



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0125978
(43) 공개일자 2021년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7016558
(22) 출원일자(국제) 2019년11월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년05월31일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2019/114939
(87) 국제공개번호 WO 2020/088631
국제공개일자 2020년05월07일
(30) 우선권주장
201811297174.3 2018년11월01일 중국(CN)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
그라셀 바이오테크놀로지스 (상하이) 컴퍼니, 리미티드
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
넘버 926 빌딩 1 12층
쑤저우 그라셀 바이오테크놀로지스 컴퍼니, 리미티드
중국 215000 장쑤 쑤저우 쑤저우 인터스트리얼 파크
상타안 스트리트 넘버 218 블록 비 빌딩 12
(72) 발명자
왕, 신신
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
넘버 926 빌딩 1 12층
진, 타오
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
넘버 926 빌딩 1 12층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 259 항

(54) 발명의 명칭 T 세포 조작을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

조작된 면역 세포 및 이의 용도가 제공된다. 조작된 면역 세포는 CAR 또는 조작된 TCR을 포함하며, 상기 CAR 또는 조작된 TCR은 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포는 대상체에게 투여될 때 숙주 면역 세포, 예컨대 T 세포 및/또는 NK 세포를 억제하고, 생체내에서 조작된 면역 세포의 생존 및 지속성을 향상시켜, 이에 의해 보다 효과적인 종양 사멸 활성을 나타낼 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

양, 춘후이

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
 넘버 926 빌딩 1 12층

쉬, 중동

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
 넘버 926 빌딩 1 12층

리우, 리펑

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
 넘버 926 빌딩 1 12층

순, 징

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
 넘버 926 빌딩 1 12층

추, 슈이

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
 넘버 926 빌딩 1 12층

차오, 위

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
 넘버 926 빌딩 1 12층

(30) 우선권주장

201811535338.1 2018년12월14일 중국(CN)
 201811549651.0 2018년12월18일 중국(CN)
 201910492882.0 2019년06월06일 중국(CN)
 PCT/CN2019/101651 2019년08월20일 중국(CN)

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, 조작된 면역 세포:

하기를 포함하는 키메라 폴리펩티드이며: (i) 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티, 및 (ii) 상기 키메라 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티; 여기서 상기 인핸서 모이어티는 상기 유도성 세포 사멸 모이어티에 연결된 것인 키메라 폴리펩티드, 및

결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 폴리펩티드 수용체 (CPR)이며, 여기서 상기 결합 모이어티는 (i) 대상체에게 투여될 때 상기 조작된 면역 세포에 대한 상기 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 CPR의 개별 CPR은 (i) 상기 제1 항원 결합 도메인, (ii) 상기 제2 항원 결합 도메인, 또는 (iii) 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 CPR의 각 CPR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 하나 이상의 CPR.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 CPR이 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 조작된 T 세포 수용체 (TCR)인 조작된 면역 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 면역 세포 항원에 결합하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자가 불활성화되고, 여기서 상기 내인성 표면 마커가 발현될 때 상기 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)가 불활성화된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자가 상기 내인성 TCR이 불활성화되도록 불활성화된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 서브유닛을 코딩하는 상기 유전자가 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 인 조작된 면역 세포.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 키메라 폴리펩티드가 상기 인핸서 모이어티 및 상기 유도성 세포 사멸 모이어티에 의해 플랭킹된 어떠한 자기-절단 펩티드도 포함하지 않는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 상기 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포내 신호전달 경로가 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로인 조작된 면역 세포.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 자기-올리고머화를 통해 자기-활성화하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 자기-이량체화를 통해 자기-활성화하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 키메라 폴리펩티드가 분비된 단백질인 조작된 면역 세포.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 키메라 폴리펩티드가 세포내 단백질인 조작된 면역 세포.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 키메라 폴리펩티드가 막횡단 단백질인 조작된 면역 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티 또는 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 상기 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티 또는 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 상기 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 19

제16항에 있어서, (i) 상기 인핸서 모이어티가 상기 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유되고, (ii) 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 상기 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 20

제16항에 있어서, (i) 상기 인핸서 모이어티가 상기 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유되고, (ii) 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 상기 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 시토카인 또는 시토카인 수용체인 조작된 면역 세포.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 트랜스-활성화 인자 또는 시스-활성화 인자로서 기능하는 것인 조작된

면역 세포.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, ΔCD20, mTMPK, ΔCD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 EGFRt이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 조작된 면역 세포.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 HSV-TK이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 GCV인 조작된 면역 세포.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 iCasp9이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 AP1903인 조작된 면역 세포.

청구항 28

제1항에 있어서, 상기 세포 사멸 활성화제가 핵산, 폴리뉴클레오타이드, 아미노산, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 소분자, 효소, 리보솜, 프로테아좀, 이의 변이체 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 29

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 CPR의 상기 개별 CPR이 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인이 링커를 통해 연결된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 링커가 자기-절단 펩티드를 포함하지 않는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 또는 상기 제2 항원 결합이 scFv인 조작된 면역 세포.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인이 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열되며:

- (i) VL2-VH1-VL1-VH2;
- (ii) VH2-VL1-VH1-VL2;
- (iii) VL1-VH2-VL2-VH1;
- (iv) VH1-VL2-VH2-VL1;
- (v) VL2-VL1-VH1-VH2;
- (vi) VH2-VH1-VL1-VL2;
- (vii) VL1-VL2-VH2-VH1; 또는

(viii) VH1-VH2-VL2-VL1;

여기서 VH1은 상기 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 상기 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 상기 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 상기 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인인 조작된 면역 세포.

청구항 34

제29항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인이 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열되며:

(i) VL2-VH2-VL1-VH1;

(ii) VL2-VH2-VH1-VL1;

(iii) VL1-VH1-VL2-VH2;

(iv) VL1-VH1-VH2-VL2;

(v) VH2-VL2-VL1-VH1;

(vi) VH2-VL2-VH1-VL1;

(vii) VH1-VL1-VL2-VH2; 또는

(viii) VH1-VL1-VH2-VL2,

여기서 VH1은 상기 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 상기 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 상기 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 상기 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인인 조작된 면역 세포.

청구항 35

제30항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인이 상기 면역 세포 항원 및 상기 질환-연관 항원에 결합하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 36

제29항에 있어서, 상기 하나 이상의 CPR의 상기 개별 CPR이 상기 제1 항원 결합 도메인만을 포함하고, 상기 하나 이상의 CPR의 추가 개별 CPR이 상기 제2 항원 결합 도메인만을 포함하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 37

제30항에 있어서, 상기 면역 세포 항원이 면역 세포의 표면 단백질 또는 분비된 단백질인 조작된 면역 세포.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 면역 세포가 NK 세포, T 세포, 단핵구, 대식세포 또는 과립구인 조작된 면역 세포.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 면역 세포가 말초혈, 제대혈로부터 수득되거나, 줄기 세포로부터 유래된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 40

제37항에 있어서, 상기 면역 세포 항원이 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 41

제1항에 있어서, 상기 질환-연관 항원이 종양-연관 항원인 조작된 면역 세포.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 종양-연관 항원이 CD19, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Robo1, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 또는 TROP-2인 조작된 면역 세포.

청구항 43

제1항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 세포 항원에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19에 결합하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD3에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19에 결합하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD7에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19에 결합하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 46

제43항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD137에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19에 결합하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I 및/또는 HLA-II 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 49

제47항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 50

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현이 상향조절된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현이 상향조절된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 52

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두의 발현이 억제된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 53

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두를 코딩하는 유전자가 불활성화된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 54

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 HLA-E 또는 HLA-G가 과발현된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 55

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 CD24, CD47, FasL 및/또는 PD-1이 과발현된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 T 세포가 알파 베타 T 세포 또는 감마 델타 T 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 58

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 유래된 조작된 면역 세포.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)인 조작된 면역 세포.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 자가 세포 또는 동종 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 61

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상태를 갖는 대상체로부터 획득된 조작된 면역 세포.

청구항 62

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 건강한 공여자로부터 획득된 조작된 면역 세포.

청구항 63

하기를 포함하는, 조작된 면역 세포이며:

(a) 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)이며, 여기서 상기 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 하나 이상의 CAR; 및

(b) 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티,

여기서 상기 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화되고,

여기서 상기 조작된 면역 세포는, (a)의 상기 하나 이상의 CAR을 포함하나 (b)의 상기 인헨서 모이어티를 포함하지 않는 추가의 조작된 면역 세포와 비교하여, (i) 상기 조작된 면역 세포와 이중인 세포의 존재 하에 적어도 약 20일 동안 시험관내에서 생존가능한 상태로 유지함으로써 향상된 정도의 지속성, (ii) 15일 이내에 적어도 약 10배만큼 향상된 정도의 확장, 또는 (iii) 상기 면역 세포 항원 또는 상기 질환-연관 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 향상된 세포독성을 나타내는 것인

조작된 면역 세포.

청구항 64

제63항에 있어서, (i), (ii) 및 (iii) 중 둘 이상을 나타내는 것을 특징으로 하는 조작된 면역 세포.

청구항 65

제63항에 있어서, (i), (ii) 및/또는 (iii)이 임의의 외인성 인헨서 모이어티의 부재 하에 측정되는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 66

제63항에 있어서, 상기 면역 세포 항원이 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 면역 세포 항원이 CD7인 조작된 면역 세포.

청구항 68

제63항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 상기 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포내 신호전달 경로가 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로인 조작된 면역 세포.

청구항 71

제63항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 자기-올리고머화를 통해 자기-활성화하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 자기-이량체화를 통해 자기-활성화하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 73

제63항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 시토카인 또는 시토카인 수용체인 조작된 면역 세포.

청구항 74

제63항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15,

IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGF β 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 75

제63항에 있어서, 상기 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자가 상기 내인성 TCR이 불활성화되도록 불활성화된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 서브유닛을 코딩하는 상기 유전자가 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 인 조작된 면역 세포.

청구항 77

제63항에 있어서, 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함하고, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 조작된 면역 세포의 자살을 일으키는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 EGFRt이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 조작된 면역 세포.

청구항 80

제78항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 HSV-TK이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 GCV인 조작된 면역 세포.

청구항 81

제78항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 iCasp9이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 AP1903인 조작된 면역 세포.

청구항 82

제77항에 있어서, 상기 세포 사멸 활성화제가 핵산, 폴리뉴클레오티드, 아미노산, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 소분자, 효소, 리보솜, 프로테아좀, 이의 변이체 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 83

제63항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I 및/또는 HLA-II 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 85

제83항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 86

제63항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현이 상향조절된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현이 상향조절된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 88

제63항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두의 발현이 억제된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 89

제63항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두를 코딩하는 유전자가 불활성화된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 90

제63항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 HLA-E 또는 HLA-G가 과발현된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 91

제63항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 CD24, CD47, FASL 및/또는 PD-1이 과발현된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 92

제63항에 있어서, 상기 질환-연관 항원이 종양-연관 항원인 조작된 면역 세포.

청구항 93

제63항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 또는 상기 제2 항원 결합 도메인이 scFv인 조작된 면역 세포.

청구항 94

제63항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자가 불활성화되고, 여기서 상기 내인성 표면 마커가 발현될 때 상기 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 내인성 표면 마커가 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7인 조작된 면역 세포.

청구항 96

제63항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 97

제63항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 유래된 조작된 면역 세포.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)인 조작된 면역 세포.

청구항 99

제63항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 자가 세포 또는 동종 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 100

제63항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상태를 갖는 대상체로부터 수득된 조작된 면역 세포.

청구항 101

제63항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 건강한 공여자로부터 수득된 조작된 면역 세포.

청구항 102

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항의 상기 조작된 면역 세포 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 질환 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 103

제102항의 상기 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 질환을 치료 또는 진단 하는 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 상기 제약 조성물 중 상기 조작된 면역 세포가 동종 면역 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 동종 면역 세포로부터 유래된 상기 조작된 면역 세포가 상기 대상체에서 이식편 대 숙주 질환 (GvHD)을 유도하지 않는 것인 방법.

청구항 106

제103항에 있어서, 상기 제약 조성물 중 상기 조작된 면역 세포가 자가 면역 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 107

제103항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제약 조성물 중 상기 조작된 면역 세포의 내인성 TCR이 기능적으로 불활성인 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포가 기능적으로 활성인 TCR을 갖는 추가 면역 세포와 비교하여 상기 대상체에서 GvHD를 감소시키는 것인 방법.

청구항 109

제102항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환이 암인 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 상기 암이 림프종 또는 백혈병인 방법.

청구항 111

하기를 포함하는, 세포이며:

기능적으로 불활성인 T 세포 수용체 (TCR), 및

하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR), 여기서 상기 하나 이상의 CAR의 각 개별 CAR은 결합 모이어티를 포함하며, 상기 결합 모이어티는 (i) 대상체에게 투여될 때 상기 조작된 면역 세포에 대한 상기 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는

것인

세포.

청구항 112

제111항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인이 링커에 의해 연결된 것인 세포.

청구항 113

제112항에 있어서, 상기 링커가 자기-절단 펩티드를 포함하지 않는 것인 세포.

청구항 114

제111항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인이 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열되며:

- (i) VL2-VH1-VL1-VH2;
- (ii) VH2-VL1-VH1-VL2;
- (iii) VL1-VH2-VL2-VH1;
- (iv) VH1-VL2-VH2-VL1;
- (v) VL2-VL1-VH1-VH2;
- (vi) VH2-VH1-VL1-VL2;
- (vii) VL1-VL2-VH2-VH1; 또는
- (viii) VH1-VH2-VL2-VL1,

여기서 VH1은 상기 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 상기 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 상기 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 상기 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인인

세포.

청구항 115

제111항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 및 상기 제2 항원 결합 도메인이 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열되며:

- (i) VL2-VH2-VL1-VH1;
- (ii) VL2-VH2-VH1-VL1;
- (iii) VL1-VH1-VL2-VH2;
- (iv) VL1-VH1-VH2-VL2;
- (v) VH2-VL2-VL1-VH1;
- (vi) VH2-VL2-VH1-VL1;
- (vii) VH1-VL1-VL2-VH2; 또는
- (viii) VH1-VL1-VH2-VL2,

여기서 VH1은 상기 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 상기 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 상기 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 상기 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인인

세포.

청구항 116

제111항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자가 불활성화되어, 이에 의해 상기 기능적으로 불활성인 TCR을 생성하는 것인 세포.

청구항 117

제116항에 있어서, 상기 서브유닛을 코딩하는 상기 유전자가 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 인 세포.

청구항 118

제111항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 면역 세포 항원에 결합하는 것인 세포.

청구항 119

제118항에 있어서, 상기 면역 세포 항원이 면역 세포의 표면 단백질 또는 분비된 단백질인 세포.

청구항 120

제119항에 있어서, 상기 면역 세포가 NK 세포, T 세포, 단핵구, 대식세포 또는 과립구인 세포.

청구항 121

제118항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포 항원이 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7인 세포.

청구항 122

제111항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환-연관 항원이 종양-연관 항원인 세포.

청구항 123

제122항에 있어서, 상기 종양-연관 항원이 CD19, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCRa, TCRb, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Robo1, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 또는 TROP-2인 세포.

청구항 124

제111항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 세포 항원에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19에 결합하는 것인 세포.

청구항 125

제124항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD3에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19에 결합하는 것인 세포.

청구항 126

제124항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD7에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19에 결합하는 것인 세포.

청구항 127

제124항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD137에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19에 결합하는 것인 세포.

청구항 128

제111항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 인헨서 모이어티를 추가로 포함하며, 상기 인헨서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시키는 것인 세포.

청구항 129

제128항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 상기 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된 것인 세포.

청구항 130

제128항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된 것인 세포.

청구항 131

제128항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포내 신호전달 경로가 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로인 세포.

청구항 132

제131항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 시토카인 또는 시토카인 수용체인 세포.

청구항 133

제128항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGF β 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 세포.

청구항 134

제111항 내지 제133항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 상기 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함하는 세포.

청구항 135

제134항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 세포.

청구항 136

제135항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 EGFRt이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 세포.

청구항 137

제135항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 HSV-TK이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 GCV인 세포.

청구항 138

제135항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 iCasp9이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 AP1903인 세포.

청구항 139

제111항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자가 불활성화되고, 여기서 상기 내인성 표면 마커가 발현될 때 상기 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있는 것인 세포.

청구항 140

제139항에 있어서, 상기 내인성 표면 마커가 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7인 세포.

청구항 141

키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 서열을 포함하며, 여기서 상기 CAR은 결합 모이어티를 포함하며, 상기 결합 모이어티는 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인에 연결된 (i) 제1 항원 결합 도메인을 포함하며, 상기 제1 항원 결합 도메인은 대상체에게 투여될 때 상기 조작된 면역 세포에 대한 상기 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키고, 여기서 상기 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 142

제141항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 결합하는 것인 핵산 분자.

청구항 143

제141항 또는 제142항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 도메인이 CD19, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGA-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFR, LRP5, MUC1, MUC16, TCRa, TCRb, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Robo1, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAG3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 또는 TROP-2에 결합하는 것인 핵산 분자.

청구항 144

제141항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 인핸서 모이어티를 코딩하는 제2 서열을 추가로 포함하며, 상기 인핸서 모이어티는 세포에서 발현될 때 상기 CAR의 하나 이상의 활성을 향상시키는 것인 핵산 분자.

청구항 145

제144항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 핵산 분자.

청구항 146

제141항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 세포 사멸 모이어티를 코딩하는 제2 서열을 추가로 포함하며, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티는 세포에서 발현될 때 상기 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활

성화제와 접촉시 상기 세포의 사멸을 일으키는 것인 핵산 분자.

청구항 147

제146항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 핵산 분자.

청구항 148

제141항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 서열 및 상기 제2 서열에 의해 플랭킹된 제3 서열을 추가로 포함하며, 여기서 상기 제3 서열은 절단가능한 링커를 코딩하는 것인 핵산 분자.

청구항 149

제148항에 있어서, 상기 절단가능한 링커가 자기-절단 펩티드인 핵산 분자.

청구항 150

제141항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 서열 및/또는 상기 제2 서열의 발현을 조절하는 조절 서열을 추가로 포함하는 핵산 분자.

청구항 151

제141항 내지 제150항 중 어느 한 항의 상기 핵산 분자를 포함하는 키트.

청구항 152

(a) 제141항 내지 제150항 중 어느 한 항의 상기 핵산 분자를 세포에 전달하는 단계; 및 (b) 상기 핵산 분자를 상기 세포에서 발현시켜 이에 의해 상기 조작된 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 조작된 세포를 생성하는 방법.

청구항 153

하기를 포함하는, 조작된 면역 세포이며:

상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티;

CD7에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR), 여기서 상기 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하고;

여기서 상기 조작된 면역 세포에서 내인성 CD7은 불활성화된 것인

조작된 면역 세포.

청구항 154

제153항에 있어서, 인핸서 모이어티가 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, PD-1, PD-L1, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19 및 TGFR 베타, 이에 대한 수용체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 155

제153항 또는 제154항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)가 불활성화된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 156

제153항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함하는 폴리펩티드를 추가로 포함하는 조작된 면역 세포.

청구항 157

제156항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 상기 폴리펩티드의 일부인 조작된 면역 세포.

청구항 158

제153항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 상기 CAR의 일부가 아닌 것인 조작된 면역 세포.

청구항 159

제153항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인헨서 모이어티가 상기 CAR의 일부인 조작된 면역 세포.

청구항 160

제153항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 161

제153항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 유래된 조작된 면역 세포.

청구항 162

제161항에 있어서, 상기 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)인 조작된 면역 세포.

청구항 163

제153항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 자가 세포 또는 동종 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 164

제153항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 상태를 갖는 대상체로부터 획득된 조작된 면역 세포.

청구항 165

제153항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 건강한 공여자로부터 획득된 조작된 면역 세포.

청구항 166

제153항 내지 제165항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포를 생성하는 방법이며,

(a) (i) 상기 인헨서 모이어티 및 (ii) 상기 CAR을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 면역 세포에 전달하는 단계; 및 (b) 상기 하나 이상의 핵산 분자를 상기 면역 세포에서 발현시켜, 이에 의해 상기 조작된 면역 세포를 생성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 167

제166항에 있어서, 단일 핵산 분자가 (i) 상기 인헨서 모이어티 및 (ii) 상기 CAR을 코딩하는 것인 방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 상기 단일 핵산 분자가 (i) 상기 인헨서 모이어티 및 (ii) 상기 CAR에 의해 플랭킹된 자기-절단 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 169

제167항에 있어서, 상기 단일 핵산 분자가 (i) 상기 인헨서 모이어티 및 (ii) 상기 CAR에 의해 플랭킹된 어떠한 자기-절단 펩티드도 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 170

제166항에 있어서, (i) 제1 핵산 분자가 상기 인헨서 모이어티를 코딩하고, (ii) 제2 핵산 분자가 상기 CAR을 코딩하는 것인 방법.

청구항 171

제153항 내지 제165항 중 어느 한 항의 상기 조작된 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 상태를 치료 또는 진단하는 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포가 상기 대상체의 자가 면역 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 173

제171항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포가 동종 면역 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 174

제171항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상태가 암인 방법.

청구항 175

하기를 포함하는, 조작된 면역 세포이며:

(i) CD7에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 단일 키메라 항원 수용체 (CAR), 상기 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하고,

여기서 내인성 CD7을 코딩하는 유전자는 상기 조작된 면역 세포에서 불활성화된 것인

조작된 면역 세포.

청구항 176

제175항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 추가로 포함하는 조작된 면역 세포.

청구항 177

제176항에 있어서, 인핸서 모이어티가 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, PD-1, PD-L1, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19 및 TGFR 베타, 이에 대한 수용체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 178

제175항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)가 불활성화된 것인 조작된 면역 세포.

청구항 179

제175항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함하는 폴리펩티드를 추가로 포함하는 조작된 면역 세포.

청구항 180

제179항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 폴리펩티드의 일부인 조작된 면역 세포.

청구항 181

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 182

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 유래된 조작된 면역 세포.

청구항 183

제182항에 있어서, 상기 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)인 조작된 면역 세포.

청구항 184

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 자가 세포 또는 동종 세포인 조작된 면역 세포.

청구항 185

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 상태를 갖는 대상체로부터 수득된 조작된 면역 세포.

청구항 186

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 건강한 공여자로부터 수득된 조작된 면역 세포.

청구항 187

제175항 내지 제186항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포를 생성하는 방법이며,

(a) 상기 단일 CAR을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 면역 세포에 전달하는 단계; 및 (b) 상기 하나 이상의 핵산 분자를 상기 면역 세포에서 발현시켜, 이에 의해 상기 조작된 면역 세포를 생성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 188

제187항에 있어서, 단일 핵산 분자가 상기 단일 CAR을 코딩하는 것인 방법.

청구항 189

제175항 내지 제186항 중 어느 한 항의 상기 조작된 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 상태를 치료 또는 진단하는 방법.

청구항 190

제189항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포가 상기 대상체의 자가 면역 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 191

제189항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포가 동종 면역 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 192

제189항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상태가 암인 방법.

청구항 193

동종 세포 요법 전달을 필요로 하는 대상체에게 조작된 면역 세포 집단을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 집단의 개별 조작된 면역 세포는

(a) 결합 모이어티를 포함하며, 여기서 상기 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 제1 항원 결합 도메인은 대상체에게 투여될 때 상기 조작된 면역 세포에 대한 상기 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 것인, 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR);

(b) 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티

를 포함하며, 여기서 상기 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화되고,

여기서 상기 조작된 면역 세포는, (a)의 상기 하나 이상의 CAR을 포함하나 (b)의 상기 인핸서 모이어티를 포함하지 않는 추가의 조작된 면역 세포와 비교하여, (i) 상기 조작된 면역 세포와 이중인 세포의 존재 하에 적어도 약 20일 동안 시험관내에서 생존가능한 상태로 유지함으로써 향상된 정도의 지속성, (ii) 15일 이내에 적어도

약 10배만큼 향상된 정도의 확장, 또는 (iii) 상기 면역 세포 항원 또는 상기 질환-연관 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 향상된 세포독성을 나타내는 것인, 동종 세포 요법을 전달하는 방법.

청구항 194

제193항에 있어서, 추가 증식제를 사용하지 않고 조작된 면역 세포 집단을 단독으로 투여하는 상기 단계가 (i) 상기 조작된 면역 세포와 이중인 세포의 존재 하에 적어도 약 20일 동안 시험관내에서 생존가능한 상태로 유지함으로써 향상된 정도의 지속성, (ii) 15일 이내에 적어도 약 10배만큼 향상된 정도의 확장, 또는 (iii) 상기 면역 세포 항원 또는 상기 질환-연관 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 향상된 세포독성을 산출하는 것인 방법.

청구항 195

제194항에 있어서, 상기 추가 증식제가 시토카인인 방법.

청구항 196

제193항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 CAR의 각 CAR이 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 도메인이 대상체에게 투여될 때 상기 조작된 면역 세포에 대한 상기 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 것인 방법.

청구항 197

제193항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포의 내인성 CD7이 불활성화된 것인 방법.

청구항 198

제193항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포 항원이 CD7인 방법.

청구항 199

제193항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 개별 조작된 면역 세포의 상기 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된 것인 방법.

청구항 200

제193항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된 것인 방법.

청구항 201

제200항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포내 신호전달 경로가 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로인 방법.

청구항 202

제193항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 자기-올리고머화를 통해 자기-활성화하는 것인 방법.

청구항 203

제193항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 자기-이량체화를 통해 자기-활성화하는 것인 방법.

청구항 204

제193항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 시토카인 또는 시토카인 수용체인 방법.

청구항 205

제193항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 206

제193항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자가 상기 내인성 TCR이 불활성화되도록 불활성화된 것인 방법.

청구항 207

제206항에 있어서, 상기 서브유닛을 코딩하는 상기 유전자가 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 인 방법.

청구항 208

제193항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포가 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함하며, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 조작된 면역 세포의 자살을 일으키는 것인 방법.

청구항 209

제208항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 210

제209항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 EGFRt이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 방법.

청구항 211

제209항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 HSV-TK이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 GCV인 방법.

청구항 212

제209항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 iCasp9이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 AP1903인 방법.

청구항 213

제208항에 있어서, 상기 세포 사멸 활성화제가 핵산, 폴리뉴클레오티드, 아미노산, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 소분자, 효소, 리보솜, 프로테아좀, 이의 변이체 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 214

제193항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 방법.

청구항 215

제214항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I 및/또는 HLA-II 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 방법.

청구항 216

제214항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현이 무손상 상태로 유지되는 것인 방법.

청구항 217

제214항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현이 상향조절된 것인 방법.

청구항 218

제214항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현이 상향조절된 것인 방법.

청구항 219

제193항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두의 발현이 억제된 것인 방법.

청구항 220

제193항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두를 코딩하는 유전자가 불활성화된 것인 방법.

청구항 221

제193항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 HLA-E 또는 HLA-G가 과발현된 것인 방법.

청구항 222

제193항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 면역 세포의 CD24, CD47, FASL 및/또는 PD-1이 과발현된 것인 방법.

청구항 223

제193항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환-연관 항원이 종양-연관 항원인 방법.

청구항 224

제193항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인 또는 상기 제2 항원 결합 도메인이 scFv인 방법.

청구항 225

제193항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포가 T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포인 방법.

청구항 226

제193항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포가 줄기 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 227

제226항에 있어서, 상기 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)인 방법.

청구항 228

제193항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포가 동종 세포인 방법.

청구항 229

제193항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개별 조작된 면역 세포가 건강한 공여자로부터 수득된 것인 방법.

청구항 230

하기를 포함하는, 세포이며:

(a) 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)이며, 여기서 상기 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 하나 이상의 CAR; 및

(b) 상기 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티,

여기서 상기 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화된 것인

세포.

청구항 231

제230항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 세포의 하나 이상의 활성을 향상시키는 것인 세포.

청구항 232

제230항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 세포의 상기 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된 것인 세포.

청구항 233

제230항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향 조절하도록 구성된 것인 세포.

청구항 234

제230항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포내 신호전달 경로가 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로인 세포.

청구항 235

제230항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 시토카인 또는 시토카인 수용체인 세포.

청구항 236

제230항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 세포.

청구항 237

제230항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함하는 세포.

청구항 238

제237항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, ΔCD20, mTMPK, ΔCD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 세포.

청구항 239

제237항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 EGFRt이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 세포.

청구항 240

제237항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 HSV-TK이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 GCV인 세포.

청구항 241

제237항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 iCasp9이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 AP1903인 세포.

청구항 242

제230항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자가 불활성화되고, 여기서 상기 내인성 표면 마커가 발현될 때 상기 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있는 것인 세포.

청구항 243

제242항에 있어서, 상기 내인성 표면 마커가 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7인 세포.

청구항 244

림프성 악성종양 치료를 필요로 하는 환자에게 조작된 면역 세포 집단을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 집단의 개별 조작된 면역 세포는

(a) 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)이며, 여기서 상기 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 하나 이상의 CAR; 및

(b) 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티

를 포함하며, 여기서 상기 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화되고,

여기서 (i) 말초혈 중 이환 세포의 수 또는 골수 중 이환 세포의 수는 상기 조작된 면역 세포의 마지막 투여 후 3주 이내에 적어도 50%만큼 감소되고, (ii) 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수는 상기 조작된 면역 세포의 마지막 투여 후 3주 이내에 증가하기 시작하는 것인

림프성 악성종양을 치료하는 방법.

청구항 245

제244항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시키는 것인 방법.

청구항 246

제244항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 상기 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된 것인 방법.

청구항 247

제244항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 상기 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된 것인 방법.

청구항 248

제244항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포내 신호전달 경로가 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로인 방법.

청구항 249

제244항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 시토카인 또는 시토카인 수용체인 방법.

청구항 250

제244항에 있어서, 상기 인핸서 모이어티가 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방

법.

청구항 251

제244항 내지 제250항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 면역 세포가 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 252

제251항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, ΔCD20, mTMPK, ΔCD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 253

제251항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 EGFRt이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 방법.

청구항 254

제251항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 HSV-TK이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 GCV인 방법.

청구항 255

제251항에 있어서, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티가 iCasp9이고, 상기 세포 사멸 활성화제가 AP1903인 방법.

청구항 256

제244항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자가 불활성화되고, 여기서 상기 내인성 표면 마커가 발현될 때 상기 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있는 것인 방법.

청구항 257

제256항에 있어서, 상기 내인성 표면 마커가 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α, TCR β 또는 SLAMF7인 방법.

청구항 258

제244항에 있어서, 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수가, 말초혈 중 이환 세포의 수 또는 골수 중 이환 세포의 수가 적어도 50%만큼 감소되기 전에 증가하기 시작하는 것인 방법.

청구항 259

제244항에 있어서, 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수가, 말초혈 중 이환 세포의 수 또는 골수 중 이환 세포의 수가 적어도 50%만큼 감소된 후에 증가하기 시작하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

상호 참조

[0001]

본 출원은 2018년 11월 1일에 출원된 중국 특허 출원 번호 201811297174.3; 2018년 12월 14일에 출원된 중국 특허 출원 번호 201811535338.1; 2018년 12월 18일에 출원된 중국 특허 출원 번호 201811549651.0; 2019년 6월 6일에 출원된 중국 특허 출원 번호 201910492882.0; 및 2019년 8월 20일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/CN2019/101651을 우선권 주장하며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현시키기 위한 유전적 변형에 의한 종양-특이적 T 림프구의 생성은 강력한 항종양 효과를 생성하는 합성 생물학의 한 형태로서 주목을 받고 있다. 특이성이 항체 단편에 의해 부여되기 때문에, CAR-T 세포는 MHC 제한적이지 아니므로, MHC 매칭을 필요로 하는 T-세포 수용체에 기반한 접근법보다 더 실용적이다.

[0004] 암 치료에서 수득된 초기 CAR-T 세포 임상 데이터는 유망한 결과를 나타내었지만, 환자에 대한 위험이 더 높고, 일부 환자의 T 세포는 TCR 또는 CAR 재지정 이후에도 효과적이다. 치료가 또한 충분히 효과적이지 않으며, 이는 동종 공여자 T 세포의 변형을 촉진한다. 그러나, 주입된 동종 T 세포의 내인성 $\alpha\beta$ T 세포 수용체는 수용자에서 1차 및 2차 조직적합성 항원을 인식할 수 있으며, 이는 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)을 초래한다. 그 결과, 자가 CAR-T 세포 주입을 사용하는 대부분의 현재 임상 시험은 입양 세포 이동 후 정상 조직의 TCR-매개 유해한 인식을 방지하기 위해 면역 관용에 의존한다. 이 접근법은 초기 임상적 성공을 달성하였지만, 환자-특이적 T 세포 생성물을 제조하는데 드는 시간과 비용에 의해 제한된다.

발명의 내용

[0005] <요약>

[0006] 동종 세포 요법을 위해 면역 세포 (예를 들어, T 세포)를 유전적으로 변형시키기 위한 조성물 및 방법에 대한 필요성이 본원에서 인식된다. 또한, 환자-특이적 T 세포 생성물을 제조하는데 드는 시간과 비용을 회피하면서 면역 세포 (예를 들어, T 세포)를 변형시키는 방법에 대한 필요성이 본원에서 인식된다.

[0007] 한 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 조작된 면역 세포를 제공한다: (i) 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티, 및 (ii) 키메라 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함하며, 여기서 인핸서 모이어티는 유도성 세포 사멸 모이어티에 연결된 것인 키메라 폴리펩티드, 및 결합 모이어티를 포함하며, 여기서 결합 모이어티는 (i) 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 하나 이상의 CPR의 개별 CPR은 (i) 제1 항원 결합 도메인, (ii) 제2 항원 결합 도메인, 또는 (iii) 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함하고, 여기서 하나 이상의 CPR의 각 CPR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호 전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 하나 이상의 키메라 폴리펩티드 수용체 (CPR).

[0008] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 CPR은 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 조작된 T 세포 수용체 (TCR)이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자는 불활성화 (예를 들어, 침묵 또는 녹아웃)되고, 여기서 내인성 표면 마커는 발현될 때 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 TCR의 기능은 억제제에 의해 억제된다. 일부 실시양태에서, 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자는 내인성 TCR이 불활성화되도록 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 서브유닛을 코딩하는 유전자는 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 이다. 일부 실시양태에서, 키메라 폴리펩티드는 인핸서 모이어티 및 유도성 세포 사멸 모이어티에 의해 플랭킹된 어떠한 자기-절단 펩티드도 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토키인 신호전달 경로이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 자기-올리고머화를 통해 자기-활성화한다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 자기-이량체화를 통해 자기-활성화한다. 일부 실시양태에서, 키메라 폴리펩티드는 분비된 단백질이다. 일부 실시양태에서, 키메라 폴리펩티드는 세포내 단백질이다. 일부 실시양태에서, 키메라 폴리펩티드는 막횡단 단백질이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티 또는 유도성 세포 사멸 모이어티는 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유된다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티 또는 유도성 세포 사멸 모이어티는 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유된다. 일부 실시양태에서, (i) 인핸서 모이어티는 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유되고, (ii) 유도성 세포 사멸 모이어티는 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유된다. 일부 실시양태에서, (i) 인핸서 모이어티는 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유되고, (ii) 유도성 세포 사멸 모이어티는 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유된다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 시토키인 또는 시토키인 수용체이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTLA-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편,

이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 인헨서 모이어티는 트랜스-활성화 인자 또는 시스-활성화 인자로서 기능한다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 세포 사멸 활성화제는 GCV이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다. 일부 실시양태에서, 세포 사멸 활성화제는 핵산, 폴리뉴클레오티드, 아미노산, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 소분자, 효소, 리보솜, 프로테아좀, 이의 변이체 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 CPR의 개별 CPR은 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 링커를 통해 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 자기-절단 펩티드를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 또는 제2 항원 결합은 scFv이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열된다: (i) VL2-VH1-VL1-VH2; (ii) VH2-VL1-VH1-VL2; (iii) VL1-VH2-VL2-VH1; (iv) VH1-VL2-VH2-VL1; (v) VL2-VL1-VH1-VH2; (vi) VH2-VH1-VL1-VL2; (vii) VL1-VL2-VH2-VH1; 또는 (viii) VH1-VH2-VL2-VL1; 여기서 VH1은 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열된다: (i) VL2-VH2-VL1-VH1; (ii) VL2-VH2-VH1-VL1; (iii) VL1-VH1-VL2-VH2; (iv) VL1-VH1-VH2-VL2; (v) VH2-VL2-VL1-VH1; (vi) VH2-VL2-VH1-VL1; (vii) VH1-VL1-VL2-VH2; 또는 (viii) VH1-VL1-VH2-VL2, 여기서 VH1은 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원 및 질환-연관 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 CPR의 개별 CPR은 제1 항원 결합 도메인만을 포함하고, 하나 이상의 CPR의 추가 개별 CPR은 제2 항원 결합 도메인만을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 항원은 면역 세포의 표면 단백질 또는 분비된 단백질이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 NK 세포, T 세포, 단핵구, 선천성 림프구, 대식세포 또는 과립구이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 말초혈, 체대혈로부터 획득되거나, 줄기 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 질환-연관 항원은 종양-연관 항원이다. 일부 실시양태에서, 종양-연관 항원은 CD19, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGA-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Robo1, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGA3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 또는 TROP-2이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD2, CD3, CD5, CD7 및 CD137로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 세포 항원에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD3에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD7에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD137에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I 및/또는 HLA-II 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현은 상향조절된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 상향조절된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두의 발현은 억제된다. 일부 실시양태에서, 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두를 코딩하는 유전자는 불활성

화된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 HLA-E 또는 HLA-G는 과발현된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 CD24, CD47, FASL 및/또는 PD-1은 과발현된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 줄기 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 자가 세포 또는 동종 세포이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 상태를 갖는 대상체로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 건강한 공여자로부터 획득된다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 조작된 면역 세포를 제공한다: (a) 결합 모이어티를 포함하며, 여기서 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티, 여기서 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화되고, 여기서 조작된 면역 세포는, (a)의 하나 이상의 CAR을 포함하나 (b)의 인핸서 모이어티를 포함하지 않는 추가의 조작된 면역 세포와 비교하여, (i) 조작된 면역 세포와 이중인 세포의 존재 하에 적어도 약 20일 동안 시험관내에서 생존가능한 상태로 유지함으로써 향상된 정도의 지속성, (ii) 15일 이내에 적어도 약 10배만큼 향상된 정도의 확장, 또는 (iii) 면역 세포 항원 또는 질환-연관 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 향상된 세포독성을 나타낸다.

[0010] 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 (i), (ii) 및 (iii) 중 둘 이상을 나타내는 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, (i), (ii) 및/또는 (iii)은 임의의 외인성 인핸서 모이어티의 부재 하에 측정된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CS1, TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 항원은 CD7이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 자기-올리고머화를 통해 자기-활성화한다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 자기-이량체화를 통해 자기-활성화한다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 시토카인 또는 시토카인 수용체이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTLA-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGF β 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자는 내인성 TCR이 불활성화되도록 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 서브유닛을 코딩하는 유전자는 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함하며, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티는 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 자살을 일으킨다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 세포 사멸 활성화제는 GCV이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다. 일부 실시양태에서, 세포 사멸 활성화제는 핵산, 폴리뉴클레오타이드, 아미노산, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 소분자, 효소, 리보솜, 프로테아솜, 이의 변이체 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I 및/또는 HLA-II 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현은 상향조절된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 상향조절된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두의 발현은 억제된다. 일부 실시양태에서, 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두를 코딩하는 유전자는 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 HLA-E 또는 HLA-G는 과발현된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 CD24, CD47, FASL 및/또는 PD-1은 과발현된다. 일부 실시양태에서, 질환-연관 항원은 종양-연관 항원이다. 일부 실시양태

에서, 제1 항원 결합 도메인 또는 제2 항원 결합 도메인은 scFv이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자는 불활성화되고, 여기서 내인성 표면 마커는 발현될 때 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 내인성 표면 마커는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 줄기 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 자가 세포 또는 동종 세포이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 상태를 갖는 대상체로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 건강한 공여자로부터 획득된다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 조작된 면역 세포 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 질환 치료를 위한 제약 조성물을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료 또는 진단하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물 중 조작된 면역 세포는 동종 면역 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 동종 면역 세포로부터 유래된 조작된 면역 세포는 대상체에서 이식편 대 숙주 질환 (GvHD)을 유도하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물 중 조작된 면역 세포는 자가 면역 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물 중 조작된 면역 세포의 내인성 TCR은 기능적으로 불활성이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 기능적으로 활성인 TCR을 갖는 추가 면역 세포와 비교하여 대상체에서 GvHD를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 림프종 또는 백혈병이다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 세포를 제공한다: 기능적으로 불활성인 T 세포 수용체 (TCR), 및 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR), 여기서 하나 이상의 CAR의 각 개별 CAR은 결합 모이어티를 포함하며, 상기 결합 모이어티는 (i) 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 자기-절단 펩티드를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열된다: (i) VL2-VH1-VL1-VH2; (ii) VH2-VL1-VH1-VL2; (iii) VL1-VH2-VL2-VH1; (iv) VH1-VL2-VH2-VL1; (v) VL2-VL1-VH1-VH2; (vi) VH2-VH1-VL1-VL2; (vii) VL1-VL2-VH2-VH1; 또는 (viii) VH1-VH2-VL2-VL1, 여기서 VH1은 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열된다: (i) VL2-VH2-VL1-VH1; (ii) VL2-VH2-VH1-VL1; (iii) VL1-VH1-VL2-VH2; (iv) VL1-VH1-VH2-VL2; (v) VH2-VL2-VL1-VH1; (vi) VH2-VL2-VH1-VL1; (vii) VH1-VL1-VL2-VH2; 또는 (viii) VH1-VL1-VH2-VL2, 여기서 VH1은 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이다. 일부 실시양태에서, 세포의 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자는 불활성화되어, 이에 의해 기능적으로 불활성인 TCR을 생성한다. 일부 실시양태에서, 서브유닛을 코딩하는 유전자는 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 항원은 면역 세포의 표면 단백질 또는 분비된 단백질이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 NK 세포, T 세포, 단핵구, 대식세포 또는 과립구이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7이다. 일부 실시양태에서, 질환-연관 항원은 종양-연관 항원이다. 일부 실시양태에서, 종양-연관 항원은 CD19, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1,

TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGA-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCRa, TCRb, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Robo1, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGA3, 클라우딘 18.2, 폴레이트 수용체 α , 폴레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 또는 TROP-2이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 세포 항원에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD3에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD7에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD137에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포는 인헨서 모이어티를 추가로 포함하며, 상기 인헨서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 인헨서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 인헨서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토킨 신호전달 경로이다. 일부 실시양태에서, 인헨서 모이어티는 시토킨 또는 시토킨 수용체이다. 일부 실시양태에서, 인헨서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFBR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포는 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 세포 사멸 활성화제는 GCV이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 서열을 포함하며, 여기서 CAR은 결합 모이어티를 포함하며, 상기 결합 모이어티는 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인에 연결된 (i) 제1 항원 결합 도메인을 포함하며, 제1 항원 결합 도메인은 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키고, 여기서 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 핵산 분자를 제공한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 도메인은 CD19, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PSMA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGA-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCRa, TCRb, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Robo1, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGA3, 클라우딘 18.2, 폴레이트 수용체 α , 폴레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 또는 TROP-2에 결합한다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 인헨서 모이어티를 코딩하는 제2 서열을 추가로 포함하며, 상기 인헨서 모이어티는 세포에서 발현될 때 CAR의 하나 이상의 활성을 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 인헨서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFBR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 유도성 세포 사멸 모이어티를 코딩하는 제2 서열을 추가로 포함하며, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티는 세포에서 발현될 때 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 세

포의 사멸을 일으킨다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 제1 서열 및 제2 서열에 의해 플랭킹된 제3 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제3 서열은 절단가능한 링커를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 자기-절단 펩티드이다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 제1 서열 및/또는 제2 서열의 발현을 조절하는 조절 서열을 추가로 포함한다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 핵산 분자를 포함하는 키트를 제공한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 (a) 본원에 기재된 핵산 분자를 세포에 전달하는 단계; 및 (b) 핵산 분자를 세포에서 발현시켜 이에 의해 조작된 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 조작된 세포를 생성하는 방법을 제공한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 조작된 면역 세포를 제공한다: 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티; CD7에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR), 여기서 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함함; 여기서 조작된 면역 세포에서 내인성 CD7은 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, PD-1, PD-L1, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19 및 TGF β 베타, 이에 대한 수용체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 폴리펩티드의 일부이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 CAR의 일부가 아니다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 CAR의 일부이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 줄기 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 자가 세포 또는 동종 세포이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 상태를 갖는 대상체로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 건강한 공여자로부터 수득된다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 (a) (i) 인핸서 모이어티 및 (ii) CAR을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 면역 세포에 전달하는 단계; 및 (b) 하나 이상의 핵산 분자를 면역 세포에서 발현시켜, 이에 의해 조작된 면역 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 조작된 면역 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 단일 핵산 분자는 (i) 인핸서 모이어티 및 (ii) CAR을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 단일 핵산 분자는 (i) 인핸서 모이어티 및 (ii) CAR에 의해 플랭킹된 자기-절단 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 핵산 분자는 (i) 인핸서 모이어티 및 (ii) CAR에 의해 플랭킹된 어떠한 자기-절단 펩티드도 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, (i) 제1 핵산 분자는 인핸서 모이어티를 코딩하고, (ii) 제2 핵산 분자는 CAR을 코딩한다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 조작된 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 상태를 치료 또는 진단하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 대상체의 자가 면역 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 동종 면역 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 상태는 암 (예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포 악성종양)이다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 조작된 면역 세포를 제공한다: (i) CD7에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 단일 키메라 항원 수용체 (CAR), CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함함, 여기서 내인성 CD7을 코딩하는 유전자는 조작된 면역 세포에서 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, PD-1, PD-L1, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19 및 TGF β 베타, 이에 대한 수용체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 폴리펩티드의 일부이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 줄기 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)이다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 자가 세포 또는 동종 세포이다. 일부 실시양태에서,

조작된 면역 세포는 상태를 갖는 대상체로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 건강한 공여자로부터 수득된다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 (a) 단일 CAR을 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 면역 세포에 전달하는 단계; 및 (b) 하나 이상의 핵산 분자를 면역 세포에서 발현시켜, 이에 의해 조작된 면역 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 조작된 면역 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 단일 핵산 분자는 단일 CAR을 코딩한다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 조작된 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 상태를 치료 또는 진단하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 대상체의 자가 면역 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 동종 면역 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 상태는 암 (예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포 악성종양)이다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 동종 세포 요법 전달을 필요로 하는 대상체에게 조작된 면역 세포 집단을 투여하는 단계를 포함하는, 동종 세포 요법을 전달하는 방법을 제공하며, 집단의 개별 조작된 면역 세포는 (a) 결합 모이어티를 포함하며, 여기서 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 제1 항원 결합 도메인은 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 것인, 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR); (b) 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 포함하며, 여기서 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화되고, 여기서 조작된 면역 세포는 (i) 조작된 면역 세포와 이종인 세포의 존재 하에 적어도 약 20일 동안 시험관내에서 생존가능한 상태로 유지함으로써 향상된 정도의 지속성, (ii) 15일 이내에 적어도 약 10배만큼 향상된 정도의 확장, 또는 (iii) 면역 세포 항원 또는 질환-연관 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 향상된 세포독성을 나타낸다.

[0025] 일부 실시양태에서, 추가 증식제를 사용하지 않고 조작된 면역 세포 집단을 단독으로 투여하는 단계는 (i) 조작된 면역 세포와 이종인 면역 세포의 존재 하에 적어도 약 20일 동안 시험관내에서 생존가능한 상태로 유지함으로써 향상된 정도의 지속성, (ii) 15일 이내에 적어도 약 10배만큼 향상된 정도의 확장, 또는 (iii) 면역 세포 항원 또는 질환-연관 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 향상된 세포독성을 산출한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포의 내인성 CD7은 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 항원은 CD7이다.

[0026] 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 개별 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토킨 신호전달 경로이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 자기-올리고머화를 통해 자기-활성화한다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 자기-이량체화를 통해 자기-활성화한다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 시토킨 또는 시토킨 수용체이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자는 내인성 TCR이 불활성화되도록 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 서브유닛을 코딩하는 유전자는 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 이다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함하며, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티는 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 자살을 일으킨다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 세포 사멸 활성화제는 GCV이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다. 일부 실시양태에서, 세포 사멸 활성화제는 핵산, 폴리뉴클레오티드, 아미노산, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 소분자, 효소, 리보솜, 프로테아좀, 이의 변이체 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I 및/또는 HLA-II 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에

서, 개별 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지된다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현은 상향조절된다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 상향조절된다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두의 발현은 억제된다. 일부 실시양태에서, 내인성 HLA-I, 내인성 HLA-II 또는 둘 모두를 코딩하는 유전자는 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 HLA-E 또는 HLA-G는 과발현된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 CD24, CD47, FASL 및/또는 PD-1은 과발현된다.

[0027] 일부 실시양태에서, 질환-연관 항원은 종양-연관 항원이다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 또는 제2 항원 결합 도메인은 scFv이다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포는 T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포는 줄기 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)이다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포는 동종 세포이다. 일부 실시양태에서, 개별 조작된 면역 세포는 건강한 공여자로부터 수득된다.

[0028] 한 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 세포를 제공한다: (a) 결합 모이어티를 포함하며, 여기서 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티, 여기서 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화된다.

[0029] 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 시토카인 또는 시토카인 수용체이다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTLA-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGF β , 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 방법은 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 세포 사멸 활성화제는 GCV이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다. 일부 실시양태에서, 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자는 불활성화되며, 여기서 내인성 표면 마커는 발현될 때 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 내인성 표면 마커는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7이다.

[0030] 한 측면에서, 본 개시내용은 림프성 악성종양 치료를 필요로 하는 환자에게 조작된 면역 세포 집단을 투여하는 단계를 포함하는, 림프성 악성종양을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 집단의 개별 조작된 면역 세포는 (a) 결합 모이어티를 포함하며, 여기서 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR); 및 (b) 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 포함하며, 여기서 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화되고, 여기서 (i) 말초혈 중 이환 세포의 수 또는 골수 중 이환 세포의 수는 조작된 면역 세포의 마지막 투여 후 3주 이내에 적어도 50%만큼 감소되고, (ii) 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수는 조작된 면역 세포의 마지막 투여 후 3주 이내에 증가하기 시작한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로

이다. 일부 실시양태에서, 인헨서 모이어티는 시토카인 또는 시토카인 수용체이다. 일부 실시양태에서, 인헨서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함한다.

[0032] 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 세포 사멸 활성화제는 GCV이다. 일부 실시양태에서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다. 일부 실시양태에서, 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자는 불활성화되며, 여기서 내인성 표면 마커는 발현될 때 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 내인성 표면 마커는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7이다. 일부 실시양태에서, 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수는 말초혈 중 이환 세포의 수 또는 골수 중 이환 세포의 수가 적어도 50%만큼 감소되기 전에 증가하기 시작한다. 일부 실시양태에서, 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수는 말초혈 중 이환 세포의 수 또는 골수 중 이환 세포의 수가 적어도 50%만큼 감소된 후에 증가하기 시작한다.

[0033] 본 개시내용의 추가 측면 및 장점은 본 개시내용의 예시적인 실시양태만이 표시되고 설명되는 하기 상세한 설명으로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 쉽게 명백해질 것이다. 알 수 있는 바와 같이, 본 개시내용은 다른 및 상이한 실시양태가 가능하고, 그의 여러 세부사항은 모두 본 개시내용으로부터 벗어나지 않고 다양한 명백한 관점에서 변형이 가능하다. 따라서, 도면 및 설명은 제한적인 것이 아니라 사실상 예시적인 것으로 간주되어야 한다.

[0034] 참조로 포함

[0035] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다. 참조로 포함된 간행물 및 특허 또는 특허 출원이 본 명세서에 포함된 개시내용과 모순되는 한, 본 명세서는 임의의 이러한 모순되는 자료를 대체 및/또는 우선하도록 의도된다.

도면의 간단한 설명

[0036] 본 발명의 새로운 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 기재되어 있다. 본 발명의 원리가 활용되는 예시적인 실시양태를 기재하는 하기 상세한 설명 및 첨부된 그림 (또한 본원에서 "도면" 및 "도")을 참조하면 본 발명의 특징 및 장점에 대한 더 나은 이해를 얻을 것이며, 그 중:

도 1은 EGFRt-CD3-CD19 CAR의 예시적인 구조를 도시한다.

도 2는 EGFRt-CD3-CD19 범용 CAR-T의 예시적인 제조 과정을 도시한다.

도 3은 병렬 CAR (FMC63-OKT3) 및 tEGFR 스위치의 발현을 도시한다.

도 4는 병렬 및 루프(Loop) CAR의 발현을 도시한다.

도 5A-C는 UCHT1 대 OKT3를 비교하는 실험 데이터를 도시한다.

도 6A-C는 병렬-UCHT1의 항암 기능을 도시한다.

도 7A 및 7B는 병렬 CAR 대 루프 CAR의 항암 기능을 비교하는 실험 데이터를 도시한다.

도 8A 및 8B는 TCR KO CD19 CAR-T 세포가 피하 종양 모델에서 증식 결함을 나타내었음을 도시한다. 5e5 Raji-루시페라제 세포를 피하 주사에 의해 NOG 마우스에 그래프팅하였다. 1e6 WT, TCR KO CD19 CAR-T 세포를 Raji 그래프팅된 마우스에 주입하였다 (IV). 종양 부담을 실제 종양 크기의 캘리퍼스 측정에 의해 평가하였다. 둘 모두는 Raji 기반 종양 보유 모델이었지만, 피하 모델은 고형 종양을 생성하고 정맥내 모델보다 종양을 제어하

기 위한 CAR-T 세포 증식에 대한 훨씬 더 높은 요구사항을 갖는다. TCR KO CAR-T 세포는 WT CAR-T 세포와 비교하여 증식 결함을 나타내었으며, 이는 이들의 종양 제어 효과와 일치하였다.

도 9A-C는 암 세포에 의한 여러 라운드의 자극 후 상이한 인헨서를 갖는 CAR-T 세포의 증식 및 사멸 효능을 도시한다.

도 10A 및 10B는 암 세포에 의한 여러 라운드의 자극 후 상이한 인헨서를 갖는 CAR-T 세포의 증식을 도시한다.

도 11은 TCR KO CD19 CAR-T 세포에서 인헨서의 생체내 비교를 도시한다. 5e5 Raji-루시페라제 세포를 정맥내 (IV) 주사에 의해 NOG 마우스에 그래프팅하였다. 인헨서가 있는/없는 WT, TCR KO CD19 CAR-T 세포를 Raji 그라프팅된 마우스에 주입하였다 (IV). 종양 부담을 생물발광 강도 (BLI)에 의해 평가하였다.

도 12는 TCR KO CD19 CAR-T 세포에서 인헨서의 생체내 비교를 도시한다.

도 13은 CD7 mRNA의 예시적인 조직 분포를 도시한다.

도 14는 CD2 mRNA의 예시적인 조직 분포를 도시한다.

도 15는 CD7 CAR-T의 예시적인 제조를 도시한다.

도 16은 CD7 gRNA 스크리닝의 실험 데이터를 도시한다.

도 17은 CAR7, CAR7-mb15 및 CAR7-C7R의 예시적인 구조를 도시한다.

도 18은 CAR7, CAR7-mb15, CAR7-C7R 및 대조군 CAR19의 CAR 발현, IL15Ra 및 CD34의 발현, 및 CD7 및 CD3의 녹아웃 효율의 실험 데이터를 도시한다.

도 19는 UCAR-T 세포에서 STAT5의 활성화의 실험 데이터를 도시한다. IL-2의 첨가는 CAR7 T 세포의 STAT5를 활성화시켰고, IL-2의 제거는 pSTAT5 수준을 유의하게 감소시켰다. CAR7-C7R에서, pSTAT5의 수준은 외인성 IL-2가 있거나 없거나 높은 수준이었다.

도 20은 CCRF-CEM-luc 세포주에 대한 UCAR-T 세포의 사멸 효과의 실험 데이터를 도시한다.

도 21은 동종반응성 T (동종-T) 세포에 대한 UCAR-T 세포의 사멸 효과의 실험 데이터를 도시한다.

도 22는 24시간 이내에 NK92 세포주에 대한 UCAR-T 세포의 사멸 효과를 도시한다.

도 23A는 여러 UCAR-T 세포의 시험관내 확장의 실험 데이터를 도시하며, 여기서 인헨서를 발현하는 UCAR-T 세포는 더 오래 생존하였다. 도 23B는 IL-2 제거 후 CCRF-CEM 종양 세포에 대한 이들의 사멸 효과를 비교한 실험 데이터를 도시한다.

도 24A는 여러 UCAR-T 세포의 시험관내 확장의 실험 데이터를 도시한다. 도 24B는 IL-2를 제거하고 여러 라운드 동안 CCRF-CEM과 공동배양한 후 CCRF-CEM 종양 세포에 대한 이들의 사멸 효과를 비교한 실험 데이터를 도시하며, 여기서 인헨서를 발현하는 UCAR-T 세포는 종양 항원의 자극 하에 더 강한 확장을 나타내었다.

도 25는 CCRF-CEM 종양을 보유하는 면역결핍 마우스에서 인헨서를 발현하는 UCAR-T 세포의 확장의 실험 데이터를 도시한다.

도 26은 마우스에서 CCRF-CEM 종양에 대한 인헨서를 발현하는 UCAR-T 세포의 사멸 효과의 실험 데이터를 도시한다.

도 27은 TCR KO CD7 CAR-T 세포에서 인헨서의 생체내 비교를 도시한다.

도 28A 및 28B는 TCR KO CD7 CAR-T 세포에서 인헨서의 생체내 비교를 도시한다.

도 29는 RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R 및 RQR8-CD19CAR-MBIL7의 예시적인 구조를 도시한다.

도 30은 E3: 구성적 활성 IL7R α 기반 인헨서 + 안전 스위치의 설계를 도시한다.

도 31은 CAR 및 인헨서의 발현을 도시한다.

도 32A 및 32B는 CAR-T 기능의 시험을 도시한다.

도 33A 및 33B는 인헨서 기능의 시험을 도시한다.

도 34A-C는 인헨서 기능의 시험을 도시한다.

도 35A-C는 ADCC에 의한 안전 스위치의 시험을 도시한다.

도 36A 및 36B는 반복 자극 후 ADCC에 의한 안전 스위치의 시험을 도시한다.

도 37은 CD7-CD19 이중 CAR의 설계의 예를 도시한다. L719는 루프-CAR, LHLH=VLVH-VLVH, HLHL=VHVL-VHVL을 나타내고; T197 및 T719는 탠덤-CAR이고, EAAAK는 2개의 LH 사이의 링커이다. SP: 신호전달 펩티드; H: 힌지; TM: 막횡단 도메인.

도 38A 및 38B는 상이한 항체의 scFv로 구축된 CD7 단일 CAR의 발현 및 CD7/CD3 (TRAC)의 녹아웃 효율 (도 38A), 뿐만 아니라 CD7+ 세포에 대한 CAR의 사멸 효과 (도 38B)의 실험 데이터를 도시한다. LH는 VLVH를 나타내고, HL은 VHVL을 나타낸다.

도 39는 루프-CAR 및 탠덤-CAR의 발현의 실험 데이터를 도시한다. CAR7 및 CAR19는 단일 CAR 대조군이고, 모의 T는 음성 대조군이다.

도 40은 CD7 및 CD3 (TRAC)의 녹아웃 효율 및 CAR에 의한 CD7+ 세포의 클리어런스의 실험 데이터를 도시한다.

도 41은 루프-CAR 및 탠덤 CAR에 의한 HeLa-CD19+ 세포의 클리어런스의 실험 데이터를 도시한다.

도 42A 및 42B는 CD7 단일 CAR 및 CD7-CD19 이중 CAR에 의한 NK의 완전한 사멸의 실험 데이터를 도시한다. 도 42A는 상이한 CAR에 의한 시험관내 확장된 말초혈 NK의 클리어런스 효율의 실험 데이터를 나타낸다. 도 42B는 ~80% CD7+ 세포를 포함하는 시험관내 확장된 NK의 실험 데이터를 도시하며; L719-LHLH 및 T197-LHLH에 의한 사멸 후, 나머지 NK 세포는 CD7-세포이다.

도 43은 CD7 단일 CAR 및 CD7-CD19 이중 CAR에 의한 동종 T 세포의 신속한 사멸의 실험 데이터를 도시한다.

도 44는 이중 CAR의 생체내 기능의 실험 데이터를 도시한다. 루프 CAR 및 탠덤 CAR은 둘 모두 Raji 종양 세포에 대한 강력한 사멸 효과를 나타내었다.

도 45A 및 45B는 2개의 탠덤 CAR을 비교하는 실험 데이터를 도시한다. 도 45A는 L719: L719-LHLH를 스크리닝을 위한 표준 대조군으로서 사용하고 CAR7, CAR19 및 모의 T를 다른 대조군으로서 사용한 실험 데이터를 나타낸다. 도 45B는 CD7 녹아웃 후 상이한 CAR에 의한 나머지 CD7+ 세포의 클리어런스의 실험 데이터를 나타낸다.

도 46은 HeLa-CD19+ 세포에 대해 L719와 유사한 클리어런스 효과를 나타내는 2개의 탠덤 CAR의 실험 데이터를 도시한다.

도 47A 및 47B는 동종 T 세포 (도 47A) 및 NK 세포 (도 47B)에 대해 L719와 유사한 클리어런스 효과를 나타내는 2개의 탠덤 CAR의 실험 데이터를 도시한다.

도 48은 이중 CAR의 생체내 기능 스크리닝의 실험 데이터를 도시한다. 루프 및 탠덤 이중 CAR은 둘 모두 생체내 CCRF-CEM 종양 세포에 대한 강력한 사멸 효과를 나타내었다.

도 49는 rapaC, L719-C7R 및 L719-E3의 구조를 도시한다.

도 50A-J는 이중 CAR의 기능에 대한 시토카인 신호전달의 효과의 실험 데이터를 도시한다. 도 50A는 L719 및 L719-C7R 이중 CAR의 발현의 실험 데이터를 도시한다. 도 50B는 HeLa-CD7+ 세포에 대한 이중 CAR의 사멸 효과의 실험 데이터를 도시한다. 도 50C는 HeLa-CD19+ 세포에 대한 이중 CAR의 사멸 효과의 실험 데이터를 도시한다. 도 50D는 L718 이중 CAR-T 세포에서 인헨서 및 CD7의 발현의 실험 데이터를 도시한다. 도 50E는 L719 이중 CAR-T 세포의 세포독성의 실험 데이터를 도시한다. 도 50F는 L719 이중 CAR-T 세포의 세포독성의 실험 데이터를 도시한다. 도 50G는 L719 이중 CAR-T 세포에서 인산화된 STAT5 및 인헨서의 발현의 실험 데이터를 도시한다. 도 50H는 L719 이중 CAR-T 세포 증식의 실험 데이터를 도시한다. 도 50I는 HeLa-CD19+ 세포에 대한 이중 CAR의 사멸 효과의 실험 데이터를 도시한다. 도 50J는 HeLa-CD7+ 세포에 대한 이중 CAR의 사멸 효과의 실험 데이터를 도시한다.

도 51은 CD137 mRNA의 예시적인 조직 분포를 도시한다.

도 52는 CD137-CD19 AAC/CAR의 예시적인 구조도를 도시한다.

도 53은 CD137-CD19 범용 CAR-T의 예시적인 제조 과정을 도시한다.

도 54A-C는 TCR 녹아웃 자가 CAR-T 세포의 세포 확장에서 결함을 보여주는 실험 데이터를 도시한다. 도 54A는 주입전 및 주입후 TCR+ 세포의 분획을 보여주는 FACS 데이터를 도시한다. 도 54B는 도 54A의 FACS 데이터의 막대 그래프를 도시한다. 도 54C는 TCR이 있거나 없는 CAR-T 세포의 확장 차이의 비교를 도시한다.

도 55A 및 55B는 TCR 녹아웃 (KO) CD7 CAR-T 세포 (예를 들어, CD7을 표적화하는 CAR을 갖는 CAR-T 세포, 또한 UCART7 세포 또는 CAR7 세포로서 지칭됨) 확장 및 지속성에 대한 C7R의 효과를 보여주는 실험 데이터를 도시한다. 도 55A는 인헨서 C7R이 있거나 없는 TCR KO CD7 CAR-T 확장 데이터를 도시한다. 도 55B는 인헨서가 있거나 없는 TCR KO CD7 CAR-T 세포의 증식 데이터를 도시한다.

도 56A-E는 인헨서 C7R 또는 E3 (EGFRt+IL7R α)을 발현하는 TCR KO CD7 CAR-T 세포의 STAT5 인산화, 세포 지속성 및 세포독성을 보여주는 실험 데이터를 도시한다. 도 56A는 인헨서를 발현하는 CAR-T 세포의 분획의 실험 데이터를 도시한다. 도 56B는 TCR KO CD7 CAR-T 세포의 세포독성을 도시한다. 도 56C는 IL2의 부재 하에 CAR-T 세포의 증식 데이터를 도시한다. 도 56D는 인헨서를 발현하고 인산화된 STAT5를 갖는 CAR-T 세포의 분획의 실험 데이터를 도시한다. 도 56E는 도 56D의 인산화된 STAT5의 평균 형광 지수 (MFI)의 막대 그래프를 도시한다.

도 57A 및 57B는 UCAR-T GC197 세포 (예를 들어, CD19 및 CD7 둘 모두를 표적화하는 CAR을 갖는 다중특이적 CAR-T 세포)의 확장 및 지속성을 보여주는 실험 데이터를 도시한다. 도 57A는 암 항원 자극의 존재 하에 2개의 상이한 공여자로부터 인헨서 C7R을 발현하는 UCAR-T GC197 세포의 증식 데이터를 도시한다. 도 57B는 IL2 또는 항원 자극의 부재 하에 인헨서 C7R을 발현하는 UCAR-T GC197 세포의 증식 데이터를 도시한다.

도 58A-C는 UCAR-T GC197 세포의 확장 및 지속성을 보여주는 실험 데이터를 도시한다. 도 58A는 CD7 및 인헨서 C7R 또는 E3 (EGFRt+IL7R α)을 발현하는 CAR-T 세포의 분획을 보여주는 실험 데이터를 도시한다. 도 58B는 인헨서 C7R 또는 E3 (EGFRt+IL7R α)을 발현하는 UCAR-T GC197 세포의 증식 데이터를 도시한다. 도 58C는 암 항원 자극의 존재 하에 인헨서 C7R 또는 E3 (EGFRt+IL7R α)을 발현하는 UCAR-T GC197 세포의 증식 데이터를 도시한다.

도 59A 및 59B는 K562-CAR19 프로파일링 및 자연 살해 (NK) 세포 사멸 검정의 실험 데이터를 도시한다. 도 59A는 CAR (예를 들어, CAR19 또는 CD19를 표적화하는 CAR) 및 인헨서 CD47 또는 E4 (CD47+IL7R α)를 발현하는 K562 세포의 분획의 실험 데이터를 도시한다. 도 59B는 인헨서 CD47 또는 E4 (CD47+IL7R α)를 발현하는 K562-CAR19에 대한 NK 세포의 세포독성의 실험 데이터를 도시한다.

도 60A 및 60B는 UCART19 세포 (예를 들어, CD19를 표적화하는 CAR을 갖는 CAR-T 세포, 또한 CD19 CAR-T 세포 또는 CAR19 세포로서 지칭됨)의 STAT5 인산화 및 세포 지속성을 보여주는 실험 데이터를 도시한다. 도 60A는 인산화된 STAT5 및 CAR19를 갖는 TCR KO CAR19 세포의 분획의 실험 데이터를 도시한다. 도 60B는 인헨서 C7R, CD47 또는 E4 (CD47+IL7R α)를 발현하는 TCR KO CD19 CAR의 증식 데이터를 도시한다.

도 61은 L719-E3 세포에서 E3의 안전 스위치 기능을 도시한다.

도 62는 보체 의존적 세포독성 검정 (CDC 검정)에 의해 CAR7-E3 및 L719-E3에서 시험된 E3의 안전 스위치 기능을 도시한다.

도 63은 시토카인 신호전달 향상이 없거나 mbIL15, C7R, 또는 E3 발현이 있는 TCR/CD7 이중 녹아웃 CAR7 세포에서 IL2 및 IFN γ 의 발현을 도시한다.

도 64는 시토카인 신호전달 향상이 없거나 C7R 또는 E3 발현이 있는 TCR/CD7 이중 녹아웃 CD19/CD7 이중 CAR-L719 세포에서 IL2 및 IFN γ 의 발현을 도시한다.

도 65는 CD2 gRNA 스크리닝을 도시한다.

도 66은 CD19 CAR-T 대 TCR KO CD19 CAR-T 세포를 비교하는 생체내 GvHD 연구를 도시한다.

도 67은 T-급성 림프모세포성 백혈병 (T-ALL) 환자를 치료하기 위한 CAR7-C7R의 임상 데이터를 도시한다.

도 68은 CAR7 및 CAR7-E3 UCAR-T 세포의 생체내 효능의 BLI 영상화를 도시한다.

도 69는 L719 및 L719-C7R UCAR-T 세포의 생체내 효능의 BLI 영상화를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] <상세한 설명>
- [0038] 본 발명의 다양한 실시양태가 본원에 표시되고 설명되었지만, 이러한 실시양태는 단지 예로서 제공된다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 본 발명에서 벗어나지 않고 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 수많은 변경, 변화 및 치환이 발생할 수 있다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 사용될 수 있음을 이해해야 한다.
- [0039] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 결정된 바와 같은 특정 값 또는 조성에 대한 허용가능한 관용 범위 내의 값 또는 조성을 지칭하며, 이는 값 또는 조성이 측정 또는 측정되는 방법, 즉 측정 시스템의 한계에 부분적으로 좌우될 것이다. 예를 들어, "약"은 관련 기술분야에서 실행 당 1 이내 또는 1 초과와 표준 편차를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 최대 10%, 최대 5% 또는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여, 상기 용어는 값의 10배 이내, 바람직하게는 5배 이내, 및 보다 바람직하게는 2배 이내를 의미할 수 있다. 특정 값이 본 출원 및 청구범위에 기재되어 있는 경우, 달리 언급되지 않는 한, 용어 "약"은 특정 값에 대한 허용가능한 오차 범위 이내를 의미하는 것으로 간주되어야 한다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "투여하는"은 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 척추 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함하는 임의의 다양한 방법 및 전달 시스템을 사용하여, 예를 들어 주사 또는 주입에 의해 본 개시내용의 생성물을 대상체에 물리적으로 도입하는 것을 지칭한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원"은 선택적 결합제에 의해 결합될 수 있는 분자 또는 이의 단편을 지칭한다. 예로서, 항원은 선택적 결합제, 예컨대 수용체에 의해 결합될 수 있는 리간드일 수 있다. 또 다른 예로서, 항원은 선택적 결합제, 예컨대 면역학적 단백질 (예를 들어, 항체)에 의해 결합될 수 있는 항원성 분자일 수 있다. 항원은 또한 해당 항원에 결합할 수 있는 항체를 생산하기 위해 동물에서 사용될 수 있는 분자 또는 이의 단편을 지칭할 수 있다. 일부 경우에, 항원은 기질 (예를 들어, 세포막)에 결합될 수 있다. 대안적으로, 항원은 기질 (예를 들어, 분비된 분자, 예컨대 분비된 폴리펩티드)에 결합되지 않을 수 있다.
- [0042] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체 (Ab)"는 항원에 특이적으로 결합하고 디설피드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 면역글로불린, 또는 이의 항원을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 각 H쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로서 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로서 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 불변 도메인 CL을 포함한다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)이라고 불리는 더 보존된 영역이 산재된 상보성 결정 영역 (CDR)이라고 불리는 초가변 영역으로 추가로 세분화될 수 있다. 각 VH 및 VL은 아미노 말단에서 카르복시 말단까지 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR을 함유한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "뉴클레오타이드"는 일반적으로 염기-당-포스페이트 조합을 지칭한다. 뉴클레오타이드는 합성 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 합성 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 핵산 서열의 단량체 단위 (예를 들어 데옥시리보핵산 (DNA) 및 리보핵산 (RNA))일 수 있다. 용어 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 아데노신 트리포스페이트 (ATP), 우리딘 트리포스페이트 (UTP), 시토신 트리포스페이트 (CTP), 구아노신 트리포스페이트 (GTP) 및 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 예컨대 dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, 또는 이의 유도체를 포함할 수 있다. 이러한 유도체는 예를 들어, [α S]dATP, 7-데아자-dGTP 및 7-데아자-dATP, 및 이를 함유하는 핵산 분자에 뉴클레아제 저항성을 부여하는 뉴클레오타이드 유도체를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 뉴클레오타이드는 디데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 (ddNTP) 및 이들의 유도체를 지칭할 수 있다. 디데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트의 예시적인 예는 ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP 및 ddTTP를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 뉴클레오타이드는 비표지되거나 널리 공지된 기술에 의해 검출가능하게 표지될 수 있다. 표지화는 또한 양자점으로 수행될 수 있다. 검출가능한 표지는 예를 들어, 방사성 동위원소, 형광 표지, 화학발광 표지, 생물발광 표지 및 효소 표지를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드의 형광 표지는 플루오레세인, 5-카르복시플루오레세인 (FAM), 2'7'-디메톡시-4'5'-디클로로-6-카르복시플루오레세인 (JOE), 로다민, 6-카르복시로다민 (R6G), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민 (TAMRA), 6-카르복시-X-로다민 (ROX), 4-(4'디메틸아미노페닐아조) 벤조산 (DABCYL), 캐스케이드 블루, 오리진 그린, 텍사스 레드, 시아닌 및 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-술폰산 (EDANS)을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 형광으로 표지된 뉴클레오타이드의 구체적인 예는 미국 캘리포니아주

포스터 시티 소재의 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)로부터 입수가 가능한 [R6G]dUTP, [TAMRA]dUTP, [R110]dCTP, [R6G]dCTP, [TAMRA]dCTP, [JOE]ddATP, [R6G]ddATP, [FAM]ddCTP, [R110]ddCTP, [TAMRA]ddGTP, [ROX]ddTTP, [dR6G]ddATP, [dR110]ddCTP, [dTAMRA]ddGTP 및 [dROX]ddTTP; 미국 일리노이주 알링턴 하이츠 소재의 아머삼(Amersham)으로부터 입수가 가능한 플루오로링크 데옥시뉴클레오타이드, 플루오로링크 Cy3-dCTP, 플루오로링크 Cy5-dCTP, 플루오로링크 플루오르 X-dCTP, 플루오로링크 Cy3-dUTP, 및 플루오로링크 Cy5-dUTP; 미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재의 베링거 만하임(Boehringer Mannheim)으로부터 입수가 가능한 플루오레세인-15-dATP, 플루오레세인-12-dUTP, 테트라메틸-로다민-6-dUTP, IR770-9-dATP, 플루오레세인-12-ddUTP, 플루오레세인-12-UTP, 및 플루오레세인-15-2'-dATP; 및 미국 오리건주 유진 소재의 몰레큘라 프로브스(Molecular Probes)로부터 입수가 가능한 염색체 표지된 뉴클레오타이드, 보디피-FL-14-UTP, 보디피-FL-4-UTP, 보디피-TMR-14-UTP, 보디피-TMR-14-dUTP, 보디피-TR-14-UTP, 보디피-TR-14-dUTP, 캐스케이드 블루-7-UTP, 캐스케이드 블루-7-dUTP, 플루오레세인-12-UTP, 플루오레세인-12-dUTP, 오리진 그린 488-5-dUTP, 로다민 그린-5-UTP, 로다민 그린-5-dUTP, 테트라메틸로다민-6-UTP, 테트라메틸로다민-6-dUTP, 텍사스 레드-5-UTP, 텍사스 레드-5-dUTP, 및 텍사스 레드-12-dUTP를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 또한 화학적 변형에 의해 표지되거나 표시될 수 있다. 화학적으로 변형된 단일 뉴클레오타이드는 비오틴-dNTP일 수 있다. 비오틴화된 dNTP의 일부 비제한적인 예는 비오틴-dATP (예를 들어, 바이오-N6-ddATP, 비오틴-14-dATP), 비오틴-dCTP (예를 들어, 비오틴-11-dCTP, 비오틴-14-dCTP), 및 비오틴-dUTP (예를 들어 비오틴-11-dUTP, 비오틴-16-dUTP, 비오틴-20-dUTP)를 포함할 수 있다.

[0044] 용어 "폴리뉴클레오타이드", "올리고뉴클레오타이드" 및 "핵산"은 단일-, 이중- 또는 다중-가닥 형태의 임의의 길이의 뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 이의 유사체의 중합체 형태를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오타이드는 세포에 대해 외인성 또는 내인성일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 무세포 환경에 존재할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 유전자 또는 이의 단편일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 DNA일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 RNA일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 공지되거나 공지되지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 유사체 (예를 들어 변경된 백본, 당 또는 핵염기)를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 유사체의 일부 비제한적인 예는 하기를 포함한다: 5-브로모우라실, 펩티드 핵산, 제노 핵산, 모르폴리노, 잠금 핵산, 글리콜 핵산, 트레오스 핵산, 디데옥시뉴클레오타이드, 코디세핀, 7-데아자-GTP, 형광단 (예를 들어 당에 연결된 로다민 또는 플루오레세인), 티올 함유 뉴클레오타이드, 비오틴 연결된 뉴클레오타이드, 형광 염기 유사체, CpG 섬, 메틸-7-구아노신, 메틸화된 뉴클레오타이드, 이노신, 티오우리딘, 슈도우르딘, 디히드로우리딘, 케오신 및 와이오신. 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예는 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연결 분석으로부터 정의된 유전자좌들 (유전자좌), 엑손, 인트론, 전령 RNA (mRNA), 운반 RNA (tRNA), 리보솜 RNA (rRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은-헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로-RNA (miRNA), 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 무세포 DNA (cfDNA) 및 무세포 RNA (cfRNA)를 포함하는 무세포 폴리뉴클레오타이드, 핵산 프로브, 및 프라이머를 포함한다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 구성성분에 의해 중단될 수 있다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유전자"는 RNA 전사체를 코딩하는데 관여하는 핵산 (예를 들어, DNA, 예컨대 게놈 DNA 및 cDNA) 및 그의 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 게놈 DNA와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어는 개재, 비-코딩 영역 뿐만 아니라 조절 영역을 포함하고, 5' 및 3' 말단을 포함할 수 있다. 일부 사용에서, 용어는 5' 및 3' 비번역된 영역 (5'-UTR 및 3'-UTR), 엑손 및 인트론을 포함하는 전사된 서열을 포함한다. 일부 유전자에서, 전사된 영역은 폴리펩티드를 코딩하는 "오픈 리딩 프레임"을 함유할 것이다. 용어의 일부 사용에서, "유전자"는 폴리펩티드를 코딩하는데 필요한 코딩 서열 (예를 들어, "오픈 리딩 프레임" 또는 "코딩 영역")만을 포함한다. 일부 경우에, 유전자, 예를 들어 리보솜 RNA 유전자 (rRNA) 및 운반 RNA (tRNA) 유전자는 폴리펩티드를 코딩하지 않는다. 일부 경우에, 용어 "유전자"는 전사된 서열을 포함할 뿐만 아니라, 상류 및 하류 조절 영역, 인핸서 및 프로모터를 포함하는 비-전사된 영역도 포함한다. 유전자는 "내인성 유전자" 또는 유기체 게놈에서 그의 자연적 위치에 있는 천연 유전자를 지칭할 수 있다. 유전자는 "외인성 유전자" 또는 비천연 유전자를 지칭할 수 있다. 비천연 유전자는 숙주 유기체에서 정상적으로 발견되지 않지만 유전자 이동에 의해 숙주 유기체에 도입되는 유전자를 지칭할 수 있다. 비천연 유전자는 또한 유기체 게놈에서 그의 자연적 위치에 있지 않은 유전자를 지칭할 수 있다. 비천연 유전자는 또한 자연 발생 핵산 또는 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 폴리펩티드 서열 (예를 들어, 비천연 서열)을 지칭할 수 있다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "내인성"은 세포 또는 조직에서 정상적으로 발현되는 핵산 분자 또는 폴리펩티드

를 지칭한다.

