggcgg	780
gggacgaaag tggagatcaa gaccactacc ccagcaccga ggccacccac cccggctcct	840
accatgcct cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagacccgc agctggtgg	900
gccgtgcata cccgggtct tgcgtggactc tgcatatct acatttggc ccctctggct	960
ggtaacttgcg gggtaactc gtttactc gtgtactc tttactgtaa ggcgggtcg	1020
aagaagctgc tgcgtatctt taagcaaccc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag	1080

gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg 1140

aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaaggcagg ggcagaacca gctctacaac 1200  
 gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacggac 1260  
 ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaaag agggcctgta caacgagctc 1320  
 caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtt taaaaggggaa acgcagaaga 1380  
 ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccc caccaagga cacctatgac 1440  
 gctttcaca tgcaggccct gcccctcg 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 Val Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Ser 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 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
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	

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser 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

gacgtggta tgacccaatc gccagattcc ctggcagtgt ccctggcga acgcgccact 60

attaactgca aatcgtcaca gtccttgctt gattccgacg gaaagaccta cctcaattgg	120
ctccagcaga agccaggaca accgcacaaag agactgatct ccctgggtgc aaagctggac	180
tcgggagtgc ctgatcggtt ctcgggtac gggagcggca ccgacttcac tctgaccatc	240
tcgtcactcc aggtgagga cgtggccgtg tattactttt ggcagggtac tcactttccg	300
ggcactttcg gaggcggcac caaggtggag attaaaggag gaggcggaaag cgagggtgga	360

ggatcgggag gtggtgggag cggcggagga gggagcaga tccagctgt ccaatcgga	420
gcggaaagtga agaagcccg agagtcactt agaatctcat gcaaggggtc gggcttcaac	480
atcgaggatt actacatcca ttgggtccgc cagatgcctg gtaaaggact ggaatggatg	540
gggaggattg acccgaaaaa cgacgaaact aagtacggac cgatcttca agggcacgtg	600
actatctccg ctgataccctc aatcaatact gtctacccctc agtggccctc gctgaaagca	660
agcgacacccg cgatgtacta ctgcgccttc cggggaggag tgtactgggg ccaaggcacc	720
acggtcacgg tcagctcc	738

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 834

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 76

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcg	60
cccgacgtgg tggatgaccca atcgccagat tccctggcag tggccctggg cgaacgcgcc	120
actattaact gcaaatcgac acagtcctt cttgattccg acggaaagac ctacctaatt	180
tggctccagc agaagccagg acaaccgcca aagagactga tctccctggt gtcaaagctg	240
gactcgggag tgcctgatcg gttctcggt agcgggagcg gcaccgactt cactctgacc	300

atctcgac tccaggctga ggacgtggcc gtgtattact gttggcaggg tactacttt	360
ccgggcactt tcggaggcgg caccaagggtg gagattaaag gaggaggcgg aagcggaggt	420
ggaggatcg gagggtgg gaggcggcga ggagggagcg agatccagct cgtccaaatcg	480
ggagcggaaag tggaaagcc cggagagtca ctttagaatct catgcaaggg gtcggccctc	540
aacatcgagg attactacat ccattgggtc cgccagatgc ctggtaaagg actggaatgg	600
atggggagga ttgacccgga aaacgacgaa actaagtacg gaccgatctt tcaagggcac	660

gtgactatct ccgctgatac ctaaatcaat actgtctacc tccagtggtc ctcgctgaaa 720

gcaagcgaca ccgcgatgta ctactgcgcc ttccgggag gagtgtactg gggccaaggc 780

accacggtca cggtcagctc cggctccat 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 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 Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 78

