



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월14일
(11) 등록번호 10-2805767
(24) 등록일자 2025년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2025.01)
A61K 35/17 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2017-7020916
(22) 출원일자(국제) 2015년12월28일
심사청구일자 2020년12월28일
(85) 번역문제출일자 2017년07월26일
(65) 공개번호 10-2017-0093254
(43) 공개일자 2017년08월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/067635
(87) 국제공개번호 WO 2016/109410
국제공개일자 2016년07월07일
(30) 우선권주장
62/097,375 2014년12월29일 미국(US)
62/133,137 2015년03월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Blood. 2009,113: 4449-4457.
W02013126712 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국, 19104 펜실바니아주, 필라델피아, 9층, 씨
빅 센터 불러바드 3600
(72) 발명자
베도야, 펠리프
미국 19403 펜실베니아주 이스트 노리스타운 헤이
즈 로드 3202
가세미, 사바
미국 19129 펜실베니아주 필라델피아 헤이우드 스
트리트 3641
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 김영

전체 청구항 수 : 총 15 항

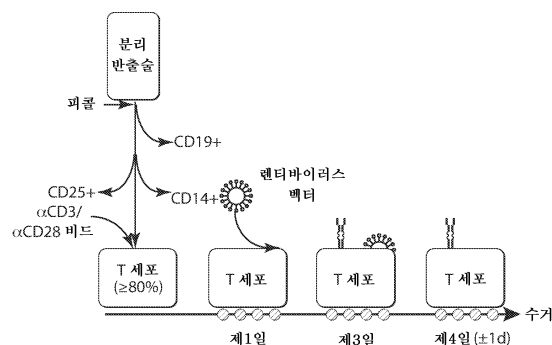
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 키메라 항원 수용체-발현 세포를 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 조작될 수 있는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)를 제조하는 방법, 및 그를 포함하는 조성물 및 반응 혼합물을 제공한다.

대표도 - 도20



(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
C12N 5/0087 (2013.01)
C12N 5/0638 (2025.01)
A61K 2039/5156 (2025.01)
A61K 2039/5158 (2025.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

준, 카를, 에이치.

미국 19066 펜실베이니아주 메리온 스테이션 베어드
로드 409

레바인, 브루스, 엘.

미국 08003 뉴저지주 체리 힐 리버티 벨 드라이브
1258

멜렌호스트, 잔, 제이.

미국 08003 뉴저지주 체리 힐 엑스톤 서클 11

밀론, 마이클, 씨.

미국 08002 뉴저지주 체리 힐 서리 로드 314

포웰, 다니엘, 제이., 주니어

미국 19004 펜실베이니아주 발라 신워드 아버데일 로
드 36

쟁, 조에

미국 08003 뉴저지주 체리 힐 도랄 드라이브 412

명세서

청구범위

청구항 1

CD25+ T 조절 세포 및 CD25-발현 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 세포가 고갈된, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 조작될 수 있는, 단리된 T 세포의 집단을 제조하는 방법이며,

CLL을 갖는 대상체로부터 수득된 집단으로부터 CD25+ 세포를 제거하여, 이에 의해 CAR의 발현에 적합한 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 CD25+ T 조절 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 CD25-발현 CLL 세포를 함유하는 T 세포의 집단을 제공하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

CD25+ T 조절 세포 및 CD25-발현 CLL 세포가 고갈되고 CAR을 발현하도록 조작될 수 있는 단리된 T 세포의 집단을 제조하는 방법이며,

CLL을 갖는 대상체로부터 수득된 세포의 집단을 항-CD25 항체 또는 CD25 결합 리간드와 접촉시켜, 이에 의해 CD25+ 세포가 제거된 T 세포의 집단을 제공하고, 여기서 T 세포의 집단은

항-CD3 선택된 T 세포의 집단과 비교 시 증가된 렌티바이러스 형질도입 효율을 갖고;

50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 CD25-발현 CLL 세포

를 함유하는 것인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 항-CD25 항체 또는 CD25 결합 리간드가 기질에 접합된 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 집단으로부터 CD25 이외의 종양 항원을 발현하는 세포를 제거하여, 이에 의해 CAR의 발현에 적합한 CD25-고갈된, 및 종양 항원 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계; 또는

(ii) 집단으로부터 체크 포인트 억제제를 발현하는 세포를 제거하여, 이에 의해 CD25-고갈된, 및 체크 포인트 억제제 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계

중 하나 또는 둘 다를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

(i) 종양 항원이 CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 또는 CD11b를 포함하거나; 또는

(ii) 체크 포인트 억제제가 PD-1, LAG-3, 및 TIM-3 중 하나 이상을 포함하는

것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제공되는 단리된 T 세포의 집단이 CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA,

및 CD45RO으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 마커의 발현에 기초하여 선택된 바 있는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 T 세포가 CD3 또는 CD28 중 하나 또는 둘 다에 대해 양성인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) CD25+ T 조절-고갈된 세포 및 CD25-발현 CLL-고갈된 세포의 집단을 활성화하는 단계 및 CD25+ T 조절-고갈된 세포 및 CD25-발현 CLL-고갈된 세포의 집단으로부터의 세포를, CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질 도입하는 단계; 및

(ii) CD25+ T 조절-고갈된 세포 및 CD25-발현 CLL-고갈된 세포의 집단을 확장하는 단계

중 하나 또는 둘 다를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 세포의 집단이

(i) 8일 이하의 기간 동안 확장되거나;

(ii) 7, 6, 5, 4, 또는 3일의 기간 동안 확장되거나;

(iii) 배양물에서 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포보다 더 강력하고, 여기서 5일 동안 확장된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 항원 자극 시에 세포 배가에서 적어도 1, 2, 3, 또는 4배 증가를 제시하거나; 또는

(iv) 배양물에서 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 더 높은 염증유발 시토카인 생산을 나타내는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 염증유발 시토카인이 IFN- γ 및 GM-CSF 중 하나 이상인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 세포의 집단이

(i) CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 세포의 표면 상의 공동자극 분자를 자극하는 리간드의 존재 하에 세포를 배양함으로써 확장되거나; 또는

(ii) 14일 확장 기간에 걸쳐 세포에서 적어도 200배 증가를 발생시키는 1종 이상의 인터류킨을 포함하는 적절한 배지에서 확장되는 것인

방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

(i) CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제가 항-CD3 항체 또는 그의 단편과 접합된 비드를 포함하거나;

(ii) 공동자극 분자를 자극하는 리간드가 항-CD28 항체 또는 그의 단편을 포함하거나; 또는

(iii) 세포의 집단이 IL-15, IL-7, 또는 IL-15 및 IL-7 둘 다의 존재 하에 확장되는 것인

방법.

청구항 13

제8항에 있어서, 세포의 집단이 적절한 확장 기간 후에 동결보존되는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 T 세포의 집단을 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 핵산이 DNA 또는 RNA인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 텔로머라제 서브유닛이 hTERT를 포함하는 것인 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2014년 12월 29일에 출원된 미국 일련 번호 62/097,375 및 2015년 3월 13일에 출원된 미국 일련 번호 62/133,137에 대한 우선권을 주장하며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0002] 서열 목록

[0003] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출된 서열 목록을 함유하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2015년 12월 18일에 생성된 상기 ASCII 카피는 N2067-7067WO_SL.txt로 명명되고, 246,147 바이트 크기이다.

[0004] 발명의 분야

[0005] 본 발명은 일반적으로 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 조작된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)를 제조하는 방법, 및 그를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 자가 T-세포, 특히 키메라 항원 수용체 (CAR)로 형질도입된 T-세포에 의한 입양 세포 전달 (ACT) 요법은 여러 혈액암 시험에서 유망한 것으로 제시된 바 있다.

발명의 내용

[0007] 본 개시내용은 CAR을 발현하도록 조작될 수 있는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포), 및 그를 포함하는 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0008] 따라서, 한 측면에서, 개시내용은 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포)의 집단을 제공하는 단계, 집단으로부터 T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포를 제거하여, 이에 의해 CAR의 발현에 적합한 T 조절-고갈된 세포, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계를 포함하는, CAR을 발현하도록 조작될 수 있는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)의 집단을 제조하는 방법을 특색으로 한다.

[0009] 한 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포의 집단은 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포를 함유한다.

[0010] 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 집단은 암을 갖는 대상체, 예를 들어 CD25 발현 암 예컨대, 예를 들어 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 갖는 대상체의 세포이다. 한 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포의 집단은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 중앙 세포를 함유한다.

[0011] 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 집단은 치료를 위해 세포가 투여될 대상체에 대해 자가이다. 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 집단은 치료를 위해 세포가 투여될 대상체에 대해 동종이다.

[0012] 한 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포는 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 또는 CD25-결합 리간드, 예를 들어 IL-2를 사용하여 집단으로부터 제거된다. 한 실시양태에서, 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 또는 CD25-결합 리간드는 기질, 예를 들어 비드에 접합되거나, 또는 달리 기질, 예를 들어 비드 상에 코팅된다. 한 실시양태에서, 항-CD25 항체 또는 그의 단편은 본원에 기재된 바와 같은 기질에 접합된다. 한 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포는 항-CD25 항체 분자 또는 그의 단편을 사용하여 집단으로부터 제거된다.

[0013] 한 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포는 밀테니(Miltenyi)TM로부터의 CD25 고갈 시약을 사용하여 집단으로부터 제거된다. 한 실시양태에서, 세포 대 CD25 고갈 시약의 비는 1e7개 세포 대 20 uL, 또는 1e7개 세포 대 15 uL, 또는 1e7개 세포 대 10 uL, 또는 1e7개 세포 대 5 uL, 또는 1e7개 세포 대 2.5 uL, 또는 1e7개 세포 대 1.25 uL이다.

[0014] 한 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단은 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR의 발현에 적합하다. 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 집단은 혈액암, 예를 들어

백혈병, 예를 들어 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 또는 림프종, 예를 들어 외투 세포 림프종 (MCL) 또는 호지킨 림프종 (HL)을 갖는 대상체로부터 수득된다. 한 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포의 집단은 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 백혈병 세포, 예를 들어 CLL 세포, ALL 세포, 또는 림프종 세포, 예를 들어 MCL 세포 또는 HL 세포를 함유한다. 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 집단은 CLL을 갖는 대상체로부터 수득되고, T 조절-고갈된 세포, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단은 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 백혈병 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유하고 본원에 기재된 CD19 CAR의 발현에 적합하다. 한 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포의 집단은 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 종양 세포, 예를 들어 CD25 발현 종양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다. 한 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포의 집단은 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 종양 세포, 예를 들어 CD25 발현 종양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다.

[0015] 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 집단은 말초 혈액 림프구로부터 분리된 T 세포이다. 한 실시양태에서, T 세포의 집단은 적혈구를 용해시키고/거나 단핵구를 고갈시킴으로써 수득된다. 한 실시양태에서, T 세포의 집단은, 예를 들어 본원에 기재된 방법을 사용하여 말초 림프구로부터 분리된다.

[0016] 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 집단은 대상체로부터의 혈액 샘플로부터 수득될 수 있고, 예를 들어 분리 반출술에 의해 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 분리반출술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하기 위해 세척되고, 임의로 세포는 후속 가공 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지 중에 제공된다. 한 실시양태에서, 세포는 완충제 예컨대, 예를 들어 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세척된다. 한 실시양태에서, 세포는 1종 이상의 2가 양이온 예컨대 칼슘 및 마그네슘이 결여된, 예를 들어 칼슘 및 마그네슘 둘 다 결여된 세척 용액에서 세척된다. 한 실시양태에서, 세포는 실질적으로 어떠한 2가 양이온도 갖지 않는 완충제에서 세척된다.

[0017] 한 실시양태에서, 방법은 종양 항원, 예를 들어 CD25를 포함하지 않는 종양 항원, 예를 들어 CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 또는 CD11b를 발현하는 집단으로부터 세포를 제거하여, 이에 의해 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR의 발현에 적합한 T 조절-고갈된, 예를 들어 CD25+ 고갈된, 및 종양 항원 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 종양 항원 발현 세포는 T 조절, 예를 들어 CD25+ 세포와 동시에 제거된다. 예를 들어, 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 및 항종양 항원 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 동일한 기질, 예를 들어 비드에 부착될 수 있거나, 또는 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 또는 항종양 항원 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 혼합물인 별개의 비드에 부착될 수 있다. 다른 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포의 제거 및 종양 항원 발현 세포의 제거는 순차적이고, 예를 들어 어느 하나의 순서로 일어날 수 있다.

[0018] 한 실시양태에서, 방법은 체크 포인트 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 체크 포인트 억제제를 발현하는 집단으로부터 세포, 예를 들어 PD1+ 세포, LAG3+ 세포, 및 TIM3+ 세포 중 1종 이상 (예를 들어, 그 중 2 또는 3종)을 제거하여, 이에 의해 T 조절 고갈된, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포, 및 체크 포인트 억제제 고갈된 세포, 예를 들어 PD1+, LAG3+ 및/또는 TIM3+ 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 실시양태에서, PD1+ 세포 및 LAG3+ 세포가 제거되거나; PD1+ 세포 및 TIM3+ 세포가 제거되거나; 또는 LAG3+ 및 TIM3+ 세포가 제거된다. 한 실시양태에서, 체크 포인트 억제제 발현 세포는 T 조절, 예를 들어 CD25+ 세포와 동시에 제거된다. 예를 들어, 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 및 항-체크 포인트 억제제 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 동일한 비드에 부착될 수 있거나, 또는 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 및 항-체크 포인트 억제제 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 혼합물인 별개의 비드에 부착될 수 있다. 다른 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포의 제거, 및 체크 포인트 억제제 발현 세포의 제거는 순차적이고, 예를 들어 어느 하나의 순서로 일어날 수 있다.

[0019] 한 실시양태에서, 제거될 세포의 집단은 조절 T 세포도 종양 세포도 아니지만, CART 세포의 확장 및/또는 기능에 달리 부정적인 영향을 미치는 세포, 예를 들어 CD14, CD11b, CD33, CD15, 또는 잠재적으로 면역 억제 세포에 의해 발현되는 다른 마커를 발현하는 세포이다. 한 실시양태에서, 이러한 세포는 조절 T 세포 및/또는 종양 세포와 공동으로, 또는 상기 고갈 후에, 또는 또 다른 순서로 제거되는 것이 고려된다.

[0020] 한 실시양태에서, 방법은 CD14를 발현하는 집단으로부터 세포를 제거하여, 이에 의해 T 조절-고갈된, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포, 및 CD14+ 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, CD14+ 세포는 T 조절, 예를 들어 CD25+ 세포와 동시에 제거된다. 예를 들어, 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 및

항-CD14 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 동일한 비드에 부착될 수 있거나; 또는 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 및 항-CD14 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 혼합물인 별개의 비드에 부착될 수 있다. 다른 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포의 제거 및 CD14+ 세포의 제거는 순차적이고, 예를 들어 어느 하나의 순서로 일어날 수 있다. 한 실시양태에서, CD14+ 세포는 CD14 항체 분자 또는 그의 단편을 사용하여 제거된다.

[0021] 한 실시양태에서, 제공되는 면역 이펙터 세포의 집단은 1종 이상의 마커 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7종, 또는 그 초과 마커), 예를 들어 CD3, CD28, CD4, CD8, CD27, CD127, CD45RA, 및 CD45RO의 발현에 기초하여 선택된 바 있고, 예를 들어 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포)의 제공되는 집단은 CD3+ 및/또는 CD28+이다.

[0022] 한 실시양태에서, 방법은 1종 이상의 마커 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7종, 또는 그 초과 마커), 예를 들어 CD3, CD28, CD4, CD8, CD27, CD127, CD45RA, 및 CD45RO의 발현에 대해 풍부화된, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포의 집단을 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 집단은 CD3+ 및/또는 CD28+ 세포에 대해 풍부화된다. 예를 들어, 항-CD3/항-CD28 접합된 비드와의 인큐베이션에 의해 단리된 T 세포가 획득된다. 한 실시양태에서, 방법은 1종 이상 마커 (예를 들어, 2, 3, 4, 5종, 또는 그 초과 마커), 예를 들어 CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA, 및 CD45RO를 발현하는 T 조절-고갈된 세포, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단으로부터 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함한다.

[0023] 한 실시양태에서, 방법은, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 T 조절 고갈된 세포, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단을 활성화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0024] 한 실시양태에서, 방법은 T 조절-고갈된 세포의 집단, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단으로부터의 세포를, CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질도입하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단의 집단으로부터의 세포는, 예를 들어 면역 이펙터 세포의 집단이 대상체로부터의 혈액 샘플로부터 획득된 후, 예를 들어 분리반출술에 의해 획득된 후 1일 내에 벡터로 1회 형질도입된다.

[0025] 한 실시양태에서, 방법은 T 조절-고갈된 세포의 집단, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단으로부터 외인성 RNA를 일시적으로 발현하는 RNA-조작된 세포의 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 방법은 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 집단으로부터의 세포 내로 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 RNA는 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산을 포함한다.

[0026] 한 실시양태에서, CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산으로 형질도입된 세포는, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 배양물에서 수 시간 (예를 들어, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21시간) 내지 약 14일 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일)의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 3 내지 9일의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 4 내지 9일의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 8일 이하, 예를 들어 7, 6, 5, 4, 또는 3일의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 배양물에서 3 또는 4일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포보다 더 강력하다. 한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 배양물에서 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포보다 더 강력하다. 효력은, 예를 들어 다양한 T 세포 기능, 예를 들어 증식, 표적 세포 사멸, 시토카인 생산, 활성화, 이동, 또는 그의 조합에 의해 정의될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 또는 4일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 항원 자극 시에 세포 배가에서 적어도 1, 2, 3 또는 4배 증가를 제시한다. 한 실시양태에서, 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 항원 자극 시에 세포 배가에서 적어도 1, 2, 3 또는 4배 증가를 제시한다. 한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 발현하는 세포는 배양물에서 3 또는 4일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 더 높은 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준을 나타낸다. 한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 발현하는 세포는 배양물에서 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 더 높은 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수

준을 나타낸다. 한 실시양태에서, 3 또는 4일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 pg/ml 단위의 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10배 또는 그 초과를 증가를 제시한다. 한 실시양태에서, 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 pg/ml 단위의 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10배 또는 그 초과를 증가를 제시한다. 한 실시양태에서, 3, 4, 또는 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 적어도 pg/ml 단위의 높은 시토카인 생산, 또는 pg/ml 단위의 시토카인 생산, 예를 들어 IL2, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-1 β , IL4, IL5, IL6, IL8, 또는 IL10 수준에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10배 또는 그 초과를 증가를 제시한다.

[0027] 한 실시양태에서, 비드 (예를 들어, CD3/28-자극 비드)는 세포로부터 기계적 파괴에 의해 제거된다. 한 실시양태에서, 기계적 파괴는 피펫 팁, 예를 들어 좁은 구멍 피펫 팁을 통한 세포의 통과 (예를 들어, 반복 통과)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 1개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 초과)의 튜브, 예를 들어 좁은 구멍 튜브를 통해 통과된다. 한 실시양태에서, 튜브는 밀폐된 세포 배양 시스템의 일부이다. 일부 실시양태에서, 피펫 팁 또는 튜브의 내부 직경은 약 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.5mm, 0.4 mm, 0.3 mm 또는 0.2 mm 미만이고, 임의로 직경은 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm 또는 0.4 mm 초과이다.

[0028] 한 실시양태에서, 3, 4, 또는 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 증가된 비율의 Tem 세포, Tcm 세포, 또는 Tem 및 Tcm 세포 둘 다를 갖는다. 한 실시양태에서, 3, 4, 또는 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 증가된 비율의 Tem 세포, Teff 세포, 또는 Tem 및 Teff 세포 둘 다를 갖는다. 한 실시양태에서, 3, 4, 또는 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19CAR 세포의 집단은 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50%, 및 임의로 최대 약 40% 또는 50%의 T나이프 유사 세포의 백분율 (T나이프 유사, Teff, 및 Tcm 세포 중)을 갖는다. 한 실시양태에서, 3, 4, 또는 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19CAR 세포의 집단은 적어도 약 10%, 15%, 또는 20%, 및 임의로 최대 약 15% 또는 20%의 Tem 세포의 백분율 (T나이프 유사, Teff, 및 Tcm 세포 중)을 갖는다. 한 실시양태에서, 3, 4, 또는 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19CAR 세포의 집단은 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 또는 70%, 및 임의로 최대 약 50% 또는 70%의 (T나이프 유사 + Tem) 세포의 백분율 (T나이프 유사, Teff, 및 Tcm 세포 중)을 갖는다.

[0029] 한 실시양태에서, 3, 4, 또는 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는, 도 31a의 NALM6 검정에서 0.5×10^6 개 세포의 용량으로 투여된 경우에 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포의 1×10^6 , 1.5×10^6 , 2×10^6 , 2.5×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 또는 5×10^6 개의 용량 이상의 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서 활성은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6주에 측정된다.

[0030] 한 실시양태에서, 세포는, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이, CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 세포의 표면 상의 공동자극 분자를 자극하는 리간드의 존재 하에 세포를 배양함으로써 확장된다. 한 실시양태에서, 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 단편 및/또는 항-CD28 항체 또는 그의 단편과 접합된 비드이다.

[0031] 한 실시양태에서, 세포는 혈청 (예를 들어, 태아 소 또는 인간 혈청), 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TGF β , 및 TNF- α 또는 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함한, 증식 및/또는 생존을 위한 1종 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5종 또는 그 초과)의 인자를 임의로 함유할 수 있는 적절한 배지 (예를 들어, 본원에 기재된 배지)에서 확장된다.

[0032] 한 실시양태에서, 세포는, 예를 들어 본원에 기재된 방법 예컨대 유동 세포측정법에 의한 측정 시, 14일 확장 기간에 걸쳐 세포에서 적어도 200-배 (예를 들어, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배) 증가를 발생시키는 1종 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5종 또는 그 초과)의 인터류킨을 포함하는 적절한 배지 (예를 들어, 본원에 기재된 배지)에서 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 IL-15 및/또는 IL-7 (예를 들어, IL-15 및 IL-7)의 존재 하에 확장된다.

[0033] 한 실시양태에서, 세포는 적절한 확장 주기 후에 동결보존된다. 한 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 방법에 따라 동결보존된다. 한 실시양태에서, 확장된 세포는 적절한 배지, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 주

입가능한 배지에서 동결보존된다.