- [0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "외인성"은 핵산 분자 또는 폴리펩티드가 세포에 내인적으로 존재하지 않거나 과발현시 수득되는 기능적 효과를 달성하기에 충분한 수준으로 존재함을 의미한다. 그러므로, 용어 "외인성"은 세포에서 발현되는 임의의 재조합 핵산 분자 또는 폴리펩티드, 예를 들어 외래, 이종 및 과발현된 핵산 분자 및 폴리펩티드를 포함한다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "T 세포 및 NK 세포 컨센서스 마커"는 CD2, CD7, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD69, CD100, CD122, CD132, CD161, CD159a, CD159c, CD314를 포함하나 이에 제한되지는 않는, T 세포 및 NK 세포에 공존하는 마커를 지칭한다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "T 세포 및/또는 NK 세포의 마커"는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는, T 세포 또는 NK 세포 각각에 또는 T 세포 및 NK 세포 둘 모두에 존재하는 마커를 지칭한다: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, SLAMF7.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "기능적으로 불활성화시키다" 또는 "기능적 불활성화"는 기능적 유전자 또는 유전자의 생성물, 예컨대 mRNA 또는 단백질이 방지 또는 억제되는 것을 지칭한다. 불활성화는 발현이 일어나지 않도록 유전자 또는 이의 프로모터의 결실, 첨가 또는 치환에 의해, 또는 유전자 생성물, 예컨대 mRNA 또는 단백질이 불활성이 되도록 유전자의 코딩 서열의 돌연변이에 의해 달성될 수 있다. 기능적 불활성화는 완전 또는 부분적일 수 있다. 유전자의 불활성화는 유전자 침묵, 녹아웃, 억제 및 파괴를 포함하는 모든 정도의 불활성화를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 불활성화는 CRISPR-Cas9 시스템에 의해 도입된다.
- [0051] 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 예컨대 인간을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 포유동물은 무린, 유인원, 인간, 농장 동물, 스포츠 동물 및 애완동물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 생체내에서 수득되거나 시험관내에서 배양된 생물학적 실체의 조직, 세포 및 이들의 자손이 또한 포함된다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료" 및 "치료하는"은 치료적 이점 및/또는 예방적 이점을 포함하나 이에 제한되지는 않는 유익한 또는 원하는 결과를 수득하기 위한 접근법을 지칭한다. 예를 들어, 치료는 본원에 개시된 시스템 또는 세포 집단을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 치료적 이점은 치료 중인 하나 이상의 상태 (예를 들어, 질환 또는 증상)에 대한 임의의 치료적으로 관련된 개선 또는 효과를 의미한다. 예방적 이점을 위해, 조성물은 특정 상태를 발병할 위험이 있는 대상체에게 또는 질환의 생리학적 증상 중 하나 이상을 보고하는 대상체에게 투여될 수 있지만, 상태가 아직 나타나지 않았을 수도 있다.
- [0053] 개요
- [0054] CAR은 세포의 항원 인식 영역, 예를 들어 scFv (단일-쇄 가변 단편), 막횡단 영역, 및 세포내 공동자극 신호 영역을 포함할 수 있다. CAR의 세포외 도메인은 특이적 항원을 인식한 후 세포내 도메인을 통해 신호를 도입하여, T 세포 활성화 및 증식, 세포용해 독성, 및 시토키인의 분비를 유발하여, 이에 의해 표적 세포를 제거할 수 있다. 환자의 자가 T 세포 (또는 이종 공여자)를 먼저 단리하고 활성화하고 유전적으로 조작하여 CAR-T 세포를 생성할 수 있으며, 그 후 동일한 환자에게 주사할 수 있다. 이러한 방식으로, 이식편 대 숙주 질환의 확률은 감소될 수 있고, 항원은 비-MHC-제한 방식으로 T 세포에 의해 인식될 수 있다. 또한, CAR-T는 항원을 발현하는 모든 암을 치료할 수 있다.
- [0055] 본 개시내용은 이중특이적 또는 다가 CAR(들)을 통해 질환-연관 항원 (예를 들어, 종양-연관 항원 또는 종양 세포 마커) 및 면역 세포 항원 (예를 들어, CD3, CD7 또는 CD137) 둘 모두를 표적화할 수 있도록 세포, 예를 들어 면역 세포를 조작하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 종양 세포 마커 및 면역 세포 항원, 예컨대 CD3을 표적화할 수 있는 조작된 면역 세포를 제공한다. 내인성 TCR은 불활성화 (예를 들어, 파괴, 억제, 녹아웃 또는 침묵)될 수 있다. 종양 세포 마커 및 면역 세포 항원을 표적화하는 본 개시내용의 CAR-T는 양성 종양 세포를 제거하고 숙주 면역 세포 항원 양성 T 및 NK 세포를 제거하여, 이에 의해 숙주 거부 (HVG)를 피할 수 있다. 본 개시내용에서, 조작된 면역 세포의 내인성 TCR을 녹아웃시킬 수 있고, 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)을 예방할 수 있으며, 이에 의해 일반적인-목적 또는 범용 CAR-T (UCAR-T) 세포를 제조할 수 있다. 조작된 면역 세포는 자가 T 세포 또는 동종 T 세포로부터 유래될 수 있다.
- [0056] 더욱이, 조작된 면역 세포는 세포 자살 요소 (예를 들어, 유도성 세포 사멸 모이어티)를 포함할 수 있고, CAR-T

는 부작용을 감소시키기 위해 언제든지 불활성화/제거될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 인헨서 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 인헨서 모이어티는 조작된 면역 세포가 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 조절할 수 있다. 예를 들어, 인헨서 모이어티는 시토카인 (예를 들어, IL-5 또는 IL-7) 또는 시토카인 수용체 (예를 들어, IL-5R 또는 IL-7R)일 수 있다. 인헨서 모이어티는 조작된 면역 세포 내의 신호전달 경로, 예를 들어 STAT5 신호전달 경로를 향상시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 CD19 및 CD3 둘 모두를 표적화하는 이중특이적 CAR을 포함한다. 이 예에서 보여지는 조작된 면역 세포는 유도성 세포 사멸 모이어티, 예컨대 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (EGFRt 또는 tEGFR, 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있음; 미국 특허 번호 9447194B2 및 PCT 공개 번호 W02018038945 참조)를 추가로 포함할 수 있다.

[0057] 유도성 세포 사멸 모이어티 또는 인헨서 모이어티는 별도의 발현 벡터를 통해 면역 세포에 도입될 수 있다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티 및 인헨서 모이어티는 모이어티 둘 모두를 코딩하는 서열을 포함하는 발현 벡터를 통해 면역 세포에 도입될 수 있다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티 및 인헨서 모이어티는 연결되어 키메라 폴리펩티드로서 발현된다.

[0058] 세포 요법에서 본원에 제공된 조작된 면역 세포의 적용은 환자의 질환 (예를 들어, 암)을 치료할 수 있고, GVHD 및 HvG를 회피하고 치료 비용을 감소시키고 필요한 경우 언제든지 CAR-T를 불활성화시키고 면역요법의 부작용을 감소시키고 생성물 안전을 보장하기 위해 사전에 대규모로 제조될 수 있다. 본원에 제공된 조작된 세포는 범용 CAR T 세포 (UCAR-T 세포)로서 지칭될 수 있다.

[0059] 키메라 항원 수용체 (CAR)

[0060] 본원에 제공된 세포 (예를 들어, 면역 세포 또는 조작된 면역 세포)는 하나 이상의 CAR을 포함할 수 있다. CAR은 세포의 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 세포의 도메인은 표적-특이적 결합 요소 (또한 항원 결합 도메인으로서 공지됨)를 포함할 수 있다. 세포내 도메인은 공동자극 신호전달 영역 및 제타 (ζ)쇄 부분을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요할 수 있는 항원 수용체 또는 이들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. CAR의 세포의 도메인과 막횡단 도메인 사이에, 또는 CAR의 세포질 도메인과 막횡단 도메인 사이에, 스페이서 도메인이 혼입될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "스페이서 도메인"은 일반적으로 막횡단 도메인을 세포의 도메인 또는 폴리펩티드 쇄의 세포질 도메인에 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩티드를 의미한다. 스페이서 도메인은 최대 300개 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100개 아미노산 및 가장 바람직하게는 25 내지 50개 아미노산을 포함할 수 있다.

[0061] 막횡단 도메인과 관련하여, CAR은 CAR의 세포의 도메인에 융합된 막횡단 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 한 실시양태에서, CAR의 도메인 중 하나와 자연적으로 회합된 막횡단 도메인이 사용된다. 일부 예에서, 막횡단 도메인은 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 동일한 또는 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인으로의 이러한 도메인의 결합을 회피하기 위해 아미노산 치환에 의해 선택 또는 변형될 수 있다.

[0062] 막횡단 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 개시내용에서 특히 사용되는 막횡단 영역은 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, CD154로부터 유래되거나 (예를 들어, 이의 적어도 막횡단 영역(들)을 포함함), 또는 면역글로불린, 예컨대 IgG4로부터 유래될 수 있다. 대안적으로 막횡단 도메인은 합성될 수 있으며, 이 경우, 주로 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 포함할 것이다. 바람직하게는 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛은 합성 막횡단 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 임의로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커 (바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이)는 CAR의 막횡단 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이에 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 듀플렛은 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0063] 본 개시내용의 CAR의 세포질 도메인 또는 그렇지 않으면 세포내 신호전달 도메인은 CAR이 배치된 면역 세포의 정상적인 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당할 수 있다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 특수 기능을 지칭한다. 예를 들어, T 세포의 이펙터 기능은 세포용해 활성 또는 시토카인의 분비를 포함하는 헬퍼 활성일 수 있다. 그러므로 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 도입하고 세포가 특수 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 일반적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 쇄를 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분이 사용되는 정도까지, 이러한 말단절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 도입하는 한 무손상 쇄 대신에 사용될 수 있다. 그러므로 용어 세포

내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 도입하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.

- [0064] 본 개시내용의 CAR에서 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 TCR의 세포질 서열 및 항원 수용체 결합 후 신호 도입을 개시하기 위해 함께 작용하는 공동-수용체, 뿐만 아니라 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다.
- [0065] TCR 단독을 통해서 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분할 수 있으며, 2차 또는 공동자극 신호가 포함될 수 있다. 그러므로, T 세포 활성화는 2개의 별개의 부류의 세포질 신호전달 서열에 의해 매개된다고 할 수 있다: TCR을 통해 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 것 (1차 세포질 신호전달 서열) 및 2차 또는 공동자극 신호를 제공하기 위해 항원-독립적 방식으로 작용하는 것 (2차 세포질 신호전달 서열).
- [0066] 1차 세포질 신호전달 서열은 자극 방식으로 또는 억제 방식으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절할 수 있다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 본 개시내용에서 특히 사용되는 ITAM 함유 1차 세포질 신호전달 서열의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 본 개시내용의 CAR에서 세포질 신호전달 분자는 CD3-제타로부터 유래된 세포질 신호전달 서열을 포함하는 것이 특히 바람직하다.
- [0067] 일부 실시양태에서, CAR의 세포질 도메인은 그 자체로 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되거나, 본 개시내용의 CAR의 문맥에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포질 도메인은 CD3 제타쇄 부분 및 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요할 수 있는 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-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다. 그러므로, 본 개시내용은 일부 경우에 공동자극 신호전달 요소로서 4-1BB로 예시되지만, 다른 공동자극 요소는 본 개시내용의 범위 내에 있다.
- [0068] 본 개시내용의 CAR의 세포질 신호전달 부분 내의 세포질 신호전달 서열은 무작위 또는 특정된 순서로 서로 연결될 수 있다. 임의로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커 (바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이)는 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 듀플렛은 특히 적합한 링커를 제공한다.
- [0069] 일부 실시양태에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 또 다른 실시양태에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 또 다른 실시양태에서, 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다.
- [0070] 본원에 제공된 CAR은 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 제공된 CAR은 면역 세포 항원 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포의 사멸 활성을 억제하기 위해) 및 질환-연관 항원 (예를 들어, 종양-연관 항원) 둘 모두를 표적화할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 면역 세포 항원 및 암 항원 둘 모두를 표적화하는 항원 결합 도메인은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD69, CD100, CD122, CD132, CD137, CD161, CD159a, CD159c, CD279, CD314, CD319 (CS1) 및 TCR을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0071] 일부 경우에, 본원에 제공된 CAR은 하나의 개별 CAR이 2개의 상이한 항원을 표적화하는 이중특이적 CAR이 되도록 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 이중특이적 CAR의 경우, 하나의 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원을 표적화할 수 있고, 다른 항원 결합 도메인은 질환-연관 항원을 표적화할 수 있다. 이중특이적 CAR의 2개의 항원 결합 도메인은 탠덤 구조, 병렬 구조 또는 루프 구조를 가질 수 있다.
- [0072] 예를 들어, CAR은 종양 세포 마커 및 CD3을 표적화할 수 있다. CAR은 화학식 I의 구조를 가질 수 있다: L-scFv1-I-scFv2-H-TM-C-CD3 ζ (I), 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고; L은 임의로 신호전달 펩티드 서열이고; I는 가요성 링커이고; H는 임의로 힌지 영역이고; TM은 막횡단 도메인이고; C는 공동자극 도메인이고; CD3 ζ 는 CD3 ζ 로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이고; scFv1 및 scFv2 중 하나는 종양 세포 마커를 표적화하는 항원 결합 도메인이고, 다른 하나는 CD3을 표적화하는 항원 결합 도메인이다. CAR은 화학식 II 또는 II'의 구조를 가질 수 있다: L-VL-scFv-VH-H-TM-C-CD3 ζ (II), L-VH-scFv-VL-H-TM-C-CD3 ζ (II'), 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고; 요소 L, H, TM, C 및 CD3 ζ 는 상기

기재된 바와 같고; scFv는 종양 세포 마커를 표적화하는 항원 결합 도메인이고, VH는 항-CD3 항체 중쇄 가변 영역이고, VL은 항-CD3 항체 경쇄 가변 영역이거나; 또는 scFv는 CD-3을 표적화하는 항원 결합 도메인이고, VH는 항종양 세포 마커 항체 중쇄 가변 영역이고, VL은 항종양 세포 마커 항체 경쇄 가변 영역이다.

[0073] 일부 경우에, CAR은 EGFRt-CD3 scFv-CD19 scFv-힌지-TM-CD28/41BB-CD3 ζ의 구조를 포함할 수 있으며, 여기서 EGFRt는 안전 스위치로서 말단절단된 EGFR (예를 들어, 유도성 세포 사멸 모이어티)이고, CD3 scFv는 GS 링커에 의해 연결된 모노클로날 항체 OKT3 또는 UCHT1의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 svFCv 단편이고, CD19 scFv 단편은 GS 링커에 의해 연결된 모노클로날 FMC63 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이다. CAR의 구조는 힌지, 막횡단 영역, CD28 또는 41BB의 공동자극 신호전달 영역, 및/또는 CD3 ζ 세포내 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용에서, EGFRt-CD3 scFv-CD19 scFv-힌지-TM-CD28/41BB-CD3 ζ의 핵산 구축물은 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)에 삽입될 수 있다. 벡터는 293T 세포에 패키징될 수 있다. T 세포는 PBMC로부터 분류될 수 있고, 활성화 후, TCR 및 PD-1 유전자는 CRISPR/CAS 기술에 의해 녹아낼 수 있다. 그 후, T 세포는 CAR을 발현하도록 벡터로 감염될 수 있다. 제조된 CAR-T 세포는 유동 세포계측법에 의해 CAR의 감염 효율 및 유전자 편집 효율을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0074] 상기 예의 면역 세포 마커, 예를 들어 CD3은 다른 면역 세포 마커, 예컨대 CD7 및 CD137로 대체될 수 있다.

[0075] 일부 경우에, CAR은 탠덤 형태로 배열된 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열된다: (i) VL2-VH2-VL1-VH1; (ii) VL2-VH2-VH1-VL1; (iii) VL1-VH1-VL2-VH2; (iv) VL1-VH1-VH2-VL2; (v) VH2-VL2-VL1-VH1; (vi) VH2-VL2-VH1-VL1; (vii) VH1-VL1-VL2-VH2; 또는 (viii) VH1-VL1-VH2-VL2, 여기서 VH1은 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이다. 예를 들어, CAR은 하기 화학식 IV 또는 IV'로 표시된 구조를 가질 수 있다: L3-scFv1-R-scFv2-H3-TM3-C3-CD3 ζ (IV); L3-scFv2-R-scFv1-H3-TM3-C3-CD3 ζ (IV'), 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고; L3은 임의의 신호 펩티드 서열이고; scFv1은 종양 세포 마커를 표적화하는 항원 결합 도메인이고; R은 경직성 또는 가요성 조인트이고; scFv2는 T 세포 및 NK 세포 컨센서스 마커를 표적화하는 항원 결합 도메인 (예를 들어, 항체 단일-쇄 가변 영역 서열)이고; H3은 임의의 힌지 영역이고; TM3은 막횡단 도메인이고; C3은 공동자극 도메인이고; CD3 ζ는 CD3 ζ로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이다.

[0076] 일부 경우에, CAR은 루프 형태로 배열된 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열된다: (i) VL2-VH1-VL1-VH2; (ii) VH2-VL1-VH1-VL2; (iii) VL1-VH2-VL2-VH1; (iv) VH1-VL2-VH2-VL1; (v) VL2-VL1-VH1-VH2; (vi) VH2-VH1-VL1-VL2; (vii) VL1-VL2-VH2-VH1; 또는 (viii) VH1-VH2-VL2-VL1, 여기서 VH1은 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이다. 예를 들어, CAR은 하기 화학식 VI, VI', VI'' 또는 VI''' 구조를 가질 수 있다: L8-VL1-VH2-I-VL2-VH1-H8-TM8-C8-CD3 ζ (VI); L8-VH1-VL2-I-VH2-VL1-H8-TM8-C8-CD3 ζ (VI'); L8-VL2-VH1-I-VL1-VH2-H8-TM8-C8-CD3 ζ (VI''); L8-VH2-VL1-I-VH1-VL2-H8-TM8-C8-CD3 ζ (VI'''), 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고; L8은 임의의 신호 펩티드 서열이고; VH1은 항종양 세포 마커 항체 중쇄 가변 영역이고, VL1은 항종양 세포 마커 항체 경쇄 가변 영역이고; VH2는 항-T 세포 및 NK 세포 컨센서스 마커 (예컨대 CD7 또는 CD2) 항체 중쇄 가변 영역이고; VL2는 항-T 세포 및 NK 세포 컨센서스 마커 (예컨대 CD7 또는 CD2) 항체 경쇄 가변 영역이고; I는 가요성 조인트이고; H8은 임의의 힌지 영역이고; TM8은 막횡단 도메인이고; C8은 공동자극 도메인이고; CD3 ζ는 CD3 ζ로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이다.

[0077] 일부 경우에, 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR은 병렬 형태로 배열된다. 병렬 형태는 제2 항원 결합 도메인을 갖는 제2 CAR의 전체 구축물에 연결된 제1 항원 결합 도메인을 갖는 제1 CAR의 전체 구축물을 포함할 수 있다. 병렬 형태의 예는 tEGFR- CD19 scFv-CD28-CD3 ζ - CD3 scFv-41BB- CD3 ζ일 수 있다. 여기에 표시된 tEGFR은 안전 스위치로서 기능할 수 있으며, 이는 본 개시내용에 기재된 바와 같은 다른 안전 스위치에 의해 대체될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, CD19 scFv 및 CD3 scFv는 항원 결합 도메인의 2개의 예이며, 이는 본 개시내용에 기재된 바와 같은 다양한 항원 결합 도메인으로 대체될 수 있다. CD28은 막횡단 도메인의 예일 수 있고, 본원에 기재된 다른 막횡단 도메인으로 대체될 수 있다. 41BB는 공동자극 도메인의 예일 수 있고, 본원에 기재된 다른 공동자극 도메인으로 대체될 수 있다. 일부 경우에, 링커는 제1 CAR 및 제2 CAR을 연결하는데 사용된다. 링커는 절단가능한 링커일 수 있다. 절단가능한 링커는 자기-절단 펩티드, 예컨대 2A 자기-절단 펩

티드일 수 있다.

- [0078] CAR 또는 이중특이적 CAR을 코딩하는 핵산 분자가 또한 본 개시내용에서 고려된다. 핵산은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 제1 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 CAR은 결합 모이어티를 포함할 수 있으며, 상기 결합 모이어티는 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인에 연결된 (i) 제1 항원 결합 도메인을 포함하며, 상기 제1 항원 결합 도메인은 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키고, 여기서 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 제1 항원 결합 도메인은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 세포 항원을 표적화할 수 있다. 제2 항원 결합 도메인은 질환-연관 항원, 예컨대 CD19를 표적화할 수 있다. 질환-연관 항원의 다른 비제한적인 예는 BCMA, VEGFR2, CD19, CD20, CD30, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD52, CD56, CD80, CD86, CD81, CD123, cd171, CD276, B7H4, CD133, EGFR, GPC3; PMSA, CD 3, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3 HER-2, HER3, ErbB4 / HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, CD44V6, CEA, CA125, CD151, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, HVEM, MAGE-A, 메소텔린, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, CD40, CD137, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Rob1, 프리즐드, OX40, CD79b, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 및 노치-1-4를 포함한다.
- [0079] 핵산 분자는 인헨서 모이어티를 코딩하는 제2 서열을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 인헨서 모이어티는 세포에서 발현될 때 CAR의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있다. 인헨서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTLA-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 핵산 분자는 유도성 세포 사멸 모이어티를 코딩하는 제2 서열을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티는 세포에서 발현될 때 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 세포의 사멸을 일으킬 수 있다. 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0080] 핵산 분자는 제1 서열 및 제2 서열에 의해 플랭킹된 제3 서열을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 제3 서열은 절단가능한 링커를 코딩할 수 있다. 절단가능한 링커는 자기-절단 펩티드일 수 있다.
- [0081] 핵산 분자는 제1 서열 및/또는 제2 서열의 발현을 조절하는 조절 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0082] 본원에 기재된 핵산 분자를 포함하는 키트가 또한 본 개시내용에서 고려된다.
- [0083] 일부 경우에, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산은 CAR의 발현을 위해 면역 세포로 전달되어 조작된 세포를 생성할 수 있다.
- [0084] 공급원 세포
- [0085] 본 개시내용은 조작된 세포, 예컨대 조작된 면역 세포를 제공한다. 조작된 면역 세포는 대상체로부터 수득된 샘플로부터 단리된 세포 (예를 들어, 면역 세포)로부터 제조될 수 있다. 조작된 면역 세포는 세포주 세포로부터 제조될 수 있다. 조작된 면역 세포를 제조하는데 사용되는 면역 세포는 T 세포, B 세포, 자연 살해 (NK) 세포 또는 대식세포일 수 있다. 조작된 면역 세포를 제조하는데 사용되는 면역 세포는 선천성 림프구 (ILC)일 수 있다.
- [0086] 조작된 면역 세포를 제조하는데 사용되는 면역 세포는 줄기 세포일 수 있다. 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)일 수 있다.
- [0087] 면역 세포는 T-세포 수용체 (TCR)를 포함할 수 있다. TCR은 면역 세포의 내인성 TCR일 수 있다. 일부 경우에, 내인성 TCR은 불활성화될 수 있다. 예를 들어, TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자는 불활성화될 수 있다. 예를 들어, 면역 세포는 면역 세포가 GVHD를 회피할 수 있도록 손상된 TCR을 갖는 알파 베타 T 세포일 수 있다. 또 다른 예로서, 내인성 TCR의 기능은 억제제, 예컨대 TCR-유래 펩티드, 다양한 바이러스, 항체 및 소분자 억제제의 융합 및 다른 단백질 영역의 아미노산 서열로부터 유래된 펩티드에 의해 억제될 수 있다. TCR 억제 펩티드가 유래될 수 있는 바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV), 헤르페스바이러스 사이

미리 (HVS), 인간 헤르페스바이러스 6 (HHV-6), 라사 바이러스 (LASV), 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV), 모페이아 바이러스 (MOPV), 타카리베 바이러스 (TACV), 프렌드 류린 백혈병 바이러스 (MLV); 인간 T 림프친화성 바이러스 유형 1 (HTLV-1); 헤르페스바이러스 아텔레스 (HVA); 마르부르크 바이러스 (MARV); 수단 에볼라 바이러스 (SEBOV); 및 자이르 에볼라 바이러스 (ZEBOV)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0088] 일부 경우에, 면역 세포는 GVHD 반응을 유발하지 않을 수 있는 TCR을 함유하는 T 세포일 수 있다. 예를 들어, 면역 세포는 특이적 항원, 예컨대 바이러스 특이적 항원, 종양-연관 항원 (TAA) 또는 종양-특이적 항원 (TSA)을 인식할 수 있는 TCR을 갖는 알파 베타 T 세포일 수 있다. 또 다른 예로서, 면역 세포는 감마 델타 T 세포 또는 자연 살해 T (NKT) 세포일 수 있다. 또 다른 예로서, 면역 세포는 항원-특이적 T 세포 (예를 들어, 항원-특이적 세포독성 T 세포)로부터 생성된 유도된 만능 줄기 세포일 수 있다. 면역 세포는 제대혈 T 세포일 수 있다.

[0089] 면역 세포는 세포 표면 마커를 포함할 수 있다. 세포 표면 마커는 면역 세포 항원일 수 있다. 조작된 면역 세포를 제조하는데 사용되는 면역 세포의 면역 세포 항원을 코딩하는 유전자는 불활성화될 수 있다. 면역 세포 항원의 예는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 일부 경우에, 면역 세포의 CD7을 코딩하는 유전자는 불활성화된다. 일부 경우에, 면역 세포의 CD3을 코딩하는 유전자는 불활성화된다. 일부 경우에, 면역 세포의 CD137을 코딩하는 유전자는 불활성화된다.

[0090] 면역 세포는 대상체로부터의 샘플로부터 단리될 수 있다. 대상체는 건강한 공여자일 수 있다. 대상체는 상태 (예를 들어, 질환, 예컨대 암)를 가질 수 있다. 샘플은 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직 및 종양을 포함하나 이에 제한되지는 않는 체액 또는 조직일 수 있다. 일부 경우에, 샘플은 NK 세포, NKT 세포, T-세포 또는 T-세포 선조 세포를 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에, 샘플은 제대혈 샘플, 말초혈 샘플 (예를 들어, 단핵 세포 분획) 또는 만능 세포를 포함하는 대상체로부터의 샘플이다. 일부 측면에서, 대상체로부터의 샘플은 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포를 생성하기 위해 배양될 수 있고, 이들 세포는 NK 세포, NKT 세포 또는 T-세포를 생산하는데 사용된다. 세포 샘플은 대상체로부터 직접 배양될 수 있거나, 사용 전에 동결보존될 수 있다. 일부 측면에서, 세포 샘플을 수득하는 것은 세포 샘플을 수집하는 것을 포함한다. 다른 측면에서, 샘플은 제3자에 의해 수득된다. 추가 측면에서, 대상체로부터의 샘플을 처리하여 샘플에서 T-세포 또는 T-세포 선조를 정제하거나 농축할 수 있다. 예를 들어, 샘플은 구배 정제, 세포 배양 선택 및/또는 세포 분류 (예를 들어, 형광-활성화 세포 분류 (FACS)를 통해)를 받을 수 있다.

[0091] 면역 세포는 NK 세포일 수 있다. NK 세포는 말초혈, 제대혈, 또는 본원에 기재된 다른 공급원으로부터 수득될 수 있다. NK 세포는 유도된 만능 줄기 세포로부터 유래될 수 있다.

[0092] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에서 사용될 수 있는 세포는 주어진 인자에 대해 양성 또는 음성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에서 사용되는 세포는 CD3+ 세포, CD3- 세포, CD5+ 세포, CD5- 세포, CD7+ 세포, CD7- 세포, CD14+ 세포, CD14- 세포, CD8+ 세포, CD8- 세포, CD103+ 세포, CD103- 세포, CD11b+ 세포, CD11b- 세포, BDCA1+ 세포, BDCA1- 세포, L-셀렉틴+ 세포, L-셀렉틴- 세포, CD25+, CD25- 세포, CD27+, CD27- 세포, CD28+ 세포, CD28- 세포, CD44+ 세포, CD44- 세포, CD56+ 세포, CD56- 세포, CD57+ 세포, CD57- 세포, CD62L+ 세포, CD62L- 세포, CD69+ 세포, CD69- 세포, CD45RO+ 세포, CD45RO- 세포, CD127+ 세포, CD127- 세포, CD132+ 세포, CD132- 세포, IL-7+ 세포, IL-7- 세포, IL-15+ 세포, IL-15- 세포, 렉틴-유사 수용체 G1 양성 세포, 렉틴-유사 수용체 G1 음성 세포, 또는 이의 분화된 또는 탈분화된 세포일 수 있다. 세포에 의해 발현되는 인자의 예는 제한하려는 것이 아니며, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 세포가 관련 기술분야에 공지된 임의의 인자에 대해 양성 또는 음성일 수 있음을 인식할 것이다. 일부 실시양태에서, 세포는 2개 이상의 인자에 대해 양성일 수 있다. 예를 들어, 세포는 CD4+ 및 CD8+일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 2개 이상의 인자에 대해 음성일 수 있다. 예를 들어, 세포는 CD25-, CD44- 및 CD69-일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 하나 이상의 인자에 대해 양성이고 하나 이상의 인자에 대해 음성일 수 있다. 예를 들어, 세포는 CD4+ 및 CD8-일 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 세포 마커는 세포 집단을 선택, 농축 또는 고갈시키는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 농축시키는 것은 단핵구 분획을 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 농축시키는 것은 단핵구 분획으로부터 면역 세포 집단을 분류하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 주어진 인자를 갖거나 갖지 않는 세포가 선택될 수 있다 (예를 들어, 세포는 하나 이상의 인자의 존재 또는 부재에 기반하여 분리될 수 있음). 일부 실시양태에서, 선택된 세포는 또한 시험관내에서 형질도입 및/또는

확장될 수 있다. 선택된 세포는 주입 전에 시험관내에서 확장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 선택된 세포는 본원에 제공된 벡터로 형질도입될 수 있다. 본원에 개시된 임의의 방법에 사용되는 세포는 본원에 개시된 임의의 세포의 혼합물 (예를 들어, 2개 이상의 상이한 세포)일 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 본 개시내용의 방법은 세포를 포함할 수 있고, 세포는 CD4⁺ 세포 및 CD8⁺ 세포의 혼합물이다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 세포를 포함할 수 있고, 세포는 CD4⁺ 세포 및 미감염 세포의 혼합물이다. 일부 경우에, 세포는 CD45RO⁻ (-), CCR7⁺ (+), CD45RA⁺ (+), CD62L⁺ (L-셀렉틴), CD27⁺, CD28⁺ 및 IL-7R α 로 구성된 줄기 기억 TSCM 세포일 수 있으며, 줄기 기억 세포는 또한 CD95, IL-2R β , CXCR3 및 LFA-1을 발현하고 줄기 기억 세포의 특유의 수많은 기능적 속성을 나타낼 수 있다. 본원에 제공된 세포는 또한 L-셀렉틴 및 CCR7을 포함하는 중앙 기억 TCM 세포일 수 있으며, 여기서 중앙 기억 세포는 예를 들어, IL-2를 분비할 수 있지만, IFN γ 또는 IL-4를 분비하지 않는다. 세포는 또한 L-셀렉틴 또는 CCR7을 포함하는 이펙터 기억 TEM 세포일 수 있으며, 예를 들어 이펙터 시토카인, 예컨대 IFN γ 및 IL-4를 생산할 수 있다. 일부 경우에, 세포 집단은 대상체에게 도입될 수 있다. 예를 들어, 세포 집단은 T 세포 및 NK 세포의 조합일 수 있다. 다른 경우에, 집단은 미감염 세포 및 이펙터 세포의 조합일 수 있다. 세포 집단은 TIL일 수 있다.

[0093] 공급원 면역 세포는 T 세포일 수 있다. T 세포는 알파 베타 T 세포 또는 감마 델타 T 세포일 수 있다. T 세포는 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직 및 종양을 포함하는 수많은 공급원으로부터 수득될 수 있다. 본 개시내용의 특정 실시양태에서, 다양한 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 개시내용의 특정 실시양태에서, T 세포는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수의 기술, 예컨대 퍼콜™ 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집에 의해 수득된다. 성분채집 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함하는 림프구를 함유한다. 일부 실시양태에서, 성분채집에 의해 수집된 세포를 세척하여, 혈장 분획을 제거하고 후속 프로세싱 단계를 위해 적절한 완충액 또는 배지에 세포를 배치할 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 세포는 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세척된다. 대안적인 실시양태에서, 세척 용액은 칼슘이 결여되고, 마그네슘이 결여될 수 있거나, 모두는 아니지만 많은 2가 양이온이 결여될 수 있다. 칼슘의 부재 하에 초기 활성화 단계는 확대된 활성화를 유발할 수 있다. 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 방법에 의해, 예컨대 반자동 "병류" 원심분리기 (예를 들어, 코베(Cobe) 2991 세포 프로세서, 박스터 사이토메이트(CytoMate), 또는 헤모네틱스 셀 세이버 5)를 사용함으로써 달성될 수 있다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대, 예를 들어 Ca²⁺-무함유, Mg²⁺-무함유 PBS, 플라스마라이트 A, 또는 완충제가 있거나 없는 다른 염수 용액에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 성분채집 샘플의 바람직하지 않은 구성성분을 제거하고 세포를 배양 배지에 직접 재현탁할 수 있다.

[0094] 또 다른 실시양태에서, T 세포는 예를 들어, 퍼콜™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심분리 세정에 의해 적혈구를 용해하고 단핵구를 고갈시킴으로써 말초혈 림프구로부터 단리된다. T 세포의 특정 하위집단, 예컨대 CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ 및 CD45RO⁺T 세포는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 단리될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택에 충분한 기간 동안 항-CD3/항-CD28 (즉, 3×28)-접합 비드, 예컨대 다이아비즈® M-450 CD3/CD28 T와의 인큐베이션에 의해 단리된다. 한 실시양태에서, 기간은 약 30분이다. 추가 실시양태에서, 기간은 30분 내지 36시간 또는 그 이상 및 그 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 추가 실시양태에서, 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 기간은 10 내지 24시간이다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 기간은 24시간이다. 백혈병 환자로부터의 T 세포의 단리를 위해, 더 긴 인큐베이션 시간, 예컨대 24시간의 사용은 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 더 긴 인큐베이션 시간은 다른 세포 유형과 비교하여 T 세포가 거의 없는 임의의 상황에서 T 세포를 단리하는데 사용될 수 있다. 또한, 더 긴 인큐베이션 시간의 사용은 CD8⁺ T 세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다. 그러므로, 단순히 T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 허용되는 시간을 단축하거나 연장함으로써 및/또는 비드 대 T 세포의 비율을 증가 또는 감소시킴으로써 (본원에 추가로 기재된 바와 같이), T 세포의 하위집단은 배양 개시에 또는 프로세스 동안 다른 시점에 우선적으로 선택될 수 있다. 추가적으로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비율을 증가 또는 감소시킴으로써, T 세포의 하위집단은 배양 개시에 또는 다른 원하는 시점에 우선적으로 선택될 수 있다. 일부 경우에, 여러 라운드의 선택이 또한 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 선택 절차를 수행하고 활성화 및 확장 프로세스에서 "비선택된" 세포를 사용하는 것이 유용할 수 있다. "비선택된" 세포는 또한 추가 라운드의 선택을 거칠 수 있다.

[0095] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 농축은 음성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 지정된 항체의 조합으로 달성될 수 있다. 예시적인 방법은 음성으로 선택된 세포에 존재하는 세포 표면 마커에 지정된 모노클로날 항체의 콕테일을 사용하는 음성 자성 면역부착 또는 유동 세포계측법을 통한 세포 분류 및/또는 선택일 수 있다.

예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 농축시키기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 전형적으로 CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GTR+ 및 FoxP3+를 발현하는 조절성 T 세포를 농축시키거나 양성으로 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, T 조절성 세포는 항-CD25 접합된 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다.

[0096] 양성 또는 음성 선택에 의한 원하는 세포 집단의 단리를 위해, 세포 및 표면 (예를 들어, 입자, 예컨대 비드)의 농도는 변동될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 것이 바람직할 수 있다 (즉, 세포의 농도를 증가시킴). 예를 들어, 한 실시양태에서, 20억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 한 실시양태에서, 10억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 100백만개 초과 세포/ml가 사용된다. 추가 실시양태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50백만개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100백만개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 125 또는 150백만개 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도의 사용은 증가된 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장을 초래할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포의, 또는 많은 종양 세포가 존재하는 샘플 (즉, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터 더 효율적인 포획을 허용한다. 이러한 세포 집단은 치료적 가치를 가질 수 있고, 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 높은 농도의 세포의 사용은 정상적으로 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8⁺ T 세포의 더 효율적인 선택을 허용한다.

[0097] 관련 실시양태에서, 더 낮은 농도의 세포가 사용될 수 있다. T 세포 및 표면 (예를 들어, 입자, 예컨대 비드)의 혼합물을 유의하게 희석함으로써, 입자와 세포 간의 상호작용이 최소화된다. 이 방법은 입자에 결합할 다량의 원하는 항원을 발현하는 세포를 선택할 수 있다. 예를 들어, CD4⁺ T 세포는 더 높은 수준의 CD28을 발현하고, 희석 농도에서 CD8⁺ T 세포보다 더 효율적으로 포획된다. 일부 실시양태에서, 사용된 세포 농도는 5×10^6 개/ml이다. 다른 실시양태에서, 사용된 농도는 약 1×10^5 개/ml 내지 1×10^6 개/ml, 및 그 사이의 임의의 정수 값일 수 있다. 다른 실시양태에서, 세포는 2-10℃에서 또는 실온에서 다양한 속도로 다양한 시간 동안 회전기에 서 인큐베이션될 수 있다.

[0098] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후 동결될 수 있다. 이론에 얽매이는 것을 원하지 않지만, 동결 및 후속 해동 단계는 과립구를 제거하고 세포 집단에서 단핵구를 어느 정도 제거함으로써 더 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후, 세포는 동결 용액에 현탁될 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터가 관련 기술분야에 공지되어 있고 이러한 문맥에서 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 및 플라스마라이트 A를 함유하는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 포함하며, 그 후 세포는 분당 1°의 속도로 -80℃로 동결되고, 액체 질소 저장 탱크의 증기 상에 저장된다. 제어된 동결의 다른 방법을 사용할 수 있을 뿐만 아니라, -20℃에서 또는 액체 질소에서 즉시 비제어된 동결을 사용할 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, 동결보존된 세포는 본원에 기재된 바와 같이 해동 및 세척되고, 본 개시내용의 방법을 사용하여 활성화 전에 실온에서 1시간 동안 남아있도록 허용된다.

[0100] 일부 실시양태에서, 세포는 작용제, 예컨대 나탈리주맵, 에팔리주맵, 항바이러스제, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역억제제, 예컨대 캄파트, 항-CD3 항체, 사이토산, 플루다라빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 및 방사선조사를 사용한 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 수의 관련 치료 방식 전에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집으로부터 단리된다. 이들 약물은 칼슘 의존적 포스파타제 칼시뉴린을 억제하거나 (사이클로스포린 및 FK506), 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다 (라파마이신) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). 추가 실시양태에서, 세포는 환자를 위해 단리되고, 골수 또는 줄기 세포 이식, 화학요법제, 예컨대 플루다라빈, 외부-빔 방사선 요법 (XRT), 시클로포스파미드, 또는 항체, 예컨대 OKT3 또는 캄파트를 사용하는 T 세포 제거 요법과 함께 (예를 들어, 전에, 동시 또는 후에) 나중에 사용하기 위해 동결된다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 B-세포 제거 요법, 예컨대 CD20과 반응하는 작용제, 예를 들어 리툭산 후 치료를 위해 이전에 단리되고 나중에 사용하기 위해 동결될 수 있다.

- [0101] 조작된 면역 세포
- [0102] 본원에 제공된 조작된 면역 세포는 종양 세포에 대한 향상된 활성을 나타낼 수 있지만 감소된 부작용, 예컨대 GVHD를 갖는다. 조작된 면역 세포는 질환-연관 항원 (예를 들어, 종양-연관 항원 또는 종양 세포 마커)을 표적화하고 동시에 숙주 면역 세포를 저해할 수 있다. 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 유전자 (예를 들어, TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자, 또는 세포 표면 마커를 코딩하는 유전자)는 불활성화될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 각각 상이한 항원을 표적화하는 제1 CAR 및 제2 CAR을 포함한다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 갖는 CAR을 포함한다.
- [0103] 조작된 면역 세포는 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포는 또한 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는, 하나 이상의 CAR을 포함하나 인핸서 모이어티를 포함하지 않는 추가의 조작된 면역 세포와 비교하여, (i) 조작된 면역 세포와 이중인 세포의 존재 하에 적어도 약 20일 동안 시험관내에서 생존가능한 상태로 유지함으로써 향상된 정도의 지속성, (ii) 15일 이내에 적어도 약 10배만큼 향상된 정도의 확장, 또는 (iii) 면역 세포 항원 또는 질환-연관 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 향상된 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 (i) 향상된 정도의 지속성, (ii) 향상된 정도의 확장, 및 (iii) 향상된 세포독성 중 2개 이상을 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다. (i), (ii) 및/또는 (iii) 특징은 임의의 외인성 인핸서 모이어티, 예컨대 외인성 시토카인의 부재 하에 측정될 수 있다.
- [0104] 조작된 면역 세포는 다중특이적 CAR을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 면역 세포 항원 및 질환-연관 항원을 표적화하는 이중특이적 CAR을 포함한다. 이중특이적 CAR의 2개의 항원 결합 도메인은 본 개시내용에 기재된 바와 같은 임의의 형태, 예를 들어 병렬 형태, 루프 형태 및 탠덤 형태로 배열될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 조작된 면역 세포는 (i) CD7에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 단일 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함할 수 있다. CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 다양한 경우에, 내인성 CD7을 코딩하는 유전자는 조작된 면역 세포에서 불활성화 (예를 들어, 침묵 또는 녹아웃)될 수 있다.
- [0105] 면역 세포 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 면역 세포 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD69, CD100, CD122, CD132, CD137, CD161, CD159a, CD159c, CD279, CD314, CD319 (CS1), TCR α 또는 TCR β 이다. 일부 경우에, 면역 세포 항원은 CD2, CD3, CD5, CD7 또는 CD137이다. 일부 경우에, 면역 세포 항원은 CD7이다. 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성될 수 있다. 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성될 수 있다. 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로일 수 있다. 인핸서 모이어티는 자기-올리고머화를 통해 자기-활성화할 수 있다. 인핸서 모이어티는 자기-이량체화를 통해 자기-활성화할 수 있다.
- [0106] 인핸서 모이어티는 시토카인 또는 시토카인 수용체일 수 있다. 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGFR 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0107] 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자는 내인성 TCR이 불활성화되도록 불활성화될 수 있다. 서브유닛을 코딩하는 유전자는 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 일 수 있다.
- [0108] 조작된 면역 세포는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 유도성 세포 사멸 모이어티는 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 자살을 일으킬 수 있다. 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 세포 사멸 활성화제는 GCV이다.

일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다. 세포 사멸 활성화제는 핵산, 폴리뉴클레오타이드, 아미노산, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 소분자, 효소, 리보솜, 프로테아좀, 이의 변이체 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

- [0109] 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I 및/또는 HLA-II 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지될 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지될 수 있다.
- [0110] 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현은 상향조절될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 상향조절된다.
- [0111] 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현은 녹아아웃되거나 부분적으로 녹아아웃될 수 있다. 예를 들어, HLA-I, HLA-II 또는 둘 모두는 녹아아웃될 수 있다. 일부 경우에, HLA-I, HLA-2, 또는 둘 모두는 부분적으로 녹아아웃될 수 있다. 일부 경우에, HLA-I/II는 부분적으로 녹아아웃될 수 있다. 일부 경우에, 내인성 HLA는 녹아아웃되어 T 세포 사멸 활성을 감소시키지만 항-NK 살해 기능을 유지할 수 있다. 예를 들어, HLA-A/B는 조작된 면역 세포에서 HLA-C/E를 유지하면서 녹아아웃될 수 있다. 일부 경우에, HLA-A, HLA-B, 또는 둘 모두는 녹아아웃된다. 일부 경우에, HLA-C, HLA-E, 또는 둘 모두는 무손상 상태로 유지된다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 킬러/식세포 억제제는 과발현될 수 있다. 일부 다른 경우에, 내인성 HLA는 킬러/식세포 억제제(들)의 공동발현과 함께 녹아아웃될 수 있다. 예를 들어, HLA-I, HLA-II 또는 둘 모두는 킬러/식세포 억제제의 공동발현과 함께 녹아아웃될 수 있다. 킬러/식세포 억제제는 조작된 면역 세포에 대한 면역 반응을 저해할 수 있다. 킬러/식세포 억제제는 CD47, CD24, FASL, PDL1 또는 이의 기능적 도메인을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0112] 본원에 기재된 질환-연관 항원은 종양-연관 항원 또는 종양-특이적 항원일 수 있다. 제1 항원 결합 도메인 또는 제2 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 단편, 예를 들어 scFv 또는 단일 도메인 항체일 수 있다.
- [0113] 조작된 면역 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자는 불활성화될 수 있으며, 여기서 내인성 표면 마커는 발현될 때 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있다. 내인성 표면 마커는 CAR이 표적화하는 항원일 수 있다. 다양한 실시양태에서, 조작된 면역 세포의 CAR이 조작된 면역 세포에 의해 내인적으로 발현되는 항원을 표적화하는 경우, 내인성 항원 또는 이러한 항원을 코딩하는 유전자는 불활성화 (예를 들어, 파괴, 억제, 침묵 또는 녹아아웃)될 수 있다. 본원에 기재된 다양한 유전자 편집 방법이 사용될 수 있다. 내인성 표면 마커는 예를 들어, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7일 수 있다.
- [0114] 본원에 제공된 조작된 면역 세포는 (i) 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티, 및 (ii) 키메라 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 포함할 수 있으며, 여기서 인핸서 모이어티는 유도성 세포 사멸 모이어티에 연결된다. 일부 경우에, 인핸서 모이어티 및 유도성 모이어티는 링커에 의해 연결될 수 있다. 링커는 절단가능한 링커, 예를 들어 자기-절단 펩티드일 수 있다. 조작된 면역 세포는 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 폴리펩티드 수용체 (CPR)를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 결합 모이어티는 (i) 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 하나 이상의 CPR의 개별 CPR은 (i) 제1 항원 결합 도메인, (ii) 제2 항원 결합 도메인, 또는 (iii) 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함할 수 있다. 하나 이상의 CPR의 CPR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포에서 하나 이상의 CPR은 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 조작된 T 세포 수용체 (TCR)이다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 CAR 및 조작된 TCR 둘 모두를 포함한다. 조작된 TCR은 TCR 융합 단백질일 수 있다. 예를 들어, TCR 융합 단백질은 TCR 복합체의 하나 이상의 서브유닛에 융합된 이종 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에, TCR 융합 단백질은 TCR 세포의 도메인 및 TCR 세포내 도메인의 적어도 일부를 포함하는 TCR 서브유닛; 및 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 TCR 서브유닛 및 항체 도메인은 연결된다. TCR 융합 단백질은 T 세포에서 발현될 때 TCR 복합체로 혼입할 수 있다. 일부 경우에, TCR 융합 단백질은 TCR 막횡단 도메인을 추가로 포함할 수 있다. TCR 세포의 도메인, TCR 세포내 도메인, 또는 TCR 막횡단 도메인은 TCR 알파 체, TCR 베타

쇄, TCR 감마 쇠, TCR 델타 쇠, CD3 엡실론, CD3 감마, CD3 델타 또는 CD3 제타로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 TCR을 포함하는 조작된 면역 세포의 내인성 TCR은 불활성화된다. 일부 경우에, 불활성화된 내인성 TCR을 포함하는 조작된 면역 세포는 GVHD를 유발하지 않을 수 있다. 예를 들어, 내인성 TCR 서브유닛을 코딩하는 유전자는 불활성화될 수 있다. 또 다른 예로서, 내인성 TCR 서브유닛을 코딩하는 유전자는 내인성 TCR이 형성되지 않을 수 있도록 돌연변이될 수 있다.

[0115] 본원에 제공된 조작된 면역 세포는 (i) 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인헨서 모이어티, 및 (ii) 키메라 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 인헨서 모이어티는 유도성 세포 사멸 모이어티에 연결된다. 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)는 결합 모이어티를 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 (i) 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 하나 이상의 CAR의 개별 CAR은 (i) 제1 항원 결합 도메인 또는 (ii) 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 하나 이상의 CAR의 개별 CAR은 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함한다. 일부 경우에, 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함한다.

[0116] 조작된 면역 세포의 제1 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화된다. 내인성 TCR을 불활성화시키기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 내인성 TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자는 내인성 TCR이 불활성화되도록 불활성화될 수 있다. 서브유닛을 코딩하는 유전자는 TCR α , TCR β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ 또는 CD3 ζ 일 수 있다.

[0117] 키메라 폴리펩티드는 인헨서 모이어티 및 유도성 세포 사멸 모이어티에 의해 플랭킹된 임의의 자기-절단 펩티드를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 인헨서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성될 수 있다. 인헨서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성될 수 있다. 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로일 수 있다. 인헨서 모이어티는 자기-올리고머화를 통해 자기-활성화할 수 있다. 인헨서 모이어티는 자기-이량체화를 통해 자기-활성화할 수 있다.

[0118] 본원에 기재된 키메라 폴리펩티드는 분비된 단백질을 수 있다. 키메라 폴리펩티드는 세포내 단백질을 수 있다. 키메라 폴리펩티드는 막횡단 단백질을 수 있다. 인헨서 모이어티 또는 유도성 세포 사멸 모이어티는 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유될 수 있다. 인헨서 모이어티 또는 유도성 세포 사멸 모이어티는 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유된다. 인헨서 모이어티는 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유될 수 있고, 유도성 세포 사멸 모이어티는 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유될 수 있다. 인헨서 모이어티는 막횡단 단백질의 엑토도메인에 함유될 수 있고, 유도성 세포 사멸 모이어티는 막횡단 단백질의 엔도도메인에 함유될 수 있다. 인헨서 모이어티는 시토카인 또는 시토카인 수용체일 수 있다. 예를 들어, 인헨서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGF β 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 세포 사멸 활성화제는 GCV이다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다. 세포 사멸 활성화제는 핵산, 폴리뉴클레오타이드, 아미노산, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 소분자, 효소, 리보솜, 프로테아좀, 이의 변이체 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0119] 조작된 면역 세포는 CAR-T 세포일 수 있다. CAR-T 세포는 종양 세포 마커 및 CD3을 표적화하는 CAR을 발현할 수 있다. 내인성 CD3 유전자의 발현은 CAR-T 세포에서 침묵될 수 있다. CAR은 종양 세포 마커 및 CD3 둘 모두를 표적화하는 단일 CAR일 수 있다. CAR은 종양 세포 마커를 표적화하는 제1 CAR 및 CD3을 표적화하는 제2 CAR을 포함할 수 있다. CAR-T 세포는 하기 특징 중 하나 이상을 가질 수 있다: (a) PD-1 유전자의 발현이 CAR-T 세포에서 침묵되고; (b) TCR 유전자의 발현이 CAR-T 세포에서 침묵되고; (c) CAR-T 세포가 외인성 세포 자살 요소 (예를 들어, 유도성 세포 사멸 모이어티)를 발현한다.

[0120] 조작된 면역 세포는 CAR 및/또는 외인성 TCR을 발현할 수 있고, CAR 및/또는 외인성 TCR은 종양 세포 마커를 표

적화한다. 조작된 면역 세포는 향상된 시토카인-관련 신호전달 경로를 포함할 수 있다. 시토카인-관련 신호전달 경로는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 시토카인의 관련 신호전달 경로를 포함할 수 있다. 시토카인-관련 신호전달 경로를 향상시키는 것은 시토카인 및/또는 이의 수용체를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계; 시토카인 및/또는 이의 수용체를 코딩하는 유전자를 상향조절하는 단계; 또는 시토카인, 도입된 시토카인의 수용체 또는 이의 조합을 외인적으로 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포는 (a) 침묵될 내인성 TCR의 유전자 발현; (b) 세포 자살을 위한 요소의 발현; (c) 내인성 HLA-I 및 HLA-II 유전자의 정상적인 발현; (d) 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G의 정상적인 발현 또는 과발현으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특징을 갖는 CAR-T 세포일 수 있다.

[0121] 조작된 면역 세포는 종양 세포 마커를 표적화하는 CAR 또는 외인성 TCR을 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포는 T 세포 또는 NK 세포를 표적화하는 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조작된 면역 세포는 T 세포 및/또는 NK 세포를 표적화하는 CAR을 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포는 (i) 종양 세포 마커 및 (ii) T 세포 및/또는 NK 세포 마커 둘 모두를 표적화하는 이중특이적 CAR을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 물질은 항체이다. T 세포 및 NK 세포 둘 모두를 표적화하는 항체는 H-69, 3A1e, 3A1f, T3-3A1, RFT2, SDZ214-380 (SDZCHH380), CD7-6B7, 124-1D1, 4H9, RPA-2.10, TS1/8, OKT11, AB75, 3E11, BH1, 또는 Lo-CD2a일 수 있다.

[0122] 본원에 제공된 CAR-T 세포는 범용 CAR-T 세포일 수 있다. CAR-T 세포는 종양 세포 마커를 표적화하는 키메라 항원 수용체 CAR을 발현할 수 있고, PD-1에 대한 T 세포 수용체의 결합은 억제된다. CAR-T 세포는 종양 세포 마커 및 면역 세포 마커, 예컨대 CD2 또는 CD7을 표적화할 수 있다. 본원에 제공된 CAR-T 세포에서 내인성 TCR 발현은 유전자 편집 기술에 의해 녹아아웃될 수 있다. CAR-T 세포의 내인성 TCR을 녹아아웃하면, 정상 세포는 동종 주입 동안 CAR-T 세포에 의해 인식 및 사멸되지 않을 수 있다. GVHD 반응은 억제될 수 있다. 더욱이, CD2 또는 CD7을 통해 숙주 T 세포 및/또는 NK 세포를 제거하면서 CD19를 통해 종양 세포를 표적화하는 것은 숙주 대 이식편 (HVG) 및/또는 NK 사멸을 회피하고 수용자에서 동종 CAR-T 세포의 생존 및 항종양 효과를 개선할 수 있다. CAR-T는 자살 유전자 스위치 (예를 들어, 유도성 세포 사멸 모이어티)를 추가로 포함할 수 있다. CAR-T 세포는 CAR-T 세포 요법의 부작용을 감소시키기 위해 자살 유전자 스위치 (예를 들어, 유도성 세포 사멸 모이어티에 대한 활성화제의 결합)를 커서 불활성화 또는 제거될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 CAR은 CD19 scFv-CD7 scFv-힌지-TM-CD28/41BB-CD3ζ의 구조를 가질 수 있으며, 여기서 CD7 scFv 단편은 모노클로날 3A1e 항체이고, 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 GS 링커에 의해 연결되고, CD19 scFv 단편은 GS 링커에 의해 연결된 모노클로날 FMC63 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이다. CAR은 또한 탠덤, 인간 CD28 및 / 또는 41BB 세포내 공동자극 요소, 뿐만 아니라 인간 CD3 세포내 도메인에 힌지 영역 및 막횡단 영역을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 일부 경우에, CAR 구축물 CD19 scFv-CD7 scFv-힌지-TM-CD28/41BB-CD3ζ의 유전자 단편은 렌티바이러스 벡터에 삽입될 수 있고, 재조합 벡터는 293T 세포에서 바이러스 입자에 패키징될 수 있다. 범용 CAR-T 세포를 제조하기 위해, T 세포를 말초혈 단핵 세포로부터 분리할 수 있고, 활성화 후, 일부 내인성 유전자 (예를 들어, CD7, TCR 및 PD-1 유전자)를 유전자 편집 기술, 예컨대 CRISPR/CAS 기술에 의해 녹아아웃할 수 있다. 다음으로, T 세포는 CAR을 발현하기 위해 본원에 기재된 CAR 구축물을 함유하는 바이러스 입자에 의해 감염될 수 있다. 제조된 CAR-T 세포는 유동 세포계측법에 의해 CAR의 감염 효율 및 유전자 편집 효율을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0123] 조작된 면역 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 특징을 가질 수 있다: (a) 조작된 면역 세포의 내인성 CD7 또는 CD2 유전자의 발현이 침묵되고; (b) 조작된 면역 세포의 PD-1 유전자 발현이 침묵되고; (c) 조작된 면역 세포의 TCR 유전자 발현이 침묵되고; (d) 조작된 면역 세포가 시토카인 또는 시토카인 수용체 복합체를 발현하고 pSTAT5 신호전달 수준이 상향조절되고; (e) 조작된 면역 세포가 외인성 유도성 세포 사멸 모이어티를 발현하고; (f) 조작된 면역 세포에서 제1 CAR 및/또는 제2 CAR이 유도성 세포 사멸 모이어티와 공동발현한다.

[0124] 조작된 면역 세포는 2개의 상이한 CAR을 포함할 수 있으며, 상이한 항원 결합 도메인을 갖는 각각은 상이한 항원을 표적화한다. 조작된 면역 세포는 단일 CAR을 포함할 수 있으며, 이는 2개의 상이한 항원을 표적화하는 2개의 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 제1 CAR 및/또는 제2 CAR은 자기-절단 요소에 의해 유도성 세포 사멸 모이어티 및/또는 인핸서 모이어티에 연결된다. 일부 경우에, 인핸서 모이어티는 시토카인 또는 시토카인 복합체이다. 시토카인 또는 시토카인 복합체의 예는 IL2, IL7, IL15, 막-결합 IL15 (mbIL15 또는 mb15), 및 구성적 활성화 시토카인 수용체, 예컨대 IL7 수용체 (C7R)를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은, "mbIL" 및 "mb"는 막-결합 인터루킨 인자, 예를 들어 mbIL7 또는 mb7, 및 mbIL17 또는 mb17을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0125] 본원에 기재된 조작된 면역 세포는 하기 특징을 가질 수 있다: (a) 조작된 면역 세포가 CAR 및/또는 외인성 TCR

을 발현하고, CAR 및/또는 외인성 TCR이 종양 세포 마커를 표적화하고; (b) 시토카인-연관 신호전달 경로가 향상된다. 조작된 면역 세포는 (i) 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포); (ii) 키메라 항원 수용체 NK 세포 (CAR - NK 세포); 또는 (iii) 외인성 T 세포 수용체 (TCR) T 세포 (TCR-T 세포)일 수 있다. 조작된 면역 세포는 CAR-T 세포, 바람직하게는 범용 CAR-T 세포 (UCAR-T 세포)일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "시토카인-관련 신호전달 경로"는 상응하는 수용체에 대한 시토카인 결합에 의해 개시되고, 세포의 신호를 세포내 신호로 전환시키고, 이어서 신호 캐스케이드에 의해 증폭, 분산 및 조절되는 신호전달 경로를 지칭한다. 일련의 세포 반응이 생성될 수 있다. 일부 경우에, 시토카인-관련 신호전달 경로는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, 25 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 시토카인의 관련 신호전달 경로를 포함한다.

[0126] 조작된 면역 세포는 이중특이적 CAR (또는 이중 CAR)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 CAR은 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함할 수 있다. 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 링커를 통해 연결될 수 있다. 링커는 자기-절단 펩티드를 포함하지 않을 수 있다. 제1 항원 결합 도메인 또는 제2 항원 결합은 scFv일 수 있다.

[0127] 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열될 수 있다: (i) VL2- VH1-VL1-VH2; (ii) VH2-VL1-VH1-VL2; (iii) VL1-VH2-VL2-VH1; 또는 (iv) VH1-VL2-VH2-VL1, 여기서 VH1은 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이다.

[0128] 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기와 같이 배열될 수 있다: (i) VL2-VH2-VL1-VH1; (ii) VL2-VH2-VH1-VL1; (iii) VL1-VH1-VL2-VH2; 또는 (iv) VL1-VH1-VH2-VL1, 여기서 VH1은 제1 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL1은 제1 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이고, VH2는 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 도메인이고, VL2는 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 도메인이다. 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원 및 질환-연관 항원에 결합할 수 있다.

[0129] 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 이중특이적 CAR을 포함하지 않을 수 있다. 예를 들어, 조작된 면역 세포의 개별 CAR은 제1 항원 결합 도메인만을 포함할 수 있고, 조작된 면역 세포의 추가 개별 CAR은 제2 항원 결합 도메인만을 포함할 수 있다.

[0130] 면역 세포 항원은 면역 세포의 표면 단백질 또는 분비된 단백질일 수 있다. 면역 세포는 NK 세포, T 세포, 단핵구, 대식세포 또는 과립구일 수 있다. 면역 세포 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0131] 질환-연관 항원은 종양-연관 항원일 수 있다. 종양-연관 항원은 CD19 또는 본원에 기재된 다른 항원일 수 있다. 일부 경우에, 제1 항원 결합 도메인은 CD2, CD3, CD5, CD7 및 CD137로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 세포 항원에 결합할 수 있고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 제1 항원 결합 도메인은 CD3에 결합할 수 있고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 제1 항원 결합 도메인은 CD7에 결합할 수 있고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 제1 항원 결합 도메인은 CD137에 결합할 수 있고, 제2 항원 결합 도메인은 CD19에 결합할 수 있다. 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지될 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-I 및/또는 HLA-II 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지될 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 무손상 상태로 유지될 수 있다. 조작된 면역 세포의 하나 이상의 내인성 HLA 유전자의 발현은 상향조절될 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 HLA-E 및/또는 HLA-G 및/또는 HLA-C 유전자의 발현은 상향조절될 수 있다.

[0132] 다양한 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 T 세포, NKT 세포 또는 NK 세포이다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 줄기 세포로부터 유래된다. 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)일 수 있다.

- [0133] 본원에 제공된 세포 (예를 들어, 조작된 면역 세포)는 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함할 수 있으며, 여기서 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 세포는 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화될 수 있다.
- [0134] 인핸서 모이어티는 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있다. 인핸서 모이어티는 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성될 수 있다. 인핸서 모이어티는 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토키인 신호전달 경로일 수 있다. 인핸서 모이어티는 시토키인 또는 시토키인 수용체일 수 있다. 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGF β 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0135] 세포는 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt일 수 있고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 또 다른 예로서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK일 수 있고, 세포 사멸 활성화제는 GCV일 수 있다. 또 다른 예로서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9일 수 있고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903일 수 있다.
- [0136] 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자는 불활성화될 수 있으며, 여기서 내인성 표면 마커는 발현될 때 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있다. 내인성 표면 마커는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7일 수 있다.
- [0137] 항원 결합 도메인
- [0138] 조작된 면역 세포는 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 단일 또는 개별 CAR은 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함한다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 2개의 CAR은 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하며, 각 CAR은 하나의 항원 결합 도메인만을 함유하다. 일부 경우에, 2개의 조작된 면역 세포는 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하며, 각 조작된 면역 세포는 하나의 유형의 항원 결합 도메인만을 포함한다. 일부 경우에, 제1 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원을 표적화할 수 있고, 제2 항원 결합 도메인은 질환-연관 항원을 표적화할 수 있다. 항원 결합 도메인은 Fab, F(ab')₂, 단일 도메인 항체, 단일쇄 Fv (scFv), 셴티린, 달핀, 또는 항원 결합 특이성을 갖는 다른 폴리펩티드일 수 있다.
- [0139] 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원을 표적화할 수 있다. 면역 세포 항원의 예는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 면역 세포 항원은 CD2, CD7, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD69, CD100, CD122, CD132, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD178 (ICOS), CD161, CD159a, CD159c 및 CD314를 포함하나 이에 제한되지는 않는, T 세포 및 NK 세포 둘 모두에서 발현되는 세포 마커이다.
- [0140] CD3은 T 림프구의 표면에 존재하는 마커이다. 3개의 하위유형, CD3 δ , CD3 ϵ 및 CD3 γ 가 있다. CD3 δ 및 CD3 ϵ 는 20 kDa의 분자량을 갖고, CD3 γ 는 26 kDa의 분자량을 갖고, 이는 T 림프구, 흉선세포 및 NK 세포막의 표면에서 발현된다. CD3은 정상 말초혈 림프구의 61% 내지 85% 및 흉선세포의 60% 내지 85%에서 발현될 수 있다. 이는 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속한다. CD3은 T-림프구 수용체 (TCR) 복합체의 구성성분이고, α - β 및 γ / δ T-림프구 수용체 (TCR)와 복합체를 형성하며, 이는 펩티드/MHC에 대한 TCR 결합시 TCR 신호를 전달하기

위한 주요 막 단백질일 수 있다. TCR은 세포 표면 발현, 항원 인식 및 신호전달에 필수적일 수 있다. CD3은 T 림프구의 표면-특이적 분자이며, 이를 통해 사멸 효과를 갖는 T 림프구를 동원할 수 있다. CD3에 대한 모노클로날 항체는 T 림프구 활성화를 유도 또는 방지할 수 있다. 항-CD3 항체는 항-CD28 항체 또는 IL-2의 존재 하에 T 림프구의 세포자멸(apoptosis)을 유도한다. CD3은 말초혈에서 성숙한 T 림프구의 마커 중 하나이다. 면역결핍 (T 림프구 결핍), 백혈병, 림프종 (T 림프구 유형) 분류 진단의 평가를 위한 CD3+ T 림프구의 결정. 항-CD3 모노클로날 항체는 장기 이식 또는 골수 이식에서 면역억제 요법에 사용될 수 있고, 또한 T 림프구를 제거하기 위한 중증 자가면역 질환의 면역조절 치료에 사용될 수 있다.

[0141] 일부 경우에, 항원 결합 도메인은 CD7을 표적화할 수 있다. CD7은 막횡단 단백질이고, 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이다. CD7 단백질은 성숙한 T 세포 및 NK 세포 뿐만 아니라 이들의 전구체 세포의 표면에서 발현된다. CD7은 그의 리간드 K12/SECTM1에 결합하고, T 세포 활성화에 대한 공동자극 이펙터로서 기능할 수 있다. 마우스에서, CD7 녹아웃 T 세포 전구체는 T 세포 이펙터 기능에 대해 약간의 영향을 미치면서 정상 T 세포로 발전할 수 있다. T-세포 급성 림프모세포성 백혈병 (T-ALL)의 90% 초과는 CD7을 발현할 수 있으며, 따라서 CD7은 T-ALL에 대한 마커일 수 있다. 더욱이, CD7은 또한 NK 림프종, T-세포 림프종/백혈병, 만성 골수형성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 림프구-풍부 흉선종에서 발현될 수 있다. CD7 발현의 예시적인 조직 분포는 도 13에 나타난다.

[0142] 일부 경우에, 항원 결합 도메인은 CD2를 표적화할 수 있다. CD7과 유사하게, CD2 접착 분자는 모든 말초혈 T 세포 및 자연 살해 세포에서 발현될 수 있지만 B 림프구에서는 발현되지 않는다. CD2 세포의 도메인은 동종이량체화를 매개하는 면역글로불린-유사 도메인을 함유한다. CD58 (LFA-3) 또는 CD48에 대한 CD2의 결합은 T 세포가 항원 제시 세포에 접촉하여 항원 결합을 위한 T 세포 수용체의 신호 도입을 촉발하는 것을 도울 수 있다. CD2의 기능은 다른 T 세포 공동자극 수용체 (예컨대 CD28)와 유사할 수 있다. CD2 녹아웃 마우스는 정상적인 면역 기능을 가질 수 있다. T-ALL, T-세포 림프종/백혈병, 급성 전골수구성 백혈병 (마이크로입자 변이체), 전신성 비만세포증, 비만 세포 질환, 흉선종, 및 급성 골수성 림프종 및 NK 세포 백혈병의 세포에서 CD2 발현. CD2 발현의 예시적인 조직 분포는 도 14에 나타난다.

[0143] 항원 결합 도메인은 CD137을 표적화할 수 있다. CD137 (또한 4-1BB로서 공지됨)은 TNF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원이다. CD137 단백질은 활성화-유도 공동자극 수용체일 수 있으며, 이는 활성화된 T 세포, NK 세포, 수지상 세포, 과립구 및 다른 면역 세포 유형 및 특정 종양 세포에서 광범위하게 발현될 수 있다. CD137 발현은 활성화된 T 및 NK 세포에서 발견되었으며, 미감염 T 세포 및 불활성화된 T 및 NK 세포에서는 거의 발현되지 않았다. T 세포에서, CD137은 TRAF2를 통해 NF- κ B 경로를 개시하고 T 세포 증식, 시토카인 분비 및 항-세포자멸에 참여할 수 있다. 임상 적용에서, CD137은 반응성 T 세포에 대한 마커로서 사용될 수 있다. CD137 자연적 리간드 또는 효능작용 항체에 의한 CD137 신호전달 경로의 활성화는 세포독성 림프구의 시토카인 분비 및 항종양 활성을 증가시킬 수 있다. 특이적 억제성 CD137 항체를 사용한 반응성 T 세포의 억제는 이식 거부에서 자가 거부를 감소시키거나 동종 기원의 자가반응성 T 세포에 의해 유발되는 GVHD 반응을 감소시킬 수 있다. CD137 발현은 시토카인 IL-2/IL-15의 TCR 신호전달 및 하류 신호전달에 의해 조절될 수 있다. CD137 분자의 녹아웃은 불활성화된 상태에서 성숙한 T 세포의 기능에 영향을 미치지 않을 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 CD137은 동종 살해를 회피하기 위해 녹아웃될 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 TCR은 GVHD를 예방하기 위해 불활성화될 수 있다. CD137 발현의 예시적인 조직 분포는 도 51에 나타난다.

[0144] 항원 결합 도메인은 질환-연관 항원, 예를 들어 종양-연관 항원을 표적화할 수 있다. 종양-연관 항원의 예는 BCMA, VEGFR2, CD19, CD20, CD30, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD52, CD56, CD80, CD86, CD81, CD123, cd171, CD276, B7H4, CD133, EGFR, GPC3; PMSA, CD 3, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3 HER-2, HER3, ErbB4 / HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, CD44V6, CEA, CA125, CD151, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, HVEM, MAGE-A, 메소텔린, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, CD40, CD137, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Rob1, 프리즐드, OX40, CD79b, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 및 노치-1-4를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 종양-연관 항원은 CD19, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2,

PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCRa, TCRb, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, Robo1, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R 또는 TROP-2를 포함한다.

[0145] 일부 경우에, 종양-연관 항원은 CD19이다. CD19는 B 세포의 초기 발달부터 형질 세포로 분화할 때까지 발현하기 시작하는 B 세포의 표면 상의 95 kDa 당단백질이다. CD19는 면역글로불린 (Ig) 수퍼패밀리의 구성원이고, B 세포 표면 신호 도입 복합체의 구성 요소 중 하나로서 B 세포 수용체의 신호 도입 과정의 조절에 관여한다. CD19-결핍 마우스 모델에서, 말초 림프성 조직 중 B 세포의 수는 유의하게 감소될 수 있고, 혈청 Ig 수준의 감소와 함께 백신 및 미토겐에 대한 반응이 또한 감소된다. 일반적으로 CD19의 발현은 만능 조혈 줄기 세포의 표면이 아닌 B-세포 계통에 제한된다고 믿어질 수 있다. CD19는 또한 대부분의 B 세포 림프종, 맨틀 세포 림프종, ALL, CLL, 털세포 백혈병, 및 일부 급성 골수성 백혈병 세포의 표면에서 발현될 수 있다. CD19는 백혈병/림프종의 치료에서 면역요법에 대한 표적일 수 있다. CD19는 만능 조혈 줄기 세포를 포함하여 B 세포 이외의 대부분의 정상 세포 표면에서 발현되지 않을 수 있다. 이 특징은 비가역성 골수 독성 손상의 위험을 최소화할 수 있기 때문에 CD19를 자가면역 질환에 대한 안전한 치료 표적으로 만들 수 있다.

[0146] 본원에 제공된 항원 결합 도메인은 V_H - V_L 또는 V_L - V_H 로 표시된 구조를 가질 수 있으며, 여기서 V_H 는 항체의 중쇄 가변 영역이고; V_L 은 항체의 경쇄 가변 영역이고; "-"는 링커 펩티드 (또는 가요성 링커) 또는 펩티드 결합이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 종양-연관 항원을 표적화한다. 일부 실시양태에서, 종양-연관 항원은 CD19를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD19를 표적화하는 항원 결합 도메인은 모노클로날 FMC63 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 펩티드 또는 가요성 링커의 서열은 2-6개, 바람직하게는 3-4개 연속 (GGGG) 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_{L1} 의 아미노산 서열은 서열식별번호(SEQ ID NO): 87에 표시된 바와 같고, V_{H1} 의 아미노산 서열은 서열식별번호: 88에 표시된다. CD19를 표적화하는 CAR의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 89에 표시된다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 면역 세포 항원을 표적화한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 항원은 CD7을 표적화한다. 일부 다른 실시양태에서, 면역 세포 항원은 CD2를 표적화한다. 일부 실시양태에서, CD7의 모노클로날 항체는 TH-69, 3A1e, 3A1f, T3-3A1, RFT2, CD7-6B7, 124-1D1, 4H9, SDZ214-380 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 다른 실시양태에서, CD2에 대한 모노클로날 항체는 RPA-2.10, TS1/8, OKT11, AB75, 3E11, BH1 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, V_L 의 아미노산 서열은 서열식별번호: 90에 표시된 바와 같고, V_H 의 아미노산 서열은 서열식별번호: 91에 표시된다.

[0147] 인핸서 모이어티

[0148] 본원에 제공된 조작된 면역 세포는 인핸서 모이어티를 포함할 수 있다. 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 조절할 수 있으며, 예를 들어 조작된 면역 세포의 이펙터 기능을 향상 또는 상향조절하기 위해 하나 이상의 신호전달 경로를 향상 또는 상향조절할 수 있다. 신호전달 경로는 시토카인-관련 신호전달 경로일 수 있다. 인핸서 모이어티는 시토카인일 수 있다. 인핸서 모이어티는 시토카인 수용체일 수 있다.

[0149] 시토카인-관련 신호전달 경로는 시토카인의 관련 신호전달 경로를 포함할 수 있다. 시토카인의 예는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21 및 IL25를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 시토카인-관련 신호전달 경로는 2개 이상의 시토카인의 관련 신호전달 경로를 포함하며, 여기서 시토카인은 IL-2 및 IL-7, IL-2 및 IL-15, IL-7 및 IL-15, IL15 및 IL21을 포함한다. 세포 반응은 하류 유전자 발현의 조절, 세포내 효소 활성의 변화, 세포 골격 구조의 변화, DNA 합성의 변화, 유전자 전사의 촉진, 면역 세포 분화의 조절, 증식, 및 세포 사멸에 대한 저항성을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 시토카인 및/또는 이의 수용체를 코딩하는 유전자를 도입 또는 상향조절하는 것, 시토카인을 외인적으로 첨가하는 것, 시토카인 수용체로 도입되는 것, 또는 이의 조합을 포함하는, 시토카인-관련 신호전달 경로가 향상된다. 일부 경우에, 시토카인 및/또는 그의 수용체를 코딩하는 유전자를 상향조절하는 것은 코딩 유전자의 전사 및/또는 번역 수준을 상향조절하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 향상된 시토카인-관련 신호전달 경로는 하기 방법 중 하나 이상에 의해 달성될 수 있다: 면역 세포에서 시토카인 및/또는 그의 수용체를 코딩하는 유전자를 발현하는 것, 면역 세포에서 시토카인 및/또는 그의 수용체를 코딩하는 유전자의 카피 수를 증가시키는 것, 전사 속도 (예를 들어, 전사 개시 속도)를 향상시키기 위해 코딩 유전자의 조절 서열 (예를 들어, 프로모터)을 조작하는 것, 번역 세기를 향상시키기 위해 코딩된 유전자를 운반하는 전령 RNA의 번역 조절 영역을 변형시키는 것,

mRNA 안정성, 단백질 안정성을 향상시키고 단백질 피드백 억제를 방출하기 위해 코딩 유전자 자체를 변형시키는 것.