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgcgtggctc ttctgctcca cgccgctcg	60
cccgacgtgg ttagtactca gtcgcctgac tcgctggctg tgtcccttgg agagcgggcc	120
actatcaatt gcaagtcata ccagtcgctg ctggattccg acggaaaac ctacctaat	180
tggctgcagc aaaaaccggg acagcctcca aagcggctca tcagcctgggt gtccaaatgg	240
gacagcggcg tgccagaccg cttctccggc tcggaaagcg gtactgattt cacgctgacc	300

atctcatccc tccaagcgga ggatgtggca gtctactact gttggcaggg cacgcatttt	360
ccgggcactt ttggaggagg gaccaagggtc gaaatcaagg gaggaggtgg ctcggcggaa	420
ggaggctcg gaggaggagg atcaggaggc ggtgaaagcg agattcaact ggtccagagc	480

ggcgcagaag tcaagaagcc gggtaatcg ctcagaatct cgtcaaagg atcgggattc	540
aacatcgagg actactacat tcaactggtc agacaaatgc cggcaaagg gctggatgg	600
atggggagga tcgaccccgaa acacgtgaa accaagtacg gaccaatctt ccaagggcac	660
gtgaccatcc cggggacac ctcaatcaac actgtgtacc tccagtggag ctcacttaag	720

gccagcgata ccgcgtatgtatattgcgtttccggag ggggtactggacaggc	780
actactgtga ccgtgtcatc caccactacc ccagcaccga ggccacccac cccggctcct	840
accatcgctt cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagacccgc agctgggg	900
gccgtgcata cccgggtct tgacttcgatc tgcatatctt acatttggcc ccctctggct	960
gttacttgtcg gggcctgct gcttcactc gtgtatctt tttactgtaa ggcggctgg	1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag	1080
gaggacggct gttcatgccc gttccagag gaggaggaag ggcggctgcga actgcgcgtg	1140

aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaaggcagg ggcagaacca gctctacaac	1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagttac gacgtgctgg acaagcggag aggacggac	1260
ccagaaatgg gcgaaagcc ggcagaaag aatcccaag agggcctgtt caacgagtc	1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta taaaaggggaa acgcagaaga	1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccc ccaccaagga cacatgac	1440
gctttcaca tgcatggccctt ggcgcctcg	1470

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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
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 Thr		
115	120	125
Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly		
130	135	140
Gly Gly Gly Ser 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 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser 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

gatgtggta	tgacgcagtc	accactgtcc	ctcccccgtga	cccttggaca	gccagcgctcg	60
attagctgca	agtcatccca	atccctgctc	gattcggatg	gaaagaccta	tctcaactgg	120
ctgcagcaaa	gaccggta	gagccctagg	agactcatct	cgttgggtgc	aaagctggac	180
agcggagtgc	cggaccggtt	ttccgggtcg	ggatcgggga	cggacttcac	tctgaagatt	240
tcacgggtgg	aagctgagga	tgtgggatgt	tactactgtc	ggcagggAAC	ccatttcct	300
ggcacttttgc	gccccgggaa	taaggtcgaa	atcaagggag	gaggtggctc	gggaggaggc	360
ggatcggcgc	gaggcgggag	cggcggagga	gggtccgaaa	tccaaacttgt	ccagtcagga	420
gccgaagtga	agaaaaccggg	agccaccgtc	aaaatcagct	gtaaggatc	gggattcaat	480
atcgaggact	actacatcca	ctgggtgcag	caagctccgg	gcaaggact	ggagtggatg	540
gggcgcatcg	acccagagaa	cgacgaaacc	aaatacgcc	cgatcttcca	agggcgggtg	600
accatcaccg	cggacacactc	aactaacact	gtgtacatgg	agctgagctc	cctgcgtcc	660
gaagatactg	cagtctacta	ctgcgccttc	cgcgggtgg	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	ctgtcaccgc	cctgctgttt	ccgctggctc	ttctgctcca	cggcgtcg	60
------------	------------	------------	------------	------------	----------	----

cccgatgtgg tcatgacgca gtcaccactg tccctcccg tgacccttgg acagccagcg	120
tcgattagct gcaagtcatc ccaatccctg ctcgattcggt atggaaagac ctatctcaac	180
tggctgcagc aaagacccgg ttagagccctt aggagactca ttcgttggt gtcaaagctg	240
gacagcggag tgccggaccg gttttccgtt tcggatcggt ggacggactt cactctgaag	300