- [0034] 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포의 집단을 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 hTERT를 코딩하는 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산은 DNA 또는 RNA이다.
- [0035] 또 다른 측면에서, 개시내용은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포를 함유하는 T 조절-고갈된 세포의 집단을 포함하는 반응 혼합물을 특색으로 한다. 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25 발현 종양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유하는 T 조절-고갈된 세포의 집단을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포의 집단은 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 종양 세포, 예를 들어 CD25 발현 종양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다. 한 실시양태에서, 세포의 집단은 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 종양 세포, 예를 들어 CD25 발현 종양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다.
- [0036] 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 체크포인트 억제제 발현 세포, 예를 들어 PD1+ 세포, LAG3+ 세포, 또는 TIM3+ 세포를 함유하는 T 조절-고갈된 세포의 집단을 포함한다. 반응 혼합물은 완충제 또는 다른 시약, 예를 들어 PBS 함유 용액을 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD14+ 세포를 함유하는 T 조절-고갈된 세포의 집단을 포함한다. 반응 혼합물은 완충제 또는 다른 시약, 예를 들어 PBS 함유 용액을 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 집단의 세포를 활성화 및/또는 확장시키는 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은, 예를 들어 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및/또는 세포의 표면 상의 공동자극 분자를 자극하는 리간드를 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 단편 및/또는 항-CD28 항체 또는 그의 단편과 접합된 비드이다.
- [0039] 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 혈청 (예를 들어, 태아 소 또는 인간 혈청), 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TGF β , 및 TNF- α 또는 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함한, 증식 및/또는 생존을 위한 1종 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5종)의 인자를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 IL-15 및/또는 IL-7을 추가로 포함한다.
- [0040] 한 실시양태에서, 반응 혼합물 중 집단의 복수의 세포는 핵산 분자, 예를 들어 CAR 코딩 서열, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은, 예를 들어 CD19 CAR 코딩 서열을 포함하는 본원에 기재된 핵산 분자를 포함한다.
- [0041] 한 실시양태에서, 반응 혼합물 중 집단의 복수의 세포는 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터는 본원에 기재된 벡터, 예를 들어 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 벡터이다.
- [0042] 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 동결보호제 또는 안정화제 예컨대, 예를 들어 사카라이드, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드 및 폴리올 (예를 들어, 트레할로스, 만니톨, 소르비톨, 락토스, 수크로스, 글루코스 및 텍스트란), 염 및 크라운 에테르를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 동결보호제는 텍스트란이다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 개시내용은 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포)의 집단을 제공하는 단계이며, 여기서 복수의 면역 이펙터 세포는 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 예를 들어, 본원에 기재된 방법 예컨대 유동 세포측정법에 의한 측정 시, 14일 확장 기간에 걸쳐 세포에서 적어도 200-배 (예를 들어, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배) 증가를 발생시키는 1종 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5종)의 인터류킨의 존재 하에 집단의 세포를 확장시키는 단계를 포함하는, CAR을 발현하도록 조작된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)의 집단을 제조하는 방법을 특색으로 한다. 한 실시양태에서, 집단의 세포는 IL-15 및/또는 IL-7, 예를 들어 IL-15 및 IL-7의 존재 하에 확장된다.
- [0044] 한 실시양태에서, 세포는 배양물에서 수시간 (예를 들어, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21시간) 내지 약 14일 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일)의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 4 내지 9일의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 8일 미만, 예를 들어 7, 6

또는 5일의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 배양물에서 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포보다 더 강력하다. 효력은, 예를 들어 다양한 T 세포 기능, 예를 들어 증식, 표적 세포 사멸, 시토카인 생산, 활성화, 이동, 또는 그의 조합에 의해 정의될 수 있다. 한 실시양태에서, 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 항원 자극 시에 세포 배가에서 적어도 1, 2, 3 또는 4배 증가를 제시한다. 한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 발현하는 세포는 배양물에서 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 더 높은 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준을 나타낸다. 한 실시양태에서, 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 pg/ml 단위의 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10배 또는 그 초과를 증가를 제시한다.

[0045] 한 실시양태에서, 세포는, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이, CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 세포의 표면 상의 공동자극 분자를 자극하는 리간드의 존재 하에 세포를 배양함으로써 확장된다. 한 실시양태에서, 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 단편 및/또는 항-CD28 항체 또는 그의 단편과 접합된 비드이다.

[0046] 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 제공된 집단은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포를 함유하는 T 조절-고갈된 세포의 집단이다. 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 제공된 집단은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25 발현 중양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유하는 T 조절-고갈된 세포의 집단이다. 한 실시양태에서, 세포의 제공된 집단은 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 중양 세포, 예를 들어 CD25 발현 중양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다. 한 실시양태에서, 세포의 제공된 집단은 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 중양 세포, 예를 들어 CD25 발현 중양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다.

[0047] 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 제공된 집단은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 체크포인트 억제제 발현 세포, 예를 들어 PD1+ 세포, LAG3+ 세포, 또는 TIM3+ 세포를 함유하는 T 조절-고갈된 세포의 집단이다.

[0048] 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포의 제공된 집단은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD14+ 세포를 함유하는 T 조절-고갈된 세포의 집단이다.

[0049] 한 실시양태에서, 방법은, 확장 전에, 집단으로부터 T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포를 제거하여, 이에 의해 확장될 T 조절-고갈된 세포, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포는 본원에 기재된 방법에 의해 제거된다.

[0050] 한 실시양태에서, 방법은, 확장 전에, 집단으로부터 T 조절 세포, 예를 들어 CD14+ 세포를 제거하여, 이에 의해 확장될 CD14+ 고갈된 세포의 집단을 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD14+ 세포는 본원에 기재된 방법에 의해 제거된다.

[0051] 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포의 집단을 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 hTERT를 코딩하는 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산은 DNA 또는 RNA이다.

[0052] 또 다른 측면에서, 개시내용은 면역 이펙터 세포의 집단, 및 IL-7 및/또는 IL-15를 포함하는 반응 혼합물을 특색으로 하며, 여기서 반응 혼합물 중 집단의 복수의 세포는 핵산 분자, 예를 들어 CAR 코딩 서열, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은, 예를 들어 CD19 CAR 코딩 서열을 포함하는 본원에 기재된 핵산 분자를 포함한다.

[0053] 한 실시양태에서, 반응 혼합물 중 집단의 복수의 세포는 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터는 본원에 기재된 벡터, 예를 들어 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 벡터이다.

[0054] 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 집단의 세포를 활성화 및/또는 확장시키는 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은, 예를 들어 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및/또는 세포의 표면 상의 공동자극 분자를 자극하는 리간드를 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 단편 및/또는

항-CD28 항체 또는 그의 단편과 접합된 비드이다.

- [0055] 또 다른 측면에서, 개시내용은 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포)의 집단을 제공하는 단계이며, 여기서 복수의 면역 이펙터 세포는 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 집단의 세포를 배양물에서 5일 동안 확장시키는 단계이며, 여기서 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 항원 자극 시에 세포 증식 수준에 의해 측정된 바와 같이 더 강력한 것인 단계를 포함하는, CAR을 발현하도록 조작된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)의 집단을 제조하는 방법을 특색으로 한다.
- [0056] 한 실시양태에서, 5일 동안 확장된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 항원 자극 시에 세포 배가에서 적어도 1, 2, 3 또는 4배 증가를 제시한다. 한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 발현하는 세포는 배양물에서 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 더 높은 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준을 나타낸다. 한 실시양태에서, 5일 동안 확장된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 pg/ml 단위의 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10배 또는 그 초과를 증가를 제시한다.
- [0057] 또 다른 측면에서, 개시내용은 본원에 기재된 방법에 의해 제조되고 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 발현하도록 조작된 면역 이펙터 세포의 집단을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특색으로 한다.
- [0058] 한 실시양태에서, 방법은 암, 예를 들어 혈액암 예컨대, 예를 들어 CLL을 갖는 대상체에서 항종양 면역을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 암, 예를 들어 본원에 기재된 혈액암, 예컨대, 예를 들어 백혈병 (예를 들어, CLL, ALL) 또는 림프종 (예를 들어, MCL, HL)을 갖는 대상체를 치료하는 방법이다. 한 실시양태에서, 세포의 집단은 집단이 투여되는 대상체에 대해 자가이다. 한 실시양태에서, 세포의 집단은 집단이 투여되는 대상체에 대해 동종이다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0059] 한 실시양태에서, 종양 항원, 예를 들어 본원에 기재된 종양 항원, 예를 들어 CD19와 연관된 질환은 증식성 질환 예컨대 암 또는 악성종양 또는 전암성 상태 예컨대 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병으로부터 선택되거나, 또는 본원에 기재된 종양 항원의 발현과 연관된 비-암 관련 적응증이다. 한 실시양태에서, 질환은 본원에 기재된 암, 예를 들어 본원에 기재된 표적과 연관된 것으로서 본원에 기재된 암이다. 한 실시양태에서, 혈액암은 백혈병이다. 한 실시양태에서, 암은 B-세포 급성 림프성 백혈병 ("BALL"), T-세포 급성 림프성 백혈병 ("TALL"), 급성 림프성 백혈병 (ALL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 급성 백혈병; 만성 골수 백혈병 (CML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 만성 백혈병; B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 상태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨 림프종, 형질모구성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 및 골수 혈액 세포의 비유효 생산 (또는 이형성증)과 연관된 혈액 상태의 다양한 집단인 "전백혈병", 및 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원을 발현하는 비정형 및/또는 비-전형적 암, 악성종양, 전암성 상태 또는 증식성 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는 본원에 기재된 종양 항원의 발현과 연관된 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 혈액암 또는 혈액 상태; 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 종양 항원과 연관된 질환은 고형 종양, 예를 들어 본원에 기재된 고형 종양, 예를 들어 전립선, 결장직장, 췌장, 자궁 경부, 위, 난소, 두부, 또는 폐암이다.
- [0060] 한 실시양태에서, CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산으로 형질도입된 면역 이펙터 세포의 집단은, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 8일 이하, 예를 들어 7, 6, 5, 4, 또는 3일의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 배양물에서 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 동일한 배양 조건 하에 배양물에서 9일 동안 확장된 동일한 세포보다 더 강력하다. 한 실시양태에서, 대상체에게 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^6 개 면역 이펙터 세포가 투여된다. 한 실시양태에서, 대상체는 복수의 면역 이펙터 세포가 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 면역 이펙터 세포의 집단의 초기 투여 (예를 들어, 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^6 개 면역 이펙터

터 세포, 예를 들어 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^5 개 면역 이펙터 세포의 초기 투여), 및 복수의 면역 이펙터 세포가 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 면역 이펙터 세포의 집단의 1회 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5회)의 후속 투여 (예를 들어, 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^6 개 면역 이펙터 세포, 예를 들어 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^5 개 면역 이펙터 세포의 1회 이상의 후속 투여)를 제공받는다. 한 실시양태에서, 1회 이상의 후속 투여는 이전 투여의 15일 미만, 예를 들어 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2일 후, 예를 들어 이전 투여의 4, 3, 2일 미만 후에 투여된다. 한 실시양태에서, 대상체는 면역 이펙터 세포의 집단의 적어도 3회 투여의 과정에 걸쳐 대상체의 체중 kg당 총 약 10^6 개의 면역 이펙터 세포를 제공받으며, 예를 들어 대상체는 1×10^5 개의 면역 이펙터 세포의 초기 용량, 3×10^5 개의 면역 이펙터 세포의 제2 투여, 및 6×10^5 개의 면역 이펙터 세포의 제3 투여를 제공받고, 예를 들어 각각의 투여는 이전 투여의 4, 3, 2일 미만 후에 투여된다.

[0061] 한 측면에서, 개시내용은 복수의 면역 이펙터 세포가 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질감염되거나 형질도입된 것인 자가 면역 이펙터 세포의 집단을 특색으로 하며, 여기서 세포의 집단은 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 종양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다. 한 실시양태에서, 세포의 집단은 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 종양 세포, 예를 들어 CD25 발현 종양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다. 한 실시양태에서, 세포의 집단은 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포 및 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 종양 세포, 예를 들어 CD25 발현 종양 세포, 예를 들어 CLL 세포를 함유한다.

[0062] 또 다른 측면에서, 개시내용은 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)의 집단을 제조하는 방법을 특색으로 한다. 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)의 집단을 제공하는 단계, 및 면역 이펙터 세포의 집단을 CAR을 코딩하는 핵산, 및 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 hTERT를 코딩하는 핵산과, CAR 및 텔로머라제 발현을 가능하게 하는 조건 하에 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0063] 한 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 핵산은 RNA이다. 또 다른 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 핵산은 DNA이다. 한 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 핵산은 텔로머라제 서브유닛의 발현을 구동할 수 있는 프로모터를 포함한다.

[0064] 관련 측면에서, 개시내용은 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포)의 집단을 제공하는 단계, 면역 이펙터 세포의 집단을 CAR을 코딩하는 핵산 및 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 hTERT를 코딩하는 RNA와, CAR 및 텔로머라제 발현을 가능하게 하는 조건 하에 접촉시키는 단계를 포함하는, 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)의 집단을 제조하는 방법을 특색으로 한다.

[0065] 한 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산 및 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA는 동일한 핵산 분자의 일부이다. 한 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산 및 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA는 별개의 핵산 분자의 일부이다.

[0066] 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포의 집단을 CAR을 코딩하는 핵산 및 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA와 실질적으로 동시에 접촉시키는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포의 집단을 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA와 접촉시키기 전에 면역 이펙터 세포의 집단을 CAR을 코딩하는 핵산과 접촉시키는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포의 집단을 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA와 접촉시킨 후에 면역 이펙터 세포의 집단을 CAR을 코딩하는 핵산과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0067] 한 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA는 mRNA이다. 한 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA는 폴리(A) 테일을 포함한다. 한 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA는 5' 캡 구조를 포함한다.

[0068] 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포를 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA로 형질감염시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포를 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA로 형질도입하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 면역 이펙터 세포를 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 RNA로, CAR 및 텔로머라제 발현을 가능하게 하는 조건 하에 전기천공하는 것을 포함한다.

[0069] 또 다른 측면에서, 개시내용은 CAR을 발현하고/거나 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 면역 이펙터 세포 (예를

들어, T 세포 또는 NK 세포)의 집단을 제공하는 단계; 및 면역 이펙터 세포의 집단을 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 hTERT를 코딩하는 핵산과, hTERT 발현을 가능하게 하는 조건 하에 접촉시키는 단계를 포함하는, 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)의 집단을 제조하는 방법을 특색으로 한다.

[0070] 또 다른 측면에서, 개시내용은 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 hTERT를 코딩하는 핵산을 발현하는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)의 집단을 제공하는 단계, 및 면역 이펙터 세포의 집단을 CAR을 코딩하는 핵산과, CAR 발현을 가능하게 하는 조건 하에 접촉시키는 것을 포함하는, 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)의 집단을 제조하는 방법을 특색으로 한다.

[0071] 한 측면에서, 본 개시내용은 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 코딩하는 핵산; 및 외인성 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 hTERT를 코딩하는 핵산을 포함하는, 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)를 제공한다. 한 실시양태에서, 외인성 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 핵산은 RNA, 예를 들어 mRNA이다.

[0072] 한 측면에서, 본 개시내용은 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CAR; 및 외인성 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 hTERT를 포함하는, 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)를 제공한다. 한 실시양태에서, 세포는 외인성 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 DNA, 예를 들어 외인성 DNA, 예를 들어 벡터를 포함하지 않는다. 예를 들어, 세포는 외인성 텔로머라제 서브유닛을 코딩하는 mRNA와 접촉될 수 있다.

[0073] 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질은 하기 기재된다. 본원에 언급된 모든 공개, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌 (예를 들어, 서열 데이터베이스 참조 번호)은 그 전문이 참조로 포함된다. 예를 들어, 본원에서, 예를 들어 본원의 임의의 표에서 언급된 모든 진뱅크, 유니진, 및 엔트레즈 서열은 참조로 포함된다. 달리 명시되지 않는 한, 본원의 임의의 표에서의 것을 포함한 본원에 명시된 서열 수탁 번호는 2014년 12월 29일 현재의 데이터베이스 엔트리를 지칭한다. 1개의 유전자 또는 단백질이 복수의 서열 수탁 번호를 참조하는 경우에, 모든 서열 변이체가 포괄된다.

[0074] 또한, 물질, 방법, 및 예는 단지 예시적이고, 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 표제, 하위-표제 또는 숫자화 또는 문자화 요소, 예를 들어 (a), (b), (i) 등은 단지 읽기의 용이성을 위해 제시된다. 본 문서에서 표제 또는 숫자화 또는 문자화 요소의 사용은 단계 또는 요소가 알파벳 순서로 수행될 것 또는 단계 또는 요소가 반드시 서로 개별적인 것을 요구하지 않는다. 본 발명의 다른 특색, 목적 및 이점은 상세한 설명 및 도면으로부터, 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1a-1h는 CAR-T 세포 축적에 대한 γ c 시토카인 및 IL-18의 차등 효과를 제시한다. 도 1a는 C4-27z CAR 벡터의 개략적 다이어그램이다. 도 1b는 렌티바이러스 형질도입 48시간 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상에서의 CAR 발현의 2개의 대표적인 FACS 히스토그램 플롯이다. 도 1c는 다양한 시토카인 노출에 반응한 CAR-T 세포의 전체 축적을 제시하는 그래프이다. T 세포를 형질도입하고, 다음날부터 (제0일) 다양한 외인성 시토카인에 10ng/mL의 최종 농도로 노출시켰다. CAR-T 세포의 수를 T 세포의 수 및 CAR 발현의 백분율에 기초하여 계산하였다. 곡선은 6명의 공여자를 대표한다. *P < 0.05, ***P < 0.001. NC, 시토카인 없음. 도 1d는 렌티바이러스 형질도입 15일 후 T 세포에 의한 CAR 발현을 제시하는 그래프이다. 막대 그래프는 CD3+, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 표면 상에서의 CAR 발현 수준 ($\pm$ SEM, n=6)을 도시하며, NC 군에서의 CAR의 발현은 1로 정규화되었다. *P < 0.05 대 IL-2 군; N.S., 통계적 차이 없음. 도 1e는 다양한 시토카인에 반응한 T 세포의 증식을 제시하는 히스토그램이다. 렌티바이러스 형질도입 후 제7일에, NC 군에서의 T 세포를 CFSE (2.5 μ M)로 표지하고, 이어서 다양한 시토카인에 노출시켰다. 7일 후에, T 세포를 유동 세포측정법에 의해 CFSE 희석에 대해 분석하였다. 도 1f는 렌티바이러스 형질도입 15일 후의 T 세포의 생존율을 제시하는 그래프이다. 다양한 시토카인 군으로부터의 T 세포를 아넥신 V 및 7-AAD로 염색한 다음, 생존 세포 (아넥신 V 및 7-AAD 둘 다 음성)의 비율을 분석하였다. *P < 0.05, **P < 0.01 대 IL-2 군 (n=6). 도 1g 및 1h는 CAR-T 세포에 의한 Bcl-xL 발현을 제시한다. 렌티바이러스 형질도입 후 제15일에, CAR-T 세포를 유동 세포측정법에 의해 Bcl-2 단백질의 발현에 대해 평가한다. 도 1g는 다양한 시토카인 군에서 Bcl-xL 발현의 대표적인 FACS 히스토그램 플롯이다. 도 1h는 6명의 공여자의 CD4+ 및 CD8+ CAR-T 세포에서의 Bcl-xL 발현 ($\pm$ SEM)을 도시하는 그래프이다. *P < 0.01 대 IL-2 군.

도 2a-2i는 CAR-T 세포의 기억 T 세포 하위세트를 제시한다. 도 2a는 T 세포 하위세트 분석의 게이팅 전략을 제시하는 대표적인 FACS 플롯이다. T 세포를 CD45RA 및 CD62L 발현에 기초하여 4개의 하위세트로 나누고, 이어

서 CCR7, CD27, CD28 및 CD95의 발현을 모든 하위세트에 대해 추가로 평가한다. CD95 발현은 렌티바이러스 형질도입 시 유의하게 상향조절된다. 도 2b는 형질도입 전 T 세포 및 형질도입 15일 후 CAR-T 세포의 CD45RA+CD62L+ 하위집단에서의 CD95 발현을 제시한다. 도 2c 및 2d는 렌티바이러스 형질도입 후 CD4+ (도 2c) 및 CD8+ T 세포 (도 2d)에서 기억 줄기 T 세포 (Tscm) 비율의 증가를 제시하는 그래프이다. Tscm은 CD45RA+CD62L+CD95+CCR7+ T 세포 하위세트로 정의된다. 도 2e는 형질도입전 T 세포에서의 나이브 T (Tn, CD45RA+CD62L+CD95- 하위집단으로 정의됨)의 양과 형질도입 후 CAR-T 세포에서의 Tscm의 비율 사이의 상관관계를 제시하는 그래프이다 (n=6). 좌측 막대는 형질도입 전 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서의 Tn의 백분율을 나타내고, 우측 막대는 CD4+ 및 CD8+ CAR-T 세포에서의 Tscm의 백분율을 나타낸다. *P < 0.05, **P < 0.01. 도 2f, 2g 및 2h는 CD4+ 및 CD8+ CAR-T 세포의 하위세트의 분포를 제시하는 그래프이다. CD4+ 및 CD8+ CAR-T 세포에서 T 하위세트는 CD95, CD45RA 및 CD62L 발현에 기초하여 정의된다. Tscm의 비율을 다양한 시토카인 군 사이에 비교한다. *P < 0.05, **P < 0.01, 대 IL-2 군 (n=6). (f) CAR-T 세포의 상이한 하위세트의 자기-재생 및 분화. FACS-분류된 CAR+ Tscm, Tcm, Tem 및 Temra 세포를 3 일 동안 IL-2 (10ng/mL)에 노출 배양한 다음, CD45RA 및 CD62L 발현에 기초하여 표현형을 분석하였다 (n=3). 도 2i는 IL-2에 반응한 CAR-T 세포의 다양한 하위세트의 증식을 제시하는 히스토그램 플롯이다. FACS-분류된 CAR+ Tscm, Tcm, Tem 및 Temra 세포를 CFSE (2.5 μM)로 표지하고, 이어서 3일 동안 IL-2 (10ng/mL)에 노출 배양하였다. 3일 후에, T 세포를 CFSE 희석에 대해 분석하였다.

도 3a-3b는 CD45 RA 발현 및 CFSE 강도 사이의 상관관계를 제시한다. 도 3a는 CD45RA 발현이 CFSE 강도와 역상관된다는 것은 입증한다. 도 3b는 모든 시토카인 군 (IL-2, IL-7, IL-15, IL-18 및 IL-21)의 경우에, CD45RA+ T 세포가 CD45RA dim 및 음성 T 세포보다 훨씬 더 낮은 CFSE 수준을 나타낸다는 것을 제시하며, 이는 CD45RA+ T 세포가 CD45RA- T 세포보다 더 강한 증식 활성을 갖는다는 것을 나타낸다.