[0150] 시토카인-관련 신호전달 경로는 시토카인 및 그의 수용체의 막 발현, 시토카인의 분비, 시토카인 및/또는 그의 수용체의 전사 조절의 향상, 또는 이의 조합에 의해 향상될 수 있다. 막-발현 시토카인 및 그의 수용체는 IL-15 및 그의 수용체 (예를 들어, mbIL15 융합 단백질), IL-7 및 그의 수용체 (예를 들어, mbIL7 융합 단백질), IL-17 및 그의 수용체 (예를 들어, mbIL17 융합 단백질), IL-2 및 그의 수용체 (예를 들어, mbIL2 융합 단백질), IL-21 및 그의 수용체 (예를 들어, mbIL21 융합 단백질), 구성적 활성화된 IL-7 수용체 (C7R), 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포에 포함된 인핸서 모이어티는 분비성 시토카인이다. 분비성 시토카인은 다양한 메커니즘으로 기능할 수 있으며, 예를 들어 분비성 시토카인은 트랜스-활성화 인자 또는 시스-활성화 인자일 수 있다. 분비성 시토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 인핸서는 막 결합 단백질, 예컨대 mbIL15, mbIL7, mbIL21 및 mbIL2이다. 일부 경우에, 인핸서 모이어티는 구성적 활성 시토카인 수용체 하류 신호전달 단백질, 예컨대 STAT5 및 STAT3이다. 일부 경우에, 인핸서 모이어티는 구성적 활성 시토카인 수용체, 예컨대 구성적 활성 IL-7 수용체 (C7R) 또는 이의 유도체이다. 예를 들어, 구성적 활성 시토카인 수용체는 조작된 단백질 (예를 들어, 본 개시내용에서 "E3"으로서 지칭됨)일 수 있으며, 여기서 C7R의 엑토도메인은 안전 스위치, 예컨대 EGFRt 또는 인간 표피 성장 인자 수용체 2의 말단절단된 형태 (Her2t; 미국 특허 출원 공개 번호 20170267742A1 참조) 또는 본 개시내용에 기재된 다른 펩티드에 의해 대체된다. 또 다른 예로서, 구성적 활성 시토카인 수용체는 조작된 단백질 (예를 들어, 본 개시내용에서 "E4"로서 지칭됨)일 수 있으며, 여기서 C7R의 엑토도메인은 면역 세포 억제제, 예컨대 CD47, CD24 또는 킬러 또는 식세포 면역 세포 기능을 억제하고 치료 세포 (예를 들어, 본원에 기재된 조작된 면역 세포)를 보호하는 다른 펩티드에 의해 대체된다. 일부 경우에, 시토카인은 케모카인, 예컨대 CCL21 및 CCL19일 수 있다. 사용될 수 있는 케모카인의 다른 비제한적인 예는 CCL27, CCL28, CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CXCL13, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL12, CCL2, CCL8, CCL13, CCL25, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23, CX3CL1, XCL1, XCL2, CCL1, CCL17, CCL22, CCL11, CCL24, CCL26, CXCL1, CXCL2, CXCL3 및 CXCL7을 포함한다. 일부 경우에, 인핸서 모이어티는 CCR7의 리간드이며, 이는 T 세포, NK 세포 또는 수지상 세포의 침윤을 향상시키는 기능을 할 수 있다. CCR7 리간드는 CCL21 및 CCL19를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 인핸서 모이어티는 림프종 또는 다른 고형 종양을 치료하기 위한 치료적 용도를 위한 케모카인 CCL21 및 CCL19의 공동발현을 포함한다.

[0151] 일부 상황에서, 조작된 면역 세포는 액체 종양을 치료하기 위한 치료제로서 사용되며, 이러한 상황에서, 인핸서 모이어티는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 형태의 임의의 시토카인을 포함할 수 있다. 일부 상황에서, 조작된 면역 세포는 고형 종양을 치료하기 위한 치료제로서 사용되며, 이러한 상황에서, 인핸서 모이어티는 임의의 형태의 임의의 시토카인을 포함하고, 하나 이상의 케모카인을 추가로 포함할 수 있다.

[0152] 일부 경우에, IL-2 및 IL-7, IL-2 및 IL-15, IL-7 및 IL-15, 및 IL15 및 IL21을 포함하는 2개의 시토카인은 조작된 면역 세포에서 시토카인-관련 신호전달 경로를 향상시키는데 사용될 수 있다. 시토카인-관련 신호전달 경로 향상은 mbIL 융합 단백질, 구성적 활성 IL-7 수용체 (C7R), 인터루킨 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드의 발현을 포함할 수 있다.

[0153] 본원에 기재된 인핸서 모이어티는 인터루킨 15 (IL-15) 또는 IL-15 수용체일 수 있다. IL-15는 114개 아미노산으로 구성된 14-15kD 당단백질이며, 4 나선 번들 시토카인의 패밀리에 속한다. IL-15는 인터루킨 2 (IL-2)와 구조적 상동성이다. IL-15 수용체는 높은 친화성 IL-15 수용체 알파 쇄, IL2/15 수용체 베타 쇄, 및 공통 감마 쇄를 포함한다. 따라서, IL-15는 IL-2와 유사한 일부 기능, 예컨대 T 세포 활성화 및 증식의 자극, NK 세포 사멸 활성의 향상 및 면역글로불린의 B 세포 생산의 촉진을 가질 수 있다. 최근 연구는 IL-15가 NK 세포, NKT 세포 및 장 상피 세포의 분화, 증식 및 활성화에 역할을 할 수 있음을 밝혀내었다. IL-15 및 IL-17은 CD8+ 기억 T 세포의 조절에 역할을 할 수 있다. 연구는 또한 IL-15α 쇄 수용체를 발현하는 세포가 IL-15β 쇄 및 공통 감마 쇄를 발현하는 세포에 IL-15를 제시할 수 있는 메커니즘을 통해 IL-15가 CD8+ 기억 T 세포의 증식 및 NK 세포의 생존 주기를 조절할 수 있음을 나타내었다. IL-15는 또한 골격근 동화작용의 조절과 같은 비-면역계에서 역할을 할 수 있다. 본원에 기재된 인핸서 모이어티는 인터루킨 7 (IL-7)일 수 있다. IL-7은 pre-B 세포, pro-B 세포, B 세포, 및 T 세포의 성장을 촉진할 수 있다. 이는 또한 B 세포 및 T 세포의 성장 및 항-세포사멸을 촉진할 수 있다. IL-7은 흉선의 초기 분화 및 증식 및 수지상 세포의 발달 및 분화에 역할을 할 수 있다. 그러나, IL-7은 항원-특이적 세포독성 T 림프구의 사멸 활성에 대한 향상된 효과를 갖지 않을 수 있다. 이는 먼저 흉선으로부터 말초혈로 이동한 다음, 흉선세포 또는 말초혈 림프구를 유도하여 림포카인을 생산하고, LAK

세포의 림포카인-활성화 살해 세포 활성을 활성화 및 향상시킬 수 있다. CD8+ 하위집단은 IL-7의 주요 이펙터 세포일 수 있고, IL-7은 또한 기억 CD8+ T 세포 확장 및 생존을 지원할 수 있다. IL-7은 골수 조직 생산을 촉진할 수 있다. IL-7은 골수 전구체 세포 및 거핵세포를 자극하여 콜로니 형성 단위 및 혈소판을 생성할 수 있을 뿐만 아니라, 시클로포스파미드의 면역억제로부터 신체를 회복시킬 수 있다. 더 높은 농도에서, 이는 또한 대식세포를 향상시키는 세포독성을 유도하고, CTL 세포, NK 세포 및 활성화된 단핵구의 생성을 위한 상승작용적 인자로서 기능하고, 단핵구-대식세포를 유도하여 다양한 시토카인을 분비하고 염증 인자, 예컨대 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-알파), MIP- β , IL-8 및 단핵구 화학유인물질 단백질-1 (MCP-1) 등의 발현을 촉진할 수 있다. 염증 세포에 의해 생성되는 많은 염증 인자를 활성화시킴으로써, IL-7은 염증 프로세스의 구성성분 간의 상호작용을 조절할 뿐만 아니라, 염증성 시토카인 수용체 (CCR), 예컨대 CCR1, CCR2 및 CCR5를 향상시킬 수 있다. 또한, IL-7은 면역 반응을 유도하는 역할을 할 수 있다. IL-7은 유형 I 면역 반응을 유도하고 IFN- γ 및 IL2의 생성을 증가시킬 수 있다. IL-7은 IL12와 상승작용하여 IFN- γ 및 T 세포 증식을 유도할 수 있다. IL-7 및 형질전환 성장 인자 베타 (TGF β)는 조절 역할을 할 수 있고, 면역 조절 메커니즘의 일부일 수 있다. IL-7은 T 세포의 면역 재구성을 촉진할 수 있을 뿐만 아니라, T 세포 주기 및 BCL-2 발현의 상향조절을 유도할 수 있으며, 이는 순환 T 세포 수용체 풀의 다양성 및 지속성을 넓히고, CD4+ 및 CD8+ T 세포 수를 증가시킨다. 더욱이, HIV 항원의 경우, 확장된 T 세포는 또한 IL2 및 IFN- γ 를 분비하고 양호한 항바이러스 기능을 가질 수 있다. 따라서, IL-7은 증식, 시토카인 분비 및 세포 기능에서 HIV-특이적 T 림프구의 결함을 역전시킬 수 있다.

[0154] 인헨서 모이어티는 신호 도입기 및 전사 5 (STAT5)-매개 신호전달 경로의 활성화제를 조절 (예를 들어, 활성화)할 수 있다. STAT5는 세포질에 광범위하게 존재할 수 있다. 시토카인 (예를 들어, IL2, IL7, IL15 및 IL21)이 시토카인 수용체에 결합하는 경우, 수용체-커플링된 JAK가 활성화되어, 이에 의해 STAT5 단백질의 C-말단에서 Tyr 잔기를 인산화한다. 인산화된 STAT5는 그의 SH2 영역을 통해 동종 또는 이종 이량체를 형성할 수 있다. 동종 또는 이종이량체는 핵으로 이동되고 표적 유전자에 결합하여, 이에 의해 세포 조절 인자 및 항-세포사멸 유전자를 포함하는 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있다. STAT5의 활성화는 정상 세포 기능을 유지하고 세포 증식 및 분화를 조절하는 역할을 할 수 있다. 따라서, STAT5 신호전달 경로의 활성을 조절하는 것은 본원에 기재된 CAR-T 세포의 생존 및 지속성을 조절할 수 있다.

[0155] 인헨서 모이어티는 인헨서 모이어티를 코딩하는 핵산 분자를 세포에 전달함으로써 세포 (예를 들어, 면역 세포 또는 조작된 면역 세포)에 도입될 수 있다. 핵산 분자는 벡터일 수 있다. 인헨서 모이어티는 융합 구축물의 일부일 수 있다. 융합 단백질 또는 상응하는 핵산 구축물은 하기로부터 선택된 화학식에 의해 표시된 바와 같은 구조를 가질 수 있다: S-2A-L1-scFv-H-TM-C-CD3 ζ -2A-L2-IL15-IL15Ra (A); S-2A-L1-scFv-H-TM-C-CD3 ζ -2A-L2-IL15-IL15Ra-2A-L3-IL7 (B); S-2A-L1-scFv-H-TM-C-CD3 ζ -2A-L2-C7R (C); S-2A-L1-scFv-H-TM-C-CD3 ζ -2A-L2-IL7-IL7Ra (D); 여기서: 각각의 "-"는 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고; S는 안전 스위치이고; 2A는 임의의 자기-절단 펩티드이고; 각각의 L1, L2 및 L3은 독립적으로 널(null) 또는 신호 펩티드 서열이고; C7R은 상기 기재된 바와 같고; scFv는 항원 결합 도메인이고; H는 널 또는 힌지 영역이고; TM은 막횡단 도메인이고; C는 공동자극 신호전달 분자이고; CD3 ζ 는 CD3 ζ 로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이고; IL15는 인터루킨 15이고, IL15Ra는 IL-15 수용체 α 이고; IL7은 인터루킨 7이고, IL7Ra는 IL-7 수용체 α 이고; C7R은 구성적으로 활성화된 IL-7 수용체이다.

[0156] 인헨서 모이어티는 키메라 폴리펩티드의 일부일 수 있다. 예를 들어, 인헨서 모이어티는 유도성 세포 사멸 모이어티에 연결될 수 있다. 인헨서 모이어티는 링커에 의해 유도성 세포 사멸 모이어티에 연결될 수 있다. 링커는 절단되지 않을 수 있다. 링커는 자기-절단 펩티드를 포함하지 않을 수 있다. 일부 다른 경우에, 인헨서 모이어티 및 유도성 세포 사멸 모이어티는 세포에서 동일한 핵산 분자로부터 발현될 수 있고, 절단되어 2개의 폴리펩티드를 형성할 수 있다.

[0157] 유도성 세포 사멸 모이어티

[0158] 본원에 기재된 조작된 면역 세포는 또한 "자살 유전자 스위치", "자살 스위치", "안전 스위치" 또는 "세포 자살 요소"로서 지칭되는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함할 수 있다. 유도성 세포 사멸 모이어티는 외인성 인자 (예를 들어, 약물)의 작용 하에 생체내에서 조작된 면역 세포 (예를 들어, CAR-T 세포)를 효과적으로 제거하는데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, CD20 (및 그의 구조모방체), RQR8, Her2t, CD30, BCMA, EGFRt, HSV-TK, mTMPK 등일 수 있다. iCasp9, CD20 (및 그의 구조모방체), RQR8 및 HSV-TK는 T 세포를 제거하는 동일한 능력을 가질 수 있지만, rapaCasp9, iCasp9, RQR8 및 CD20 (및 이들의 구조모방체)은 HSV-TK와 비교하여 더 빠를 수 있다.

- [0159] 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 상기 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 상기 세포의 사멸을 일으킬 수 있다. 유도성 세포 사멸 모이어티는 예를 들어, rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8 또는 EGFRt일 수 있다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt이고, 상기 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK이고, 상기 세포 사멸 활성화제는 GCV이다. 일부 경우에, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9이고, 상기 세포 사멸 활성화제는 AP1903이다.
- [0160] 유도성 세포 사멸 모이어티는 인헨서 모이어티에 연결될 수 있고, 상기 기재된 바와 같은 키메라 폴리펩티드로서 세포에서 공동발현될 수 있다.
- [0161] 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)
- [0162] 악성 및 감염성 질환의 치료를 위한 "기성품" 동종 T 세포를 제조하기 위해, T 세포 주입에 의한 세포 요법은 병원체 및 악성종양에 대한 면역을 재확립하도록 설계될 수 있다. 시험관내에서 충분한 수의 T 세포로 종양-표적화 특성을 갖는 T 세포를 생산하는데 필요한 시간의 양은 일반적으로 환자의 치료장과 양립할 수 없을 수 있다. 더욱이, 진행성 질환을 갖는 환자로부터의 자가 T 세포는 손상된 기능을 가질 수 있고, 원하는 항원에 내성이 있다.
- [0163] 이들 문제를 해결하기 위해, 환자에게 동종 T 세포를 투여할 수 있지만, 주입된 세포에서 상이한 주요 또는 부조직적합성 항원을 인식함으로써 숙주 T 세포에 의한 면역-매개 거부를 방지할 필요가 있다. TCR 알파 및 베타쇄 및 HLA-A 분자의 발현 없이 T 세포의 주입은 GVHD 및 HVG를 유발하지 않을 수 있다. 그러므로, TCR 알파쇄 및 HLA-A 분자를 결실시키기 위해 CRISPR/CAS9로 편집된 T 세포는 범용 이펙터 공여자 세포의 공급원으로서 작용할 수 있다.
- [0164] 베타-2-마이크로글로불린 (B2M)의 녹다운은 공여자 CAR-T 세포가 숙주 T 세포에 의해 공격받는 것을 방지할 수 있지만, 공여자 CAR-T 세포는 숙주 NK 세포에 의해 공격받을 수 있고, CAR-T 세포의 생존에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 종양 세포 및 숙주 T 세포 및/또는 NK 세포를 표적화하는 조작된 면역 세포를 제공한다. 본원에 기재된 조작된 면역 세포는 숙주 T 세포 및/또는 NK 세포를 청소하고, CAR-T 세포의 생존, 지속성 및 확장 능력을 향상시켜, 이에 의해 종양 세포에 대해 더 효과적일 수 있다.
- [0165] 유전자 편집
- [0166] CRISPR, RNA 간섭 기술, TALEN (전사 활성화제-유사 (TAL) 이펙터 뉴클레아제) 및 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN)를 포함하는 다양한 유전자 편집 방법이 본 개시내용에서 조작된 면역 세포를 제조하기 위해 사용될 수 있다.
- [0167] 일부 경우에, CRISPR/Cas9 시스템은 면역 세포의 유전자를 편집하는데 사용된다. 예를 들어, CRISPR/Cas9 시스템은 면역 세포의 내인성 TCR 또는 세포 표면 마커 (예를 들어, CD7)를 녹아웃하여 T 세포 요법을 위해 조작된 면역 세포를 생성하는데 사용될 수 있다. CRISPR/Cas9 (클러스터링된 규칙적인 간격을 갖는 짧은 회문구조 반복부)/Cas (CRISPR-연관) 시스템은 바이러스 또는 외인성 플라스미드에 저항성이 있는 원핵생물에 고유한 천연 면역계이다. 유형 II CRISPR/Cas 시스템은 직접적인 게놈-지정 게놈 편집 도구로서 많은 진핵생물 및 원핵생물 유기체에 적용되었다. CRISPR/Cas9 시스템의 개발은 사람들이 DNA 서열을 편집하고 표적 유전자의 발현 수준을 조절하는 능력을 혁신하여, 유기체의 정확한 게놈 편집을 위한 강력한 도구를 제공하였다. 단순화된 CRISPR/Cas9 시스템은 Cas9 단백질 및 gRNA를 포함할 수 있다. 작용 원리는 gRNA가 그의 자체 Cas9 핸들을 통해 Cas9 단백질과 Cas9-gRNA 복합체를 형성하고, Cas9-gRNA 복합체에서 gRNA의 염기 상보적 쌍형성 서열이 염기 상보적 쌍형성 원리에 의해 표적 유전자의 표적 서열과 쌍형성된다는 것이다. Cas9는 그의 자체 엔도뉴클레아제 활성을 사용하여 표적 DNA 서열을 절단한다. 전통적인 게놈 편집 기술과 비교하여, CRISPR/Cas9 시스템은 여러 별개의 장점: 사용 용이성, 단순성, 저렴한 비용, 프로그래밍 가능성, 및 다중 유전자를 동시에 편집하는 능력을 갖는다.
- [0168] 제약 조성물
- [0169] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 조작된 면역 세포 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 액체 조성물이다. 제약 조성물은 예를 들어 주사에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 제제 중 조작된 면역 세포의 농도는 적어도 약 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 개 또는 그 이상의 세포/ml일 수 있다. 일부 경우에, 제제 중 조작된 면역 세포의 농도는 $1 \times$

10^3 - 1×10^8 개 세포/ml, 또는 1×10^4 - 1×10^7 개 세포/ml 일 수 있다.

- [0170] 본 개시내용의 제약 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 조작된 면역 세포를 하나 이상의 제약상 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 향산화제; 킬레이트제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주 반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 정맥내 투여용으로 제형화될 수 있다.
- [0171] 본 개시내용의 제약 조성물은 치료 (또는 예방)될 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여 양 및 빈도는 인자, 예컨대 환자의 상태, 및 환자의 질환의 유형 및 중증도에 의해 결정될 것이나, 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있다.
- [0172] "면역학적 유효량", "항종양 유효량", "종양-억제 유효량" 또는 "치료량"이 표시되는 경우, 투여될 본 개시내용의 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 정도 또는 전이, 및 환자 (대상체)의 상태의 개인차를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 본원에 기재된 조작된 면역 세포 (예를 들어, CAR-T 세포)를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^9 개 세포/kg 체중, 또는 일부 경우에, 10^5 내지 10^6 개 세포/kg 체중 (해당 범위 내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여될 수 있다고 언급될 수 있다. T 세포 조성물은 또한 이들 투여량으로 수회 투여될 수 있다. 주입 기술을 사용하여 세포를 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 환자를 질환 징후에 대해 모니터링하고 그에 따라 치료를 조절함으로써 쉽게 결정될 수 있다.
- [0173] 대상 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 착상 또는 이식을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 환자에게 피하, 피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해 또는 복강내 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 T 세포 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 일부 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 T 세포 조성물은 바람직하게는 i.v. 주사에 의해 투여된다. T 세포의 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위에 직접 주사될 수 있다.
- [0174] 치료법
- [0175] 본 개시내용은 본원에 기재된 발현 카세트를 코딩하는 렌티바이러스 벡터 (LV)로 형질도입된 조작된 면역 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)를 사용한 치료적 적용을 제공한다. 형질도입된 T 세포 또는 NK 세포는 종양 세포 마커 (예컨대 CD19) 및 활성화된 T 세포 및/또는 NK 세포 컨센서스 마커 (예컨대 CD3, CD7, CD137 등)를 표적화할 수 있다. 조작된 면역 세포는 동종 종양 치료에 사용될 수 있으며, 대규모로 제조될 수 있다.
- [0176] 따라서, 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 조작된 면역 세포 (예를 들어, CAR-T 세포)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체 (예를 들어, 포유동물)의 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포 매개 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.
- [0177] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 조작된 범용 CAR-T 세포를 이를 필요로 하는 환자에게 직접 투여하는 것을 포함하는, 세포 요법 유형을 제공한다. 본 개시내용의 CAR-T 세포는 유전자 편집 기술에 의해 세포에서 녹아웃 또는 침묵된 내인성 TCR 발현을 가질 수 있다. 내인성 TCR의 불활성화는 동종 주입 동안 TCR에 의한 정상 세포의 사멸을 방지할 수 있다. GVHD 반응을 예방할 수 있다. 종양 세포 마커 (예컨대 CD19) 및 활성화된 T 세포 및/또는 NK 세포 (예컨대 CD137)에 대한 마커를 표적화하는 CAR-T 세포는 종양 세포를 청소하면서 활성화된 T 세포 및/또는 NK 세포를 제거할 수 있다. 또한, 숙주 대 이식편 반응 (HVG)을 또한 예방할 수 있다. 본원에 제공된 세포 요법은 또한 대상체에서 동종 CAR-T 세포의 생존 및 항종양 효과를 개선할 수 있다.
- [0178] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 질환을 치료 또는 진단하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0179] 상기 제약 조성물 중 조작된 면역 세포는 동종 면역 세포로부터 유래될 수 있다. 상기 동종 면역 세포로부터 유래된 조작된 면역 세포는 상기 대상체에서 이식편 대 숙주 질환 (GvHD)을 유도하지 않을 수 있다. 상기 제약 조성물 중 조작된 면역 세포는 자가 면역 세포로부터 유래될 수 있다.
- [0180] 상기 제약 조성물 중 상기 조작된 면역 세포의 내인성 TCR은 기능적으로 불활성일 수 있다. 조작된 면역 세포는 기능적으로 활성인 TCR을 갖는 추가 면역 세포와 비교하여 상기 대상체에서 GVHD를 감소시킬 수 있다. 질환

은 암일 수 있다. 암은 예를 들어, 림프종 또는 백혈병일 수 있다.

[0181] 본 개시내용의 CAR-T 세포는 강력한 생체내 세포 확장을 겪을 수 있고 연장될 수 있다. CAR-매개 면역 반응은 CAR-변형된 T 세포가 CAR에서 항원-결합 도메인에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 입양 면역요법 단계의 일부일 수 있다. 예를 들어, 항-CD19 CAR-T 세포는 CD19를 발현하는 세포에 대해 특이적 면역 반응을 유도한다.

[0182] 본원에 제공된 조작된 면역 세포는 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 암은 혈관화되지 않은 또는 아직 실질적으로 혈관화되지 않은 종양, 뿐만 아니라 혈관화된 종양을 포함한다. 암은 비-고형 종양 (예컨대 혈액 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)을 포함할 수 있거나 고형 종양을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 CAR로 치료될 암의 유형은 암종, 모세포종, 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 및 악성종양, 예를 들어 육종, 암종, 및 흑색종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암이 또한 포함된다.

[0183] 혈액 암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액 (또는 혈행) 암의 예는 급성 백혈병 (예컨대 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수형성 백혈병 및 골수모세포성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성 및 적백혈병), 만성 백혈병 (예컨대 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 골수형성 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비호지킨 림프종 (무통성 및 고등급 형태), 다발성 골수종, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 골수이형성 증후군, 털세포 백혈병 및 골수이형성을 포함하는 백혈병을 포함한다.

[0184] 고형 종양은 일반적으로 낭종 또는 액체 영역을 함유하지 않는 비정상적인 조직 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 상이한 유형의 고형 종양은 이를 형성하는 세포 유형에 따라 명명된다 (예컨대 육종, 암종 및 림프종). 고형 종양, 예컨대 육종 및 암종의 예는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 및 다른 육종, 활막종, 증피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 림프성 악성종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 갑상선 수질 암종, 갑상선 유두 암종, 크롬친화성세포종 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장 세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 용모막암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 방광 암종, 흑색종, 및 CNS 종양 (예컨대, 신경교종 (예컨대 뇌줄기 신경교종 및 혼합 신경교종), 교모세포종 (또한 다형성 교모세포종으로서 공지됨) 성상세포종, CNS 림프종, 배아세포종, 수모세포종, 슈반세포종 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 뿔돌기신경교종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종 및 뇌 전이)을 포함한다.

[0185] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 CAR의 항원 결합 모이어티 부분은 특정 암을 치료하도록 설계된다. 예를 들어, CD19를 표적화하도록 설계된 CAR은 pre-B ALL (소아 적응증), 성인 ALL, 맨틀 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 동종 골수 이식 후 구제 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암 및 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 미만성 거대 B-세포 림프종을 치료하기 위해 CD22를 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, pre-B ALL (소아 적응증), 성인 ALL, 맨틀 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 동종 골수 이식 후 구제 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암 및 장애는 CD19, CD20, CD22 및 ROR1을 표적화하는 CAR의 조합을 사용하여 치료될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 증피종, 췌장암, 난소암 등을 치료하기 위해 메소텔린을 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 급성 골수형성 백혈병 등을 치료하기 위해 CD33/IL3Ra를 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 삼중 음성 유방암, 비소세포 폐암 등을 치료하기 위해 c-Met를 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 전립선암 등을 치료하기 위해 PSMA를 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 전립선암 등을 치료하기 위해 당지질 F77을 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 교모세포종 등을 치료하기 위해 EGFRvIII을 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 신경모세포종, 흑색종 등을 치료하기 위해 GD-2를 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 골수종, 육종, 흑색종 등을 치료하기 위해 NY-ESO-1 TCR을 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 골수종, 육종, 흑색종 등을 치료하기 위해 MAGE A3 TCR을 표적화하도록 설계될 수 있다.

[0186] 본 개시내용은 본원에 개시된 항원 표적 및 질환에만 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 오히려, 본 개시내용은 CAR이 질환을 치료하는데 사용될 수 있는 질환과 연관된 임의의 항원 표적을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0187] 본원에 개시된 세포 요법은 하나 이상의 추가 치료제, 예를 들어 하나 이상의 항암제, 세포독성제 또는 세포정

지제, 호르몬 치료, 백신, 및/또는 다른 면역요법과 함께 공동-제형화 및/또는 공동-투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 수술, 방사선, 냉동수술 및/또는 온열요법을 포함하는 다른 치료적 치료 방식과 조합하여 투여된다. 이러한 조합 요법은 투여되는 치료제의 더 낮은 투여량을 유리하게 이용하므로, 다양한 단일요법과 연관된 가능한 독성 또는 합병증을 회피할 수 있다.

[0188] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 하나 이상의 항체 분자, 화학요법, 다른 항암 요법 (예를 들어, 표적화된 항암 요법 또는 종양용해성 약물), 세포독성제, 면역-기반 요법 (예를 들어, 시토키인), 수술 및/또는 방사선 절차와 조합하여 투여된다. 조합하여 투여될 수 있는 예시적인 세포독성제는 항미세소관제, 토포이소머라제 억제제, 항대사물질, 유사분열 억제제, 알킬화제, 안트라사이클린, 빈카 알칼로이드, 인터칼레이팅제, 신호 도입 경로를 방해할 수 있는 작용제, 세포자멸을 촉진하는 작용제, 프로테아좀 억제제, 및 방사선 (예를 들어, 국소 또는 전신 방사선조사)을 포함한다.

[0189] 특정 실시양태에서, 조합 요법은 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는 표준 암 치료 화학요법제와 조합하여 사용된다: 아나스트로졸 (아리미덱스®), 비칼루타미드 (카소텍스®), 블레오마이신 술페이트 (블레녹산®), 부설판 (미레란®), 부설판 주사 (부설팩스®), 카페시타빈 (젤로다®), N4-펜톡시카르보닐-5-데옥시-5-플루오로시티딘, 카보플라틴 (파라플라틴®), 카무스틴 (BiCNU®), 클로람부실 (류케란®), 시스플라틴 (플라티놀®), 클라드리빈 (류스타틴®), 시클로포스파미드 (사이톡산® 또는 네오사르®), 시타라빈, 시토신 아라비노시드 (싸이토사-유®), 시타라빈 리포솜 주사 (데포사이트®), 다카바진 (디텍-덤®), 닥티노마이신 (악티노마이신 D, 코스메간), 다우노루비신 히드로클로라이드 (세루비딘®), 다우노루비신 시트레이트 리포솜 주사 (다우녹숨®), 텍사메타손, 도세탁셀 (탁소텔®), 독소루비신 히드로클로라이드 (아드리아마이신®, 루백스®), 에토포시드 (베페시드®), 플루다라빈 포스페이트 (플루다라®, 5-플루오로우라실 (아드루실®, 에푸텍스®), 플루타미드 (유렉신®), 테자시타빈, 젠시타빈 (디플루오로데옥시시티딘), 히드록시우레아 (하이드레아®), 이다루비신 (이다마이신®), 이포스파미드 (이팩스®), 이리노테칸 (캠토사®), L-아스파라기나제 (엘스파®), 류코보린 칼슘, 멜팔란 (알케란®), 6-머캅토피린 (퓨린톨®), 메토트렉세이트 (플렉스®), 미톡산트론 (노반트론®), 마일로타그, 파클리탁셀 (탁술®), nab-파클리탁셀 (아브락산®), 피닉스 (이트롭90/MX-DTPA), 펜토스타틴, 카무스틴 임플란트를 갖는 폴리페프로산 20 (글리아텔®), 타목시펜 시트레이트 (놀바텍스®), 테니포시드 (부몬®), 6-티오구아닌, 티오테파, 티라파자민 (티라존®), 주사용 토토펜칸 히드로클로라이드 (하이캅틴®), 빈블라스틴 (벨반®), 빈크리스틴 (온코빈®), 및 비노렐빈 (나벨빈®).

[0190] 알킬화제의 예는 제한 없이 하기를 포함한다: 질소 머스터드, 에틸렌이민 유도체, 알킬 술포네이트, 니트로소우레아 및 트리아젠: 우라실 머스터드 (아미노우라실 머스터드®, 클로르에타민아실®, 테메틸도판®, 데스메틸도판®, 해만타민®, 노르도판®, 우라실 질소 머스터드®, 우라실로스트®, 우라실모스타자®, 우라무스틴®, 우라무스틴®), 클로르메틴 (머스타젠®), 시클로포스파미드 (사이톡산®, 네오사르®, 클라켄®, 엔독산®, 프로싸이톡스®, 레브이문™), 이포스파미드 (미톡사나®), 멜팔란 (알케란®), 클로람부실 (류케란®), 피포브로만 (아메텔®, 베르사이트®), 트리에틸렌멜라민 (헤멜®, 헥살렌®, 헥사스타트®), 트리에틸렌티오포스포라민, 테모졸로마이드 (테모다르®), 티오테파 (티오플렉스®), 부설판 (부설팩스®, 미레란®), 카무스틴 (BiCNU®), 로무스틴 (CeeNU®), 스트렙토조신 (자노사®), 및 다카바진 (디텍-덤®). 추가의 예시적인 알킬화제는 제한 없이 하기를 포함한다: 옥살리플라틴 (엘록사틴®); 테모졸로마이드 (테모다르® 및 테모달®); 닥티노마이신 (또한 악티노마이신-D, 코스메젠®으로서 공지됨); 멜팔란 (또한 L-PAM, L-사르콜리신, 및 페닐알라닌 머스터드, 알케란®으로서 공지됨); 알트레타민 (또한 헥사메틸멜라민 (HMM), 헥살렌®으로서 공지됨); 카무스틴 (BiCNU®); 벤다무스틴 (트린다®); 부설판 (부설팩스® 및 미레란®); 카보플라틴 (파라플라틴®); 로무스틴 (또한 CCNU, CeeNU®로서 공지됨); 시스플라틴 (또한 CDDP, 플라티놀® 및 플라티놀®-AQ로서 공지됨); 클로람부실 (류케란®); 시클로포스파미드 (사이톡산® 및 네오사르®); 다카바진 (또한 DTIC, DIC 및 아미다졸 카복시아미드, 디텍-덤®으로서 공지됨); 알트레타민 (또한 헥사메틸멜라민 (HMM), 헥살렌®으로서 공지됨); 이포스파미드 (이팩스®); 프레드누무스틴; 프로카바진 (마틀란®); 메클로로에타민 (또한 질소 머스터드, 무스틴 및 메클로로에타민 히드로클로라이드, 머스타젠®으로서 공지됨); 스트렙토조신 (자노사®); 티오테파 (또한 티오포스포아미드, TESP A 및 TSPA, 티오플렉스®로서 공지됨); 시클로포스파미드 (엔독산®, 사이톡산®, 네오사르®, 프로싸이톡스®, 레브이문®); 및 벤다무스틴 HCl (트린다®).

[0191] 안트라사이클린의 예는 예를 들어 독소루비신 (아드리아마이신® 및 루백스®); 블레오마이신 (레녹산®); 다우노루비신 (다우노루비신 히드로클로라이드, 다우노마이신, 및 루비도마이신 히드로클로라이드, 세루비딘®); 다우노루비신 리포솜 (다우노루비신 시트레이트 리포솜, 다우녹숨®); 미톡산트론 (DHAD, 노반트론®); 에피루비신 (엘렌스™); 이다루비신 (이다마이신®, 이다마이신 PFS®); 미토마이신 C (뮤타마이신®); 겔라나마이신;

허비마이신; 라비도마이신; 및 데스아세틸-라비도마이신을 포함한다.

[0192] 본원에 기재된 세포 요법과 조합하여 사용될 수 있는 빈카 알칼로이드의 예는 비노렐빈 타르트레이트 (나벨빈®), 빈크리스틴 (온코빈®), 및 빈데신 (엘디신®); 빈블라스틴 (또한 빈블라스틴 술페이트, 빈카류코 블라스틴 및 VLB, 알카반-AQ® 및 벨반®으로서 공지됨); 및 비노렐빈 (나벨빈®)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0193] 본원에 기재된 세포 요법과 조합하여 사용될 수 있는 프로테아좀 억제제의 예는 보르테조미 (벨케이드®); 카필 조미 (PX-171-007, (S)-4-메틸-N-((S)-1-(((S)-4-메틸-1-((R)-2-메틸옥시란-2-일)-1-옥소펜탄-2-일)아미노)-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)-2-((S)-2-(2-모르폴리노아세트아미도)-4-페닐부탄아미도)-펜탄아미드); 마리조미 (NPI-0052); 익사조미 시트레이트 (MLN-9708); 델란조미 (CEP-18770); 0-메틸-N-[(2-메틸-5-티아졸릴)카르보닐]-L-세틸-0-메틸-N-[(1S)-2-[(2R)-2-메틸-2-옥시라닐]-2-옥소-1-(페닐 메틸)에틸]-L-세린아미드 (ONX-0912); 다노프레비르 (RG7227, CAS 850876-88-9); 익사조미 (MLN2238, CAS 1072833-77-2); 및 (S)-N-[(페닐메톡시)카르보닐]-L-류실-N-(1-포르밀-3-메틸부틸)-L-류신아미드 (MG-132, CAS 133407-82-6)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0194] 일부 실시양태에서, 세포 요법은 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, 수용체 티로신 키나제 (RTK) 억제제)와 조합하여 사용될 수 있다. 예시적인 티로신 키나제 억제제는 표피 성장 인자 (EGF) 경로 억제제 (예를 들어, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 경로 억제제 (예를 들어, 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR) 억제제 (예를 들어, VEGFR-1 억제제, VEGFR-2 억제제, VEGFR-3 억제제)), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 경로 억제제 (예를 들어, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 (PDGFR) 억제제 (예를 들어, PDGFR-β 억제제)), RAF-1 억제제, KIT 억제제 및 RET 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 헤지호그 억제제와 조합하여 사용되는 항암제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 악시티닙 (AG013736), 보수티닙 (SKI-606), 세디라닙 (레세틴, AZD2171), 다사티닙 (스프라이셀®, BMS-354825), 엘로티닙 (타세바®), 게피티니브 (이레사®), 이매티닙 (글리벡®, CGP57148B, STI-571), 라파티닙 (타이커브®, 타이버브®), 레스타우르티닙 (CEP-701), 네라티닙 (HKI-272), 닐로티닙 (타시그나®), 세막사닙 (세막시닙, SU5416), 수니티닙 (수텐트®, SU11248), 토세라닙 (팔라디아®), 반데타닙 (작티마®, ZD6474), 바탈라닙 (PTK787, PTK/ZK), 트라스투주맙 (허셉틴®), 베바시주맙 (아바스틴®), 리톡시맙 (리톡산®), 세톡시맙 (엘비투스®), 파니투무맙 (벡티빅스®), 라니비주맙 (루센티스®), 닐로티닙 (타시그나®), 소라페닙 (넥사바®), 알렘투주맙 (캄파트®), 켄투주맙 오조가마이신 (마일로타그®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, 도비티닙 락테이트 (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (바가테프®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, 티보자닙 (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647, XL228, AEE788, AG-490, AST-6, BMS-599626, CUDC-101, PD153035, 켈리티닙 (EKB-569), 반데타닙 (작티마), WZ3146, WZ4002, WZ8040, ABT-869 (리니파닙), AEE788, AP24534 (포나티닙), AV-951 (티보자닙), 악시티닙, BAY 73-4506 (레고라페닙), 브리바닙 알라니네이트 (BMS-582664), 브리바닙 (BMS-540215), 세디라닙 (AZD2171), CHIR-258 (도비티닙), CP 673451, CYC116, E7080, Ki8751, 마시티닙 (AB1010), MGCD-265, 모테사닙 디포스페이트 (AMG-706), MP-470, OSI-930, 파조파닙 히드로 클로라이드, PD173074, 소라페닙 토실레이트 (Bay 43-9006), SU 5402, TSU-68 (SU6668), 바탈라닙, XL880 (GSK1363089, EXEL-2880). 헤지호그 억제제의 추가 예는 비스모데집 (2-클로로-N-[4-클로로-3-(2-피리디닐)페닐]-4-(메틸술포닐)-벤즈아미드, GDC-0449); 1-(4-클로로-3-(트리플루오로메틸)페닐)-3-((3-(4-플루오로페닐)-3,4-디히드로-4-옥소-2-퀴나졸리닐)메틸)-우레아 (CAS 330796-24-2); N-[(2S,3R,3'R,3aS,4'aR,6S,6'aR,6'bS,7aR,12'aS,12'bS)-2',3',3a,4,4',4'a,5,5',6,6',6'a,6'b,7,7',7a,8',10',12',12'a,12'b-에이코사히드로-3,6,11',12'b-테트라메틸스피로[푸로[3,2-b]피리딘-2(3H),9'(1'H)-나프트[2,1-a]아줄렌]-3'-일]-메탄술폰아미드 (IPI926, CAS 1037210-93-7); 및 4-플루오로-N-메틸-N-[1-[4-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-1-프탈라지닐]-4-피페리디닐]-2-(트리플루오로메틸)-벤즈아미드 (LY2940680, CAS 1258861-20-9); 및 에리스모데집 (LDE225)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 선택된 티로신 키나제 억제제는 수니티닙, 엘로티닙, 게피티니브, 또는 소라페닙 엘로티닙 히드로 클로라이드 (타세바®); 리니파닙 (N-[4-(3-아미노-1H-인다졸-4-일)페닐]-N'-(2-플루오로-5-메틸페닐)우레아, 또한 ABT 869로서 공지됨, 제넨테크로부터 입수가 가능함); 수니티닙 말레이트 (수텐트®); 보수티닙 (4-[(2,4-디클로로-5-메톡시페닐)아미노]-6-메톡시-7-[3-(4-메틸피페라진-1-일)프로폭시]퀴놀린-3-카보니트릴, 또한 SKI-606으로서 공지됨, 미국 특허 번호 6,780,996에 기재됨); 다사티닙 (스프라이셀®); 파조파닙 (보트리엔트®); 소라페닙 (넥사바®); 작티마 (ZD6474); 및 이매티닙 또는 이매티닙 메실레이트 (글리벡® 및 글리벡®)로부터 선

택된다.

[0195] 특정 실시양태에서, 세포 요법은 베바시주맵 (아바스틴®), 악시티닙 (인라이타®); 브리바닙 알라니네이트 (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 (넥사바®); 파조파닙 (보트리엔트®); 수니티닙 말레이트 (수텐트®); 세디라닙 (AZD2171, CAS 288383-20-1); 바가테프 (BIBF1120, CAS 928326-83-4); 포레티닙 (GSK1363089); 텔라티닙 (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); 아파티닙 (YN968D1, CAS 811803-05-1); 이매티닙 (글리벡®); 포나티닙 (AP24534, CAS 943319-70-8); 티보자닙 (AV951, CAS 475108-18-0); 레고라페닙 (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); 바탈라닙 디히드로클로라이드 (PTK787, CAS 212141-51-0); 브리바닙 (BMS-540215, CAS 649735-46-6); 반데타닙 (카프렐사® 또는 AZD6474); 모테사닙 디포스페이트 (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-디히드로-3,3-디메틸-1H-인돌-6-일)-2-[(4-피리디닐메틸)아미노]-3-피리딘카르복스아미드, PCT 공개 번호 WO 02/066470에 기재됨); 도비티닙 디락트산 (TKI258, CAS 852433-84-2); 린파닙 (ABT869, CAS 796967-16-3); 카보잔티닙 (XL184, CAS 849217-68-1); 레스타우르티닙 (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-디메틸에틸)-2-옥사졸릴]메틸]티오]-2-티아졸릴]-4-피페리딘카르복스아미드 (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-아미노-1-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피롤로[2,1-f][1,2,4]트리아진-5-일)메틸)피페리딘-3-올 (BMS690514); N-(3,4-디클로로-2-플루오로페닐)-6-메톡시-7-[(3a α ,5 β ,6a α)-옥타히드로-2-메틸시클로헥사[c]피롤-5-일]메톡시]-4-퀴나졸린아민 (XL647, CAS 781613-23-8); 4-메틸-3-[[1-메틸-6-(3-피리디닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노]-N-[3-(트리플루오로메틸)페닐]-벤즈아미드 (BHG712, CAS 940310-85-0); 및 애플리버셉트 (아일리아®)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 수용체 억제제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0196] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 요법은 PI3K 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. PI3K 억제제는 PI3K의 델타 및 감마 이소형의 억제제일 수 있다. PI3K 억제제의 예는 4-[2-(1H-인다졸-4-일)-6-[[4-(메틸술포닐)피페라진-1-일]메틸]티에노[3,2-d]피리미딘-4-일]모르폴린; 2-메틸-2-[4-[3-메틸-2-옥소-8-(퀴놀린-3-일)-2,3-디히드로아미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]페닐]프로피오니트릴; 4-(트리플루오로메틸)-5-(2,6-디모르폴리노피리미딘-4-일)피리딘-2-아민; 토자서팁 (VX680 또는 MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-피리디닐)-6-퀴놀리닐]메틸렌]-2,4-티아졸리딘디온 (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(아세틸옥시)-1-[2-(2-프로페닐아미노)메틸렌]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-옥타히드로-11-히드록시-4-(메톡시메틸)-4a,6a-디메틸-시클로헥타[5,6]나프토[1,2-c]피란-2,7,10(1H)-트리온 (PX866, CAS 502632-66-8); 8-페닐-2-(모르폴린-4-일)-크로멘-4-온 (LY294002, CAS 154447-36-6); 2-아미노-8-에틸-4-메틸-6-(1H-피라졸-5-일)피리도[2,3-d]피리미딘-7(8H)-온 (SAR 245409 또는 XL 765); 1,3-디히드로-8-(6-메톡시-3-피리디닐)-3-메틸-1-[4-(1-피페라지닐)-3-(트리플루오로메틸)페닐]-2H-아미다조[4,5-c]퀴놀린-2-온, (2Z)-2-부텐디오에이트 (1:1) (BGT 226); 5-플루오로-3-페닐-2-[(1S)-1-(9H-퓨린-6-일아미노)에틸]-4(3H)-퀴나졸리논 (CAL101); 2-아미노-N-[3-[N-[3-[(2-클로로-5-메톡시페닐)아미노]퀴녹살린-2-일]술포모일]페닐]-2-메틸프로판아미드 (SAR 245408 또는 XL 147); 및 (S)-피롤리딘-1,2-디카르복실산 2-아미드 1-({4-메틸-5-[2-(2,2,2-트리플루오로-1,1-디메틸-에틸)-피리딘-4-일]-티아졸-2-일}-아미드) (BYL719)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0197] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 요법은 mTOR 억제제, 예를 들어 라파마이신, 템시로리무스 (토리셀®), AZD8055, BEZ235, BGT226, XL765, PF-4691502, GDC0980, SF1126, OSI-027, GSK1059615, KU-0063794, WYE-354, 팔로미드 529 (P529), PF-04691502, 또는 PKI-587. 리다포로리무스 (공식적으로 데페로리무스로서 공지됨, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2 [(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R, 23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-디히드록시-19,30-디메톡시-15,17,21,23,29,35-헥사메틸-2,3,10,14,20-펜타옥소-11,36-디옥사-4-아자트리시클로[30.3.1.0 4,9] 헥사트리아콘타-16,24,26,28-테트라엔-12-일]프로필]-2-메톡시시클로헥실 디메틸포스포네이트, 또한 AP23573 및 MK8669로서 공지됨, 및 PCT 공개 번호 WO 03/064383에 기재됨); 에베로리무스 (아피니토® 또는 RAD001); 라파마이신 (AY22989, 시로리무스®); 시마피모드 (CAS 164301-51-3); 엠시로리무스, (5-{2,4-비스[(3S)-3-메틸모르폴린-4-일]피리도[2,3-d]피리미딘-7-일}-2-메톡시페닐)메탄올 (AZD8055); 2-아미노-8-[트랜스-4-(2-히드록시메톡시)시클로헥실]-6-(6-메톡시-3-피리디닐)-4-메틸-피리도[2,3-d]피리미딘-7(8H)-온 (PF04691502, CAS 1013101-36-4); 및 N2-[1,4-디옥소-4-[[4-(4-옥소-8-페닐-4H-1-벤조피란-2-일)모르폴리늄-4-일]메톡시]부틸]-L-아르기닐글리실-L- α -아스파르트-L-세린-, 내염 (SF1126, CAS 936487-67-1), (1r,4r)-4-(4-아미노-5-(7-메톡시-1H-인돌-2-일)아미다조[1,5-f][1,2,4]트리아진-7-일)시클로헥산카르복실산 (OSI-027); 및 XL765 중 하나 이상으로부터 선택된 하나 이상의 mTOR 억제제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0198] 일부 실시양태에서, 세포 요법은 BRAF 억제제, 예를 들어 GSK2118436, RG7204, PLX4032, GDC-0879, PLX4720, 및 소라페닙 토실레이트 (Bay 43-9006)와 조합하여 사용될 수 있다. 추가 실시양태에서, BRAF 억제제는 레고라

페닐 (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); 티보자닙 (AV951, CAS 475108-18-0); 베무라페닙 (젤보라프®, PLX-4032, CAS 918504-65-1); 엔코라페닙 (또한 LGX818로서 공지됨); 1-메틸-5-[[2-[5-(트리플루오로메틸)-1H-아미다졸-2-일]-4-피리디닐]옥시]-N-[4-(트리플루오로메틸)페닐-1H-벤즈아미다졸-2-아민 (RAF265, CAS 927880-90-8); 5-[1-(2-히드록시에틸)-3-(피리딘-4-일)-1H-피라졸-4-일]-2,3-디히드로인덴-1-온 옥심 (GDC-0879, CAS 905281-76-7); 5-[2-[4-[2-(디메틸아미노)에톡시]페닐]-5-(4-피리디닐)-1H-아미다졸-4-일]-2,3-디히드로-1H-인덴-1-온 옥심 (GSK2118436 또는 SB590885); (+/-)-메틸 (5-(2-(5-클로로-2-메틸페닐)-1-히드록시-3-옥소-2,3-디히드로-1H-이소인돌-1-일)-1H-벤즈아미다졸-2-일)카르바메이트 (또한 XL-281 및 BMS908662로서 공지됨) 및 N-(3-(5-클로로-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-카르보닐)-2,4-디플루오로페닐)프로판-1-술폰아미드 (또한 PLX4720으로서 공지됨)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0199]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 요법은 MEK 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 셀루메티닙 (5-[(4-브로모-2-클로로페닐)아미노]-4-플루오로-N-(2-히드록시에톡시)-1-메틸-1H-벤즈아미다졸-6-카르복사미드, 또한 AZD6244 또는 ARRY 142886으로서 공지됨); ARRY-142886 트라메티닙 디메틸 술폰사이드 (GSK-1120212, CAS 1204531-25-80); G02442104 (또한 GSK1120212로서 공지됨), RDEA436; N-[3,4-디플루오로-2-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6-메톡시페닐]-1-[(2R)-2,3-디히드록시프로필]-시클로프로판술폰아미드 (또한 RDEA119 또는 BAY869766으로서 공지됨); RDEA119/BAY 869766, AS703026; G00039805 (또한 AZD-6244 또는 셀루메티닙으로서 공지됨), BIX 02188; BIX 02189; 2-[(2-클로로-4-아이오도페닐)아미노]-N-(시클로프로필메톡시)-3,4-디플루오로-벤즈아미드 (또한 CI-1040 또는 PD184352로서 공지됨); CI-1040 (PD-184352), N-[(2R)-2,3-디히드록시프로필]-3,4-디플루오로-2-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-벤즈아미드 (또한 PD0325901로서 공지됨); PD03259012'-아미노-3'-메톡시플라본 (또한 PD98059로서 공지됨, 비아핀 게엠베하 운트 코., 카게(Biaffin GmbH & Co., KG) (독일)로부터 입수가함); PD98059, 2,3-비스[아미노[(2-아미노페닐)티오]메틸렌]-부탄디니트릴 (또한 U0126으로서 공지됨); U0126, XL-518 (또한 GDC-0973으로서 공지됨, Cas No. 1029872-29-4, 에이씨씨 코퍼레이션(ACC Corp.)으로부터 입수가함); GDC-0973 (메타논, [3,4-디플루오로-2-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]페닐][3-히드록시-3-(25)-2-피페리디닐-1-아제티디닐]-), G-38963; 및 G02443714 (또한 AS703206으로서 공지됨), 또는 이의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 MEK 억제제가 조합하여 사용될 수 있다. MEK 억제제의 추가 예는 베니메티닙 (6-(4-브로모-2-플루오로페닐아미노)-7-플루오로-3-메틸-3H-벤조아미다졸-5-카르복실산 (2-히드록시에톡시)-아미드, 또한 MEK162로서 공지됨, CAS 1073666-70-2); 2,3-비스[아미노[(2-아미노페닐)티오]메틸렌]-부탄디니트릴 (또한 U0126으로서 공지됨, 미국 특허 번호 2,779,780에 기재됨); (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(에틸아미노)-8,9,16-트리히드록시-3,4-디메틸-3,4,9,19-테트라히드로-1H-2-벤즈옥사시클로테트라데신-1,7(8H)-디온 (또한 E6201로서 공지됨); 베무라페닙 (PLX-4032, CAS 918504-65-1); (R)-3-(2,3-디히드록시프로필)-6-플루오로-5-(2-플루오로-4-아이오도페닐아미노)-8-메틸피리도[2,3-d]피리미딘-4,7(3H,8H)-디온 (TAK-733, CAS 1035555-63-5); 피마서티닙 (AS-703026, CAS 1204531-26-9); 2-(2-플루오로-4-아이오도페닐아미노)-N-(2-히드록시에톡시)-1,5-디메틸-6-옥소-1,6-디히드로피리딘-3-카르복사미드 (AZD 8330); 및 3,4-디플루오로-2-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-N-(2-히드록시에톡시)-5-[(3-옥소-[1,2]옥사지난-2-일)메틸]벤즈아미드 (CH 4987655 또는 Ro 4987655)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0200]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 요법은 JAK2 억제제, 예를 들어 CEP-701, INCB18424, CP-690550 (타소 시티닙)과 조합하여 사용될 수 있다. JAK 억제제의 예는 록소리티닙 (자카피®); 토파시티닙 (CP690550); 악시 티닙 (AG013736, CAS 319460-85-0); 5-클로로-N2-[(1S)-1-(5-플루오로-2-피리미디닐)에틸]-N4-(5-메틸-1H-피라 졸-3-일)-12,4-피리미딘디아민 (AZD1480, CAS 935666-88-9); (9E)-15-[2-(1-피롤리디닐)에톡시]-7,12,26-트리 옥사-19,21,24-트리아자테트라시클로[18.3.1.12,5.114,18]-헥사코사-1(24),2,4,9,14,16,18(25),20,22-노나엔 (SB-1578, CAS 937273-04-6); 모벨로티닙 (CYT 387); 바리시티닙 (INCB-028050 또는 LY-3009104); 파크리티닙 (SB1518); (16E)-14-메틸-20-옥사-5,7,14,27-테트라아자테트라시클로[19.3.1.12,6.18,12]헵타코사-1(25),2,4,6(27),8,10,12(26),16,21,23-데카엔 (SB 1317); 간도티닙 (LY 2784544); 및 N,N-디시클로프로필-4-[(1,5-디메틸-1H-피라졸-3-일)아미노]-6-에틸-1,6-디히드로-1-메틸-아미다조[4,5-d]피롤로[2,3-b]피리딘-7-카 르복사미드 (BMS 911543)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0201]

일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조합 요법은 파클리탁셀 또는 파클리탁셀 작용제, 예를 들어 탁솔®, 단백질-결합 파클리탁셀 (예를 들어, 아브락산®)을 포함한다. 예시적인 파클리탁셀 작용제는 나노입자 알부민-결합 파클리탁셀 (아브락산, 아브락시스 바이오사이언스(Abraxis Bioscience)에 의해 시판됨), 도코사헥사엔산 결합 된-파클리탁셀 (DHA-파클리탁셀, 탁소프레신, 프로타가(Protarga)에 의해 시판됨), 폴리글루타메이트 결합된-파 클리탁셀 (PG-파클리탁셀, 파클리탁셀 폴리글루맥스, CT-2103, 자이오타스, 셀 세라퓨틱(Cell Therapeutic)에

의해 시판됨), 중앙-활성화 전구약물 (TAP), ANG105 (파클리탁셀 3개 분자에 결합된 안지오펙-2, 이뮤노젠 (ImmunoGen)에 의해 시판됨), 파클리탁셀-EC-1 (erbB2-인식 펩티드 EC-1에 결합된 파클리탁셀; 문헌 [Li et al., Biopolymers (2007) 87:225-230] 참조), 및 글루코스-접합 파클리탁셀 (예를 들어, 2'-파클리탁셀 메틸 2-글루코피라노실 숙시네이트)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0202] 방법

[0203] 본 개시내용은 조작된 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 방법은 (a) 키메라 폴리펩티드를 발현하는 핵산 분자를 세포에 전달하는 단계; 및 (b) 핵산 분자를 세포에서 발현시켜 이에 의해 조작된 세포를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 키메라 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체일 수 있다.

[0204] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 조작된 세포를 투여하는 방법을 제공한다. 조작된 세포는 조작된 면역 세포일 수 있다. 조작된 면역 세포는 T 세포일 수 있다. 조작된 면역 세포는 자가 T 세포로부터 유래될 수 있다. 조작된 면역 세포는 동종 T 세포로부터 유래될 수 있다.

[0205] 일부 측면에서, (i) 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티, 및 (ii) 키메라 폴리펩티드를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 조작된 면역 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 포함하는 조작된 면역 세포를 투여하는 방법이 본원에 제공된다. 인핸서 모이어티는 유도성 세포 사멸 모이어티에 연결될 수 있다. 조작된 면역 세포는 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 추가로 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 제1 항원 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 상기 제1 항원 결합 도메인은 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시킨다. 결합 모이어티는 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 CAR의 개별 CAR은 (i) 제1 항원 결합 도메인, (ii) 제2 항원 결합 도메인, 또는 (iii) 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함할 수 있다. 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다.

[0206] 일부 측면에서, 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 면역 세포를 투여하는 방법이 본원에 제공된다. 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화될 수 있다. 조작된 면역 세포는 하나 이상의 CAR을 포함하나 인핸서 모이어티를 포함하지 않는 추가의 조작된 면역 세포와 비교하여, (i) 조작된 면역 세포와 이종인 세포 (예를 들어, 암 세포, 면역 세포, 또는 둘 모두)의 존재 하에 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500일 또는 그 이상 동안 시험관내에서 생존가능한 상태로 유지함으로써 향상된 정도의 지속성, (ii) 15일 이내에 적어도 약 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 55배, 60배, 65배, 70배, 75배, 80배, 85배, 90배, 95배, 100배, 110배, 120배, 130배, 140배, 150배, 200배, 250배, 300배 또는 그 이상만큼 향상된 정도의 확장, 또는 (iii) 면역 세포 항원 또는 질환-연관 항원을 포함하는 표적 세포에 대한 향상된 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 30일 이내에 적어도 약 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 110배, 120배, 130배, 140배, 150배, 160배, 170배, 180배, 190배, 200배, 210배, 220배, 230배, 240배, 250배, 260배, 270배, 280배, 290배, 300배, 350배, 400배, 450배, 500배 또는 그 이상만큼 향상된 정도의 확장을 나타낼 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 60일 이내에 적어도 약 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1,000배, 2,000배, 3,000배, 4,000배, 5,000배, 6,000배, 7,000배, 8,000배, 9,000배, 10,000배, 20,000배, 30,000배, 40,000배, 50,000배, 60,000배, 70,000배, 80,000배, 90,000배, 100,000배, 200,000배, 300,000배, 400,000배, 500,000배, 600,000배, 700,000배, 800,000배, 900,000배, 1,000,000배 또는 그 이상만큼 향상된 정도의 확장을 나타낼 수 있다. 생존성 또는 확장은 자극, 예를 들어 암 항원 또는 암 세포에 의한 자극의 존재 하에 측정될 수 있다. 생존성 또는 확장은 여러 라운드에 자극 또는 반복된 자극의 존재 하에 측정될 수 있다.

[0207] 일부 측면에서, 기능적으로 불활성인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 세포 (예를 들어, 조작된 면역 세포)를 투여하는 방법이 본원에 제공된다. 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 CAR의 각 개별 CAR은 결합 모이어티를 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 (i) 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시키는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-

연관 항원에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다.

[0208] 일부 측면에서, 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 포함하는 조작된 면역 세포를 투여하는 방법이 본원에 제공된다. 조작된 세포는 CD7에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 추가로 포함할 수 있다. CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포에서 내인성 CD7은 불활성화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 면역 세포 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 포함할 수 있다. 면역 세포 항원은 본원에 기재된 임의의 면역 세포 항원, 예컨대 CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 및 SLAMF7일 수 있다. 항원 결합 도메인이 결합하는 조작된 세포의 내인성 면역 세포 항원은 조작된 세포에서 불활성화될 수 있다.

[0209] 일부 측면에서, (i) CD7에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 (ii) 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 단일 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 면역 세포를 투여하는 방법이 본원에 제공된다. CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 내인성 CD7을 코딩하는 유전자는 조작된 면역 세포에서 불활성화될 수 있다.

[0210] 본 개시내용은 또한 대상체에서 질환을 치료 또는 진단하는 방법을 제공한다. 일부 경우에, 방법은 조작된 면역 세포를 포함하는 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 제약 조성물 중 조작된 면역 세포는 동종 면역 세포로부터 유래될 수 있다. 동종 면역 세포로부터 유래된 조작된 면역 세포는 대상체에서 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)을 유도하지 않을 수 있다. 제약 조성물 중 조작된 면역 세포는 자가 면역 세포로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에, 제약 조성물 중 조작된 면역 세포의 내인성 TCR은 기능적으로 불활성이다. 조작된 면역 세포는 기능적으로 활성인 TCR을 갖는 면역 세포와 비교하여 대상체에서 GVHD를 감소시킬 수 있다. 질환은 암일 수 있다. 예를 들어, 암은 림프종 또는 백혈병일 수 있다.

[0211] 본 개시내용은 또한 조작된 면역 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 동종 세포 요법을 전달하는 방법을 제공한다. 집단의 개별 조작된 면역 세포는 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 질환-연관 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 제1 항원 결합 도메인은 대상체에게 투여될 때 조작된 면역 세포에 대한 대상체의 면역 반응을 저해 또는 감소시킬 수 있다. 조작된 면역 세포는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화될 수 있다. 예를 들어, TCR의 서브유닛을 코딩하는 유전자는 불활성화될 수 있다. 본원에 기재된 다양한 유전자 편집 방법이 T 세포의 내인성 TCR을 불활성화시키는데 사용될 수 있다.

[0212] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 세포 집단의 활성화를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포를 제조하는데 사용되는 세포는 조작된 면역 세포를 제조하기 전에 활성화될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포는 활성화될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 활성화는 세포가 휴지 상태에서 활성 상태로 전환하는 과정을 지칭할 수 있다. 이 과정은 항원에 대한 반응, 이동, 및/또는 기능적으로 활성인 상태에 대한 표현형 또는 유전적 변화를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 활성화는 T 세포 활성화의 단계적 과정을 지칭할 수 있다. 일부 경우에, T 세포는 활성화되기 위해 하나 이상의 신호를 필요로 할 수 있다. 예를 들어, T 세포는 완전히 활성화되기 위해 적어도 2개의 신호를 필요로 할 수 있다. 제1 신호는 항원-MHC 복합체에 의한 TCR의 결합 후 발생할 수 있고, 제2 신호는 공동자극 분자의 결합에 의해 발생할 수 있다. 항-CD3 항체 (또는 이의 기능적 변이체)는 제1 신호를 모방할 수 있고, 항-CD28 항체 (또는 이의 기능적 변이체)는 시험관내에서 제2 신호를 모방할 수 있다.

[0213] 일부 측면에서, 본원에 제공된 방법은 세포 집단의 활성화를 포함할 수 있다. 활성화는 CD3 TCR 복합체 연관 신호를 자극할 수 있는 작용제 및 세포 표면 상의 공동자극 분자를 자극할 수 있는 리간드가 부착된 표면과 세포 집단을 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 특히, T 세포 집단은 예컨대 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 표면에 고정된 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 (때때로 칼슘 이오노포어와 함께) 시험관내에서 자극될 수 있다. T 세포 표면 상의 보조 분자의 공동자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포 집단은 T 세포의

증식을 자극할 수 있는 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. 일부 경우에, 4-1BB가 세포를 자극하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포는 4-1BB 및 IL-21 또는 또 다른 시토카인으로 자극될 수 있다. CD4 T 세포 또는 CD8 T 세포의 활성화를 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 신호를 제공하는 작용제는 용액 상태이거나 고체상 표면에 접합될 수 있다. 입자 대 세포의 비율은 표적 세포에 대한 입자 크기에 따라 달라질 수 있다. 추가 실시양태에서, 세포, 예컨대 T 세포는 작용제-코팅 비드와 조합될 수 있으며, 여기서 비드 및 세포는 후속적으로 분리되고 임의로 배양될 수 있다. 각 비드는 항-CD3 항체 또는 항-CD28 항체, 또는 일부 경우에는 상기 둘의 조합으로 코팅될 수 있다. 대안적인 실시양태에서, 배양 전에, 작용제-코팅 비드 및 세포는 분리되지 않고 함께 배양된다. 세포 표면 단백질은 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 부착될 수 있는 상자성 비드 (3x28 비드)가 T 세포와 접촉하도록 허용함으로써 접합될 수 있다. 한 실시양태에서 세포 및 비드 (예를 들어, 1:1의 비율로 다이아비즈® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)는 완충제, 예를 들어 포스페이트 완충 염수 (PBS) (예를 들어, 2가 양이온, 예컨대 칼슘 및 마그네슘 없음)에서 조합된다. 임의의 세포 농도가 사용될 수 있다. 혼합물은 약 수 시간 (예를 들어, 약 3시간) 내지 14일 또는 약 14일 또는 그 사이의 임의의 시간당 정수 값 동안 배양될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물은 21일 또는 약 21일 동안 또는 최대 21일 또는 최대 약 21일 동안 배양될 수 있다. T 세포 배양에 적절한 조건은 혈청 (예를 들어, 소 태아 또는 인간 혈청), 인터루킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-21, IL-15, TGF β , 및 TNF α 와 또는 세포 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함하는, 증식 및 생존성에 필요한 인자를 함유할 수 있는 적절한 배지 (예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 엑스-비보 5, (론자))를 포함할 수 있다. 세포 성장을 위한 다른 첨가제는 계면활성제, 플라스마네이트, 및 환원제, 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 배지는 RPMI 1640, A1 M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, 엑스-비보 1, 및 엑스-비보 20, 옵티마이저를 포함할 수 있으며, 아미노산, 피루브산 나트륨 및 비타민이 첨가되며, 무혈청 또는 적절한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 정의된 호르몬 세트, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 시토카인(들)으로 보충된다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험 배양물에만 포함될 수 있으며, 가능하게는 대상체에게 주입될 세포 배양물에는 포함되지 않을 수 있다. 표적 세포는 성장을 지원하는데 필요한 조건하에; 예를 들어, 적절한 온도 (예를 들어, 37°C) 및 대기 (예를 들어, 공기 + 5% CO₂)에서 유지될 수 있다. 일부 예에서, 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특징을 나타낼 수 있다. 일부 경우에, 인간 CD3, CD28, CD2 또는 이의 임의의 조합에 대한 가용성 단일특이적 사랑제 항체가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화는 활성화 모이어티, 공동자극제 및 이의 임의의 조합을 이용할 수 있다. 일부 측면에서, 활성화 모이어티는 CD3/T 세포 수용체 복합체에 결합하고/거나 공동자극을 제공한다. 일부 측면에서, 활성화 모이어티는 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체 중 어느 하나이다. 일부 측면에서, 고체상은 비드, 플레이트 및/또는 매트릭스 중 적어도 하나이다. 일부 측면에서, 고체상은 비드이다. 대안적으로 또는 추가적으로, 활성화 모이어티는 기질에 접합되지 않을 수 있으며, 예를 들어 활성화 모이어티는 배지에서 자유-부동할 수 있다.

[0214]

일부 경우에, 세포 집단은 조직 또는 세포와 공동배양함으로써 활성화 또는 확장될 수 있다. 세포는 항원 제시 세포일 수 있다. 인공 항원 제시 세포 (aAPC)는 T 세포 수용체 및 공동자극 분자에 대한 리간드를 발현할 수 있고, 일부 경우에 이들의 효력 및 기능을 개선하면서 이동을 위해 T 세포를 활성화 및 확장할 수 있다. aAPC는 T 세포 활성화를 위한 임의의 유전자를 발현하도록 조작될 수 있다. aAPC는 T 세포 확장을 위한 임의의 유전자를 발현하도록 조작될 수 있다. aAPC는 비드, 세포, 단백질, 항체, 시토카인 또는 임의의 조합일 수 있다. aAPC는 계능 이식을 받을 수 있는 세포 집단에 신호를 전달할 수 있다. 예를 들어, aAPC는 신호 1, 신호 2, 신호 3 또는 임의의 조합을 전달할 수 있다. 신호 1은 항원 인식 신호일 수 있다. 예를 들어, 신호 1은 펩티드-MHC 복합체에 의한 TCR의 라이게이션 또는 CD3 신호-형질도입 복합체의 활성화를 초래할 수 있는 CD3를 향해 지정된 효능작용 항체의 결합일 수 있다. 신호 2는 공동자극 신호일 수 있다. 예를 들어, 공동자극 신호는 항-CD28, 유도성 공동자극제 (ICOS), CD27 및 4-1BB (CD137)일 수 있으며, 이들은 각각 ICOS-L, CD70 및 4-1BBL에 결합한다. 신호 3은 시토카인 신호일 수 있다. 시토카인은 임의의 시토카인일 수 있다. 시토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 일부 경우에 인공 항원 제시 세포 (aAPC)가 세포 집단을 활성화 및/또는 확장하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 인공은 동종특이성을 유도하지 않을 수 있다. aAPC는 일부 경우에 HLA를 발현하지 않을 수 있다. aAPC는 활성화 및/또는 자극에 사용될 수 있는 유전자를 안정적으로 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 경우에, K562 세포가 활성화에 사용될 수 있다. K562 세포가 또한 확장에 사용될 수 있다. K562 세포는 인간 적백혈병 세포주일 수 있다. K562 세포는 관심 유전자를 발현하도록 조작될 수 있다. K562 세포는 HLA 부류 I, II, 또는 CD1d 분자를 내인적으로 발현하지 않을 수 있지만, ICAM-1 (CD54) 및 LFA-3 (CD58)을 발현할 수 있다. K562는 신호 1을 T 세포

에 전달하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, K562 세포는 HLA 부류 I을 발현하도록 조작될 수 있다. 일부 경우에, K562 세포는 추가 분자, 예컨대 B7, CD80, CD83, CD86, CD32, CD64, 4-1BBL, 항-CD3, 항-CD3 mAb, 항-CD28, 항-CD28mAb, CD1d, 항-CD2, 막-결합 IL-15, 막-결합 IL-17, 막-결합 IL-21, 막-결합 IL-2, 말단절단된 CD19 또는 임의의 조합을 발현하도록 조작될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 K562 세포는 CD80 및 CD83에 더하여 막 형태의 항-CD3 mAb, 클론 OKT3을 발현할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 K562 세포는 CD80 및 CD83에 더하여 막 형태의 항-CD3 mAb, 클론 OKT3, 막 형태의 항-CD28 mAb를 발현할 수 있다.

[0215] aAPC는 비드일 수 있다. 구형 폴리스티렌 비드는 CD3 및 CD28에 대한 항체로 코팅되고 T 세포 활성화에 사용될 수 있다. 비드는 임의의 크기일 수 있다. 일부 경우에, 비드는 3 및 6 마이크로미터 또는 약 3 및 6 마이크로미터일 수 있다. 비드는 4.5 마이크로미터 크기 또는 약 4.5 마이크로미터 크기일 수 있다. 비드는 임의의 세포 대 비드 비율로 사용될 수 있다. 예를 들어, 밀리리터 당 1백만개 세포의 3 대 1의 비드 대 세포 비율이 사용될 수 있다. aAPC는 또한 경직성 구형 입자, 폴리스티렌 라텍스 마이크로비드, 자성 나노- 또는 마이크로-입자, 나노크기 양자점, 4, 폴리(락트산-코-글리콜산) (PLGA) 마이크로스피어, 비구형 입자, 5, 탄소 나노튜브 변들, 6, 타원 PLGA 마이크로입자, 7, 나노웜, 유체 지질 이중층-함유 시스템, 8, 2D-지질 지질 이중층 (2D-SLB), 9, 리포솜, 10, RAFTsome/마이크로도메인 리포솜, 11, SLB 입자, 또는 임의의 임의의 조합일 수 있다. 일부 경우에, aAPC는 CD4 T 세포를 확장할 수 있다. 예를 들어, aAPC는 HLA 부류 II-제한 CD4 T 세포의 항원 프로세싱 및 제시 경로를 모방하도록 조작될 수 있다. K562는 HLA-D, DP α , DP β 체, Ii, DM α , DM β , CD80, CD83 또는 임의의 임의의 조합을 발현하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 조작된 K562 세포는 HLA-제한 항원-특이적 CD4 T 세포를 확장하기 위해 HLA-제한 펩티드로 펄스화될 수 있다. 일부 경우에, aAPC의 사용은 T 세포 활성화, 확장 또는 임의의 조합을 위해 외인적으로 도입된 시토카인과 조합될 수 있다. 세포는 또한 생체내에서, 예를 들어 게놈 이식된 세포를 대상체에게 투여한 후 대상체의 혈액에서 확장될 수 있다.

[0216] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 세포 집단의 형질도입을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 및/또는 T 세포 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 세포의 형질감염이 수행될 수 있다.

[0217] 일부 실시양태에서, 세포 수용체, 예컨대 CAR 및/또는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 상청액이 생성된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및/또는 아데노-연관 바이러스 벡터일 수 있다. 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는데 사용될 수 있다. 이러한 세포는 293 세포, (예를 들어, 아데노바이러스를 패키징하기 위한), 및 Psi2 세포 또는 PA317 세포 (예를 들어, 레트로바이러스를 패키징하기 위한)를 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 핵산 벡터를 바이러스 입자에 패키징하는 세포주를 생산함으로써 생성될 수 있다. 벡터는 패키징 및 숙주로의 후속 통합에 필요한 최소 바이러스 서열을 함유할 수 있다. 벡터는 발현될 폴리뉴클레오티드(들)에 대한 발현 카세트에 의해 대체되는 다른 바이러스 서열을 함유할 수 있다. 누락된 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 트랜스로 공급될 수 있다. 예를 들어, AAV 벡터는 숙주 게놈으로의 패키징 및 통합에 필요한 AAV 게놈으로부터의 ITR 서열을 포함할 수 있다. 바이러스 DNA는 다른 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 코딩하는 헬퍼 플라스미드를 함유할 수 있는 세포주에 패키징될 수 있지만, ITR 서열이 결여된다. 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염될 수 있다. 헬퍼 바이러스는 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 벡터의 복제 및 AAV 유전자의 발현을 촉진할 수 있다. 아데노바이러스에 의한 오염은 예를 들어 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열 처리에 의해 감소될 수 있다. 세포로의 핵산의 전달을 위한 추가 방법은 예를 들어 본원에 참조로 포함된 US20030087817에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0218] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 벡터로 일시적으로 또는 비-일시적으로 형질감염될 수 있다. 세포는 대상체에서 자연적으로 발생하므로 형질감염될 수 있다. 세포는 대상체로부터 채취하거나 유래되고 형질감염될 수 있다. 세포는 대상체로부터 채취된 세포, 예컨대 세포주로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 벡터로 형질감염된 세포는 하나 이상의 벡터-유래 서열을 포함하는 새로운 세포주를 확립하는데 사용된다. 진핵생물 숙주 세포를 위한 벡터의 비제한적인 예는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다: pBs, pQE-9 (퀴아젠(Qiagen)), 파지스크립트, PsiX174, p블루스스크립트 SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (스트라타젠(Stratagene)); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (파마시아(Pharmacia)). 진핵생물: pWL-neo, pSv2cat, pOG44, pXT1, pSG (스트라타젠) pSVK3, pBPv, pMSG, pSVL (파마시아). 또한, 선택된 숙주에서 복제가능하고 생존가능한 한 임의의 다른 플라스미드 및 벡터가 사용될 수 있다. 임의의 벡터 및 상업적으로 입수가능한 것들 (및 임의의 변이체 또는 유도체)은 방법에 사용하기 위한 하나 이상의 재조합 부위를 포함하도록 조작될 수 있다. 이러한 벡터는 예를 들어 벡터 레보리토리즈 인

크.(Vector Laboratories Inc.), 인비트로젠(Invitrogen), 프로메가(Promega), 노바젠(Novagen), NEB, 클론테크(Clontech), 베링거 만하임(Boehringer Mannheim), 파마시아(Pharmacia), 에피센터(EpiCenter), 오리진스 테크놀로지스 인크.(OriGenes Technologies Inc.), 스트라타젠(Stratagene), 퍼킨엘머(PerkinElmer), 파밍겐(Pharmingen), 및 리서치 제네틱스(Research Genetics)로부터 얻을 수 있다. 다른 관심 벡터는 진핵생물 발현 벡터, 예컨대 pFastBac, pFastBacHT, pFastBacDUAL, pSFV, 및 pTet-스플라이스 (인비트로젠), pEUK-C1, pPUR, pMAM, pMAMneo, pBI101, pBI121, pDR2, pCMVEBNA, 및 pYACneo (클론테크), pSVK3, pSVL, pMSG, pCH110, 및 pKK232-8 (파마시아, 인크.), p3'SS, pXT1, pSG5, pPbac, pMbac, pMCIneo, 및 pOG44 (스트라타젠, 인크.), 및 pYES2, pAC360, pBlueBa-cHis A, B, 및 C, pVL1392, pBlueBac111, pCDM8, pCDNA1, pZeoSV, pCDNA3 pREP4, pCEP4, 및 pEBVHis (인비트로젠, 코퍼레이션), 및 이의 변이체 또는 유도체를 포함한다. 다른 벡터는 pUC18, pUC19, p블루스크립트, pSPORT, 코스미드, 파지미드, YAC's (효모 인공 염색체), BAC's (박테리아 인공 염색체), P1 (에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 파지), pQE70, pQE60, pQE9 (쿠아간(quagan)), pBS 벡터, 파지스크립트 벡터, 블루스크립트 벡터, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A (스트라타젠), pCDNA3 (인비트로젠), pGEX, pTrsfus, pTrc99A, pET-5, pET-9, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (파마시아), pSPORT1, pSPORT2, pCMVSPORT2.0 및 pSYSPORT1 (인비트로젠) 및 이의 변이체 또는 유도체를 포함한다. 추가 관심 벡터는 또한 인비트로젠으로부터의 pTrxFus, pThioHis, pLEX, pTrcHis, pTrcHis2, pRSET, pBlueBa-cHis2, pCDNA3.1/His, pCDNA3.1(-)/Myc-His, pSecTag, pEBVHis, pPIC9K, pPIC3.5K, pA081S, pPICZ, pPICZA, pPICZB, pPICZC, pGAPZA, pGAPZB, pGAPZC, pBlue-Bac4.5, pBlueBacHis2, pMelBac, pSinRep5, pSinHis, pIND, pIND(SP1), pVgRXR, pCDNA2.1, pYES2, pZER01.1, pZER0-2.1, pCR-Blunt, pSE280, pSE380, pSE420, pVL1392, pVL1393, pCDM8, pCDNA1.1, pCDNA1.1/Amp, pCDNA3.1, pCDNA3.1/Zeo, pSe, SV2, pRc/CMV2, pRc/ RSV, pREP4, pREP7, pREP8, pREP9, pREP 10, pCEP4, pEBVHis, pCR3.1, pCR2.1, pCR3.1-Uni, 및 pCRBac; 파마시아로부터의 X ExCell, X gt11, pTrc99A, pKK223-3, pGEX-1X T, pGEX-2T, pGEX-2TK, pGEX-4T-1, pGEX-4T-2, pGEX-4T-3, pGEX-3X, pGEX-5X-1, pGEX-5X-2, pGEX-5X-3, pEZZ18, pRIT2T, pMC1871, pSVK3, pSVL, pMSG, pCH110, pKK232-8, pSL1180, pNEO, 및 pUC4K; 노바젠으로부터의 pSCREEN-1b(+), pT7Blue(R), pT7Blue-2, pCITE-4-abc(+), pOCUS-2, pTag, pET-32LIC, pET-30LIC, pBAC-2 cp LIC, pBACgus-2 cp LIC, pT7Blue-2 LIC, pT7Blue-2, X SCREEN-1, X BlueSTAR, pET-3abcd, pET-7abc, pET9abcd, pET11 abcd, pET12abc, pET-14b, pET-15b, pET-16b, pET-17b-pET-17xb, pET-19b, pET-20b(+), pET-21abcd(+), pET-22b(+), pET-23abcd(+), pET-24abcd (+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28abc(+), pET-29abc(+), pET-30abc(+), pET-31b(+), pET-32abc(+), pET-33b(+), pBAC-1, pBACgus-1, pBAC4x-1, pBACgus4x-1, pBAC-3 cp, pBACgus-2 cp, pBACsurf-1, plg, 시그널 plg, pYX, 셀렉타 벡터(Selecta Vecta)-Neo, 셀렉타 벡터-Hyg, 및 셀렉타 벡터-Gpt; 클론테크로부터의 pLexA, pB42AD, pGBT9, pAS2-1, pGAD424, pACT2, pGAD GL, pGAD GH, pGAD10, pGilda, pEZM3, pEGFP, pEGFP-1, pEGFPN, pEGFP-C, pEBFP, pGFpuv, pGFP, p6xHis-GFP, pSEAP2-베이직, pSEAP2-컨트롤, pSEAP2-프로모터, pSEAP2-인핸서, p I3gal -베이직, pl3gal-컨트롤, p I3gal -프로모터, p I3gal -인핸서, pCMV, pTet-Off, pTet-On, pTK-Hyg, pRetro-Off, pRetro-On, pIRESIneo, pIRES1hyg, pLXSN, pLNCX, pLAPSN, pMAMneo, pMAMneo-CAT, pMAMneo-LUC, pPUR, pSV2neo, pYEX4T-1/2/3, pYEX-S1, pBacPAK-His, pBacPAK8/9, pAcUW31, BacPAK6, pTriplEx, 2Xgt10, Xgt11, pWE15, 및 X TriplEx; 스트라타젠으로부터의 람다 ZAP II, pBK-CMV, pBK-RSV, p블루스크립트 II KS+/-, p블루스크립트 II SK+/-, pAD-GAL4, pBD-GAL4 Cam, p서프스크립트, 람다 FIX II, 람다 DASH, 람다 EMBL3, 람다 EMBL4, SuperCos, pCR-스크립트 Amp, pCR-스크립트 Cam, pCR-스크립트 Direct, pBS+/-, pBC KS+/-, pBC SK+/-, 파지스크립트, pCAL-n-EK, pCAL-n, pCAL-c, pCAL-kc, pET-3abcd, pET-11abcd, pSPUTK, pESP-1, pCMVLacI, pOPRSVI/MCS, pOPI3 CAT, pXT1, pSG5, pPbac, pMbac, pMCIneo, pMCIneo Poly A, pOG44, pOG45, pFRTI3GAL, pNEOI3GAL, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pRS413, pRS414, pRS415, 및 pRS416, pPC86, pDBLeu, pDBTrp, pPC97, p2.5, pGAD1-3, pGAD10, pAct, pACT2, pGADGL, pGADGH, pAS2-1, pGAD424, pGBT8, pGBT9, pGAD-GAL4, pLexA, pBD-GAL4, pHISi, pHISi-1, placZi, pB42AD, pDG202, pJK202, pJG4-5, pNLexA, pYESTrp 및 이의 변이체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 미니서클 벡터일 수 있다. 본원에 제공된 벡터는 CAR 및/또는 TCR을 코딩하는 폴리펩티드를 전달하는데 사용될 수 있다.