atttcacggg tggaaagctga ggatgtggga gtgtactact gctggcaggg aaccatttc	360
cctggcactt ttggcggagg aactaaggta gaaatcaagg gaggaggtgg ctcggagga	420
ggcggatcggt gcgaggcgg gaggcggcggaa ggagggtccg aaatccaact tgtccagtca	480
ggagccgaag tgaagaaacc gggagccacc gtcaaaatca gctgttaaggg atcggattc	540
aatatcgagg actactacat ccactgggtt cagcaagctc cggcaaaagg actggagtgg	600
atggggcgcata tcgacccaga gaacgacgaa accaaatacg gcccgtt ccaagggcgg	660
gtgaccatca ccggggacac ctcaactaac actgtgtaca tggagctgag ctccctgcgc	720

tccgaagata ctgcagtcta ctactgcgcc ttccgcgtt gtgtactg gggacaggc	780
---	-----

accactgtga ctgtcagctc ggggtccac catcatcacc accaccatca c	831
---	-----

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 83

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala 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 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 Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Ser 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 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 ctgtcaccgc cctgctgctt ccgcggcgc ttcgtctcca cgccgcgtgg	60
cccgatgtgg tcatgacgca gtcaccactg tccctcccg tgacccttgg acagccagcg	120
tcgattagct gcaagtcatc ccaatccctg ctgcattcgatggaaagac ctatctcaac	180
tggctgcagc aaagacccgg tcagagccctt aggagactca tctcggttggt gtcaaagctg	240
gacagcggag tgccggaccg gtttccggt tcggatcgatggactt cactctgaag	300
atttcacggg tggaaagctga ggatgtggga gtgtactact gctggcaggaaaccatttc	360
cctggcactt ttggcggagg aactaaggc gaaatcaagg gaggaggtgg ctggggagga	420
ggcgatcg ggaggcgg gaggcggggaa ggagggtccg aaatccaact tgcaggatca	480
ggagccgaag tgaagaaacc gggagccacc gtcaaaatca gctgtaaagg atcgggattc	540
aatatcgagg actactacat ccactgggtg cagcaagctc cggcaaaagg actggagtgg	600
atggggcgca tcgaccaga gaacgacgaa accaaatacg gcccgtt ccaagggcgg	660
gtgaccatca ccggggacac ctcaactaac actgtgtaca tggagctgatggatcg	720
tccgaagata ctgcagtcta ctactgcgc ttccgggtgtgtgtactgggacaggc	780
accactgtga ctgtcagctc gaccactacc ccagcacccgaaaccacccac cccggctcct	840
accatcgccctt cccagccctt gtccctgcgtt ccggaggcat gtatccgc agctgggtgg	900
gccgtgcata cccgggtct tgcgtatctt acatgggc ccctctggct	960
ggtaatgcg gggcctgtgtgttactcgttactcgttactgtaa ggcgggtcg	1020
aagaagctgc tgcataatctt taagcaaccc ttcatgagc ctgtgcagac tactcaagag	1080
gaggacggctt gttcatgcgg gttcccgag gaggaggaag ggcggctgcga actgcgcgtg	1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaaggcagg ggcagaacca gctctacaac	1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagttac gacgtgttgg acaagccggaggac	1260
ccagaaatgg gcgccggaaagcc ggcgcagaaag aatcccaag agggcctgtt caacgcgtc	1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tggaaaggaa acgcagaaga	1380
ggccaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctgcggaccg ccaccaagga cacatgtac	1440
gctttcaca tgcaggccctt gcccgttgcgtt	1470

<210> 85

<211> 490

<212> PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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 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 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 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 Ser 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 Thr Lys Leu			
225	230	235	240
Glu Ile Lys			

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 822

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223

&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

&lt;400&gt; 87

atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcg	60
cccgagatcc	agctccaaca	gagcggagcc	gaactggtca	aaccgggagc	gtcggtaag	120
ttgtcatgca	ctggatcggg	cttcaacatc	gaggattact	acatccactg	ggtcaagcaa	180
cgcacccgagc	aggggctgga	atggatcgg	cggatcgacc	ccgaaaacga	tgaaccagg	240
tacgggccta	tcttccaagg	acgggccacc	attacggctg	acacgtcaag	caataccgtc	300
tacctccagc	tttccagct	gacctccgag	gacactgccg	tgtactactg	cgccttcaga	360