도 4a-4b는 상이한 시토카인에 대한 노출로부터 생성된 CAR-T 세포의 표현형을 제시한다. 도 4a는 렌티바이러스 형질도입 후 14일 동안 IL-2에 노출된 CAR- 및 CAR+ T 세포 상에서의 CD45RA, CD62L, CCR7, CD27 및 CD28의 발현을 제시하는 대표적인 FACS 도트-플롯이다. 도 4b는 표시된 시토카인 군에서 CAR-T 세포의 표면 상에서의 CD45RA, CD62L, CCR7, CD27, CD28 및 IL7R α 발현의 정량화를 제시하는 일련의 그래프이다. 히스토그램은 6명의 독립적 공여자로부터의 발현 수준의 평균 값 ± SEM을 나타낸다. *P < 0.05, **P < 0.01 대 IL-2 군.

도 5a-5i는 상이한 시토카인에 노출된 CAR-T 세포의 기능적 분석을 제시한다. 도 5a는 CAR-T 세포에서 세포내 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2의 염색을 제시하는 대표적인 FACS 플롯이다. 도 5b, 5c 및 5d는 IFN γ (도 5b), TNF-α (도 5c) 및 IL-2 (도 5d)의 생산에 대한 다양한 시토카인 군 (n=6)에서의 시토카인-생산 CAR-T 세포의 백분율을 제시하는 정량적 플롯이다. 렌티바이러스 형질도입된 T 세포를 표시된 시토카인에 14일 동안 노출시킨 다음, SKOV3 세포와 5시간 동안 공동-배양한 후, 유동 세포측정 분석을 위해 수거한다. 도 5e는 SKOV3 자극 후 상이한 수의 시토카인 (IFN-γ, TNF-α 및 IL-2)을 생산하는 세포의 비율을 도시하는 일련의 파이 차트이다. *P < 0.05. 도 5f는 CAR-T 세포에서의 퍼포린 및 그랜자임 B (GranzB)의 발현을 제시하는 대표적인 FACS 플롯이다. 도 5g 및 5h는 다양한 시토카인 군 (n=6)에서의 CAR-T 세포에서의 퍼포린 (도 5g) 및 그랜자임 B 발현 (도 5h)의 백분율을 제시하는 정량적 플롯이다. 렌티바이러스 형질도입된 T 세포를 표시된 시토카인에 14일 동안 노출시킨 다음, SKOV3 세포와 5시간 동안 공동-배양한 후, 유동 세포측정 분석을 위해 수거한다. 도 5i는 CAR-T 세포의 항원 특이적 세포독성 활성을 제시하는 그래프이다. 표시된 시토카인 노출 14일 후에, CAR-T 세포를 표시된 E/T 비로 SKOV3과 18-시간 공동배양한 후 루시페라제-기반 검정을 사용하여 세포용해 능력에 대해 평가하였다. 비형질도입된 T 세포 (UNT)는 음성 이펙터 대조군으로서 기능하였다. 제시된 데이터는 6종의 독립적 세포용해 검정의 평균 값 ± SEM이다.

도 6a-6c는 도 5a-5i에서 상기 기재된 CAR-T 세포의 표현형 및 기능을 제시한다. 도 6a 및 6b는 CD62L+ CAR-T 세포 (Tscm 및 Tcm)가 CD62L- CAR-T 세포 (Tem 및 Temra)와 비교 시 더 낮은 시토카인 생산 활성 (도 6a 및 6b) 및 더 약한 세포용해 능력 (도 6c)을 나타낸다는 것을 제시한다.

도 7a-7e는 항원 펩티드에 노출된 CAR-T 세포의 확장 및 표현형을 제시한다. 도 7a는 항원 및 표시된 시토카인에 노출된 CAR-T 세포의 전체 축적 및 생존율을 제시하는 2개의 그래프이다. IL-2에 노출된 T 세포를 제15일에 수거한 다음, 5:1의 E/T 비의 SKOV3 및 표시된 시토카인 (10ng/mL)과 7일 동안 공동-배양하였고, SKOV3 세포의 보충은 제1일 및 제4일에 이루어졌다 (도 7c, 7d, 및 7e에서 동일한 프로토콜). 확장 배수는 평균 값 ± SEM이다. T 세포를 아넥신 V 및 7-AAD로 염색한 다음, 동일한 날에 생존 세포의 비율에 대해 분석하였다. *P < 0.05 대 IL-2 군. 도 7b는 항원 펩티드 시 표시된 시토카인에 이전에 노출된 CAR-T의 전체 축적 및 생존율을 제시하는 2개의 그래프를 도시한다. 표시된 시토카인에 노출된 T 세포를 제15일에 수거한 다음, SKOV3과 5:1의 E/T

비로 7일 동안 공동-배양하였다. CAR-T 세포의 확장을 계산하고, T 세포의 생존율을 제7일에 평가하였다. 도 7c는 SKOV3 및 표시된 시토카인과 7-일 공동배양 후 T 세포에 의한 CAR 발현을 제시하는 그래프이다. *P<0.05 대 IL-2. 도 7d는 SKOV3 및 표시된 시토카인과 7-일 공동배양 후 CAR-T 세포 상에서의 CD27 및 CD28 발현의 정량화를 제시하는 2개의 그래프이다. *P<0.05 대 IL-2. 도 7e는 다양한 시토카인 군에서 CD4+ 및 CD8+ CAR-T 세포의 기억 T 하위세트의 분포를 제시하는 2개의 그래프이다. N.S., 통계적 차이 없음.

도 8a-8g는 이전의 시토카인 노출을 갖는 다양한 CAR-T 세포의 항종양 활성을 제시한다. 도 8a는 생체내 실험 스킴이다. 도 8b는 다양한 시토카인 노출된 C4-27z CAR-T 세포, 항-CD19-27z CAR-T 세포 및 비형질도입된 T 세포로 처리된 마우스의 종양 성장 곡선이다. 데이터는 평균 값 $\pm$ SEM으로 제시된다. 화살표는 T 세포 주입의 시간을 나타낸다. 도 8c는 CAR-T 세포의 제1 정맥내 주사 직전 (제38일), 2주 후 (제53일) 및 5주 후 (제74일)의 NSG 마우스에서의 fLuc+ SKOV3 종양을 제시하는 생물발광 영상이다. 도 8d는 CAR-T 세포 주입의 제1 용량 15일 후에 마우스 말초 혈액에서의 순환 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포 카운트의 정량화를 제시하는 그래프이다. 도 8e는 마우스 혈액에서의 순환 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상에서의 CAR 발현의 정량화를 제시하는 그래프이다. 도 8f는 CD45RA 및 CD62L 염색에 기초한 마우스 혈액에서의 순환 인간 T 세포의 T-세포 하위세트의 분포를 제시하는 그래프이다. 도 8g는 마우스 혈액에서의 순환 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상에서의 CD27 및 CD28 발현의 정량화를 제시하는 그래프이다.

도 9a 및 9b는 FAC 플롯을 제시한다. 도 9a는 CLL 환자의 분리반출술로부터의 세포에서 CD45, CD3, 및 CD25 발현의 분포를 제시하는 일련의 FACS 플롯이다. 도 9b는 분리반출술로부터의 세포, 항-CD3/CD28에 의해 선택된 세포, CD25에 대해 고갈된 세포, 및 CD25 풍부화된 세포의 CD3 및 CD19 집단을 제시하는 일련의 FACS 플롯 (상부) 및 CD14 발현을 제시하는 히스토그램 (하부)이다.

도 10은 CD3/CD28 선택 또는 CD25 고갈 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포 집단의 분포를 비교한 2개의 FACS 플롯이다.

도 11a-11c는 CD3/CD28 선택된 세포 및 CD25 고갈된 세포 사이의 증식 능력의 비교를 제시한다. 도 11a는 배양 중 표시된 날의 총 세포 수를 제시하는 그래프이다. 도 11b는 배양 중 각각의 표시된 날의 정량화된 집단 배가를 제시하는 그래프이다. 도 11c는 배양 중 표시된 날의 생존 세포의 백분율을 제시한다.

도 12a 및 12b는 CAR19의 렌티바이러스 형질도입에 대한 CD25 고갈의 효과를 제시한다. 도 12a는 CD25 고갈의 효율을 제시하는 일련의 FACS 플롯이다. 도 12b는 비형질도입된 세포, CD3 선택된 세포, 및 CD25 고갈된 세포의 CAR19 발현을 제시하는 일련의 FACS 플롯이다.

도 13은 CD25 고갈 전 환자로부터의 PBMC로부터의 세포 또는 시토카인 보충된 배양물에서의 CD3, CD19, 및 CD25 발현의 분포를 제시하는 일련의 FACS 플롯이다.

도 14는 표시된 시토카인 보충, IL-7, IL-15, 또는 IL-7 및 IL-15와의 배양 후 비조작된 PBMC 및 CD25-고갈된 PBMC에서의 CD3 및 CD19의 분포를 제시하는 일련의 FACS 플롯이다.

도 15는 표시된 시토카인 보충과의 배양 10일 후 세포의 총수를 제시하는 그래프이다.

도 16은 세포를 분리반출술에 의해 수득한 당일 (제0일) 및 그 다음 날 (제1일)인 2개의 날 (제0일+제1일) 형질 감염된 공여자 세포; 분리반출술에 의해 세포를 수득한 날 (제0일) 1회 형질감염된 공여자 세포; 세포를 분리반출술에 의해 수득한 다음 날 (제1일) 1회 형질감염된 공여자 세포; 세포를 분리반출술에 의해 수득하고 2일 후 (제2일) 1회 형질감염된 공여자 세포; 및 세포를 분리반출술에 의해 수득하고 3일 후 (제3일) 1회 형질감염된 공여자 세포에 대한 렌티바이러스 형질감염 수준의 지표로서 녹색 형광 단백질 (GFP) 신호전달의 백분율을 제시하는 그래프이다.

도 17은 항-CD3 및 CD28 비드로 자극하고, 비조작으로 두거나 (UTD) CD19 CAR로 형질도입하고 (CD19.BBz), 비드-제거한 다음, 제5일 및 D9에 수거한 PBMC의 집단 배가 (도 17a) 및 평균 크기 (fL)(도 17b)에서의 확장 프로파일을 제시하는 그래프를 포함한다.

도 18은 항-CD3 및 CD28 비드로 자극하고, 비조작으로 두거나 (UTD) CD19 CAR로 형질도입하고 (CD19.BBz), 비드-제거한 다음, 제5일 및 D9에 수거한 PMBC로 처리된 CD19 발현 K562 세포의 퍼센트 용해로서 세포독성을 도시하는 그래프를 포함한다.

도 19는 항-CD3 및 CD28 비드 (3x28 비드)로 자극된 PBMC, 야생형 K562 세포, CD19 발현 K562 세포, ALL 세포 (Nalm6) 또는 CLL 세포 (PI14)의 증식을 도시하는 그래프를 포함한다. PBMC는 비조작으로 두거나 (UTD) CD19

CAR로 형질도입하고 (CART19), 비드-제거한 다음, 제5일 및 D9에 수거하였다.

도 20은 예시적인 제조 스킴의 개략도이다.

도 21은 예시적인 제조 스킴의 개략도이다.

도 22는 0 내지 9일의 기간에 걸쳐 확장된, CTL019 CAR로 형질감염된 공여자 세포의 2개의 상이한 제조 배치, 환자 15 (좌측 패널) 및 환자 21 (우측 패널)의 세포 증식의 수준을 도시하는 그래프를 포함한다.

도 23은 CTL019 CAR로 형질감염되거나 (즉 환자 15 세포) 또는 ss1-mesoCAR로 형질감염되고 (즉 환자 21 세포), 분리반출 후 0 내지 9일의 기간에 걸쳐 확장된 공여자 세포의 2개의 상이한 제조 배치의 염증유발 시토카인 생산, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α 및 IL-4를 제시하는 그래프를 포함한다.

도 24는 항-CAR19-이디오타입 항체 비드 또는 대조군 비드에 의해 자극되고, CTL019 CAR로 형질감염되고, 5 내지 9일 동안 확장된 공여자 세포에서의 생산 수준 IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-2, IL-1 β , GM-CSF 및 IL-4를 도시하는 그래프를 포함한다. 대조군 비드에 의해서는 어떠한 시토카인도 검출되지 않거나 낮은 시토카인 수준 (<200 pg/ml)이 검출되었다.

도 25는 비조작으로 두거나 (UTD) CD19 CAR로 형질도입하고 (CART19), 비드-제거한 다음, 제5일 및 D9에 수거한 PBMC의 Nalm6 (ALL) 세포의 루시페라제 검정을 사용한 총 용해물에 기초한 세포 사멸을 도시하는 그래프이다. 다양한 비의 PMBC 대 Nalm6 세포 (이펙터 (E):표적 (T))를 배양하였다. 제시된 바와 같이 제5일에 수거된 CART19 세포가 보다 우수한 사멸 능력을 보유한다.

도 26은 비조작으로 두거나 (UTD) CD19 CAR로 형질도입하고 (CART19), 비드-제거한 다음, 제5일 및 D9에 수거한 PBMC의 장기간 생체내 사멸 능력을 도시하는 그래프이다. PBMC는 Nalm6 세포를 접종한 비-비만 당뇨병/중증 복합 면역결핍 마우스 내로 도입하였다.

도 27a-27d는 초기 시점에서의 비드 제거가 세포 손실을 유도하지 않는다는 것을 나타낸다. 도 27a는 제3일에 자석을 통해 α CD3/ α CD28 코팅된 자석 비드를 제거하기 전 및 후의 평균 T 세포 부피 및 농도를 예시하는 쿨터 분석이다. 비드 제거 후 이어서 세포를 동결시켰다. 도 27b는 자석 비드의 제거 전 및 후에 평가된 세포 수를 제시한다. 농도는 유사하였다. 도 27c는 동결 전 및 후에 동일한 세포의 평균 세포 부피를 제시하는 오버레이이다. 세포는 동결 해동 과정 동안 그의 부피를 유지한다. 결과는 적어도 15회의 상이한 실험을 대표한다. 도 27d는 과정의 효율을 입증하는, α CD3/ α CD28 코팅된 자석 비드 제거 전 및 후의 T 세포 생성물의 대표적인 쿨터 분석을 제시한다.

도 28a-28b는 활성화되고, BBz 신호전달을 보유하는 CD19-특이적 CAR로 형질도입되고, 활성화 후 제3일의 이른 시점에 T 세포 배양물로부터 수거된 T 세포가 시험관내 강력한, 항원-특이적 세포독성 활성을 갖는다는 것을 제시한다. 도 28a, 상부 패널, K562-WT 세포를 사용한 4-시간 사멸 검정. 도 28b, 하부 패널, K562-19 세포를 사용한 4-시간 사멸 검정. 도 28b 상부 패널, IL7/IL15 (좌측) 또는 IL2 (우측)를 사용한 형질도입 효율. 도 28b 중심 패널, IL7/IL15를 사용한, IL2와 비교 시의 집단 배가. 도 28b 하부 패널, IL7/IL15를 사용한, IL2와 비교 시의 부피.

도 29a-29c는 제3일 및 제9일 4-1BB ζ CART 세포가 K562-CD19에 반응하여 유사한 패턴의 시토카인을 생산한다는 것을 제시한다. 이전에 IL-2 또는 IL-7/15와 함께 배지에서 배양된 제3일 및 제9일 CART 19 세포를 K562-CD19 (도 29a 및 29b), 배지 단독과 24시간 동안 (도 29c) 인큐베이션하였다. 도 29a 및 도 29b에서 "항원 없음"은 CD19가 없는 야생형 K562 세포로 자극된 세포를 나타낸다. 시토카인을 시토카인 비드 어레이 (루미넥스 (Luminex))에 의해 배양물 상청액에서 측정하였다. 도 29c는 해동 24시간 후 CART 19 T 세포에서의 대표적인 시토카인 생산을 제시한다. 시토카인 수준은 최소이다.

도 30a-30b는 Tem 및 Tcm 세포의 증가하는 비율에 의한 보다 분화된 표현형으로의 점진적 전이를 제시한다.

도 31a-31d. 도 31a는 상이한 조건 하에 생산된 CART 세포의 효력을 시험하기 위한 실험 설정을 제시한다. 도 31b는 마우스에서 Nalm6 종양 성장을 늦추는데 있어서 IL2-처리된 CART 세포의 효력을 제시한다. D3, D5, 및 D9는 제3일, 제5일, 또는 제9일에 수거된 CART 세포를 나타낸다. 3e6 및 0.5e6은 투여된 CAR+ 세포의 수를 나타낸다. CAR+ 세포의 비율을 도 31c에 제시한다. 도 31d는 마우스에서 Nalm6 종양 성장을 늦추는데 있어서 IL2-처리된 및 IL7/IL15-처리된 CART 세포의 효력을 비교한다.

도 32. 항원 자극 후 IL-2 및 IL-7/15 함유 배지에서의 CAR+ T 세포의 시험관내 확장. 좌측 패널, 건강한 인

간 공여자로부터의 PBMC를 α CD3/ α CD28 코팅된 디날 비드로 제0일에 자극하고, 19-BB ζ 로 제1일에 렌티바이러스 형질도입하였다. 이들 세포를 IL-2 또는 IL-7/15가 보충된 배지에서 9일 동안 확장시켰다. T 세포를 비드-기반 카운팅을 사용하여 유동 세포측정법에 의해 적일로 카운팅하였다. 우측 패널, 확장 과정에 걸쳐 평균 T 세포 부피 (f1)를 모니터링하였다. 데이터는 적어도 6명의 독립적 공여자를 대표한다.

도 33. IL-2 또는 IL-7/15 함유 배지에서 배양된 제3일 및 제9일 CART19 세포는 K562-CD19에 반응하여 증식하였고, K562-WT 또는 배지 단독에는 반응하여 증식하지 않았다. T 세포를 CFSE로 표지하고, K562-CD19, 야생형 K562 또는 음성 대조군으로서 배지 단독과 120시간 동안 공동-배양하였다. 증식 T 세포의 수는 야생형 K562 또는 배지 단독과 비교 시 K562-CD19에 반응하여 유의하게 더 높았고, IL-7/15 및 IL-2 군 사이에 대등하였다. 결과는 2명의 상이한 공여자를 대표한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0076] 정의
- [0077] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0078] 단수 용어는 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)의 물품의 문법적 대상을 지칭한다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.
- [0079] 용어 "약"은, 측정가능한 값, 예컨대 양, 시간 기간 등을 언급하는 경우에 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 10\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 5\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 1\%$, 또는 일부 경우에 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포괄하는 것으로 의도되고, 이는 이러한 변동이 개시된 방법의 수행에 적절하기 때문이다.
- [0080] 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 대안적으로 "CAR"은 면역 이펙터 세포 내에 존재하는 경우에 표적 세포, 전형적으로 암 세포에 대한 특이성, 및 세포내 신호 생성을 갖는 세포를 제공하는, 전형적으로 가장 단순한 실시양태에서 2종의, 폴리펩티드의 세트를 지칭한다. 일부 실시양태에서, CAR은 적어도 세포외 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 하기 정의된 바와 같은 자극 분자 및/또는 공동자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인 (본원에서 "세포내 신호전달 도메인"으로도 지칭됨)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 세트는 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 있다 (예를 들어, 키메라 융합 단백질을 포함함). 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 세트는 서로 인접해있지 않고, 예를 들어 상이한 폴리펩티드 쇄 내에 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 세트는 이량체화 분자의 존재 시 폴리펩티드를 서로 커플링시킬 수 있는, 예를 들어 항원 결합 도메인을 세포내 신호전달 도메인에 커플링시킬 수 있는 이량체화 스위치를 포함한다. 한 실시양태에서, CAR의 자극 분자는 T 세포 수용체 복합체와 연관된 제타 쇄이다. 한 측면에서, 세포질 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, CD3-제타의 1차 신호전달 도메인)을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포질 신호전달 도메인은 하기 정의된 바와 같은 적어도 1종의 공동자극 분자의 1종 이상의 기능적 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 분자는 본원에 기재된 공동자극 분자, 예를 들어 4-1BB (즉, CD137), CD27, ICOS, 및/또는 CD28이다. 한 실시양태에서, CAR은 세포외 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 자극 분자의 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR은 세포외 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 공동자극 분자의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자의 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR은 세포외 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 1개 이상의 공동자극 분자(들)로부터 유래된 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR은 세포외 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 1개 이상의 공동자극 분자(들)의 적어도 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자의 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR은 CAR 융합 단백질의 아미노-말단 (N-말단)에서 임의적인 리더 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR은 세포외 항원 결합 도메인의 N-말단에 리더 서열을 추가로 포함하고, 여기서 리더 서열은 CAR의 세포 프로세싱 및 세포 막으로의 국재화 동안 항원 결합 도메인 (예를 들어, scFv)으로부터 임의로 절단된다.
- [0081] 본원에 기재된 것과 같은 특이적 종양 항원 X를 표적화하는 항원 결합 도메인 (예를 들어, scFv, 또는 TCR)을 포함하는 CAR은 또한 XCAR로 지칭된다. 예를 들어, CD19를 표적화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR은 CD19CAR로 지칭된다.