[0219]

형질도입 및/또는 형질감염은 비-바이러스 형질감염, 유전자총, 화학적 형질감염, 전기천공, 핵감염, 열-쇼크 형질감염, 리포펙션, 미세주사 또는 바이러스 형질감염 중 어느 하나에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서 제공된 방법은 바이러스 형질도입을 포함하고, 바이러스 형질도입은 렌티바이러스를 포함한다. 바이러스 입자는 세포 수용체를 코딩하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 세포에 생체외에서 또는 생체내에서 전달하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 본원에 개시된 바와 같은 바이러스 벡터는 pfu (플라크 형성 단위)로서 측정될 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 조성물 및 방법의 제조합 바이러스 또는 바이러스 벡터의

pfu는 약 10^8 내지 약 5×10^{10} pfu일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 적어도 약 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 및 5×10^{10} pfu이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 최대 약 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 및 5×10^{10} pfu이다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 벡터 계놈으로서 측정될 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^{10} 내지 3×10^{12} 벡터 계놈, 또는 1×10^9 내지 3×10^{13} 벡터 계놈, 또는 1×10^8 내지 3×10^{14} 벡터 계놈, 또는 적어도 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} , 및 1×10^{18} 벡터 계놈이거나, 또는 1×10^8 내지 3×10^{14} 벡터 계놈이거나, 또는 최대 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} , 및 1×10^{18} 벡터 계놈이다. 일부 경우에, 본원에 제공된 바이러스 벡터는 감염 다중도 (MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 경우에, MOI는 핵산이 전달될 수 있는 세포에 대한 벡터 또는 바이러스 계놈의 비율 또는 배수를 지칭할 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^6 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^5 내지 1×10^7 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^4 내지 1×10^8 일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 적어도 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^8 내지 3×10^{14} MOI이거나, 또는 최대 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI이다. 일부 경우에, 바이러스 벡터는 세포 당 약 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 또는 최대 약 9×10^9 계놈 카피/바이러스 입자의 감염 다중도 (MOI)로 도입된다.

[0220] 본원에 기재된 임의의 핵산 전달 플랫폼, 예를 들어 형질도입을 사용한 세포의 형질감염 효율은 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 99.9% 초과이거나, 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 99.9% 초과일 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 감염체를 세포 집단을 포함하는 조성물에 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 감염체는 폴리브렌을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 감염체는 바이러스 감염 효율을 향상시킬 수 있다. 감염체는 바이러스 감염능을 약 100 내지 1,000배 향상시킬 수 있다. 폴리브렌은 ml 당 약 5ug 내지 10ug의 농도로 조성물에 첨가될 수 있다.

[0221] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 세포에 세포 수용체를 도입하는 비-바이러스 접근법을 포함할 수 있다. 비-바이러스 접근법은 하기를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다: CRISPR 연관 단백질 (Cas 단백질, 예를 들어 Cas9), 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 아르코너트 뉴클레아제, 및 메가뉴클레아제. 뉴클레아제는 자연적으로 존재하는 뉴클레아제, 유전자 변형 및/또는 재조합될 수 있다. 비-바이러스 접근법은 또한 트랜스포존-기반 시스템 (예를 들어 피기백(PiggyBac), 슬리핑 뷰티(Sleeping beauty))를 사용하여 수행될 수 있다.

[0222] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 외인성 폴리펩티드를 세포에 도입하기 위해 피기백 시스템을 이용할 수 있다. 피기백 시스템은 2개의 구성성분, 트랜스포존 및 트랜스포사제를 포함한다. 피기백 트랜스포사제는 특이적으로 계놈에 무작위로 분산된 'TTAA' 부위에서 트랜스포존의 통합을 용이하게 한다. 계놈에서 'TTAA'의 예측 빈도는 DNA 서열의 256개 염기쌍 당 대략 1이다. 다른 트랜스포존과 달리, PB 트랜스포사제는 또한 완전히 이음새없는 방식으로 트랜스포존의 절제를 가능하게 하여 서열 또는 돌연변이를 남기지 않는다. 더욱이, 피기백은 공지된 상한이 없는 대용량 화물-운반 능력 (200 kb 초과가 나타남)을 제공한다. PB 성능 수준은 코돈-

최적화 전략, 돌연변이, 결실, 첨가, 치환 및 이의 임의의 조합에 의해 증가될 수 있다. 일부 경우에, PB는 더 큰 화물 (대략 9.1-14.3 kb), 더 높은 전치 활성을 가질 수 있고, 그의 발자국-없음 특징으로 인해 유전자 편집 도구로서 매력적일 수 있다. 일부 측면에서, PB는 몇 가지 특징을 포함할 수 있다: 고효율 전치; 큰 화물; 꾸준한 장기간 발현; 트랜스진이 단일 카피로서 통합됨; 전통적인 방법, 예컨대 PCR 대신에 비침습적 마크에 의해 생체내에서 표적 유전자를 추적함; 통합 부위를 용이하게 결정함, 및 이의 조합.

[0223] 일부 측면에서, 본원에 제공된 방법은 세포 수용체를 코딩하는 폴리펩티드를 세포에 도입하기 위해 슬리핑 뷰티 (SB) 시스템을 이용할 수 있다. SB는 시험관내 진화에 의해 언어류 게놈 내에서 발견된 고대 Tc1/마리너 트랜스포존 화석으로부터 조작되었다. SB ITR (230 bp)은 트랜스포사제에 대한 인식 신호로서 역할을 할 수 있는 32 bp 길이의 불완전한 직접 반복부 (DR)를 함유한다. ITR 내의 DR 요소 사이의 결합 친화성 및 간격은 전치 활성에 관여한다. SB 트랜스포사제는 보존된 아미노산 모티프 (DDE)를 특징으로 하는, DNA 결합 폴리펩티드, 핵 국제화 신호 (NLS) 및 촉매 도메인을 보유하는 39 kDa 단백질일 수 있다. SB 트랜스포사제의 1차 아미노산 서열을 돌연변이 유발하는 다양한 스크린은 과활성 트랜스포사제 버전을 초래하였다. 일부 경우에, 변형된 SB가 사용될 수 있다. 변형된 SB는 원래 SB 트랜스포존의 ITR 내에 돌연변이, 결실 및 첨가를 함유할 수 있다. 변형된 SB는 pT2, pT3, pT2B, pT4, SB100X 및 이의 조합을 포함할 수 있다. 변형된 SB의 비제한적인 예는 SB10, SB11 (SB10보다 3배 높음), SB12 (SB10보다 4배 높음), HSB1-HSB5 (SB10보다 최대 10배 높음), HSB13-HSB17 (HSB17은 SB10보다 17배 높음), SB100X (SB10보다 100배 높음), SB150X (SB10보다 130배 높음), 및 이의 임의의 조합으로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, SB100X는 원래 부활한 트랜스포사제 (SB10)와 비교하여 100배 과활성이다. 일부 측면에서, SB 전치 절제는 화물 부위에 발자국 (3 bp)을 남긴다. 게놈의 TA 디뉴클레오티드에 통합이 발생하고 숙주 복구 기계에 의해 생성된 표적 부위 중복을 초래한다. 일부 경우에, SB는 거의 편향되지 않은, 무작위에 가까운 통합 프로파일을 보유한 것으로 보인다. 트랜스포존 통합은 야생형 시스템에서 미리 결정된 게놈 유전자좌로 인공적으로 표적화될 수 있지만 (~10%), 본원에 제공된 키메라 시스템에서, SB 트랜스포존 통합은 10% 초과 효율로 미리 결정된 유전자좌로 지정될 수 있다.

[0224] 일부 측면에서, 외인성 다중핵산을 세포 집단에 도입하기 위해 비-바이러스 접근법을 취할 수 있다. 일부 측면에서, 비-바이러스 벡터 또는 핵산은 바이러스를 사용하지 않고 전달될 수 있으며, 핵산의 양에 따라 측정될 수 있다. 일반적으로, 임의의 적합한 양의 핵산이 본 개시내용의 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있다. 일부 경우에, 핵산은 적어도 약 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 pg, 300 pg, 400 pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 500 ng, 600 ng, 700 ng, 800 ng, 900 ng, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 2 g, 3 g, 4 g 또는 5 g일 수 있다. 일부 경우에, 핵산은 최대 약 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 pg, 300 pg, 400 pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 500 ng, 600 ng, 700 ng, 800 ng, 900 ng, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 2 g, 3 g, 4 g 또는 5 g일 수 있다.

[0225] 일부 실시양태에서, CAR 및/또는 TCR 서열을 세포에 도입하는 비-바이러스 접근법은 전기천공을 포함할 수 있다. 전기천공은 예를 들어 네온® 형질감염 시스템 (써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)) 또는 아막사® 뉴클레오펙터 (아막사(AMAXA)® 바이오시스템스(Biosystems))를 사용하여 수행될 수 있다. 전기천공 파라미터는 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성을 최적화하기 위해 조정될 수 있다. 전기천공 장치는 다중 전기 과형 펄스 설정, 예컨대 지수함수형 붕괴, 시간 상수 및 구형파를 가질 수 있다. 모든 세포 유형은 적용된 펄스 파라미터 (예를 들어, 전압, 커패시턴스 및 저항)에 따라 달라지는 고유한 최적의 전계 세기 (E)를 갖는다. 최적의 전계 세기의 적용은 막횡단 전압의 유도를 통해 전기투과화를 유발하며, 이는 핵산이 세포막을 통해 통과하도록 허용한다. 일부 경우에, 전기천공 펄스 전압, 전기천공 펄스 폭, 펄스 수, 세포 밀도, 및 팁 유형은 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성을 최적화하도록 조정될 수 있다.

[0226] 일부 실시양태에서, 전기천공 펄스 전압은 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성을 최적화하기 위해 변경될 수 있다. 일부 경우에, 전기천공 전압은 약 500 볼트 미만일 수 있다. 일부 경우에, 전기천공 전압은 적어도 약 500 볼트, 적어도 약 600 볼트, 적어도 약 700 볼트, 적어도 약 800 볼트, 적어도 약 900 볼트, 적어도 약 1000 볼트, 적어도 약 1100 볼트, 적어도 약 1200 볼트, 적어도 약 1300 볼트, 적어도 약 1400 볼트, 적어도 약 1500 볼트, 적어도 약 1600 볼트, 적어도 약 1700 볼트, 적어도 약 1800 볼트, 적어도 약 1900 볼트, 적어도 약 2000 볼트, 적어도 약 2100 볼트, 적어도 약 2200 볼트, 적어도 약 2300 볼트, 적어도 약 2400 볼트, 적어도 약 2500

볼트, 적어도 약 2600 볼트, 적어도 약 2700 볼트, 적어도 약 2800 볼트, 적어도 약 2900 볼트, 또는 적어도 약 3000 볼트일 수 있다. 일부 경우에, 최적의 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성에 필요한 전기천공 펄스 전압은 세포 유형에 특이적일 수 있다. 예를 들어, 1900 볼트의 전기천공 전압이 대식세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 또 다른 예에서, 약 1350 볼트의 전기천공 전압이 Jurkat 세포 또는 1차 인간 세포, 예컨대 T 세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 일부 경우에, 일정 범위의 전기천공 전압이 주어진 세포 유형에 대해 최적일 수 있다. 예를 들어, 약 1000 볼트 내지 약 1300 볼트의 전기천공 전압이 인간 578T 세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 일부 경우에, 1차 세포는 1차 림프구일 수 있다. 일부 경우에, 1차 세포 집단은 림프구 집단일 수 있다.

[0227] 일부 실시양태에서, 전기천공 펄스 폭은 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성을 최적화하기 위해 변경될 수 있다. 일부 경우에, 전기천공 펄스 폭은 약 5 밀리초 미만일 수 있다. 일부 경우에, 전기천공 폭은 적어도 약 5 밀리초, 적어도 약 6 밀리초, 적어도 약 7 밀리초, 적어도 약 8 밀리초, 적어도 약 9 밀리초, 적어도 약 10 밀리초, 적어도 약 11 밀리초, 적어도 약 12 밀리초, 적어도 약 13 밀리초, 적어도 약 14 밀리초, 적어도 약 15 밀리초, 적어도 약 16 밀리초, 적어도 약 17 밀리초, 적어도 약 18 밀리초, 적어도 약 19 밀리초, 적어도 약 20 밀리초, 적어도 약 21 밀리초, 적어도 약 22 밀리초, 적어도 약 23 밀리초, 적어도 약 24 밀리초, 적어도 약 25 밀리초, 적어도 약 26 밀리초, 적어도 약 27 밀리초, 적어도 약 28 밀리초, 적어도 약 29 밀리초, 적어도 약 30 밀리초, 적어도 약 31 밀리초, 적어도 약 32 밀리초, 적어도 약 33 밀리초, 적어도 약 34 밀리초, 적어도 약 35 밀리초, 적어도 약 36 밀리초, 적어도 약 37 밀리초, 적어도 약 38 밀리초, 적어도 약 39 밀리초, 적어도 약 40 밀리초, 적어도 약 41 밀리초, 적어도 약 42 밀리초, 적어도 약 43 밀리초, 적어도 약 44 밀리초, 적어도 약 45 밀리초, 적어도 약 46 밀리초, 적어도 약 47 밀리초, 적어도 약 48 밀리초, 적어도 약 49 밀리초, 또는 적어도 약 50 밀리초일 수 있다. 일부 경우에, 최적의 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성에 필요한 전기천공 펄스 폭은 세포 유형에 특이적일 수 있다. 예를 들어, 30 밀리초의 전기천공 펄스 폭이 대식세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 또 다른 예에서, 약 10 밀리초의 전기천공 폭이 Jurkat 세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 일부 경우에, 일정 범위의 전기천공 폭이 주어진 세포 유형에 대해 최적일 수 있다. 예를 들어, 약 20 밀리초 내지 약 30 밀리초의 전기천공 폭이 인간 578T 세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함).

[0228] 일부 실시양태에서, 전기천공 펄스 수는 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성을 최적화하기 위해 변경될 수 있다. 일부 경우에, 전기천공은 단일 펄스를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 전기천공은 1개 초과 펄스를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 전기천공은 2개 펄스, 3개 펄스, 4개 펄스, 5개 펄스, 6개 펄스, 7개 펄스, 8개 펄스, 9개 펄스 또는 10개 또는 그 이상의 펄스를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 전기천공 펄스 수는 최적의 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성에 필요한 세포 유형에 특이적일 수 있다. 예를 들어, 단일 펄스를 사용한 전기천공이 대식세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 또 다른 예에서, 3개 펄스를 사용한 전기천공이 1차 세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 일부 경우에, 일정 범위의 전기천공 폭이 주어진 세포 유형에 대해 최적일 수 있다. 예를 들어, 약 1개 내지 약 3개 펄스를 사용한 전기천공이 인간 세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함).

[0229] 일부 경우에, 전기천공을 위한 시작 세포 밀도는 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성을 최적화하기 위해 변경될 수 있다. 일부 경우에, 전기천공을 위한 시작 세포 밀도는 약 1×10^5 개 세포 미만일 수 있다. 일부 경우에, 전기천공을 위한 시작 세포 밀도는 적어도 약 1×10^5 개 세포, 적어도 약 2×10^5 개 세포, 적어도 약 3×10^5 개 세포, 적어도 약 4×10^5 개 세포, 적어도 약 5×10^5 개 세포, 적어도 약 6×10^5 개 세포, 적어도 약 7×10^5 개 세포, 적어도 약 8×10^5 개 세포, 적어도 약 9×10^5 개 세포, 적어도 약 1×10^6 개 세포, 적어도 약 1.5×10^6 개 세포, 적어도 약 2×10^6 개 세포, 적어도 약 2.5×10^6 개 세포, 적어도 약 3×10^6 개 세포, 적어도 약 3.5×10^6 개 세포, 적어도 약 4×10^6 개 세포, 적어도 약 4.5×10^6 개 세포, 적어도 약 5×10^6 개 세포, 적어도 약 5.5×10^6 개 세포, 적어도 약 6×10^6 개 세포, 적어도 약 6.5×10^6 개 세포, 적어도 약 7×10^6 개 세포, 적어도 약 7.5×10^6 개 세포, 적어도 약 8×10^6 개 세포, 적어도 약 8.5×10^6 개 세포, 적어도 약 9×10^6 개 세포, 적어도 약 9.5×10^6 개 세포, 적어도 약 1×10^7 개 세포, 적어도 약

1.2x10⁷개 세포, 적어도 약 1.4x10⁷개 세포, 적어도 약 1.6x10⁷개 세포, 적어도 약 1.8x10⁷개 세포, 적어도 약 2x10⁷개 세포, 적어도 약 2.2x10⁷개 세포, 적어도 약 2.4x10⁷개 세포, 적어도 약 2.6x10⁷개 세포, 적어도 약 2.8x10⁷개 세포, 적어도 약 3x10⁷개 세포, 적어도 약 3.2x10⁷개 세포, 적어도 약 3.4x10⁷개 세포, 적어도 약 3.6x10⁷개 세포, 적어도 약 3.8x10⁷개 세포, 적어도 약 4x10⁷개 세포, 적어도 약 4.2x10⁷개 세포, 적어도 약 4.4x10⁷개 세포, 적어도 약 4.6x10⁷개 세포, 적어도 약 4.8x10⁷개 세포, 또는 적어도 약 5x10⁷개 세포일 수 있다. 일부 경우에, 전기천공을 위한 시작 세포 밀도는 최적의 형질감염 효율 및/또는 세포 생존성에 필요한 세포 유형에 특이적일 수 있다. 예를 들어, 1.5x10⁶개 세포의 전기천공을 위한 시작 세포 밀도가 대식세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 또 다른 예에서, 5x10⁶개 세포의 전기천공을 위한 시작 세포 밀도가 인간 세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함). 일부 경우에, 전기천공을 위한 일정 범위의 시작 세포 밀도가 주어진 세포 유형에 대해 최적일 수 있다. 예를 들어, 5.6x10⁶ 내지 5 x10⁷개 세포의 전기천공을 위한 시작 세포 밀도가 인간 세포, 예컨대 T 세포에 대해 최적일 수 있다 (예를 들어, 가장 높은 생존성 및/또는 형질감염 효율을 제공함).

[0230] 림프성 악성종양을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 조작된 면역 세포 집단을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 집단의 개별 조작된 면역 세포는 결합 모이어티를 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함할 수 있으며, 여기서 결합 모이어티는 면역 세포 항원에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 CAR의 각 CAR은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 집단의 개별 조작된 면역 세포는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있는 인핸서 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 조작된 면역 세포의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)는 불활성화될 수 있다. 일부 경우에, 환자의 말초혈 중 이환 세포의 수 또는 골수 중 이환 세포의 수는 조작된 면역 세포의 마지막 투여 후 일정 기간 (예를 들어, 3주) 내에 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상만큼 감소될 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 마지막 투여 후 기간은 약 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 이상일 수 있다. 환자의 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수는 조작된 면역 세포의 마지막 투여 후 일정 기간 (예를 들어, 3주) 내에 증가하기 시작할 수 있다. 일부 경우에, 조작된 면역 세포의 마지막 투여 후 기간은 약 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 이상일 수 있다.

[0231] 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 향상시킬 수 있다. 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 활성을 구성적으로 향상시키도록 구성될 수 있다. 인핸서 모이어티는 조작된 면역 세포의 하나 이상의 세포내 신호전달 경로를 구성적으로 상향조절하도록 구성될 수 있다. 하나 이상의 세포내 신호전달 경로는 하나 이상의 시토카인 신호전달 경로일 수 있다. 인핸서 모이어티는 시토카인 또는 시토카인 수용체일 수 있다. 인핸서 모이어티는 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, PD-1, PD-L1, CD122, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, CCL21, CCL19, TGF β 베타, 이에 대한 수용체, 이의 기능적 단편, 이의 기능적 변이체 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0232] 조작된 면역 세포는 유도성 세포 사멸 모이어티를 세포 사멸 활성화제와 접촉시 세포의 사멸을 일으킬 수 있는 유도성 세포 사멸 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 유도성 세포 사멸 모이어티는 rapaCasp9, iCasp9, HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, Her2t, CD30, BCMA 및 EGFRt로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 유도성 세포 사멸 모이어티는 EGFRt일 수 있고, 세포 사멸 활성화제는 EGFRt에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 또 다른 예로서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 HSV-TK일 수 있고, 세포 사멸 활성화제는 GCV일 수 있다. 또 다른 예로서, 유도성 세포 사멸 모이어티는 iCasp9일 수 있고, 세포 사멸 활성화제는 AP1903일 수 있다.

[0233] 세포의 내인성 표면 마커를 코딩하는 유전자는 불활성화될 수 있다. 내인성 표면 마커는 발현될 때 제1 항원 결합 도메인에 결합할 수 있다. 내인성 표면 마커는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16a, CD16b, CD25, CD27, CD28, CD30, CD38, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD57, CD62L, CD69, CD94, CD100, CD102, CD122, CD127, CD132, CD137, CD160, CD161, CD178, CD218, CD226, CD244, CD159a (NKG2A), CD159c (NKG2C), NKG2E, CD279, CD314 (NKG2D), CD305, CD335 (NKP46), CD337, CD319 (CS1), TCR α , TCR β 또는 SLAMF7일 수 있다.

[0234] 환자의 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수는 말초혈 중 이환 세포의 수 또는

골수 중 이환 세포의 수가 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상만큼 감소되기 전에 증가하기 시작할 수 있다. 말초혈 중 자가 T 세포, 과립구 및 NK 세포 중 임의의 하나 이상의 수는 말초혈 중 이환 세포의 수 또는 골수 중 이환 세포의 수가 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상만큼 감소된 후에 증가하기 시작할 수 있다.

- [0235] 실시예
- [0236] 실시예 1 TCR 녹아웃을 갖는 CD3 +CD19 이중 CAR 및 EGFRt 스위치를 발현하는 U-CAR T 세포의 연구
- [0237] 일반 재료 및 방법
- [0238] 공여자 혈액으로부터의 말초혈 단핵 세포 (PBMC)의 분리 및 T 세포의 확장
- [0239] 밀도 구배 원심분리를 통해 히스토패이크-1077(Histopaque-1077) (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))을 사용하여 공여자 혈액으로부터 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.
- [0240] 세포주 및 PBMC의 배양
- [0241] Raji 세포 (버킷 림프종 세포, ATCC-CCL86);
- [0242] K562 세포 (인간 적백혈병 세포주, ATCC-CCL243);
- [0243] Raji-ffluc 세포주 (반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 Raji 세포를 스크리닝함으로써 수득됨);
- [0244] 293T 세포 (ATCC-CRL3216).
- [0245] Raji 세포, K562 세포 및 Raji-ffluc 세포주를 RPMI1640 배지에서 배양하고, 293T 세포를 DMEM 배지에서 배양하였다. RPMI1640 및 DMEM을 모두 10% (v/v) 소 태아 혈청 및 100IU/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM 글루타민 및 1 mM 피루브산나트륨으로 보충하였다. 모든 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0246] T 세포 및 수득된 CAR-T 세포를 엑스-비보15 배지 (5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2 함유)에서 배양하였다. CAR-T 세포를 위한 배양 배지를 2일마다 300IU/ml의 최종 농도로 rhIL-2 (썬모피서 사이언티픽)로 추가로 보충하였다. 모든 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0247] 1.1 CAR의 설계 및 바이러스의 패키지
- [0248] 키메라 항원 수용체의 구조는 EGFRt-CD3 scFv-CD19 scFv-힌지-TM-CD28-CD3 ζ (탠덤), tEGFR- CD19 scFv-CD28-CD3 ζ- CD3 scFv-41BB- CD3 ζ (병렬), tEGFR- CD3 scFv-CD19 scFv41BB- CD3 ζ (탠덤), 및 CD19VL-CD3VL-CD3VH-CD19VH-41BB-CD3 ζ (루프)이고, 여기서 EGFRt (또는 tEGFR)는 스위치로서 말단절단된 EGFR이고, CD3 scFv 단편은 모노클로날 항체 OKT3 또는 UCHT1의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (GS 링커에 의해 연결됨)이고, CD 19 scFv 단편은 CAR 검출을 위한 비콘 서열을 함유하는 모노클로날 항체 FMC63의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (GS 링커에 의해 연결됨)이고, 또한 힌지 영역, 막횡단 영역, 인간 CD 28 세포내 공동자극 요소 및 인간 CD3 ζ 세포내 영역이 탠덤으로 포함된다. 키메라 항원 수용체의 예시적인 구조물은 도 1에 나타낸다.

[0249] EGFRt-OKT3-FMC63-CD28z의 아미노산 서열 (서열식별번호: 1)은 하기 기재된 바와 같다:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIHKFNCTISISGD
LHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT
KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKII
SNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRF
VENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLV
WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTNGPKIPSIATGMVGAALLLLLVVALGIG
LFMRAKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQQS
GAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYN
QKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLT
VSSGSTSGGGSGGGSGGGSGSSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQ
QKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQOWSS
NPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGSGGGSGGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQ
DISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHSTRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA
TYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSO
SLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIROPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALKSRLTIHKDN
SKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAHYYYGGSYAMDYWGQTSVTYSSAAADYKD
DDDKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVGGLACYSL
LVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0250]

[0251] EGFRt-OKT3-FMC63-CD28z 아미노산 서열에서, 밑줄친 부분은 안전 스위치 신호 펩티드 영역이고, 이탤릭체 부분은 tEGFR이고, 이탤릭체 밑줄친 부분은 tEGFR TM이고, 곡선 밑줄친 부분은 P2A이고, 이탤릭체 곡선 밑줄친 부분은 CAR 신호 펩티드이고, 굵은 부분은 OKT3 VH이고, 점선 밑줄친 부분은 연결 펩티드이고, 굵은 밑줄친 부분은 OKT3 VL이고, 굵은 이탤릭체 부분은 FMC63 VL이고, 굵은 이탤릭체 밑줄친 부분은 FMC63 VH이고, 박스형 부분은 CD28 힌지 영역 막횡단 영역 및 공동자극 도메인이고, 박스형 이탤릭체 부분은 CD3z이다.

[0252] EGFRt-OKT3-FMC63-CD28z의 뉴클레오티드 산 서열은 서열식별번호: 2에 기재된 바와 같다.

[0253] 서열식별번호: 2:

ATGTTGCTCCTTGACGAGCCTCCTGCTCTGCGAGCTGCCCCATCCAGCCTTCCTCC
 TCATCCC CGGAAGGTGTGCAATGGCATAGGCATTGGCGAGTTTAAAGATTCTCTG
 AGCATAAATGCTACGAATATTAAGCATTTCAGAAATTGTACTTCTATTAGTGGCGAC
 CTCCATATTCTTCCGTTGCTTCAGGGGTGACTCTTACCCACACACCTCCATTGG
 ATCCACAAGAACTTGACATCCTGAAGACGGTTAAAGAGATTACAGGCTTCCTCCTT
 ATCCAAGCGTGGCCCGAGAACAGAACGGACTTGACACGCTTTGAGAACCTCGAAAT
 AATACGGGGTCGGACGAAGCAACACGGCCAATTTAGCCTTGCGGTTGTTAGTCTGA
 ACATTACTTCTCTCGGCCTTCGCTCTTTGAAAGAAATCAGCGACGGAGATGTCATCA

[0254]

TTAGTGGAACAAGAACCTGTGCTACGCGAACACAATCAACTGGAAGAAGCTCTTC
GGTACTTCAGGCCAAAAGACAAAGATTATTAGTAACAGAGGAGAGAATAGCTGTA
AGGCTACCGGACAAGTTTGTACGCCTTGTGTAGTCCAGAGGGTTGCTGGGGACCG
GAACCAAGGGATTGCGTCAGTTGCCGGAACGTGAGTCGCGGACGCGAGTGTGTGGA
TAAGTGCAATCTTCTGGAAGGGGAACCGCGAGAGTTTGTAGAAAATTCCGAATGTA
TACAGTGTTCATCCCGAGTGTCTTCCACAAGCAATGAATATCACATGTACAGGGAGG
GGTCTGATAACTGTATCCAATGTGCACACTACATAGATGGTCTCACTGTGTAAAG
ACGTGCCCGCCGGAGTAATGGGTGAAAAACAACCCCTCGTGTGGAAGTACGCCGA
TGCCGGGCATGTCTGTCTTTGTGTCTATCCCAACTGCACATATGGCTGTACCGGTCC
TGGATTGGAGGGCTGTCCAACAAACGGGCCGAAAATACCGAGTATCGCAACAGGC
ATGGTGGGAGCACTTTTGTCTCTCTCGTTGTGCGCCCTGGGCATCGGCTTGTTTCATGC
GAGCTAAACGAGGCTCAGGCGCGACGAACTTTAGTTTGTGTAAGCAAGCTGGGGAT
GTAGAGGAAAATCCGGGTCCCATGGCCCTTCCAGTGACAGCCTTGTTGTTGCCACTT
GCTCTGCTGCTCCACGCTGCGCGGCCACAGGTCCAGTTGCAGCAGTCAGGCGCCGA
ATTGGCGCGACCAGGGGAAGCGTAAAGATGAGCTGTAAGGCATCCGGGTACACGT
TCACTCGCTATACCATGCATTGGGTAAACAACGGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGG
ATTGGGTATATCAACCCATCCCGGGGCTACACTAACTATAATCAAAAGTTTAAAGA
TAAAGCAACCCCTACGACCGACAAATCATCTTCTACCGCATACATGCAGCTCAGCTC
CCTCACCAGTGAAGATTCTGCCGTTTATTATTGTGCACGATACTATGACGATCACTA
TTGCCTGGACTACTGGGGTCAAGGCACCACACTTACTGTCAGTTCGGAAGTACCA
GTGGGGGAGGTTCTGGCGGTGGCAGCGGGGGTGGGGGTAGCTCACAAATCGTGCTG
ACCCAGAGTCCCCTATCATGAGCGCCTCCCCAGGGGAAAAGGTGACGATGACATG
CTCAGCCAGCTCCAGTGTATCCTACATGAATTGGTATCAACAGAAGAGTGGGACGT
CACCCAAAAGATGGATTTATGACACCAGCAAATTGGCCAGCGGAGTACCAGCGCAT
TTCAGAGGCAGTGGGAGTGGAACATCTTATTCTCTACCATTAGCGGCATGGAAGC
AGAGGATGCAGCAACGTACTATTGTCAACAATGGAGCTCTAATCCCTTTACGTTTCG
CAGCGGCACTAAGCTCGAAATTAATAGGGGTGGCGGCGGCTCCGGCGGTGGCGGGT
CTGGAGGTGGGGGACAGTACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCC
TCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATA
TTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATAC
ATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAG
ATTATTCTCTACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCC
AACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGAATAACA
GGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGA

[0255]

GGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCG
 TCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTGCGC
 AGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACA
 TACTATAATTACAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAG
 CCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAAGTATGACACAGCCATTTACTACTG
 TGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
 CCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGACTACAAAGACGATGACGACAAGATT
 GAAGTTATGTATCCTCCTCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATC
 CATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCC
 TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGGGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA
 GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGA
 CTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
 ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
 GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT
 AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
 ATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
 AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG
 GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC
 ACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0256]

[0257]

EGFRt-UCHT1-FMC63-CD28z의 아미노산 서열 (서열식별번호: 3)은 하기 기재된 바와 같다:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGD
 LHLPVAFRGDSFHTHTPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT
 KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKII
 SNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRF
 VENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLV
 WKYADAGHVCHLCPNCTYGTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMVGAALLLVVALGIG
LFMRAKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQSP
 SSSLASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLESGVPSRFSGS
 GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINP
YKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARSGYGDSDW
YFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG
 VSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKM
 NSLQTDITAIIYYCAHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKG
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHSTRLHSG
VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITAAADYKD
 DDDKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVGGVLACYSL
 LVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
 ADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0258]

[0259]

EGFRt-UCHT1-FMC63-CD28z의 아미노산 서열에서, 밑줄친 부분은 안전 스위치 신호 펩티드 (GMCSFR-L)이고, 이탤릭체 부분은 tEGFR이고, 이탤릭체 밑줄친 부분은 tEGFR TM이고, 곡선 밑줄친 부분은 P2A이고, 이탤릭체 곡선 밑줄친 부분은 CAR 신호 펩티드 (CD8 L)이고, 굵은 부분은 UCHT1 VL이고, 점선 밑줄친 부분은 연결 펩티드이고, 굵은 밑줄친 부분은 UCHT1 VH이고, 굵은 이탤릭체 부분은 FMC63 VH이고, 굵은 이탤릭체 밑줄친 부분은 FMC63 VL이고, 박스형 부분은 CD28 힌지 영역 막횡단 영역 및 공동자극 도메인이고, 박스형 이탤릭체 부분은 CD3z이다.

[0260] EGFRt-UCHT1-FMC63-CD28z의 뉴클레오타이드 산 서열은 서열식별번호: 4에 기재된 바와 같다.

[0261] 서열식별번호: 4:

ATGCTGCTGCTCGTGACATCCCTCTTATTATGCGAACTCCCTCACCCCGCTTTTCTGC
TGATCCCCAGAAAGGTGTGCAACGGCATCGGCATTGGAGAGTTCAAGGATTCTTTA
AGCATCAACGCTACCAACATCAAACATTTCAAGAACTGTACCTCCATTTCCGGCGAT
TTACACATCCTCCCCGTTGCCTTTCGTGGCGATAGCTTCACACACACACCCCTCTG
GACCCCTCAAGAACTGGACATTTTAAAGACCGTGAAGGAGATCACTGGTTTTTTACTG
ATCCAAGCTTGCCCCGAAAATAGGACAGATCTCCACGCTTTCGAGAATTTAGAGAT
CATTCGTGGCAGAACCAAGCAGCACGGACAGTTCTCTTTAGCCGTCGTGTCTTTAAA
TATCACCTCTTTAGGTTTAAGATCTTTAAAAGAGATCAGCGATGGCGACGTCATCAT
CTCCGGCAACAAGAACCTCTGTTACGCCAACACCATTAATTGGAAAAAGCTGTTTG
GCACCTCCGGACAGAAGACCAAGATCATCAGCAACAGAGGCGAGAACAGCTGCAA
AGCTACCGGCCAAGTTTGCCACGCTCTGTGTAGCCCCGAAGGCTGCTGGGGACCCG
AACCTCGTGACTGTGTGAGCTGTAGGAACGTGTCTCGTGGTCGTGAGTGTGTGGATA
AGTGCAATTTACTCGAGGGCGAGCCCAGAGAGTTTGTGGAAAATAGCGAGTGCATC
CAGTGCCACCCCGAATGTCTGCCCCAAGCTATGAACATTACTTGTACTGGTCGTGGC
CCCGATAACTGTATCCAGTGCGCTCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACA
TGCCCCGCTGGCGTGATGGGAGAAAACAACACACTGGTGTGGAAGTATGCCGATGC

[0262]

CGGCCACGTCTGTTCATCTGTGCCACCCCTAACTGTACCTACGGCTGTACCGGACCCGG
 ACTGGAGGGCTGTCCACCAACGGACCCAAGATCCCTAGCATCGCCACCGGCATGG
 TGGGAGCCTTACTGCTGTTACTGGTGGTGGCTCTGGGCATTGGTTTATTCATGAGGG
 CCAAGAGAGGATCCGGCGCCACCAACTTTTCTTTACTGAAACAAGCTGGAGACGTC
 GAGGAAAACCCCGGACCCATGGCTCTCCCCGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTCGCT
 TTATTACTGCACGCCGCTAGGCCCGATATTCAGATGACCCAAAGCCCTAGCTCTTTA
 TCCGCCAGCGTCGGAGATAGAGTCACAATCACTTGTAGAGCCAGCCAAGATATTCG
 TAATTATCTCAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCCAAGCTGCTCATCT
 ATTACACCTCTCGTCTGGAGAGCGGCGTGCCTTCCAGATTCAGCGGCTCCGGCAGCG
 GCACCGACTATACACTCACCATTAGCTCTTTACAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACT
 ACTGCCAGCAAGGTAATACTTTACCTTGGACCTTCGGCCAAGGTACCAAGGTCGAA
 ATCAAGGGCGGCGGCGGATCCGGCGGCGGTGGATCTGGTGGCGGCGGCTCCGAAGT
 CCAGCTGGTCGAATCCGGAGGCGGACTGGTCCAGCCCGGTGGATCCCTCAGACTGA
 GCTGCGCCGCTAGCGGCTATTCCCTTACCCGGCTACACCATGAACTGGGTGAGACAA
 GCTCCCGCAAAGGACTGGAATGGGTGGCCCTCATCAACCCCTACAAGGGCGTGC
 CACATATAATCAAAAAGTTTAAGGACAGATTCACCATCAGCGTCGACAAGTCCAAGA
 ACACCGCTTATTTACAGATGAACTCTTTAAGAGCTGAGGATACCGCCGTGTACTATT
 GTGCTAGGTCCGGCTACTACGGCGACAGCGACTGGTATTTTGACGTCTGGGGACAA
 GGTACCCCTCGTGACAGTGAGCAGCGGCGGTGGCGGTTCTGGCGGCGGAGGCTCCGG
 AGGAGGCGGCAGCGAGGTGAAGCTGCAAGAAAGCGGACCCGGTCTCTGTGGCTCCC
 TCCCAATCTTTATCCGTGACTTGTACCGTGTCCGGAGTCTCTTTACCCGACTACGGC
 GTGAGCTGGATTAGACAGCCCCCAGAAAAGGTTTAGAGTGGCTGGGCGTGATCTG
 GGGATCCGAGACCACATACTACAACAGCGCTTTAAAGTCTCGTCTGACAATCATCA
 AAGACAATTCCAAAAGCCAAGTTTTCTCAAGATGAACTCTTTACAGACCGACGAC
 ACAGCCATTACTACTGCGCCAAGCATTATTACTACGGCGGCAGCTACGCTATGGAC
 TACTGGGGCCAAGGTACAAGCGTCACAGTGAGCTCCGGCAGCACATCCGGAAGCGG
 AAAGCCCGGCAGCGGAGAGGGCAGCACAAAGGGAGACATCCAGATGACCCAGACC
 ACCTCCTCTTTAAGCGCCTCTTTAGGAGATAGGGTGACCATTAGCTGCAGAGCCTCC
 CAAGACATCAGCAAGTATCTCAATTGGTACCAGCAAAAGCCCGATGGCACCGTCAA
 GCTGCTGATCTACCACACCTCTCGTCTCCATTCCGGCGTGCCCAGCAGATTTAGCGG
 AAGCGGATCCGGAACAGACTATTCTTTAACAATCAGCAATTTAGAGCAAGAAGACA
 TCGCCACATATTTCTGCCAACAAGGTAACACTTTACCCTACACCTTCGGAGGCGGCA
 CCAAAGTGGAGATTACAGCGGCCGAGACTACAAAGACGATGACGACAAGATTGA
 AGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATATCCA

[0263]

TGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTT
 TTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGGGGAGTCCCTGGCTTGTCTATAGCTTGTAGTAACAGT
 GGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACT
 ACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT
 GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC
 AGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
 GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT
 GGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAG
 AAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGA
 GGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC
 TACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0264]

[0265]

CAR 유전자를 EF1 α (EF-1 α)의 프로모터 하에 Fuw 렌티바이러스 벡터 백본에 클로닝하여 Fuw-EF1 α -CAR을 형성

하였다. Fuw-EF1 α -CAR, 렌티바이러스 외피 플라스미드 pMD2.G (애드진(Addgene), 플라스미드 #12259) 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드 psPAX2 (애드진, 플라스미드 #12260)를 리포펙타민3000을 사용함으로써 293 T 세포에 형질감염하여 전체 렌티바이러스 발현 벡터를 제조하였다. 상청액을 48 및 72시간에 수집하고, 농축을 위해 초원심분리기 (머크 밀리포어(Merck Millipore))에 적용하였다. 농축된 바이러스를 T 세포의 형질감염을 위해 준비하였다.

[0266] 결과는 렌티바이러스 벡터가 성공적으로 구축되었고 EGFRt 및 CD19+CD3 CAR의 발현이 모두 예상대로 검출되었음을 보여준다.

[0267] 1.2 CRISPR의 설계 및 구축

[0268] 먼저, TCR 보존된 영역의 제1 엑손을 표적화하는 gRNA 서열은 <http://crispr.mit.edu>에서 설계되었으며, 더 높은 녹아웃 효율을 위해 80 초과의 점수를 갖는 2개의 gRNA 서열을 선택하였다. gRNA 프라이머의 경우, 정방향 프라이머는 T7 프로모터 다음에 20 bp의 표적 서열을 포함하고, 역방향 프라이머는 20 bp의 상보적 서열을 갖는다. pX330 플라스미드를 PCR 주형으로서 사용하였다. 정제 후, T7-PCR 생성물을 MEGAscript T7 키트에 대한 주형으로서 추가로 사용하여 RNA를 수득하였다. RNA를 MEGAclear 컬럼으로 정제하고 RNA-무함유 물로 용출하였다. Cas9 플라스미드를 애드진으로부터 구입하였다.

[0269] gRNA 표적화 서열은 하기와 같다:

[0270] TRAC-gRNA : TGTGCTAGACATGAGGTCTA, 서열식별번호: 5;

[0271] 한편, gRNA의 녹아웃 효율을 서베이어(Surveyor) 검정, TIDE에 의해 분석하였다.

[0272] 1.3 CAR-T 세포의 제조

[0273] 세포 단리 및 활성화

[0274] 성분채집 후, 밀도 구배 원심분리를 통해 히스토페이크-1077 (시그마-알드리치)을 사용하여 단핵구를 단리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.

[0275] 5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2를 갖는 엑스-비보 15를 CAR-T 세포 배지로서 사용하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하고 배양하였다.

[0276] CD 19를 발현하는 세포주: Raji (버킷 림프종 세포주, ATCC-CCL86); K562 세포 (인간 적백혈병 세포주, ATCC-CCL243); Raji-ffluc 세포주는 반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 Raji 세포를 스크리닝함으로써 수득됨;

[0277] CD3을 발현하는 세포주: Jurkat 세포.

[0278] 모든 세포를 RPMI1640 배지에서 배양하고, 293T 세포 (ATCC-CRL3216)를 DMEM 배지에서 배양하였다. RPMI1640 및 DMEM을 모두 10% (v/v) 소 태아 혈청 및 100U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM 글루타민 및 1 mM 피루브산나트륨으로 보충하였다.

[0279] 전기천공

[0280] T 세포 농축 및 활성화 2일 후, 항-CD3/항-CD28 자성 비드 및 세포를 튜브에 수집하고, 300g에서 5분 동안 원심 분리한 후, DPBS로 2회 세척하고, opti-mem에서 $1-3 \times 10^8$ 개/ml의 세포 밀도로 재현탁하였다. 필요한 cas9/gRNA의 양을 세포 밀도 (각각 30 μ g/ml)를 기준으로 계산하였다. Cas9 및 gRNA를 1:1 혼합하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 전기천공 완충액으로 옮겨 4D-뉴클레오택터 시스템 N (론자) 시스템에 의한 전기천공을 위해 세포와 추가로 혼합하였다. 그 후, 세포를 예열된 배지에서 $1-2 \times 10^6$ 개/ml의 밀도로 재현탁하고, 플레이트로 옮긴 후, 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.

[0281] 렌티바이러스 형질감염

[0282] 전기천공 1일 후, 세포를 2-8의 MOI에서 렌티바이러스 벡터에 의해 형질감염시키고, 플라스크로 옮기고, 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

- [0283] 세포 증식 및 CAR 양성 비율의 검출
- [0284] 형질감염 3일 후, 세포 수 및 CAR 양성 세포를 검출하고, T 세포에서 CAR의 양성 비율을 계산하였다. 녹아웃 효율을 결정하기 위해 CD3 및 PD1의 양성 비율을 또한 검출하였다. 그 후, 세포를 인큐베이터에서 연속적으로 배양하고, 배지의 절반을 2-3일마다 세포가 동결보존을 위해 준비가 된 14일차까지 대체하였다. 예시적인 워크플로우는 도 2에 나타낸다.
- [0285] 도 3은 특정된 마커가 있거나 없는 이중-CAR을 발현하는 조작된 면역 세포 또는 대조군 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. 예를 들어, CD3은 내인성 TCR 녹아웃 효율을 나타내는 마커일 수 있고, 3CAR (CD3을 표적화하는 CAR)은 CD3을 표적화하는 CAR-T 세포를 나타내는 마커일 수 있고, 19CAR (CD19를 표적화하는 CAR)은 CD19를 표적화하는 CAR-T 세포를 나타내는 마커일 수 있고, EGFR은 EGFRt를 발현하는 CAR-T를 나타내는 마커일 수 있다. 도 4는 특정된 마커가 있거나 없는 이중-CAR을 발현하는 조작된 면역 세포 또는 대조군 세포의 분획의 또 다른 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. 도 4에서, CD19를 표적화하는 CAR은 모노클로날 항체 FMC63의 scFv이고, CD3을 표적화하는 CAR은 모노클로날 항체 OKT3 또는 UCHT1의 scFv였다. 결과는 EGFR 및 CAR의 양성 비율 및 CD3의 음성 비율이 제조된 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T 세포에서 높았음을 보여주며, 이는 안전 스위치 (예를 들어, EGFRt)를 갖는 유전자 녹아웃 이중 CAR-T 세포 (예를 들어, 병렬-EGFRt)가 성공적으로 제조되었음을 나타낸다.
- [0286] 1.4 시토크인의 방출
- [0287] 실시예 1.3에서 제조된 이중 CAR-T 세포 및 CD19 양성 종양 세포 (Raji), CD3 양성 종양 세포 (Jurkat) 또는 1차 동종 PBMC (각각 100ul)를 각 세포에 대해 1×10^6 개/ml의 밀도로 1:1 비율로 RPMI 배지에서 혼합한 후, 96-웰 플레이트에서 밤새 배양하였다. 그 후, 배지를 수집하고, 원심분리하고, 방출된 시토크인 IFN- γ 및 IL-2를 시토크인 비드 어레이 키트 (CBA 키트, 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences))에 의해 검출하였다.
- [0288] 결과는 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T 세포를 Raji, Jurkat 또는 1차 동종 PBMC와 함께 공동-인큐베이션하는 것이 다량의 IFN- γ 및 IL-2를 생성하였음을 보여주며, 이는 CD19 양성 또는 CD3 양성 표적 세포에 대한 CAR-T의 기능을 나타낸다.
- [0289] 1.5 시험관내 사멸 활성
- [0290] 루시페라제 유전자를 표적 세포에 도입한 후 스크리닝함으로써 안정적으로 형질감염된 세포주를 수득하였다. 플루오레세인을 첨가한 후, 루시페라제는 플루오레세인과 반응하여 형광을 생성할 수 있었다. 형광 강도를 검출함으로써, 루시페라제의 활성을 측정할 수 있고, 세포의 생존을 검출하여 CART 세포의 사멸 효과를 평가할 수 있다.
- [0291] 도 5A는 각각 6시간 및 24시간 동안 1:1 E:T (이펙터 CAR-T 세포 대 표적 암 세포) 비율로 CD19+ NALM6-Luc 세포 및 CD3+ Jurkat-Luc 세포에 대한, 모노클로날 항체 OKT3 또는 UCHT1의 scFv를 갖는 CD3을 표적화하는 CAR-T 세포, CD19 및 CD3을 표적화하는 이중-특이적 CAR-T 세포 (para193-O 및 para193-U), 내인성 TCR 녹아웃된 CD19 CAR (TCR KO CD19 CAR), 및 내인성 TCR 녹아웃된 T 세포 대조군 (TCR KO T 세포 대조군)을 포함하는, CAR-T 세포의 세포독성의 막대 그래프를 보여준다. 도 5B는 1:1 E:T 비율로 Jurkat 세포 및 CAR-T 세포의 공동 배양의 1일차부터 3일차까지 측정된 Jurkat 세포에 대한 CAR-T 세포의 세포독성을 보여준다. 도 5C는 1:1 E:T 비율로 NALM6 세포 및 CAR-T 세포의 공동배양의 1일차부터 3일차까지 측정된 CD3을 발현하는 T 세포에 대한 CAR-T 세포의 세포독성을 보여준다.
- [0292] CD19 및 CD3을 표적화하는 이중-특이적 CAR-T 세포 (예를 들어, 모노클로날 항체 UCHT1: GC193-para-U로부터의 scFv와 병렬 형태의 이중-특이적 CAR-T 세포)의 세포독성을 또한 NALM6-LucG, Jurkat-LucG, Raji, 동종 NT 세포 (비처리된 T 세포), 및 자가 NT 세포에 대해 시험하였다. 도 6A는 상이한 이펙터 : 표적 비율에서 NALM6 세포에 대한 CAR-T 세포의 40시간 세포독성을 보여준다. 도 6B는 상이한 이펙터 : 표적 비율에서 Jurkat 세포에 대한 CAR-T 세포의 6시간 세포독성을 보여준다. 도 6C는 Jurkat, 동종 NT 세포, 자가 NT 세포, Raji 세포 및 NALM6 세포에 대한 CAR-T 세포의 40시간 세포독성을 보여준다. 도 7A는 NALM6 세포에 대한 병렬 또는 루프 형태의 이중-특이적 CAR-T 세포의 16시간 세포독성을 보여준다. CD19-CD3 이중-특이적 CAR-T 세포는 단일 CD19 CAR-T 세포와 비교가능한 항종양 효능을 나타내었다. 도 7B는 Jurkat 세포에 대한 병렬 또는 루프 형태의 이중-특이적 CAR-T 세포의 16시간 세포독성을 보여준다. CD19-CD3 이중-특이적 CAR-T 세포는 단일 CD3 CAR-T 세포와 비교가능한 항종양 효능을 나타내었다. 결과는 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T 세포가 Nalm6, Raji, Jurkat 및 1차 동종 PBMC를 유의하게 사멸시켰음을 보여주며, 이는 CD19-양성 또는 CD3-양성 표적 세포에 대한 CAR-T의 기능,

및 CD19+ 암 세포 및 CD3+ 킬러 T 세포를 모두 동시에 표적화하는 능력을 나타낸다.

[0293]

1.6 생체내 효능

[0294]

6-12주 NOD-Prkdcscid Il2rgnull (NPG) 마우스를 선택하고, 2×10^5 개 Raji-ffluc 세포 또는 Jurkat-ffluc 세포, 50 μ L DPBS 및 50 μ L 매트릭스 (코닝(Corning))를 복강내로 주사하였다. 2일 후, 마우스의 중앙 이식편 부담을 측정하고, 마우스를 중앙 부담에 기반하여 4개의 그룹으로 나누었다. 하루 후, 200 μ L DPBS, 5×10^6 개 NT 세포 및 5×10^6 개 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T 세포를 각 마우스에 각각 주사하였다. 마우스의 중앙 부담을 CAR-T 처리 7일 후 추가로 평가하였다. 그 후, 각 마우스에 4-분 반응 동안 3 mg d-루시페린을 복강내로 주사하고, 후속적으로 30초 노출로 제노겐(Xenogen) IVIS 이미징 시스템을 사용하여 사진을 촬영하였다.

[0295]

결과는 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T가 Raji-ffluc 및 Jurkat-ffluc 세포 둘 모두에 의한 중앙에 대해 NT 세포와 비교하여 중앙 부담을 유의하게 감소시켰음을 보여주며, 이는 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T가 생체내에서 CD19 양성 또는 CD3 양성 표적 세포를 제거할 수 있음을 나타낸다.

[0296]

1.7 생체내 GVHD 연구

[0297]

마우스를 먼저 치사-미만 용량의 방사선조사 (175 cGy)로 전신 처리하였다. 그 후, CAR-T 세포를 PBS에 재현탁하고, 처리된 마우스의 흉부에 주사하였다. 체중 감소, 아치형-등, 활동성, 모피 질감 및 피부 무결성을 포함하는 GVHD 임상 기준을 사용하여 마우스를 일주일에 2-3회 관찰하였다.

[0298]

결과는 TCR 녹아웃이 없는 마우스가 GVHD 증상을 보였으나, EGFRt-CD3-CD19 CAR-T+TCR 이중 녹아웃 그룹에서는 GVHD가 검출되지 않았음을 보여준다.

[0299]

도 66은 CD19 CAR-T 대 TCR KO CD19 CAR-T 세포를 비교하는 생체내 GvHD 연구를 보여준다. GvHD 반응을 비교하기 위해 2×10^7 CD19 CAR-T 또는 TCR KO CD19 CAR-T 세포를 각 Raji-중앙 보유 NOG 마우스에 주입하였다. CD19 CAR-T 그룹으로부터의 마우스는 TCR KO CAR-T 세포와 비교하여 중증 체중 감소 (>20%), 아치형-등, 주름진 모피, 및 조기 사망과 함께 유의한 CAR-T 확장을 나타내었다. 어떠한 TCR KO CD19 CAR-T 주입된 마우스에서도 GVHD가 검출되지 않았다.

[0300]

1.8 시험관내 HVG 연구

[0301]

EGFRt-CD3-CD19 CAR-T+TCR 녹아웃 및 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T+TCR/B2M 이중 녹아웃 세포를 NK 세포와 함께 밤새 1:1 인큐베이션하여 세포자멸 및 시토카인 방출 (IFN- γ)을 검출하였다.

[0302]

결과는 대조군과 비교하여, EGFRt-CD3-CD19 CAR-T+TCR 녹아웃 그룹이 거의 세포자멸을 갖지 않았고, 방출된 시토카인이 유의하게 적었음을 보여주며, 이는 본 개시내용의 생성물이 NK 세포에 의한 HVG 반응을 유발하지 않음을 나타낸다. 한편, TCR/B2M 이중 녹아웃 세포는 NK 세포에 의해 유의하게 사멸되었고 오래 생존할 수 없었다.

[0303]

HVG는 또한 HLA 무손상 CAR-T 세포에 대해 동종 T 세포를 유도할 수 있다. 도 6C는 이중 CAR-T 세포가 40시간 이내에 동종 T 세포를 표적화하여, 일반적으로 72시간이 걸리는 숙주 동종 T 세포에 의한 CAR-T 거부를 방지할 수 있음을 보여준다.

[0304]

1.9 EGFRt 유전자-매개 CAR-T 세포의 클리어런스

[0305]

NK 세포를 이펙터 세포로서 PBMC로부터 분리하고, 10 μ g/mL의 최종 농도로 세톡시맙과 함께 또는 없이 CD19-28z CART 또는 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T와 1:1 공동배양하였다. 4시간 및 24시간 후, CD3 및 CAR의 발현을 유동 세포 계측법에 의해 검출하였다.

[0306]

ADCC 백분율 = $(1 - \text{모노클로날 항체 그룹 CAR 양성 비율} / \text{무항체 그룹 CAR 양성 비율}) \times 100\%$

[0307]

결과는 4시간 및 24시간 후, 세톡시맙의 존재 하에, NK 세포가 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T 세포를 유의하게 제거하였지만, CD19-28z CART를 제거하지 못하였음을 보여준다. 세톡시맙 없이, NK는 세포를 사멸시키지 못하였다. 이는 세톡시맙이 EGFRt-CD3-CD19 CAR-T에 결합하는 안전 스위치로서 기능하고, NK가 ADCC 기능을 매개하여 CART 세포를 제거하도록 허용함을 나타낸다.

[0308]

실시에 2 TCR 녹아웃을 갖는 CAR19 및 인헨서를 발현하는 U-CAR-T 세포의 연구

[0309]

본 실시예에서, 5×10^5 개 Raji-루시페라제 세포를 피하 주사에 의해 NOG 마우스에 그래프팅하고 100 mm²에 도달할

때까지 성장시켰다. 1×10^6 개 야생형 또는 TCR KO CD19 CAR-T 세포를 Raji 그래프팅된 마우스에 정맥내로 주입하였다 (IV). 종양 부담을 실제 종양 크기의 캘리퍼스 측정에 의해 평가하였다. 말초혈에서의 CAR-T 세포 확장을 유동 세포계측법 분석에 의해 측정하였다. 도 8A는 CAR-T 처리 후 종양 부담을 보여준다. TCR 무손상 CD19 CAR-T 세포는 종양을 제거할 수 있었지만, TCR KO CD19 CAR-T는 Raji 종양 성장을 제어할 수 없었다. 둘 모두는 Raji 기반 종양 보유 모델이었지만, 피하 모델은 고형 종양을 생성하고, 정맥내 모델보다 종양을 제어하기 위한 CAR-T 세포 증식에 대한 훨씬 더 높은 요구사항을 갖는다. 도 8B는 말초혈에서의 CAR-T 증식을 보여준다. TCR KO CAR-T 세포는 WT CAR-T 세포와 비교하여 증식 결함을 나타내었으며, CAR-T 세포 확장의 피크는 WT 세포의 피크보다 훨씬 더 약하며, 이는 이들의 종양 제어 효과와 일치한다.

[0310] 도 9A-9C는 TCR 녹아웃을 갖는 CD19 CAR-T 세포의 증식을 보여준다. 도 9A는 NALM6 세포에 의한 반복된 자극 및 잔류 종양 세포의 측정의 실험 타임라인을 보여준다. 도 9B는 TCR 녹아웃이 없는 CD19 CAR-T 세포 및 TCR 녹아웃을 갖지만 인헨서의 발현이 없는 CD19 CAR-T 세포와 비교하여 TCR 녹아웃 및 상이한 인헨서의 발현을 갖는 CD19 CAR-T 세포의 증식 데이터를 보여준다. NALM6 세포의 첨가는 도 9A의 실험 타임라인에 따라 화살표로 표시된다. 도 9B는 도 9A의 실험 타임라인에 따라 표시된 날짜에 측정된 잔류 종양 세포의 양으로 표시된 바와 같은 다양한 CD19 CAR-T 세포의 제거 활성을 보여준다. NALM6 세포에 의한 여러 라운드 또는 반복된 자극 하에, TCR 녹아웃 및 C7R 또는 IL7을 갖는 CD19 CAR-T 세포는 본 실험에서 시험된 다른 세포와 비교하여 지속적인 확장 및 향상된 확장 능력을 나타내었다.

[0311] 도 10A 및 10B는 조작된 CAR-T 세포의 확장 능력을 비교하는 추가 증식 데이터를 보여준다. 도 10A는 인헨서의 발현이 없는 세포와 비교하여 TCR 녹아웃 및 2개의 상이한 인헨서 (C7R 및 IL2)를 갖는 CD19 CAR-T 세포의 증식 데이터를 보여준다. 결과는 NALM6 세포에 의한 여러 라운드 또는 반복된 자극 하에, TCR 녹아웃 및 C7R 또는 IL2를 갖는 CD19 CAR-T 세포가 어떠한 인헨서의 발현도 없는 세포와 비교하여 지속적인 확장 및 향상된 확장 능력을 나타내었음을 보여주었다. 도 10B는 인헨서의 발현이 없는 세포와 비교하여 TCR 녹아웃 및 2개의 상이한 인헨서 (C7R 및 mbIL15)를 갖는 CD7 CAR-T 세포의 증식 데이터를 보여준다. 결과는 CCRF-CEM 세포에 의한 여러 라운드 또는 반복된 자극 하에, TCR 녹아웃 및 C7R 또는 mbIL15를 갖는 CD7 CAR-T 세포가 어떠한 인헨서의 발현도 없는 세포와 비교하여 지속적인 확장 및 향상된 확장 능력을 나타내었음을 보여주었다. C7R의 발현을 갖는 세포는 mbIL15를 발현하는 세포보다 더 우수한 확장 능력을 나타내었다.

[0312] 도 11은 TCR KO CD19 CAR-T 세포에서 인헨서의 생체내 비교의 예를 보여준다. 본 실시예에서, 5×10^5 개 Raji-루시페라제 세포를 정맥내 (IV) 주사에 의해 NOG 마우스에 그래프팅하고, 5일 동안 성장시켰다. 인헨서가 있는/없는 TCR KO CD19 CAR-T 세포 (TCR 녹아웃을 갖는 CD19 CAR-T 세포) 뿐만 아니라 비히클 및 T 세포 대조군을 정맥내로 Raji 그래프팅된 마우스에 주입하였다 (IV). 종양 부담을 생물발광 강도 (BLI)에 의해 평가하였다. 인헨서 C7R, IL7을 발현하는 TCR KO CD19 CAR-T 세포는 인헨서의 발현이 없는 또는 mbIL15의 발현이 있는 세포 또는 다른 대조군 세포와 비교하여 더 우수한 종양 제어를 나타내었다. 도 12는 BLI에 의해 평가된 종양 부담을 나타내는 NOG 마우스의 상응하는 영상을 보여준다.

[0313] 실시예 3 TCR 및 CD 7 이중 녹아웃을 갖는 CAR7 및 인헨서를 발현하는 U-CAR-T 세포, 뿐만 아니라 TCR 및 CD 2 이중 녹아웃을 갖는 CD2 CAR 및 인헨서를 발현하는 U-CAR-T 세포의 연구

[0314] 일반 재료 및 방법

[0315] 공여자 혈액으로부터의 말초혈 단핵 세포 (PBMC)의 분리 및 T 세포의 확장

[0316] 밀도 구배 원심분리기를 통해 히스토페이크-1077 (시그마-알드리치)을 사용하여 공여자 혈액으로부터 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.

[0317] 세포주 및 T 세포의 배양

[0318] CCRF-CEM (T 림프모세포, ATCC® CCL-119™);

[0319] CCRF-CEM-luc 세포 (반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 CCRF-CEM 세포를 스크리닝함으로써 획득됨);

[0320] K562 세포 (인간 적백혈병 세포주, ATCC-CCL243);

[0321] 293T 세포 (ATCC-CRL3216);

- [0322] NK92 세포 (ATCC-CRL2407).
- [0323] CCRF-CEM-luc 세포주를 RPMI1640 배지에서 배양하고, 293T 세포를 DMEM 배지에서 배양하였다. RPMI1640 및 DMEM을 모두 10% (v/v) 소 태아 혈청 및 100U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM 글루타민 및 1 mM 피루브산 나트륨으로 보충하였다. 모든 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0324] NK92 세포를 10% (v/v) 소 태아 혈청, 2 mM 글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 1% NEAA, 0.1 mM 머캅토에탄올 및 200 IU/ml rhIL2로 보충된 RPMI1640 배지에서 배양하였다.
- [0325] T 세포 및 수득된 CAR-T 세포를 엑스-비보15 배지 (5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2 함유)에서 배양하였다. CAR-T 세포를 위한 배양 배지를 2일마다 300IU/ml의 최종 농도로 rhIL-2 (썬모피서 사이언티픽)로 추가로 보충하였다. 모든 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0326] 3.1 CRISPR의 설계 및 구축
- [0327] 웹사이트 <http://crispr.mit.edu>, www.idtdna.com 및 <https://www.synthego.com>에서 유전자 편집 효율 및 오프-타겟 위험을 평가한 후 유전자 편집을 위한 CD7 및 TCR gRNA를 선택하였다. 본 개시내용에서 사용된 gRNA 및 HiFi-Cas9 단백질을 인테그레이티드 DNA 테크놀로지스, 인크(Integrated DNA Technologies, Inc) (IDT)로부터 구입하였다.
- [0328] 유전자 편집을 위해, 3 µg Cas9 단백질 및 1.5 µg gRNA를 20 µl에 혼합하고, 37°C 또는 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 리보핵단백질 (RNP)을 형성하였다. 그 후, RNP를 론자 4D 뉴클레오펙터에 의해 T 세포에 형질 감염시켰다. 유전자 녹아웃 효율을 유동 세포계측법 (FACS)에 의해 검출된 바와 같은 단백질을 발현하는 세포의 비율에 의해 결정하였다.
- [0329] 본 발명자들의 이전 연구는 TRAC-gRNA1이 TCR에 대해 더 높은 녹아웃 효율을 갖는다는 것을 나타내었다 (서열은 서열식별번호: 20으로서 기재됨). CD7의 gRNA 및 TRAC-gRNA를 함께 사용하여 CD7 및 TCR을 동시에 녹아웃시켰을 때, 4개의 CD7-gRNA 중 3개가 고효율을 나타내었다 (도 16에 나타난 바와 같음). CD7을 녹아웃시키기 위해 gRNA로서 CD7-gRNA1 (서열식별번호: 34)을 선택하였다.
- TRAC-gRNA1: TTCGGAACCCAATCACTGAC, SEQ ID NO 20;
- [0330] CD7-gRNA1: GAGGTCAATGTCTACGGCTC, SEQ ID NO 25.
- [0331] CD2의 gDNA는 하기와 같이 설계되었고, CD2 gRNA2는 가장 높은 CD2 녹아웃 효율을 나타내었다 (도 65에 나타난 바와 같음).
- CD2-gRNA1: CAAAGAGATTACGAATGCCT
- CD2-gRNA2: GTGCCACAAAGACCATCAAG
- CD2-gRNA3: AGAGGGTCATCACACACAAG
- [0332] CD2-gRNA4: CTTGTAGATATCCTGATCAT
- [0333] 3.2 CAR 및 시토카인의 설계 및 바이러스의 패키지
- [0334] 키메라 항원 수용체 및 시토카인의 구조는 CAR7, CAR7-mb15 및 CAR7-C7R이다 (도 17에 나타난 바와 같음). 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 서열식별번호: 35-40으로서 기재되어 있다.

atggcactccctgtaactgcactcttttggcacttgctctgcacgcagcgcggccgacatcgactgacccagagc
cccgcacatcatgagcggcagcctggcgaggagatcacctgacctgcagcggcagcagcgtgagctacatgcactggtaccagc
agaagagcggcaccagcccaagctgctgatctacagcaccagcaacctggccagcggcgtgccagcaggttcagcggcagcggca
ggcgacacttctacagcctgacatcagcagcgtggagggcaggacggcggcactactactgcccacagtgagcagctacaccttc
ggcgggcgccaccaagctggagatcaagaggggcgggcgggcagcggcggcgggcagcggcgggcgggcagccaggtgaa
gctgcaggagagcggcgggcggtggtgaaagccggcgggcagcctgaagctgagctgcccggcagcggcttcaccttcagcagcta
cgccatgagctgggtgagcagacccccgagaagggtggagtggtggccaccatcagcagcggcgggcagctacacctactacc
cgacagcgtgaaggcgaggttcacatcagcaggggacaacgccaagaacacctgtacctgcagatgagcagcctgaggagcagga
caccgcatgtactactgcggcagcagggcgtactacccggctggttcgcaactggggccagggcaccaccgtgaccgtgagc
agctccggaacaacgacaccagcaccacggccacccactcctgctccgacaattgctctcagcccccttcccttcgacccgaagctgtc
ggcctgctgcgggaggagcgggtccacagcgcgggcttgacttcgcttgacatctacattgggcacccctggccgggacatgcggc
gtcttgcctcgtgagctggttataacgctgtattgtaagcaggtcggaagaagctttgtatatcttaaacagcccttatgagggccgtacaa
accacacaagaggaggtggtgctcatgacatctgaagaggagaggcggttgcaacttagagtaaatfcagccgctccgc
agatgcacctgcttataaacgggtcagaatcaattgtataatgaacttaatctcgggagggcgaggagtgatgctggtgacaagcgcag
ggggtcgagaccagagatggcggttaaccccgccgaaagaaccccgaggaggactgtataatgagctgcaaaaggacaaaatgg
cagaagcctattccgaaataggatgaaggagagcggcgcgaggtaaggacatgacggctttatcaaggcttagtactgcaacta
aggacacatgacgcgctgcatatgcagcgtctccacctagacgagctaaacgaggtcagggcgacgaacttagttgtgtaagc
aagctggggtgtagagaaaatccgggtcccatggattggacttgattttgtcctggttccgagcagcactgcgtccatagtaattgg
gtgaacgtaatagtgacttgaaaaaattgagaccttatacaaaagtatgcatacgtatgcaacactgtacacggagtcggcagctgacccc
aagctgcaaggtcaccgcaatgaaatgcttttgcctgaattgcaagttatctcactgagtcaggggacgttcaatccatgatactgtggag
aatgtgataatcctcggaacaatagccttagttcaaatggcaacgtcactgagtcaggctgcaaggatgtgaggaattggaagaaaaaa
tatcaaggaaattttgcaacttttgttcacatgttcagatgttcattaacactagtccggggcgggcagtgagggtggcggtagcggcggg
gggtggctctgggtggagggcgctctggggcggaagtctgcagataacatgccccccacatgagtggtgaacatgctgatatctgggtta
aatcttactccctttacagtcgagaaaggatcatttgaactccggctttaaagcgaagccgggactagttcactgactgaatgtgtattgaat
aaagcgacaaatgtcgacactgactaccccttccctcaaatgcattcgcatcctgccttgggtgcatcagcgaccagcaccgctcca
cggttaactaccgcaggagtaacaccgcagcccagagcctttcccccagcgaagagccggcgcatcctccccatcttcaataata
ccgcagctaccaccgcagcaatcgtaccggatcccagctgatgccagcaaaagtccgagtactggaacgactgaaatctccagtcac
gagcttctcatggaactccgagtcgaaactacagcaagaattgggagctgactgcttccgcttcacaccagccggcgtttatcctca
gggacactcagataccaggggtggcgattagcacaagcaccgtcctcgtgtgggctgagtgagtgacttctgcctgctacctaagt
ccagacagacaccccccttggcaagcgttgaaatggaagccatggaagccttgcctgtcacatgggggacttcatcccgcatgaagactt
ggagaactgctcacaccatctt

CAR7-mb15 (SEQ ID NO 38):

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCSSSSVSYMHW
YQKSGTSPKLLIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEADAADYYCHQWSSYT

[0336]

FGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY
 AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSED
 TAMYYCARQDGYYPGWFWANWGQTTVTVSSSGTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILF
 LVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQV
 ISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFI
 NTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICN
 SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPLSKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQP
 ESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAK
 NWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSQRQTPPLASVE
 MEAMEALPVTWGTSSRDELENCSHHL

CAR7-C7R (SEQ ID NO 39):

atggcactccctgtaactgcactcttttgcacttgccctgctcctgcacgcagcgcggccggacatcgagctgacccagagc
 cccgccatcatgagcgcagcctggcgaggagatcacctgacctgcagcgcagcagcagcgtgagctacatgcactggtaccagc
 agaagagcggcaccagccccaagctgctgatctacagcaccagcaactggccagcggcgtgccagcaggttcagcggcagcggca
 gcggcaccttctacagcctgaccatcagcagcgtggaggccgaggacgcccgcgactactactgccaccagtggagcagctacaccttc
 ggcgggcgccaccaagctggagatcaagagggcgcgcgcgagcggcgcgcgagcggcgcgcgagcggcgagccaggtgaa
 gctgcaggagagcggcgcgcgcgctggtgaagcccggcgcgagcctgaagctgagctgcggcgagcggcttcaccttcagcagcta
 cgccatgagctgggtgaggcagacccccgagaagggctggagtgggtggccaccatcagcagcggcgagcgtacacctactacc
 cgacagcgtgaaggcaggttcacatcagcagggacaacccaagaacacctgtacctgcagatgagcagcctgaggagcagga
 caccgccatgtactactgcggcaggcagggactactaccccgctggttcgcaactggggccagggcaccacgtgaccgtgagc
 agctccggaacaacgacaccagcaccacggccaccactcctgctccgacaattgcgtctcagcccctttcccttcgacccgaagctgtc
 gccctgctcgggaggagcgggtccacacgcgcgggcttgacttcgcttgcgacatctacatttgggcacccttggccgggacatgcggc
 gtctgtcctgagctggttataacgctgtattgtaagcaggtcggaaagcctttgtatatctttaacagcccttatgaggccgtacaa
 accacacaagaggaggtggtgctcatgcagatttctgaagaggagaggcggttgcgaacttagagtcaaatcagccgctccgc
 agatgcacctgcttataacagggtcagaatcaattgtataatgaacttaatctcgggagcgcgaggagtatgatgtgctggacaagcgac
 ggggtcgagaccagagatggcggttaaccccgccgaaagaacccccaggaggactgtataatgagctgcaaaaggacaaaatgg
 cagaagcctattccgaaataggatgaaggagagcggcgcgaggtgaaggacatgacggtctttatcaaggctttagtactgcaacta
 aggacacctatgacgcgctgcatatgcaggctctccacctagaggctcagcgcgacgaactttagtttgcgtaagcaagctgggatgt
 agaggaaaatccgggtcccatgttggtgcggcaggcgacgagcaggacctcgatgcccgaggctggacagccctgtgtctctct
 ctttgcttccatccgggtcatgagctcgcacaataatggtacggcaaccccggaactcccgaccaagggaaccttagtaacggttcaacca

[0337]

atgtgtcctatcaggagacaacaacccttctactctgggcagtagcagcttgcacccgtcagccaacacggcaacaggcaacaacta
 acatcacagagactacgggtcaagtttactagttacttccgtaatcacgtctgtgtacgggaatacaaatcatcagttcagagtaaacgtcag
 tatatctacagttctactactcccgcgaatgtatccaccaccagaaccaccctcaaaccttctttagtcaggaaatgttagcgattgtcaa
 cgacgagcagcagagtttggcgactagccaacgaaaccgtacacttccagcagtcaccatactgtccgacattaaggcagaaataaatgttct
 gggatcagggaggtcaagcttacgcaggggaatatgtcttgagcaaaaataagacgtcctcatgcgcagaattcaagaaagatcgcgcgaa
 ggtctggccagagtcctctgtggagagggagcagggcgatgctgacgcagggagcgcaggtttgtagtctcctgctcgcgcaagtgaagt
 agggcccaatgtcttctgtgtactggctaaccgaactgaaattagcagcaagcttcaactcatgaaaaaacaccagagtgatttgaaaaa
 ctgggatacttgacttcacggagcaagacgttgcgtctaccaatcctactcacagaaaacccgatactgttgacatgccccacatatca
 atcttgtcttctcagttgtggtcttctgtgatcttggcgtgcgtgctgtgaaaaaaaggattaaaccgatcgttggcctagtctgccgat
 cacaaaaagacactggagcacctctgcaagaagccacgaaaaaacctgaatgtgagctttaaccccgagtccttttggactgtcagataca
 ccgagtcgacgatatacaggcaagagatgaggttgagggttctctgcaagacacattcccgaacaactgagaatccgagaaacagc
 gccttgggtggagatgtccagtcctgaactgtccgagcagggacgtagtaattacccagaaagcttcggtcgagatagtagccttacgtgt
 ctgcccgggaacgtgtcagcgtgtgacgcgcctattcttcaagttcacgcagtttggactgtcgagaatcagggaaaaacggacctcacgt
 gtatcaggatctcctctcagcctgggcacgacaaacagtagcttgcctcctcgttttcctcgtcagtcaggtattctgacgtcaatccagtc
 gcacaagggaacctatctgacctcttgggttctaaccaggaagggcatacgtcactatgtccagcttctatcagaatcag

CAR-C7R (SEQ ID NO 40):

MALPVTALLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCSASSSVSYMHW
 YQQSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSTFYSLTISSVEADAADYYCHQWSSYT
 FGGGTKEIKRGGGSGGGSGGGGQVKLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSY
 AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSED
 TAMYCARQDGYYPGWFANWGQGTTVTVSSSGTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
 YQGLSTATKDYDALHMQALPPRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLVRRGARAGPR
 MPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGTFENVSTNVSYQETTTPTSLGSTSL
 HPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYGNNTSSVQSQTSVISTVFPTPANVSTPETT
 LKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKT
 SSAEFKKDRGEGLARVLCGEEQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLNRTEISS
 KLQLMKKHQSCLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKTPILLTCPTISILSFFSVALLVILACV
 LWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSNPESFLDCQIHRVDDIARDEVE
 GFLQDTPFQQLESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPI
 LSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNTSTLPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILSLG
 SNQEEAYVTMSSFYQNNQ

[0338]

[0339] 단일 또는 이중 CAR에 구축된 2개의 CD2 scFv의 아미노산 서열은 하기와 같다:

CD2 scFv1 VH:

QLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSETHYN
QKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTSVTVSS

CD2 scFv1 VL:

DIMMTQSPSSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKRL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTITSSVQPEDLAVYYCHQYLSSTFTGGGKLEIK
R

CD2 scFv2 VH:

QVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVNWVKQRPDQGLEWIGRIDP
YDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLTSDASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQ
GTLVTVSS

CD2 scFv2 VL:

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIDYLVHWYQQKSHESPRLLIKYASQSI
SGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELRR

[0340]

[0341] CAR 유전자를 EF1 α (EF-1 α)의 프로모터 하에 FuW 렌티바이러스 벡터 백본에 클로닝하여 FuW-EF1 α -CAR을 형성하였다. FuW-EF1 α -CAR, 렌티바이러스 외피 플라스미드 pMD2.G (애드진, 플라스미드 #12259) 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드 psPAX2 (애드진, 플라스미드 #12260)를 리포펙타민3000을 사용함으로써 293 T 세포에 형질감염하여 전체 렌티바이러스 발현 벡터를 제조하였다. 상청액을 48 및 72시간에 수집하고, 농축을 위해 초원심분리기 (머크 밀리포어)에 적용하였다.