ggaggcgtgt	actggggacc	aggaaccact	ttgaccgtgt	ccagcggagg	cgggtggatca	420
ggaggaggag	gctcaggcgg	tggcggctcg	cacatggacg	tggcatgac	tcagtccccg	480
ctgaccctgt	cggtggaat	tggacagagc	gcatccatct	cgtcaagag	ctcacagtcg	540
ctgctggatt	ccgacggaaa	gacttatctg	aactggctgc	tccaaagacc	agggcaatca	600
ccgaaacgcc	ttatctccct	ggtgtcgaaa	ctcgactcgg	gtgtgccgga	tcggtttacc	660

ggtagcgggt ccggcacgga cttcaactc cgcattcga gggtggaaagc ggaggatctc  
gggatctact actgttggca ggaaacccac ttccctggga ctttgagg cggaactaag 780

ctgaaatca aggttagcca 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 Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Ser 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

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	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcg	60
cccgagatcc	agctccaaca	gagcggagcc	gaactggta	aaccgggagc	gtcggtgaag	120
ttgtcatgca	ctggatcggg	cttcaacatc	gaggattact	acatccactg	ggtcaagcaa	180
cgcaccgagc	aggggctgga	atggatcgga	cggatcgacc	ccgaaaacga	tcaaaccaaag	240
tacgggccta	tcttccaagg	acgggccacc	attacggctg	acacgtcaag	caataccgtc	300
tacctccagc	tttccagct	gacctccgag	gacactgccg	tgtactactg	cgccttcaga	360
ggaggcgtgt	actggggacc	aggaaccact	ttgaccgtgt	ccagcggagg	cggtgatca	420

ggaggaggag	gctcaggcgg	tggcggctcg	cacatggacg	tggcatgac	tcagtcccg	480
------------	------------	------------	------------	-----------	-----------	-----

ctgaccctgt	cggggcaat	tggacagagc	gcatccatct	cgtcaagag	ctcacagtcg	540
ctgctggatt	ccgacggaaa	gacttatctg	aactggctgc	tccaaagacc	aggcaatca	600
ccgaaacgcc	ttatctccct	ggtgtcgaaa	ctcgactcg	gtgtgccgga	tcggttacc	660
gttagcgggt	ccggcacgga	cttcaacttc	cgcattcga	gggtgaaagc	ggaggatctc	720
gggatctact	actgttggca	gggaacccac	ttccctggga	ctttggagg	cggaactaag	780
ctggaaatca	agaccactac	cccagcacgg	aggccaccca	ccccggctcc	taccatcgcc	840

tcccagcctc	tgtccctgcg	tccggaggca	tgttagacccg	cagctggtgg	ggccgtgcat	900
acccggggtc	ttgacttcgc	ctgcgatatc	tacatttggg	ccctctggc	tggtaacttgc	960
ggggctctgc	tgtttact	cgtgatcaact	ctttaactgta	agcgcgtcg	gaagaagctg	1020
ctgtacatct	ttaagcaacc	cttcatgagg	cctgtgcaga	ctactcaaga	ggaggacggc	1080
tgttcatgcc	ggttcccaga	ggaggaggaa	ggcggctgca	aactgcgcgt	gaaattcage	1140
cgcagcgcag	atgctccagc	ctacaaggcag	gggcagaacc	agctctacaa	cgaactcaat	1200
cttggctcgga	gagaggagta	cgacgtgctg	gacaagcgga	gaggacggga	cccagaaatg	1260

ggcgggaagc	cgcgcagaaa	gaatccccaa	gagggctgt	acaacgagct	ccaaaaggat	1320
aagatggcag	aagcctatag	cgagattgg	atgaaagggg	aacgcagaag	aggcaaaggc	1380
cacgacggac	tgtaccaggg	actcagcacc	gccaccaagg	acacctatga	cgctcttcac	1440
atgcaggccc	tgcccctcg	g				1461

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 487

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 90

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala 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 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
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 Val Tyr Trp Gly Pro Gly		
115	120	125
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
130	135	140
Ser Gly Gly Gly Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro		
145	150	155
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		
210	215	220
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu		
225	230	235
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 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 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 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 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 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