- [0082] 용어 "신호전달 도메인"은 정보를 세포 내로 전달함으로써 제2 메시지를 생성하거나 또는 이러한 메시지에 반응하여 이펙터로서 기능함으로써 정의된 신호전달 경로를 통해 세포 활성을 조절하는 작용을 하는 단백질의 기능적 부분을 지칭한다.
- [0083] 본원에 사용된 용어 "항체"는 항원에 특이적으로 결합하는 이뮤노글로불린 분자로부터 유래된 단백질, 또는 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날, 다중 또는 단일쇄, 또는 무손상 이뮤노글로불린일 수 있고, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 항체는 이뮤노글로불린 분자의 사량체일 수 있다.
- [0084] 용어 "항체 단편"은 항원의 에피토프와 (예를 들어, 결합, 입체 장애, 안정화/탈안정화, 공간 분포에 의해) 특이적으로 상호작용하는 능력을 보유하는 항체의 적어도 한 부분을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, scFv 항체 단편, 디설파이드-연결된 Fv (sdFv), VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체 예컨대 sdAb (VL 또는 VH), 낙타류 VH8 도메인, 항체 단편 예컨대 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편으로부터 형성된 다중-특이적 항체, 및 단리된 CDR 또는 항체의 다른 에피토프 결합 단편을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 항원 결합 단편은 또한 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 나노바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR 및 비스-scFv 내에 혼입될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005] 참조). 항원 결합 단편은 또한, 피브로넥틴 유형 III (Fn3)과 같이, 폴리펩티드를 기반으로 하는 스캐폴드 내로 그래프팅될 수 있다 (피브로넥틴 폴리펩티드 미니바디를 기재한 미국 특허 번호 6,703,199 참조).
- [0085] 용어 "scFv"는 경쇄의 가변 영역을 포함하는 적어도 1개의 항체 단편 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 적어도 1개의 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 지칭하며, 여기서 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 예를 들어 합성 링커, 예를 들어 짧은 가요성 폴리펩티드 링커를 통해 인접하여 연결되고, 단일쇄 폴리펩티드로서 발현될 수 있고, 여기서 scFv는 그것이 유래된 무손상 항체의 특이성을 보유한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 scFv는 VL 및 VH 가변 영역을 임의의 순서로 가질 수 있고, 예를 들어 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단 단부와 관련하여, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 또는 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.
- [0086] 항체 또는 그의 항체 단편을 포함하는 CAR의 부분은 항원 결합 도메인이 예를 들어 단일 도메인 항체 단편 (sdAb), 단일쇄 항체 (scFv) 및 인간화 항체를 포함하는 인접 폴리펩티드쇄의 일부로서 발현되는 다양한 형태로 존재할 수 있다 (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). 한 실시양태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 항체 단편을 포함한다. 추가 측면에서, CAR은 scFv를 포함하는 항체 단편을 포함한다.
- [0087] 본원에 사용된 용어 "결합 도메인" 또는 "항체 분자"는 적어도 1개의 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열을 포함하는 단백질, 예를 들어 이뮤노글로불린쇄 또는 그의 단편을 지칭한다. 용어 "결합 도메인" 또는 "항체 분자"는 항체 및 항체 단편을 포괄한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 다중특이적 항체 분자이고, 예를 들어 이는 복수의 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열을 포함하며, 여기서 복수개 중 제1 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열은 제1 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖고, 복수개 중 제2 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열은 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 이중특이적 항체 분자이다. 이중특이적 항체는 2개 이하의 항원에 대해 특이성을 갖는다. 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제1 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제2 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열을 특징으로 한다.
- [0088] 항체 또는 그의 항체 단편을 포함하는 본 발명의 CAR의 부분은 항원 결합 도메인이 예를 들어 단일 도메인 항체 단편 (sdAb), 단일쇄 항체 (scFv), 인간화 항체, 또는 이중특이적 항체를 포함하는 인접 폴리펩티드쇄의 일부로서 발현되는 다양한 형태로 존재할 수 있다 (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). 한 측면에서, 본 발명의 CAR 조성물의 항원 결합 도메인은 항체 단편을 포함한다. 추가 측면에서, CAR은 scFv를 포함하는 항체 단편을 포함한다.
- [0089] 용어 "항체 중쇄"는 그의 자연 발생 입체형태로 항체 분자에 존재하고 통상적으로 항체가 속하는 부류를 결정하

는, 폴리펩티드 쇄의 2개의 유형 중 더 큰 것을 지칭한다.

- [0090] 용어 "항체 경쇄"는 그의 자연 발생 입체형태로 항체 분자에 존재하는 폴리펩티드 쇄의 2개의 유형 중 더 작은 것을 지칭한다. 카파 (κ) 및 람다 (λ) 경쇄는 2개의 주요 항체 경쇄 이소형을 지칭한다.
- [0091] 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화도를 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산의 서열을 지칭한다. 예를 들어, 일반적으로, 각 중쇄 가변 영역 내에 3개의 CDR (예를 들어, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 각 경쇄 가변 영역 내에 3개의 CDR (LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)이 존재한다. 주어진 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌 [Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("카바트(Kabat)" 넘버링 스킴), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 ("코티아(Chothia)" 넘버링 스킴)]에 기재된 것을 포함한 널리 공지된 다수의 스킴 중 임의의 것 또는 그의 조합을 사용하여 결정될 수 있다. 카바트 넘버링 스킴 하에, 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인 (VH)에서의 CDR 아미노산 잔기는 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) 및 95-102 (HCDR3)로 넘버링되고; 경쇄 가변 도메인 (VL)에서의 CDR 아미노산 잔기는 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) 및 89-97 (LCDR3)로 넘버링된다. 코티아 넘버링 스킴 하에, 일부 실시양태에서, VH에서의 CDR 아미노산은 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) 및 95-102 (HCDR3)로 넘버링되고; VL에서의 CDR 아미노산 잔기는 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) 및 91-96 (LCDR3)으로 넘버링된다. 조합된 카바트 및 코티아 넘버링 스킴에서, 일부 실시양태에서, CDR은 카바트 CDR, 코티아 CDR, 또는 둘 다의 일부인 아미노산 잔기에 상응한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, CDR은 VH, 예를 들어 포유동물 VH, 예를 들어 인간 VH에서 아미노산 잔기 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3)에 상응하고; VL, 예를 들어 포유동물 VL, 예를 들어 인간 VL에서 아미노산 잔기 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), 및 89-97 (LCDR3)에 상응한다.
- [0092] 용어 "재조합 항체"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 항체, 예컨대 예를 들어 박테리오파지 또는 효모 발현 시스템에 의해 발현된 항체를 지칭한다. 상기 용어는 또한 항체를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성된 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하고, DNA 분자는 항체 단백질, 또는 항체를 특정하는 아미노산 서열을 발현하며, 여기서 DNA 또는 아미노산 서열은 관련 기술분야에서 이용가능하고 널리 공지된 재조합 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득된다.
- [0093] 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자를 지칭한다. 이러한 면역 반응은 항체 생산, 또는 특이적 면역학적-적격 세포의 활성화, 또는 둘 다를 수반할 수 있다. 통상의 기술자는 실질적으로 모든 단백질 또는 펩티드를 포함한 임의의 거대분자가 항원으로서의 역할을 할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 따라서, 통상의 기술자는 면역 반응을 도출하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 부분적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 임의의 DNA가, 본원에 사용된 용어 "항원"을 코딩함을 이해할 것이다. 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오타이드 서열에 의해 서만 코딩될 필요는 없음을 이해할 것이다. 본 발명은 1개 초과 유전자의 부분적인 뉴클레오타이드 서열의 사용을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니고, 이들 뉴클레오타이드 서열은 목적하는 면역 반응을 도출하는 폴리펩티드를 코딩하기 위해 다양한 조합으로 배열됨이 분명하다. 또한, 통상의 기술자는 항원이 "유전자"에 의해 코딩될 필요가 전혀 없음을 이해할 것이다. 항원은 합성되어 생성될 수 있거나 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있거나, 또는 폴리펩티드 이외의 거대분자일 수 있음이 분명하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 다른 생물학적 성분을 갖는 유체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0094] 용어 "자가"는 이후 개체에게 재도입될 예정인, 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0095] 용어 "동종"은 물질이 도입되는 개체와 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 2종 이상의 개체는 1개 이상의 유전자좌에서의 유전자가 동일하지 않을 때 서로 동종인 것으로 언급된다. 일부 측면에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종 물질은 항원과 상호작용하기에 유전적으로 충분히 다를 수 있다.
- [0096] 용어 "이종"은 상이한 종의 동물로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0097] 용어 "암"은 이상 세포의 비제어 성장을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 암 세포는 국부로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산될 수 있다. 다양한 암의 예가 본원에 기재되어 있고, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "종양" 및 "암"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 예를 들어 둘 다의 용어는 고형 및 액상, 예를 들어 미만성 또는 순환성 종양을 포괄한다. 본원에 사용된 용어 "암" 또는 "종양"은 전암성, 뿐만 아니라 악성 암 및 종양을 포함한다.

- [0098] 본원에 사용된 용어 "로부터 유래된"은 제1 및 제2 분자 사이의 관계를 나타낸다. 이는 일반적으로 제1 분자 및 제2 분자 사이의 구조적 유사성을 지칭하고, 제2 분자로부터 유래된 제1 분자에 대해 방법 또는 공급원 제한을 내포하거나 포함하지 않는다. 예를 들어, CD3제타 분자로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인의 경우에, 세포내 신호전달 도메인은 필요한 기능, 즉 적절한 조건 하에 신호를 생성하는 능력을 갖도록 충분한 CD3제타 구조를 보유한다. 이는 세포내 신호전달 도메인을 생성하는 특정한 방법에 대한 제한을 내포하거나 포함하지 않고, 예를 들어 세포내 신호전달 도메인을 제공하기 위해 반드시 CD3제타 서열로 출발하여, 원치않는 서열을 결실시키거나 또는 돌연변이를 부과하여 세포내 신호전달 도메인에 도달해야한다는 것을 의미하지 않는다.
- [0099] 어구 "본원에 기재된 바와 같은 종양 항원의 발현과 연관된 질환"은 증식성 질환 예컨대 암 또는 악성종양 또는 전암성 상태 예컨대 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병을 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원의 발현과 연관된 질환 또는 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원을 발현하는 세포와 연관된 상태; 또는 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원을 발현하는 세포와 연관된 비암 관련 적응증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원의 발현과 연관된 암은 혈액암이다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원의 발현과 연관된 암은 고형 암이다. 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원의 발현과 연관된 추가의 질환은, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원의 발현과 연관된 비정형 및/또는 비-전형적 암, 악성종양, 전암성 상태 또는 증식성 질환을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원의 발현과 연관된 비암 관련 적응증은 자가면역 질환, (예를 들어, 루푸스), 염증성 장애 (알레르기 및 천식) 및 이식을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 종양 항원-발현 세포는 종양 항원을 코딩하는 mRNA를 발현하거나 또는 임의의 시점에 발현하였다. 한 실시양태에서, 종양 항원-발현 세포는 종양 항원 단백질 (예를 들어, 야생형 또는 돌연변이체)을 생산하고, 종양 항원 단백질은 정상 수준 또는 감소된 수준으로 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 종양 항원-발현 세포는 종양 항원 단백질을 한 시점에 검출가능한 수준으로 생산하고, 이어서 실질적으로 검출가능하지 않은 종양 항원 단백질을 생산하였다.
- [0100] 어구 "CD19의 발현과 연관된 질환"은 CD19의 발현과 연관된 질환, 또는 예를 들어 증식성 질환, 예컨대 암 또는 악성종양 또는 전암성 상태, 예컨대 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병을 포함한 CD19를 발현하는 세포와 연관된 상태; 또는 CD19를 발현하는 세포와 연관된 비암 관련 적응증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 측면에서, CD19의 발현과 연관된 암은 혈액암이다. 한 측면에서, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다. 한 측면에서, CD19의 발현과 연관된 암은 예를 들어 급성 골수성 백혈병 (AML), B-세포 급성 림프성 백혈병 (BALL), T-세포 급성 림프성 백혈병 (TALL), 급성 림프성 백혈병 (ALL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 급성 백혈병; 예를 들어, 만성 골수 백혈병 (CML), 만성 림프성 백혈병 (CLL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 만성 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암 및 악성종양을 포함한다. CD19의 발현과 연관된 추가의 암 또는 혈액 상태는, 예를 들어 B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 상태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종 (MCL), 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 형질모세포 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 골수증식성 신생물; 조직구성 장애 (예를 들어, 비만 세포 장애 또는 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물); 비만 세포 장애, 예를 들어 전신 비만세포증 또는 비만 세포 백혈병; B-세포 전림프구성 백혈병, 형질 세포 골수종, 및 골수 혈액 세포의 비유효 생산 (또는 이형성증)과 연관된 혈액 상태의 다양한 집단인 "전백혈병" 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. CD19 발현과 연관된 추가의 질환은, 예를 들어 CD19의 발현과 연관된 비정형 및/또는 비전형적 암, 악성종양, 전암성 상태 또는 증식성 질환을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. CD19의 발현과 연관된 비-암 관련 적응증은, 예를 들어 자가면역 질환 (예를 들어, 루푸스), 염증성 장애 (알레르기 및 천식) 및 이식을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 종양 항원-발현 세포는 종양 항원을 코딩하는 mRNA를 발현하거나 또는 임의의 시점에 발현하였다. 한 실시양태에서, 종양 항원-발현 세포는 종양 항원 단백질 (예를 들어, 야생형 또는 돌연변이체)을 생산하고, 종양 항원 단백질은 정상 수준 또는 감소된 수준으로 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 종양 항원-발현 세포는 종양 항원 단백질을 한 시점에 검출가능한 수준으로 생산하고, 이어서 실질적으로 검출가능하지 않은 종양 항원 단백질을 생산한다. 다른 실시양태에서, 질환은 CD19-음성 암, 예를 들어 CD19-음성 재발성 암이다. 일부 실시양태에서, 종양 항원 (예를 들어, CD19)-발현 세포는 종양 항원을 코딩하는 mRNA를 발현하거나 또는 임의의 시점에 발현하였다. 한 실시양태에서, 종양 항원 (예를 들어, CD19)-발현 세포는 종양 항원 단백질 (예를 들어, 야생형 또는 돌연변이체)을 생산하고, 종양 항원 단백질은 정상 수준 또는 감소된 수준으로 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 종양 항원 (예를 들어, CD19)-발현 세포는 종양 항원 단백질을 한 시점에

검출가능한 수준으로 생산하고, 이어서 실질적으로 검출가능하지 않은 종양 항원 단백질을 생산한다.

[0101] 어구 "B-세포 항원의 발현과 연관된 질환"은 CD19, CD20, CD22 또는 ROR1 중 1종 이상의 발현과 연관된 질환, 또는 예를 들어 증식성 질환, 예컨대 암 또는 악성종양 또는 전암성 상태, 예컨대 골수이형성증, 골수이형성 증 후군 또는 전백혈병을 포함한 CD19, CD20, CD22 또는 ROR1 중 1종 이상을 발현하거나 또는 임의의 시점에 발현 했던 세포와 연관된 상태; 또는 CD19, CD20, CD22 또는 ROR1 중 1종 이상을 발현하는 세포와 연관된 비암 관련 적응증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 의심을 피하기 위해, B-세포 항원의 발현과 연관된 질환은, 예를 들어 B-세포 항원을 표적화하는 분자, 예를 들어 B-세포 표적화 CAR을 사용한 치료로 인해 예를 들어 항원 발현 이 하향조절되었지만 한때 항원을 발현하였기 때문에, 현재 B-세포 항원을 발현하지 않은 세포와 연관된 상태를 포함할 수 있다. 어구 "B-세포 항원의 발현과 연관된 질환"은 본원에 기재된 바와 같은 CD19의 발현과 연관된 질환을 포함한다. 실시양태에서, CAR-발현 세포는 B-세포 항원과 연관된 질환을 치료하는데 사용된다. 실시양 태에서, 본원의 방법에 의해 생산된 CAR은 B-세포 항원을 표적화하는 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0102] 본원에 사용된 용어 "재발"은 반응성의 초기 기간 후, 예를 들어 요법, 예를 들어 암 요법에 의한 선행 치료 (예를 들어, 완전 반응 또는 부분 반응) 후 질환 (예를 들어, 암)의 재출현을 지칭한다. 반응성의 초기 기간은 특정 역치 미만, 예를 들어 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만으로 떨어진 암 세포의 수준을 수반 할 수 있다. 재출현은 특정 역치 초과, 예를 들어 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 초과로 상승한 암 세포의 수준을 수반할 수 있다. 예를 들어, 예를 들어 B-ALL과 관련하여, 재출현은 완전 반응 후 혈액, 골수 (> 5%), 또는 임의의 수질외 부위에서 예를 들어 모세포의 재출현을 수반할 수 있다. 이와 관련하여, 완전 반 응은 < 5% BM 모세포를 수반할 수 있다. 보다 일반적으로, 한 실시양태에서, 반응 (예를 들어, 완전 반응 또는 부분 반응)은 검출가능한 MRD (최소 잔류 질환)의 부재를 수반할 수 있다. 한 실시양태에서, 반응성의 초기 기 간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일; 적어도 1, 2, 3, 또는 4주; 적어도 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 또는 12개월; 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5년 지속된다.

[0103] 본원에 사용된 "불응성"은 치료에 반응하지 않는 질환, 예를 들어 암을 지칭한다. 실시양태에서, 불응성 암은 치료의 시작 전 또는 시작 시 치료에 저항성일 수 있다. 다른 실시양태에서, 불응성 암은 치료 동안 저항성이 될 수 있다. 불응성 암은 또한 저항성 암으로도 불린다.

[0104] 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체 또는 항체 단편의 결합 특징에 유의한 영향을 미치 거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한 다. 변형은 관련 기술분야에 공지된 표준 기술, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 본 발명의 항체 또는 항체 단편 내에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 관련 기술분야에 서 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오 닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라 닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 본원에 기재된 CAR 내의 1개 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 CAR은 본원에 기재 된 기능적 검정을 사용하여 시험될 수 있다.

[0105] 용어 "자극"은 자극 분자 (예를 들어, TCR/CD3 복합체 또는 CAR)가 그의 동족 리간드 (또는 CAR의 경우에 종양 항원)와 결합하여 신호 전달 사건, 예컨대 비제한적으로 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달 또는 적절한 NK 수용 체 또는 CAR의 신호전달 도메인을 통한 신호 전달을 매개함으로써 유도되는 1차 반응을 지칭한다. 자극은 특정 분자의 변경된 발현을 매개할 수 있다.

[0106] 용어 "자극 분자"는 면역 세포 신호전달 경로의 적어도 일부 측면에 대한 자극 방식에서 면역 세포의 활성화를 조절하는 세포질 신호전달 서열(들)을 제공하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포, B 세포)에 의해 발현 되는 분자를 지칭한다. 한 측면에서, 신호는 예를 들어 펩티드로 로딩된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 개시되고, 증식, 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 T 세포 반응의 매개로 이어지는 1차 신호이다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열 ("1차 신호전달 도메인"으로도 지칭됨)은 면역수 용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 본 발명에서 특히 유용한 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 CD3 제타, 통상적인 FcR 감마 (FCER1G), Fc 감마 RIIa, FcR 베타 (Fc 엡실론 R1b), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD79a, CD79b, DAP10, 및 DAP12로부터 유래된

것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 특정 CAR에서, 본 발명의 임의의 1종 이상의 CAR 내의 세포내 신호전달 도메인은 세포내 신호전달 서열, 예를 들어 CD3-제타의 1차 신호전달 서열을 포함한다. 본 발명의 특정 CAR에서, CD3-제타의 1차 신호전달 서열은 서열식별번호: 9 (돌연변이체 CD3 제타)로서 제공된 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기이다. 본 발명의 특정 CAR에서, CD3-제타의 1차 신호전달 서열은 서열식별번호: 10 (야생형 인간 CD3 제타)에 제공된 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기이다.

[0107] 용어 "항원 제시 세포" 또는 "APC"는 그의 표면 상에 주요 조직적합성 복합체 (MHC)와 복합체화된 외래 항원을 디스플레이하는 면역계 세포, 예컨대 보조 세포 (예를 들어, B-세포, 수지상 세포 등)를 지칭한다. T-세포는 그의 T-세포 수용체 (TCR)를 사용하여 이들 복합체를 인식할 수 있다. APC는 항원을 프로세싱하고, 이를 T-세포에 제시한다.

[0108] 본원에 사용된 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 분자의 세포내 부분을 지칭한다. 세포내 신호전달 도메인은 CAR 함유 세포, 예를 들어 CART 세포의 면역 이펙터 기능을 촉진하는 신호를 생성할 수 있다. 예를 들어 CART 세포에서 면역 이펙터 기능의 예는 시토카인의 분비를 포함한 세포용해 활성 및 헬퍼 활성을 포함한다. 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 전문화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분이다. 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에서 전체 쇄를 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분이 사용되는 정도로, 이러한 말단절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 무손상 쇄 대신 사용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 따라서 이펙터 기능 신호를 전달하는데 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단된 부분을 포함하는 것으로 의도된다.

[0109] 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 1차 세포내 신호전달 도메인은 1차 자극, 또는 항원 의존성 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 신호, 또는 항원 비의존성 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것을 포함한다. 예를 들어, CART의 경우에, 1차 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 수용체의 세포질 서열을 포함할 수 있고, 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 보조-수용체 또는 공동자극 분자로부터의 세포질 서열을 포함할 수 있다.

[0110] 1차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 CD3 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"), FcεRI, 및 CD66d, CD32, DAP10 및 DAP12로부터 유래된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0111] 용어 "제타" 또는 대안적으로 "제타 쇄", "CD3-제타" 또는 "TCR-제타"는 진뱅크 수탁 번호 BAG36664.1로서 제공된 단백질 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기로서 정의되고, "제타 자극 도메인" 또는 대안적으로 "CD3-제타 자극 도메인" 또는 "TCR-제타 자극 도메인"은 T 세포 활성화를 위해 필요한 초기 신호를 기능적으로 전달하기에 충분한 제타 쇄의 세포질 도메인으로부터의 아미노산 잔기로서 정의된다. 한 측면에서, 제타의 세포질 도메인은 진뱅크 수탁 번호 BAG36664.1의 잔기 52 내지 164, 또는 그의 기능적 오르토로그인 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기를 포함한다. 한 측면에서, "제타 자극 도메인" 또는 "CD3-제타 자극 도메인"은 서열식별번호: 9로서 제공된 서열이다. 한 측면에서, "제타 자극 도메인" 또는 "CD3-제타 자극 도메인"은 서열식별번호: 10으로서 제공된 서열이다.