[0342]

3.3 UCAR-T 세포의 제조

[0343]

전체 제조 과정은 도 15에 도시된다.

[0344]

세포 단리 및 활성화

[0345]

성분채집 후, 밀도 구배 원심분리를 통해 히스토페이크-1077 (시그마-알드리치)을 사용하여 단핵구를 단리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.

[0346]

5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2를 갖는 엑스-비보 15를 UCAR-T 세포 배지로서 사용하였다. 세포를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 인큐베이션하고 배양하였다.

[0347]

전기천공 및 렌티바이러스 감염

[0348]

T 세포 농축 및 활성화 2일 후, 항-CD3/항-CD28 자성 비드를 제거하고, 세포를 튜브에 수집하고, 300g에서 5분 동안 원심분리한 후, DPBS로 2회 세척하고, opti-mem에서 50×10^6 개/ml의 세포 밀도로 재현탁하였다. 필요한 cas9/gRNA RNP의 양을 세포 밀도를 기준으로 계산한 후, 세포와 혼합하고, 4D-뉴클레오펙터 시스템 N (론자) 시스템에 의한 전기천공을 위해 옮겼다. 그 후, 세포를 예열된 배지에서 2×10^6 개/ml의 밀도로 재현탁하였다. 세포를 2-8의 MOI에서 렌티바이러스 형질감염에 추가로 적용하고, 플라스크로 옮기고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 인큐베이터에서 배양하였다.

[0349]

세포 증식 및 CAR 양성 비율의 검출

[0350]

형질감염 3일 후, 세포 수 및 CAR 양성 세포를 검출하고, T 세포에서 CAR의 양성 비율을 계산하였다. 녹아웃 효율을 결정하기 위해 TCR (또는 CD3) 및 CD7의 양성 비율을 또한 검출하였다. 그 후, 세포를 인큐베이터에서 10일 동안 연속적으로 배양한 후, 세포는 동결보존을 위해 준비가 되었다.

[0351]

결과는 (도 18) CAR, IL15R α 또는 C7R (CD34)의 발현이 CAR7, CAR7-mb15 및 CAR7-C7R에 대해 유동 세포계측법에 의해 성공적으로 검출되었고, 양성 비율이 30% 초과였음을 보여준다. CD3/CD7의 음성 비율은 최대 약 98%였으며, 이는 TCR 녹아웃이 향상되고 범용 UCAR-T 세포가 성공적으로 제조되었음을 나타낸다.

[0352]

도 19에 나타낸 바와 같이, 외인성 IL-2를 제거한 후, CAR7의 pSTAT5 수준은 기저 수준으로 떨어졌다. 그러나,

외인성 IL2가 첨가된 CAR7-C7R T 세포 (CD34+ 세포) 또는 CAR7-T 세포에서 pSTAT5의 수준은 상당히 높은 수준이었으며, 이는 C7R의 발현 및 외인적으로 첨가된 IL-2가 모두 STAT5 신호전달 경로의 활성화를 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[0353] 3.4 시험관내 사멸 효과

[0354] 루시페라제 유전자를 표적 세포 CCRF-CEM에 도입한 후 스크리닝함으로써 안정적으로 형질감염된 CCRF-CEM-luc 세포주를 획득하였다. 플루오레세인을 첨가한 후, 루시페라제는 플루오레세인과 반응하여 형광을 생성할 수 있었다. 형광 강도를 검출함으로써, 루시페라제의 활성을 측정할 수 있고, 세포의 생존을 검출하여 UCAR-T 세포의 사멸 효과를 평가할 수 있다.

[0355] 실시예 3.3에서 제조된 UCAR-T 세포를 각 세포에 대해 1×10^6 개/ml의 밀도로 1:1 비율로 RPMI 배지에서 CD-7 양성 T 세포 CCRF-CEM-luc (각각 100u1)와 혼합한 후, 96-웰 플레이트에서 특정 기간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 수집하고, 원심분리하고, 시토카인 IFN- γ 및 IL-2를 시토카인 비드 어레이 키트 (CBA 키트, 비디 바이오사이언시스)에 의해 검출하였다. 또한, UCAR-T 세포의 사멸 효과를 검출하기 위해 플루오레세인 기질을 세포 배양물에 첨가하였다. 결과는 UCAR-T가 24시간 이내에 CCRF-CEM 종양에 대해 유의한 사멸 효과를 갖는다는 것을 보여준다 (도 20).

[0356] 동종 T 세포에 대한 UCAR-T의 사멸 효과: 동종 T 세포를 CFSE로 표지하고, 미리 결정된 기간 동안 CAR-T와 함께 인큐베이션하였다. 그 후, CFSE 양성 세포 수의 변화를 유동 세포계측법에 의해 분석하였다. 결과는 CAR-T 세포가 동종 T 세포를 24시간 이내에 효율적으로 사멸시켰으며, 이는 동종-T 세포 매개 HVG가 발생하는 시간보다 훨씬 더 짧으므로, CAR7이 동종 T 세포 사멸로부터 CAR-T 세포를 효과적으로 보호할 수 있음을 보여준다 (도 21).

[0357] NK 종양 세포주 (NK92)에 대한 UCAR-T의 24시간 사멸 효과: NK92를 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)로 표지하고, 미리 결정된 기간 동안 UCAR-T와 인큐베이션하였다. 그 후, CFSE 양성 세포 수의 변화를 유동 세포계측법에 의해 분석하여, NK92 종양 세포주에 대한 UCAR-T의 시험관내 사멸 효과를 계산하였다 (도 22).

[0358] 3.5 CAR-T 세포의 증식

[0359] IL-2를 CAR-T로부터 제거하였다. CAR-T 세포를 2주 동안 연속적으로 배양하고, 증식을 측정하기 위해 일주일에 2회 계수하였다.

[0360] 도 23A 및 23B의 결과는 CAR7-mb15 및 CAR7-C7R CAR-T 세포가 CAR7 CAR-T 세포보다 더 강한 증식 속도를 가졌고, IL-2의 부재 하에, 2주 이내에 여전히 더 높은 생존율을 가졌음을 보여준다. CAR7-C7R은 CAR7-mb15보다 더 우수한 생존을 나타내었다. 시험관내 사멸 검정은 UCAR-T 세포가 7시간 이내에 T-ALL 세포주 CCRF-CEM에 대해 우월한 사멸 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0361] 3.6 세포의 시험관내 재활성화

[0362] IL-2를 UCAR-T로부터 제거하였다. CCRF-CEM을 1:1 이펙터: 표적 비율로 일주일에 2회 첨가하고, 증식을 측정하기 위해 일주일에 2회 계수하였다.

[0363] 도 24A 및 24B는 CCRF-CEM을 첨가한 후, CAR7-mb15 및 CAR7-C7R UCAR-T 세포가 CAR7 UCAR-T보다 유의하게 더 강한 증식을 나타내었고, CAR7-C7R UCAR-T 세포가 CAR7-mb15 UCAR-T 세포보다 더 우수하게 증식하였음을 보여준다. 반복된 자극 후, UCAR-T 세포는 여전히 종양 세포를 제거하는 유의한 능력을 나타내었으며, 이는 반복된 항원 자극 후, 시토카인-관련 신호전달 경로 향상된 UCAR-T 세포가 더 높은 증식 속도를 갖고 더 우수하게 생존할 수 있음을 나타낸다.

[0364] 3.7 종양 보유 마우스에서 UCAR-T 세포의 증식 및 효능

[0365] 6-12주 NOD/Shi-scid/IL-2R γ null (NOG) 마우스를 선택하고, 2×10^6 개 CCRF-CEM-luc 세포를 복강내로 주사하였다. 2일 후, 마우스의 종양 이식편 부담을 측정하고, 마우스를 종양 부담에 기반하여 5개의 그룹으로 나누었다. 종양 착상 6일 후, 1×10^6 개 UCAR-T 또는 대조군을 각 마우스에 정맥내로 주사하고, 종양 부담을 1-2주마다 추가로 평가하였다. 각 마우스에 4-분 반응 동안 3 mg D-루시페린을 복강내로 주사한 후, 30초 노출로 제노젠 IVIS 이미징 시스템을 사용하여 사진을 촬영하였다 (BLI). 말초혈 중 UCAR-T 세포 수를 매주 계수하였다.

- [0366] 도 25는 CAR7-mb15 및 CAR7-C7R UCAR-T가 유의한 확장을 가졌고, CAR7 UCAR-T가 어떠한 유의한 확장도 나타내지 않았음을 보여준다. 도 26은 BLI 영상화의 결과를 보여주고, CAR7-mb15 및 CAR7-C7R UCAR-T 세포가 CAR7 UCAR-T 세포보다 종양 클리어런스에 대한 더 우수한 효과를 가졌음을 알 수 있다.
- [0367] 도 27은 비히클 대조군 또는 TCR 녹아웃을 갖고 인헨서의 발현이 있거나 없는 CAR7 UCAR-T 세포로 처리된 마우스의 BLI 영상을 보여준다. TCR 녹아웃 및 C7R 또는 mbIL15의 발현을 갖는 CAR7 UCAR-T 세포는 비히클 대조군 및 어떠한 인헨서의 발현도 없는 TCR KO CAR7 UCAR-T 세포와 비교하여 종양 클리어런스에 대한 더 우수한 효과를 나타내었다. C7R 발현 CAR7 세포는 mbIL15를 발현하는 것보다 더 우수한 종양 제어 및 마우스 생존을 나타내었다. 본원에 사용된 바와 같은 "CAR7", "CAR7 UCAR-T", 또는 "CD7 CAR-T"는 CD7을 표적화하는 CAR을 포함하는 조작된 CAR-T 세포를 나타내기 위해 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0368] 도 28A BLI 영상화는 종양 세포 제거에서 CD7 CAR-T 세포의 생체내 기능을 보여준다. 발현 C7R 또는 mbIL15를 갖는 TCR KO CD7 CAR-T 세포는 비히클 대조군 및 어떠한 인헨서의 발현도 없는 TCR KO CD7 CAR-T 세포와 비교하여 종양 클리어런스에 대한 더 우수한 생체내 효과를 나타내었다. 도 28B는 인헨서의 발현이 있거나 없는 TCR KO CD7 CAR-T 및 비히클 대조군으로 처리된 NOG 마우스의 동물 생존 데이터를 보여준다. 생존된 마우스의 백분율을 CAR-T 세포 주입 후 일수에 대해 측정하였다. C7R 또는 mbIL15의 발현을 갖는 TCR KO CD7 CAR-T로 처리된 마우스는 발현 인헨서가 없는 CAR-T 세포 또는 비히클 대조군으로 처리된 마우스와 비교하여 더 우수한 생존율을 가졌다. C7R 발현 CAR7 세포는 mbIL15를 발현하는 것보다 더 우수한 종양 제어 및 마우스 생존을 나타내었다.
- [0369] 도 55A는 CAR-T 세포의 확장 데이터를 보여준다. C7R을 발현하는 신선하게 제조된 CD7 CAR-T 세포를 IL2의 보충 또는 항원 자극이 없는 T 세포 배양 배지에서 배양하고, C7R 또는 임의의 인헨서 발현을 갖지 않는 대조군 세포와 비교하였고, C7R을 발현하는 CD7 CAR-T 세포는 더 우수한 확장을 유지하고 배양에서 지속되었다. 도 55B는 자극의 존재 하에 CAR-T 세포의 증식을 보여준다. CD7 CAR-T (또는 UCART7), mbIL15 또는 C7R을 발현하는 CD7 CAR-T를 CCRF-CEM (CD7+ T-ALL 세포)에 의해 반복적으로 자극하였다. C7R을 발현하는 CD7 CAR-T는 최고의 지속성 및 증식을 나타내었다. mbIL15/C7R을 발현하는 CD7 CAR-T는 항원 자극이 자극 라운드 6 (CC6)에서 제거되었을 때 증식을 중단하였다. 본원에 사용된 바와 같은 "CC"는 암 세포와의 공동배양을 나타낸다.
- [0370] 3.8 생체내 GVHD 연구
- [0371] 마우스를 먼저 치사-미만 용량의 방사선조사 (175 cGy)로 전신 처리하였다. 그 후, CAR-T 세포를 PBS에 재현탁하고, 처리된 마우스의 흉부에 주사하였다. 체중 감소, 아치형-등, 활동성, 모피 질감 및 피부 무결성을 포함하는 GVHD 임상 기준을 사용하여 마우스를 일주일에 2-3회 관찰하였다.
- [0372] 결과는 TCR 녹아웃이 없는 그룹의 마우스는 모두 GVHD 증상을 보였으나, TCR 녹아웃 그룹에서는 GVHD가 검출되지 않았음을 보여준다.
- [0373] 3.9 TCR 녹아웃의 효과
- [0374] 도 54A-C는 CAR-T 세포에서의 TCR 녹아웃의 효과를 보여준다. 조사관이 개시한 임상 시험에서, 메소텔린 CAR-T 세포에서의 TCR 발현은 TCR 관련 유해 사건을 회피하기 위해 손상되었다. 그러나, TCR KO CAR-T 세포는 예기치 않게 환자에게 주입 후 유의한 확장 결함을 보였다. 도 54A는 주입후 13일에 환자의 말초혈 CAR-T 세포에서 자가 메소텔린 (MSLN) CAR+ T 세포 (왼쪽) 및 CAR+ T 세포 (오른쪽)에서의 TCR KO 효율의 예를 보여준다. 도 54B는 자가 MSLN CAR-T 생성물에서의 TCR 파괴 효율이 고도로 효과적이었으며, 생성물에 5% 미만의 TCR+ 세포가 남아있음을 보여준다. 그러나, 환자에게 주입 후, 말초혈에서 검출된 CAR-T 세포의 대부분은 TCR+ 세포였다. 도 54C는 TCR+ 세포가 암 환자에서 TCR- 세포보다 40 내지 ~1000배 더 많은 확장을 나타내었음을 보여준다. 따라서, 동종 살해 세포로부터 세포 생존 및 확장 압력이 없는 자가 CAR-T 적용에서도, TCR 파괴는 CAR-T 세포 확장을 극적으로 손상시켰다.
- [0375] 3.10 구축물 설계의 서열

[0376] CD7CAR-mbIL15 구축물 설계: CD7CAR-mbIL15 아미노산 서열 (mbIL15=IgE 신호 펩티드 + IL15 + IL15R α)

MALPVTALLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCSASSSVSYMHW
YQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYT
FGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY
AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSED
TAMYYCARQDGYYPGWFWANWGQTTVTVSSSGTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEAC
RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAA
ATRVHSNWNVNISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES
GDASHIDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNKEFLQSFVHIVQMFINTSS
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFK
RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPELSLP
SGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWEL
TASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAM
EALPVTWGTSSRDEDLENCSSHL

[0377]

[0378] CD7CAR-C7R 구축물 설계: CD7CAR-C7R 아미노산 서열 (C7R=CD34 엑토도메인 + 구성적 활성 IL7R α)

MALPVTALLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCSASSSVSYMHW
YQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYT
FGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY
AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSED
TAMYYCARQDGYYPGWFWANWGQTTVTVSSSGTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEAC
RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLVRRGARAGPR
MPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTSTLGSTSL
HPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYGNNTSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETT
LKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIAEIKCSGIREVKLTQGCICLEQNKT
SSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQADADAGAQCVCALLAQSEVRPQCLLLVLNRTEISS
KLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKTPILLTCPTISILSFFSVALLVILACV
LWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVE
GFLQDFTFPQQLSESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPI
LSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPFSLQSGILTLNPVAQGGPILTSLG
SNQEEAYVTMSSFYQNNQ

[0379]

[0380] 실시예 4 안전 스위치와 함께 인헨서를 발현하는 U-CAR T 세포의 연구

[0381] 4.1 CAR의 설계 및 바이러스의 패키지

[0382] 카메라 항원 수용체의 구조는 하기와 같다:

[0383] 1) RQR8-CD19CAR-mbIL15;

[0384] 2) RQR8-CD19CAR-mbIL15-IL7;

[0385] 3) RQR8-CD19CAR-C7R;

[0386] 4) RQR8-CD19CAR-mbIL7;

[0387] 여기서 RQR8은 안전 스위치이고, CD19CAR 단편은 모노클로날 항체 FMC63의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (GS 링커에 의해 연결됨)이고, 또한 힌지 영역 및 막횡단 영역, 인간 CD 28 세포내 공동자극 요소, 및 인간 CD3 ζ 세포내 영역이 탠덤으로 포함되고; mbIL15은 IL15+IL15R α 로 탠덤으로 이루어지고; C7R은 CD34 세포의 도메인 및 IL7 수용체 막횡단 및 세포내 도메인으로 이루어진 구성적으로 활성화된 IL7 수용체이고; IL7은 IL7 신호 펩티드 및 성숙한 펩티드로 이루어지고; mbIL7은 IL7+IL7R α 로 탠덤으로 이루어진다. 본원에 기재된 구축물의 예는 도 29에 나타낸다.

[0388] RQR8의 아미노산 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 7):

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSP
AKPTTTACPYSNPSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD
[0389] FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

[0390] RQR8의 DNA 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 8):

ATGGGCACCTCTCTGCTGTGCTGGATGGCTCTGTGTCTGCTGGGCGCTGACC
ATGCTGATGCTTGCCCCATTCCAACCCCTCTCTGTGCTCCGGAGGAGGATCCG
AACTGCCTACCCAAGGCACCTTCAGCAACGTGTCCACCAACGTGAGCCCCGTAAG
CCTACCACCACCGCTTGCCCTTACTCCAATCCCAGCCTCTGCTCCGGAGGCGGAGGA
TCCCCGCCCCCAGACCTCCTACACCCGCTCCCACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCT
CTGAGACCCGAAGCTTGCAGACCCGCTGCCGGAGGAGCTGTGCATACAAGAGGACT
GGATTTCGCTTGCACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCTGGCACATGTGGCGTGCT
GCTGCTGTCTCTGGTCATTACACTGTACTGCAACCATAGAAATAGAAGAAGGGTGT
GCAAGTGTCCCAGACCCGTGGTGGGCAGCGGAGAAGGAAGAGGCTCTCTGCTGACA
[0391] TGCGGAGACGTGGAAGAGAACCCCGGCCCC

[0392] CD19CAR의 아미노산 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 9):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLN
WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL
PYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL
PDYGVSWIRQPQRKLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAADYKDDDDKIEVMYPPPYLDNE
KSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL
LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
[0393] RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0394] CD19CAR의 DNA 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 10):

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCAT
TCCTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTC
TGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTA
AATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATC
AAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATT
ATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAAC
AGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGC
TCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGT
GAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCA
CATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTGCCAGC
CTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATAC
TATAATTTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCA
AGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGC
CAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT
CAGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGCAGACTACAAAGACGATGACGACAAGATTGAA
GTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCAT
GTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCGCCGACCTTCTAAGCCCTTT
TGGGTGCTGGTGGTGGTGGGGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG
GCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGC
CCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
ACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
GGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0395]

[0396] mbIL15의 아미노산 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 11):

MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT
AMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSF
VHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADJWVKSYSLY
SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAIVHQRAPPSTVTT
AGVTPOPELSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPSTGTTEISSHESHGT
PSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPOGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQT
PPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDELENCSHHL

[0397]

[0398] mbIL15의 아미노산 서열에서, 밑줄친 부분은 신호 펩티드 영역이고, 이탤릭체 부분은 IL-15이고, 굵은 부분은 연결 영역이고, 점선 밑줄친 부분은 IL-15 수용체 α이다.

[0399] mbIL15의 DNA 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 12):

ATGGATTGGACTTGGATTTTGTTCCTCGTTGCCGACGCGACTCGCGTCCATA
GTAATTGGGTGAACGTAATTAGTGACTTGAAAAAATTGAGGACCTTATACAAAGT
ATGCATATCGATGCAACACTGTACACGGAGTCCGACGTGCACCCAAGCTGCAAGGT
CACCGCAATGAAATGCTTTTTGCTCGAATTGCAAGTTATCTCACTTGAGTCAGGGGA
CGCTTCAATCCATGATACTGTGGAGAATTTGATAATCCTGGCGAACAATAGCCTTAG
TTCAAATGGCAACGTCCTGAGTCAGGCTGCAAGGAATGTGAGGAATTGGAAGAAA
AAAATATCAAGGAATTTTGTCAATCTTTTGTTCACATAGTTCAGATGTTTATTAACA
CTAGTTCCGGGGGCGGCAGTGGAGGTGGCGGTAGCGGCGGGGGTGGCTCTGGTGGGA
GGCGGCTCTGGGGGCGGAAGTCTGCAGATAACATGCCCCCACCTATGAGTGTTGA
ACATGCTGATATCTGGGTAAATCTTACTCCCTTTACAGTCGAGAAAGGTACATTTG
CAACTCCGGCTTTAAACGCAAAGCCGGGACTAGTTCACTGACTGAATGTGTATTGA
ATAAAGCGACAAATGTCGCACACTGGACTACCCCTTCCCTCAAATGCATTCGCGATC
CTGCCCTTGGTGCATCAGCGACCAGCACCGCCGTCCACGGTAACTACCGCAGGAGTA
ACACCGCAGCCCCGAGAGCCTTTCCCCCTCAGGCAAAGAGCCGGCCGCATCCTCCCC
ATCTTCCAATAATACCGCAGCTACCACCGCAGCAATCGTACCCGGGTCCCAGCTGAT
GCCCAGCAAAAGTCCGAGTACTGGAACGACTGAAATCTCCAGTCACGAGTCTTCTC
ATGGAACCTCCGAGTCAAACCTACAGCAAAGAATTGGGAGCTGACTGCTTCCGCTTCA
CACCAGCCGCCAGGCGTTTATCCTCAGGGACACTCAGATACCACGGTGGCGATTAG
CACAAGCACCGTCTCTGTGTGGGCTGAGTGCAGTGTCACTTCTCGCCTGCTACCT
TAAGTCCAGACAGACACCCCTTTGGCAAGCGTTGAAATGGAAGCCATGGAAGCCT
TGCCTGTCACATGGGGGACTTCATCCCGCGATGAAGACTTGGAGAACTGCTCACAC
CATCTTTGA

[0400]

[0401] IL7의 아미노산 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 13):

MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDSMKEI
GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTIL
LNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLQEIKTCWNKILM
GTKEH

[0402]

[0403] IL7의 DNA 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 14):

GAATTCGGCAGCGGCGTCAAGCAGACACTGAACTTCGATCTGCTGAAGCTG
GCCGGAGACGTCGAGAGCAACCCCGGCCCTATGTTCCACGTGAGCTTTAGATACAT
CTTCGGACTGCCCCCTCTGATTCTGGTGTCTGCTGCCCGTGGCCAGCAGCGACTGCGA
TATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTATGAGTCCGTGCTGATGGTCTCCATCGATC
AGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAAC
TTTTTCAAGAGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTTCTGTTTAGAGCC
GCTAGAAAGCTGAGGCAGTTTCTGAAGATGAACAGCACCGGCGACTTTGATCTGCA
TCTGCTGAAAGTGAGCGAGGGCACCACTTCTGCTGAACTGCACCGGCCAAGTGA
AAGGAAGAAAGCCCCGCGCTCTGGGCGAGGCTCAGCCTACCAAGTCTCTGGAAGAG
AACAACTCTCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTCAACGATCTGTGCTTCTCAAGAGGCT
GCTGCAAGAGATCAAGACATGCTGGAACAAGATCCTCATGGGCACCAAGGAACACT
G

[0404]

[0405] C7R의 아미노산 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 15):

MLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGTFSNVS
TNVSYQETTTSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQT
SVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCS
GIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQADADAGAQVCSLLLAQS
EVRPQCLLLVLNRTEISSKLQLMKKHQSDLKKGILDFTTEQDVASHQSYSQKT*PILLTC*
*PTISILSFFSVALLVIL*ACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNLVSNPESFL
 DCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTPPQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDEVVITPESFGRD
 SSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNTSLPPFSLQSGI
 LTLNPVAQGGPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ.

[0406]

[0407] 구성적으로 활성화된 IL-7 수용체 (C7R)의 아미노산 서열에서, 밑줄친 부분은 CD34 세포의 영역이고, 이탤릭체 부분은 IL-7 수용체 α 막횡단 영역이고, 굵은 부분은 IL-7 수용체 α 세포내 영역이다.

[0408] C7R의 DNA 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 16):

GGAAGCGGCGCCACAACTTTTCTCTGCTGAAGCAAGCCGGCGACGTCGAA
 GAGAACCCCGGCCCTATGCTGGTGAGGAGAGGCGCTAGGGCTGGACCCAGAATGCC
 CAGAGGCTGGACCGCTCTGTGTCTGCTGTCTCTGCTGCCAGCGGCTTCATGAGCCT
 CGATAATAACGGCACCGCTACCCCCGAGCTGCCACACAAGGCACCTTCTCCAATG
 TGAGCACCAACGTGTCTACCAAGAGACCACCACCCCTTCCACACTGGGAAGCACA
 TCTCTGCATCCCGTCTCCCAGCACGGCAATGAAGCCACCACAAACATCACCGAGAC
 CACCGTGAAGTTACACAGCACCTCCGTCATTACCAGCGTGTACGGCAACACCAATA
 GCTCCGTGCAAAGCCAGACATCCGTGATTTCACCGTGTTTACCACCCCCGCCAATG

[0409]

TCAGCACACCCGAGACAACACTGAAACCTTCTCTGTCCCCCGGAAACGTGAGCGAT
 CTGAGCACAACCAGCACCAGCCTCGCCACCAGCCCCACAAAGCCTTACACAAGCAG
 CAGCCCCATTCTGAGCGACATCAAGGCCGAAATCAAGTGCTCCGGAATTAGAGAGG
 TCAAGCTGACCAAGGAATCTGTCTGGAGCAGAATAAGACCAGCAGCTGCGCCGAG
 TTCAAGAAAGACAGAGGCGAAGGACTGGCCAGAGTGCTCTGCGGCGAGGAACAAG
 CCGATGCCGATGCCGGAGCTCAAGTGTGCAGCCTCCTCCTCGCTCAGAGCGAGGTC
 AGACCCCAATGTCTGCTGCTCGTGCTGGCCAATAGGACCGAGATCTCCTCCAACTG
 CAGCTGATGAAGAAGCACCAGAGCGACCTCAAGAAGCTCGGCATCCTCGACTTTAC
 CGAGCAAGACGTGGCCTCCCATCAATCCTATAGCCAGAAGACCCCCATTCTGCTGA
 CATGTCCCAACATCAGCATCCTCAGCTTCTTCAGCGTCGCTCTGCTCGTCATTCTGGC
 TTGTGTGCTGTGGAAGAAGAGGATCAAGCCTATTGTGTGGCCCTCTCTGCCCCACCA
 CAAGAAGACCCTCGAACACCTCTGCAAGAAACCTAGAAAGAACCTCAACGTGAGCT
 TCAACCCCGAGTCCTTTCTGGACTGTCAAATCCATAGGGTGGATGACATCCAAGCTA
 GAGACGAGGTCGAGGGCTTTCTGCAAGACACCTTCCCTCAGCAGCTGGAAGAAAGC
 GAGAAGCAAAGACTGGGCGGAGATGTGCAGTCCCCTAATTGCCCCCTCCGAGGACGT
 GGTGATTACCCCCGAGAGCTTCGGAAGAGACAGCTCTCTGACATGTCTGGCCGGAA
 ATGTGTCCGCTTGCGATGCCCTATTCTGAGCAGCTCCAGATCTCTGGACTGCAGAG
 AGTCCGGAAGAACGGCCCTCATGTGTACCAAGATCTGCTGCTGTCTCTGGGAACC
 ACAAACCTCCACACTGCCTCCCCCTTTAGCCTCCAGTCCGGCATTCTGACACTGAAC
 CCCGTGGCTCAAGGCCAACCTATCCTCACATCCCTCGGCTCCAATCAAGAGGAAGC
 CTACGTGACCATGAGCTCCTTCTATCAGAACCAGTGA

[0410]

[0411] mbIL7의 아미노산 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 17):

MALPVTALLPLALLLHAARPDCDIEGKDGKQYESVLMV'SIDQLDSMKEIGSNC
LNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQV
KGRKPAALGEAOPKTSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEHGGSG
GGSGGGSGGGSGGGSGGGSESGYAQNQDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNNGSQHSLTCAFE
DPDVNITNLEFEICGALVEVKCLNFRKLOEIYFIETKKFLLIGKSNICVKVGEKSLTCKKI
DLTTIVKPEAPFDLSVYVYREGANDFVVTFTNTSHLOKKYVYKVLMDVAVYRQEKDENKW
THVNLSSTKLTLLQRKLOPAAMYEEKVRSIPDHYFKGFWESEWSPSYFRTPPEINNSSGE
MDPILLTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSE
NPESFLDCQIHRVDDIARDEVEGFLQDTFPQOLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDDVVTIP
ESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDILLSLGTTNSTLPPPF
SLQSGILTLPVAAQGPILTSLGSGNQEEAYVTMSSEFYQNQ

[0412]

[0413] mbIL7의 아미노산 서열에서, 밑줄친 부분은 신호 펩티드 영역이고, 이탤릭체 부분은 IL-7이고, 굵은 부분은 연결 영역이고, 점선 밑줄친 부분은 IL-7 수용체 α 이다.

[0414] mbIL7의 DNA 서열은 하기 기재된 바와 같다 (서열식별번호: 18):

ATGGCTCTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTTCTGCATGC
CGCCAGACCTGACTGTGACATCGAGGGCAAAGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTG
CTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAAATCGGCAGCAACTG
CCTGAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGAAG
GCATGTTCTGTTCAGAGCCGCCAGAAAGCTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACAGC
ACCGGCGACTTCGACCTGCATCTGCTGAAAGTGTCTGAGGGCACCACTCCTGCTG
AATTGCACCGGCCAAGTGAAGGGCAGAAAGCCTGCTGCTCTGGGAGAAGCCCAGCC
TACCAAGAGCCTGGAAGAGAACAAGTCCCTGAAAGAGCAGAAGAAGCTGAACGAC
CTCTGCTTCTGAAGCGGTGCTGCAAGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCT
GATGGGCACCAAAGAGCACGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGCGGAGGC
GGTAGCGGTGGCGGAGGAAGTGGTGGCGGATCTGAATCTGGCTACGCCCAGAACG
GCGACCTGGAAGATGCCGAGCTGGACGACTACAGCTTCAGCTGCTACAGCCAGCTG
GAAGTGAACGGCAGCCAGCACTCTCTGACCTGCGCCTTTGAAGATCCCGACGTGAA
CATCACCAACCTTGAGTTCGAGATTGTGGCGCCCTGGTGAAGTCAAGTGCCTGA
ATTTCCGGAAGCTGCAAGAAATCTACTTTATCGAGACAAAGAAGTTCCTGCTGATC
GGCAAGAGCAACATCTGTGTGAAAGTGGGCGAGAAAAGCCTGACCTGCAAGAAGA
TCGACCTGACCACCATCGTGAAGCCCCGAGGCTCCTTTGATCTGAGCGTGGTGTATA
GAGAGGGCGCCAACGACTTCGTGGTACCTTCAACACCAGCCACCTCCAAAAGAAA
TACGTGAAGGTGCTGATGCACGACGTGGCCTACCGGCAAGAGAAGGACGAGAACA
AATGGACCCACGTGAACCTGAGCAGCACCAAGCTGACCCTGCTGCAGAGAAAAGTG
CAGCCTGCCGCTATGTACGAGATCAAAGTGCAGGAGCATCCCCGACCACTACTTTAA
AGGCTTTTGGAGCGAGTGGTCCCTAGCTACTACTTCAGAACCCCTGAGATCAACA
ACTCCAGCGGCGAGATGGACCCATTCTGCTGACAATCAGCATCCTGAGCTTTTCA
GCGTGGCCCTGCTGGTCATCCTGGCCTGTGTGCTGTGGAAGAAGCGGATCAAGCCC
ATCGTGTGGCCAGCCTGCCTGACCACAAGAAAACCCTGGAACACCTGTGCAAGAA
GCCCCGAAAAACCTGAACGTGTCTTCAATCCCGAGAGCTTCTGGACTGCCAGA
TCCACAGAGTGGACGACATCCAGGCCAGGGACGAAGTGAAGGATTTCTGCAGGA
CACATTCCCTCAGCAGCTCGAAGAGAGCGAGAAGCAAAAGACTCGGAGGCGACGTG
CAGAGCCCTAATTGCCCTTCTGAGGACGTGGTCATACCCCAGAGAGCTTCGGCAG
AGATAGCAGCCTGACATGTCTGGCCGGCAATGTGTCCGCTGTGATGCCCTATCCT

[0415]

GTCCTCTAGCAGAAGCCTGGATTGCAGAGAGAGCGGCAAGAACGGCCCTCACGTGT
ACCAGGATCTGCTCCTGTCTCTGGGCACCACAAACAGCACACTGCCTCCACCATTCA
GCCTGCAGAGCGGCATCCTGACACTGAACCCTGTTGCTCAGGGCCAGCCTATCCTG
ACAAGCCTGGGCAGCAATCAAGAAGAGGCCTACGTCACCATGAGCAGCTTCTACCA
GAACCAG

[0416]

[0417]

상기 CAR 유전자를 EF1 α (EF-1 α)의 프로모터 하에 Fuw 렌티바이러스 벡터 백본에 클로닝하여 Fuw-EF1 α -CAR을 형성하였다. Fuw-EF1 α -CAR, 렌티바이러스 외피 플라스미드 pMD2.G (애드진, 플라스미드 #12259) 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드 psPAX2 (애드진, 플라스미드 #12260)를 리포펙타민3000을 사용함으로써 293 T 세포에 형질감염하여 전체 렌티바이러스 발현 벡터를 제조하였다. 상청액을 48 및 72시간에 수집하고, 농축을 위해 초원심분리기 (마크 밀리포어)에 적용하였다. 농축된 바이러스를 T 세포의 형질감염을 위해 준비하였다.

[0418]

결과는 RQR8, CAR, IL15Ra 또는 C7R의 발현이 RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R 세포에 대해 유동 세포계측법에 의해 성공적으로 검출되었고; IL-7의 분비가 ELISA에 의해 검출되었음을 보여준다. 렌티바이러스 벡터가 성공적으로 구축되었다. 모든 구조는 서로 간섭 없이 동시에 발현될 수 있었다.

[0419]

4.2 CRISPR의 설계 및 구축

[0420]

먼저, TCR 보존된 영역의 엑손을 표적화하는 gRNA 서열은 <http://crispr.mit.edu>에서 설계되었으며, 더 높은 녹아웃 효율을 위해 80 초과점의 점수를 갖는 2개의 gRNA 서열을 선택하였다. gRNA 프라이머의 경우, 정방향 프라이머는 T7 프로모터 다음에 20 bp의 표적 서열을 포함하고, 역방향 프라이머는 20 bp의 상보적 서열을 갖는다. 플라스미드를 PCR 주형으로서 사용하였다. 정제 후, T7-PCR 생성물을 MEGashortscript T7 키트에 대한 주형으로서 추가로 사용하여 RNA를 수득하였다. RNA를 MEGAclean 컬럼으로 정제하고 RNA-무함유 물로 용출하였다. Cas9 플라스미드를 애드진으로부터 구입하였다.

[0421]

gRNA 표적화 서열은 하기와 같다:

[0422]

TRAC-gRNA: TGTGCTAGACATGAGGTCTA, 서열식별번호: 5

[0423]

한편, gRNA의 녹아웃 효율을 T7E1, TIDE 및 유동 세포계측법에 의해 분석하였다.

[0424]

결과는 TCR 유전자가 90% 초과점의 녹아웃 효율로 성공적으로 녹아웃되었음을 보여준다.

[0425]

4.3 CAR-T 세포의 제조

[0426]

세포 단리 및 활성화

[0427]

성분채집 후, 밀도 구배 원심분리를 통해 히스토페이크-1077 (시그마-알드리치)을 사용하여 단핵구를 단리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.

[0428]

5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2를 갖는 엑스-비보 15를 CAR-T 세포 배지로 사용하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하고 배양하였다.

[0429]

CD 19를 발현하는 세포주: Raji (버킷 림프종 세포주, ATCC-CCL86); K562 세포 (인간 적백혈병 세포주, ATCC-CCL243); Raji-ffluc 세포주는 반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 Raji 세포를 스크리닝함으로써 수득됨;

[0430]

모든 세포를 RPMI1640 배지에서 배양하고, 293T 세포 (ATCC-CRL3216)를 DMEM 배지에서 배양하였다. RPMI1640 및 DMEM을 모두 10% (v/v) 소 태아 혈청 및 100U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM 글루타민 및 1 mM 피루브산나트륨으로 보충하였다.

[0431]

전기천공

[0432]

T 세포 농축 및 활성화 2일 후, 항-CD3/항-CD28 자성 비드를 제거하고, 세포를 튜브에 수집하였다. Cas9 및 gRNA를 필요에 따라 혼합하고, 실온에서 인큐베이션한 후, 전기천공 완충액으로 옮겨 4D-뉴클레오펙터 시스템 N (론자) 시스템에 의한 전기천공을 위해 세포와 추가로 혼합하였다. 그 후, 세포를 예열된 배지에서 $1-2 \times 10^6$ 개/ml의 밀도로 재현탁하고, 플레이트로 옮기고 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.

- [0433] 렌티바이러스 형질감염
- [0434] 전기천공 1일 후, 세포를 2-8의 MOI에서 렌티바이러스 벡터에 의해 형질감염시키고, 플라스크로 옮기고, 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다.
- [0435] 세포 증식 및 CAR 양성 비율의 검출
- [0436] 형질감염 3일 후, 세포 수 및 CAR 양성 세포를 검출하고, T 세포에서 CAR의 양성 비율을 계산하였다. 녹아웃 효율을 결정하기 위해 CD3의 양성 비율을 또한 검출하였다. 그 후, 세포를 인큐베이터에서 연속적으로 배양하고, 배지의 절반을 2-3일마다 세포가 동결보존을 위해 준비가 된 14일차까지 대체하였다.
- [0437] 결과는 RQR8, CAR, IL15Ra 또는 C7R의 발현이 RQR8-CD19CAR-mbIL15, RQR8-CD19CAR-mbIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T에 대해 유동 세포계측법에 의해 성공적으로 검출되었고; IL-7의 분비가 ELISA에 의해 검출되었음을 보여준다. CD3 음성 비율은 90% 초과였으며, 이는 향상된 시토카인-관련 신호전달 경로 및 안전 스위치를 갖는 TCR 녹아웃 CAR-T가 성공적으로 구축되었고, 요소가 각각 서로 간섭하지 않음을 나타낸다.
- [0438] 4.4 시토카인의 방출
- [0439] 실시예 3에서 제조된 CAR-T 세포 및 CD19 양성 종양 세포 (Raji, NALM6) (각각 100u1)를 각 세포에 대해 1×10^6 개/ml의 밀도로 1:1 비율로 RPMI 배지에서 혼합한 후, 96-웰 플레이트에서 밤새 배양하였다. 배지를 수집하고, 원심분리하고, 방출된 시토카인 IFN- γ 및 IL-2를 시토카인 비드 어레이 키트 (CBA 키트, 비디 바이오사이언시스)에 의해 검출하였다.
- [0440] 결과는 Raji, NALM6과 함께 RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T 세포의 인큐베이션이 다량의 IFN- γ 및 IL-2를 생성하였음을 보여주며, 이는 CD19 양성 표적 세포에 대한 시토카인-관련 신호전달 경로 향상된 CART의 기능, 및 시토카인-관련 신호전달 경로 향상된 CART에 의한 시토카인의 분비가 종래 CAR-T와 비교하여 증가되었음을 나타낸다.
- [0441] 4.5 표적 세포와 CAR-T 세포의 공동배양 후 CD107a의 발현
- [0442] 2×10^5 개 CAR-T/NT 세포 및 2×10^5 개 표적 세포 (Raji, NALM6)/대조군 세포 (K562)를 v-바닥 96 웰 플레이트에 첨가하고, IL-2가 없는 200 μ l 엑스-비보 완전 배지에 재현탁하였다. 1 μ l 비디 골지스탑(BD GolgiStop) (모넨 함유)을 각 1 ml 배지에 첨가하고, 2 μ l CD107a 항체 (1:50)를 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 세포를 37℃에서 4시간 동안 배양하고, 추가로 수집하였다.
- [0443] 샘플을 원심분리하여 배지를 제거하고, PBS로 1회 세척한 후, 400g, 4℃에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 특이적 표면 항체 CAR, CD3, CD4 및 CD8을 각 튜브에 첨가하였다. 그 후, 세포를 100 μ l에 재현탁하고, 암소에서 30분 동안 얼음 위에 두었다.
- [0444] 각 튜브를 3 mL PBS로 1회 세척한 후, 샘플을 400g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 조심스럽게 제거하고, 펠릿을 PBS에 재현탁하였다. CAR, CD3, CD4, CD8, 및 CD107a를 유동 세포계측법에 의해 검출하였다.
- [0445] 결과는 Raji, NALM6과 함께 RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T 세포의 인큐베이션이 다량의 CD107a를 생성하였음을 보여주고, 이는 시험관내 CD19 양성 표적 세포에 대한 시토카인-관련 신호전달 경로 향상된 CART의 기능을 나타낸다.
- [0446] 4.6 시험관내 사멸 활성
- [0447] 루시페라제 유전자를 표적 세포에 도입한 후 스크리닝함으로써 안정적으로 형질감염된 세포주를 획득하였다. 실시예 3에서 제조된 CAR-T 세포를 상이한 이펙터: 표적 비율로 CD19-양성 종양 세포 (Raji-luc, NALM6-luc)와 혼합하였다. 플루오레세인을 첨가한 후, 루시페라제는 플루오레세인과 반응하여 형광을 생성할 수 있었다. 형광 강도를 검출함으로써, 루시페라제의 활성을 측정할 수 있고, 세포의 생존을 검출하여 CART 세포의 사멸 효과를 평가할 수 있다.
- [0448] 결과는 RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T 세포가 Raji 및 NALM6을 유의하게 사멸시켰으며, 시토카인-관련 신호전달 경로 향상된 CART가 더 유의한 사멸 효과를 나타내었고, 이는 이펙터: 표적 비율과 상관관계가 있음을 보여준다.
- [0449] 4.7 CAR-T 세포의 증식

- [0450] IL-2를 CAR-T로부터 제거하였다. CAR-T 세포를 2주 동안 연속적으로 배양하고, 증식을 측정하기 위해 일주일에 2회 계수하였다.
- [0451] 결과는 RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T 세포가 CD19 CAR-T보다 더 강한 증식 속도를 가졌음을 보여준다. IL-2 없이, 2주 후 여전히 높은 생존율을 가졌다. CFSE는 특정 증식을 나타내었고, CD19 CAR-T는 2주 후 생존할 수 없었다.
- [0452] 4.8 세포의 시험관내 재활성화
- [0453] IL-2를 CAR-T로부터 제거하였다. K562-CD19를 2:1 이펙터: 표적 비율로 일주일에 2회 첨가하였다. 세포를 2주 동안 배양하고, 세포 증식을 측정하기 위해 일주일에 2회 계수하였다.
- [0454] 결과는 K562-CD19의 첨가 후, RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T 세포가 CD19 CAR-T보다 유의하게 더 강한 증식 속도를 나타내었음을 보여준다. 자극 후, 세포 생존율은 CD19 CAR-T보다 높았으며, 이는 시토카인-관련 신호전달 경로 향상된 CART가 더 높은 증식 속도를 가지며 더 잘 생존할 수 있음을 나타낸다.
- [0455] 4.9 생체내 효능
- [0456] 6-12주 NOD-Prkdcscid Il2rgnull (NOG) 마우스를 선택하고, 2×10^5 개 Raji-ffluc 세포, 50 μ L DPBS 및 50 μ L 매트릭스 (코닝)를 복강내로 주사하였다. 2일 후, 마우스의 종양 이식편 부담을 측정하고, 마우스를 종양 부담에 기반하여 4개의 그룹으로 나누었다. 하루 후, 200 μ L DPBS, 5×10^6 개 NT 세포, 5×10^6 개 CD19 CAR-T 세포, RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7, RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T 세포를 각 마우스에 각각 주사하였다. 마우스의 종양 부담을 CAR-T 처리 7일 후 추가로 평가하였다. 각 마우스에 4-분 반응 동안 3 mg d-루시페린을 복강내로 주사한 후, 30초 노출로 제노젠 IVIS 이미징 시스템을 사용하여 사진을 촬영하였다.
- [0457] 결과는 2주 후, RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7 및 RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T 세포가 NT 및 CD19 CAR-T 세포와 비교하여 종양 부담을 유의하게 감소시켰고, T 세포가 말초혈에서 여전히 검출될 수 있었음을 보여준다. 시토카인-관련 신호전달 경로 향상된 CART 그룹의 마우스는 전반적으로 더 긴 생존을 가졌다.
- [0458] 4.10 생체내 GVHD 연구
- [0459] 마우스를 먼저 치사-미만 용량의 방사선조사 (175 cGy)로 전신 처리하였다. 그 후, CAR-T 세포를 PBS에 재현탁하고, 처리된 마우스의 흉부에 주사하였다. 체중 감소, 아치형-등, 활동성, 모피 질감 및 피부 무결성을 포함하는 GVHD 임상 기준을 사용하여 마우스를 일주일에 2-3회 관찰하였다.
- [0460] 결과는 TCR 녹아웃이 없는 그룹의 마우스가 모두 GVHD 반응 증상을 보였고, TCR 단일 녹아웃 CAR-T 세포 그룹에서는 GVHD 반응이 검출되지 않았음을 보여준다.
- [0461] 4.11 11 RQR8 유전자-매개 CAR-T 세포의 클리어런스
- [0462] NK 세포를 이펙터 세포로서 PBMC로부터 분리하고, 10 μ g/mL의 최종 농도로 리톡시맙 (루텍시맙)과 함께 또는 없이 CAR-T와 1:1 공동배양하였다. 4시간 및 24시간 후, 발현 CAR을 유동 세포계측법에 의해 검출하였다.
- [0463] ADCC 백분율 = $(1 - \text{모노클로날 항체 그룹 CAR 양성 비율} / \text{무항체 그룹 CAR 양성 비율}) \times 100\%$
- [0464] 결과는 4시간 및 24시간 후, 루텍시맙의 존재 하에, NK 세포가 RQR8-CD19CAR-MBIL15, RQR8-CD19CAR-MBIL15-IL7 및 RQR8-CD19CAR-C7R CAR-T 세포를 유의하게 제거하였지만, CD19 CAR-T를 제거하지 못하였음을 보여준다. 루텍시맙 없이, NK는 어떠한 세포도 사멸시키지 못하였다. 이는 루텍시맙이 RQR8에 결합하는 안전 스위치로서 기능하고, NK가 ADCC 기능을 매개하여 CART 세포를 제거하도록 허용함을 나타낸다.
- [0465] 실시예 5 E3을 발현하는 U-CAR T 세포의 연구
- [0466] 도 30은 인헨서 E3을 발현하는 CAR-T 세포의 예시적인 설계를 보여준다. E3에서, C7R의 엑토도메인은 안전 스위치, 예컨대 EGFRt 또는 Her2t 또는 본 개시내용에 기재된 다른 펩티드에 의해 대체된다.
- [0467] 도 31은 CD19 CAR 및 인헨서 C7R 또는 E3을 발현하는 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다.
- [0468] 도 32A 및 32B는 CD19 항원을 발현하는 HeLa 세포에 대한 CAR-T 세포의 시험관내 사멸 활성을 보여준다. 도 32A는 표적 단독 또는 T 세포 대조군과 비교하여 C7R 또는 E3을 발현하는 CD19 CAR-T 세포의 시험관내 사멸 활성

성을 보여준다. 본 실험에서 이펙터 : 표적 비율은 5:1이다. 도 32B는 표적 단독 또는 T 세포 대조군과 비교하여 C7R 또는 E3을 발현하는 CD19 CAR-T 세포의 시험관내 사멸 활성을 보여준다. 본 실험에서 이펙터 : 표적 비율은 1:1이다.

[0469] 도 33A 및 33B는 시험된 조작된 세포에서 인산화된 STAT5 (pSTAT5) 및 CD19 CAR의 발현을 보여준다. 도 33A는 CD19 CAR 및 pSTAT5를 발현하는 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. 도 33B는 도 33A의 데이터의 pSTAT5의 상응하는 평균 형광 지수 (MFI)를 보여준다.

[0470] 도 34A-C는 인헨서가 없는 CD19 CAR-T와 비교하여 C7R 또는 E3을 발현하는 CD19 CAR-T 세포의 증식 데이터를 보여준다. 도 34A는 3개의 상이한 세포의 시토킨 독립적 증식을 보여준다. 도 34B는 반복된 NALM6 자극 하에서의 증식을 보여준다. 도 34C는 NALM6에 의한 자극 전 및 후 CAR-T 세포의 백분율을 보여준다. CAR 자극은 CAR+ 세포를 농축시켰다.

[0471] 도 35A는 세특시맵 (CTX, 항-EGFR 항체)의 존재 또는 부재 하에 상이한 이펙터 : 표적 비율에서 NK 세포와 공동 배양된 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. 데이터는 CTX의 존재 하에, E3을 발현하는 CD19 CAR-T가 NK 세포-매개 항체-의존적 세포 세포독성 (ADCC)을 통해 NK 세포에 의해 효과적으로 사멸될 수 있음을 보여주며, 이는 E3이 효과적인 안전 스위치로서 기능하고 효과적으로 꺼졌음을 나타낸다. 도 35B는 다른 세포에 대한 NK 세포의 총 사멸 활성을 보여준다. 도 35C는 CAR-T 세포에 대한 NK 세포의 사멸 활성을 보여준다.

[0472] 도 36A 및 36B는 반복된 자극 후 ADCC에 의한 안전 스위치의 시험을 보여준다. 도 36A는 CTX의 존재 또는 부재 하에 상이한 이펙터 : 표적 비율에서 NK 세포와 공동배양된 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. 본 실시예에서 표시된 세포는 반복 자극되었다. 도 36B는 CAR-T 세포에 대한 NK 세포의 사멸 활성을 보여준다.

[0473] 도 56A는 세포 배양의 12일차에 CD7 CAR 및 인헨서 C7R 또는 E3 (EGFRt+IL7R α)을 발현하는 TCR KO CD7 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. 도 56B는 CCRF-CEM 세포에 대한 CD7 CAR 및 인헨서 C7R 또는 E3 (EGFRt+IL7R α)을 발현하는 TCR KO CD7 CAR-T 세포의 6-시간 세포독성을 보여준다. 본 실험에서 시험된 이펙터 : 표적 비율은 5:1 및 1:1이다. 도 56C는 C7R 또는 E3 (EGFRt+IL7R α)을 발현하는 TCR KO CD7 CART 세포의 증식을 보여준다. CAR-T 세포를 IL2의 보충 없이 T 세포 배양 배지에서 배양하고, 세포 확장 배수에 대해 모니터링하였다. 결과는 C7R 또는 E3을 발현하는 TCR KO CD7 CART 세포가 대조군 T 세포보다 더 우수한 세포 확장 및 세포 안정성을 나타내었음을 보여준다. E3 (EGFRt+IL7R α)은 더 우수한 인헨서 발현을 가지며, 그러므로 C7R보다 더 우수한 세포 지속성 및 확장을 유지하였다. 도 56D는 인산화된 STAT5 (pSTAT5) 및 C7R 또는 E3을 발현하는 TCR KO CD7 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. pSTAT5는 C7R 또는 E3을 발현하는 TCR KO CD7 CAR-T 세포에서 고도로 상향조절되었다. CAR19 + IL2 자극을 pSTAT5에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 도 56E는 도 56D의 데이터의 pSTAT5의 상응하는 평균 형광 지수 (MFI)를 보여준다.

[0474] 구축물 설계의 서열: C7R의 엑토도메인은 안전 스위치, 예컨대 말단절단된 EGFR 또는 말단절단된 Her2에 의해 대체될 수 있다.

[0475] CD7CAR-E3 아미노산 서열 (E3=EGFRt + 구성적 활성 IL7R α TM 및 엔도도메인)

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCASSSSVSYMHW
 YQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYT
 FGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY
 AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSED
 TAMYYCARQDGYYPGWFWANWGQTTVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLCEL
 PHPAFLIPRKVCNIGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPL
 DPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSL
 GLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQVCHA
 LCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAM
 NITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC
 TYGCTGPGLEGCPNGPKIPSPILLTCPTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPD
 HKKTLEHLCKKPRKNLNVSNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTPPQLEESEK
 QRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNG
 PHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPSLQSGILTLNPVAQGPILTSLGNSQEEAYVTMSSFYQN
 Q

[0476]

[0477] CD7CAR-E3 (E3=Her2t + 구성적 활성 IL7R α TM 및 엔도도메인)

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCASSSSVSYMHW
 YQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYT
 FGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY
 AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSED
 TAMYYCARQDGYYPGWFWANWGQTTVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLCEL
 PHPAFLIPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPGSKVPDLSYMPI
 WKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGGGSGGGSPILLTCPTISILSF
 FSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKKTLEHLCKKPRKNLNVSNPESFLDCQIHR
 VDDIQARDEVEGFLQDTPPQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCL
 AGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPSLQSGILTLNPV
 AQGPILTSLGNSQEEAYVTMSSFYQNQ

[0478]

[0479] 도 68은 CCRF-CEM (T-ALL) 류틴 이중이식편 모델에서 CAR7 및 CAR7-E3 UCAR-T의 생체내 효능의 BLI 영상화를 보여준다. 각 마우스를 3×10^5 개 CCRF-CEM 세포로 정맥내로 접종하였다. 4일 후, CAR-T 세포를 정맥내로 주입 하였다 (마우스 당 1×10^6 개 세포). BLI 영상화는 CAR7-E3 UCAR-T 세포가 CAR7 UCAR-T 세포보다 종양 클리어런 스에 대한 더 우수한 효과를 가졌음을 나타낸다.

[0480] 실시예 6 이중 CAR을 발현하는 U-CAR T 세포의 연구

[0481] 일반 재료 및 방법

[0482] 공여자 혈액으로부터의 말초혈 단핵 세포 (PBMC)의 분리 및 T 세포의 확장

[0483] 밀도 구배 원심분리기를 통해 히스토패이크-1077 (시그마-알드리치)을 사용하여 공여자 혈액으로부터 말초혈 단

핵 세포 (PBMC)를 분리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.

- [0484] 세포주 및 PBMC의 배양
- [0485] Raji 세포 (버킷 림프종 세포, ATCC-CCL86);
- [0486] K562 세포 (인간 적백혈병 세포주, ATCC-CCL243);
- [0487] Raji-ffluc 세포주 (반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 Raji 세포를 스크리닝함으로써 수득됨);
- [0488] 293T 세포 (ATCC-CRL3216);
- [0489] CCRF-CEM 세포 (ATCC-CCL119);
- [0490] PBNK: CD56 마이크로비드를 사용하여 PBMC로부터 분류되고 NK 무혈청 배지 키트 II (사이아젠 바이오사이언시스 (Cyagen Biosciences)) + 10% FBS + 900 IU/ml IL2 (페프로테크(PeproTech))에서 배양된 말초혈 NK;
- [0491] NK92 세포 (ATCC-CRL2407);
- [0492] NK92-ffluc 세포 (반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 NK92 세포를 스크리닝함으로써 수득됨);
- [0493] Raji 세포, Raji-ffluc 세포주, 및 K562 세포를 RPMI1640 배지에서 배양하고, 293T 세포를 DMEM 배지에서 배양하였다. RPMI1640 및 DMEM을 모두 10% (v/v) 소 태아 혈청 및 100IU/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM 글루타민 및 1 mM 피루브산나트륨으로 보충하였다. 모든 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0494] NK92 세포를 10% (v/v) 소 태아 혈청, 2 mM 글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 1% NEAA, 0.1 mM 머캅토에탄올 및 200 IU/ml rhIL2로 보충된 RPMI1640 배지에서 배양하였다.
- [0495] T 세포 및 수득된 CAR-T 세포를 엑스-비보15 배지 (5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2 함유)에서 배양하였다. CAR-T 세포를 위한 배양 배지를 2일마다 300IU/ml의 최종 농도로 rhIL-2 (썬모피서 사이언티픽)로 추가로 보충하였다. 모든 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0496] 6.1 CRISPR의 설계 및 구축
- [0497] 웹사이트 <http://crispr.mit.edu>, www.idtdna.com 및 <https://www.synthego.com>에서 유전자 편집 효율 및 오프-타겟 위험을 평가한 후 유전자 편집을 위한 CD7, CD2, TCR gRNA를 선택하였다. 본 개시내용에서 사용된 gRNA는 인테그레이티드 DNA 테크놀로지스, 인크 (IDT)에 의해 합성되었거나, 시험관내 전사에 의해 제조하였다 (문헌 [Shi et al., 2017, J Vis Exp. doi: 10.3791/55267] 참조). HiFi-Cas9를 IDT로부터 구입하였다.
- [0498] 유전자 편집을 위해, 3 µg Cas9 단백질 및 1.5 µg gRNA를 20 µl에 혼합하고, 37°C 또는 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 리보핵단백질 (RNP)을 형성하였다. 그 후, RNP를 론자 4D 뉴클레오펙터에 의해 T 세포에 형질감염시켰다. 유전자 녹아웃 효율을 유동 세포계측법에 의해 검출된 바와 같은 단백질을 발현하는 세포의 비율에 의해 결정하였다.

[0499] 사용된 gRNA 표적화 서열은 하기와 같다:

TRAC-gRNA1: TTCGGAACCCAATCACTGAC, SEQ ID NO: 20
 TRAC-gRNA2: TCAGGGTTCTGGATATCTGT, SEQ ID NO: 21
 TRAC-gRNA3: AAGTTCCTGTGATGTCAAGC, SEQ ID NO: 22
 CD7-gRNA1: GAGGTCAATGTCTACGGCTC, SEQ ID NO: 25
 CD7-gRNA2: ATCACGGAGGTCAATGTCTA, SEQ ID NO: 26
 CD7-gRNA3: GTAGACATTGACCTCCGTGA, SEQ ID NO: 27
 CD7-gRNA4: GGAGCAGGTGATGTTGACGG, SEQ ID NO: 28
 CD2-gRNA1: CAAAGAGATTACGAATGCCT, SEQ ID NO: 29
 CD2-gRNA2: GTGCCACAAAGACCATCAAG, SEQ ID NO: 30
 CD2-gRNA3: AGAGGGTCATCACACACAAG, SEQ ID NO: 31
 CD2-gRNA4: CTTGTAGATATCCTGATCAT, SEQ ID NO: 32

[0500]

[0501] 스크리닝 후, 각 유전자에 대해 높은 녹아웃 효율을 갖는 gRNA가 발견되었으며, 2개의 유전자, TCR/CD7 또는 TCR/CD2를 녹아웃시켰을 때 고효율이 또한 관찰되었으며, 여기서 TRAC-gRNA2 및 CD7-gRNA1은 높은 녹아웃 효율을 갖는 gRNA이다. 도 16은 TRAC-gRNA1, 및 CD7-gRNA1 및 CD7-gRNA4와 상이한 CD7-gRNA를 사용함으로써 CD7 녹아웃의 효율이 명백하게 더 우수하였음을 보여주며, CD7-gRNA1을 후속 실험에서 사용하였다.

[0502]

6.2 CD7 CAR의 설계 및 바이러스의 패키지

[0503]

CD7 단일 CAR의 scFv는 TH69, 3A1e 및 SDZCHH380 항체로부터 유래된다. CAR에서 scFv는 3A1e-LH, TH69-LH, SDZ-LH, SDZ-HL로서 설계된다. CAR의 아미노산 서열은 서열식별번호: 75-78에 기재된 바와 같다.

3A1e-LH (SEQ ID NO 75)

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCSASSSVSYMHW
 YQQSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYT
 FGGGKLEIKRGGGGSGGGSGGGGSQVKLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSY
 AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSED
 TAMYCARQDGYYPGWFWANWGQGTTVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

TH69-LH (SEQ ID NO 76)

MALPVTALLLPLALLLHAARPAAYKDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGIS
 NYLWYQQKPDGTVKLLIYTTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQ
 YSKLPYTFGGGKLEIKRGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS
 GLTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYQMSS
 LRSEDTAMYCARDEVGRYLDVWGAGTTTVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP
 EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE

[0504]

EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

SDZ-LH (SEQ ID NO 77)

MALPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYL
AWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSIQPEDFGSYQCQHF
WTTTPWTFGGGKLEIKGGGGSGGGSGGGGSIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGY
TFTNYGMNVWKQAPGKGLKWMGWINTYNGEPTYADDFKGRFDFSLETSASTAYLQIN
NLKNEDTATYFCARRGYYYGSRYGAMDYWGQGTSTVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTAS
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL
LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

SDZ-HL (SEQ ID NO 78)

MALPVTALLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYG
MNWVKQAPGKGLKWMGWINTYNGEPTYADDFKGRFDFSLETSASTAYLQINNKNED
TATYFCARRGYYYGSRYGAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSP
ASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGS
GTQYSLKINSIQPEDFGSYQCQHFWTTPWTFGGGKLEIKSGTTTPAPRPPTPAPTASQ
PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

[0505]

[0506]

CAR 유전자를 EF1 α (EF-1 α)의 프로모터 하에 Fuw 렌티바이러스 벡터 백본에 클로닝하여 Fuw-EF1 α -CAR을 형성하였다. Fuw-EF1 α -CAR, 렌티바이러스 외피 플라스미드 pMD2.G (애드진, 플라스미드 #12259) 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드 psPAX2 (애드진, 플라스미드 #12260)를 리포펙타민3000 또는 PEI를 사용함으로써 293 T 세포에 형질감염하여 전체 발현 벡터를 제조하였다. 상청액을 48 및 72시간에 수집하고, 농축을 위해 초원심분리기(머크 밀리포어)에 적용하였다. 농축된 바이러스를 T 세포의 형질감염을 위해 준비하였다.

[0507]

6.3 CAR-T 세포의 제조

[0508]

세포 단리 및 활성화

[0509]

성분채집 후, 밀도 구배 원심분리에 의해 히스토페이크-1077 (시그마-알드리치)을 사용하여 단핵구를 단리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.

[0510]

5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2를 갖는 엑스-비보 15를 CAR-T 세포 배지로서 사용하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하고 배양하였다.

[0511]

CD 19를 발현하는 세포주: Raji (버킷 림프종 세포주, ATCC-CCL86); K562 (ATCC-CCL243); Raji-ffluc 및 NK92 세포주는 반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 세포를 스크리닝함으로써 획득됨;

[0512]

CD7 및 CD2를 발현하는 세포주: Jurkat 세포, CCRF-CEM 및 NK92 세포.

[0513]

모든 세포를 RPMI1640 배지에서 배양하고, 293T 세포 (ATCC-CRL3216)를 DMEM 배지에서 배양하였다. RPMI1640 및 DMEM을 모두 10% (v/v) 소 태아 혈청 및 100IU/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM 글루타민 및 1 mM 피루브산나트륨으로 보충하였다.

[0514]

전기천공 및 렌티바이러스 감염

[0515]

T 세포 농축 및 활성화 2일 후, 항-CD3/항-CD28 자성 비드를 제거하고, 세포를 튜브에 수집하고, 300g에서 5분 동안 원심분리한 후, DPBS로 2회 세척하고, opti-mem에서 50×10^6 개/ml의 세포 밀도로 재현탁하였다. 필요한 cas9/gRNA RNP의 양을 세포 밀도를 기준으로 계산한 후, 세포와 혼합하고, 4D-뉴클레오펙터 시스템 N (론자) 시

시스템에 의한 전기천공을 위해 옮겼다. 그 후, 세포를 예열된 배지에서 $1-2 \times 10^6$ 개/ml의 밀도로 재현탁하였다. 세포를 2-8의 MOI에서 렌티바이러스 형질감염에 추가로 적용하고, 플라스크로 옮기고, 37℃, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.

[0516] 세포 증식 및 CAR 양성 비율의 검출

[0517] 형질감염 3일 후, 세포 수 및 CAR 양성 세포를 검출하고, T 세포에서 CAR의 양성 비율을 계산하였다. 녹아웃 효율을 결정하기 위해 TCR (또는 CD3), 및 CD7의 양성 비율을 또한 검출하였다. 그 후, 세포를 인큐베이터에서 연속적으로 배양하고, 배지의 절반을 2-3일마다 세포가 동결보존을 위해 준비가 된 10일차까지 대체하였다.

[0518] 6.4 CD7 CAR 구조의 스크리닝

[0519] 도 38A에 나타낸 바와 같이, 항-CD7 CAR의 발현이 성공적으로 검출되었으며, 그 중 TH69-LH가 가장 강한 발현을 나타내었고, 그 다음으로는 3A1e-LH, 그 다음, SDZ-LH, 및 SDZ-HL이 그 뒤를 이었다. 기능의 면에서, 도 38B에 나타낸 바와 같이, 3A1e-LH, CAR은 모두 CD7-양성 T 세포에 대해 최고의 사멸 효과를 나타낸 반면, TH69-LH, SDZ-LH 및 SDZ-HL CAR은 덜 효과적이었다. 따라서, 이중 CAR에서 CD7 CAR을 위해 3A1e의 scFv를 선택하였다.

[0520] 6.5 CD19-CD7 이중 CAR 구조의 설계

[0521] CD19 및 CD7을 표적화하는 CD19-CD7 이중 CAR의 구조는 도 37 및 하기에 예시된 바와 같다:

[0522] 루프: L719-LHLH 및 L719-HLHL, 서열식별번호 79 및 80에 기재된 바와 같은 서열;

L719-LHLH (SEQ ID NO. 79)

MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL
N
WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL
PYTFGGGTKLEITGGGGSQVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQT
PEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCAR
QDGYYPGWANWGQGTITVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIELTQSPAIMSASLGEEI
TLTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKLLIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAE
DAADYYCHQWSSYTFGGGTKLEIKRGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS
LPDYGVSWSIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALSKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT
DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSSGTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRP
EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVRKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPGEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

L719-HLHL (SEQ ID NO. 80)

MALPVTALLPLALLLHAARPEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALSKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD
DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGSDIELTQSPAIMSASLGEEITLCSA
SSSVSYMHWYQQKSGTSPKLLIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADY
YCHQWSSYTFGGGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVKLQESGGGLVKPGGSLKL
SCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTL
YLQMSSLRSEDAMYYCARQDGYYPGWANWGQGTITVTVSSGGGSDIQMTQTSSLS
SASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDY
SLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITSGTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVRKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPGEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

[0523]

[0524] 탠덤: T197-LHLH, T197-LHLH-EAAAK3 (3개의 연결된 EAAAK를 갖는 링커를 사용함으로써), T719-LHLH, T719-

LHHL, 서열식별번호 81-84에 기재된 바와 같은 서열;

T197-LHLH (SEQ ID NO. 81)

MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL
N WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL
PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD
YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD
DDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIELTQSPAI
MSASLGEEITLTCASSSVSYMHWYQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFY
SLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYTFGGGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVKLQESG
GGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVK
GRFTISRDNANTLYLQMSLRSEDAMYYCARQDGYYPGWANWGQGTTVTVSSSGT
TTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL
LSLVTLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSR
SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKDMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

T197-LHLH-(EAAAK)₃ (SEQ ID NO. 82)

MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL
N WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL
PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD
YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD
DDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSEAAAKEAAAKEAAAKDIELTQSPAIMS
ASLGEEITLTCASSSVSYMHWYQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLT
ISSVEAEDAADYYCHQWSSYTFGGGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVKLQESGGGL
VKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTI
SRDNANTLYLQMSLRSEDAMYYCARQDGYYPGWANWGQGTTVTVSSSGTTTPA
PRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVT
LYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSR
SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKDMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

T719-LHLH (SEQ ID NO. 83)

MALPVTALLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCASSSVSYMH
WYQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSY
TFGGGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSY
AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLRSED
TAMYYCARQDGYYPGWANWGQGTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDQMTQTT

[0525]

SLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT
 DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQE
 SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKS
 RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSSGT
 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLL
 SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA
 PAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

T719-LHHL (SEQ ID NO. 84)

MALPVTALLPLALLLHAARPDIELTQSPAIMSASLGEEITLTCSASSSVSYMHW
 YQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEADAADYYCHQWSSYT
 FGGGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGVVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGTFSSY
 AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSED
 TAMYYCARQDGYYPGWANWGQGTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGP
 GLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLT
 IIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGS
 GGGGSGGGGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIY
 HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITSGT
 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLL
 SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA
 PAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

[0526]

[0527]

구성적으로 활성화된 IL7 수용체 C7R과 연결된 루프 이중 CAR: L719-C7R, 서열식별번호 85에 기재된 바와 같은 아미노산 서열.

L719-C7R (SEQ ID NO 85)

MALPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN
 WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL
 PYTFGGGKLEITGGGGSQVVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGTFSSYAMSWVRQT
 PEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSED
 TAMYYCARQDGYYPGWANWGQGTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIELTQSPAIMSASLGEEI
 TLTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAE
 DAADYYCHQWSSYTFGGGKLEIKRGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS
 LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT
 DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP

[0528]

EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
FMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLVRRGARA
GPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGTFNSVSTNVSYQETTTPTSLG
STSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSTVISTVFTTPANVSTP
ETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIAEIKCSGIREVKLTQGICLEQ
NKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQADADAGAQCVCALLAQSEVRPQCLLLVLNART
EISSKLQLMKKHQSDLKKGILDFTEQDVASHQSYSQKTPILLTCPTISILSFFSVALLVIL
ACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARD
EVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACD
APILSSSRSLDCRESGKNPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPFSLQSGILTLNPVAQQQPILTS
LGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ*

[0529]

6.6 이중 CAR 구조-1에 대한 시험

[0530]

1) 이중 CAR의 발현 및 녹아웃 효율

[0531]

2개의 루프 CAR (L719-LHLH 및 L719-HLHL) 및 2개의 탠덤 CAR (T197-LHLH 및 T197-LHLH-(EAAAK3)3)을 비교하였으며, 여기서 CAR7 및 CAR19는 단일 CAR 대조군으로서 사용되었고, 모의 T는 음성 대조군이었다. 도 39에 나타낸 바와 같이, 2개의 루프 이중 CAR의 발현은 대각선으로 분포되었으며, 이는 이중 CAR의 성공적인 발현을 나타낸다. 탠덤 이중 CAR의 CD19 CAR은 강한 발현을 나타내었으나, CD7 CAR은 약하게 검출되었다. 도 40은 CD7 및 CD3 (TRAC)의 녹아웃 효율을 보여주며, 모의 T 및 CAR19에서 녹아웃 효율이 최대 98%였음을 알 수 있다. CD7 단일 CAR 및 CD7/CD19 이중 CAR을 포함하는 다른 2개의 그룹에서, CD7+ 세포의 비율은 모의 T 및 CAR 19 그룹의 비율보다 유의하게 더 낮았으며, 이는 CD7 CAR의 기능을 나타낸다.

[0532]

2) CD19+ 세포 및 CD7+ 세포에 대한 이중 CAR의 시험관내 사멸 효과

[0533]

먼저, CD 19 표적에 대한 상이한 CAR의 사멸 효과를 비교하였다. 엑스셀리전스(xCELLigence) 실시간 세포 분석기 (RTCA) 실험은 2개의 루프 CAR 및 2개의 탠덤 CAR이 모두 CD19 단일 CAR (CAR19)과 유사한 HeLa-CD19+ 세포에 대한 강력한 사멸 효과를 가졌음을 보여주었다 (도 41).

[0534]

후속적으로, 말초혈로부터의 CD7+ NK 세포에 대한 상이한 CAR의 사멸 효과를 비교하였다 (도 42A). 생체내 확장된 PBNK 세포 (CD7+ 세포의 비율은 ~80%임)를 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)로 표지하고, CAR-T 세포와 함께 1일 동안 인큐베이션하였다. 그 후, CFSE 양성 세포의 비율 변화를 분석하기 위해 세포를 유동 세포계측법에 적용하였다. 도 42A는 이중 CAR 및 CD7 단일 CAR이 NK 세포에 대해 유의한 사멸 효과를 가졌고, CD19 단일 CAR 및 모의 T가 어떠한 사멸 효과도 나타내지 않았음을 보여준다. 도 42B는 NK에서 CD7+ 세포가 이중 CAR (L719-LHLH 및 T197-LHLH)과 함께 공동배양한 후 거의 사라졌음을 보여주며, 이는 CAR7 및 이중 CAR이 NK에서 CD7+ 세포를 완전히 사멸시켰음을 나타낸다.

[0535]

더욱이, 동종 T 세포 (CD7+)에 대한 상이한 CAR의 사멸 효과를 비교하였다 (도 43). 결과는 동종 T 세포가 CAR7 및 이중 CAR에 의해 완전히 사멸된 반면, CAR19가 동종 T 세포에 대해 어떠한 사멸 효과도 나타내지 않았음을 보여준다.

[0536]

3) 이중 CAR에 의한 CD19+ Raji 종양의 생체내 클리어런스

[0537]

각 마우스를 3×10^5 개 종양 세포로 정맥내로 접종하였다. 6일 후, CAR-T 세포를 정맥내로 주입하였다 (마우스 당 3×10^6 개 세포). BLI 영상화는 루프 CAR 및 탠덤 CAR이 모두 특정 정도로 Raji 종양을 제거하였고, L719-LHLH가 최고의 생체내 종양 제거를 보였음을 나타낸다 (도 44).

[0538]

6.7 이중 CAR 구조-2에 대한 시험

[0539]

2개의 다른 탠덤 이중 CAR 구조: T719-LHLH 및 T719-LHHL을 설계하고 루프 CAR과 비교하였다 (L719-LHLH, 또한 L719로서 명명됨).

[0540]

도 45A 및 45B는 새로운 탠덤 이중 CAR이 성공적으로 발현되었고 (도 45A), 또한 유전자 녹아웃 후 나머지 CD7+

[0541]

세포에 대해 유의한 사멸 효과를 가졌음을 보여준다 (도 45B).

- [0542] 실시간 세포 분석 (RTCA)은 (도 46), 탠덤 이중 CAR이 HeLa-CD19 세포에 대해 L719와 유사한 사멸 효과를 가졌음을 보여준다.
- [0543] 도 47A 및 47B는 탠덤 이중 CAR이 또한 24시간에 걸쳐 동종 T 세포 및 NK 세포에 대해 L719와 유사한 강한 사멸 효과를 가졌음을 보여준다.
- [0544] 도 48은 L719 및 탠덤 (T719-LHLH 및 T719-LHHL) 이중 CAR이 모두 생체내에서 CCRF-CEM 종양을 크게 제거하였음을 보여준다 (NOG 마우스에서 CCRF-CEM 정맥내 모델).
- [0545] 6.8 시토카인의 방출
- [0546] 실시예 6.3에서 제조된 이중 CAR-T 세포 및 CD19 양성 종양 세포 (Raji), CD7 양성 종양 세포 (Jurkat) 또는 1차 동종 PBMC 또는 NK (각각 100u1)를 각 세포에 대해 1×10^6 개/ml의 밀도로 1:1 비율로 RPMI 배지에서 혼합한 후, 96-웰 플레이트에서 밤새 배양하였다. 그 후, 배지를 수집하고 원심분리하고, 방출된 시토카인 IFN- γ 및 IL-2를 시토카인 비드 어레이 키트 (CBA 키트, 비디 바이오사이언시스)에 의해 검출하였다.
- [0547] 결과는 CD19-CD7 CAR-T 세포를 Raji, Jurkat, 1차 동종 PBMC 또는 NK 세포와 함께 인큐베이션하는 것이 다량의 IFN- γ 및 IL-2를 생성하였음을 보여주며, 이는 CD19 양성 또는 CD7 양성 표적 세포에 대한 CAR-T의 기능을 나타낸다.
- [0548] 6.9 생체내 GVHD 연구
- [0549] 마우스를 먼저 치사-미만 용량의 방사선조사 (175 cGy)로 전신 처리하였다. 그 후, CAR-T 세포를 PBS에 재현탁하고, 처리된 마우스의 흉부에 주사하였다. 체중 감소, 아치형-등, 활동성, 모피 질감 및 피부 무결성을 포함하는 GVHD 임상 기준을 사용하여 마우스를 일주일에 2-3회 관찰하였다.
- [0550] 결과는 TCR 녹아웃이 없는 마우스가 GVHD 증상을 보였으나, CD7-CD19 CAR-T+ TCR/CD7이중 녹아웃 그룹에서는 GVHD가 검출되지 않았음을 보여준다.
- [0551] 6.10 시험관내 HVG 연구
- [0552] CD7 CAR은 CD7+ 세포를 효과적이고 신속하게 제거할 수 있으며, 시험관내 실험은 동종 T 세포가 CD7 CAR을 발현하는 CAR-T 세포에 대해 유의한 거부를 나타내지 않았지만, CAR19만을 발현하는 CAR-T 세포에 대해 강한 거부를 나타내었음을 보여주었다.
- [0553] 동종 NK 세포는 CD7 CAR이 없는 CAR-T 세포보다 CD7 CAR을 발현하는 CAR-T 세포에 대해 유의하게 더 적은 거부를 나타내었다.
- [0554] 6.11 AP1903 또는 라파마이신에 의한 CAR-T 세포의 클리어런스
- [0555] 10nM AP1903 또는 라파마이신을 rapaCasp9- L719 CAR-T (서열식별번호: 86에 기재된 바와 같은 서열) 세포의 배지에 첨가하였다. 1, 6 및 24시간 후, CAR-T 세포의 세포자멸 및 생존을 유동 세포계측법에 의해 검출하였다.
- [0556] 결과는 AP1903 및 라파마이신이 rapaCasp9- L719 CAR-T 세포를 신속하게 제거하였지만, CD19 대조군 CART를 제거하지 못하였음을 보여주며, 이는 안전 스위치의 특이성을 나타낸다.