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 92

gatatccaaa tgactcagag cccttcatcc ctgagcgcca gcgtcgaga cagggtgacc 60

atcacgtgcc gggcatccca aggcattttaga aataacttgg cgtggatca gcaaaaacca 120  
ggaaaggccc cgaaggcgct gatctacgct gcctccaaacc ttccatcgagg agtgcctcg 180  
cgcttcaccc ggagcggttag cgaaacttggg ttaccctta tcgtgtcgcc cctgcagcca 240  
gaggacttcg cgacactacta ctgcctccag catcaactcg acccgatcgatcc 300  
ggaaccaagg tcgaaatcaa acgcacttggc tcgacgtcgatcc ggtcccgtaa accggatcg 360  
ggagaaggat cgaaagtcca agtgcgtggag agcggaggcg gactcgtgca acctggcg 420  
tcgctgcggc tcagctgtgc cgcgtcggt ttacttca gctcgatcg tatgtcatgg 480tgccggcagg ctccggaaa ggggctggaa tgggtgtccg ctatccgg ctcgggtgga 540  
agcaccaatt acgcccactc cgtgaaggga cgcttacca tctcacggta taactccaag 600  
aatactctgt acctccagat gaactcgctg agagccgagg acaccgcgt gtactactgc 660  
gcagggtaa gcccgtggc cgaatactgg ggacaggcga ccctcgatcc tgcgtacgc 720

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 807

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 93

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgtggctc ttctgctcca cgccgctcg 60

cccgatatcc aaatgactca gagccatca tccctgagcg ccagcgatcg agacagggtg 120  
accatcacgt gcccggcatc ccaaggcatt agaaataact tggcggtta tcagcaaaaa 180  
ccagggaaagg ccccgaaagcg cctgatctac gcccgtccaa acttcagtc aggagtgc 240  
tcgctgttca cccggagcg tagcgaaact gagttaccc ttatcgatcc gtcctgcag 300

ccagaggact tcgcgaccta ctactgcctc cagcatca cgtaccgtt gacttcggga 360  
 ggcggaca acca aggtcgaaat caaacgcact ggctcgacgt cagggtccgg taaaccggga 420  
 tcgggagaag gatcggaagt ccaagtgctg gagagcggag gcggactcgt gcaacctggc 480

gggtcgctgc ggctcagctg tgccgcgtcg ggtttactt ttagctcgta cgctatgtca 540  
 tgggtgcggc aggctccggg aaaggggctg gaatgggtgt ccgttatttc cggctcggt 600  
 ggaagcacca attacgccga ctccgtgaag ggacgcttca ccatctcacg ggataactcc 660  
 aagaataactc tgtaccccca gatgaactcg ctgagagccg aggacaccgc agtgtactac 720  
 tgccgcagggt caagcggctg gtccgaatac tggggacagg gcaccctcgt cactgtcagc 780  
 tcccatcacc atcaccacca ccatcac 807

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 269

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 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 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

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 cctgctgttt ccgcgtggctc ttctgctcca cgccgctcg 60

cccgatatacc aatgactca gagcccttca tccctgagcg ccagcgtcg agacagggtg 120

accatcacgt gccgggcattt ccaaggcatt agaaataact tggcgtggta tcagcaaaaa 180

ccagggaaagg ccccgaaagcg cctgatctac gcggcctcca acttcagtc aggagtgcc	240
tcgcgcttca cggggagcgg tagcggact gagtttaccc ttatcggtc gtcctcgag	300
ccagaggact tcgcgaccta ctactgcctc cagcatcaact cgtaccgtt gacttcggg	360
ggcggaaacca aggtcgaaat caaacgcact ggctcgacgt cagggtccgg taaaccggg	420
tcgggagaag gatcggaagt ccaagtgtcg gagagcggag gcggactcg gcaacctggc	480
gggtcgctgc ggctcagctg tgccgcgtcg gttttactt tcagctcgta cgctatgtca	540
tgggtgcggc aggctccggg aaaggggctg gaatgggtgt ccgctatttcccgctcggt	600