[0112] 용어 "공동자극 분자"는 공동자극 리간드에 특이적으로 결합하여, T 세포에 의한 공동자극 반응, 예컨대 비제한적으로 증식을 매개하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공동자극 분자는 효율적인 면역 반응에 필요한 항원 수용체 이외의 다른 세포 표면 분자 또는 그의 리간드이다. 공동자극 분자는 MHC 부류 I 분자, TNF 수용체 단백질, 이뮤노글로불린-유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구성 활성화 분자 (SLAM 단백질), 활성화 NK 세포 수용체, BTLA, 톨 리간드 수용체, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Nkp80 (KLRF1), Nkp44, Nkp30, Nkp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1,

CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0113] 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 분자의 세포내 부분을 지칭한다. 세포내 신호전달 도메인은 그것이 유래된 분자의 전체 세포내 부분, 또는 전체 천연 세포내 신호전달 도메인, 또는 그의 기능적 단편을 포함할 수 있다.
- [0114] 세포내 신호전달 도메인은 그것이 유래된 분자의 전체 세포내 부분, 또는 전체 천연 세포내 신호전달 도메인, 또는 그의 기능적 단편을 포함할 수 있다.
- [0115] 용어 "4-1BB"는 진뱅크 수탁 번호 AAA62478.2로서 제공된 아미노산 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기를 갖는 TNFR 슈퍼패밀리의 구성원을 지칭하고; "4-1BB 공동자극 도메인"은 진뱅크 수탁 번호 AAA62478.2의 아미노산 잔기 214-255, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기로서 정의된다. 한 측면에서, "4-1BB 공동자극 도메인"은 서열식별번호: 7로서 제공된 서열 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기이다.
- [0116] 본원에 사용된 용어 "면역 이펙터 세포"는 면역 반응, 예를 들어 면역 이펙터 반응의 촉진에 수반되는 세포를 지칭한다. 면역 이펙터 세포의 예는 T 세포, 예를 들어 알파/베타 T 세포 및 감마/델타 T 세포, B 세포, 자연 킬러 (NK) 세포, 자연 킬러 T (NKT) 세포, 비만 세포 및 골수-유래 식세포를 포함한다.
- [0117] 본원에 사용된 용어 "면역 이펙터 기능 또는 면역 이펙터 반응"은, 예를 들어 표적 세포의 면역 공격을 증진시키거나 촉진하는 면역 이펙터 세포의 기능 또는 반응을 지칭한다. 예를 들어, 면역 이펙터 기능 또는 반응은 표적 세포의 사멸, 또는 성장 또는 증식의 억제를 촉진하는 T 또는 NK 세포의 특성을 지칭한다. T 세포의 경우에, 1차 자극 및 공동자극은 면역 이펙터 기능 또는 반응의 예이다.
- [0118] 용어 "이펙터 기능"은 세포의 전문화된 기능을 지칭한다. T 세포의 이펙터 기능은, 예를 들어 시토카인의 분비를 포함한 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다.
- [0119] 용어 "코딩하는"은 뉴클레오타이드 (예를 들어, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 정의된 서열 또는 아미노산의 정의된 서열 및 그로부터 생성된 생물학적 특성을 갖는, 생물학적 과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 기능하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA 내의 뉴클레오타이드의 특정 서열의 고유한 특성을 지칭한다. 따라서, 유전자, cDNA, 또는 RNA는 그러한 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생산할 경우에 단백질을 코딩한다. 그의 뉴클레오타이드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 통상적으로 서열 목록에서 제공되는 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비-코딩 가닥 둘 다는 그러한 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 산물을 코딩하는 것으로서 지칭될 수 있다.
- [0120] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은, 서로 축중성 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 어구 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 또한 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.
- [0121] 용어 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터의, 또는 그 내부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0122] 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 외부로부터 도입되거나 외부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0123] 용어 "발현"은 프로모터에 의해 구동되는 특정한 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역을 지칭한다.
- [0124] 용어 "전달 벡터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포의 내부에 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 조성물을 지칭한다. 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온성 또는 친양쪽성 화합물과 회합된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 및 바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는 수많은 벡터가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "전달 벡터"는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한 핵산의 세포 내로의 전달을 용이하게 하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물, 예컨대 예를 들어 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 추가로 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 전달 벡터의 예는 아테노바이러스 벡터, 아테노-연관

바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0125] 용어 "발현 벡터"는 발현시킬 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 코스미드, 플라스미드 (예를 들어, 네이키드이거나 또는 리포솜 내에 포함됨) 및 바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-연관 바이러스)를 포함한, 관련 기술분야에 공지된 모든 것을 포함한다.
- [0126] 용어 "렌티바이러스"는 레트로비리다에(Retroviridae) 패밀리의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 특유한 것이고; 유의한 양의 유전자 정보를 숙주 세포의 DNA 내로 전달할 수 있고, 따라서 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV, 및 FIV가 렌티바이러스의 모든 예이다.
- [0127] 용어 "렌티바이러스 벡터"는 특히 문헌 [Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]에서 제공되는 바와 같은 자기-불활성화 렌티바이러스 벡터를 포함한, 렌티바이러스 계통의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 지칭한다. 임상에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는, 예를 들어 옥스포드 바이오메디카(Oxford BioMedica)로부터의 렌티벡터(LENTIVECTOR)® 유전자 전달 기술, 렌티젠(Lentigen)으로부터의 렌티맥스(LENTIMAX)™ 벡터 시스템 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터가 또한 이용가능하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다.
- [0128] 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 2개의 중합체 분자 사이, 예를 들어 2개의 핵산 분자, 예컨대, 2개의 DNA 분자 또는 2개의 RNA 분자 사이, 또는 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 서브유닛 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 분자들 다 내의 서브유닛 위치가 동일한 단량체 서브유닛에 의해 점유된 경우; 예를 들어, 각각의 2개의 DNA 분자 내의 위치가 아데닌에 의해 점유된 경우에, 이들은 그 위치에서 상동이거나 동일하다. 2개의 서열 사이의 상동성은 매칭되는 또는 상동성 위치의 수의 직접적인 함수이고; 예를 들어, 2개의 서열 내의 위치의 절반 (예를 들어, 중합체 10개 서브유닛 길이 내의 5개의 위치)이 상동성일 경우에, 2개의 서열은 50% 상동성이고; 90%의 위치 (예를 들어, 10개 중 9개)가 매칭되거나 상동성일 경우에, 2개의 서열은 90% 상동성이다.
- [0129] 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 쇄 또는 그의 단편 (예컨대 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 대개, 인간화 항체 및 그의 항체 단편은 수용자의 상보성-결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 비-인간 종 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체 또는 항체 단편)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체/항체 단편은 수용자 항체에서도, 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서도, 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 또는 항체 단편 성능을 추가로 정밀화 및 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체 또는 그의 항체 단편은 적어도 하나의, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 그것에 상응하고, 모든 또는 유의한 부분의 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 그것이다. 인간화 항체 또는 항체 단편은 또한 최적으로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 그것을 포함할 수 있다. 추가의 세부 사항에 대해서는, 문헌 [Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992]을 참조한다.
- [0130] "완전 인간"은 전체 분자가 인간 기원이거나 또는 항체 또는 이뮤노글로불린의 인간 형태와 동일한 아미노산 서열로 이루어진 이뮤노글로불린, 예컨대 항체 또는 항체 단편을 지칭한다.
- [0131] 용어 "단리된"은 천연 상태에서부터 변경되거나 제거됨을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그의 천연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어 숙주 세포와 같은 비-천연 환경에 존재할 수 있다.
- [0132] 본 발명의 문맥에서, 통상적으로 발생하는 핵산 염기에 대해 하기 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하고, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하고, "U"는 우리딘을 지칭한다.

- [0133] 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 "전사 제어"는 조절 서열과 이중 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하며, 후자의 발현을 발생시킨다. 예를 들어, 제1 핵산 서열은 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 위치하는 경우에 제2 핵산 서열과 작동가능하게 연결된 것이다. 예를 들어, 프로모터는 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 서로 인접할 수 있고, 예를 들어 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하기 위해 필요한 경우에, 동일한 리딩 프레임 내에 있다.
- [0134] 용어 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는, 예를 들어 피하 (s.c.), 정맥내 (i.v.), 근육내 (i.m.), 또는 흉골내 주사, 종양내, 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0135] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA), 또는 그의 DNA 또는 RNA의 조합, 및 단일- 또는 이중-가닥 형태로의 그의 중합체를 지칭한다. 용어 "핵산"은 유전자, cDNA 또는 mRNA를 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 합성 (예를 들어, 화학적으로 합성됨) 또는 재조합이다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 이 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 자연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 유사체 또는 유도체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 또한 명확하게 나타낸 서열 뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축중성 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP, 및 상보적 서열을 함축적으로 포괄한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 1개 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 및 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).
- [0136] 용어 "펩티드", "폴리펩티드", 및 "단백질"은 상호교환가능하게 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유 연결된 아미노산 잔기를 포함하는 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유하여야 하고, 단백질 또는 펩티드 서열을 구성할 수 있는 아미노산의 최대 수에 대한 제한은 존재하지 않는다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 상기 용어는 관련 기술분야에서 예를 들어 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 통상적으로 지칭되는 짧은 쇠, 및 많은 종류가 존재하는, 일반적으로 관련 기술분야에서 단백질로 지칭되는 더 긴 쇠 둘 다를 지칭한다. "폴리펩티드"는 특히, 예를 들어 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동성 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0137] 용어 "프로모터"는 폴리뉴클레오타이드 서열의 특이적 전사를 개시하는데 필요한, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열을 지칭한다.
- [0138] 용어 "프로모터/조절 서열"은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 산물의 발현을 위해 필요한 핵산 서열을 지칭한다. 일부 경우에, 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 예에서 이 서열은 또한 인핸서 서열, 및 유전자 산물의 발현을 위해 필요한 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은 예를 들어 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.
- [0139] 용어 "구성적" 프로모터는, 유전자 산물을 코딩하거나 특정하는 폴리뉴클레오타이드와 작동가능하게 연결된 경우에 유전자 산물이 세포의 대부분의 또는 모든 생리학적 조건 하에 세포에서 생산되도록 하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.
- [0140] 용어 "유도성" 프로모터는, 유전자 산물을 코딩하거나 특정하는 폴리뉴클레오타이드와 작동가능하게 연결된 경우에 실질적으로 프로모터에 상응하는 유도인자가 세포에 존재할 때에만 유전자 산물이 세포에서 생산되도록 하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.
- [0141] 용어 "조직-특이적" 프로모터는, 유전자에 의해 코딩되거나 명시되는 폴리뉴클레오타이드와 작동가능하게 연결된 경우에 실질적으로 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 유전자 산물이 세포에서 생산되도록 하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.
- [0142] 용어 "암 연관 항원" 또는 "종양 항원"은 상호교환가능하게 전체로 또는 단편 (예를 들어, MHC/펩티드)으로서 정상 세포와 비교 시 암 세포의 표면 상에서 우선적으로 발현되고 약리학적 작용제의 암 세포에 대한 우선적인 표적화에 유용한 분자 (전형적으로 단백질, 탄수화물 또는 지질)를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 정상 세포 및 암 세포 둘 다에 의해 발현되는 마커, 예를 들어 계열 마커, 예를 들어 B 세포 상의 CD19이다. 특정 측면에서, 본 발명의 종양 항원은 원발성 또는 전이성 흑색종, 흉선종, 림프종, 육종, 폐암, 간암, 비-호

지킨 림프종, 호지킨 림프종, 백혈병, 자궁암, 자궁경부암, 방광암, 신장암 및 선암종, 예컨대 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 암-연관 항원은 정상 세포와 비교 시 암 세포에서 과다발현, 예를 들어 정상 세포와 비교 시 1-배 과다 발현, 2-배 과다 발현, 3-배 과다 발현 또는 그 초과로 과다발현되는 세포 표면 분자이다. 일부 실시양태에서, 암-연관 항원은 암 세포에서 부적절하게 합성된 세포 표면 분자, 예를 들어 정상 세포 상에서 발현되는 분자와 비교 시 결실, 부가 또는 돌연변이를 함유하는 분자이다. 일부 실시양태에서, 암-연관 항원은 전체로 또는 단편 (예를 들어, MHC/펩티드)으로서 암 세포의 세포 표면 상에서 독점적으로 발현되고 정상 세포의 표면 상에서는 합성되거나 발현되지 않을 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 MHC 제시 펩티드에 결합하는 항원 결합 도메인 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편)을 포함하는 CAR을 포함한다. 통상적으로는, 내인성 단백질로부터 유래된 펩티드는 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 부류 I 분자의 포켓을 채우고, CD8+ T 림프구 상의 T 세포 수용체 (TCR)에 의해 인식된다. MHC 부류 I 복합체는 모든 유핵 세포에 의해 구성적으로 발현된다. 암에서, 바이러스-특이적 및/또는 종양-특이적 펩티드/MHC 복합체는 면역요법을 위한 세포 표면 표적의 고유한 부류를 나타낸다. 인간 백혈구 항원 (HLA)-A1 또는 HLA-A2와 관련하여 바이러스 또는 종양 항원으로부터 유래된 TCR-유사 항체 표적화 펩티드가 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sastry et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemssen et al., Gene Ther 2001 8(21):1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176):176ra33; Tashev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100] 참조). 예를 들어, TCR-유사 항체는 라이브러리, 예컨대 인간 scFv 파지 디스플레이된 라이브러리의 스크리닝으로부터 확인될 수 있다.

[0143] scFv와 관련하여 사용된 용어 "가요성 폴리펩티드 링커" 또는 "링커"는 가변 중쇄 및 가변 경쇄 영역을 함께 연결하기 위해 단독으로 또는 조합되어 사용되는 아미노산, 예컨대 글리신 및/또는 세린 잔기로 이루어진 펩티드 링커를 지칭한다. 한 실시양태에서, 가요성 폴리펩티드 링커는 Gly/Ser 링커이고, 아미노산 서열 (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (서열식별번호: 15)을 포함하며, 여기서 n은 1 이상의 양의 정수이다. 예를 들어, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 및 n=10이다. 한 실시양태에서, 가요성 폴리펩티드 링커는 (Gly₄ Ser)₄ (서열식별번호: 27) 또는 (Gly₄ Ser)₃ (서열식별번호: 28)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 실시양태에서, 링커는 (Gly₂Ser), (GlySer) 또는 (Gly₃Ser) (서열식별번호: 29)의 다중 반복부를 포함한다. 또한, 본원에 참조로 포함되는 WO2012/138475에 기재된 링커가 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0144] 본원에 사용된 5' 캡 (RNA 캡, RNA 7-메틸구아노신 캡 또는 RNA m⁷G 캡으로도 불림)은 전사 개시 직후에 진행 메신저 RNA의 "전면" 또는 5' 말단에 부가된 변형된 구아닌 뉴클레오타이드이다. 5' 캡은 제1 전사되는 뉴클레오타이드에 연결된 말단 기로 이루어진다. 그의 존재는 리보솜에 의한 인식 및 RNase로부터의 보호를 위해 중요하다. 캡 부가는 전사와 커플링되고, 각각 서로 영향을 미치도록 공동-전사 방식으로 발생한다. 전사 개시 직후에, 합성 중인 mRNA의 5' 말단은 RNA 폴리머라제와 회합된 캡-합성 복합체에 의해 결합된다. 이러한 효소 복합체는 mRNA 캡핑에 필요한 화학 반응을 촉매한다. 합성은 다단계 생화학적 반응으로서 진행된다. 캡핑 모이어티는 mRNA의 기능성, 예컨대 그의 안정성 또는 번역 효율을 조정하도록 변형될 수 있다.

[0145] 본원에 사용된 "시험관내 전사된 RNA"는 시험관내에서 합성된 RNA, 예를 들어 mRNA를 지칭한다. 일반적으로, 시험관내 전사된 RNA는 시험관내 전사 벡터로부터 생성된다. 시험관내 전사 벡터는 시험관내 전사된 RNA를 생성하기 위해 사용되는 주형을 포함한다.

[0146] 본원에 사용된 "폴리(A)"는 폴리아데닐화에 의해 mRNA에 부착된 일련의 아데노신이다. 일시적 발현을 위한 구축물의 일부 실시양태에서, 폴리A는 50 내지 5000개 (서열식별번호: 30), 예를 들어 64개 초과, 예를 들어 100개 초과, 예를 들어 300 또는 400개 초과이다. 폴리(A) 서열은 mRNA 기능성, 예컨대 국제화, 안정성 또는 번역 효율을 조정하기 위해 화학적으로 또는 효소적으로 변형될 수 있다.

[0147] 본원에 사용된 "폴리아데닐화"는 폴리아데닐릴 모이어티, 또는 그의 변형된 변이체의 메신저 RNA 분자에 대한 공유 연결을 지칭한다. 진행 유기체 내에서, 대부분의 메신저 RNA (mRNA) 분자는 3' 말단에서 폴리아데닐화된다. 3' 폴리(A) 테일은 효소, 폴리아데닐레이트 폴리머라제의 작용을 통해 프리-mRNA에 부가된 아데닌 뉴클레오타이드 (종종 수백 개)의 긴 서열이다. 고등 진핵생물에서, 폴리(A) 테일은 특정 서열, 폴리아데닐화 신호를 함유하는 전사체 상에 부가된다. 폴리(A) 테일 및 그에 결합된 단백질은 mRNA를 엑소뉴클레아제에 의한 분해로부터 보호하는 것을 돕는다. 폴리아데닐화는 또한 전사 종결, mRNA의 핵으로부터의 유출, 및 번역에 중요하다. 폴리아데닐화는 DNA의 RNA로의 전사 직후에 핵에서 일어나지만, 추가로 세포질에서 추후 일어날 수도 있다. 전

사가 종결된 후에, mRNA 쇄는 RNA 폴리머라제와 연관된 엔도뉴클레아제 복합체의 작용을 통해 절단된다. 절단 부위는 통상적으로 절단 부위 근처의 염기 서열 AAUAAA의 존재를 특징으로 한다. mRNA가 절단된 후에, 아데노신 잔기는 절단 부위의 자유 3' 말단에 부가된다.

[0148] 본원에 사용된 "일시적"은 수시간, 수일 또는 수주의 기간 동안의 비-통합된 트랜스진의 발현을 지칭하고, 여기서 발현 기간은 계놈 내로 통합되거나 숙주 세포 내의 안정한 플라스미드 레플리콘 내에 함유된 경우에 유전자의 발현을 위한 시간 미만이다.

[0149] 분리반출술은 개체로부터 전혈이 제거되고, 선택 성분으로 분리되고, 나머지가 순환으로 되돌려지는 과정이다. 일반적으로, 혈액 성분의 분리를 위한 2종의 방법, 원심분리 및 비-원심분리가 존재한다. 백혈구분리반출술은 환자의 백혈구의 능동적 선택 및 제거를 발생시킨다.

[0150] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 1종 이상의 요법 (예를 들어, 1종 이상의 치료제, 예컨대 본 발명의 CAR)의 투여로부터 생성된 증식성 장애의 진행, 중증도 및/또는 지속기간의 감소 또는 호전, 또는 증식성 장애의 1종 이상의 증상 (예를 들어, 1종 이상의 식별식별가능한 증상)의 호전을 지칭한다. 구체적인 실시양태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 환자에 의해 반드시 식별가능하지 않을 수 있는 증식성 장애의 적어도 하나의 측정가능한 물리적 파라미터, 예컨대 종양의 성장의 호전을 지칭한다. 다른 실시양태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은, 예를 들어 식별가능한 증상의 안정화에 의해 물리적으로, 예를 들어 물리적 파라미터의 안정화에 의해 생리학적으로, 또는 둘 다로의 증식성 장애의 진행의 억제 지칭한다. 다른 실시양태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 종양 크기 또는 암성 세포 카운트의 감소 또는 안정화를 지칭한다.

[0151] 용어 "신호 전달 경로"는 신호를 세포의 한 부분으로부터 세포의 또 다른 부분으로의 전달에 소정의 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자 사이의 생화학적 관계를 지칭한다. 어구 "세포 표면 수용체"는 신호를 수신하고 세포막을 가로질러 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다.

[0152] 용어 "대상체"는 면역 반응이 도출될 수 있는 살아있는 유기체 (예를 들어, 포유동물, 인간)를 포함하는 것으로 의도된다.

[0153] 용어 "실질적으로 정제된" 세포는 다른 세포 유형이 본질적으로 없는 세포를 지칭한다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 그의 자연 발생 상태에서 정상적으로 회합되어 있는 다른 세포 유형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 경우에, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 균질한 세포 집단을 지칭한다. 다른 경우에, 이 용어는 단순히 그의 천연 상태에서 자연적으로 회합되어 있는 세포로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 측면에서, 세포는 시험관내에서 배양된다. 다른 측면에서, 세포는 시험관내에서 배양되지 않는다.

[0154] 본 발명의 문맥에서, "종양 항원" 또는 "과다증식성 장애 항원" 또는 "과다증식성 장애와 연관된 항원"은 특정 과다증식성 장애에 공통적인 항원을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 종양 항원은 원발성 또는 전이성 흑색종, 흉선종, 림프종, 육종, 폐암, 간암, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 백혈병, 자궁암, 자궁경부암, 방광암, 신장암 및 선암종 예컨대 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암으로부터 유래된다.

[0155] 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염된, 형질전환된 또는 형질도입된 바 있는 것이다. 세포는 1차 대상체 세포 및 그의 자손을 포함한다.

[0156] 용어 "특이적으로 결합한다"는 항체 또는 리간드가 샘플 내에 존재하는 동족 결합 파트너 단백질을 인식하고 이와 결합하지만, 항체 또는 리간드가 샘플 내 다른 분자는 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는다는 것을 지칭한다.

[0157] 범위: 본 개시내용에 걸쳐, 본 발명의 다양한 측면은 범위 포맷으로 제시될 수 있다. 범위 포맷의 기재는 단지의 및 간결함을 위한 것임을 이해하여야 하고, 본 발명의 범주에 대한 불변의 제한으로서 해석되지 않아야 한다. 따라서, 범위의 기재는 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위범위 뿐만 아니라 그러한 범위 내의 개별 수치값을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 범위, 예컨대 1 내지 6의 기재는 구체적으로 개시된 하위범위, 예컨대 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등, 뿐만 아니라 그러한 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 또 다른 예로서, 범위 예컨대 95-99% 동일성은 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 어떤 것을 포함하고, 하위범위 예컨대 96-

99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98%와 98-99% 동일성을 포함한다. 이것은 범위의 폭에 상관없이 적용된다.