[0557] rapaC9-L719 (서열식별번호. 86)

MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKET
 SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKLEYSGGGSLEG
 VQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDNRNPKFKMLGKQEVIRGW
 EEGVAQMSVQRAKLITISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGSGGGGS
 GGGSGVDGFDVGALESRLGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNI
 DCEKLRRRFSSLFHMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQAS
 HLQFPGA VYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS
 PEDESPGSNPEPDATPFQEGRLTFDQLDAISSLPSTDFVSYSYTFPGFVSWRDPKSGSWY
 VETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKMPGCFNFLRKKLFFKTSGSGATN
 FSLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALLHAARPDQMTQTTSLSASLGDRVTISC
 RASQDISKYLNWYQKQPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI
 ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGGGGSQVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS
 SYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRS
 EDTAMYYCARQDGYYPGW FANWGQTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIELTQSP
 AIMSASLGEEITLCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTF
 YSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYTFGGGTKEIKRGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSL
 SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ
 VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSSGTTTTAPRPPTPAP
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR
 KKKLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLY
 NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
 ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

[0558]

[0559] L719-E3 세포에서 E3의 안전 스위치 기능을 24시간 보체 의존적 세포독성 검정 (CDC 검정)에 의해 결정하였다. 간단히 말해서, TCR/CD7 이중 녹아웃 L719-E3 세포 또는 L718-E2 세포를 0%, 5% 또는 25% 공여자 혈청을 함유하는 배지에서 인큐베이션하였다. 5 또는 50ug/ml의 세톡시맵(CTX)을 첨가함으로써 24시간 CDC 효과를 검사하였다. CD20을 표적화하는 리톡시맵 (RTX)을 음성 대조군으로서 사용하였다. 도 61에 나타낸 바와 같이, L719-E3 세포는 혈청의 존재 하에 세톡시맵에 의해 특이적으로 용해되었고 (도 61A), EGFRt 또는 CD20 세포의 도메인이 없는 L719-E2 세포에서는 CDC 효과가 관찰되지 않았다 (도 61B).

[0560]

TCR/CD7 이중 녹아웃 CAR7-E3 세포 또는 L719-E3 세포에서 E3의 안전 스위치 기능을 보체 의존적 세포독성 검정 (CDC 검정)에 의해 추가로 결정하였다. 0%, 5% 또는 25% 기니피그 혈청을 함유하는 배지에서 세포를 인큐베이션하였다. 그 후, 5ug/ml의 세톡시맵의 존재 하에 CDC 효과를 검출하였다. 도 62A에 나타낸 바와 같이, CDC 효과는 혈청 (보체)의 농도에 상응하였고, E3 발현 CAR7-E3 세포에 대해 특이적이었지만, 대조군 T 세포에 대해서는 그렇지 않았다. CDC 효과를 또한 5ug/ml 세톡시맵 또는 허셉틴의 존재 하에 L719-E3 세포에 대해 검사하였다. 도 62B에 나타낸 바와 같이, CDC 효과는 세톡시맵의 존재 하에서만 관찰되었다.

[0561]

6.12 시토카인 수용체 C7R 또는 E3은 이중 CAR의 기능을 향상시켰다

[0562]

생체내에서 범용 CAR-T 세포의 생존을 추가로 향상시키기 위해, 구성적 신호 인자 IL7 수용체 (C7R) 또는 E3을 2A에 의해 L719 이중 CAR에 연결하여, pSTAT5 신호전달 경로를 활성화시켰다. 도 50A는 L719 및 L719-C7R 이중 CAR-T 세포에서 CD19 및 CD7 항원 결합 도메인의 발현을 보여준다. 도 50B는 CD7을 발현하는 HeLa 세포 (HeLa-CD7)에 대한 C7R 발현이 있거나 없는 L719 이중 CAR-T 세포의 세포독성을 보여준다. 도 50C는 CD19를 발현하는 HeLa 세포 (HeLa-CD19)에 대한 C7R 발현이 있거나 없는 L719 이중 CAR-T 세포의 세포독성을 보여준다. 도 50B 및 50C에서 시험된 이펙터 : 표적 비율은 4:1이다. 도 50B 및 50C는 L719 및 L719-C7R이 모두 HeLa-CD7 및 HeLa-CD19를 효과적으로 사멸시켰음을 보여준다. 도 50D는 인헨서 (C7R 또는 E3) 및 CD7 둘 모두를 발현하는 L719 이중 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. 도 50E는 NALM6 세포에 대한 C7R 또는 E3을 발현하는 L719 이중 CAR-T 세포의 6-시간 세포독성 데이터를 보여준다. 본 실험에서 시험된 이펙터 : 표적 비율은 5:1 및 1:1이다. 도 50F는 CCRF-CEM 세포에 대한 C7R 또는 E3을 발현하는 L719 이중 CAR-T 세포의 6-시간 세포독성 데이터를 보여준다. 본 실험에서 시험된 이펙터 : 표적 비율은 5:1 및 1:1이다. 도 50G

는 인산화된 STAT5 (pSTAT5) 및 C7R 또는 E3을 발현하는 L719 이중 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. pSTAT5는 C7R 또는 E3을 발현하는 L719 이중 CAR-T 세포에서 고도로 상향조절되었다. CAR19 + IL2 자극을 pSTAT5에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 비-조작된 T 세포를 pSTAT5에 대한 음성 대조군으로서 사용하였다. 도 50H는 IL-2 제거 후 C7R 또는 E3을 발현하는 L719 이중 CAR-T 세포의 증식을 보여준다. CAR-T 세포를 NALM6 세포에 의한 2회 자극 라운드로 처리하였다.

[0563] 도 50I는 CD19 발현 HeLa 세포 (HeLa-CD19)에 대한 E3을 발현하는 L719 이중 CAR-T 세포 (L719-E3)의 세포독성을 보여준다. 표적 세포 단독, 비-형질도입된 TCR/CD7 이중 녹아웃 세포 (NT-DK0), 및 CD19 CAR-T 세포를 포함하는 대조군과 L719-E3 세포를 비교하였으며, L719-E3은 HeLa-CD19 세포에 대한 더 우수한 세포독성을 나타내었다. 본 실험에서 시험된 이펙터 : 표적 비율은 5:1이다. 도 50J는 CD7 발현 HeLa 세포 (HeLa-CD7)에 대한 E3을 발현하는 L719 이중 CAR-T 세포 (L719-E3)의 세포독성을 보여준다. 표적 세포 단독, 비-형질도입된 TCR/CD7 이중 녹아웃 세포 (NT-DK0) 및 CD19 CAR-T 세포를 포함하는 대조군과 L719-E3 세포를 비교하였으며, L719-E3은 HeLa-CD7 세포에 대한 더 우수한 세포독성을 나타내었다. 본 실험에서 시험된 이펙터 : 표적 비율은 5:1이다.

[0564] 도 63은 시토카인 신호전달 향상이 없거나 mbIL15, C7R, 또는 E3 발현이 있는 TCR/CD7 이중 녹아웃 CAR7 세포에서 IL2 및 IFN- γ 의 발현을 보여준다. 세포를 CCRF-CEM 세포에 의해 1:1 이펙터: 표적 세포 비율로 24시간 동안 자극하였다. 상청액을 수집하고, 시토카인 비드 어레이에 의해 IL12 및 IFN γ 발현에 대해 측정하였다. 도 63에 나타난 바와 같이, C7R 및 E3을 발현하는 CAR7 세포는 향상된 IL-2 생산을 나타내었다.

[0565] 도 64는 시토카인 신호전달 향상이 없거나 C7R 또는 E3 발현이 있는 TCR/CD7 이중 녹아웃 CD19/CD7 이중 CAR-L719 세포에서 IL2 및 IFN- γ 의 발현을 보여준다.

[0566] 세포를 CCRF-CEM 세포에 의해 1:2 이펙터: 표적 세포 비율로 24시간 동안 자극하였다. 상청액을 수집하고, 시토카인 비드 어레이에 의해 IL12 및 IFN γ 발현에 대해 측정하였다. 도 64에 나타난 바와 같이, C7R을 발현하는 CAR7 세포는 향상된 IL-2 생산을 나타내었다.

[0567] 6.13 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 구축하는데 사용된 추가 서열

FMC63 scFv V_L (SEQ ID NO 87)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL
HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT

FMC63 scFv V_H (SEQ ID NO 88)

EVKLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGS
ETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYGGSYAMDYWG
QGTSVTVSS

FMC63 CD19CAR (SEQ ID NO 89)

MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL
NWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL
PYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSL
PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD
ITAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPMEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

3A1e CD7 scFv V_L (SEQ ID NO 90)

DIETQSPAIMSASLGEEITLTCASSSVSYMHYQQKSGTSPKLLIYSTSNLASG
VPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYTFGGGKLEIKR

3A1e CD7 scFv V_H (SEQ ID NO 91)

QVKLQESGGGLVKPGSLKLSCAASGFTFSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISS
GGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDTAMYCARQDGYYPGWFWANW
GQGTTVTVSS

[0568]

- [0569] 6.14 CD19 및 CD7 이중 특이적 CAR-T 세포의 증식
- [0570] 도 57A는 C7R을 발현하는 CD19 및 CD7 이중 특이적 CAR-T 세포 (GC197-C7R)의 증식을 보여준다. 조작된 이중 특이적 CAR-T 세포를 2개의 상이한 T 세포 공여자로부터 제조하였다. 두 공여자로부터의 CAR-T 세포는 반복적 암 항원 자극에 반응하여 우월한 지속성 및 증식을 나타내었다. 도 57B는 자극 없이 GC197-C7R 세포의 증식을 보여준다. 신선하게 제조된 GC197-C7R을 IL2 또는 항원 자극의 보충 없이 T 세포 배양 배지에서 배양하고, 대조군 T 세포와 비교하였으며, GC197-C7R은 더 우수한 확장을 유지하고 배양에서 지속되었다.
- [0571] 도 58A는 세포 배양의 12일차에 GC197-C7R 및 GC197-E3에서 CD7 CAR 및 인헨서의 발현을 보여준다. 도 58B는 자극 없이 C7R (GC197-C7R) 또는 E3 (GC197-E3)을 발현하는 GC197 세포의 증식을 보여준다. GC197-C7R 또는 GC197-E3 세포를 IL2 보충 없이 T 세포 배양 배지에서 배양하고, 세포 확장 배수 및 지속성에 대해 모니터링하였다. 도 58C는 항원 자극의 존재 하에 GC197-C7R 및 GC197-E3의 증식을 보여준다. 세포를 Nalm6에 의해 반복적으로 자극하고 (CD19+ B-ALL 세포주), 세포 확장 배수에 대해 모니터링하였다. 데이터는 GC197-C7R/E3이 시토크인 또는 항원 자극이 있거나 없는 경우 비교가능하게 우월한 세포 확장 및 세포 안정성을 나타내었음을 보여주었다.
- [0572] 6.15 생체내 효능
- [0573] 도 69는 Nalm6 (B-ALL) 무인 이중이식편 모델에서 L719 및 L719-C7R UCAR-T의 생체내 효능의 BLI 영상화를 보여준다. 각 마우스를 1×10^6 개 Nalm6 세포로 정맥내로 접종하였다. 4일 후, CAR-T 세포를 정맥내로 주입하였다 (고용량: 마우스당 1×10^6 개 또는 저용량: 3×10^5 개 세포). BLI 영상화는 L719-C7R UCAR-T 세포가 L719 UCAR-T 세포보다 종양 클리어런스에 대한 더 우수한 효과를 가졌음을 나타낸다.
- [0574] 실시예 7 CD137 및 CD19 이중 CAR을 갖는 U-CAR T 세포의 연구
- [0575] 일반 재료 및 방법
- [0576] 공여자 혈액으로부터의 말초혈 단핵 세포 (PBMC)의 분리 및 T 세포의 확장
- [0577] 밀도 구배 원심분리기를 통해 히스토페이크-1077 (시그마-알드리치)을 사용하여 공여자 혈액으로부터 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.
- [0578] 세포주 및 PBMC 및 말초혈 1차 NK (PBNC) 세포의 배양
- [0579] Raji 세포 (버킷 림프종 세포, ATCC-CCL86);
- [0580] K562 세포 (인간 적백혈병 세포주, ATCC-CCL243);
- [0581] Raji-ffluc 세포주 (반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 Raji 세포를 스크리닝함으로써 획득됨);
- [0582] 293T 세포 (ATCC-CRL3216);
- [0583] NK92 세포 (ATCC-CRL2407);
- [0584] NK92-ffluc 세포 (반딧불이 루시페라제를 갖는 렌티바이러스로 형질감염된 NK92 세포를 스크리닝함으로써 획득됨)
- [0585] Raji 세포, K562 세포 및 Raji-ffluc 세포주를 RPMI1640 배지에서 배양하고, 293T 세포를 DMEM 배지에서 배양하였다. RPMI1640 및 DMEM을 모두 10% (v/v) 소 태아 혈청 및 100IU/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM 글루타민 및 1 mM 피루브산나트륨으로 보충하였다. 모든 세포를 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0586] NK92 세포 및 NK92-ffluc 세포를 10% (v/v) 소 태아 혈청, 2 mM 글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 1% NEAA, 0.1 mM 머캅토에탄올 및 200 IU/ml rhIL2로 보충된 RPMI1640 배지에서 배양하였다. PBNC를 CD56 마이크로비드를 사용하여 PBMC로부터 분류한 후, 상기 배지에서 배양하고, 4-1BBL-mbIL15를 발현하는 K562의 자극 하에 확장시켰다.
- [0587] T 세포 및 수득된 CAR-T 세포를 엑스-비보15 배지 (5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2 함유)에서 배양하였다. CAR-T 세포를 위한 배양 배지를 2일마다 300IU/ml의 최종 농도로 rhIL-2 (썬모피

서 사이언티픽)로 보충하였다. 모든 세포를 37℃, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.

[0588]

7.1 CD19-CD137 이중 CAR의 설계 및 바이러스의 패키지

[0589]

CD19 CAR의 구조는 SP-CD19 scFv VL - 링커 - CD19 scFv VH - 힌지-TM-4-1BB-CD3 ζ 이고; CD19 및 CD137 표적화 이중 CAR (CD19-CD7 이중-CAR)의 루프는 SP-CD19 scFv VL - 링커 - CD137 scFv VH - 링커 - CD137 scFv VL - 링커 - CD19 scFv VH - 힌지-TM-4-1BB-CD3 ζ 이다 (도 52에 나타난 바와 같음). CD19-CD137-루프-CAR의 뉴클레오타이드 서열은 서열식별번호: 41로서 기재되어 있다.

[0590]

CD19-CD137-루프-CAR (서열식별번호 41):

ATGGCACTCCCTGTAAGTGCACCTTCTTTTGCCACTTGCCTTGCTCCTGCACGC
AGCGCGGCCGATATTCAAATGACACAACTACCAGCTCCCTTTCAGCATCTTTGGG
CGATAGAGTAACTATAAGTTGCCGCGCGTCCCAAGACATCTCTAAGTACCTTAACTG
GTATCAACAAAAACCGGACGGGACGGTCAAACTGTTGATCTATCACACATCCAGAT
TGCACTCAGGCGTGCCGAGCAGGTTCACTGGGAGTGGGTCAGGAACGGATTACAGC
TTGACGATTAGTAACCTGGAGCAAGAAGACATTGCCACCTACTTCTGCCAGCAAGG
TAACACTCTCCCATATACGTTCTGGGGGTGGCACCAAGCTGGAAATCACTGGCGGCG
GAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGA
GAGCTGAGGATCAGCTGCAAGGGCAGCGGCTACAGCTTCAGCACCTACTGGATCA
GCTGGGTGAGGCAGATGCCCGGCAAGGGCTGGAGTGGATGGGCAAGATCTACCCC
GGCGACAGCTACACCAACTACAGCCCCAGCTTCCAGGGCCAGGTGACCATCAGCGC
CGACAAGAGCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCAGCGAC
ACCGCATGTACTACTGCGCCAGGGGCTACGGCATCTTCGACTACTGGGGCCAGGG
CACCTTGGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACAAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTG
GCGAGGGCTCTACCAAGGGCATGAGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGC

[0591]

GTGAGCCCCGGCCAGACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAACATCGGCGACCA
GTACGCCCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTGATCTACC
AGGACAAGAACAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGGTTCAAGCGGCAGCAACAGCGG
CAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACT
ACTGCGCCACCTACACCGGCTTCGGCAGCCTGGCCGTGTTCTGGCGGCGGCACCAAG
CTGACCGTGCTGGGGGGAGGCGGCAGCGAGGTGAACTGCAGGAGTCCGGGCCCCG
GTCTCGTGGCACCTTCCCAGTCACTGTCCGTGACCTGCACCGTATCTGGGGTAAGTC
TGCCGGATTATGGGGTTTCATGGATCCGGCAACCTCCGAGGAAAGGGTTGGAATGG
CTGGGAGTCATCTGGGGAAGCGAGACAACCTTATTATAATTCTGCTTTGAAGAGCCG
CTTGACGATAATCAAGGACAACAGTAAGAGTCAGGTTTTCTTGAAGATGAATTCTCT
TCAGACAGATGACACCGCTATTTATTATTGTGCAAAACATTATTATTACGGAGGATC
CTACGCGATGGACTATTGGGGACAGGGTACCTCTGTTACGGTGTCTCATCCGGAAC
AACGACACCAGCACCACGGCCACCCACTCCTGCTCCGACAATTGCGTCTCAGCCCCCT
TTCCCTTCGACCCGAAGCTTGTGCCCCGTGCTGCGGGAGGAGCGGTCCACACGCGCG
GGCTTGACTTCGCTTGCGACATCTACATTTGGGCACCCCTTGCCCGGACATGCGGCG
TCTTGCTCCTGAGTCTGGTTATAACGCTGTATTGTAAGCGAGGTTCGGAAGAAGCTTT
TGTATATCTTTAAACAGCCCTTTATGAGGCCCGTACAAACCACACAAGAGGAGGAT
GGGTGCTCATGCAGATTTCTGAAGAGGAAGAGGGCGGTTGCGAACTTAGAGTCAA
ATTCAGCCGCTCCGCAGATGCACCTGCTTATAAACAGGGTCAGAATCAATTGTATA
ATGAACTTAATCTCGGGAGGCGCGAGGAGTATGATGTGCTGGACAAGCGACGGGGT
CGAGACCCAGAGATGGGCGGTAAACCCCCGCCGAAAGAACCCCCAGGAGGGACTGT
ATAATGAGCTGCAAAAGGACAAAATGGCAGAAGCCTATTCCGAAATAGGGATGAA
GGGAGAGCGGCGGCGAGGTAAGGGACATGACGGTCTTTATCAAGGTCTTAGTACTG
CAACTAAGGACACCTATGACGCGCTGCATATGCAGGCTCTCCACCTAGATAA

[0592]

- [0593] CAR 유전자를 EF1 α (EF-1 α)의 프로모터 하에 FUV 렌티바이러스 벡터 백본에 클로닝하여 Fuv-EF1 α -CAR을 형성하였다. Fuv-EF1 α -CAR, 렌티바이러스 외피 플라스미드 pMD2.G (애드진, 플라스미드 #12259) 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드 psPAX2 (애드진, 플라스미드 #12260)를 리포펙타민3000을 사용함으로써 293 T 세포에 형질감염하여 전체 렌티바이러스 발현 벡터를 제조하였다. 상청액을 48 및 72시간에 수집하고, 농축을 위해 초원심분리기 (머크 밀리포어)에 적용하였다. 농축된 바이러스를 T 세포의 형질감염을 위해 준비하였다.
- [0594] 결과는 렌티바이러스 벡터가 성공적으로 구축되었고, 이중 CAR의 항-CD19 및 항-CD19/CD137의 발현이 예상대로 검출되었음을 보여준다.
- [0595] 7.2 CRISPR의 설계 및 구축
- [0596] 웹사이트 <http://crispr.mit.edu>, www.idtdna.com 및 <https://www.synthego.com>에서 유전자 편집 효율 및 오프-타겟 위험을 평가한 후 유전자 편집을 위한 CD137 및 TCR gRNA를 선택하였다. 본 개시내용에서 사용된 gRNA는 인테그레이티드 DNA 테크놀로지스, 인크 (IDT)에 의해 합성되었다. HiFi-Cas9를 IDT로부터 구입하였다.
- [0597] 유전자 편집을 위해, 3 μ g Cas9 단백질 및 1.5 μ g gRNA를 20 μ l에 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 또는 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 리보핵단백질 (RNP)을 형성하였다. 그 후, RNP를 론자 4D 뉴클레오펙터에 의해 T 세포에 형질감염시켰다. 유전자 녹아웃 효율을 유동 세포계측법에 의해 검출된 바와 같은 단백질을 발현하는 세포의 비율에 의해 결정하였다.
- [0598] 사용된 gRNA 표적화 서열은 하기와 같다:
- TRAC-gRNA1 : TTCGGAACCCAATCACTGAC, SEQ ID NO: 20
- TRAC-gRNA2 : TCAGGGTTCTGGATATCTGT, SEQ ID NO: 21
- TRAC-gRNA3 : AAGTTCCTGTGATGTCAAGC, SEQ ID NO: 22
- CD137-gRNA1: AACGTGGCATCTGTGACCC, SEQ ID NO: 45
- CD137-gRNA2: GCGCTGGAGAACTATTTGG, SEQ ID NO: 46
- CD137-gRNA3: ACATTTAACGATCAGAAACG, SEQ ID NO: 47
- CD137-gRNA4: GGTCCTTTGTCCACCTGCGC, SEQ ID NO: 48
- CD137-gRNA5: GAGAACTATTTGGAGGACA, SEQ ID NO: 49
- CD137-gRNA6: GGAGAACTATTTGGAGGAC, SEQ ID NO: 50
- [0599]
- [0600] 스크리닝 후, 각 유전자에 대해 높은 녹아웃 효율을 갖는 gRNA가 발견되었으며, 2개의 유전자, TCR/CD137을 녹아웃시켰을 때 고효율이 또한 관찰되었다.
- [0601] 7.3 CAR-T 세포의 제조
- [0602] 세포 단리 및 활성화
- [0603] 성분채집 후, 밀도 구배 원심분리에 의해 히스토페이크-1077 (시그마-알드리치)을 사용하여 단핵구를 단리하였다. 그 후, T 세포를 농축시키고, 항-CD3/항-CD28과 커플링된 자성 비드에 의해 활성화하고, 배양하고, 확장시켰다.
- [0604] 5% FBS, 2mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨 및 300IU/ml rhIL2를 갖는 엑스-비보 15를 CAR-T 세포 배지로써 사용하였다. 세포를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 인큐베이션하고 배양하였다.
- [0605] 항-CD3/항-CD28 자성 비드를 사용하여 동종 T 세포를 활성화시켰다.
- [0606] K562 세포를 PBNK와 공동배양함으로써 동종 PBNK 세포를 활성화시켰다.
- [0607] 활성화 전 및 후의 세포 표면 상의 CD137의 발현을 유동 세포계측법에 의해 결정하였다.
- [0608] 전기천공 및 렌티바이러스 감염
- [0609] T 세포 농축 및 활성화 2일 후, 항-CD3/항-CD28 자성 비드를 제거하고, 세포를 튜브에 수집하고, 300g에서 5분 동안 원심분리한 후, DPBS로 2회 세척하고, opti-mem에서 50×10^6 개/ml의 세포 밀도로 재현탁하였다. 필요한

cas9/gRNA RNP의 양을 세포 밀도를 기준으로 계산한 후, 세포와 혼합하고, 4D-뉴클레오펙터 시스템 N (론자) 시스템에 의한 전기천공을 위해 옮겼다. 그 후, 세포를 예열된 배지에서 $1-2 \times 10^6$ 개/ml의 밀도로 재현탁하였다. 세포를 2-8의 MOI에서 렌티바이러스 형질감염에 추가로 적용한 후, 플라스크로 옮기고, 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터에서 배양하였다.

[0610] 세포 증식 및 CAR 양성 비율의 검출

[0611] 형질감염 4일 후, 세포 수 및 CAR 양성 세포를 검출하고, T 세포에서 CAR의 양성 비율을 계산하였다. 녹아웃 효율을 결정하기 위해 TCR (또는 CD3) 및 CD137의 양성 비율을 또한 검출하였다. 그 후, 세포를 인큐베이터에서 연속적으로 배양하고, 배지의 절반을 2-3일마다 세포가 동결보존을 위해 준비가 된 10일차까지 대체하였다. 예시적인 워크플로우는 도 53에 나타낸다.

[0612] 결과는 CAR의 양성 비율 및 CD3의 음성 비율이 모두 제조된 CD19-CD137 CAR-T 세포에서 높았음을 보여준다.

[0613] 7.4 시험관내 사멸 효과 및 시토카인의 방출

[0614] 실시예 7.3에서 제조된 이중 CAR-T 세포 및 CFSE 표지된 CD19 양성 종양 세포 (Raji) 및 CD137 양성 세포 (활성화된 동종 T 세포 또는 활성화된 동종 PBNK 또는 NK92) (각각 100u1)를 각 세포에 대해 1×10^6 개/ml의 밀도로 1:1 비율로 RPMI 배지에서 혼합한 후, 96-웰 플레이트에서 밤새 내지 1주 동안 배양하였다. CAR-T 세포 및 CFSE-표지된 표적 세포의 수를 유동 세포계측법에 의해 검출하여, 공동배양 동안 CAR-T 세포 및 표적 세포 간의 사멸 효과를 결정하였다. 더욱이, 공동배양 배지를 또한 수집하고 원심분리하고, 방출된 시토카인 IFN- γ 및 IL-2를 시토카인 비드 어레이 키트 (CBA 키트, 비디 바이오사이언시스)에 의해 검출하였다.

[0615] 결과는 CD19-CD137 CAR-T 세포를 Raji, 동종-T 또는 동종-NK 세포와 함께 인큐베이션하는 것이 다량의 IFN- γ 및 IL-2를 생성하였음을 보여주며, 이는 CD19 양성 또는 CD137 양성 표적 세포에 대한 CAR-T의 기능을 나타낸다. 유동 세포계측법 결과는 또한 CD19-CD137 이중 CAR T 세포에 대한 동종-T 및 동종-NK의 사멸 효과가 CD19 단일 CAR T 세포에 대한 것보다 유의하게 더 적었음을 나타낸다.

[0616] 추가 실험은 CD19-CD137 이중 CAR T 세포가 오직 CD137 양성 세포 및 NK 세포를 제거함을 보여주지만, CD137 음성 불활성화된 T 세포 또는 NK 세포에 대한 어떠한 유의한 사멸 효과도 보여주지 못하였으며, 이는 CD137 CAR의 특이성을 나타낸다.

[0617] 7.5 생체내 효능

[0618] 6-12주 NOD/Shi-scid/IL-2R γ null (NOG) 마우스를 선택하고, 2×10^5 개 Raji-ffluc 세포 및 동종-T 세포를 정맥내로 주사하였다. 5일 후, 마우스의 종양 이식편 부담을 측정하고, 마우스를 종양 부담에 기반하여 4개의 그룹으로 나누었다. 하루 후, 200 μ L DPBS, 0.5×10^6 개 CD19 CAR-T 세포 및 0.5×10^6 개 CD19-CD137 CAR-T 세포를 각 마우스에 각각 주사하였다. 마우스의 종양 부담을 모든 CAR-T 처리 후 7일마다 추가로 평가하였다. 각 마우스에 4-분 반응 동안 3 mg d-루시페린을 복강내로 주사한 후, 30초 노출로 제노젠 IVIS 이미징 시스템을 사용하여 사진을 촬영하였다.

[0619] 결과는 CD19-CD137 CAR-T가 CD19 CAR-T 세포와 비교하여 종양 부담을 유의하게 감소시켰고, CD19-CD137 CAR-T 세포가 CD19 CAR-T 세포보다 유의한 더 우수한 생체내 확장을 나타내었음을 보여주며, 이는 CD19-CD137 CAR-T 세포가 더 잘 생존하고 생체내에서 CD19 양성 종양 세포를 제거하는 더 강한 능력을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0620] 7.6 생체내 GVHD 연구

[0621] 마우스를 먼저 치사-미만 용량의 방사선조사 (175 cGy)로 전신 처리하였다. 그 후, CAR-T 세포를 PBS에 재현탁하고, 처리된 마우스의 흉부에 주사하였다. 체중 감소, 아치형-등, 활동성, 모피 질감 및 피부 무결성을 포함하는 GVHD 임상 기준을 사용하여 마우스를 일주일에 2-3회 관찰하였다.

[0622] 결과는 TCR 녹아웃이 없는 마우스가 모두 GVHD 증상을 보였으나, TCR/CD137 이중 녹아웃 CD19-CD137 CAR-T 세포 그룹에서는 GVHD가 검출되지 않았음을 보여준다.

[0623] 7.7 본원에 기재된 바와 같은 CAR의 구축에서 사용된 추가 서열

4-1BB-L (SEQ ID NO: 51)

MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLAAACAVFLACP
WAVSGARASPGSAASPRREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY
SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ
PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW
QLTQGATVVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

4-1BB PF-05082566 scFv VH (SEQ ID NO: 52)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYP
GDSYTNYSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGT
LTVSS

[0624] 4-1BB PF-05082566 scFv VL (SEQ ID NO: 53)

MSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKN
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL

4-1BB BMS-663513 scFv VH (SEQ ID NO: 54)

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFSGYYWSWIRQS PEKGLEWIGE
INHGGYVTYNPSLESRTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG
PGNYDWYFDLWGRGTLTVSS

4-1BB BMS-663513 scFv VL (SEQ ID NO: 55)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRTATGIPARFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF
CGGTKVEIKR

AAC VL-VH (SEQ ID NO: 56)

MALPVTALLPLALLLHAARPMSEYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYA
HWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATY
TGFGSLAVFGGGTKLTVLGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKG
SGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSFQGGVTISADKSISTAYLQ
WSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGT LTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRP
EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
FMRPVQTTQEEDGCSRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

AAC DNA 서열 VL-VH (SEQ ID NO: 57)

ATGGCCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACG
CCGCCAGGCCCATGAGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGCGTGAGCCCC
GGCCAGACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAACATCGGCGACCAGTACGCCCA
CTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTGATCTACCAGGACAAGA
ACAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGGTTACGCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGC
CACCTGACCATCAGCGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACTACTGCGCCA
CCTACACCGGCTTCGGCAGCCTGGCCGTGTTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTG
CTGGGCAGCACCAGCGGCAGCGCAAGCCCGCAGCGGCAGGGCAGCACCAAGG
GCGAGGTGCAGCTGGTGACAGCGGCGCGGAGGTGAAGAAGCCCGGCAGAGCCT
GAGGATCAGCTGCAAGGGCAGCGGCTACAGCTTCAGCACCTACTGGATCAGCTGGG
TGAGGCAGATGCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGAGTGGGCAAGATCTACCCCGGCGA
CAGCTACACCAACTACAGCCCCAGCTTCAGGGCCAGGTGACCATCAGCGCCGACA
AGAGCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCAGCGACACCGCC

[0625]

ATGTACTACTGCGCCAGGGGCTACGGCATCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCT
GGTGACCGTGAGCAGCAGCGGACCAACACCCCCGCCCCAGGCCCCACCCCCG
CCCCACCATCGCCAGCCAGCCCCTGAGCCTGAGGCCCAGGCCTGCAGGCCCGCC
GCCGGCGGCGCCGTGCACACCAGGGGCTGGAATTCGCTGCGACATCTACATCTG
GGCCCCCTGGCCGGCACCTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGATCACCTGTA
CTGCAAGAGGGGCAGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGGC
CCGTGCAGACCACCCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAGGTTCCCCGAGGAGGA
GGAGGGCGGCTGCGAGCTGAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCCGACGCCCCGCC
TACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGG
AGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCAGGGACCCGAGATGGGCGGCAAGCC
CAGGAGGAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATG
GCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCC
ACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTG
CACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTGA

AAC VH-VL (SEQ ID NO: 58)

ATGGCCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACG
CCGCCAGGCCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGG
CGAGAGCCTGAGGATCAGCTGCAAGGGCAGCGGCTACAGCTTCAGCACCTACTGGA
TCAGCTGGGTGAGGCAGATGCCCCGGAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAAGATCTAC
CCCGGCGACAGCTACACCAACTACAGCCCCAGCTTCCAGGGCCAGGTGACCATCAG
CGCCGACAAGAGCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCAGCG
ACACCGCCATGTACTACTGCGCCAGGGGCTACGGCATCTTCGACTACTGGGGCCAG
GGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACAGCGGCAGCGGAAGCCCGGCA
GCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCATGAGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGT
GAGCGTGAGCCCCGGCCAGACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAACATCGGCG
ACCAGTACGCCCCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTGATC
TACCAGGACAAGAACAGGCCCAGCGGCATCCCCGAGAGGTTAGCGGCAGCAACA
GCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCGAC
TACTACTGCGCCACCTACACCGGCTTCGGCAGCCTGGCCGTGTTGCGCGGCGGCACC
AAGCTGACCGTGCTGAGCGGCACCAACACCCCCGCCCCAGGCCCCCAGCCCCGC
CCCCACCATCGCCAGCCAGCCCCTGAGCCTGAGGCCGAGGCCTGCAGGCCCGCCG
CCGGCGGCGCCGTGCACACCAGGGGCTGGAATTCGCTGCGACATCTACATCTGG
GCCCCCTGGCCGGCACCTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGATCACCTGTAC
TGCAAGAGGGGCAGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGGCC

[0626]

CGTGCAGACCACCCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAGGTTCCCCGAGGAGGAG
GAGGGCGGCTGCGAGCTGAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCCGACGCCCCGCCT
ACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGA
GTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGACGGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCC
AGGAGGAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG
CCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCCA
CGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC
ACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTGA

FMC63 VH (SEQ ID NO: 59)

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGS
ETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG
QGTSVTVSS

FMC63 VL (SEQ ID NO: 60)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL
HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT

FMC63 CD19 CAR (SEQ ID NO: 61)

MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL
WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNT
LPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL
PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTD
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSGTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

[0627]

[0628]

실시에 8 E4를 발현하는 U-CAR T 세포의 연구

[0629]

도 59A는 인헨서 CD47 (CAR19-CD47) 또는 E4 (CAR19-E4)를 발현하는 CD19 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. E4 설계에서, C7R의 엑토도메인은 면역 세포 억제제, 예컨대 CD47, CD24, 또는 킬러 또는 식세포 면역 세포 기능을 억제하고 치료 세포를 보호하는 다른 펩티드로부터의 엑토도메인에 의해 대체된다. CAR19-CD47 또는 CAR19-E4는 MHCII 발현이 결여되어 있으며 MHC 발현 결여로 인해 NK 세포 사멸에 대해 매우 민감한 K562 세포에서 발현되었다. CAR19 및 CD47의 발현을 유동 세포계측법에 의해 분석하였다. 도 59B는 CAR19-CD47 및 CAR19-E4 세포에 대한 NK 세포 사멸 활성을 보여준다. CD47 및 E4는 모두 K562 세포에 대한 NK 세포 사멸 정도를 감소시킬 수 있었다. 데이터는 E4가 NK 세포에 의한 사멸로부터 MHCII 음성 세포를 보호할 수 있으며, 이는 MHCII KO CAR-T 세포의 보호에서 사용될 수 있음을 보여준다.

[0630]

도 60A는 CD19 및 인산화된 STAT5 (pSTAT5)를 발현하는 TCR KO CD19 CAR-T 세포의 분획의 유동 세포계측법 데이터를 보여준다. CAR19-CD47 또는 CAR19-E4는 TCR 녹아웃 T 세포에서 발현되었고, CAR 발현 및 STAT5 인산화를 위해 접근되었다. CAR19-E2 및 CAR19-CD47 + IL2 자극을 양성 대조군으로서 사용하였다. E4는 pSTAT5의 상향조절을 매개한다. 도 60B는 인헨서 CD47 (CAR19-CD47) 또는 E4 (CAR19-E4)를 발현하는 TCR KO CD19 CAR-T 세포의 증식을 보여준다. CAR19-CD47, CAR19-E4, CAR19-C7R 발현 TCR 녹아웃 T 세포를 IL12 보충 없이 세포 증식 및 세포 생존에 대해 비교하였다. E4는 배양 배지에서 IL2 제거 후 세포 수의 유지 뿐만 아니라 더 강한 세포 증식을 매개할 수 있다. E4는 IL2 첨가 없이 더 우수한 CAR-T 세포 안정성을 유지한다. E4는 치료 세포, 예컨대 HLA-I KO가 있는 세포를 NK 세포 사멸 또는 식세포 및 T 살해 세포에 의한 사멸로부터 보호할 수 있다.

[0631]

구축물 설계의 서열: C7R의 엑토도메인은 킬러 또는 식세포 면역 세포 기능을 억제하고 CAR-T/NK 세포를 환자의 면역계에 의한 부착으로부터 보호할 수 있는 면역 세포 억제제, 예컨대 말단절단된 CD47, CD24에 의해 대체될 수 있다.

[0632] CD7CAR-E4 아미노산 서열:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHT
GNYTCEVTELTREGETIIEHKYRVVSWFSPNEPILLTCPTISILSFFSVALLVILACVLWKK
RIKPIVWPSLPDHKKLTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQD
TFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSR
LDCRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPSLQSGILTLNPVAQGPILTSLGSNQEEA
YVTMSSFYQNNQ.

[0633]

[0634] 실시예 9 T-급성 림프모세포성 백혈병 (T-ALL) 환자를 치료하기 위한 CAR7-C7R의 임상 데이터

[0635] 본 실시예는 CAR7-C7R을 사용한 임상 연구 설계 및 임상 데이터를 제공한다. 등록 당시에 골수 세포의 38.2%가 T-ALL 세포인 종양 부담을 갖는 환자를 등록시켰다. CAR7-C7R 세포를 주입하기 전에, 환자를 사전 조건부 요법으로 치료하였다. 사전 조건부 요법은 림프고갈을 위해 플루다라빈, 시클로포스파미드 및 에토포시드를 포함한 화학요법 약물을 사용하였다. 사전 조건부 요법은 더 우수한 CAR-T 생착 및 종양 클리어런스를 제공할 수 있다. 림프고갈 요법 완료 2일 후, CAR7-C7R 세포를 환자에게 1.5×10^7 개/kg으로 정맥내로 주입하였다. CAR7-C7R은 암 세포 (T-ALL 세포)를 신속하게 제거하고 선천성 면역 세포 서브세트, 예컨대 과립구 및 단핵구에 영향을 주지 않고 약 7-10일에 피크까지 확장하였다. 암 세포가 말초혈 및 골수 모두에서 완전히 제거되면, CAR7-C7R 세포는 최소 수준으로 매우 빠르게 회복되며, 이는 암 세포 클리어런스 직후 환자 자신의 면역계가 회복을 시작하도록 허용한다. 그 후, T 세포 및 NK 세포는 정상 수준으로 점차 회복한다.

[0636] 도 67은 T-급성 림프모세포성 백혈병 (T-ALL) 환자를 치료하기 위한 CAR7-C7R의 임상 데이터를 보여준다. 임상 연구에 사용된 CAR7-C7R의 구조물은 도 17에 나타난다. 도 67A는 말초혈에서 T-ALL 제거의 동역학을 보여준다. T-ALL 세포는 7-10일 이내에 빠르게 제거되었다. T-ALL 세포 농도를 말초혈에서 유동 세포계측법에 의해 측정하였다. 도 67B 및 C는 CAR7-C7R 세포 확장 동역학을 보여주며, 여기서 도 67B는 말초혈에서의 CAR7-C7R 세포 농도를 보여주고, 도 67C는 말초혈 세포의 CAR7-C7R DNA 카피/ug DNA를 보여준다. 도 67D 및 E는 골수 및 말초혈에서 과립구 및 림프구 (T 및 NK 세포) 회복을 보여준다.

[0637] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에 도시되고 설명되었지만, 이러한 실시양태는 단지 예로서 제공된다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 본 발명은 명세서 내에 제공된 특정 예에 의해 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명은 상기 언급된 명세서를 참조하여 설명되었지만, 본원의 실시양태의 설명 및 예시는 제한적인 의미로 해석되지 않는다. 이제 본 발명에서 벗어나지 않고 수많은 변경, 변화 및 치환이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 발생할 것이다. 더욱이, 본 발명의 모든 측면은 다양한 조건 및 변수에 의존하는 본원에 기재된 특정 묘사, 구성 또는 상대적 비율에 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명의 실시예에 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 또한 임의의 이러한 대안, 변형, 변경 또는 등가물을 포함할 것으로 고려된다. 하기 청구범위는 본 발명의 범위를 정의하고, 이러한 청구범위 내의 방법 및 구조 및 이들의 등가물이 이에 의해 커버되도록 의도된다.

도면

도면1

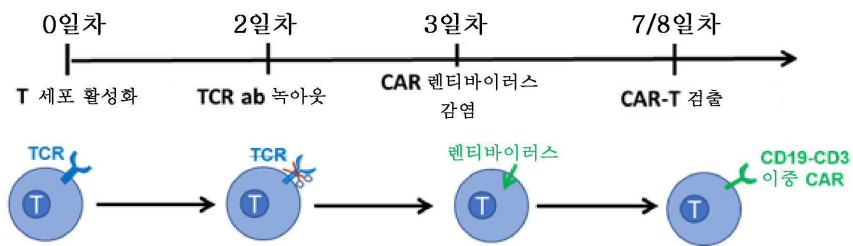
tEGFR 2A SP CD3e scFv Lk CD19 scFv H TM CD28 CD3z

병렬: tEGFR 2A CD19 scFv CD28 CD3z 2A CD3 scFv 41BB CD3z

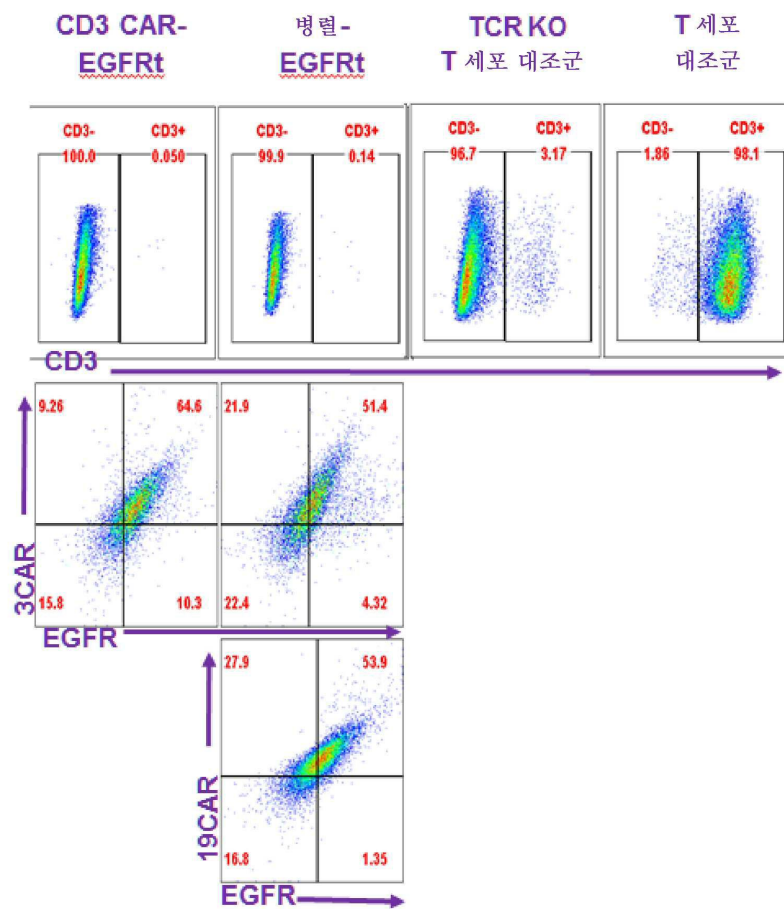
탠덤: tEGFR 2A CD3 scFv CD19 scFv 41BB CD3z

루프: CD19 VL CD3 VL CD3 VH CD19 VH 41BB CD3z

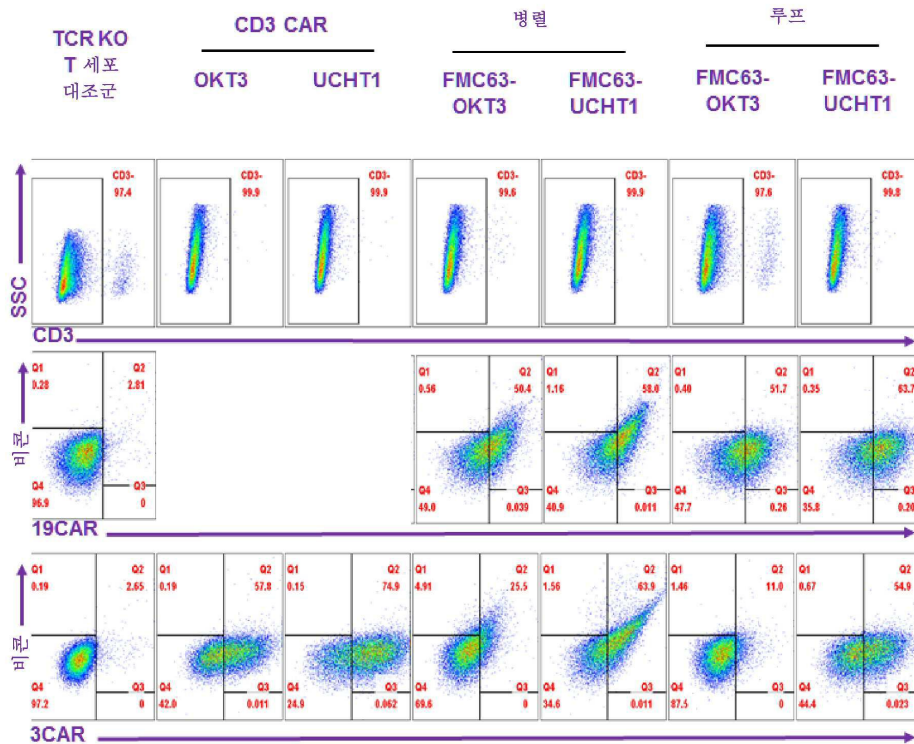
도면2



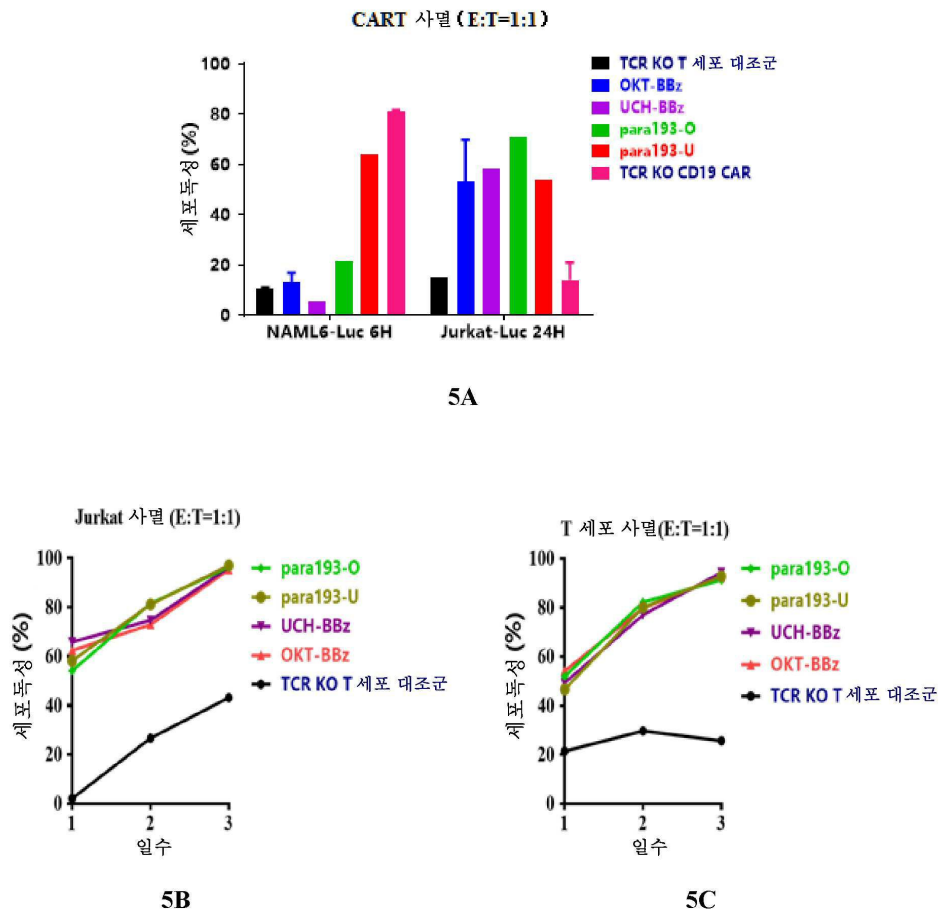
도면3



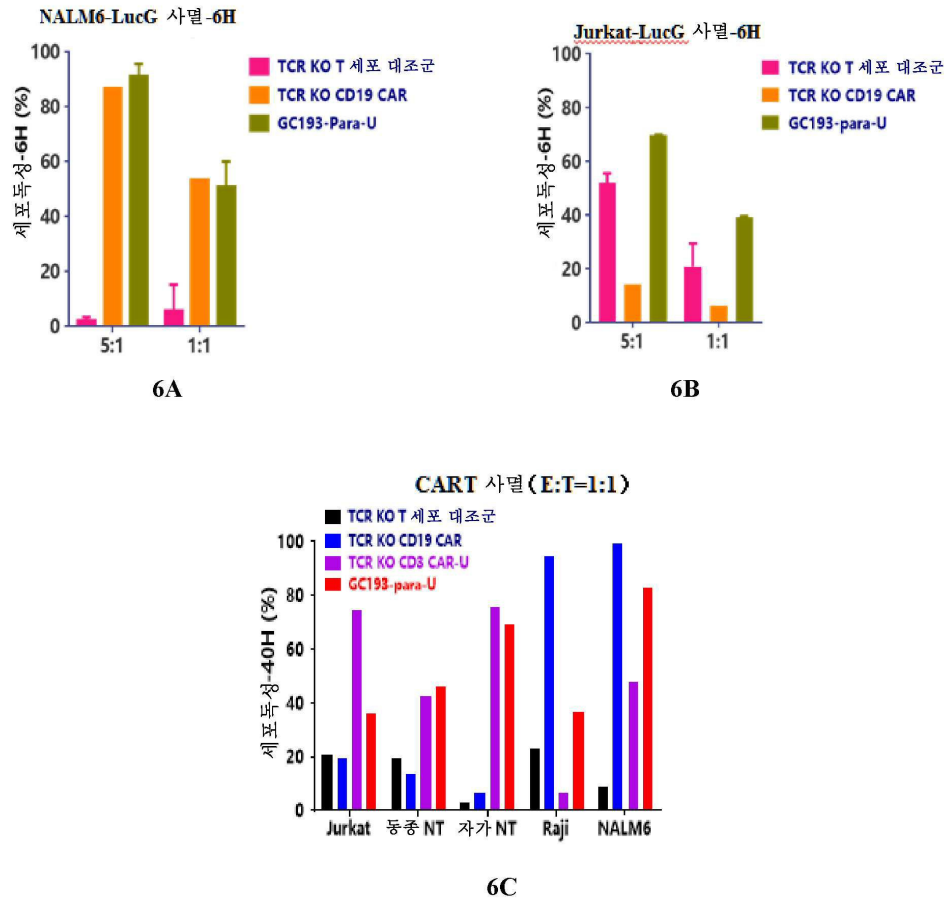
도면4



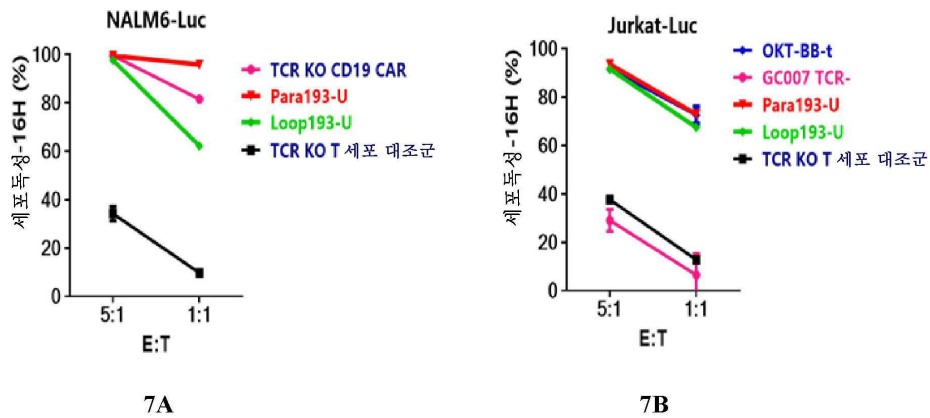
도면5



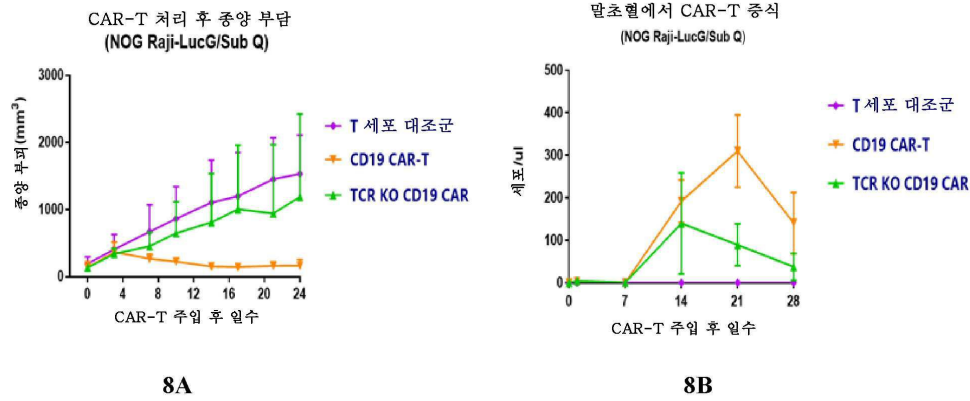
도면6



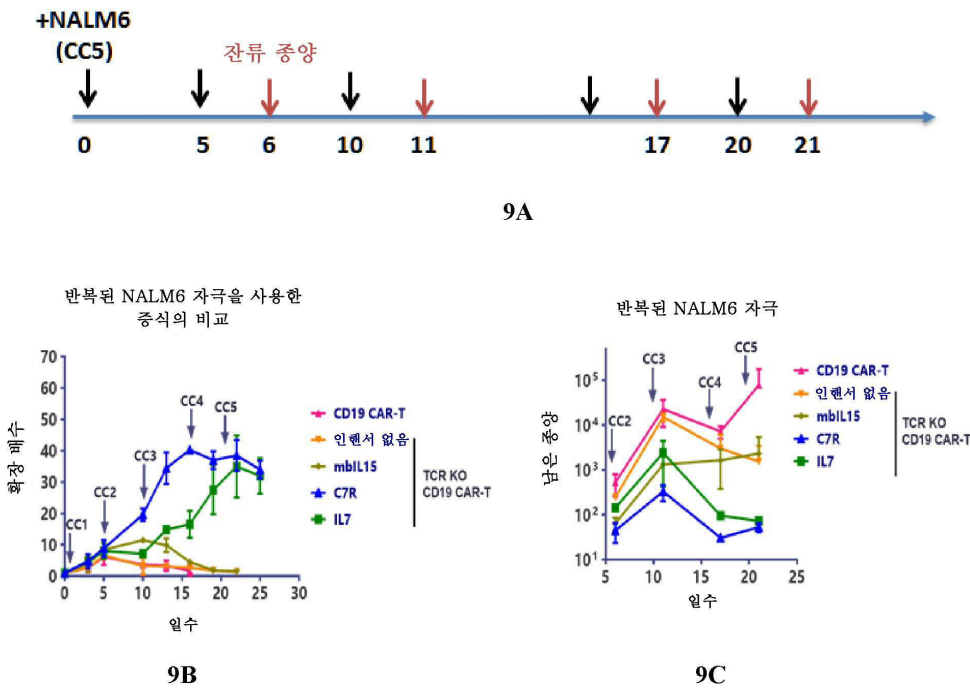
도면7



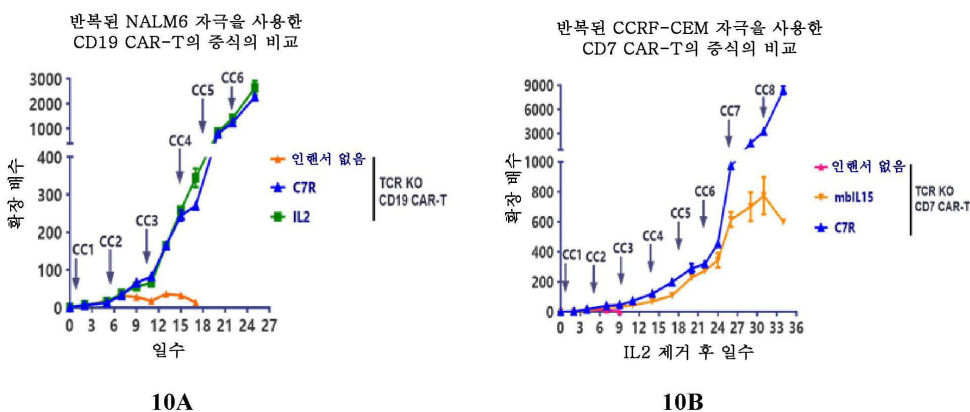
도면8



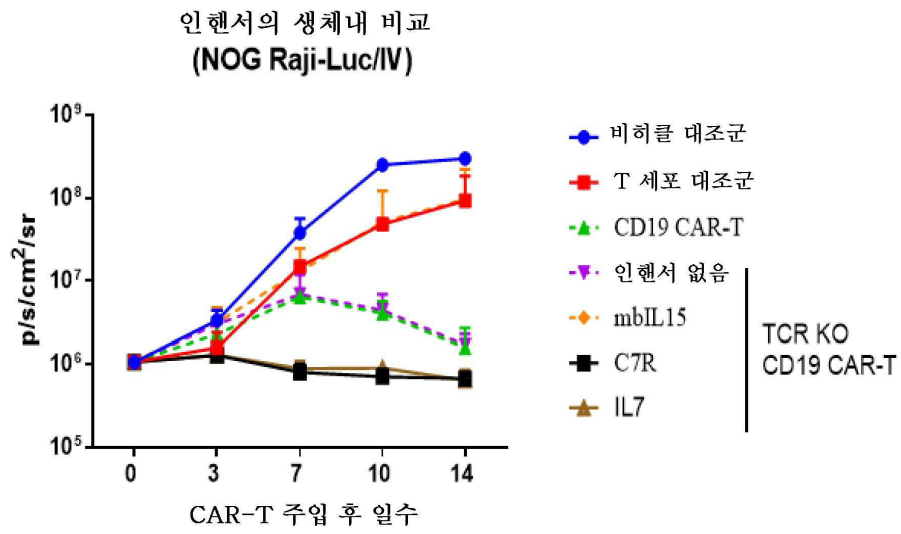
도면9



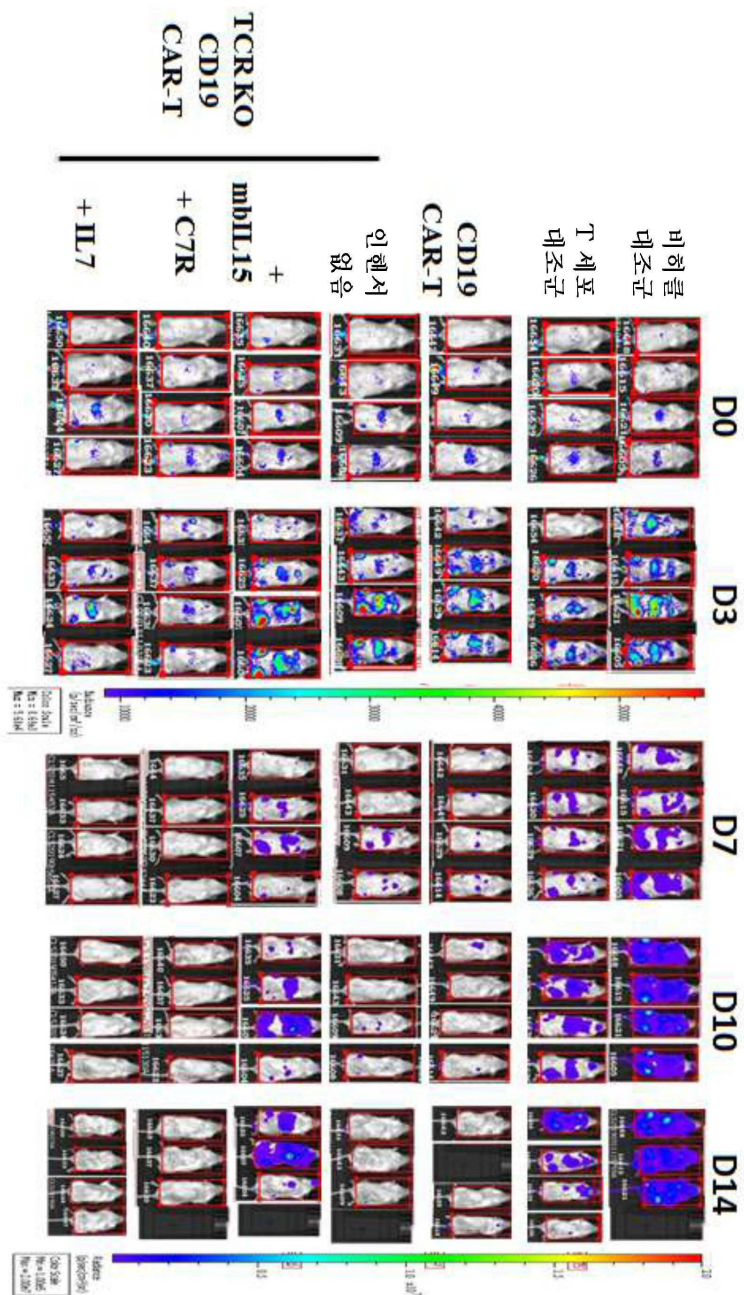
도면10



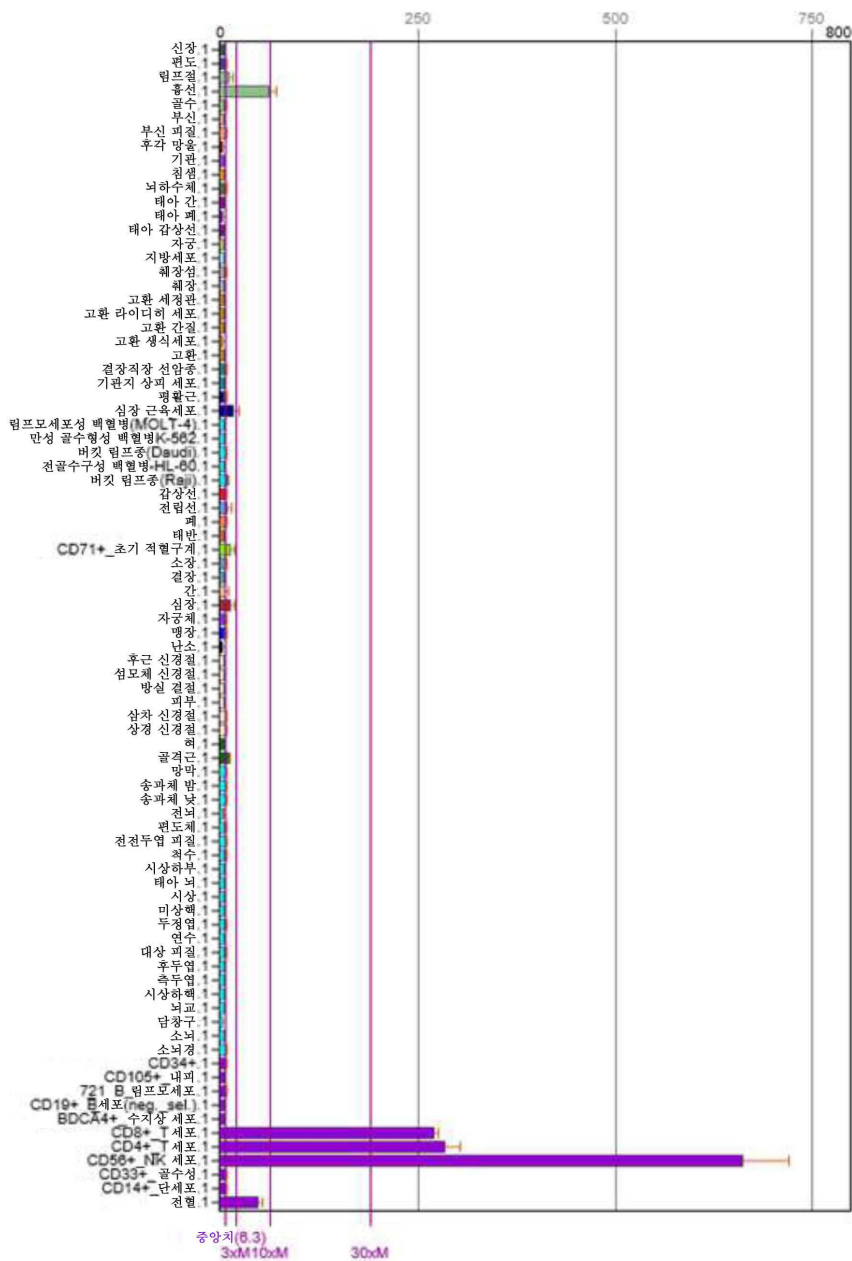
도면11



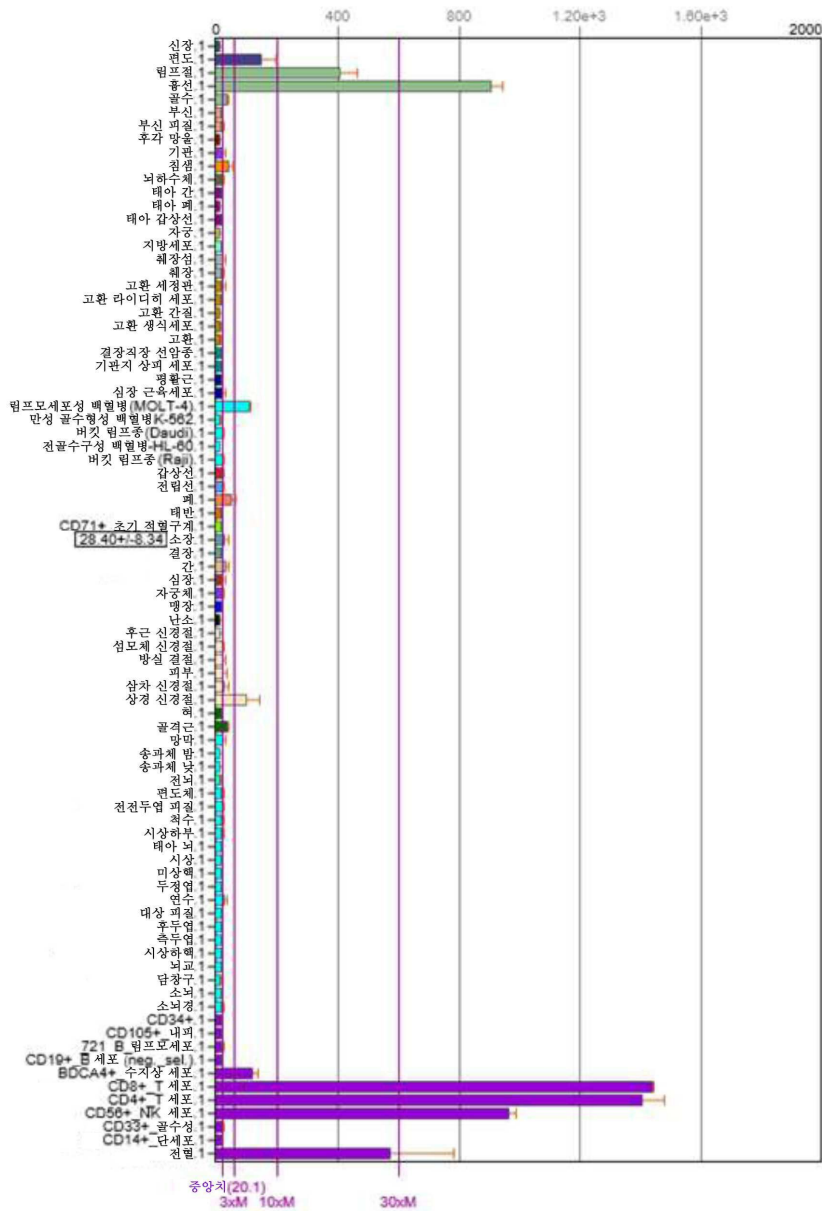
도면12



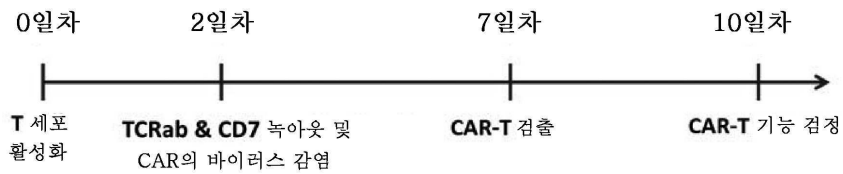
도면13



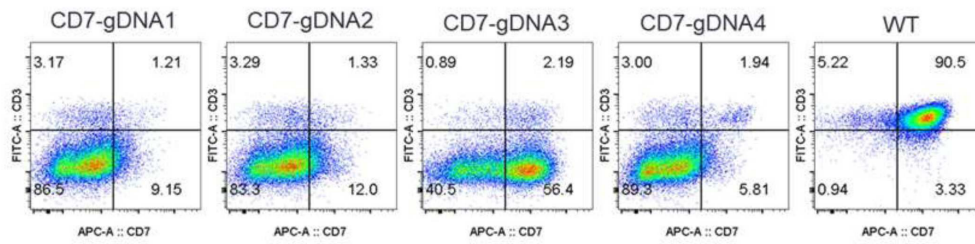
도면14



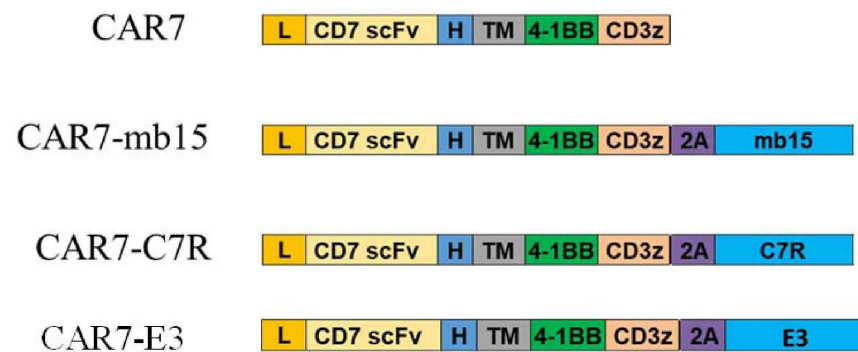
도면 15



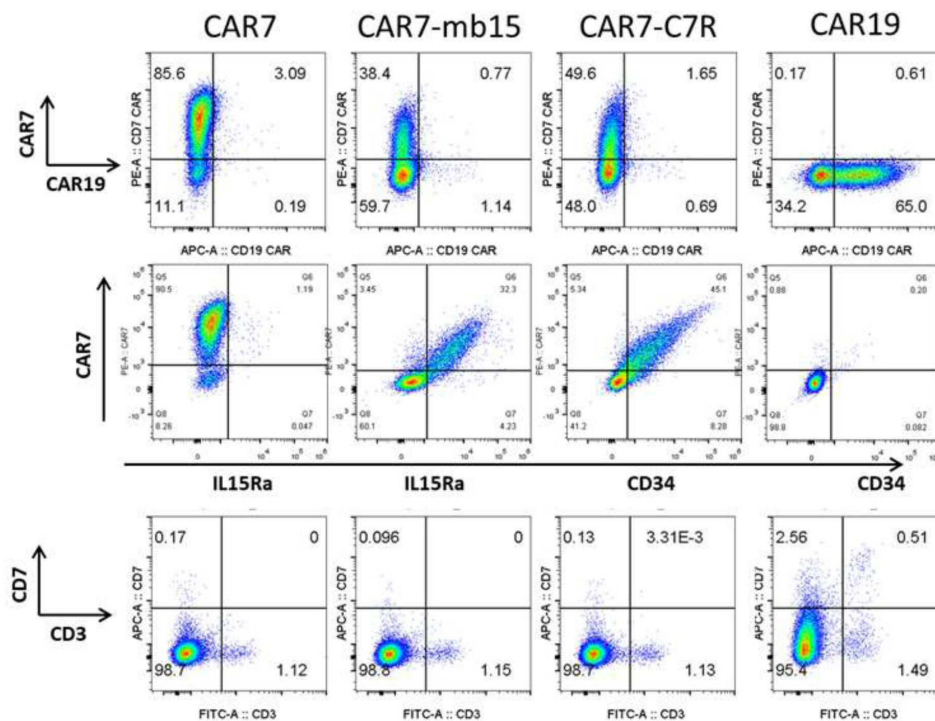
도면16



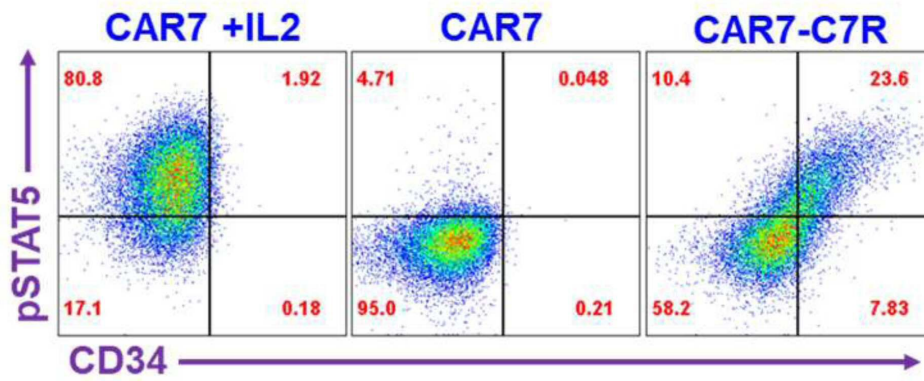
도면17



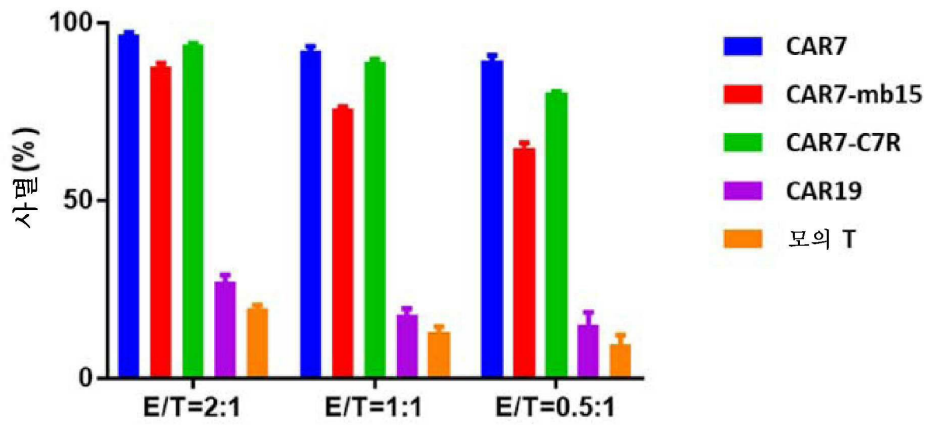
도면18



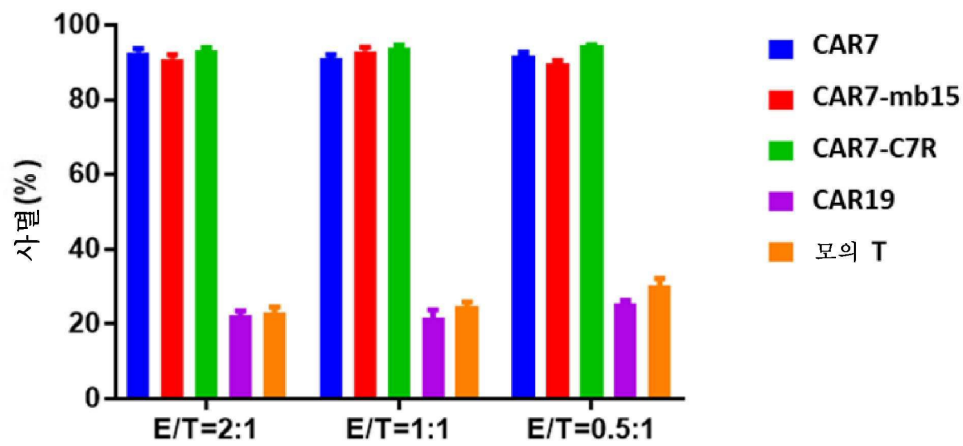
도면19



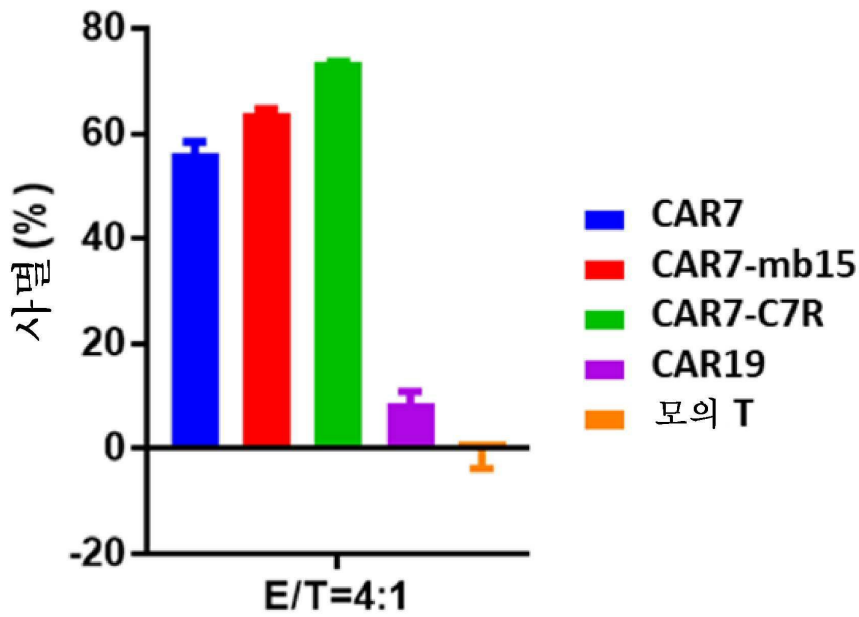
도면20



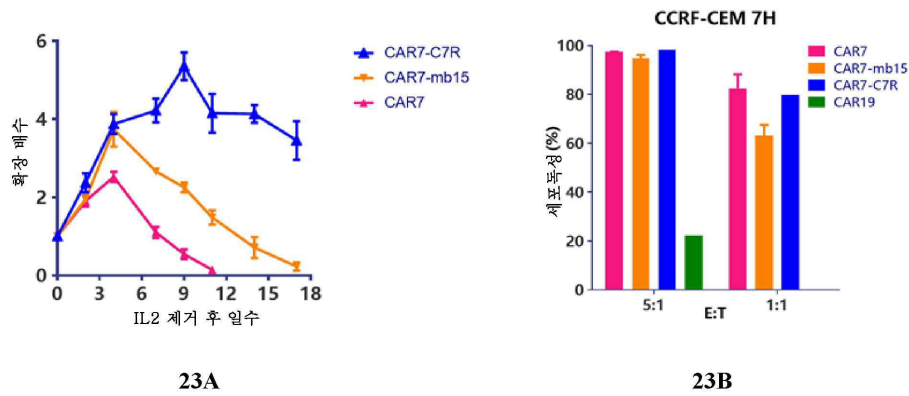
도면21



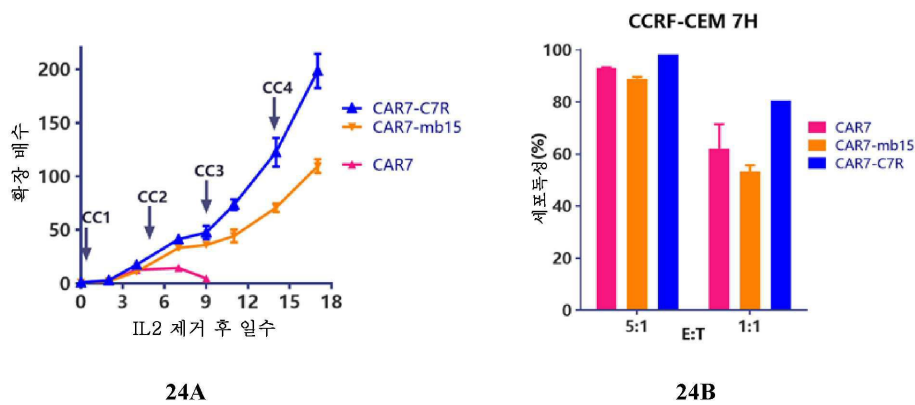
도면22



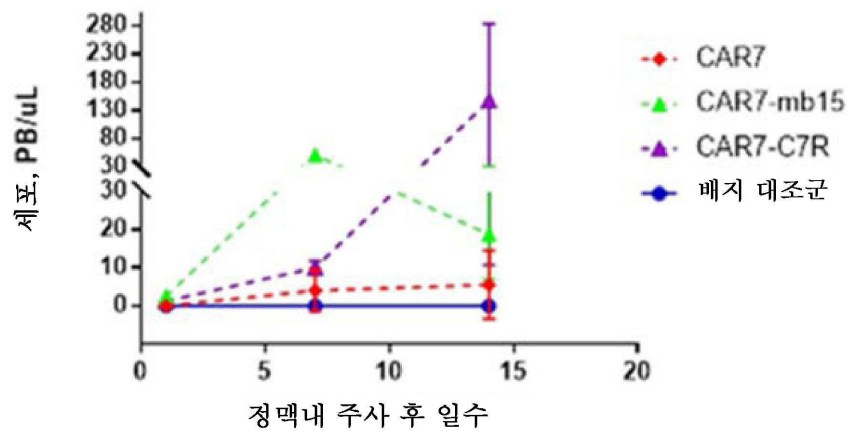
도면23



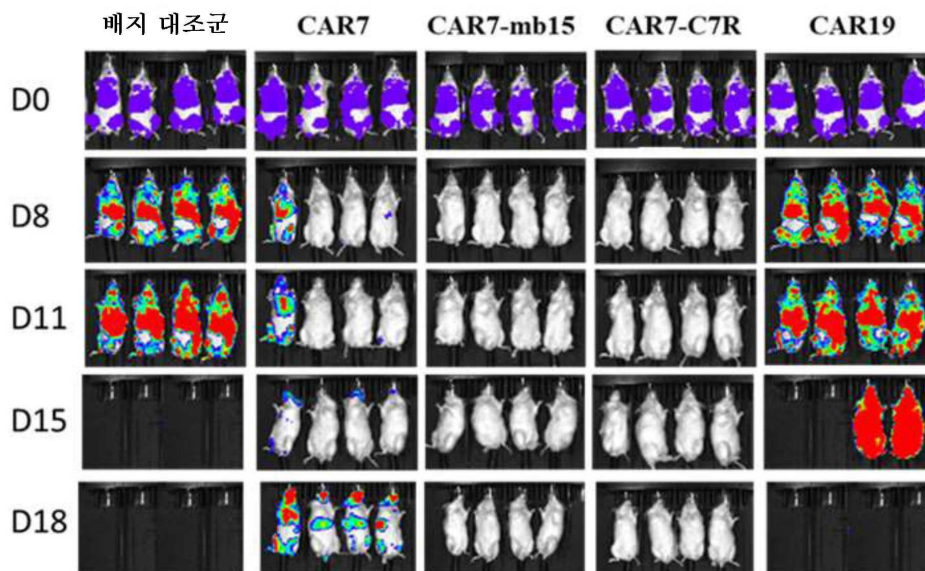
도면24



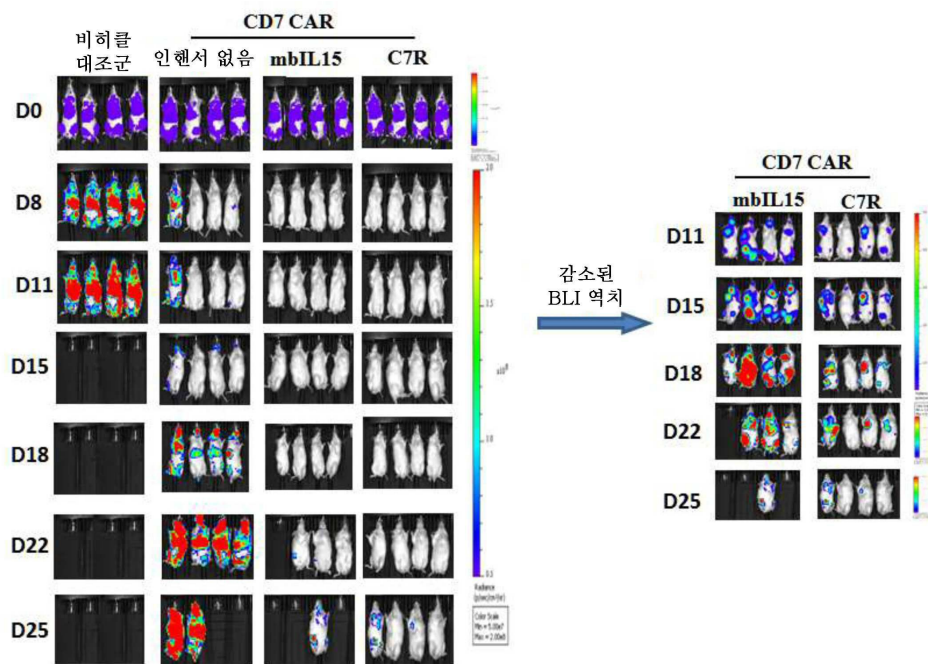
도면25



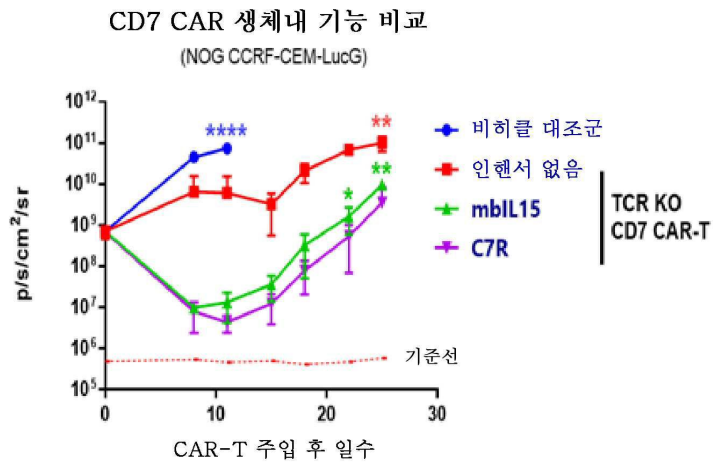
도면26



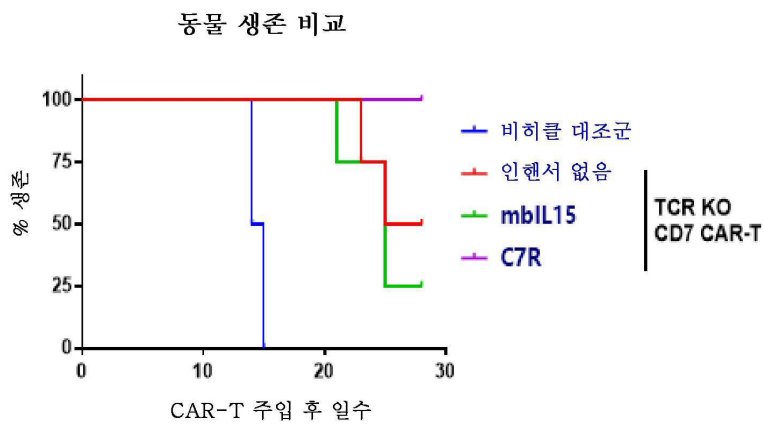
도면27



도면28



28A



28B

도면29

RQR8-CD19CAR-mbIL15	RQR8	2A	CD19 scFv	bc	CD28	CD3z	2A	mbIL15		
RQR8-CD19CAR-mbIL15-IL7	RQR8	2A	CD19 scFv	bc	CD28	CD3z	2A	mbIL15	2A	slL7
RQR8-CD19CAR-C7R	RQR8	2A	CD19 scFv	bc	CD28	CD3z	2A	C7R		
RQR8-CD19CAR-mbIL7	RQR8	2A	CD19 scFv	bc	CD28	CD3z	2A	mbIL7		