ggaagcacca attacgccga ctccgtgaag ggacgcttca ccatctcact ggataactcc	660
aagaatactc tgtacctcca gatgaactcg ctgagagccg aggacaccgc agtgtactac	720
tgccgcagggt caagcggctg gtccgaatac tggggacagg gcaccctcgta cactgtcagc	780
tccaccacta ccccagcacc gagggccaccc accccggctc ctaccatcgc ctcccagcct	840
ctgtccctgc gtccggaggc atgttagaccc gcagctggtg gggccgtgca taccggggt	900
cttgacttcg cctgcgatatactacattgg gcccctctgg ctggtaacttg cgggtcctg	960
ctgcattcac tcgtgatcac tctttactgt aagcgcggc ggaagaagct gctgtacatc	1020

tttaagcaac cttcatgag gcctgtgcag actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc	1080
cgggtccag aggaggagga aggccggctgc gaactgcgcg tgaaattcag ccgcagcga	1140
gatgctccag cctacaagca gggcagaac cagctctaca acgaactcaa tcttggtcg	1200
agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg agaggacggg acccagaaat gggcggaaag	1260
ccgcgcagaa agaatccccaa agagggctg tacaacgcgc tccaaaagga taagatggca	1320
gaaggctata gcgagatgg tatgaaaggg gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgg	1380
ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag gacacctatg acgctttca catgcaggcc	1440

ctgcccctc gg	1452
--------------	------

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 484

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 96

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

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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

Arg Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gly Glu Gly

130 135 140

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

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 1183

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 97

gtgaggctcc ggtgccgtc agtggcaga ggcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt	60
ggggggaggg gtggcaatt gaaccgggtc ctagagaagg tggcgccggg taaactggga	120
aagtgtatgtc gtgtactggc tccgccttt tcccgagggt gggggagaac cgtatataag	180
tgcagtagtc gccgtgaacg ttcttttcg caacgggtt gccgcccaga cacaggtaa	240

tgccgtgtgt gttcccgcg ggcctggcct cttaacgggt tatggccctt gcgtgccttg	300
aattacttcc acctggctgc agtacgtat tcttgatccc gagcttcggg ttgaaagtgg	360
gtggagagt tcgaggcctt ggccttaagg agcccttcg cctcgtgctt gagttgaggc	420
ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc	480
tgcttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttatgta cctgctgcgca cgctttttt	540
ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggatattt cggtttttgg	600
ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tggcggcga ggcggggcct	660

gcgagcgcgg ccaccgagaa tggacgggg gtatctcaa gctggccggc ctgcctgtgt	720
gcctggcctc ggcgcgcgt gtatcgcccc gccctggcg gcaaggctgg cccggcggc	780
accagttgcg tggcgaaa gatggccgt tcccgccct gtcgcaggga gctcaaaatg	840
gaggacgcgg cgctcgggag agcgggcggg tgagtacccc acacaaagga aaaggccct	900
tccgtcctca ggcgtcgctt catgtgactc cacggagtac cgggcgcgt ccaggcacct	960
cgattagttc tggatctttt ggagtacgtc gtcttaggt tggggggagg gttttatgc	1020
gatggatgtt cccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat	1080

gtaattctcc ttggatatttgccttttgcgtttggatct tggttcatttc tcaagcctca	1140
gacagtgggtt caaagttttt ttcttcatt tcaggtgtcg tga	1183

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 729

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 98

gagatccagc tccaacagag cggagccgaa ctggtaaac cgggagcg tc ggtgaagt tg	60
tcatgcactg gatcggtttt caacatcgag gattactaca tccactgggt caagcaacgc	120
accgagcagg ggctggaatg gatcgacgg atcgaccccg aaaacgtatg aaccaagttac	180

ggcctatct tccaaggacg ggccaccatt acggctgaca cgtcaagcaa taccgtctac	240
ctccagctt ccagcctgac ctccgaggac actgccgtt actactgcgc cttcagagga	300
ggcgtgtact ggggaccagg aaccacttg accgtgtcca gcggaggcgg tggatcagga	360
ggaggaggct caggcgtgg cggctcgac atggacgtgg tcatgactca gtccccgtg	420
accctgtcg tggcaattgg acagagcgca tccatctcg tcaagagctc acagtcgtg	480
ctggatccg acggaaagac ttatctgaac tggctgctcc aaagaccagg gcaatcacgg	540
aaacgccta tctccctggt gtcgaaactc gactcgggtg tgccggatcg gtttaccgg	600

agcgggtccg gcacggactt cactctccgc attcgaggg tggaaagcgg a gatctcggg	660
atctactact gttggcaggg aaccacttc cctggactt 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