- [0158] 설명
- [0159] CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR로 조작될 수 있는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포), 및 이러한 세포를 포함하는 반응 혼합물 및 조성물을 제조하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0160] 한 측면에서, 개시내용은 CAR을 발현하도록 조작된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)를 특색으로 하며, 여기서 조작된 면역 이펙터 세포는 항종양 특성을 나타낸다. 예시적인 항원은 본원에 기재된 암 연관 항원 (즉, 종양 항원)이다. 한 측면에서, 세포는 CAR에 의해 형질전환되고 CAR은 세포 표면 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)는 CAR을 코딩하는 바이러스 벡터에 의해 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 이러한 실시양태에서, 세포는 CAR을 안정하게 발현할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)는 CAR을 코딩하는 핵산, 예를 들어 mRNA, cDNA, DNA에 의해 형질감염된다. 일부 이러한 실시양태, 세포에서 CAR을 일시적으로 발현할 수 있다.
- [0161] 게다가, 본 발명은, 다른 질환 중에서, 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원을 발현하는 세포 또는 조직을 수반하는 암 또는 임의의 악성종양 또는 자가면역 질환을 치료하기 위한 CAR-발현 세포, 예를 들어 CART 조성물 및 의약 또는 방법에서의 그의 용도를 제공한다.
- [0162] 한 측면에서, 본 발명의 CAR은 본원에 기재된 바와 같은 종양 항원을 발현하는 정상 세포를 근절하여, 이에 의해 세포 이식 전에 세포 조건화 요법으로서 사용하기 위해 적용가능할 수 있다.
- [0163] 면역 이펙터 세포의 공급원
- [0164] 실시양태에서, 확장 및 유전자 변형 또는 다른 변형 전에, 세포, 예를 들어 T 세포 또는 자연 킬러 (NK) 세포의 공급원을 대상체로부터 수득할 수 있다. 대상체의 예는 인간, 원숭이, 침팬지, 개, 고양이, 마우스, 래트, 및 그의 트랜스제닉 종을 포함한다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직, 및 종양을 포함한 수많은 공급원으로부터 수득될 수 있다.
- [0165] 본 개시내용의 특정 측면에서, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포는 통상의 기술자에게 공지된 임의의 많은 기술, 예컨대 피콜(Ficoll)TM 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 수득될 수 있다. 한 측면에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 분리반출술에 의해 수득된다. 분리반출술 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포를 포함한 림프구, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 한 측면에서, 분리반출술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고, 임의로 세포를 후속 프로세싱 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지에 두기 위해 세척될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포를 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세척한다. 대안적 실시양태에서, 세척 용액은 칼슘이 결여되어 있고, 마그네슘이 결여될 수 있거나 또는 모두는 아니지만 많은 2가 양이온이 결여될 수 있다.
- [0166] 칼슘의 부재 하에 초기 활성화 단계는 확대된 활성화로 이어질 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백한 바와 같이, 세척 단계는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해, 예컨대 반-자동화 "관통형" 원심분리기 (예를 들어, 코브(Cobe) 2991 셀 프로세서, 박스터 시토메이트(Baxter CytoMate), 또는 해모네틱스 셀 세이버 5(Haemonetics Cell Saver 5))를 제조업체의 지침에 따라 사용하는 것에 의해 달성할 수 있다. 세척 후에, 세포를 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대 Ca-무함유, Mg-무함유 PBS, 플라스마라이트 A(PlasmaLyte A), 또는 완충제 존재 또는 부재 하의 다른 염수 용액 중에 재현탁시킬 수 있다. 대안적으로, 분리반출술 샘플의 바람직하지 않은 성분을 제거하고, 세포를 배양 배지 내에 직접 재현탁시킬 수 있다.
- [0167] 한 측면에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고, 예를 들어 퍼콜(PERCOLL)TM 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심 분리에 의해 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 단리된다.
- [0168] 본원에 기재된 방법은, 예를 들어 본원에 기재된 예를 들어 음성 선택 기술을 사용하여, 예를 들어 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포의 특정 하위집단, T 조절 세포-고갈된 집단, CD25+ 고갈된 세포의 선택을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포의 집단은 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 CD25+ 세포를 함유한다.
- [0169] 한 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포는 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 또는 CD25-결합 리간드, IL-2를 사용하여 집단으로부터 제거된다. 한 실시양태에서, 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 또는 CD25-결합 리간드는 기질, 예를 들어 비드에 접합되거나, 또는 달리 기질, 예를 들어 비드 상에 코팅된다. 한 실시양태에

서, 항-CD25 항체 또는 그의 단편은 본원에 기재된 바와 같은 기질에 접합된다.

- [0170] 한 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포는 밀테니(Miltenyi)TM로부터의 CD25 고갈 시약을 사용하여 집단으로부터 제거된다. 한 실시양태에서, 세포 대 CD25 고갈 시약의 비는 1e7개 세포 대 20 μ L, 또는 1e7개 세포 대 15 μ L, 또는 1e7개 세포 대 10 μ L, 또는 1e7개 세포 대 5 μ L, 또는 1e7개 세포 대 2.5 μ L, 또는 1e7개 세포 대 1.25 μ L이다. 한 실시양태에서, 예를 들어 T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 고갈을 위해, 5억개 초과 세포/ml가 사용된다. 추가 측면에서, 6억, 7억, 8억, 또는 9억개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다.
- [0171] 한 실시양태에서, 고갈될 면역 이펙터 세포의 집단은 약 6×10^9 개의 CD25+ T 세포를 포함한다. 다른 측면에서, 고갈될 면역 이펙터 세포의 집단은 약 1×10^9 개 내지 1×10^{10} 개의 CD25+ T 세포, 및 그 사이의 임의의 정수 값을 포함한다. 한 실시양태에서, T 조절-고갈된 세포의 생성된 집단은 2×10^9 개의 T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포, 또는 그 미만 (예를 들어, 1×10^9 개, 5×10^8 개, 1×10^8 개, 5×10^7 개, 1×10^7 개, 또는 그 미만의 CD25+ 세포)을 갖는다.
- [0172] 한 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포는 고갈 튜빙 세트, 예컨대 예를 들어 튜빙 162-01이 구비된 클리니맥(CliniMAC) 시스템을 사용하여 집단으로부터 제거된다. 한 실시양태에서, 클리니맥 시스템은 고갈 설정, 예컨대 예를 들어, DEPLETION2.1로 가동된다.
- [0173] 특정한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 분리반출술 전 또는 CAR-발현 세포 생성물의 제조 동안 대상체에서 면역 세포의 음성 조절자의 수준을 감소시키는 것 (예를 들어, 원치않는 면역 세포, 예를 들어 T_{REG} 세포의 수를 감소시키는 것)은 대상체의 재발 위험을 유의하게 감소시킨다. 예를 들어, T_{REG} 세포를 고갈시키는 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. T_{REG} 세포를 감소시키는 방법은 시클로포스파미드, 항-GITR 항체 (본원에 기재된 항-GITR 항체), CD25-고갈, mTOR 억제제, 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0174] 일부 실시양태에서, 제조 방법은 CAR-발현 세포의 제조 전에 T_{REG} 세포의 수를 감소시키는 것 (예를 들어, 고갈시키는 것)을 포함한다. 예를 들어, 제조 방법은, 예를 들어 CAR-발현 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포) 생성물의 제조 전에 T_{REG} 세포를 고갈시키기 위해 샘플, 예를 들어 분리반출술 샘플을 항-GITR 항체 및/또는 항-CD25 항체 (또는 그의 단편 또는 CD25-결합 리간드)와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0175] 특정한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 분리반출술 전 또는 CAR-발현 세포 생성물의 제조 동안 대상체에서 면역 세포의 음성 조절자의 수준을 감소시키는 것 (예를 들어, 원치않는 면역 세포, 예를 들어 T_{REG} 세포의 수를 감소시키는 것)은 대상체의 재발 위험을 감소시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체는 CAR-발현 세포 생성물 제조를 위한 세포의 수집 전에 T_{REG} 세포를 감소시키는 1종 이상의 요법으로 사전-처리되고, 이에 의해 CAR-발현 세포 처리에 대한 대상체의 재발 위험이 감소된다. 한 실시양태에서, T_{REG} 세포를 감소시키는 방법은 대상체에게 시클로포스파미드, 항-GITR 항체 중 1종 이상의 투여, CD25-고갈, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, T_{REG} 세포를 감소시키는 방법은 대상체에게 시클로포스파미드, 항-GITR 항체 중 1종 이상을 투여하는 것, CD25-고갈, mTOR 억제제, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 시클로포스파미드, 항-GITR 항체 중 1종 이상의 투여, CD25-고갈, 또는 그의 조합은 CAR-발현 세포 생성물의 주입 전, 그 동안 또는 그 후에 일어날 수 있다. 시클로포스파미드, 항-GITR 항체 중 1종 이상의 투여, CD25-고갈, mTOR 억제제, 또는 그의 조합은 CAR-발현 세포 생성물의 주입 전, 그 동안 또는 그 후에 일어날 수 있다.
- [0176] 일부 실시양태에서, 제조 방법은 CAR-발현 세포의 제조 전에 T_{REG} 세포의 수를 감소시키는 것 (예를 들어, 고갈시키는 것)을 포함한다. 예를 들어, 제조 방법은, 예를 들어 CAR-발현 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포) 생성물의 제조 전에 T_{REG} 세포를 고갈시키기 위해 샘플, 예를 들어 분리반출술 샘플을 항-GITR 항체 및/또는 항-CD25 항체 (또는 그의 단편 또는 CD25-결합 리간드)와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0177] 한 실시양태에서, 대상체는 CAR-발현 세포 생성물 제조를 위한 세포의 수집 전에 시클로포스파미드로 사전-처리되고, 이에 의해 CAR-발현 세포 처리 (예를 들어, CTL019 처리)에 대한 대상체의 재발 위험이 감소된다. 한 실시양태에서, 대상체는 CAR-발현 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포) 생성물 제조를 위한 세포의 수집 전에 항-GITR 항체로 사전-처리되고, 이에 의해 CAR-발현 세포 처리에 대한 대상체의 재발 위험이 감소된다.

- [0178] 한 실시양태에서, CAR-발현 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포) 제조 방법은 CAR-발현 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포) 생성물 (예를 들어, CTL019 생성물)의 제조 전에 T_{REG} 세포를 고갈시키기 위해 변형된다. 한 실시양태에서, CD25-고갈은 CAR-발현 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포) 생성물 (예를 들어, CTL019 생성물)의 제조 전에 T_{REG} 세포를 고갈시키기 위해 사용된다.
- [0179] 한 실시양태에서, 제거될 세포의 집단은 조절 T 세포도 또는 종양 세포도 아니지만, CART 세포의 확장 및/또는 기능에 달리 음의 영향을 미치는 세포, 예를 들어 CD14, CD11b, CD33, CD15, 또는 잠재적으로 면역 억제 세포에 의해 발현되는 다른 마커를 발현하는 세포이다. 한 실시양태에서, 이러한 세포는 조절 T 세포 및/또는 종양 세포와 공동으로, 또는 상기 고갈 후에, 또는 또 다른 순서로 제거되는 것이 고려된다.
- [0180] 본원에 기재된 방법은 1개 초과와 선택 단계, 예를 들어 1개 초과와 고갈 단계를 포함할 수 있다. 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 풍부화는, 예를 들어 음성 선택된 세포에 고유한 표면 마커로 지시되는 항체의 조합에 의해 달성될 수 있다. 1가지 방법은 음성 선택된 세포의 표면 상에 존재하는 세포 표면 마커로 지시되는 모노클로날 항체의 콕테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유동 세포측정법을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 풍부화하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함할 수 있다.
- [0181] 본원에 기재된 방법은 종양 항원, 예를 들어 CD25를 포함하지 않는 종양 항원, 예를 들어 CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 또는 CD11b를 발현하는 집단으로부터 세포를 제거하여 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR의 발현에 적합한 T 조절-고갈된, 예를 들어 CD25+ 고갈된 및 종양 항원 고갈된 세포의 집단을 제공하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 종양 항원 발현 세포는 T 조절, 예를 들어 CD25+ 세포와 동시에 제거된다. 예를 들어, 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 및 항종양 항원 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 동일한 기질, 예를 들어 비드에 부착될 수 있거나, 또는 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 또는 항종양 항원 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 혼합물인 개별 비드에 부착될 수 있다. 다른 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포의 제거 및 종양 항원 발현 세포의 제거는 순차적이고, 예를 들어 어느 하나의 순서로 일어날 수 있다.
- [0182] 또한, 체크 포인트 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 체크 포인트 억제제를 발현하는 집단으로부터 세포, 예를 들어 PD1+ 세포, LAG3+ 세포, 및 TIM3+ 세포 중 1종 이상을 제거하여, T 조절-고갈된, 예를 들어 CD25+ 고갈된 세포 및 체크 포인트 억제제 고갈된 세포, 예를 들어 PD1+, LAG3+ 및/또는 TIM3+ 고갈된 세포의 집단을 제공하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 예시적인 체크 포인트 억제제는, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 및 TGFR (예를 들어, TGFR베타)을 포함한다. 한 실시양태에서, 체크 포인트 억제제 발현 세포는 T 조절, 예를 들어 CD25+ 세포와 동시에 제거된다. 예를 들어, 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 및 항-체크 포인트 억제제 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 동일한 비드에 부착될 수 있거나, 또는 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 또는 항-체크 포인트 억제제 항체 또는 그의 단편은 세포를 제거하는데 사용될 수 있는 혼합물인 개별 비드에 부착될 수 있다. 다른 실시양태에서, T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ 세포의 제거 및 체크 포인트 억제제 발현 세포의 제거는 순차적이고, 예를 들어 어느 하나의 순서로 일어날 수 있다.
- [0183] 본원에 기재된 방법은 양성 선택 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, T 세포는 항-CD3/항-CD28 (예를 들어, 3x28)-접합된 비드, 에컨대 디나비즈(DYNABEADS)® M-450 CD3/CD28 T와 함께 목적하는 T 세포의 양성 선택을 위한 충분한 시간 동안 인큐베이션함으로써 분리될 수 있다. 한 실시양태에서, 시간은 약 30분이다. 추가 실시양태에서, 시간은 30분 내지 36시간 또는 그 초과 및 그 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 추가 실시양태에서, 시간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 시간은 10 내지 24시간, 예를 들어 24시간이다. 다른 세포 유형과 비교 시 T 세포가 거의 없는 임의의 상황에서, 에컨대 종양 조직으로부터 또는 면역손상된 개체로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)를 분리하는데 있어서, T 세포를 분리하기 위해 보다 긴 인큐베이션 시간이 사용될 수 있다. 또한, 보다 긴 인큐베이션 시간의 사용은 CD8+ T 세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 단순히 시간을 단축하거나 연장함으로써 T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 하고/거나, 비드 대 T 세포의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써 (본원에 추가로 기재된 바와 같음), 배양 개시 시 또는 과정 동안의 다른 시점에 T 세포의 하위집단을 우선적으로 선택할 수 있다. 추가로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써, T 세포의 하위집단은 배양 개시

시 또는 다른 목적하는 시점에 우선적으로 선택될 수 있다.

- [0184] 한 실시양태에서, IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, 그랜자임 B 및 퍼포린, 또는 다른 적절한 분자, 예를 들어 다른 시토카인 중 1종 이상을 발현하는 T 세포 집단이 선택될 수 있다. 세포 발현에 대해 스크리닝하는 방법은 예를 들어 PCT 공개 번호 WO 2013/126712에 기재된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0185] 양성 또는 음성 선택에 의한 세포의 목적하는 집단의 단리를 위해, 세포의 농도 및 표면 (예를 들어, 입자, 예컨대 비드)은 변할 수 있다. 특정 측면에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 (예를 들어, 세포의 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 100억개 세포/ml, 90억개/ml, 80억개/ml, 70억개/ml, 60억개/ml, 또는 50억개/ml의 농도가 사용된다. 한 측면에서, 10억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 한 측면에서, 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 측면에서, 1억2천5백만 또는 1억5천만개 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다.
- [0186] 높은 농도의 사용은 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장을 발생시킬 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 (예를 들어, 백혈병성 혈액, 종양 조직 등)로부터의 보다 효율적인 포획을 가능하게 한다. 이러한 세포의 집단은 치료 가치를 가질 수 있고, 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어 높은 농도의 세포를 사용하는 것은, 정상적으로는 보다 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T 세포의 보다 효율적인 선택을 가능하게 한다.
- [0187] 관련 측면에서, 보다 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포 및 표면 (예를 들어, 입자, 예컨대 비드)의 혼합물을 유의하게 희석시킴으로써, 입자와 세포 사이에 상호작용이 최소화된다. 이것은 입자에 결합되는 다량의 목적하는 항원을 발현하는 세포를 선택한다. 예를 들어, CD4+ T 세포는 보다 높은 수준의 CD28을 발현하고, 희석 농도에서 CD8+ T 세포보다 더 효율적으로 포획된다. 한 측면에서, 사용된 세포의 농도는 5×10^6 개/ml이다. 다른 측면에서, 사용된 농도는 약 1×10^5 개/ml 내지 1×10^6 개/ml, 및 그 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.
- [0188] 다른 측면에서, 세포를 2-10°C 또는 실온에서 상이한 속도로 상이한 시간 길이 동안 회전장치 상에서 인큐베이션할 수 있다.
- [0189] 한 실시양태에서, 집단의 복수의 면역 이펙터 세포는 디아글리세롤 키나제 (DGK)를 발현하지 않고, 예를 들어 DGK-결핍이다. 한 실시양태에서, 집단의 복수의 면역 이펙터 세포는 이카로스를 발현하지 않고, 예를 들어 이카로스-결핍이다. 한 실시양태에서, 집단의 복수의 면역 이펙터 세포는 DGK 및 이카로스를 발현하지 않고, 예를 들어 DGK 및 이카로스 둘 다-결핍이다.
- [0190] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후에 동결될 수 있다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도의 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후에, 세포는 동결 용액 중에 현탁될 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터가 관련 기술분야에 공지되어 있고 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 한 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% DMSO, 또는 예를 들어, 헤스판 및 플라스마라이트 A를 함유하는 다른 적합한 세포 동결 매질을 함유하는 배양 배지를 사용하는 것을 수반하고, 세포는 이어서 1분에 1°C의 속도로 -80°C로 동결되고, 액체 질소 저장 탱크의 증기 상에 저장된다. 다른 제어 동결 방법 뿐만 아니라 -20°C에서의 또는 액체 질소 내의 즉각적인 비제어 동결이 사용될 수 있다.
- [0191] 특정 측면에서, 동결보존된 세포는 본원에 기재된 바와 같이 해동 및 세척되고, 1시간 동안 실온에서 휴지되도록 한 후, 본 발명의 방법을 사용하여 활성화된다.
- [0192] 또한, 본 발명과 관련하여 본원에 기재된 바와 같은 확장된 세포가 필요할 수 있을 때 그 전의 일정 기간에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 분리반출술 생성물을 수집하는 것이 고려된다. 따라서, 확장시킬 세포의 공급원은 필요한 임의의 시점에 수집될 수 있고, 목적하는 세포, 예컨대 T 세포가 단리되고, 면역 이펙터 세포 요법으로부터 이익을 얻을 임의의 수많은 질환 또는 상태, 예컨대 본원에 기재된 것에 대한 면역 이펙터 세포 요법에 추후 사용하기 위해 동결될 수 있다. 한 측면에서, 혈액 샘플 또는 분리반출술은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취된다. 특정 측면에서, 혈액 샘플 또는 분리반출술은 질환이 발생할 위험이 있지만 아직 질환이 발생하

지 않은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취되고, 관심 세포가 분리되고, 추후 사용을 위해 동결된다. 특정 측면에서, T 세포는 확장, 동결되고, 나중에 사용될 수 있다. 특정 측면에서, 샘플은 본원에 기재된 바와 같은 특정한 질환의 진단 직후에, 그러나 임의의 치료 전에 환자로부터 수집된다. 추가 측면에서, 세포는 나탈리주맵, 에팔리주맵, 항바이러스제, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역절제제, 예컨대 캄파트, 항-CD3 항체, 시톡산, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228과 같은 작용제, 및 방사선조사를 사용하는 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 수많은 관련 치료 양식 전에 대상체로부터의 혈액 샘플 또는 분리만출술로부터 분리된다.

[0193] 본 발명의 추가 측면에서, T 세포는 기능적 T 세포를 사용한 대상체의 치료 후에 환자로부터 직접 수득된다. 이와 관련하여, 특정 암 치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물을 사용한 치료 후, 환자가 치료로부터 정상적으로 회복되는 기간 동안의 치료 직후에, 수득된 T 세포의 품질은 생체외에서 확장되는 그의 능력이 최적화되거나 개선될 수 있는 것으로 관찰되었다. 마찬가지로, 본원에 기재된 방법을 사용한 생체의 조작 후에, 이들 세포는 증진된 생착 및 생체내 확장을 위한 바람직한 상태로 존재할 수 있다. 따라서, 이러한 회복기 동안 T 세포, 수지상 세포, 또는 조혈 계열의 다른 세포를 포함하는 혈액 세포를 수집하는 것이 본 발명의 문맥 내에서 고려된다. 추가로, 특정 측면에서, 특히 요법 후의 정의된 시간 윈도우 동안 특정한 세포 유형의 재증식, 재순환, 재생, 및/또는 확장이 유리한 조건을 대상체에서 생성하기 위해 가동화 (예를 들어, GM-CSF를 사용한 가동화) 및 조건화 요법이 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형은 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.

[0194] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 면역 이펙터 세포는 낮은, 면역 증진 용량의 mTOR 억제제를 제공받은 대상체로부터 수득된다. 한 실시양태에서, CAR을 발현하도록 조작된 면역 이펙터 세포의 집단, 예를 들어 T 세포는 대상체 내의 또는 대상체로부터 수거된 PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포의 수준, 또는 PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포/ PD1 양성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포의 비가 적어도 일시적으로 증가되도록 낮은, 면역 증진 용량의 mTOR 억제제의 충분한 시간 후에 또는 충분한 투여 후에 수거된다.

[0195] 다른 실시양태에서, CAR을 발현하도록 조작되었거나 또는 조작된 면역 이펙터 세포의 집단, 예를 들어 T 세포는 PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포의 수를 증가시키거나 또는 PD1 음성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포/ PD1 양성 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포의 비를 증가시키는 mTOR 억제제의 양과의 접촉에 의해 생체외에서 처리될 수 있다.

[0196] 본 출원의 방법은 5% 이하, 예를 들어 2%의 인간 AB 혈청을 포함하는 배양 배지 조건을 이용할 수 있고, 공지된 배양 배지 조건 및 조성, 예를 들어 문헌 [Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31]에 기재된 것을 사용할 수 있는 것으로 인식된다.

[0197] 한 실시양태에서, 본 출원의 방법은 무혈청 배지를 포함하는 배양 배지 조건을 이용할 수 있다. 한 실시양태에서, 무혈청 배지는 옵티마이저 CTS (라이프테크(LifeTech)), 이뮤노컬트 XF (스템셀 테크놀로지스(Stemcell technologies)), 셀그로 (셀게닉스(CellGenix)), 텍스맥스 (밀테니(Miltenyi)), 스텐라인 (시그마(Sigma)), 엑스비보15 (론자(Lonza)), 프라임XV (어바인 사이언티픽(Irvine Scientific)) 또는 스텐엑스비보 (랜드디 시스템(RandD systems))이다. 무혈청 배지는 혈청 대체제 예컨대 라이프테크로부터의 ICSR (면역 세포 혈청 대체제)로 보충될 수 있다. 혈청 대체제 (예를 들어, ICSR)의 수준은, 예를 들어 최대 5%, 예를 들어 약 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5%일 수 있다.