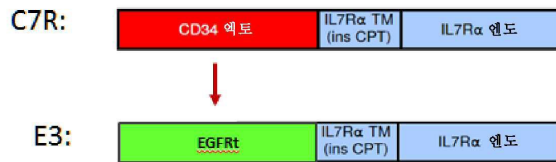
도면30

CAR7-E3

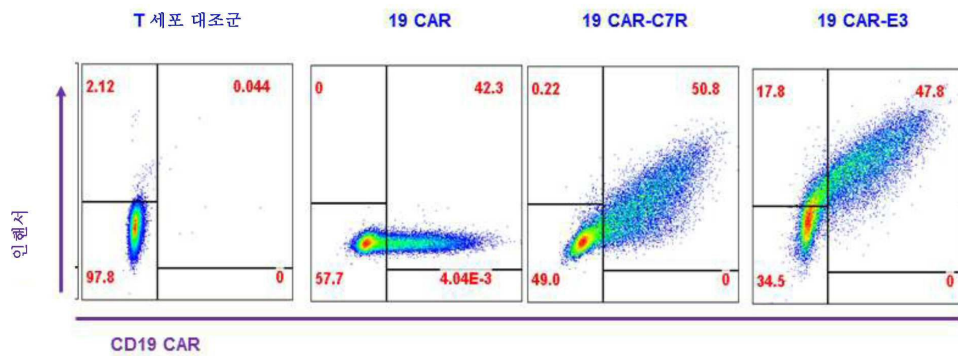
L	CD7 scFv	H	TM	4-1BB	CD3z	2A	E3
---	----------	---	----	-------	------	----	----

CAR19-E3

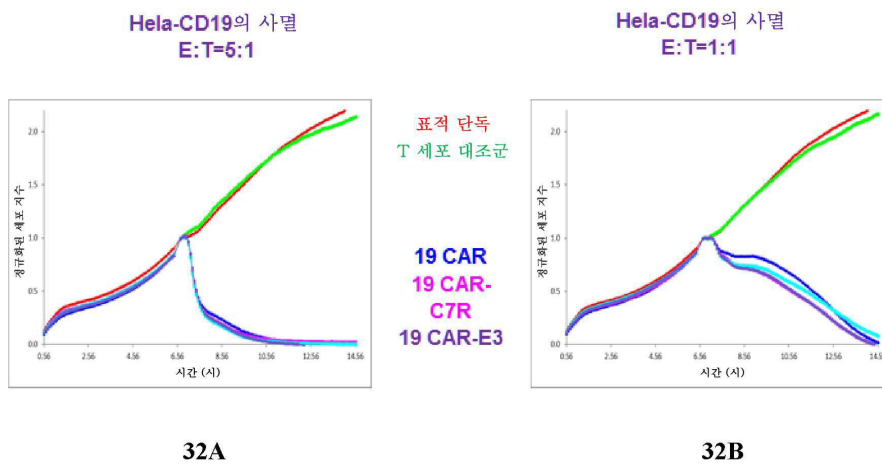
L	CD19 scFv	H	TM	4-1BB	CD3z	2A	E3
---	-----------	---	----	-------	------	----	----



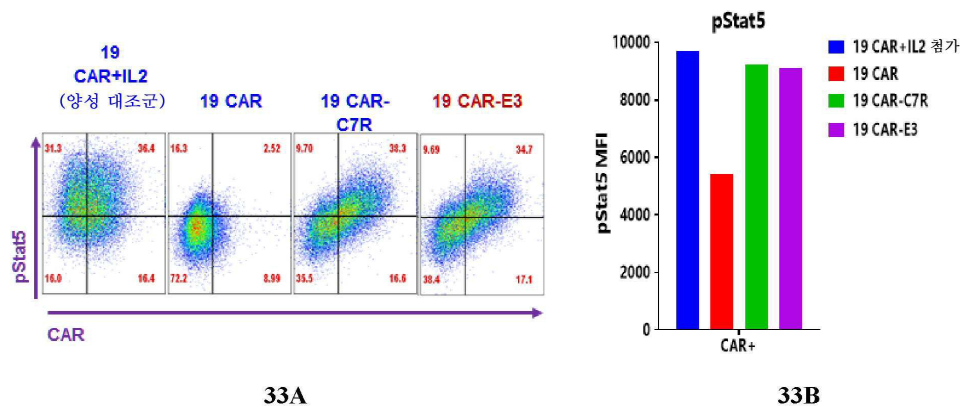
도면31



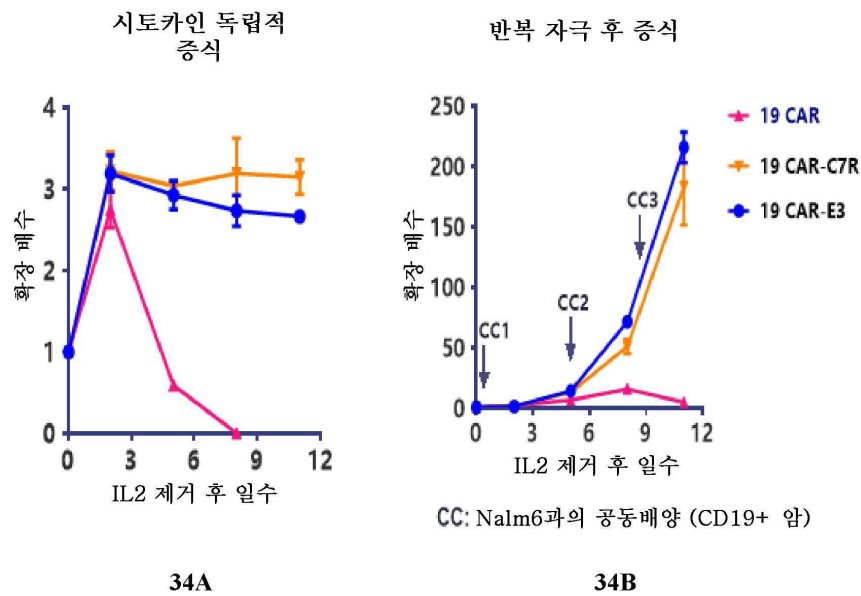
도면32



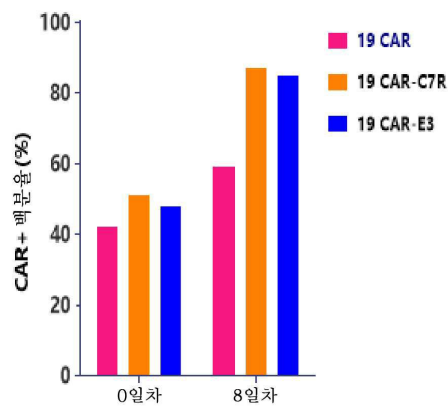
도면33



도면34

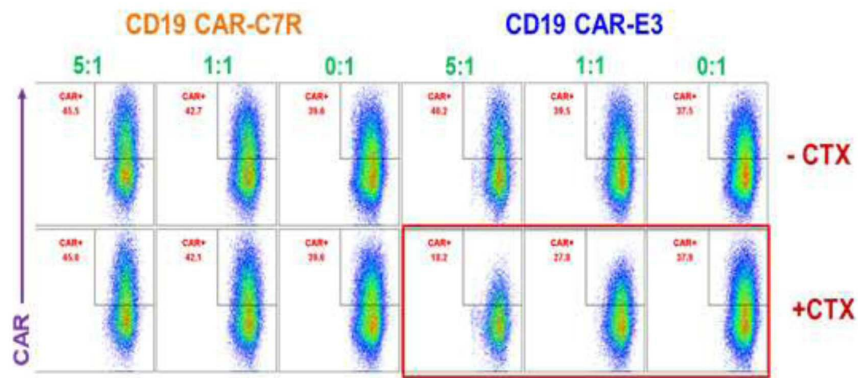


반복 자극 전후 CAR+ %

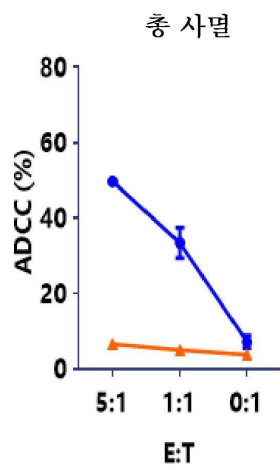


34C

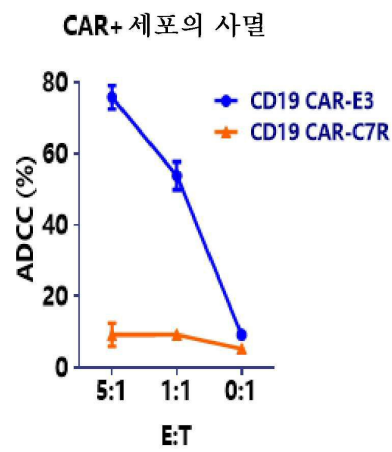
도면35



35A

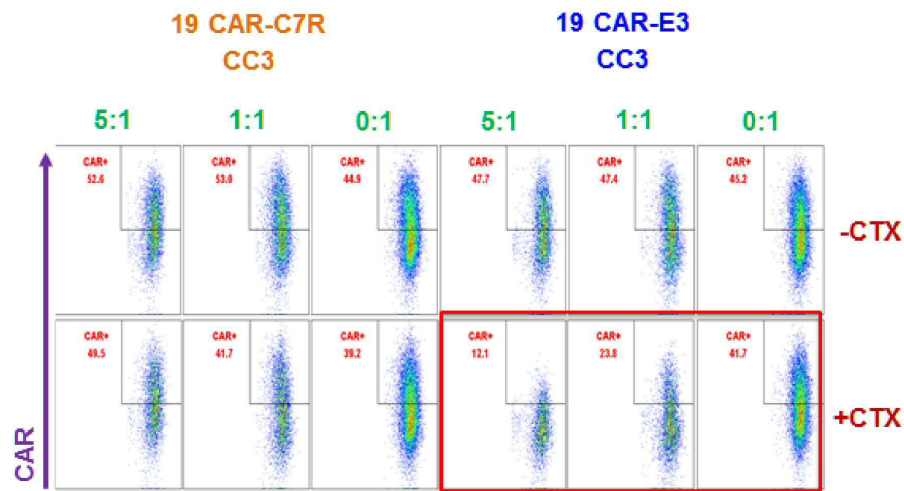


35B



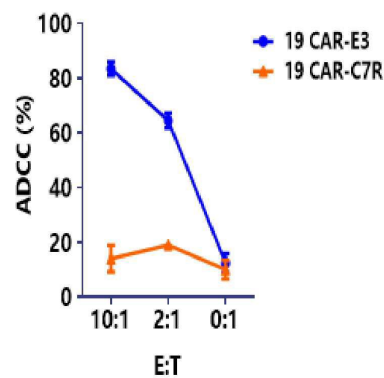
35C

도면36



36A

CAR+세포의 사멸

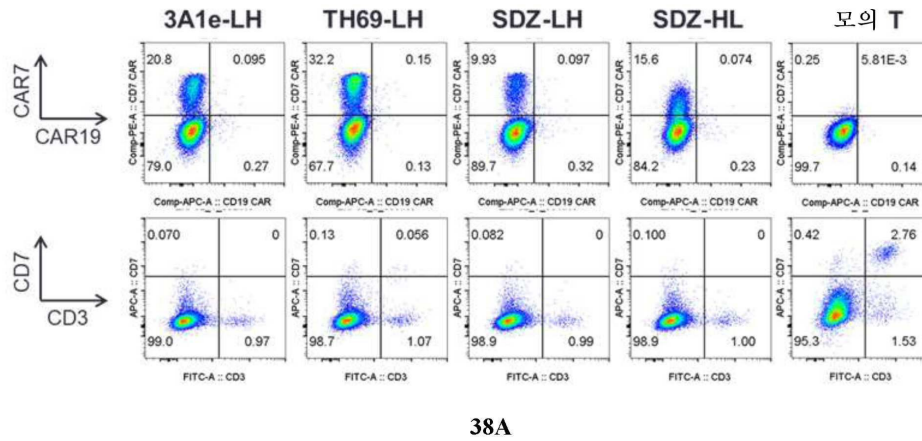


36B

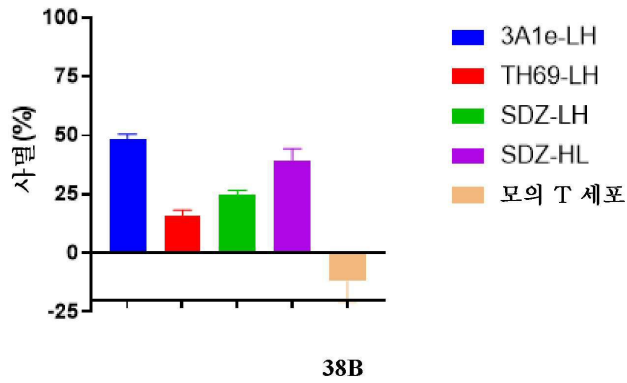
도면37

L719-LHLH	SP	CD19 VL	CD7 VH	CD7 VL	CD19 VH	H	TM	4-1BB	CD3z
L719-HLHL	SP	CD19 VH	CD7 VL	CD7 VH	CD19 VL	H	TM	4-1BB	CD3z
T197-LHLH	SP	CD19 VL	CD19 VH	CD7 VL	CD7 VH	H	TM	4-1BB	CD3z
T197-LHLH (EAAAK)3	SP	CD19 VL	CD19 VH	CD7 VL	CD7 VH	H	TM	4-1BB	CD3z
T719-LHLH	SP	CD7 VL	CD7 VH	CD19 VL	CD19 VH	H	TM	4-1BB	CD3z
T719-LHHL	SP	CD7 VL	CD7 VH	CD19 VH	CD19 VL	H	TM	4-1BB	CD3z

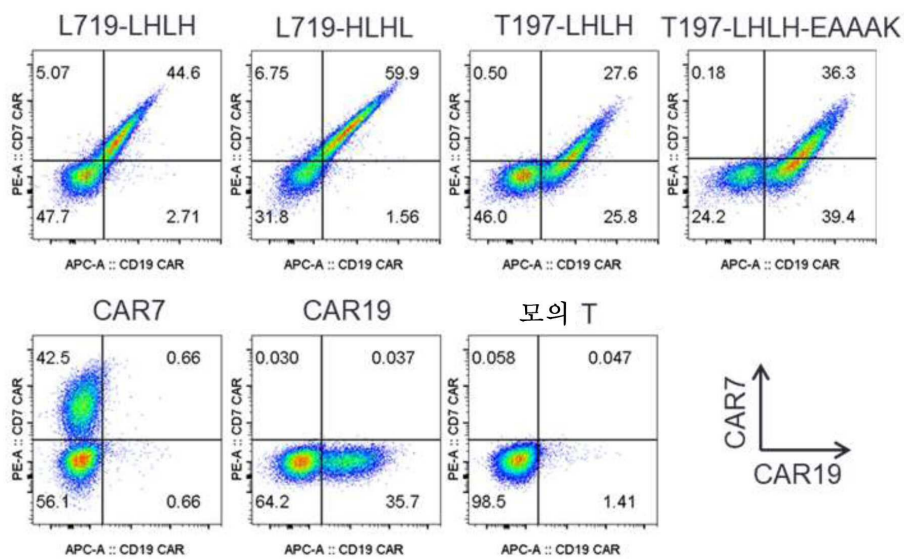
도면38



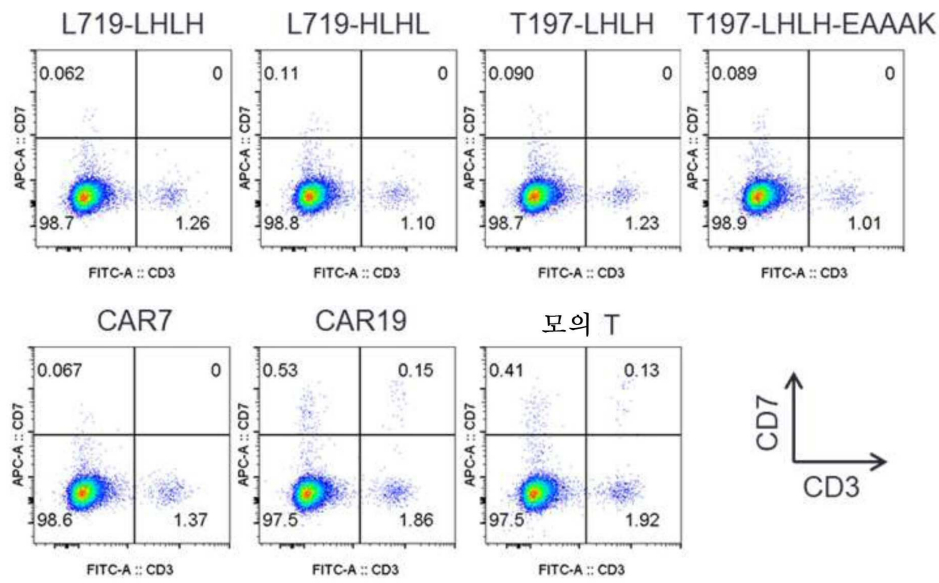
6시간 사멸



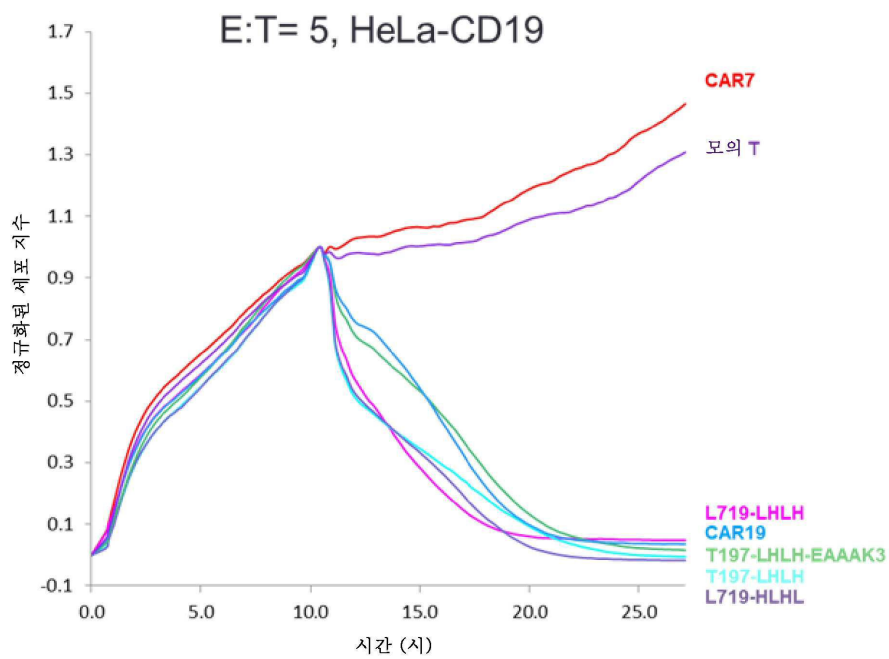
도면39



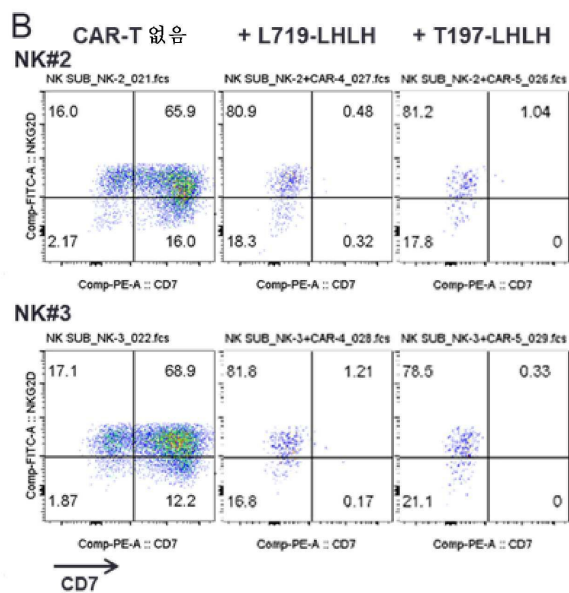
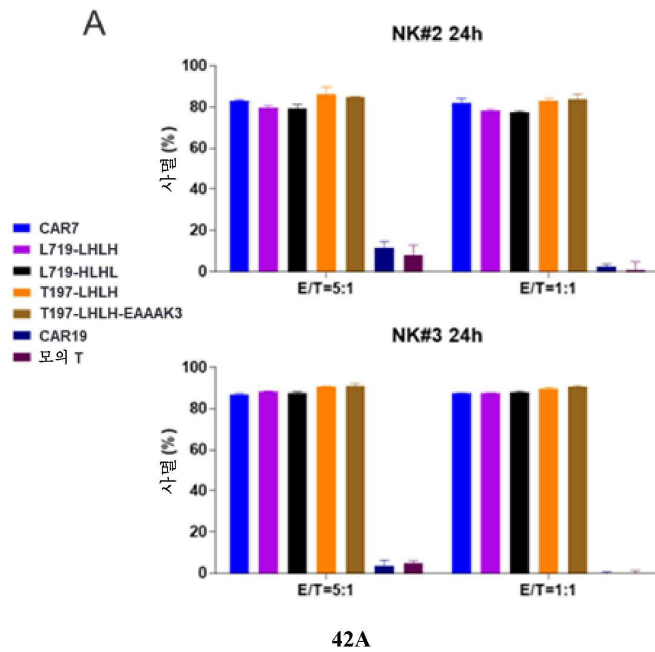
도면40



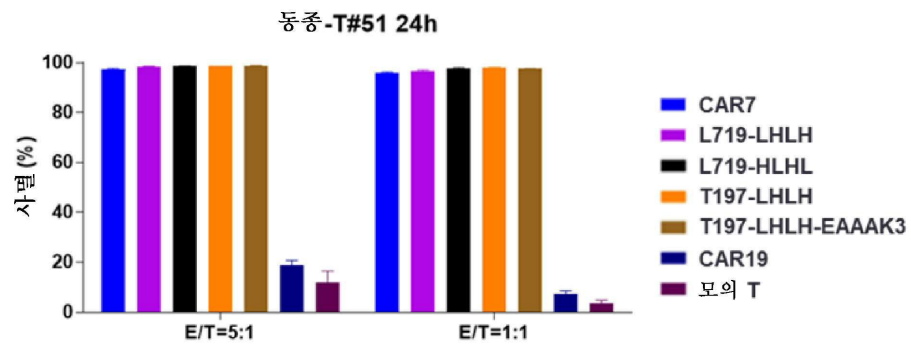
도면41



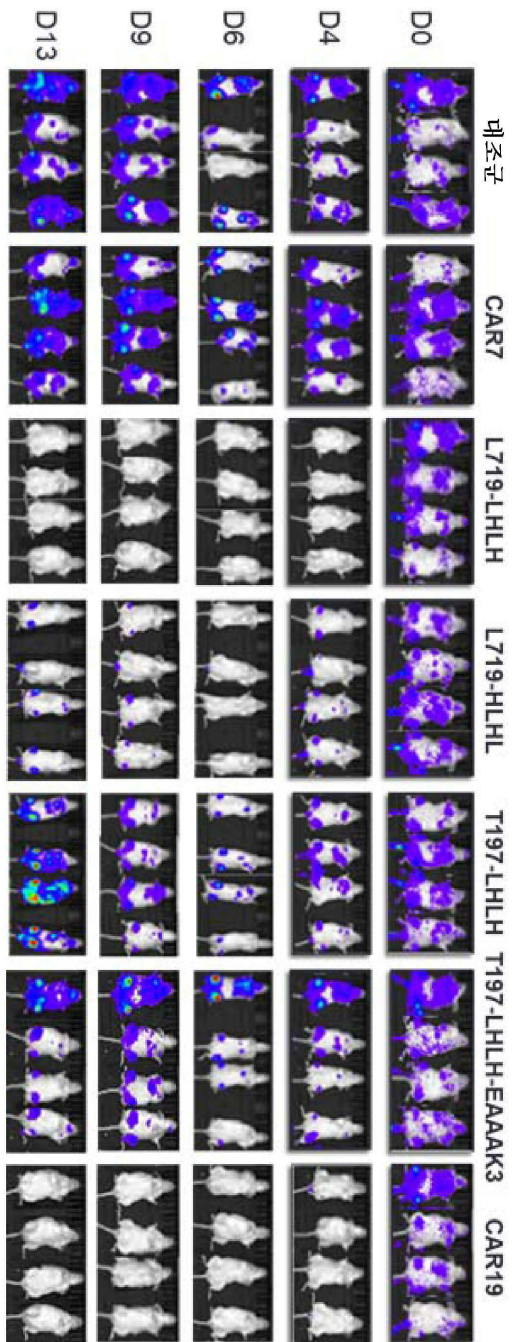
도면42



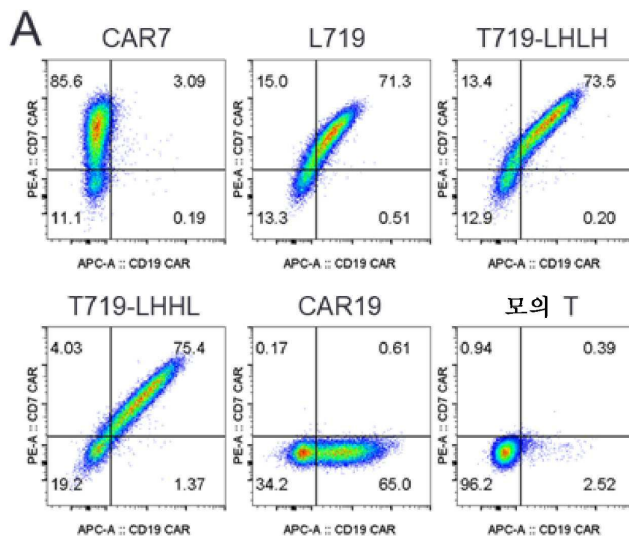
도면43



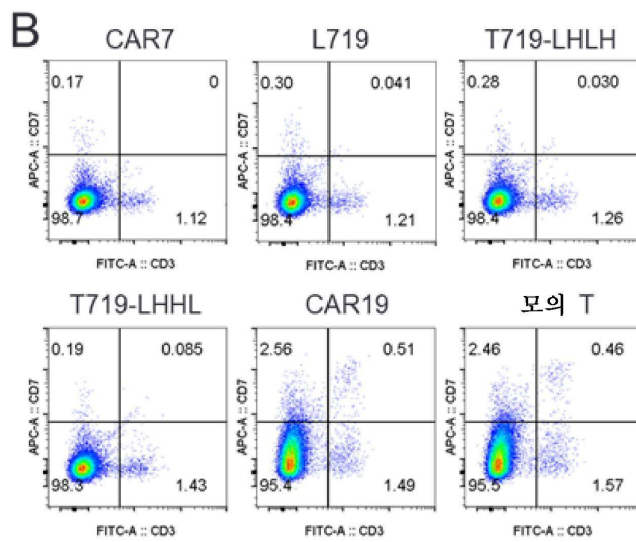
도면44



도면45

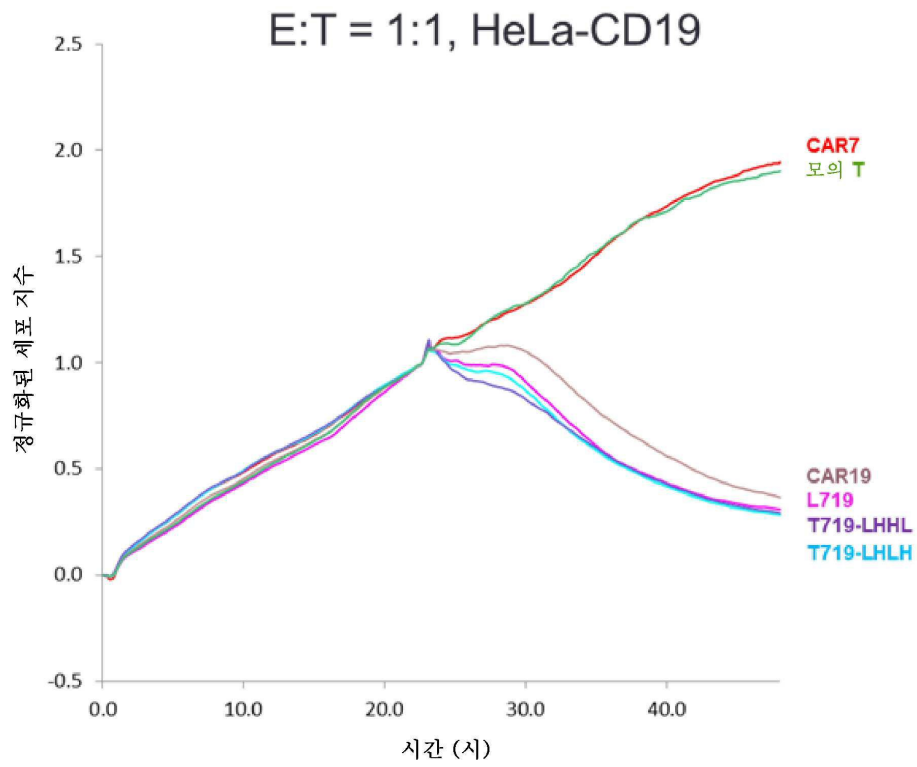


45A

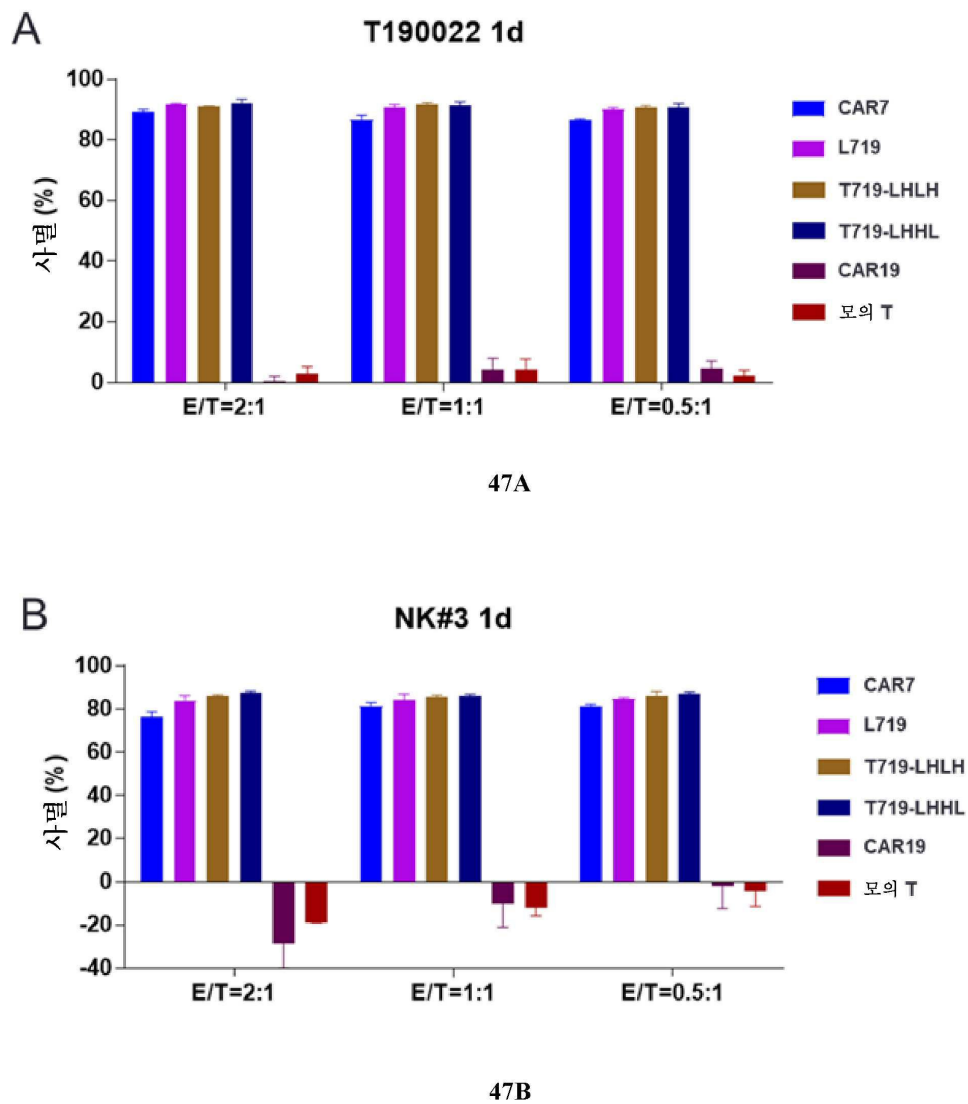


45B

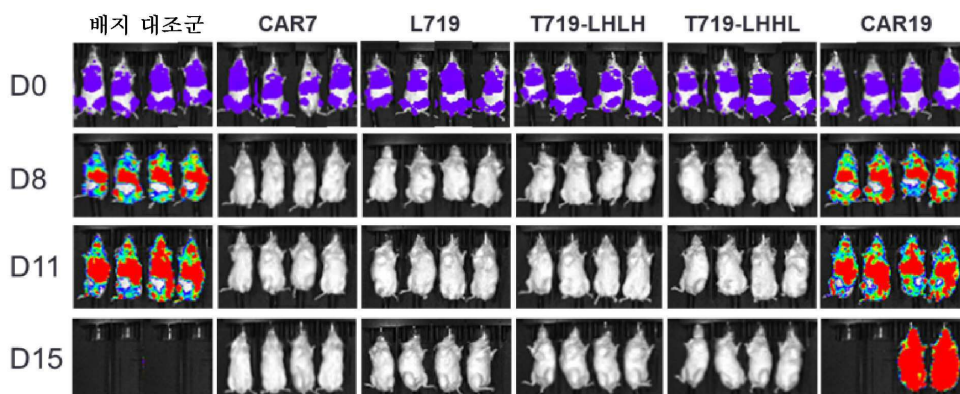
도면46



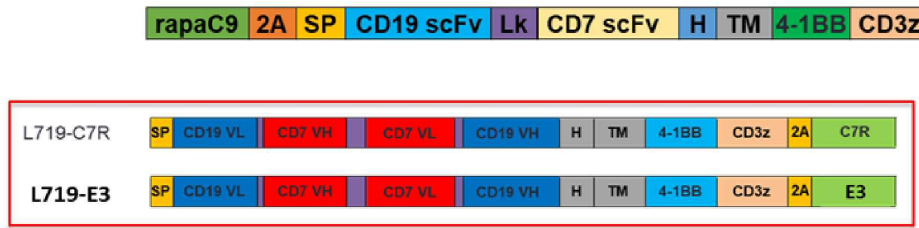
도면47



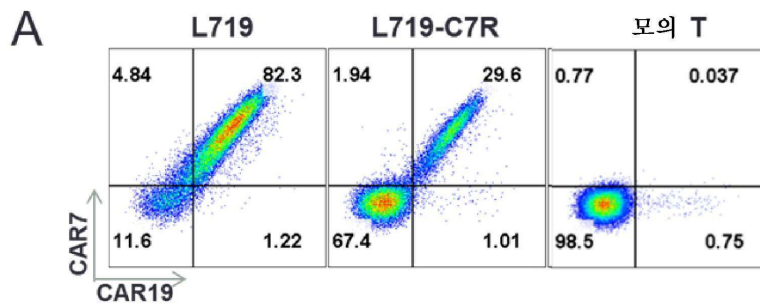
도면48



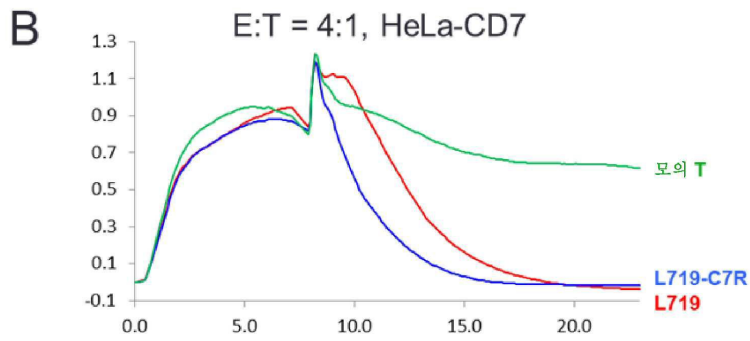
도면49



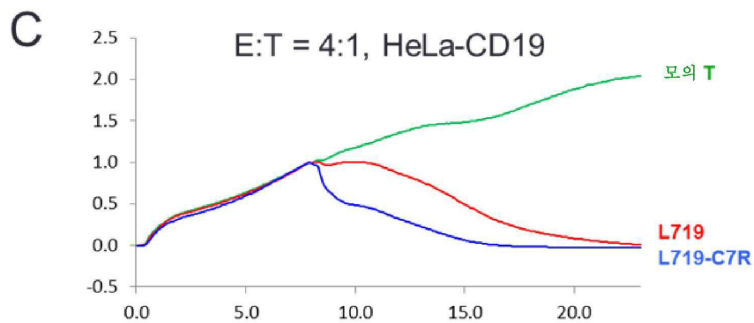
도면50i



50A

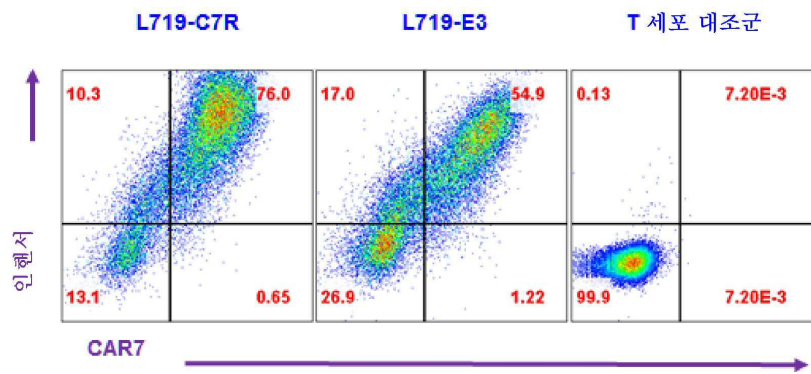


50B

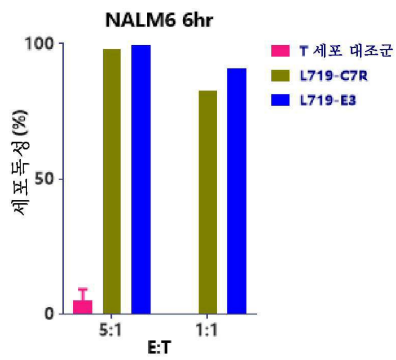


50C

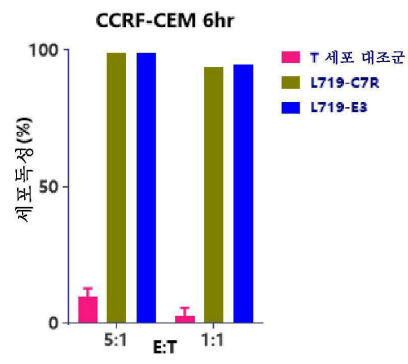
도면50ii



50D

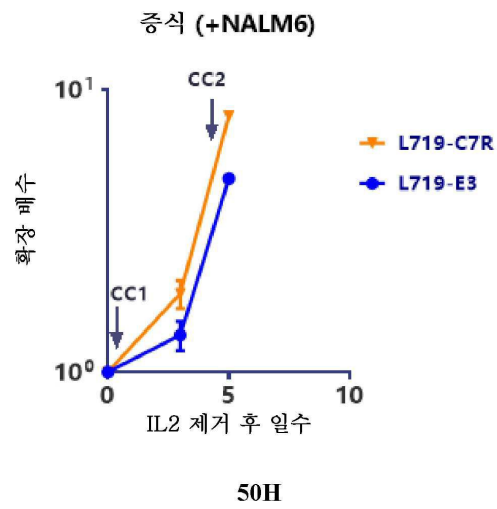
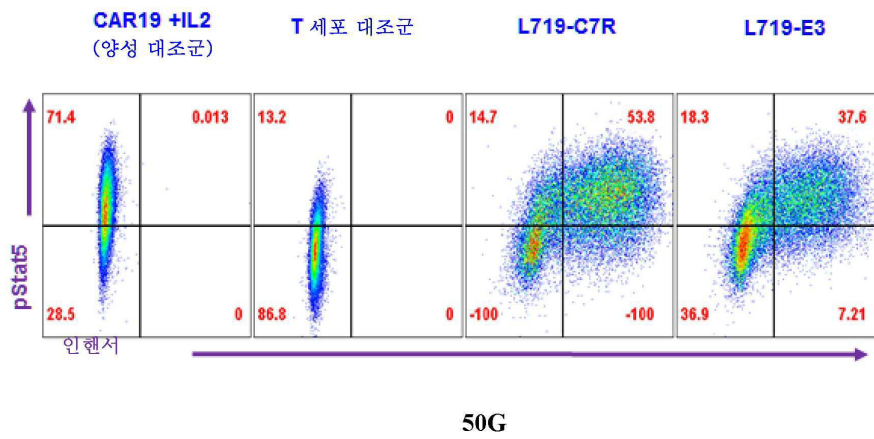


50E

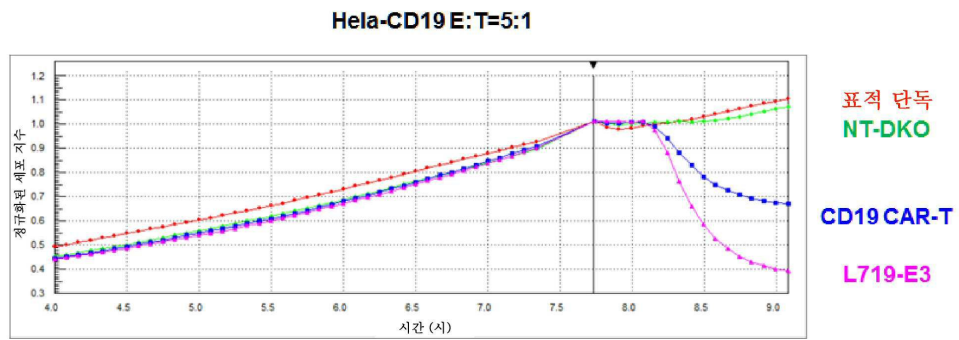


50F

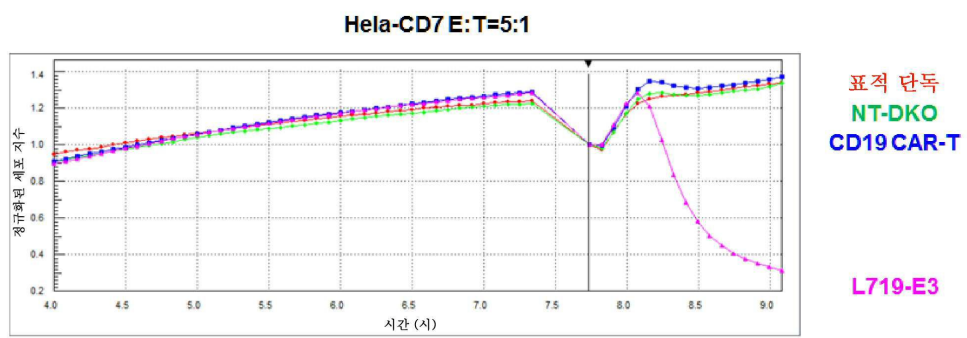
도면50iii



도면50iv

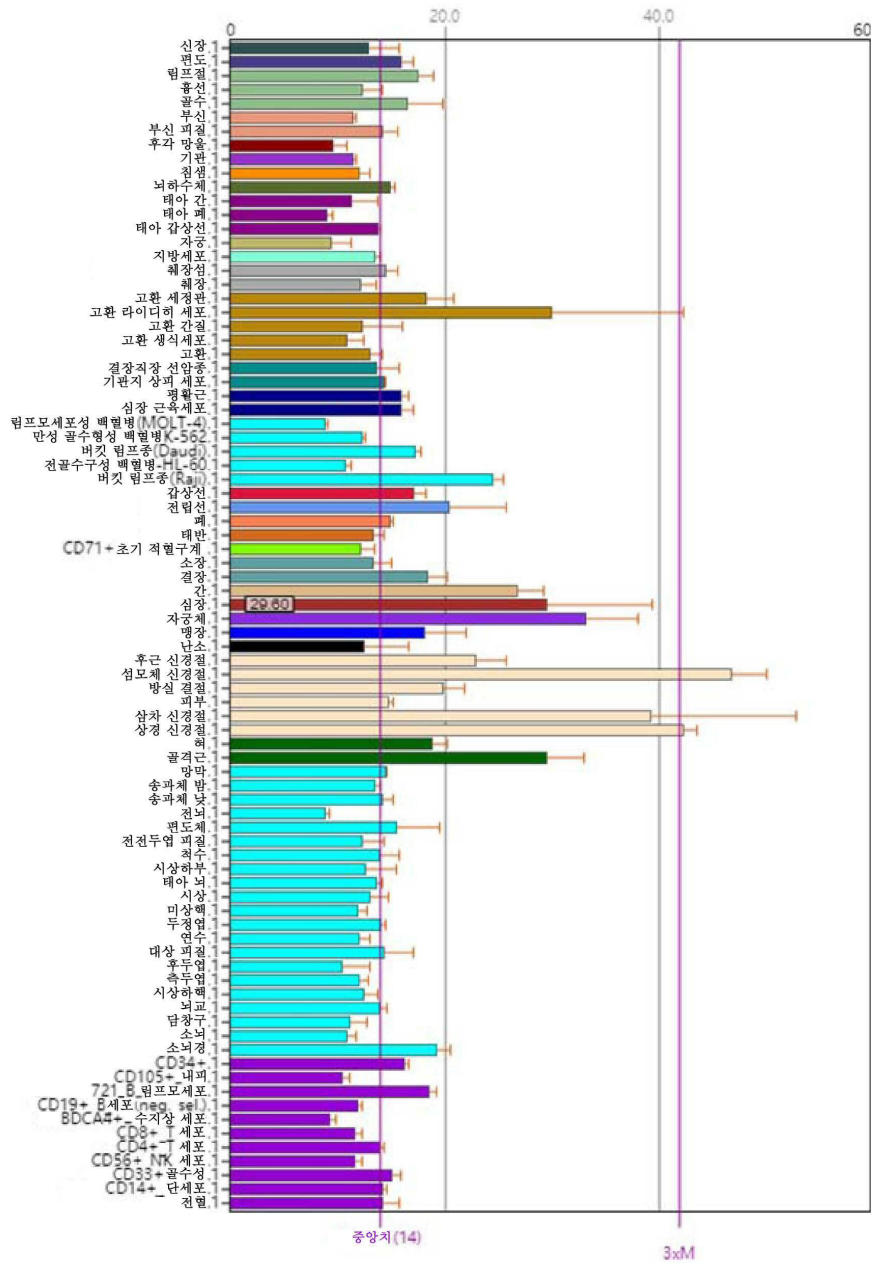


50I



50J

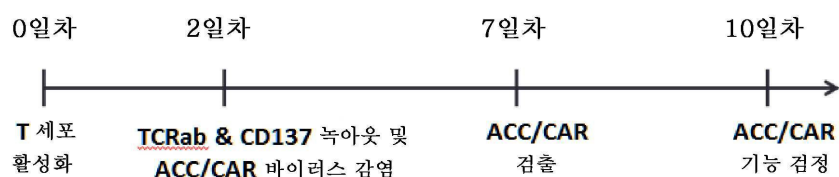
도면51



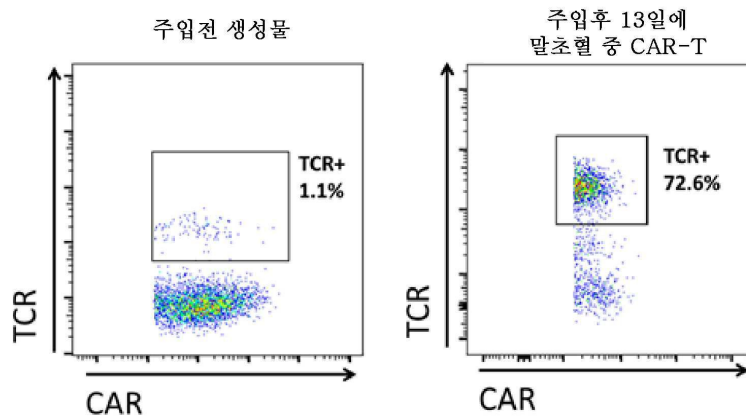
도면52



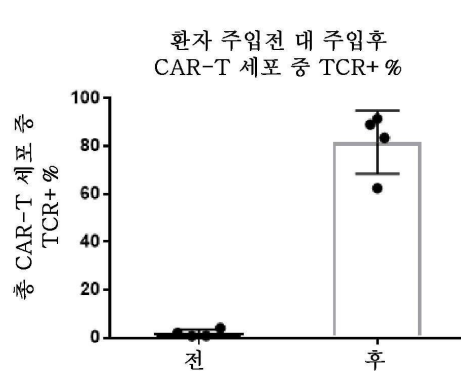
도면53



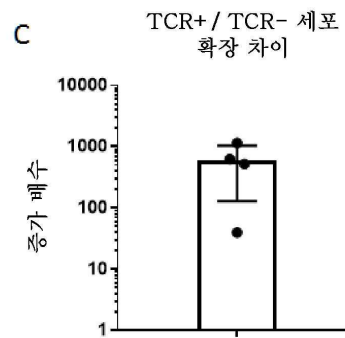
도면54



54A

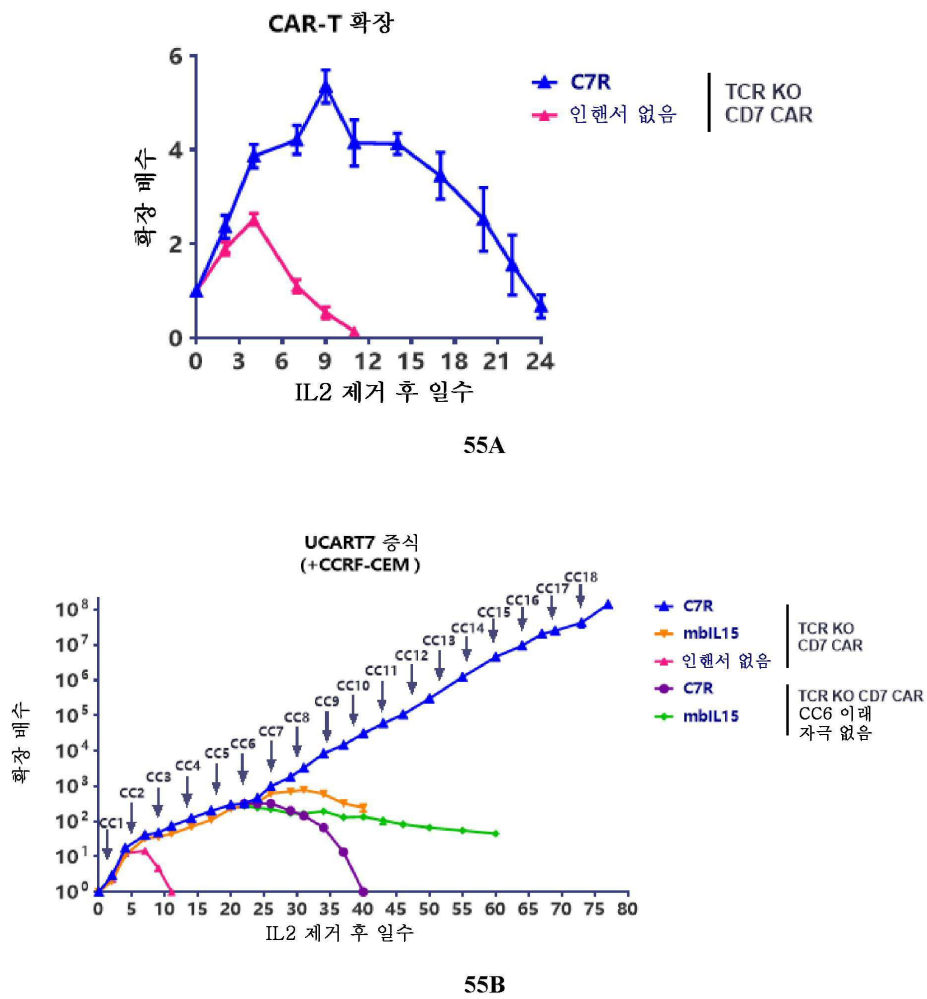


54B

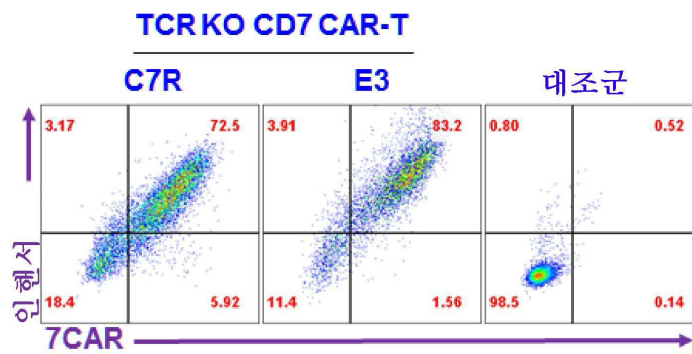


54C

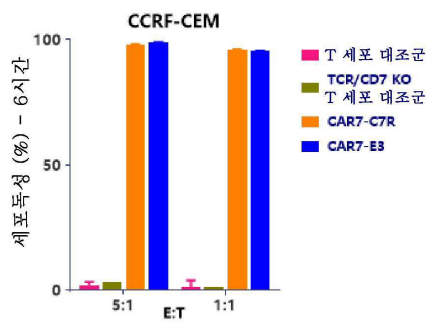
도면55



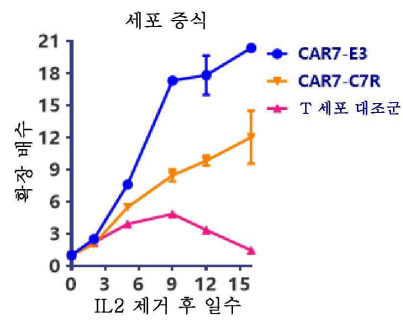
도면56i



56A

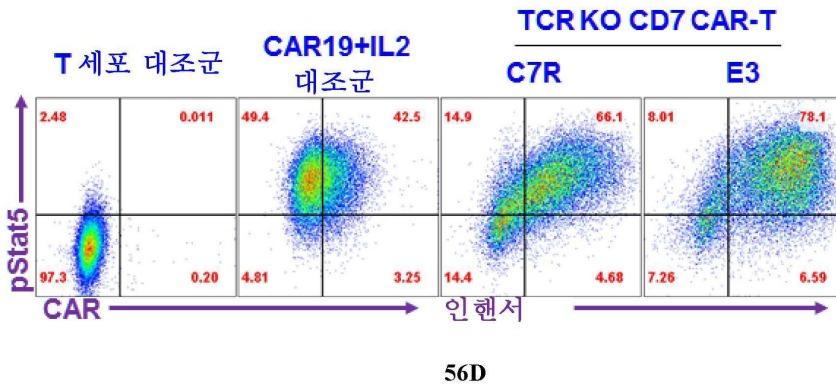


56B

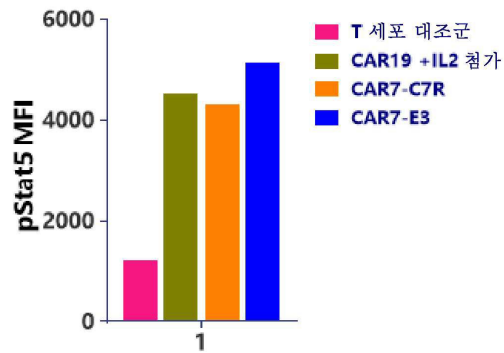


56C

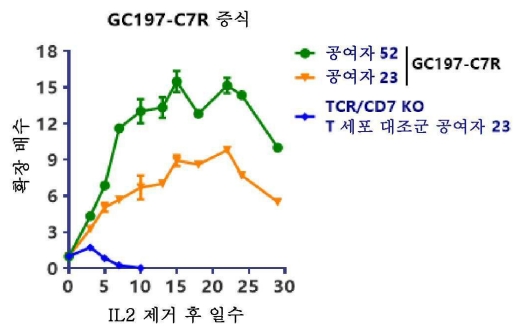
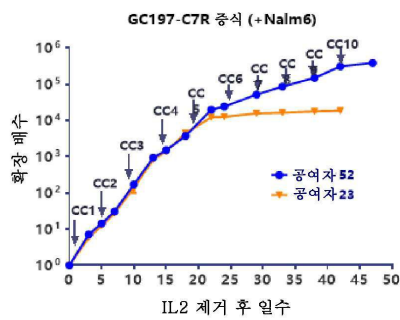
도면56ii



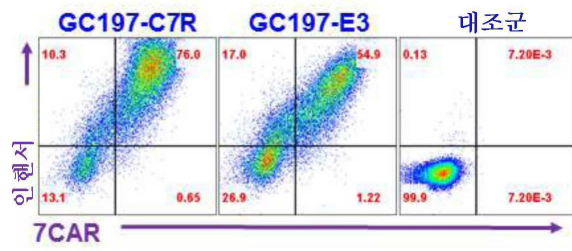
CAR+ 세포에서 pStat5



도면57

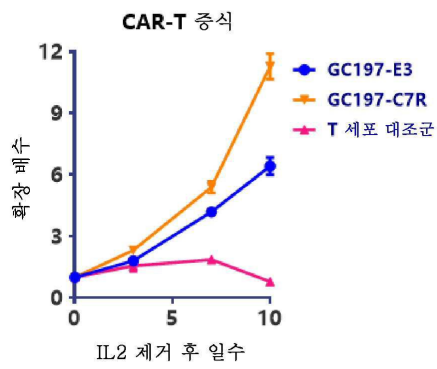


도면58

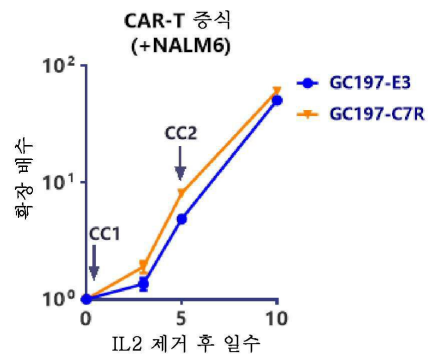


E3: EGFRt + IL7Rα

58A

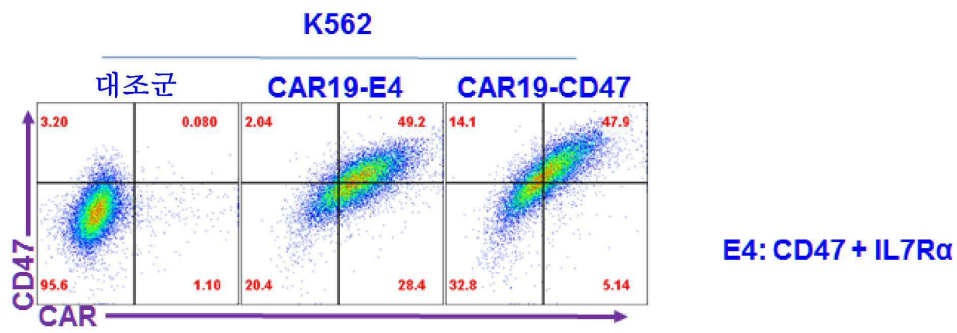


58B

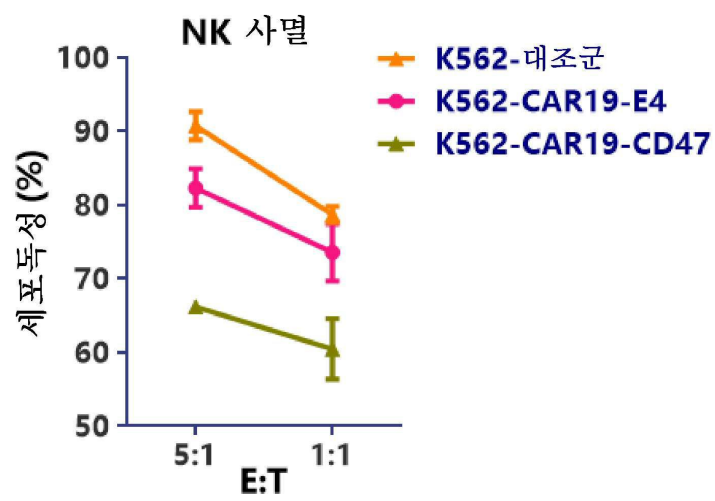


58C

도면59

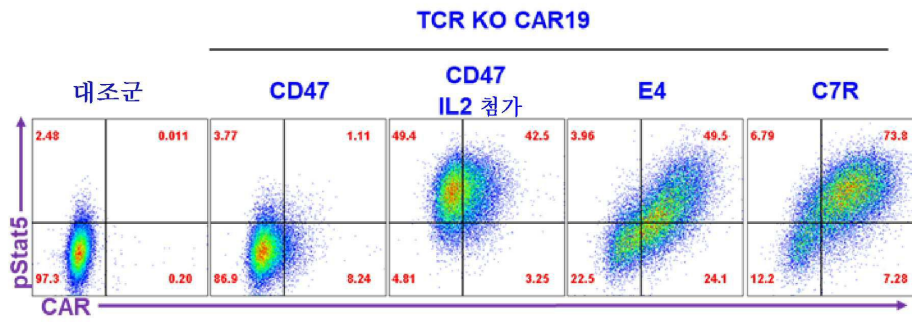


59A

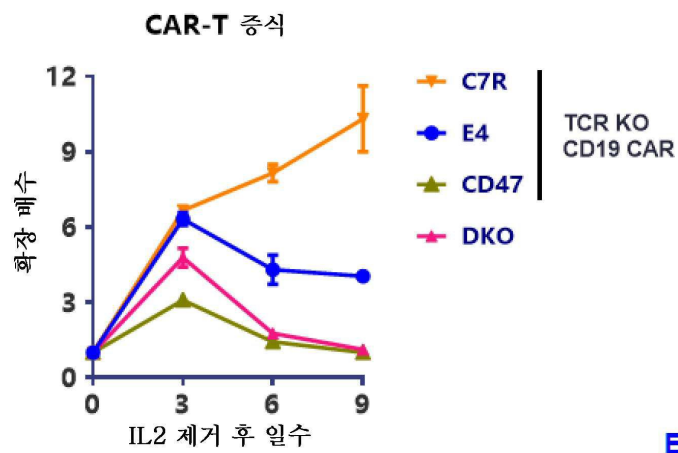


59B

도면60



60A

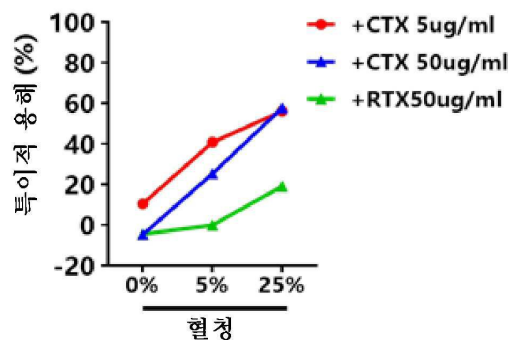


E4: CD47 + IL7R α

60B

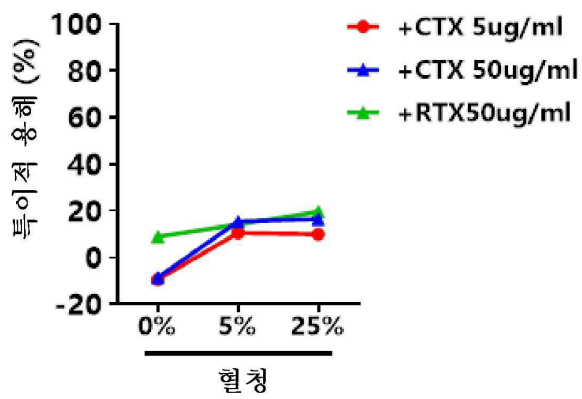
도면61

L719-E3의 24시간 CDC



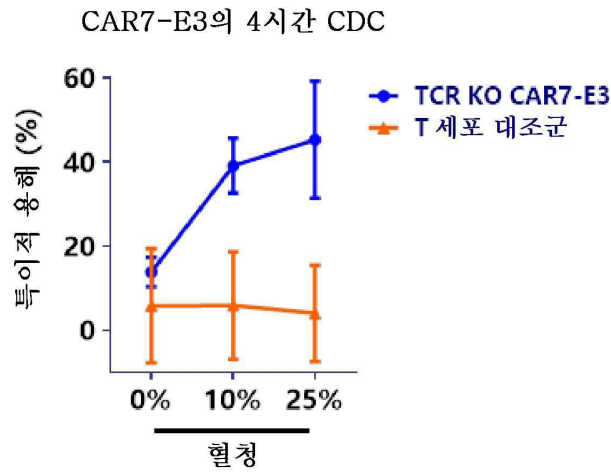
61A

L719-E2의 24시간 CDC

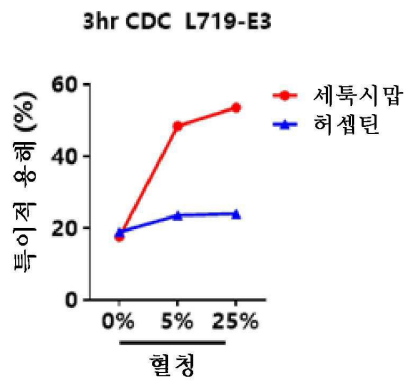


61B

도면62

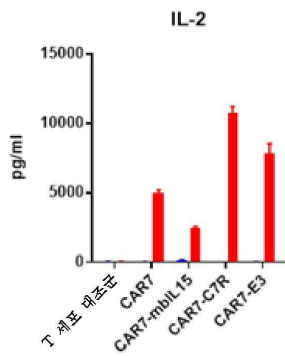


62A

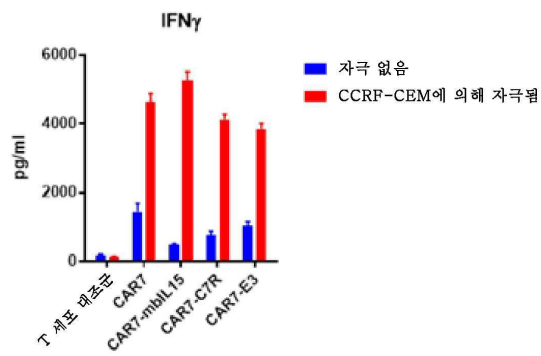


62B

도면63

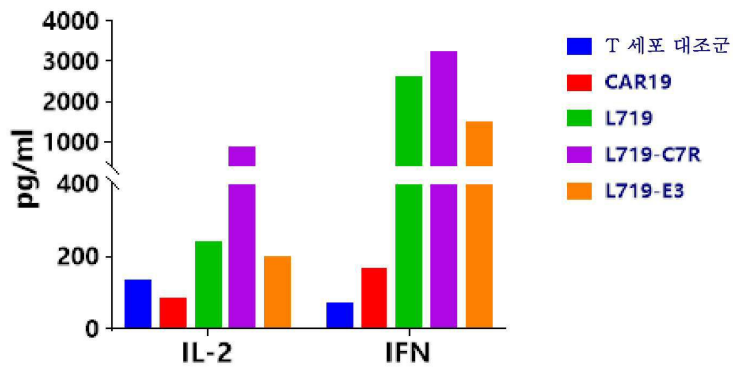


63A

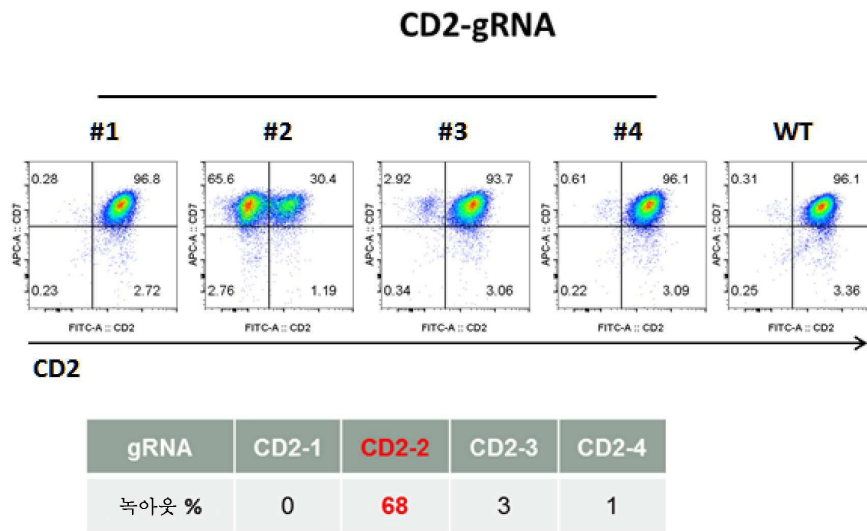


63B

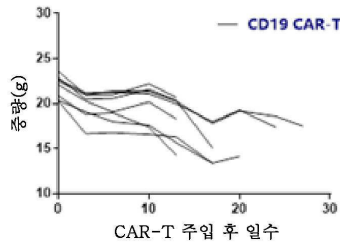
도면64



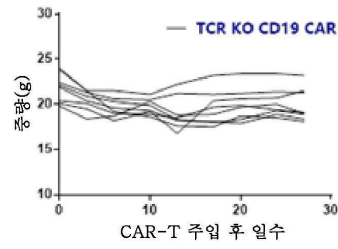
도면65



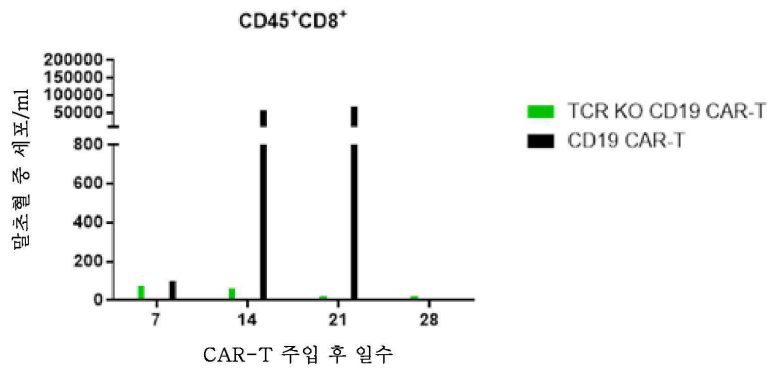
도면66



66A

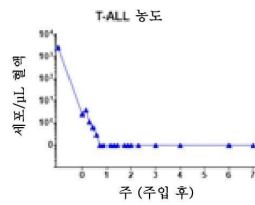


66B

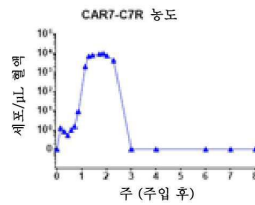


66C

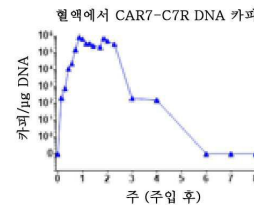
도면67



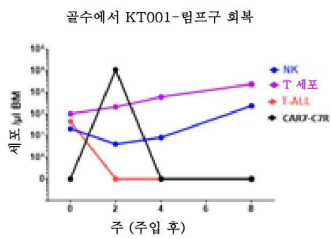
67A



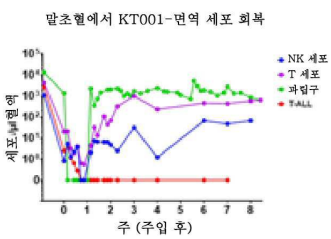
67B



67C

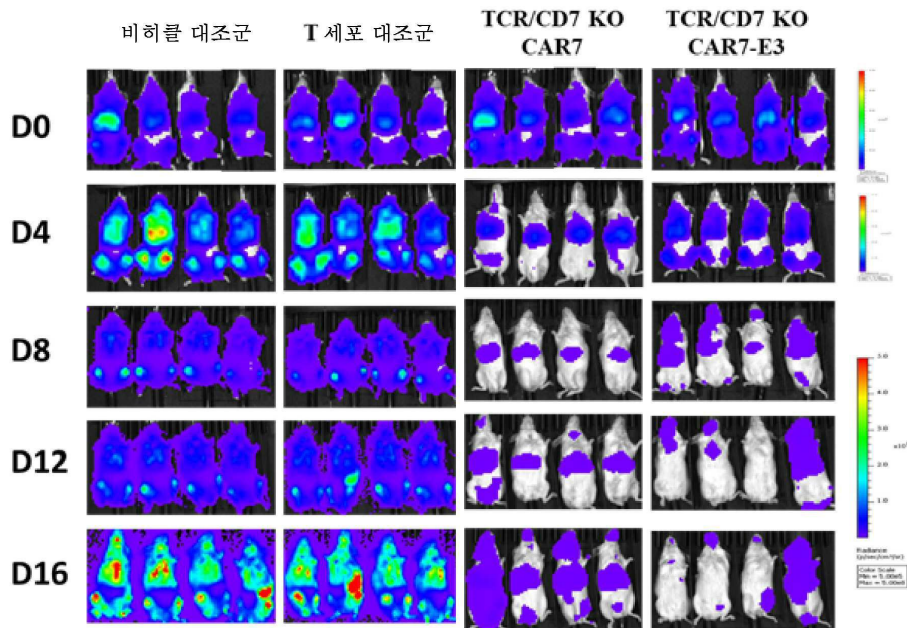


67D

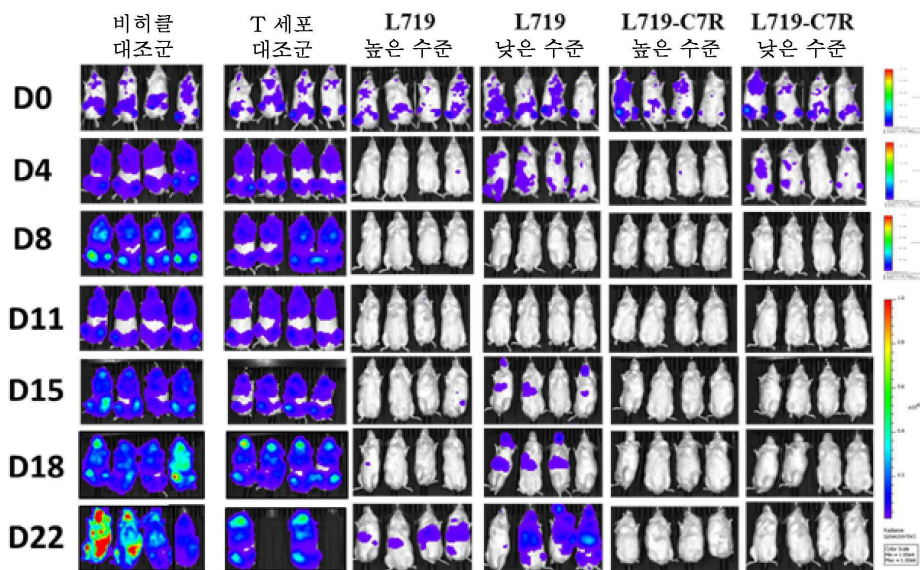


67E

도면68



도면69



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GRACELL BIOTECHNOLOGIES (SHANGHAI) CO., LTD.