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 100

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc	60
acgaggccca gaaccagctc	
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgtat	120
ttttggacaa gagacgtggc	
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc	180
ctcaggaagg cctgtacaat	
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga	240
ttggatgaa aggcgagcgc	
cgaggggca agggcacga tggcattac cagggtctca	300
gtacagccac caaggacacc	

tacgacgccc ttcatgca ggcctgccc cctcg	336
-------------------------------------	-----

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 101

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys

1 5 10

&lt;210&gt; 102

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 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 ccgccccccc	60
gggccccaccc gcaaggcatta 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 tgccctgccc ccgagttcct gggcggaccc 60

agcgtgttcc tttcccccaag gacaccctga tgcgtggccg gaccccccag 120

gtgacacctgtg tgggtggta cgtgtccag gaggaccccg aggtccagtt caactggta 180

gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240

acctaccggg tgggtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cgccaaggaa 300

tacaagtgtt aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360

gccaaggggcc agcctcggtt gcccaggtt tacaccctgc cccctagcca agaggagatg 420

accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggtt tctacccag cgacatcgcc 480

gtggagtggg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 540

gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagg cggctgaccg tggacaagag ccgggtggcag 600

gagggcaacg tcttagctg ctccgtgtt cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 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

aggtggccg aaagtccaa ggcccaggca tctagtgtc ctactgcaca gccccaggca	60
gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgaatac tggccgtggc	120
ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc	180
cctgaatgtc catccatac ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgccgtacag	240

gacttgtggc ttagagataa ggccacctt acatgtttcg tcgtggctc tgacctgaag	300
gatgccatt tgacttggga ggttgccgga aaggtaccca caggggggt tgaggaagg	360
ttgctggagc gccattccaa tggctctag agccagact caagactcac cttccgaga	420
tccctgtgga acgcccggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcttag cctggccca	480
cagcgctgta tggcccttag agagccagcc gcccaggcac cagttaaatgt tagccgtaa	540
ctgctcgcca gtagtgcattt cccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgcggc	600
tttagccgc ccaacatctt gtcgtgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc	660

ggcttcgctc cagccggcc cccacccag ccgggtctta ccacattctg ggcctggagt	720
gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg ttttgttcc	780
catgaagata gcaggaccct gctaaatgtctt tcttaggatc tggaggtttc ctacgtgact	840
gaccatt	847

&lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 108

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

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

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 109

ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(30)

&lt;223

&gt; /note="This sequence may encompass 1, 2, 3, 4, 5, or 6

'Gly Gly Gly Gly Ser' repeating units"

&lt;220&gt;&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (6)..(30)

&lt;223&gt; /replace=" "

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(30)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no  
preference with respect to those in the annotations  
for variant positions"

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(30)

<223> /note="See specification as filed for detailed description of  
substitutions and preferred embodiments"

&lt;400&gt; 110

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

1 5 10 15

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

20 25 30

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 111

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
---	----

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
---	-----

aaaaaaaaaa 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 Ser 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 Ser 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





aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	3660
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	3720
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	3780
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	3840
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	3900
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	3960
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4020
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4080
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4140
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4200
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4260
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4320
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4380
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4440
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4500
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4560
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4620
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4680
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4740
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4800
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4860
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4920
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4980
---	------

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	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

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	420
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	480
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	540
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	600
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	660
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	720
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	780
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	840
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	900
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	960
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	1080

aaaaaaaaaa 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

aaaaaaaaaa 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

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2000

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 117

ttttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt	60
ttttttttt tttttttt tttttttt tttttttt	100

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 5000

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; 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

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	60
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	120
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	180
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	240
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	300
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	360
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	420
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	480
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	540
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	600
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	660
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	720
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	780
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	840
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	900
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	960
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	1020
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	1080





ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	4680
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	4740
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	4800
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	4860
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	4920
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	4980
ttttttttt ttttttttt	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

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360





aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4020
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4080
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4140
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	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

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	60
---	----

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	120
---	-----

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	180
---	-----

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	240
---	-----

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	300
---	-----

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	360
---	-----

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa	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 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 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 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 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 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 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

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 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 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 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 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	