[0198] 한 실시양태에서, T 세포 집단은 디아글리세롤 키나제 (DGK)-결핍이다. DGK-결핍 세포는 DGK RNA 또는 단백질을 발현하지 않거나 또는 감소 또는 억제된 DGK 활성을 갖는 세포를 포함한다. DGK-결핍 세포는 유전적 접근법에 의해, 예를 들어 RNA-간섭제, 예를 들어 siRNA, shRNA, miRNA를 투여하여 DGK 발현을 감소 또는 방지하는 것에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, DGK-결핍 세포는 본원에 기재된 DGK 억제제를 사용한 처리에 의해 생성될 수 있다.

[0199] 한 실시양태에서, T 세포 집단은 이카로스-결핍이다. 이카로스-결핍 세포는 이카로스 RNA 또는 단백질을 발현하지 않거나 또는 감소 또는 억제된 이카로스 활성을 갖는 세포를 포함하고, 이카로스-결핍 세포는 유전적 접근법에 의해, 예를 들어 RNA-간섭제, 예를 들어 siRNA, shRNA, miRNA를 투여하여 이카로스 발현을 감소 또는 방지하는 것에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 이카로스-결핍 세포는 이카로스 억제제, 예를 들어 레날리도미드를

사용한 처리에 의해 생성될 수 있다.

- [0200] 실시양태에서, T 세포 집단은 DGK-결핍 및 이카로스-결핍이고, 예를 들어 DGK 및 이카로스를 발현하지 않거나 또는 감소 또는 억제된 DGK 및 이카로스 활성을 갖는다. 이러한 DGK 및 이카로스-결핍 세포는 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0201] 한 실시양태에서, NK 세포는 대상체로부터 수득된다. 또 다른 실시양태에서, NK 세포는 NK 세포주, 예를 들어 NK-92 세포주 (콘퀘스트)이다.
- [0202] 동종 CAR
- [0203] 본원에 기재된 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 동종 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포 또는 NK 세포일 수 있다. 예를 들어, 세포는 동종 T 세포, 예를 들어 기능적 T 세포 수용체 (TCR) 및/또는 인간 백혈구 항원 (HLA), 예를 들어, HLA 부류 I 및/또는 HLA 부류 II의 발현이 결여된 동종 T 세포일 수 있다.
- [0204] 기능적 TCR이 결여된 T 세포는 예를 들어 그의 표면 상에 임의의 기능적 TCR을 발현하지 않도록 조작되거나, 기능적 TCR을 포함하는 1개 이상의 서브유닛을 발현하지 않도록 조작되거나 (예를 들어, TCR 알파, TCR 베타, TCR 감마, TCR 델타, TCR 엡실론, 및/또는 TCR 제타를 발현하지 않도록 (또는 감소된 발현을 나타내도록) 조작되거나), 또는 그의 표면 상에 매우 적은 기능적 TCR을 생산하도록 조작될 수 있다. 대안적으로, T 세포는 예를 들어 TCR의 서브유닛 중 1개 이상의 돌연변이된 또는 말단절단된 형태의 발현에 의해 실질적으로 손상된 TCR을 발현할 수 있다. 용어 "실질적으로 손상된 TCR"은 이러한 TCR이 숙주에서 유해한 면역 반응을 도출하지 않을 것임을 의미한다.
- [0205] 본원에 기재된 T 세포는 예를 들어 그의 표면 상에 기능적 HLA를 발현하지 않도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 T 세포는 세포 표면 발현 HLA, 예를 들어, HLA 부류 I 및/또는 HLA 부류 II가 하향조절되도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, HLA의 하향조절은 베타-2 마이크로글로불린 (B2M)의 발현을 감소시키거나 제거하는 것에 의해 달성될 수 있다.
- [0206] 일부 실시양태에서, T 세포는 기능적 TCR 및 기능적 HLA, 예를 들어 HLA 부류 I 및/또는 HLA 부류 II가 결여될 수 있다.
- [0207] 기능적 TCR 및/또는 HLA의 발현이 결여된 변형된 T 세포는 TCR 또는 HLA의 1개 이상의 서브유닛의 녹아웃 또는 녹다운을 포함한 임의의 적합한 수단에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 siRNA, shRNA, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (CRISPR) 전사-활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 또는 아연 핑거 엔도뉴클레아제 (ZFN)를 사용한 TCR 및/또는 HLA의 녹다운을 포함할 수 있다.
- [0208] 일부 실시양태에서, 동종 세포는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 억제 분자를 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현하는 세포일 수 있다. 예를 들어, 세포는 예를 들어 면역 이펙터 반응을 일으키는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있는 억제 분자를 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현하는 세포일 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 및 TGFR (예를 들어, TGFR베타)를 포함한다. 예를 들어, DNA, RNA 또는 단백질 수준에서의 억제에 의한 억제 분자의 억제는 CAR-발현 세포 성능을 최적화할 수 있다. 실시양태에서, 억제 핵산, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 예를 들어 억제 핵산, 예를 들어 dsRNA, 예를 들어 siRNA 또는 shRNA, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (CRISPR), 전사-활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 또는 아연 핑거 엔도뉴클레아제 (ZFN)가 사용될 수 있다.
- [0209] TCR 또는 HLA를 억제하는 siRNA 및 shRNA
- [0210] 일부 실시양태에서, TCR 발현 및/또는 HLA 발현은 세포, 예를 들어 T 세포에서 TCR 및/또는 HLA, 및/또는 본원에 기재된 억제 분자 (예를 들어, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 및 TGFR 베타)를 코딩하는 핵산을 표적화하는 siRNA 또는 shRNA를 사용하여 억제될 수 있다.
- [0211] siRNA 및 shRNA를 위한 발현 시스템, 및 예시적인 shRNA가, 예를 들어 그 전문이 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 W02015/142675의 단락 649 및 650에 기재되어 있다.

- [0212] TCR 또는 HLA를 억제하는 CRISPR
- [0213] 본원에 사용된 "CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA에 대한 CRISPR" 또는 "TCR 및/또는 HLA를 억제하는 CRISPR"은 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부의 세트, 또는 이러한 반복부의 세트를 포함하는 시스템을 지칭한다. 본원에 사용된 "Cas"는 CRISPR-연관 단백질을 지칭한다. "CRISPR/Cas" 시스템은 세포, 예를 들어 T 세포에서 TCR 및/또는 HLA 유전자, 및/또는 본원에 기재된 억제 분자 (예를 들어, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 및 TGFR 베타)를 침묵 또는 돌연변이시키기 위해 사용될 수 있는, CRISPR 및 Cas로부터 유래된 시스템을 지칭한다.
- [0214] CRISPR/Cas 시스템 및 그의 용도는, 예를 들어 그 전문이 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 651-658에 기재되어 있다.
- [0215] TCR 및/또는 HLA를 억제하는 TALEN
- [0216] "TALEN" 또는 "HLA 및/또는 TCR에 대한 TALEN" 또는 "HLA 및/또는 TCR을 억제하는 TALEN"은 세포, 예를 들어 T 세포에서 HLA 및/또는 TCR 유전자, 및/또는 본원에 기재된 억제 분자 (예를 들어, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 및 TGFR 베타)를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제를 지칭한다.
- [0217] TALEN 및 그의 용도는, 예를 들어 그 전문이 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 659-665에 기재되어 있다.
- [0218] HLA 및/또는 TCR을 억제하는 아연 핑거 뉴클레아제
- [0219] "ZFN" 또는 "아연 핑거 뉴클레아제" 또는 "HLA 및/또는 TCR에 대한 ZFN" 또는 "HLA 및/또는 TCR을 억제하는 ZFN"은 세포, 예를 들어 T 세포에서 HLA 및/또는 TCR 유전자, 및/또는 본원에 기재된 억제 분자 (예를 들어, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 및 TGFR 베타)를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 아연 핑거 뉴클레아제를 지칭한다.
- [0220] ZFN 및 그의 용도는, 예를 들어 그 전문이 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 666-671에 기재되어 있다.
- [0221] 텔로머라제 발현
- [0222] 텔로미어는 체세포 지속성에서 중요한 역할을 하고, 그의 길이는 텔로머라제 (TERT)에 의해 유지된다. CLL 세포에서 텔로미어 길이는 매우 짧을 수 있고 (Roth et al., "Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38 chronic lymphocytic leukaemia" British Journal of Haematology, 143, 383-386., August 28 2008), 제조된 CAR-발현 세포, 예를 들어 CART19 세포에서 심지어 더 짧을 수 있어서 환자에 의 입양 전달 후에 그의 확장 잠재력을 제한할 수 있다. 텔로머라제 발현은 복제 소진으로부터 CAR-발현 세포를 구출할 수 있다.
- [0223] 어떠한 특정한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 일부 실시양태에서, 치료 T 세포는 T 세포의 단축된 텔로미어로 인해 환자에서 단기 지속성을 갖고; 따라서, 텔로머라제 유전자에 의한 형질감염은 T 세포의 텔로미어를 늘리고 환자에서의 T 세포의 지속성을 개선시킬 수 있다. 문헌 [Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007)]을 참조한다. 따라서, 한 실시양태에서, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포는 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 텔로머라제의 촉매 서브유닛, 예를 들어 TERT, 예를 들어 hTERT를 이소적으로 발현한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 세포를 텔로머라제 서브유닛, 예를 들어 텔로머라제의 촉매 서브유닛, 예를 들어 TERT, 예를 들어 hTERT를 코딩하는 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, CAR-발현 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 세포는 CAR을 코딩하는 구축물과의 접촉 전에, 그와 동시에, 또는 그 후에 핵산과 접촉될 수 있다.
- [0224] 텔로머라제 발현은 안정할 수 있거나 (예를 들어, 핵산이 세포의 게놈 내로 통합할 수 있음) 또는 일시적일 수

있다 (예를 들어, 핵산이 통합하지 않고, 소정의 시간, 예를 들어 수일 후에 발현이 저하됨). 안정한 발현은 텔로머라제 서브유닛 및 선택 마커를 코딩하는 DNA로 세포를 형질감염시키거나 형질도입하고, 안정한 통합물을 선택함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로 또는 조합하여, 안정한 발현은, 예를 들어 Cre/Lox 또는 FLP/FRT 시스템을 사용한 부위-특이적 재조합에 의해 달성될 수 있다.

[0225] 일시적 발현은 핵산, 예를 들어 DNA 또는 RNA 예컨대 mRNA에 의한 형질감염 또는 형질도입을 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, 일시적 mRNA 형질감염은 유전적 불안정성을 회피하고 때때로 TERT에 의한 안정한 형질감염과 연관된다. 외인성 텔로머라제 활성의 일시적 발현은, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 국제 출원 WO2014/130909에 기재되어 있다. 실시양태에서, 텔로머라제 서브유닛의 mRNA-기반 형질감염은 모더나 테라퓨틱스(Moderna Therapeutics)에 의해 상업화된 메신저 RNA 테라퓨틱스(messenger RNA Therapeutics)TM 플랫폼에 따라 수행된다. 예를 들어, 방법은 미국 특허 번호 8710200, 8822663, 8680069, 8754062, 8664194, 또는 8680069에 기재된 방법일 수 있다.

[0226] 한 실시양태에서, hTERT는 진뱅크 단백질 ID AAC51724.1의 아미노산 서열을 갖는다 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795):

```
MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDP
AAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFA
LLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGGDDVLVHLLARCALFV
LVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCEAWNHSVREAGVPLGLPA
PGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPA
RPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLLYS
SGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRRLPRLPQRYWQMRPL
FLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRLVQ
LLRQHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQEL
TWKMSVRGCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWMVSVVVELLRSEFFYVTET
TFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFI
PKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNYERARRPGLLGASVLG
LDDIHRWRTFVLRVRAQDPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYC
VRRYAVVQKAAHGHRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVIEQSSSL
NEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPOGSILSTLLCSLCYGDMENKLFAG
IRRDLGLLRLLVDDFLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFPVEDEAL
GGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRR
KLFGLVRLRKCHSLFDLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPT
FFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVT
YVPLLGSRLTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD
(SEQ ID NO: 108)
```

[0227]

[0228] 한 실시양태에서, hTERT는 서열식별번호: 108의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 갖는다. 한 실시양태에서, hTERT는 서열식별번호: 108의 서열을 갖는다. 한 실시양태에서, hTERT는 N-말단, C-말단, 또는 둘 다에서 (예를 들어, 5, 10, 15, 20, 또는 30개 이하의 아미노산의) 결실을 포함한다. 한 실시양태에서, hTERT는 N-말단, C-말단, 또는 둘 다에서 (예를 들어, 5, 10, 15, 20, 또는 30개 이하의 아미노산의) 트랜스제닉 아미노산 서열을 포함한다.

[0229] 한 실시양태에서, hTERT는 진뱅크 수탁 번호 AF018167의 핵산 서열에 의해 코딩된다 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and

during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795):

```

1  caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc
61  cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct cctgctgctg cagccactac cgcgaggtgc
121  tgccgctggc cagcttctgt cggcgccctg ggccccaggg ctggcgctgt gtgcagcgcg
181  gggaccgccg ggttttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgctgt ccttgggacg
241  cagcgccgcc ccgcgcgcgc cctccttccc gccaggtgtc ctgctgtaag gagctggtgt
301  cccgagtgct gcagaggtgt tgccagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggtctcg
361  cgtgctgtag cggggccccc cggggccccc cccagggcct caccaccagc gtgcgcagct
421  acctgcccaa caccgtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc
481  gccgcgtggg cgcagacgtg ctggttcacc tgcctggcag ctgcgcgctc tttgtgctgg
541  tggctccacc ctgcgcctac caggtgtgct ggccgcgctc gtaccagctc ggcgtgcca
601  ctacggcccg gccccgcga cagctagtgt gacccgaag cgtctggga tgccgaacgg
661  cctggaacca tagcgtcagg gaggcggggg tccccctggg cctgccagcc cgggtgcca
721  ggaggcgccg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttggc caagaggccc aggcgtggcg
781  ctgccctcga gccggagcgg acgcccgttg ggcagggttc ctgggccacc cggggcagga
841  cgcgtggacc ggtgacctg ggttctgtgt tgggtgcacc tgccagacc gccgaagaa
901  ccaactcttt ggagggtgct ctctctgcca cgcgccactc caccactacc gtggggcgcc
961  agcaccacgc gggcccccga tccacatcgc ggcaccacgc tccctgggac acgcttgtc
1021  ccccggtgta cgcgcagacc aagcacttcc tctactctc aggcgacaag gagcagctgc
1081  ggccctcctt cctactcagc tctctgaggg ccagcctgac tggcgctcgg aggcctgctg
1141  agaccatctt tctgggttcc aggccttggg tgccagggac tcccccgagg ttgccccgcc
1201  tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgttcttggg gctgcttggg aaccacgcgc
1261  agtgccctta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgtc gcgagctgct gtacccccag
1321  cagcccggtg ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggcggccccc gaggaggagg
1381  acacagaccg ccgtgcgcctg gtgcagctgc tcccaccaca cagcagcccc tggcaggtgt
1441  acggttctgt cggggcctgc ctgcgcggcg tgggtgcccc aggcctctgg ggtccagggc
1501  acaacgaacg ccgcttctcc aggaacacca agaagtcat ctccctgggg aagcatgcca
1561  agctctcgct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgct gggctgctgt tggctgcca
1621  ggagcccgcc ggttgctgtg gttccggcgg cagagcacgc tctgcgtgag gagatcctgg
1681  ccaagtttct gactggctgt atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg tcttctcttt
1741  atgtcacgga gccacacgtt caaaagaaca ggtcttcttt ctacgggaag agtgtctgga
1801  gcaagttgca aagcatlgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt
1861  cggaagcaga ggtcaggcag catcgggagg ccaggccccc cctgctgacg tccagactcc
1921  gcttcatccc cagcgctgac gggctgcgga cgatttgtga catggactac gtcgtgggag
1981  ccagaacgtt ccgcagagaa aagaggcgcc agcgtctcac ctgcagggtg aaggcactgt
2041  tcagcgtgct caactacgag cgggcgcgcg gcccccgcct cctgggcgcc tctgtgctgg
2101  gctggagca tatccacagg ccctggcgca ccttctgtgt cgtgtgctgg gccagggacc
2161  cgcgcctcga gctgtacttt gtcaaggttg atgtgacggg cgcgtacgac accatcccc
2221  aggcagggct cagggaggtc atcgccagca tcatcaaac ccagaacacg tactgctgct
2281  gtcggtatgc cgtggtccag aagggccccc atgggcacgt ccgcaaggcc tccaagagcc
2341  acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct caactgcagg
2401  agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctccctccct aatgaggcca
2461  gcagtggcct cttgcagctc ttctacgctc tcatgtgcca ccacgcctgt cgcacagggg
2521  gcaagtccta cgtccagctg caggggatcc cgcagggtc cactctctcc acgctgctct
2581  gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggagcggg
2641  tgctcctgct tttggtggat gatttcttgt tggtagaccc tccactcacc caccgcaaaa
2701  ccttctcag gaccctggct cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtgggt aacttgcgga
2761  agacagtggt gaacttccct gtagaagacg aggcctggg tggcagggct tttgttcaga
2821  tgccggccca cgcgttattc cctgggtgct gcctgctgct ggatacccg accctggagg
2881  tgacagcgca ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagctct accctcaacc
2941  gcggttcaa ggtcgggagg aacatgcgtc gcaaacctct tggggtcttg cggtgaagt
3001  gtcacagcct gtttctggat ttgcagggtg acagcctcca gacggtgtgc accaacatct
3061  acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctccccattc
3121  atcagcaagt ttggaagaac ccacatttt tccctgcgct catctetgac acggcctccc
3181  tctgctactc catcctgaaa gccaaagaac cagggatgtc gctgggggcc aaggcgccg
3241  cggccctctc gccctccgag gccgtgcagt ggcgtgtcca ccaagcattc ctgctcaagc
3301  tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tccctgggtc actcaggaca gccacagcg
3361  agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgcctt ggaggccgca gccaccggcg
3421  cactgccctc agactccaag accatcctgg actgatggcc acccgccacc agccaggccg
3481  agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccc ggcctacagt cccagggagg gagggcgggc
3541  ccacacccag gcccgacccg ctgggagctc gaggcctgag tgagtgtttg gccgagggct
3601  gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccgct tgaggcctga cgcagtgctc agccaaggcg
3661  tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttccct tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc
3721  agggccagct tttctcacc aggagcccg cttccactcc ccacatagga atagtcctc
3781  cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgcctcctt tgccttccac cccaccatc
3841  caggtggaga ccttgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaggtgt
3901  gccctgtaca cccgagagga cctgcacct ggaagggggt cctgtgggt caaattgggg
3961  ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagttt tcagttttga aaaaaaaa
4021  aaaaaa

```

(SEQ ID NO: 23)

[0230]

[0231]

한 실시양태에서, hTERT는 서열식별번호: 23의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 갖는 핵산에 의해 코딩된다. 한 실시양태에서, hTERT는 서열식별번호: 23의 핵산에 의해 코딩된다.

[0232]

키메라 항원 수용체 (CAR)

[0233]

본 발명은 면역 이펙터 세포를 암으로 지시하는 1개 이상의 CAR을 함유하도록 조작된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)를 제공한다. 이는 암 연관 항원에 특이적인 CAR 상의 항원 결합 도메인을 통해 달성된다. 본원에 기재된 CAR에 의해 표적화될 수 있는 2 부류의 암 연관 항원 (종양 항원): (1) 암 세포의 표면 상에서 발현된 암 연관 항원; 및 (2) 그 자체가 세포내에 있지만, 이러한 항원의 단편 (펩티드)이 MHC (주요 조직 적합성 복합체)에 의해 암 세포의 표면 상에 제시되는 암 연관 항원이 존재한다.

[0234]

따라서, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 획득되는 면역 이펙터 세포는 하기 암 연관 항원 (종양 항원) 중 1종을 표적화하는 CAR을 함유하도록 조작될 수 있다: CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT,

IL-13Ra2, 메소텔린, IL-11Ra, PSCA, VEGFR2, 루이스Y, CD24, PDGFR-베타, PRSS21, SSEA-4, CD20, 플레이트 수용체 알파, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, 프로스타제, PAP, ELF2M, 에프린 B2, IGF-I 수용체, CAIX, LMP2, gp100, bcr-ab1, 티로시나제, EphA2, 푸코실 GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-아세틸-GD2, 플레이트 수용체 베타, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, 폴리시알산, PLAC1, 글로보H, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, 레구마인, HPV E6,E7, MAGE-A1, MAGE A1, ETV6-AML, 정자 단백질 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-관련 항원 1, p53, p53 돌연변이체, 프로스테인, 서바이빈 및 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전위 절단점, ML-IAP, ERG (TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로겐 수용체, 시클린 B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 장 카르복실 에스테라제, 및 mut hsp70-2.

[0235] 이중특이적 CAR

[0236] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 이중특이적 항체 분자이다. 이중특이적 항체는 2개 이하의 항원에 대해 특이성을 갖는다. 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제1 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제2 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 동일한 항원, 예를 들어 동일한 단백질 (또는 다량체 단백질의 서브유닛) 상에 존재한다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩된다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩되지 않는다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 상이한 항원, 예를 들어 상이한 단백질 (또는 다량체 단백질의 상이한 서브유닛) 상에 존재한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 절반 항체 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 절반 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 절반 항체 또는 그의 단편, 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 절반 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 scFv 또는 그의 단편, 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 scFv 또는 그의 단편을 포함한다.

[0237] 특정 실시양태에서, 항체 분자는 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적 또는 삼중특이적) 항체 분자이다. 이중특이적 또는 이중이량체 항체 분자를 생성하기 위한 프로토콜, 및 이중특이적 항체 분자에 대한 다양한 형상은, 예를 들어 그 전문이 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 W02015/142675의 단락 455-458에 기재되어 있다.

[0238] 한 측면에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열, 예를 들어 CD19에 대한 결합 특이성을 갖는, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 scFv를 포함하거나, 또는 본원에 기재된 scFv로부터의 경쇄 CDR 및/또는 중쇄 CDR을 포함하는 scFv, 및 상이한 항원 상의 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제2 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열을 특징으로 한다.