SUZHOU GRACELL BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR T CELL ENGINEERING

<130> 56758-702.771

<140>

<141>

<150> PCT/CN2019/114939

<151> 2019-11-01

<150> PCT/CN2019/101651

<151> 2019-08-20

<150> CN 201910492882.0

<151> 2019-06-06

<150> CN 201811549651.0

<151> 2018-12-18

<150> CN 201811535338.1

<151> 2018-12-14

<150> CN 201811297174.3

<151> 2018-11-01

<160> 103

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 1

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

	85	90	95
Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu			
	100	105	110
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala			
	115	120	125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu			
	130	135	140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr			
145	150	155	160
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys			
	165	170	175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly			
	180	185	190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu			
	195	200	205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys			
	210	215	220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu			
225	230	235	240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met			
	245	250	255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala			
	260	265	270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val			
	275	280	285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His			
	290	295	300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro			
305	310	315	320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala			
	325	330	335

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
340 345 350

Ile Gly Leu Phe Met Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe
355 360 365

Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
370 375 380

Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His
385 390 395 400

Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
405 410 415

Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
420 425 430

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
435 440 445

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
450 455 460

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
465 470 475 480

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
485 490 495

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
500 505 510

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly
515 520 525

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gln Ile Val
530 535 540

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
545 550 555 560

Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
565 570 575

Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser

580 585 590
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
 595 600 605
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 610 615 620

 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
 625 630 635 640
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 645 650 655
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser
 660 665 670
 Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 675 680 685

 Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp
 690 695 700
 Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
 705 710 715 720
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu
 725 730 735
 Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
 740 745 750

 Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 755 760 765
 Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
 770 775 780
 Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 785 790 795 800
 Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser
 805 810 815

 Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly
 820 825 830

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn
 835 840 845
 Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser
 850 855 860
 Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile
 865 870 875 880

 Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp
 885 890 895
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Asp
 900 905 910
 Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 915 920 925
 Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
 930 935 940

 His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
 945 950 955 960
 Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
 965 970 975
 Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
 980 985 990
 Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
 995 1000 1005

 Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala
 1010 1015 1020
 Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 1025 1030 1035
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 1040 1045 1050
 Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 1055 1060 1065

 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly

1070	1075	1080
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser		
1085	1090	1095
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp		
1100	1105	1110
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp		
1115	1120	1125
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
1130	1135	
<210> 2		
<211> 3417		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic		
polynucleotide		
<400> 2		
atgttgctcc ttgtgacgag cctcctgctc tgcgagctgc cccatccagc ctctcctctc	60	
atcccccgga aggtgtgcaa tggcataggc attggcgagt ttaaagattc tctgagcata	120	
aatgctacga atattaagca tttcaagaat tgtacttcta ttagtggcga cctccatatt	180	
cttccggttg ccttcagggg tgactctttc acccacacac ctccattgga tccacaagaa	240	
cttgacatcc tgaagacggt taaagagatt acaggcttcc tccttatcca agcgtggccc	300	
gagaacagaa cggacttgca cgcctttgag aacctcgaaa taatacgggg tcggacgaag	360	
caacacggcc aatttagcct tgcggttggt agtctgaaca ttacttctct cggccttcgc	420	
tctttgaaag aaatcagcga cggagatgtc atcattagt gaaacaagaa cctgtgctac	480	
gcgaacacaa tcaactggaa gaagctcttc ggtacttcag gccaaaagac aaagattatt	540	
agtaacagag gagagaatag ctgtaaggct accggacaag tttgtcacgc ctgtgtagt	600	
ccagagggtt gctggggacc ggaaccaagg gattgcgtca gttgccggaa cgtgagtcgc	660	
ggacgcgagt gtgtggataa gtgcaatctt ctggaagggg aaccgcgaga gttttagaa	720	
aattccgaat gtatacagtg tcatcccag tgtcttcac aagcaatgaa tatcacatgt	780	
acagggaggg gtctgataa ctgtatccaa tgtgcacact acatagatgg tcctcactgt	840	
gtaaagacgt gccccgccg agtaatgggt gaaaacaaca ccctcgtgtg gaagtacgcc	900	
gatgccgggc atgtctgtca tttgtgtcat cccaactgca catatggctg taccgtcct	960	

ggattggagg gctgtccaac aaacgggccc aaaataccga gtatcgcaac aggcatggtg 1020
ggagcacttt tgcttctcct cgttgtcgcc ctgggcatcg gcttgttcat gcgagctaaa 1080

cgaggtcag gcgcgacgaa ctttagtttg ctgaagcaag ctggggatgt agaggaaaat 1140
ccgggtccca tggcccttcc agtgacagcc ttgttgttgc cacttgctct gctgctccac 1200
gctgcgcggc cacaggtcca gttgcagcag tcaggcgcgc aattggcgcg accaggggca 1260
agcgtaaaga tgagctgtaa ggcatccggg tacacgttca ctcgtatac catgcattgg 1320
gttaacaac ggcttgggca gggccttgag tggattgggt atatcaacc atccccgggc 1380
tacactaact ataataaaa gtttaaat aaagcaacc ttacgaccga caaatcatct 1440
tctaccgat acatgcagct cagctccctc accagtgaag attctgccgt ttattattgt 1500

gcacgatact atgacgatca ctattgcctg gactactggg gtcaaggcac cacacttact 1560
gtcagttccg gaagtaccag tgggggaggt tctggcgggt gcagcggggg tgggggtagc 1620
tcacaaatcg tgctgaccca gagtcccgt atcatgagcg cctcccagg ggaaaagggtg 1680
acgatgacat gctcagccag ctccagtgt tctacatga attggtatca acagaagagt 1740
gggacgtcac ccaaagatg gatttatgac accagcaaat tggccagcgg agtaccagcg 1800
catttcagag gcagtgggag tggaaatct tattctctca ccattagcgg catggaagca 1860
gaggatgcag caacgtacta ttgtcaacaa tggagctcta atccctttac gttcggcagc 1920

ggcactaagc tcgaaattaa taggggtggc ggcggtccg gcggtggcgg gtctggaggt 1980
gggggcagtg acatccagat gacacagact acatcctccc tgtctgcctc tctgggagac 2040
agagtcacca tcagttgcag ggcaagtcag gacattagta aatatitaaa ttggtatcag 2100
cagaaaccag atggaactgt taaactcctg atctaccata catcaagatt acactcagga 2160
gtcccatcaa ggttcagttg cagtgggtct ggaacagatt attctctcac cattagcaac 2220
ctggagcaag aagatatgtc cacttacttt tgccaacagg gtaatacgt tccgtacacg 2280
ttcggagggg ggactaagtt ggaaataaca ggctccacct ctggatccgg caagcccga 2340

tctggcgagg gatccaccaa gggcgaggtg aaactgcagg agtcaggacc tggcctggtg 2400
gcgcctcac agagcctgtc cgtcacatgc actgtctcag gggctctatt acccgactat 2460
ggtgtaagct ggattcgcca gcctccacga aagggtctgg agtggtggg agtaatatgg 2520
ggtagtgaaa ccacatacta taattcagct ctcaaacca gactgacct catcaaggac 2580
aactcaaga gccaagtttt cttaaaaatg aacagtctgc aaactgatga cacagccatt 2640
tactactgtg ccaaacatta ttactacggt ggtagctatg ctatggacta ctggggtcaa 2700

ggaacctcag tcaccgtctc ctacagcgcc gcagactaca aagacgatga cgacaagatt 2760

gaagttatgt atcctcctcc ttacctagac aatgagaaga gcaatggaac cattatccat 2820

gtgaaaggga aacaccttig tccaagtecc ctatttcccg gaccttctaa gcccttttgg 2880

gtgctgggtg tggttggggg agtcctggct tgctatagct tgctagtaac agtggccttt 2940

attattttct ggttgaggag taagaggagc aggtcctgc acagtgacta catgaacatg 3000

actccccgcc gccccgggcc caccgcaag cattaccage cctatgcccc accacgcgac 3060

ttcgagcct atcgctccag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag 3120

cagggccaga accagctcta taacagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt 3180

ttggacaaga gacgtggccg ggacctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct 3240

caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagttagatt 3300

gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggctcagt 3360

acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg cctgcccc tcgctaa 3417

<210> 3

<211> 1138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 3

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
115 120 125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145 150 155 160
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
180 185 190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
195 200 205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
210 215 220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
225 230 235 240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
245 250 255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
260 265 270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
325 330 335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly

340 345 350
 Ile Gly Leu Phe Met Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe
 355 360 365
 Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
 370 375 380
 Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His

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

 450 455 460
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 465 470 475 480
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn
 485 490 495
 Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 500 505 510
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

 515 520 525
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 530 535 540
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met
 545 550 555 560
 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu
 565 570 575
 Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp

 580 585 590

Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 595 600 605
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 610 615 620
 Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 625 630 635 640
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 645 650 655
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 660 665 670
 Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser
 675 680 685
 Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 690 695 700
 Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr
 705 710 715 720
 Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn
 725 730 735
 Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
 740 745 750
 Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr
 755 760 765
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
 770 775 780
 Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
 785 790 795 800
 Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 805 810 815
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
 820 825 830
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu

835	840	845	
Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser			
850	855	860	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu			
865	870	875	880
Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro			
885	890	895	
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Ala Ala Ala Asp			
900	905	910	
Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr			
915	920	925	
Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys			
930	935	940	
His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp			
945	950	955	960
Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val			
965	970	975	
Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu			
980	985	990	
Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr			
995	1000	1005	
Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala			
1010	1015	1020	
Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala			
1025	1030	1035	
Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly			
1040	1045	1050	
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp			
1055	1060	1065	
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly			
1070	1075	1080	

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

1085	1090	1095
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp		
1100	1105	1110
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp		
1115	1120	1125
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
1130	1135	

<210> 4

<211> 3417

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 4

atgctgctgc tcgtgacatc cctcttatta tgcgaactcc ctcacccgc ttttctgctg	60
atccccagaa aggtgtgcaa cggcatcggc attggagagt tcaaggattc tttacgcatc	120
aacgctacca acatcaaaca tttcaagaac tgtacctcca tttccggcga tttacacatc	180
ctccccgttg ctttctgtgg cgatagcttc acacacacac cccctctgga ccctcaagaa	240
ctggacattt taaagaccgt gaaggagatc actggttttt tactgatcca agcttggccc	300
gaaaatagga cagatctcca cgctttcgag aatttagaga tcattcgtgg cagaaccaag	360
cagcacggac agttctcttt agccgtcgtg tctttaaata tcacctcttt aggtttaaga	420
tctttaaaag agatcagcga tggcgacgtc atcatctccg gcaacaagaa cctctgttac	480
gccaacacca ttaattggaa aaagctgttt ggcacctccg gacagaagac caagatcatc	540
agcaacagag gcgagaacag ctgcaaagct accggccaag tttgccacgc tctgtgtagc	600
cccgaaggct gctggggacc cgaacctcgt gactgtgtga gctglaggaa cgtgtctcgt	660
ggtcgtgagt gtgtggataa gtgcaattta ctcgagggcg agcccagaga gtttgtggaa	720
aatagcgagt gcatccagtg ccaccccgaa tgtctgcccc aagctatgaa cattaactgt	780
actggtcgtg gccccgataa ctgtatccag tgcgctcact acattgacgg cccccactgc	840
gtcaagacat gccccgtgg cgtgatggga gaaaacaaca cactgggtgtg gaagtatgcc	900
gatgccggcc acgtctgtca tctgtgccac cctaactgta cctacggctg taccggaccc	960

ggactggagg gctgtccac caacggaccc aagatcccta gcatcgccac cggcatggtg	1020
ggagccttac tgctgttact ggtggtggct ctgggcattg gtttattcat gagggccaaag	1080
agaggatccg gcgccaccaa cttttcttta ctgaaacaag ctggagacgt cgaggaaaac	1140
cccggaccca tggctctccc cgtgacagct ctgctgctgc ctctcgcttt attactgcac	1200
gccgctaggc ccgatattca gatgacccaa agccctagct ctttatccgc cagcgtcgga	1260
gatatagtca caatcacttg tagagccagc caagatattc gtaattatct caactggtac	1320
cagcagaagc ccggtaaagc cccaagctg ctcatctatt acacctctcg tctggagagc	1380
ggcgtgcctt ccagattcag cggctccggc agcggcaccg actatacact caccattagc	1440
tctttacagc ccgaagattt cgctacctac tactgccagc aaggttaatac ttaccttgg	1500
accttcggcc aaggtaccaa ggtcgaaatc aagggcggcg gcggatccgg cggcggtgga	1560
tctgtggcg gcggctccga agtccagctg gtcgaatccg gaggcggact ggtccagccc	1620
ggtggatccc tcagactgag ctgcgccgt agcggctatt ccttcaccgg ctacaccatg	1680
aactgggtga gacaagctcc cggcaaagga ctggaatggg tggccctcat caaccctac	1740
aagggcgtgt ccacataaa tcaaaagttt aaggacagat tcaccatcag cgtcgacaag	1800
tccaagaaca ccgcttattt acagatgaac tctttaagag ctgaggatac cgccgtgtac	1860
tattgtgcta ggtccggcta ctacggcgac agcgactggt attttgacgt ctggggacaa	1920
ggtaccctcg tgacagtgag cagcggcggg ggcggttctg gcggcggagg ctccggagga	1980
ggcggcagcg aggtgaagct gcaagaaagc ggacccggtc tcgtggctcc ctccaatct	2040
ttatccgtga cttgtaccgt gtccggagtc tctttaccg actacggcgt gagctggatt	2100
agacagcccc ccagaaaagg tttagagtgg ctgggcgtga tctggggatc cgagaccaca	2160
tactacaaca gcgttttaa gtctcgtctg acaatcatca aagacaattc caaaagccaa	2220
gttttctca agatgaactc ttacagacc gacgacacag ccatttacta ctgcgccaag	2280
cattattact acggcggcag ctacgctatg gactactggg gccaaggtac aagcgtcaca	2340
gtgagctccg gcagcacatc cggaagcgga aagcccggca gcggagaggg cagcaciaag	2400
ggagacatcc agatgaccca gaccacctcc tctttaagcg cctctttagg agatagggtg	2460
accattagct gcagagcctc ccaagacatc agcaagtatc tcaattggta ccagcaaaag	2520
cccgatggca ccgtcaagct gctgatctac cacacctctc gtctccattc cggcgtgccc	2580
agcagattta gcggaagcgg atccggaaca gactattctt taacaatcag caatttagag	2640
caagaagaca tcgccacata tttctgcaa caagtaaca ctttacccta caccttcgga	2700
ggcggcacca aactggagat tacagcggcc gcagactaca aagacgatga cgacaagatt	2760
gaagttatgt atctctctcc ttacctagac aatgagaaga gcaatggaac cattatccat	2820

gtgaaaggga aacacctttg tccaagtccc ctatttcccg gaccttctaa gcccttttgg 2880

gtgctggtgg tgggtggggg agtcctggct tgctatagct tgctagtaac agtggccttt 2940

attattttct gggtgaggag taagaggagc aggcctcctgc acagtgacta catgaacatg 3000

actccccgcc gccccgggcc caccgcaag cattaccagc cctatgcccc accacgcgac 3060

ttcgcagcct atcgtccag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag 3120

cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt 3180

ttggacaaga gacgtggccg ggacctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct 3240

caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagttagatt 3300

gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggcttcagt 3360

acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg ccctgcccc tcgctaa 3417

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 5

tgtgctagac atgaggtcta 20

<210> 6

<400> 6

000

<210> 7

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 7

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala

1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
35 40 45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro

65 70 75 80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro

85 90 95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu

100 105 110

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys

115 120 125

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg

130 135 140

Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val

145 150 155

<210> 8

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 8

atgggcacct ctctgctgtg ctggatggct ctgtgtctgc tgggcgctga ccatgctgat 60

gcttgccctt attccaacc ctctctgtgc tccggaggag gaggatccga actgcctacc 120

caaggcacct tcagcaacgt gtccaccaac gtgagccccg ctaagcctac caccaccgct 180

tgcccttact ccaatccag cctctgtctc ggaggcggag gatccccgc cccagacct 240

cctacaccgc ctcccacaat cgccagccag cctctgtctc tgagaccga agcttgaga 300

cccgtgccg gaggagctgt gcatacaaga ggactggatt tcgcttgca catctacatc 360

tgggcccctc tggtggcac atgtggcgtg ctgtgtctgt ctctggtcat tacactgtac 420

tgcaaccata gaaatagaag aagggtgtgc aagtgtcca gaccgtggt gggcagcgga 480

gaaggaagag gctctctgct gacatgcgga gacgtggaag agaaccgccg cccc 534

<210> 9

<211> 497

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 9

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly

50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln

100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
 195 200 205
 Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 210 215 220
 Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Asp Tyr
 260 265 270
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu
 275 280 285
 Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His
 290 295 300
 Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val
 305 310 315 320
 Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
 325 330 335
 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
 340 345 350
 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
 355 360 365
 Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
 370 375 380
 Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 385 390 395 400
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 405 410 415
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 420 425 430
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln

435 440 445
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 450 455 460
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 465 470 475 480
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 485 490 495
 Arg

<210> 10

<211> 1491

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

atgcttctcc tggtgacaag ctttctgctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg	60
atcccagaca tccagatgac acagactaca tcttccctgt ctgcctctct gggagacaga	120
gtcaccatca gttgcagggc aagtcaggac attagtaaatt atttaaattg gtatcagcag	180
aaaccagatg gaactgttaa actcctgac taccatacat caagattaca ctcaggagtc	240
ccatcaaggt ttagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat tagcaacctg	300
gagcaagaag atattgccac ttacttttgc caacagggtg atacgcttcc gtacacgttc	360
ggagggggga ctaagttgga aataacaggc tccacctctg gatccggcaa gcccggatct	420
ggcgagggat ccaccaaggc cgaggtgaaa ctgcaggagt caggacctgg cctggtggcg	480
ccctcacaga gctgtccgt cacatgcact gtctcagggg tctcattacc cgactatggt	540
gtaagctgga ttcgccagcc tccacgaaaagggtctggagt ggctgggagt aatatggggt	600
agtgaacca catactataa ttcagctctc aaatccagac tgaccatcat caaggacaac	660
tccaagagcc aagttttctt aaaaatgaac agtctgcaaa ctgatgacac agccatttac	720
tactgtgcca aacattatta ctacggtggt agctatgcta tggactactg gggtaagga	780
acctcagtca ccgtctctc agcgccgca gactacaaag acgatgacga caagattgaa	840
gttatgtatc ctctcctta cctagacaat gagaagagca atggaacat tatccatgtg	900
aaagggaaac acctttgtcc aagtcacctt tttcccgac cttctaagcc cttttgggtg	960

ctggtggtgg ttgggggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 1020
 attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctctgcaca gtgactacat gaacatgact 1080
 ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 1140
 gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag 1200

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 1260
 gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag 1320
 gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 1380
 atgaaaggcg agcgcggag gggcaagggg cacgatggcc ttaccagggt tctcagtaca 1440
 gccaccaagg acacctaga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg c 1491

<210> 11

<211> 395

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp

20 25 30

Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp

35 40 45

Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly

85 90 95

Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys

100 105 110

Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe

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

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

370

375

380

Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu

385

390

395

<210> 12

<211> 1188

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

atggattgga ctigatttt gtctctggt gccgcagcga ctgcgtcca tagtaattgg	60
gtgaacgtaa ttagtgactt gaaaaaatt gaggacctta tacaagtat gcatatcgat	120
gcaacactgt acacggagtc cgacgtgcac ccaagctgca aggtcaccgc aatgaaatgc	180
tttttctcg aattgcaagt tatctcactt gagtccgggg acgcttcaat ccatgatact	240
gtggagaatt tgataatcct ggccaacaat agccttagtt caaatggcaa cgtcactgag	300
tcaggctgca aggaatgtga ggaattggaa gaaaaaata tcaaggaatt ttgcaatct	360
tttgttcaca tagttcagat gtctattaac actagtccg ggggcggcag tggaggtggc	420
ggtagcggcg ggggtggctc tggtaggagc ggctctgggg gcggaagtct gcagataaca	480
tgccccccac ctatgagtg tgaacatgct gatctctggg ttaaatctta ctccctttac	540
agtcgagaaa ggtacatttg caactccggc tttaaagcga aagccgggac tagttcactg	600
actgaatgtg tattgaataa agcgacaaat gtcgcacact ggactacccc ttccctcaaa	660
tgcatcgcg atcctgcctt ggtgcatcag cgaccagcac cgccgtccac ggtaactacc	720
gcaggagtaa caccgcagcc cgagagcctt tccccctcag gcaaagagcc ggccgcaccc	780
tccccatctt ccaataatac cgcagctacc accgcagcaa tcgtacccgg gtcccagctg	840
atgcccgca aaagtccgag tactggaacg actgaaatct ccagtcacga gtcttctcat	900
ggaactccga gtcaaacac agcaaagaat tgggagctga ctgcttcgcg ttacaccag	960
ccgccaggcg ttatctctca gggacactca gataccaggg tggcgattag cacaagcacc	1020
gtctctctgt gtgggctgag tgcagtgtca ctctctgcct gctaccttaa gtccagacag	1080
acacccctt tggcaagcgt tgaaatggaa gccatggaag ccttgctgt cacatggggg	1140
acttcacccc gcgatgaaga cttggagaac tgctcacacc atctttga	1188

<210> 13

<211> 177

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 13

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu

35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe

50 55 60

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe

65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala

115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu

130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu

145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu

165 170 175

His

<210> 14

<211> 614

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 14

gaattcggca gcggcgtcaa gcagacactg aacttcgac tgctgaagct ggccggagac 60

gtcagagca acccggccc tatgtccac gtgagcttta gatacatctt cggactgccc 120

cctctgattc tggctgctgt gcccggtggc agcagcgact gcgatatcga gggcaaggac 180

ggcaagcagt atgagtcctg gctgatggc tccatcgac agctgctgga cagcatgaag 240

gagatcggt ccaactgcct caacaacgag ttcaactttt tcaagaggca catctgcgac 300

gccaacaagg agggcatgtt tctgtttaga gccgctagaa agctgaggca gtttctgaag 360

atgaacagca ccggcgactt tgatctgcat ctgctgaaag tgagcgaggg caccaccatt 420

ctgctgaact gcaccggcca agtgaaagga agaaagccg ccgctctggg cgaggctcag 480

cctaccaagt ctctggaaga gaacaagtct ctgaaggagc agaagaagct caacgatctg 540

tgcttctca agaggctgct gcaagagatc aagacatgct ggaacaagat cctcatgggc 600

accaaggaac actg 614

<210> 15

<211> 513

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 15

Met Leu Val Arg Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Gly

1 5 10 15

Trp Thr Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly Phe Met Ser

20 25 30

Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr

35 40 45

Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr Pro

50 55 60

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

305 310 315 320
 Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr
 325 330 335
 Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe
 340 345 350
 Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile

 355 360 365
 Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln
 370 375 380
 Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser
 385 390 395 400
 Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly
 405 410 415
 Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp

 420 425 430
 Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly
 435 440 445
 Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr
 450 455 460
 Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu
 465 470 475 480
 Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly

 485 490 495
 Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn
 500 505 510
 Gln

<210> 16

<211> 1608

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 16

ggaagcggcg ccacaaactt ttctctgctg aagcaagccg gcgacgtcga agagaacccc	60
ggccctatgc tggtagaggag aggcgctagg gctggaccca gaatgcccag aggctggacc	120
gctctgtgtc tgctgtctct gctgcccagc ggcttcatga gcctcgataa taacggcacc	180
gtacccccg agctgcccac acaaggcacc ttctccaatg tgagcaccaa cgtgtcctac	240
caagagacca ccacccttc cacttgga agcacatctc tgcatcccg tccccagcac	300
ggcaatgaag ccaccacaaa catcaccgag accaccgtga agttcaccag cacctccgtc	360
attaccagcg tgiacggcaa caccaatagc tccgtgcaaa gccagacatc cgtgatttcc	420
accgtgttta ccacccccgc caatgtcagc acaccgaga caaactgaa accttctctg	480
tccccggaa acgtgagcga tctgagcaca accagacca gcctcgccac cagccccaca	540
aagccttaca caagcagcag cccattctg agcgacatca aggcgaaat caagtgtcc	600
ggaattagag aggtcaagct gaccaagga atctgtctgg agcagaataa gaccagcagc	660
tgcgccgagt tcaagaaaga cagaggcgaa ggactggcca gagtgtctg cggcgaggaa	720
caagccgatg ccgatgccg agctcaagtg tgcagcctcc tcctcgctca gagcgaggtc	780
agaccccaat gtctgtctc cgtgtgtggc aataggaccg agatctctc caaactgcag	840
ctgatgaaga agcaccagag cgacctcaag aagctcggca tcctcgactt taccgagcaa	900
gacgtggcct cccatcaatc ctatagccag aagacccca ttctgtctgac atgtcccaca	960
atcagcatcc tcagcttctt cagcgtcgtc ctgctcgtca ttctggcttg tgtgtgtgg	1020
aagaagagga tcaagcctat tgtgtggccc tctctgccc accacaagaa gaccctcgaa	1080
cacctctgca agaaacctag aaagaacctc aacgtgagct tcaacccga gtctttctg	1140
gactgtcaaa tccatagggt ggatgacatc caagctagag acgaggtcga gggctttctg	1200
caagacacct tcctcagca gctggaagaa agcgagaagc aaagactggg cggagatgtg	1260
cagtcacctt attgccctc cgaggacgtg gtgattacc cagagagctt cggaagagac	1320
agctctctga catgtctggc cggaaatgtg tccgcttgcg atgccctat tctgagcagc	1380
tccagatctc tggactgcag agagtccggc aagaacggc ctcatgtgta ccaagatctg	1440
ctgtgtctc tgggaaccac aaactccaca ctgcctcccc ccttagcct ccagtccggc	1500
attctgacac tgaacccgt ggctcaaggc caacctatcc tcacatccct cggctccaat	1560
caagaggaag cctacgtgac catgagctcc ttctatcaga accagtga	1608

<210> 17

<211> 635

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 17

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

1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln

20 25 30
Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met

35 40 45
Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys

50 55 60
Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala

65 70 75 80
Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe

85 90 95
Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn

100 105 110
Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala

115 120 125
Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys

130 135 140
Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys

145 150 155 160
Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His Gly Gly Gly

165 170 175
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

180 185 190
Gly Gly Gly Ser Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp

195 200 205

Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val
210 215 220

Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val
225 230 235 240

Asn Ile Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val
245 250 255

Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr
260 265 270

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly
275 280 285

Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys
290 295 300

Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Val Tyr Arg Glu Gly Ala Asn
305 310 315 320

Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val
325 330 335

Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn
340 345 350

Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln
355 360 365

Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile
370 375 380

Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr
385 390 395 400

Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro
405 410 415

Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val
435 440 445

Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys

450 455 460
 Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu
 465 470 475 480
 Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val
 485 490 495
 Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu
 500 505 510
 Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu

515 520 525
 Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr
 530 535 540
 Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser
 545 550 555 560
 Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val
 565 570 575
 Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro

580 585 590
 Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala
 595 600 605
 Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala
 610 615 620
 Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
 625 630 635

<210> 18

<211> 1905

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 18

atggctctgc ctgttacagc tctgctgctg cctctggctc tgcttctgca tgccgccaga 60
 cctgactgtg acatcgaggg caaagacggc aagcagtacg agagcgtgct gatggtgtcc 120

atcgaccagc tgctggacag catgaaggaa atcggcagca actgcctgaa caacgagttc 180
aacttcttca agcggcacat ctgcgacgcc aacaaagaag gcatgttcct gttcagagcc 240
gccagaaagc tgcggcagtt cctgaagatg aacagcacccg gcgacttcga cctgcatctg 300
ctgaaagtgt ctgagggcac caccatcctg ctgaattgca ccggccaagt gaagggcaga 360
aagcctgctg ctctgggaga agcccagcct accaagagcc tggaagagaa caagtccttg 420

aaagagcaga agaagctgaa cgacctctgc ttcctgaagc ggctgctgca agagatcaag 480
acctgctgga acaagatcct gatgggcacc aaagagcacg gcggaggatc tggcggaggt 540
ggaagcggcg gaggcggtag cggtggcgga ggaagtgtg gcggatctga atctggctac 600
gcccagaacg gcgacctgga agatgccgag ctggacgact acagcttcag ctgctacagc 660
cagctggaag tgaacggcag ccagactct ctgacctgcg cctttgaaga tcccagctg 720
aacatcacca accttgagtt cgagatttgt ggcgccctgg tggaagtcaa gtgcctgaat 780
ttccggaagc tgcaagaaat ctactttatc gagacaaaga agttcctgct gatcggcaag 840

agcaacatct gtgtgaaagt gggcgagaaa agcctgacct gcaagaagat cgacctgacc 900
accatcgtga agcccaggcg tcctttcgat ctgagcgtgg tgtatagaga gggcgccaac 960
gacttcgtgg tcaccttcaa caccagccac ctccaaaaga aatacgtgaa ggtgctgatg 1020
cacgacgtgg cctaccggca agagaaggac gagaacaaat ggaccacgt gaacctgagc 1080
agcaccaagc tgacctgct cgagagaaaa ctgcagcctg ccgctatgta cgagatcaaa 1140
gtgcggagca tccccgacca ctactttaaa ggcttttggg gcgagtggtc ccctagctac 1200
tacttcagaa cccctgagat caacaactcc agcggcgaga tggaccccat tctgctgaca 1260

atcagcatcc tgagcttttt cagcgtggcc ctgctggtca tccctggcctg tgtgctgtgg 1320
aagaagcggg tcaagcccat cgtgtggccc agcctgcctg accacaagaa aacctggaa 1380
cacctgtgca agaagccccg gaaaaacctg aacgtgtcct tcaatcccga gagcttcctg 1440
gactgccaga tccacagagt ggacgacatc caggccaggg acgaagtgga aggatttctg 1500
caggacacat tccctcagca gctcgaagag agcgagaagc aaagactcgg aggcgacgtg 1560
cagagcccta attgccttc tgaggacgtg gtcatcaccc cagagagctt cggcagagat 1620
agcagcctga catgtctggc cggcaatgtg tccgcctgtg atgccctat cctgtcctct 1680

agcagaagcc tggattgcag agagagcggc aagaacggcc ctcacgtgta ccaggatctg 1740
ctcctgtctc tgggcaccac aaacagcaca ctgcctccac cattcagcct gcagagcggc 1800
atcctgacac tgaacctgt tgctcagggc cagcctatcc tgacaagcct gggcagcaat 1860
caagaagagg cctacgtcac catgagcagc ttctaccaga accag 1905

<210> 19

<400> 19

000

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

ttcgggaacc aatcactgac 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

tcagggttct ggatatctgt 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

aagttcctgt gatgtcaagc 20

<210> 23

<400> 23

000

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

gaggtcaatg tctacggctc 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

atcacggagg tcaatgtcta 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

gtagacattg acctccgtga 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

ggagcaggtg atgttgacgg 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 29

caaagagatt acgaatgcct 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 30

gtgccacaaa gaccatcaag 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 31

agagggtcat cacacacaag 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 32

ctttagata tcctgatcat 20

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 34

gaggtcaatg tctacggctc 20

<210> 35

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 35

atggcactcc ctgtaactgc acttcttttg ccacttgctt tgctcctgca cgcagcgagg 60

ccggacatcg agctgaccca gagccccgcc atcatgagcg ccagcctggg cgaggagatc 120

accctgacct gcagcgccag cagcagcgtg agctacatgc actggtacca gcagaagagc 180

ggcaccagcc ccaagctgct gatctacagc accagcaacc tggccagcgg cgtgcccagc 240

aggttcagcg gcagcggcag cggcaccttc tacagcctga ccatcagcag cgtggaggcc 300

gaggacgccc ccgactacta ctgccaccag tggagcagct acaccttcgg cggcggcacc 360

aagctggaga tcaagagggg cggcggcggc agcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc 420

agccaggtga agctgcagga gagcggcggc ggccctggtga agcccggcgg cagcctgaag 480

ctgagctgcg ccgccagcgg ctccaccttc agcagctacg ccatgagctg ggtgaggcag 540

acccccgaga agaggctgga gtgggtggcc accatcagca gcggcggcag ctacacctac 600

taccccgaca gcgtgaaggg caggttcacc atcagcaggg acaacgcaa gaacacctg 660

tacctgcaga tgagcagcct gaggagcagag gacaccgcca tgtactactg cgccaggcag 720

gacggctact accccggctg gttcgccaac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc 780

agctccgga caacgacacc agcaccacgg ccaccactc ctgctccgac aattgcgtct 840

cagccccctt ccttcgacc cgaagcttgt cgccctgctg cgggaggagc ggtccacacg 900

cgccggcttg atttcgctg cgacatctac atttgggcac ccttggccgg gacatcgggc 960

gtcttgctcc tgagtctggt tataacgctg tattgtaagc gaggtcggaa gaagcttttg 1020

tatatcttta aacagccctt tatgaggccc gtacaaacca cacaagagga ggatgggtgc 1080

tcatgcagat ttcttgaaga ggaagagggc ggttgcaac ttagagtcaa attcagccgc 1140

tccgcagatg cacctgctta taaacagggt cagaatcaat tgtataatga acttaatctc 1200

gggagcgcg aggagtatga tgtgctggac aagcgacggg gtcgagacc agagatgggc 1260

ggtaaaccgc gccgaaagaa ccccaggag ggactgtata atgagctgca aaaggacaaa 1320

atggcagaag cctattccga aatagggatg aaggagagc ggcggcgagg taaggacat 1380

gacggctctt atcaaggct tagtactgca actaaggaca cctatgacgc gctgcatatg 1440

caggctctcc cacctagata a 1461

<210> 36

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

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 Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys

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

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

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

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

 370 375 380

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

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

<210> 37

<211> 2721

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 37

atggcactcc ctgtaactgc acttcttttg ccacttgcc tgcctctgca cgcagcgcgg	60
ccggacatcg agctgaccca gagccccgcc atcatgagcg ccagcctggg cgaggagatc	120
accctgacct gcagcgccag cagcagcgtg agctacatgc actggtacca gcagaagagc	180
ggcaccagcc ccaagctgct gatctacagc accagcaacc tggccagcgg cgtgcccagc	240
aggttcagcg gcagcggcag cggcaccttc tacagcctga ccatcagcag cgtggaggcc	300
gaggacgccg ccgactacta ctgccaccag tggagcagct acaccttcgg cggcggcacc	360
aagctggaga tcaagagggg cggcggcggc agcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc	420
agccaggtga agctgcagga gagcggcggc ggcttggtga agcccggcgg cagcctgaag	480
ctgagctgcg ccgccagcgg cttcaccttc agcagctacg ccatgagctg ggtgaggcag	540
acccccgaga agaggctgga gtgggtggcc accatcagca gcggcggcag ctacacctac	600
taccccgaca gcgtgaaggg caggttcacc atcagcaggg acaacgcaa gaacaccctg	660

tacctgcaga tgagcagcct gaggagcgag gacaccgcca tgtactactg cgccaggcag	720
gacggctact accccggctg gttcgccaac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc	780
agctccggaa caacgacacc agcaccacgg ccaccactc ctgctccgac aattgcgtct	840
cagccctttt cccttcgacc cgaagcttgt cgccctgctg cgggaggagc ggtccacacg	900
cgcggtcttg atttcgcttg cgacatctac atttgggcac ccttggccgg gacatgcggc	960
gtcttgctcc tgagtctggt tataacgctg tattgtaagc gaggtcggaa gaagcttttg	1020
tatatcttta aacagccctt tatgaggccc gtacaaacca cacaagagga ggatgggtgc	1080
tcatgcagat ttctgaaga ggaagagggc ggttgcgaac ttagagtcaa attcagccgc	1140
tccgcagatg cacctgctta taaacagggt cagaatcaat tgtataatga acttaatctc	1200
gggaggcgcg aggagtatga tgtgctggac aagcgacggg gtcgagacc agagatgggc	1260
ggtaaaccce gccgaaagaa cccccaggag ggactgtata atgagctgca aaaggacaaa	1320
atggcagaag cctattccga aatagggatg aaggagagc ggcgcgagg taaggacat	1380
gacggctttt atcaaggctt tagtactgca actaaggaca cctatgacgc gctgcatatg	1440
caggctctcc cacctagacg agctaaacga ggctcaggcg cgacgaactt tagtttgctg	1500
aagcaagctg gggatgtaga ggaaaatccg ggtcccatgg attggacttg gatttgttc	1560
ctcgttgccg cagcgactcg cgtccatagt aattgggtga acgtaattag tgactgaaa	1620
aaaattgagg accttataca aagtatgcat atcgatgcaa cactgtacac ggagtccgac	1680
gtgcacccaa gctgcaaggt caccgcaatg aaatgctttt tgctcgaatt gcaagttatc	1740
tcacttgagt caggggacgc ttcaatccat gatactgtgg agaatttgat aatcctggcg	1800
aacaatagcc ttagttcaaa tggcaacgtc actgagtcag gctgcaagga atgtgaggaa	1860
ttggaagaaa aaaatatcaa ggaatttttg caatcttttg ttcacatagt tcagatgttc	1920
attaacacta gtccggggg cggcagtgga ggtggcggta gcggcggggg tggctctggt	1980
ggaggcggct ctgggggcgg aagtctgcag ataacatgcc cccacctat gagtgttgaa	2040
catgctgata tctgggttaa atcttactcc ctttacagtc gagaaaggta catttgcaac	2100
tccggcttta aacgcaaagc cgggactagt tcaactgactg aatgtgtatt gaataaagcg	2160
acaaatgtcg cacactggac tacccttcc ctcaaagca ttcgcatcc tgccttggtg	2220
catcagcgac cagcaccgcc gtccacggta actaccgag gagtaacacc gcagcccag	2280
agcctttccc cctcaggcaa agagccggcc gcatectccc catcttccaa taataccgca	2340
gctaccaccg cagcaatcgt acccgatcc cagctgatgc ccagcaaaag tccgagtact	2400
ggaacgactg aaatctccag tcacgagtct tctcatggaa ctccgagtca aactacagca	2460

aagaattggg agctgactgc ttccgcttca caccagccgc caggcggtta tcctcagga 2520

cactcagata ccacggtggc gattagcaca agcacgtcc tcctgtgtgg gctgagtga 2580

gtgtcacttc tcgctgcta ccttaagtcc agacagacac cccctttggc aagcgttgaa 2640

atggaagcca tggaagcctt gcctgtcaca tgggggactt catcccgcga tgaagacttg 2700

gagaactgct cacaccatct t 2721

<210> 38

<211> 907

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 38

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 Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

20 25 30
Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser

35 40 45
Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro

50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

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

85 90 95
Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser

100 105 110
Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly

115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys

130 135 140
Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys

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

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

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

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

 385 390 395 400

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

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn
485 490 495

Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
500 505 510

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
515 520 525

His Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp
530 535 540

Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp
545 550 555 560

Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr
580 585 590

Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly
595 600 605

Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys
610 615 620

Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe
625 630 635 640

Ile Asn Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

645 650 655
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln Ile Thr
 660 665 670
 Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
 675 680 685
 Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 690 695 700
 Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala

 705 710 715 720
 Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp
 725 730 735
 Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr
 740 745 750
 Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu
 755 760 765
 Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala

 770 775 780
 Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr
 785 790 795 800
 Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser
 805 810 815
 Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln
 820 825 830
 Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile

 835 840 845
 Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu
 850 855 860
 Ala Cys Tyr Leu Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu
 865 870 875 880
 Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg
 885 890 895
 Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu

900

905

<210> 39

<211> 3063

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

atggcactcc ctgtaactgc acttcttttg ccacttgcct tgctcctgca cgcagcgagg	60
ccggacatcg agctgaccca gagccccgcc atcatgagcg ccagcctggg cgaggagatc	120
accctgacct gcagcgccag cagcagcgtg agctacatgc actggtacca gcagaagagc	180
ggcaccagcc ccaagctgct gatctacagc accagcaacc tggccagcgg cgtgcccagc	240
aggttcagcg gcagcggcag cggcaccttc tacagcctga ccatcagcag cgtggaggcc	300
gaggacgccg ccgactacta ctgccaccag tggagcagct acaccttcgg cggcggcacc	360
aagctggaga tcaagagggg cggcggcggc agcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc	420
agccaggtga agctgcagga gagcggcggc ggccctggtga agcccggcgg cagcctgaag	480
ctgagctgcg ccgccagcgg ctacaccttc agcagctacg ccatgagctg ggtgaggcag	540
acccccgaga agaggctgga gtgggtggcc accatcagca gcggcggcag ctacacctac	600
taccccgaca gcgtgaaggg caggttcacc atcagcaggg acaacgcaa gaacacctg	660
tacctgcaga tgagcagcct gaggagcagag gacaccgcca tgtactactg cgccaggcag	720
gacggctact accccggctg gttcgccaac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc	780
agctccggaa caacgacacc agcaccacgg ccaccactc ctgctccgac aattgcgtct	840
cagccccctt ccttcgacc cgaagcttgi cgccctgctg cgggaggagc ggtccacacg	900
cgccggcttg acttcgcttg gcacatctac atttgggcac ccttggccgg gacatcgggc	960
gtcttgctcc tgagtctggt tataacgctg tattgtaagc gaggtcggaa gaagcttttg	1020
tatatcttta aacagccctt tatgaggccc gtacaaacca cacaagagga ggatgggtgc	1080
tcatgcagat ttctgaaga ggaagagggc ggttgcgaac ttagagtcaa attcagccgc	1140
tccgcagatg cacttgctta taaacagggt cagaatcaat tgtataatga acttaatctc	1200
gggaggcgcg aggagtafga tgtgttgac aagcgacggg gtcgagacc agagatgggc	1260
ggtaaacccc gccgaaagaa cccccaggag ggactgtata atgagctgca aaaggacaaa	1320
atggcagaag cctattccga aatagggatg aaggagagc ggcgcgagg taaggacat	1380

gacggctcttt atcaaggctt tagtactgca actaaggaca cctatgacgc gctgcatatg 1440
caggctctcc cacctagagg ctcaggcgcg acgaacttta gtttgctgaa gcaagctggg 1500
gatgtagagg aaaatccggg tcccatgttg gtgcgccgag gcgcacgagc aggacctcgg 1560

atgccgcgag gctggacagc cctctgtctc ctctctttgc tcccatccgg gttcatgagt 1620
ctcgacaata atggtacggc aaccccgga cccccgaccc aaggaacctt tagtaacgtt 1680
tcaaccaatg tgtcctatca ggagacaaca accccttcta cactgggcag taccagcttg 1740
catcccgta gccaacacgg caacgaggca acaactaaca tcacagagac tacggtcaag 1800
tttactagta ctccgtaat cagctctgtg tacgggaata caaatctac agttcagagt 1860
caaacgtcag ttatatctac agtcttcaact actcccgca atgtatccac cccagaaacc 1920
acctcaaac ctctcttag tccaggaaat gttagcgatt tgtcaacgac gagcacgagt 1980

ttggcgacta gtccaacgaa accgtacact tccagcagtc ccatactgtc cgacattaag 2040
gcagaaataa aatgttctgg gatcaggagg gtcaagctta cgcagggaat atgtcttgag 2100
caaaataaga cgtcctcatg cgcagaattc aagaaagatc gcggcgaagg tctggccaga 2160
gtcctctgtg gagaggagca ggcggatgct gacgcaggag cgcaggtttg tagtctcctg 2220
ctcgcgcaaa gtgaagttag gccccaatgt ctcttggttg tactggctaa ccgaactgaa 2280
attagcagca agcttcaact catgaaaaaa caccagagtg atttgaaaaa acttgggata 2340
cttgacttca cggagcaaga cgttgcgtct caccaatcct actcacagaa aaccccgata 2400

ctgttgacat gccccacat atcaatcttg tctttcttca gtgtggctct tctggtgac 2460
ttggcgtgcg tctgtggaa aaaaaggatt aaaccgatcg tttggcctag tctgccgat 2520
cacaaaaaga cactggagca cctctgcaag aagccacgaa aaaacctgaa tgtgagcttt 2580
aaccccgagt cttttttgga ctgtcagata caccgagtcg acgatataca ggcaagagat 2640
gaggttgagg gtttctgca agacacattc ccgcaacaac tcgaagaatc cgagaaacag 2700
cgcttggtg gagatgtcca gtctccgaac tgtccgagcg aggacgtagt aattaccca 2760
gaaagcttcg gtcgagatag tagccttacg gtctcgcgg ggaacgtgtc agcgtgtgac 2820

gcgcctattc ttcaagttc acgcagtttg gactgtcgag aatcaggga aaacggacct 2880
cacgtgtatc aggatctcct tctcagcctg ggcacgacaa acagtacctt gcctcctccg 2940
ttttcctgc agtcaggat tctgacgtc aatccagtcg cacaaggga acctatcctg 3000
acctccttg gtictaacca ggaagaggca tacgtcacta tgtccagctt ctatcagaat 3060
cag 3063

<210> 40

<211> 1021

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 40

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 Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile

180 185 190

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

195 200 205

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

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

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

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

 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

450 455 460
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
 485 490 495
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Val Arg
 500 505 510

 Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Gly Trp Thr Ala Leu
 515 520 525
 Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly Phe Met Ser Leu Asp Asn Asn
 530 535 540
 Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val
 545 550 555 560
 Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr Pro Ser Thr Leu Gly
 565 570 575

 Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly Asn Glu Ala Thr Thr
 580 585 590
 Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser Thr Ser Val Ile Thr
 595 600 605
 Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln Ser Gln Thr Ser Val
 610 615 620
 Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val Ser Thr Pro Glu Thr
 625 630 635 640

 Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val Ser Asp Leu Ser Thr
 645 650 655
 Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys Pro Tyr Thr Ser Ser
 660 665 670
 Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile Lys Cys Ser Gly Ile
 675 680 685
 Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu Glu Gln Asn Lys Thr
 690 695 700

Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly Glu Gly Leu Ala Arg
 705 710 715 720
 Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp Ala Gly Ala Gln Val
 725 730 735
 Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg Pro Gln Cys Leu Leu
 740 745 750
 Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser Lys Leu Gln Leu Met
 755 760 765

 Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Ile Leu Asp Phe Thr
 770 775 780
 Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser Gln Lys Thr Pro Ile
 785 790 795 800
 Leu Leu Thr Cys Pro Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala
 805 810 815
 Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro
 820 825 830

 Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu
 835 840 845
 Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser
 850 855 860
 Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp
 865 870 875 880
 Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu
 885 890 895

 Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro
 900 905 910
 Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser
 915 920 925
 Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu
 930 935 940
 Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro

945 950 955 960

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

 965 970 975

Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro

 980 985 990

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

 995 1000 1005

Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln

 1010 1015 1020

<210> 41

<211> 2181

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 41

atggcactcc ctgtaactgc acttcttttg ccacttgct tgctcctgca cgcagcgcgg	60
cgggatattc aaatgacaca aactaccagc tccctttcag catctttggg cgatagagta	120
actataagtt gccgcgcgtc ccaagacatc tctaagtacc ttaactggta tcaacaaaaa	180
cgggacggga cggtcaaact gttgatctat cacacatcca gattgcactc aggcgtgccg	240
agcaggttca gtgggagtgg gtcaggaacg gattacagct tgacgattag taacctggag	300

caagaagaca ttgccacctt cttctgccag caaggttaaca ctctcccata tacgttcggg	360
ggtggcacca agctggaaat cactggcggc ggaggatccg aggtgcagct ggtgcagagc	420
ggcgccgagg tgaagaagcc cggcgagagc ctgaggatca gctgcaaggg cagcggctac	480
agcttcagca cctactggat cagctgggtg aggcagatgc ccggcaaggg cctggagtgg	540
atgggcaaga tctaccccg cgacagctac accaactaca gccccagctt ccagggccag	600
gtgaccatca gcgccgacaa gagcatcagc accgcctacc tgcagtggag cagcctgaag	660
gccagcgaca ccgcatgta ctactgcgcc aggggctacg gcatcttcga ctactggggc	720

caggggcaccc ttgtgacgt gagcagcggc agcacaagcg gctctggcaa gcctggatct 780
ggcgaggggct ctaccaaggg catgagctac gagctgaccc agccccccag cgtgagcgtg 840
agccccggcc agaccgccag catcacctgc agcggcgaca acatcggcga ccagtacgcc 900

cactggtacc agcagaagcc cggccagagc cccgtgctgg tgatctacca ggacaagaac 960
 agggccagcg gcatccccga gaggttcagc ggagcaaca gcggcaacac cgccaccctg 1020
 accatcagcg gcacccagcg catggacgag gccgactact actgcgccac ctacaccggc 1080
 ttcggcagcc tggccgtgtt cggcggcggc accaagctga ccgtgctggg gggaggcggc 1140

 agcgaggatga aactgcagga gtccggggcc ggtctcgtgg caccttccca gtcactgtcc 1200
 gtgacctgca ccgtatctgg ggtaagtctg ccgattatg gggtttcatg gatccggcaa 1260
 cctccgagga aagggttggga atggctggga gtcactctggg gaagcgagac aacttattat 1320
 aattctgctt tgaagagccg cttgacgata atcaaggaca acagtaagag tcaggttttc 1380
 ttgaagatga attctcttca gacagatgac accgtatatt attattgtgc aaaacattat 1440
 tattacggag gatcctacgc gatggactat tggggacagg gtacctctgt tacggtgtcc 1500
 tcatccggaa caacgacacc agcaccacgg ccaccactc ctgctccgac aattgcgtct 1560

 cagccccctt cccttcgacc cgaagcttgt cgcctgctg cgggaggagc ggtccacacg 1620
 cgcgggcttg acttcgcttg cgacatctac atttgggcac ccttggccgg gacatgcggc 1680
 gtcttctcc tgagtctggt tataacgtg tattgtaagc gaggtcggaa gaagcttttg 1740
 tatactttta aacagccctt tatgaggccc gtacaaacca cacaagagga ggatgggtgc 1800
 tcatgcagat ttctgaaga ggaagaggc ggttgcgaac ttagagtcaa attcagccgc 1860
 tccgcagatg cacctgctta taaacagggt cagaatcaat tgtataatga acttaatctc 1920
 gggaggcgcg aggagtatga tgtgtggac aagcgacggg gtcgagacc agagatgggc 1980

 ggtaaacccc gccgaaagaa ccccaggag ggactgtata atgagctgca aaaggacaaa 2040
 atggcagaag cctattccga aatagggatg aaggagagc ggcgcgagg taaggacat 2100
 gacggtcttt atcaaggct tagtactgca actaaggaca cctatgacgc gctgcatatg 2160
 caggtctctc cacctagata a 2181

 <210> 42
 <400> 42
 000
 <210> 43
 <400> 43
 000
 <210> 44
 <400> 44
 000
 <210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 45

aacgtggcat ctgtcgaccc

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 46

gcgctggaga aactatttgg

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 47

acatttaacg atcagaaacg

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 48

ggtcctttgt ccacctgcgc

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 49

gagaaactat ttggaggaca

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 50

ggagaaacta tttggaggac

20

<210> 51

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 51

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro

1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val

20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe

35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser

50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp

65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val

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

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

210 215 220
Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240
Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 52

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 52

Glu Val 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 Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala 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 Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
<210> 53
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<
400> 53
Met Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr
20 25 30
Ala His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile
35 40 45
Tyr Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
65 70 75 80
Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser
85 90 95
Leu Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 54

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 54

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

<210> 55

<211> 110

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

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

<400> 55

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

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

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

<210> 56

<211> 489

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 56

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 Met Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
 20 25 30
Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn
 35 40 45

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

Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr
100 105 110

Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
115 120 125

Val Leu Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
130 135 140

Ser Thr Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
145 150 155 160

Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser
165 170 175

Phe Ser Thr Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
180 185 190

Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr
195 200 205

Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
210 215 220

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
225 230 235 240

Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
245 250 255

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270

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

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

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

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

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

340 345 350
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
355 360 365

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

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

<210> 57

<211> 1470

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 57

atggccctgc ccgtgaccgc cctgtgtctg cccctggccc tgctgtctga cgccgccagg	60
cccatgagct acgagctgac ccagccccc agcgtgagcg tgagcccccg ccagaccgcc	120
agcatcacct gcagcggcga caacatcggc gaccagtacg cccactggta ccagcagaag	180
cccgccaga gcccgtgtgt ggtgatctac caggacaaga acaggcccag cggcacccc	240
gagaggttca gcggcagcaa cagcggcaac accgccacc tgaccatcag cggcacccag	300

gccatggacg aggccgacta ctactgcgcc acctacaccg gcttcggcag cctggccgtg	360
ttcggcggcg gcaccaagct gaccgtgctg ggcagcacca gcggcagcgg caagcccggc	420
agcggcgagg gcagcaccaa gggcgagggtg cagctggtgc agagcggcgc cgaggatgaag	480
aagcccggcg agagcctgag gatcagctgc aagggcagcg gctacagctt cagcacctac	540
tggatcagct gggtagagca gatgcccgcc aagggcctgg agtggatggg caagatctac	600
cccggcgaca gctacaccaa ctacagcccc agcttcagg gccaggtgac catcagcgcc	660
gacaagagca tcagcacgc ctacctgcag tggagcagcc tgaaggccag cgacaccgcc	720
atgtactact gcgccagggg ctacggcatc ttcgactact ggggccaggg caccctggtg	780
accgtgagca gcagcggcac caccaccccc gccccaggc cccccacccc cccccacc	840
atgccagcc agcccctgag cctgaggccc gaggcctgca ggcccgcgc cgccggcgcc	900
gtgcacacca ggggcctgga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcccc cctggccggc	960
acctgcggcg tgctgctgct gagcctggtg atcacctgt actgcaagag gggcaggaag	1020
aagctgctgt acatcttcaa gcagcccttc atgaggcccg tgcagaccac ccaggaggag	1080
gacggctgca gctgcaggtt ccccgaggag gaggagggcg gctgcgagct gaggtgaag	1140
ttcagcagga gcgccgacgc cccgcctac aagcagggcc agaaccagct gtacaacgag	1200
ctgaacctgg gcaggaggga ggagtacgac gtgctggaca agaggagggg cagggacccc	1260
gagatggcg gcaagcccag gaggaagaac ccccgaggag gcctgtacaa cgagctgcag	1320
aaggacaaga tggccgagcg ctacagcgag atcgcatga agggcgagag gaggaggggc	1380
aaggccacg acggcctgta ccaggcctg agcaccgcca ccaaggacac ctacgacgcc	1440
ctgcacatgc aggcctgcc cccaggtga	1470
<210> 58	
<211> 1470	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
polynucleotide	
<400> 58	
atggccctgc ccgtgaccgc cctgtgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccagg	60
cccaggtgac agctggtgca gacggcgcc gaggtgaaga agcccggcga gacgtgagg	120
atcagctgca agggcagcgg ctacagcttc agcacctact ggatcagctg ggtgaggcag	180
atgcccgga agggcctgga gtggatgggc aagatctacc ccggcgacag ctacaccaac	240

tacagcccca gcttccaggg ccaggtgacc atcagcgccg acaagagcat cagcaccgcc 300
 tacctgcagt ggagcagcct gaagccagc gacaccgcca tgtactactg cgccaggggc 360
 tacggcatct tcgactactg gggccagggc accctggtga ccgtgagcag cggcagcacc 420

agcggcagcg gcaagcccgg cagcggcgag ggcagcacca agggcatgag ctacgagctg 480
 acccagcccc ccagcgtgag cgtgagcccc ggccagaccg ccagcatcac ctgcagcggc 540
 gacaacatcg gcgaccagta cgcccactgg taccagcaga agcccggcca gagccccgtg 600
 ctggtgatct accaggacaa gaacaggccc agcggcatcc ccgagaggtt cagcggcagc 660
 aacagcggca acaccgccac cctgaccatc agcggcacc aggccatgga cgaggccgac 720
 tactactgcg ccacctacac cggcttcggc agcctggccg tgttcggcgg cggcaccaag 780
 ctgaccgtgc tgagcggcac caccaccccc gccccaggc cccccaccc cgcacccacc 840

atgccagcc agccctgag cctgaggccc gaggcctgca ggcccggcg cggcggcgcc 900
 gtgcacacca ggggcctgga cttgcctgc gacatctaca tctgggcccc cctggcggc 960
 acctgcggcg tgctgtgct gagcctggtg atcacctgt actgcaagag gggcaggaag 1020
 aagctgctgt acatcttcaa gcagcccttc atgaggcccg tgcagaccac ccaggaggag 1080
 gacggctgca gctgcaggtt ccccgaggag gaggagggcg gctgcgagct gaggggtgaag 1140
 ttcagcagga gcgccagcg cccgcctac aagcagggcc agaaccagct gtacaacgag 1200
 ctgaacctgg gcaggaggga ggagtacgac gtgctggaca agaggagggg cagggacccc 1260

gagatggcg gcaagcccag gaggaagaac cccagaggag gcctgtacaa cgagctgcag 1320
 aaggacaaga tggccgaggc ctacagcgag atcgcatga agggcgagag gaggaggggc 1380
 aagggccacg acggcctgta ccaggcctg agcaccgcca ccaaggacac ctacgacgcc 1440
 ctgcacatgc aggcctgcc cccaggtga 1470

<210> 59

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 59

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

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

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 60

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100

105

<210> 61

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 61

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

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

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

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

180 185 190
Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala

195 200 205
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val

210 215 220
Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr

225 230 235 240
Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

245 250 255
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro

260 265 270
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu

275 280 285
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His

290 295 300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu

305 310 315 320
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr

325 330 335
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe

340 345 350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg

355 360 365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser

370 375 380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr

385 390 395 400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

405 410 415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<400> 63

000

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<400> 65

000

<210> 66

<400> 66

000

<210> 67

<400> 67

000

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<400> 71

000

<210> 72

<400> 72

000

<210> 73

<400> 73

000

<210> 74

<400> 74

000

<210> 75

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 75

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys
 130 135 140
 Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys
 145 150 155 160

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

 Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln
 225 230 235 240
 Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 245 250 255
 Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285

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

[illegible]

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

 100 105 110
 Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr

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

 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Glu Val Arg Gly Tyr Leu Asp Val Trp Gly
 245 250 255
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala
 260 265 270
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 275 280 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr

290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490

<210> 77

<211> 492

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 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 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser

50 55 60

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro

65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile

85 90 95

Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe

100 105 110

Trp Thr Thr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

180 185 190

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

195 200 205

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

210 215 220

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

225	230							235							240			
Ala	Arg	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr			
245				250				255										
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr			
260				265				270										
Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro			
275				280				285										
Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val			
290				295				300										
His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro			
305				310				315				320						
Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu			
325				330				335										
Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro			
340				345				350										
Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys			
355				360				365										
Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe			
370				375				380										
Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu			
385				390				395				400						
Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp			
405				410				415										
Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys			
420				425				430										
Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala			
435				440				445										
Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys			
450				455				460										
Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr			
465				470				475				480						

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

485

490

<210> 78

<211

> 492

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 78

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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu
180 185 190

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

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
225 230 235 240

Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Pro Trp
245 250 255

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Thr Thr Thr
260 265 270

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

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

420 425 430
 Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 435 440 445
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 450 455 460
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 465 470 475 480
 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490
 <210> 79
 <211
 > 726
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 79
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 50 55 60
 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

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

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

 Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
 435 440 445
 Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
 450 455 460
 Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr
 465 470 475 480
 Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 485 490 495

 Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 500 505 510
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 515 520 525
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 530 535 540
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 545 550 555 560

 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 565 570 575
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 580 585 590
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 595 600 605
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile

675 680 685

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
690 695 700

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
705 710 715 720

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
725

<210> 80

<211> 726

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 80

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

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

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

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln

420 425 430

Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

485 490 495

Lys Leu Glu Ile Thr Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro

500 505 510

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu

515 520 525

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

530 535 540

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly

545 550 555 560

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg

565 570 575
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln

580 585 590
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu

595 600 605
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala

610 615 620
Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu

625 630 635 640
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp

645 650 655
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu

660 665 670
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile

675 680 685
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

690 695 700
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met

705 710 715 720
Gln Ala Leu Pro Pro Arg

725

<210> 81

<211> 746

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20					25					30						
Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	
35					40					45						
Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	
50					55					60						
Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	
65					70					75					80	
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	
85					90					95						
Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	
100					105					110						
Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	
115					120					125						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	
130					135					140						
Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	
145					150					155					160	
Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	
165					170					175						
Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	
180					185					190						
Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	
195					200					205						
Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	
210					215					220						
Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	
225					230					235					240	
His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
245					250					255						
Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	
260					265					270						

Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
275 280 285

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys
290 295 300

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
325 330 335

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser
340 345 350

Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys
355 360 365

His Gln Trp Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
370 375 380

Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
385 390 395 400

Ser Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
405 410 415

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
420 425 430

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp
435 440 445

Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
450 455 460

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
465 470 475 480

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
485 490 495

Cys Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly
500 505 510

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

515 520 525
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 530 535 540

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 545 550 555 560
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 565 570 575
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 580 585 590
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 595 600 605

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 610 615 620
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 625 630 635 640
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 645 650 655
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 660 665 670

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 675 680 685
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 690 695 700
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 705 710 715 720
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 725 730 735

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 740 745

<210> 82

<211> 743

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 82

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 Thr Thr Ser Ser Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys

210 215 220
 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys

 225 230 235 240
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 245 250 255
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala

 260 265 270
 Lys Glu Ala Ala Ala Lys Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

 275 280 285
 Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser

 290 295 300
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 305 310 315 320
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

 325 330 335
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile

 340 345 350
 Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp

 355 360 365
 Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly

 370 375 380
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 385 390 395 400
 Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu

 405 410 415
 Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

 420 425 430
 Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr

 435 440 445
 Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly

 450 455 460

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
465 470 475 480
Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
485 490 495
Gln Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr
500 505 510
Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
515 520 525
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
530 535 540
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
545 550 555 560
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
565 570 575
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
580 585 590
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
595 600 605
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
610 615 620
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
625 630 635 640
Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
645 650 655
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
660 665 670
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
675 680 685
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
690 695 700
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu

705 710 715 720
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 725 730 735
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 740

<210> 83

<211> 746

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 83

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

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

Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly
 115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys
 130 135 140
Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys
145 150 155 160

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 165 170 175

Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile
 180 185 190

Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg
 195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 210 215 220

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln
 225 230 235 240

Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 245 250 255

Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser
 260 265 270

Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser
 275 280 285

Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 290 295 300

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp
 305 310 315 320

Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
 325 330 335

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu
 340 345 350

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
 355 360 365

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 370 375 380

Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

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

405 410 415
 Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp
 420 425 430

 Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp
 435 440 445
 Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu
 450 455 460
 Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
 465 470 475 480
 Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 485 490 495

 Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 500 505 510
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala
 515 520 525
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 530 535 540
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 545 550 555 560

 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 565 570 575
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 580 585 590
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 595 600 605
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 610 615 620

 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 625 630 635 640
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 645 650 655

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
660 665 670
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
675 680 685

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
690 695 700
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
705 710 715 720
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
725 730 735
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
740 745

<210> 84

<211> 746

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 84

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 Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
20 25 30
Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser
35 40 45

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

100	105	110
Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly		
115	120	125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys		
130	135	140
Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys		
145	150	155
160		
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser		
165	170	175
Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile		
180	185	190
Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg		
195	200	205
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met		
210	215	220
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln		
225	230	235
240		
Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
245	250	255
Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser		
260	265	270
Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro		
275	280	285
Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser		
290	295	300
Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro		
305	310	315
320		
Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr		
325	330	335
Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn		
340	345	350

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
355 360 365

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr
370 375 380

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
405 410 415

Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg
420 425 430

Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
435 440 445

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His
450 455 460

Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480

Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp
485 490 495

Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe
500 505 510

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala
515 520 525

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
530 535 540

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
545 550 555 560

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
565 570 575

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
580 585 590

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

595 600 605
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 610 615 620

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 625 630 635 640
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 645 650 655
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 660 665 670
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 675 680 685

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 690 695 700
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 705 710 715 720
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 725 730 735
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 740 745

<210> 85

<211> 1261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 85

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

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

 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 130 135 140
 Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 145 150 155 160
 Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys
 165 170 175

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

 Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr
 245 250 255
 Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp
 260 265 270
 Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu
 275 280 285

Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
290 295 300

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
305 310 315 320

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
325 330 335

Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp
340 345 350

Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly
355 360 365

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys
370 375 380

Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser
385 390 395 400

Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser
405 410 415

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
420 425 430

Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
435 440 445

Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
450 455 460

Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr
465 470 475 480

Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
485 490 495

Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
500 505 510

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
515 520 525

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

530 535 540
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 545 550 555 560

 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 565 570 575
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 580 585 590
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 595 600 605
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 610 615 620

 Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 625 630 635 640
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 645 650 655
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 660 665 670
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 675 680 685

 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 690 695 700
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 705 710 715 720
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
 725 730 735
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Val Arg
 740 745 750

 Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Gly Trp Thr Ala Leu
 755 760 765
 Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly Phe Met Ser Leu Asp Asn Asn
 770 775 780

Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val
 785 790 795 800
 Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr Pro Ser Thr Leu Gly
 805 810 815

Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly Asn Glu Ala Thr Thr
 820 825 830
 Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser Thr Ser Val Ile Thr
 835 840 845
 Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln Ser Gln Thr Ser Val
 850 855 860
 Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val Ser Thr Pro Glu Thr
 865 870 875 880

Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val Ser Asp Leu Ser Thr
 885 890 895
 Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys Pro Tyr Thr Ser Ser
 900 905 910
 Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile Lys Cys Ser Gly Ile
 915 920 925
 Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu Glu Gln Asn Lys Thr
 930 935 940

Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly Glu Gly Leu Ala Arg
 945 950 955 960
 Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp Ala Gly Ala Gln Val
 965 970 975
 Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg Pro Gln Cys Leu Leu
 980 985 990
 Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser Lys Leu Gln Leu Met
 995 1000 1005

Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Ile Leu Asp Phe
 1010 1015 1020
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser Gln Lys Thr

1025	1030	1035
Pro Ile Leu Leu Thr Cys Pro	Thr Ile Ser Ile Leu	Ser Phe Phe
1040	1045	1050
Ser Val Ala Leu Leu Val Ile	Leu Ala Cys Val Leu	Trp Lys Lys
1055	1060	1065
Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp	Pro Ser Leu Pro Asp	His Lys Lys
1070	1075	1080
Thr Leu Glu His Leu Cys Lys	Lys Pro Arg Lys Asn	Leu Asn Val
1085	1090	1095
Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe	Leu Asp Cys Gln Ile	His Arg Val
1100	1105	1110
Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp	Glu Val Glu Gly Phe	Leu Gln Asp
1115	1120	1125
Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu	Glu Ser Glu Lys Gln	Arg Leu Gly
1130	1135	1140
Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn	Cys Pro Ser Glu Asp	Val Val Ile
1145	1150	1155
Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg	Asp Ser Ser Leu Thr	Cys Leu Ala
1160	1165	1170
Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp	Ala Pro Ile Leu Ser	Ser Ser Arg
1175	1180	1185
Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser	Gly Lys Asn Gly Pro	His Val Tyr
1190	1195	1200
Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu	Gly Thr Thr Asn Ser	Thr Leu Pro
1205	1210	1215
Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser	Gly Ile Leu Thr Leu	Asn Pro Val
1220	1225	1230
Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu	Thr Ser Leu Gly Ser	Asn Gln Glu
1235	1240	1245
Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser	Ser Phe Tyr Gln Asn	Gln
1250	1255	1260

<210> 86

<211> 1263

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 86

Met Ala Ser Arg Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe

20 25 30

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

35 40 45

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu

50 55 60

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp

65 70 75 80

Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser

85 90 95

Lys Leu Glu Tyr Ser Gly Gly Gly Ser Leu Glu Gly Val Gln Val Glu

100 105 110

Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr

115 120 125

Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp

130 135 140

Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln

145 150 155 160

Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly

165 170 175

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

180 185 190

Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val

195 200 205
 Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala
 225 230 235 240
 Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met
 245 250 255
 Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg
 260 265 270
 Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys
 275 280 285

 Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly
 290 295 300
 Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln
 305 310 315 320
 Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His
 325 330 335
 Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr
 340 345 350

 Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly
 355 360 365
 Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln
 370 375 380
 Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr
 385 390 395 400
 Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr
 405 410 415

 Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser
 420 425 430
 Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro
 435 440 445

Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu
450 455 460

Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln
465 470 475 480

Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr
485 490 495

Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe
500 505 510

Lys Thr Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala
515 520 525

Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala
530 535 540

Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Ile
545 550 555 560

Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg
565 570 575

Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
580 585 590

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His
595 600 605

Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
610 615 620

Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp
625 630 635 640

Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe
645 650 655

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
660 665 670

Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu
675 680 685

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

690	695	700	
Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr			
705	710	715	720
Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly			
	725	730	735
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln			
	740	745	750
Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg			
	755	760	765
Gln Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr			
	770	775	780
Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly			
785	790	795	800
Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro			
	805	810	815
Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser			
	820	825	830
Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly			
	835	840	845
Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly			
850	855	860	
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu			
865	870	875	880
Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His			
	885	890	895
Gln Trp Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	900	905	910
Arg Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly			
	915	920	925
Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly			
930	935	940	

Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
 945 950 955 960
 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
 965 970 975
 Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
 980 985 990

Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
 995 1000 1005
 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr
 1010 1015 1020
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 1025 1030 1035
 Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 1040 1045 1050

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 1055 1060 1065
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 1070 1075 1080
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 1085 1090 1095
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 1100 1105 1110

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 1115 1120 1125
 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 1130 1135 1140
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 1145 1150 1155
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 1160 1165 1170

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

1175 1180 1185
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 1190 1195 1200
 Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 1205 1210 1215
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 1220 1225 1230

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 1235 1240 1245
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 1250 1255 1260

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 87

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 100 105

<210> 88

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 88

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 89

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 89

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

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

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

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

260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 90

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 90

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

1 5 10 15

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 91

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 92

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 92

Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5

<210> 93

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> SITE

<222> (1)..(30)

<223> This sequence may encompass 2-6 "Gly Gly Gly Gly Ser"
 repeating units

<400> 93

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

<210> 94

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 94

Arg Gly Asp Ser

1

<210> 95

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 95

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

1 5 10 15

Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Ile

20 25 30

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn

35 40 45

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 96

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 96

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 97

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 97

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Thr Asp Lys Ala Ile Ser Thr Ile Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Ser Pro Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Ala Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 98

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg

100 105

<210> 99

<211> 903

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 99

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 Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 165 170 175
 Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile
 180 185 190
 Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg
 195 200 205
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 210 215 220
 Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln
 225 230 235 240
 Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 245 250 255
 Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380
 Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp

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

 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
 485 490 495
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Asp Trp Thr
 500 505 510
 Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val His Ser Asn Trp
 515 520 525
 Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser

 530 535 540
 Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser
 545 550 555 560
 Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile
 565 570 575
 Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu
 580 585 590
 Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu

 595 600 605
 Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu
 610 615 620
 Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 625 630 635 640
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 645 650 655

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln Ile Thr Cys Pro Pro Pro

660 665 670
Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr
675 680 685
Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly
690 695 700
Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala
705 710 715 720
His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val

725 730 735
His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr Ala Gly Val Thr
740 745 750
Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu Pro Ala Ala Ser
755 760 765
Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Ile Val Pro
770 775 780
Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr Gly Thr Thr Glu

785 790 795 800
Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser Gln Thr Thr Ala
805 810 815
Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln Pro Pro Gly Val
820 825 830
Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile Ser Thr Ser Thr
835 840 845
Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu Ala Cys Tyr Leu

850 855 860
Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu Met Glu Ala Met
865 870 875 880
Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg Asp Glu Asp Leu
885 890 895
Glu Asn Cys Ser His His Leu

900

<210> 100

<211> 1065

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 100

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 Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile

180	185	190
Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg		
195	200	205
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met		
210	215	220
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln		
225	230	235
Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Trp Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
245	250	255
Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro		
260	265	270
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu		
275	280	285
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp		
290	295	300
Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly		
305	310	315
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg		
325	330	335
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln		
340	345	350
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu		
355	360	365
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala		
370	375	380
Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu		
385	390	395
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp		
405	410	415
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu		
420	425	430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445

 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
 485 490 495
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu
 500 505 510

 Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu
 515 520 525
 Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp
 530 535 540
 Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr
 545 550 555 560
 Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
 565 570 575

 Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
 580 585 590
 Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
 595 600 605
 Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
 610 615 620
 Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
 625 630 635 640

 Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
 645 650 655
 Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
 660 665 670
 Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile

675	680	685	
Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His			
690	695	700	
Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys			
705	710	715	720
Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys			
725	730	735	
Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys			
740	745	750	
Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys			
755	760	765	
Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp			
770	775	780	
Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn			
785	790	795	800
Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu			
805	810	815	
Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly			
820	825	830	
Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Pro Ile Leu Leu Thr Cys			
835	840	845	
Pro Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile			
850	855	860	
Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro			
865	870	875	880
Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro			
885	890	895	
Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys			
900	905	910	
Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly			
915	920	925	

Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln
 930 935 940
 Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val
 945 950 955 960

Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu
 965 970 975
 Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg
 980 985 990
 Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln
 995 1000 1005
 Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro
 1010 1015 1020

Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala
 1025 1030 1035
 Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu
 1040 1045 1050
 Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
 1055 1060 1065

<210> 101

<211> 851

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<

400> 101

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 Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
 20 25 30
 Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser
 35 40 45
 Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro

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

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

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

 Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
485 490 495

Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu
500 505 510

Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu
515 520 525

Ile Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
530 535 540

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp

545 550 555 560
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 565 570 575

 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 580 585 590
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 595 600 605
 Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Gly Gly Gly Ser
 610 615 620
 Gly Gly Gly Ser Pro Ile Leu Leu Thr Cys Pro Thr Ile Ser Ile Leu
 625 630 635 640

 Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp
 645 650 655
 Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys
 660 665 670
 Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val
 675 680 685
 Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp
 690 695 700

 Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe
 705 710 715 720
 Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val
 725 730 735
 Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser
 740 745 750
 Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala
 755 760 765

 Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu
 770 775 780
 Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu
 785 790 795 800

Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly
805 810 815
Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser
820 825 830
Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr
835 840 845
Gln Asn Gln
850
<210> 102
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 102
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
<210> 103
<211> 368
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 103
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val
20 25 30
Glu Phe Thr Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr
35 40 45
Asn Met Glu Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe
50 55 60

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

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