[0239] 키메라 TCR

[0240] 한 측면에서, 본 발명의 항체 및 항체 단편 (예를 들어, CD19 항체 및 단편)은 T 세포 수용체 ("TCR") 쇠, 예를 들어 TCR 알파 쇠 또는 TCR 베타 쇠의 1개 이상의 불변 도메인에 그래프팅되어 키메라 TCR을 생성할 수 있다. 이론에 얽매는 것은 아니지만, 키메라 TCR은 항원 결합 시 TCR 복합체를 통해 신호를 전달할 것으로 여겨진다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 scFv는 TCR 쇠, 예를 들어 TCR 알파 쇠 및/또는 TCR 베�타 쇠의 불변 도메인, 예를 들어 세포의 불변 도메인의 적어도 일부, 막횡단 도메인 및 세포질 도메인에 그래프팅될 수 있다. 또 다른 예로서, 항체 단편, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 VL 도메인은 TCR 알파 쇠의 불변 도메인에 그래프팅될 수 있고, 항체 단편, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 VH 도메인은 TCR 베타 쇠의 불변 도메인에 그래프팅될 수 있다 (또는 대안적으로, VL 도메인은 TCR 베타 쇠의 불변 도메인에 그래프팅될 수 있고, VH 도메인은 TCR 알파 쇠에 그래프팅될 수 있음). 또 다른 예로서, 항체 또는 항체 단편의 CDR은 TCR 알파 및/또는 베타 쇠에 그래프팅되어 키메라 TCR을 생성할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 LCDR은 TCR 알파 쇠의 가변 도메인에 그래프팅될 수 있고, 본원에 개시된 HCDR은 TCR 베타 쇠의 가변 도메인에 그래프팅될 수 있거나, 또는 그 반대이다. 이러한 키메라 TCR은, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Willemssen RA et al., Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al., Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al., Gene Ther. 2012 Apr;19(4):365-74]).

- [0241] 비-항체 스캐폴드
- [0242] 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 비 항체 스캐폴드, 예를 들어 피브로넥틴, 안키린, 도메인 항체, 리포칼린, 소형 모듈 면역제약, 맥시바디, 단백질 A 또는 아필린을 포함한다. 비 항체 스캐폴드는 세포 상의 표적 항원에 결합하는 능력을 갖는다. 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 세포 상에 발현된 자연 발생 단백질의 폴리펩티드 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 비-항체 스캐폴드를 포함한다. 생성된 폴리펩티드가 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 1개의 결합 영역을 포함하는 한, 매우 다양한 비-항체 스캐폴드가 사용될 수 있다.
- [0243] 비-항체 스캐폴드는 피브로넥틴 (노파르티스(Novartis), 매사추세츠주), 안키린 (몰레큘라 파트너스 아게(Molecular Partners AG), 스위스 취리히), 도메인 항체 (도만티스, 리미티드(Domantis, Ltd.), 매사추세츠주 캠브리지 및 아블링스 엔브이(Ablynx nv), 벨기에 츠뮈나아르드), 리포칼린 (피에리스 프로테오랩 아게(Pieris Proteolab AG), 독일 프라이징), 소형 모듈 면역제약 (트루비온 파마슈티칼스 인크.(Trubion Pharmaceuticals Inc.), 워싱턴주 시애틀), 맥시바디 (아비디아, 인크.(Avidia, Inc.), 캘리포니아주 마운틴 뷰), 단백질 A (아피바디 아게(Affibody AG), 스웨덴), 및 아필린 (감마-결정질 또는 유비퀴틴) (실 프로테인스 게엠베하(Scil Proteins GmbH), 독일 할레)을 포함한다.
- [0244] 한 실시양태에서 항원 결합 도메인은 표적 세포의 표면 상의 대응리간드에 결합하는 분자의 세포외 도메인, 또는 그의 대응-리간드 결합 단편을 포함한다.
- [0245] 면역 이펙터 세포는 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 DNA 구축물을 포함할 수 있으며, 여기서 CAR은 종양 항원, 예를 들어 본원에 기재된 종양 항원 및 세포내 신호전달 도메인에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편, TCR 또는 TCR 단편)을 포함한다. 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 신호전달 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 제타 체를 포함할 수 있다. 다른 곳에 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 방법은 예를 들어 T 조절-고갈된 세포의 집단으로부터의 세포를 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산으로 형질도입하는 것을 포함할 수 있다.
- [0246] 구체적 측면에서, CAR은 scFv 도메인을 포함하며, 여기서 scFv는 서열식별번호: 1에 제공된 바와 같은 임의적인 리더 서열이 선행하고, 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 36 또는 서열식별번호: 38에 제공된 바와 같은 임의적인 힌지 서열, 서열식별번호: 6에 제공된 바와 같은 막횡단 영역, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 16을 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 서열식별번호: 9 또는 서열식별번호: 10을 포함하는 CD3 제타 서열이 이어질 수 있으며, 예를 들어 여기서 도메인은 인접하거나 동일한 리딩 프레임 내에 존재하여 단일 융합 단백질을 형성한다.
- [0247] 한 측면에서, 예시적인 CAR 구축물은 임의적인 리더 서열 (예를 들어, 본원에 기재된 리더 서열), 세포외 항원 결합 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 항원 결합 도메인), 힌지 (예를 들어, 본원에 기재된 힌지 영역), 막횡단 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 막횡단 도메인), 및 세포내 자극 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 세포내 자극 도메인)을 포함한다. 한 측면에서, 예시적인 CAR 구축물은 임의적인 리더 서열 (예를 들어, 본원에 기재된 리더 서열), 세포외 항원 결합 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 항원 결합 도메인), 힌지 (예를 들어, 본원에 기재된 힌지 영역), 막횡단 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 막횡단 도메인), 세포내 공동자극 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 공동자극 신호전달 도메인) 및/또는 세포내 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 1차 신호전달 도메인)을 포함한다.
- [0248] 예시적인 리더 서열은 서열식별번호: 1로서 제공된다. 예시적인 힌지/스페이서 서열은 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 36 또는 서열식별번호: 38로서 제공된다. 예시적인 막횡단 도메인 서열은 서열식별번호: 6으로서 제공된다. 4-1BB 단백질의 세포내 신호전달 도메인의 예시적인 서열은 서열식별번호: 7로서 제공된다. CD27의 세포내 신호전달 도메인의 예시적인 서열은 서열식별번호: 16으로서 제공된다. 예시적인 CD3제타 도메인 서열은 서열식별번호: 9 또는 서열식별번호: 10으로서 제공된다.
- [0249] 한 측면에서, 면역 이펙터 세포는 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 핵산 구축물을 포함하며, 여기서 핵산 분자는 항원 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 서열은 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열과 인접하고 동일한 리딩 프레임 내에 존재한다. CAR에 사용될 수 있는 예시적인 세포내 신호전달 도메인은, 예를 들어 CD3-제타, CD28, CD27, 4-1BB 등의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, CAR은 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

- [0250] 목적하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 관련 기술분야에 공지된 재조합 방법을 사용하여, 예컨대 예를 들어 핵산 분자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝함으로써, 이를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 핵산 분자를 유도함으로써, 또는 표준 기술을 사용하여 이를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 취득될 수 있다. 대안적으로, 관심 핵산은 클로닝하기 보다는 합성적으로 생산될 수 있다.
- [0251] CAR을 코딩하는 핵산은 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 구축물을 사용하여 면역 이펙터 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0252] CAR을 코딩하는 핵산은 또한 예를 들어 세포 내로 직접적으로 형질감염될 수 있는 RNA 구축물을 사용하여 면역 이펙터 세포 내로 도입될 수 있다. 형질감염에 사용하기 위한 mRNA를 생성하는 방법은 특수하게 설계된 프라이머를 사용한 주형의 시험관내 전사 (IVT)에 이은 폴리A 첨가를 수반하며, 이는 3' 및 5' 비번역 서열 ("UTR") (예를 들어, 본원에 기재된 3' 및/또는 5' UTR), 5' 캡 (예를 들어, 본원에 기재된 5' 캡) 및/또는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) (예를 들어, 본원에 기재된 IRES), 발현시킬 핵산, 및 폴리A 테일을 함유하는, 전형적으로 50-2000개 염기 길이의 구축물 (예를 들어, 실시예에 기재됨, 예를 들어 서열식별번호: 35)을 생산한다. 이와 같이 생산된 RNA는 상이한 유형의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 주형은 CAR에 대한 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, RNA CAR 벡터는 전기천공에 의해 세포, 예를 들어 T 세포 내로 형질 도입된다.
- [0253] 항원 결합 도메인
- [0254] 한 측면에서, 복수의 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 조절-고갈된 세포의 집단은 달리 항원 결합 도메인으로 지칭되는 표적-특이적 결합 요소를 포함하는 CAR을 코딩하는 핵산을 포함한다. 결합 요소의 선택은 표적 세포의 표면을 정의하는 리간드의 유형 및 수에 의존한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 특정한 질환 상태와 연관된 표적 세포 상에서 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 CAR에서 항원 결합 도메인에 대한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예는 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염, 자가면역 질환 및 암 세포와 연관된 것을 포함한다.
- [0255] 한 측면에서, 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR의 부분은 종양 항원, 예를 들어 본원에 기재된 종양 항원을 표적화하는 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0256] 항원 결합 도메인은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 재조합 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 및 단일-도메인 항체, 예컨대 중쇄 가변 도메인 (VH), 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 낙타류 유래 나노바디의 가변 도메인 (VHH)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 그의 기능적 단편, 및 항원 결합 도메인으로 기능하는 것으로 관련 기술분야에 공지된 대안적 스캐폴드, 예컨대 재조합 피브로넥틴 도메인, T 세포 수용체 (TCR), 또는 그의 단편, 예를 들어 단일 쇠 TCR 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 항원에 결합하는 임의의 도메인일 수 있다. 일부 경우에, 항원 결합 도메인은, CAR이 궁극적으로 사용될 종과 동일한 종으로부터 유래되는 것이 유익하다. 예를 들어, 인간에서 사용하기 위해, CAR의 항원 결합 도메인은 항체 또는 항체 단편의 항원 결합 도메인에 대한 인간 또는 인간화 잔기를 포함하는 것이 유익할 수 있다.
- [0257] 한 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항-CD19 항체 또는 그의 단편, 예를 들어 scFv를 포함한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 표 1에 열거된 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함한다. 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 연결하는 링커 서열은, 예를 들어 본원에 기재된 링커 서열 중 임의의 것일 수 있거나, 또는 대안적으로 GSTSGSGKPGSGEGSTKG (서열식별번호: 104)일 수 있다.

[0258] 표 1: 항-CD19 항체 결합 도메인

CD19	huscFv1 (SEQ ID NO: 39)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGGQTKLEIKG GGGSGGGSGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYY CAKHYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS
CD19	huscFv2 (SEQ ID NO: 40)	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprllyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytl t t i s s l p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k g g g g s g g g s g g g g s q v q l q e s g p g l v k p s e t l s l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y q s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s
CD19	huscFv3 (SEQ ID NO: 41)	Qvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y s s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s g g g s g g g s g g g s g g g s e i v m t q s p a t l s l s p g e r a t l s c r a s q d i s k y l n w y q q k p g q a p r l l i y h t s r l h s g i p a r f s g s g s g t d y t l t i s s l q p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k
CD19	huscFv4 (SEQ ID NO: 42)	Qvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y q s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s g g g s g g g s g g g s g g g s e i v m t q s p a t l s l s p g e r a t l s c r a s q d i s k y l n w y q q k p g q a p r l l i y h t s r l h s g i p a r f s g s g s g t d y t l t i s s l q p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k
CD19	huscFv5 (SEQ ID	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprllyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytl t t i s s l p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k g g g g s g g g s g g g g s q v q l q e s g p g l v k p s e t l s l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y s s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y

[0259]

	NO: 43)	wgqgtltvtvss
CD19	huscFv6 (SEQ ID NO: 44)	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprllyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytl t t i s s l p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k g g g g s g g g s g g g g s q v q l q e s g p g l v k p s e t l s l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y q s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s
CD19	huscFv7 (SEQ ID NO: 45)	Qvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y s s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s g g g s g g g s g g g s g g g s e i v m t q s p a t l s l s p g e r a t l s c r a s q d i s k y l n w y q q k p g q a p r l l i y h t s r l h s g i p a r f s g s g s g t d y t l t i s s l q p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k
CD19	huscFv8 (SEQ ID NO: 46)	Qvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y q s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s g g g s g g g s g g g s g g g s e i v m t q s p a t l s l s p g e r a t l s c r a s q d i s k y l n w y q q k p g q a p r l l i y h t s r l h s g i p a r f s g s g s g t d y t l t i s s l q p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k
CD19	huscFv9 (SEQ ID NO: 47)	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprllyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytl t t i s s l p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k g g g g s g g g s g g g g s q v q l q e s g p g l v k p s e t l s l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y n s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s
CD19	Hu scFv10 (SEQ ID NO: 48)	Qvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y n s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s g g g s g g g s g g g s g g g s e i v m t q s p a t l s l s p g e r a t l s c r a s q d i s k y l n w y q q k p g q a p r l l i y h t s r l h s g i p a r f s g s g s g t d y t l t i s s l q p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k
CD19	Hu scFv11 (SEQ ID NO: 49)	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprllyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytl t t i s s l p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k g g g g s g g g s g g g g s q v q l q e s g p g l v k p s e t l s l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y n s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s
CD19	Hu scFv12 (SEQ ID NO: 50)	Qvqlqesgpglvkpsetls l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y y n s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t l v t v s s g g g s g g g s g g g s g g g s e i v m t q s p a t l s l s p g e r a t l s c r a s q d i s k y l n w y q q k p g q a p r l l i y h t s r l h s g i p a r f s g s g s g t d y t l t i s s l q p e d f a v y f c q q g n t l p y t f g g q t k l e i k
CD19	muCTL0 19 (SEQ ID NO: 51)	Diqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvp srfsqsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlp y t f g g q t k l e i t g g g s g g g s g g g g s e v k l q e s g p g l v a p s q s l s v t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p r k g l e w l g v i w g s e t t y y n s a l k s r l t i i k d n s k s q v f l k m n s l q t d d t a i y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g q t s v t v s s

[0260]

[0261] 표 2: 추가의 항-CD19 항체 결합 도메인

항체	VH 서열	VL 서열
SSJ25-C1	QVQLLESQAEIVRPGSSVKISKASGYAFSS YWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNG KFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAV YSCARKTISSVDFYFDYWGQGTITV (SEQ ID NO: 3)	ELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSG TDFTLTITNVQSKDLADYFYFCQYNRYPYTSGGG TKLEIKRRS (SEQ ID NO: 4)

[0262]

[0263]

임의의 CD19 CAR, 예를 들어 임의의 공지된 CD19 CAR의 CD19 항원 결합 도메인은 본 개시내용에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어, LG-740; CD19 CAR이 미국 특허 번호 8,399,645; 미국 특허 번호 7,446,190; 문헌 [Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2):255-260(2012); Cruz et al., Blood 122(17):2965-2973 (2013); Brentjens et al., Blood, 118(18):4817-4828 (2011); Kochenderfer et al., Blood 116(20):4099-102 (2010); Kochenderfer et al., Blood 122 (25):4129-39(2013); 및 16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10]에 기재되어 있다.

[0264]

CAR-발현 세포를 사용하여 표적화될 수 있는 예시적인 표적 항원은, 예를 들어 각각의 전문이 본원에 참조로 포함되는 WO 2014/130635, WO 2014/130657, 및 WO 2015/090230에 기재된 바와 같은, 특히 CD19, CD123, EGFRvIII, 메소텔린을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0265]

한 실시양태에서, CD19에 특이적으로 결합하는 CAR T 세포는 USAN 명칭 티사젠렉류셀-T를 갖는다. CTL019는 EF-1 알과 프로모터의 제어 하에 CTL019 트랜스진을 함유하는 자기-불활성화, 복제 결핍 렌티바이러스 (LV) 벡터에 의한 형질도입을 통한 안정한 삽입에 의해 매개되는, T 세포의 유전자 변형에 의해 제조된다. CTL019는 퍼센트 트랜스진 양성 T 세포에 기초하여 대상체에게 전달된 트랜스진 양성 및 음성 T 세포의 혼합물일 수 있다.

[0266]

다른 실시양태에서, CAR-발현 세포는 인간 CD19에 특이적으로 결합할 수 있고, 예를 들어 본원에 참조로 포함되는 WO2014/153270의 표 3에 따른 CAR 분자 또는 항원 결합 도메인 (예를 들어, 인간화 항원 결합 도메인)을 포함할 수 있다.

[0267]

다른 실시양태에서, CAR-발현 세포는 CD123에 특이적으로 결합할 수 있고, 예를 들어 본원에 참조로 포함되는 WO 2014/130635의 표 1-2에 따른 CAR 분자 (예를 들어, CAR1-CAR8 중 임의의 것), 또는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0268]

다른 실시양태에서, CAR-발현 세포는 EGFRvIII에 특이적으로 결합할 수 있고, 예를 들어 본원에 참조로 포함되는 WO 2014/130657의 표 2 또는 서열식별번호: 11에 따른 CAR 분자 또는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0269]

다른 실시양태에서, CAR-발현 세포는 메소텔린에 특이적으로 결합할 수 있고, 예를 들어 본원에 참조로 포함되는 WO 2015/090230의 표 2-3에 따른 CAR 분자 또는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0270]

한 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 상기 열거된 항체로부터의 1, 2, 3 (예를 들어, 모든 3)개의 중쇄 CDR, HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3 및/또는 상기 열거된 항체로부터의 1, 2, 3 (예를 들어, 모든 3)개의 경쇄 CDR, LC CDR1, LC CDR2 및 LC CDR3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 상기 열거되거나 기재된 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함한다.

[0271]

일부 실시양태에서, 종양 항원은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675에 기재된 종양 항원이다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (CD2 하위세트 1, CRACC, SLAMP7, CD319, 및 19A24로도 지칭됨); C-유형 렉틴-유사 분자-1 (CLL-1 또는 CLECL1); CD33; 표피 성장 인자 수용체 변이체 III (EGFRvIII); 강글리오시드 G2 (GD2); 강글리오시드 GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bdGalp(1-4)bdGlc(1-1)Cer); TNF 수용체 패밀리를 구성원 B 세포 성숙 (BCMA); Tn 항원 ((Tn Ag) 또는 (GalNAc α-Ser/Thr)); 전립선-특이적 막 항원 (PSMA); 수용체 티로신 키나제-유사 고아 수용체 1 (ROR1); Fms-유사 티로신 키나제 3 (FLT3); 종양-연관 당단백질 72 (TAG72); CD38; CD44v6; 암배아성 항원 (CEA); 상피 세포 부착 분자 (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2

(IL-13Ra2 또는 CD213A2); 메소텔린; 인터류킨 11 수용체 알파 (IL-11Ra); 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA); 프로테아제 세린 21 (테스티신 또는 PRSS21); 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (VEGFR2); 루이스(Y) 항원; CD24; 혈소판-유래 성장 인자 수용체 베타 (PDGFR-베타); 스테이지-특이적 배아 항원-4 (SSEA-4); CD20; 플레이트 수용체 알파; 수용체 티로신-단백질 키나제 ERBB2 (Her2/neu); 뮤신 1, 세포 표면 연관 (MUC1); 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); 신경 세포 부착 분자 (NCAM); 프로스타제; 전립선 산 포스포타제 (PAP); 신장 인자 2 돌연변이 (ELF2M); 에프린 B2; 섬유모세포 활성화 단백질 알파 (FAP); 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체 (IGF-I 수용체), 탄산 안하이드라제 IX (CAIX); 프로테아솜 (프로솜(Prosome), 마크로파인(Macropain)) 서브유닛, 베타 유형, 9 (LMP2); 당단백질 100 (gp100); 절단점 클러스터 영역 (BCR) 및 아벨슨 뮤린 백혈병 바이러스 종양유전자 상동체 1 (Ab1)로 이루어진 종양유전자 융합 단백질 (bcr-abl); 티로시나제; 에프린 유형-A 수용체 2 (EphA2); 푸코실 GM1; 시알릴 루이스 부착 분자 (sLe); 강글리오시드 GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer); 트랜스글루타미나제 5 (TGS5); 고분자량-흑색종-연관 항원 (HMMWAA); o-아세틸-GD2 강글리오시드 (OAcGD2); 플레이트 수용체 베타; 종양 내피 마커 1 (TEM1/CD248); 종양 내피 마커 7-관련 (TEM7R); 클라우딘 6 (CLDN6); 갑상선 자극 호르몬 수용체 (TSHR); G 단백질-커플링된 수용체 부류 C군 5, 구성원 D (GPRC5D); 염색체 X 오픈 리딩 프레임 61 (CXORF61); CD97; CD179a; 역형성 림프종 키나제 (ALK); 폴리시알산; 태반-특이적 1 (PLAC1); 글로보H 글리코세라미드의 헥사사카라이드 부분 (글로보H); 유선 분화 항원 (NY-BR-1); 우로플라킨 2 (UPK2); A형 간염 바이러스 세포 수용체 1 (HAVCR1); 아드레날린수용체 베타 3 (ADRB3); 패넥신 3 (PANX3); G 단백질-커플링된 수용체 20 (GPR20); 림프구 항원 6 복합체, 유전자좌 K 9 (LY6K); 후각 수용체 51E2 (OR51E2); TCR 감마 대안적 리딩 프레임 단백질 (TARP); 윌름스 종양 단백질 (WT1); 암/고환 항원 1 (NY-ESO-1); 암/고환 항원 2 (LAGE-1a); 흑색종-연관 항원 1 (MAGE-A1); 염색체 12p에 위치한 ETS 전위-변이체 유전자 6 (ETV6-AML); 정자 단백질 17 (SPA17); X 항원 패밀리, 구성원 1A (XAGE1); 안지오펜이테틴-결합 세포 표면 수용체 2 (Tie 2); 흑색종 암 고환 항원-1 (MAD-CT-1); 흑색종 암 고환 항원-2 (MAD-CT-2); Fos-관련 항원 1; 종양 단백질 p53 (p53); p53 돌연변이체; 프로스테인; 서바이빙; 텔로머라제; 전립선 암종 종양 항원-1 (PCTA-1 또는 갈렉틴 8), T 세포 1에 의해 인식되는 흑색종 항원 (멜란A 또는 MART1); 래트 육종 (RAS) 돌연변이체; 인간 텔로머라제 역전사효소 (hTERT); 육종 전위 절단점; 흑색종 아포토시스 억제제 (ML-IAP); ERG (막형단 프로테아제, 세린 2 (TMPRSS2) ETS 융합 유전자); N-아세틸 글루코사미닐-트랜스퍼라제 V (NA17); 쌍형성된 박스 단백질 Pax-3 (PAX3); 안드로겐 수용체; 시클린 B1; v-myc 조류 골수구종증 바이러스 종양유전자 신경모세포종 유래 상동체 (MYCN); Ras 상동체 패밀리 구성원 C (RhoC); 티로시나제-관련 단백질 2 (TRP-2); 시토크롬 P450 1B1 (CYP1B1); CCCTC-결합 인자 (아연 핑거 단백질)-유사 (BORIS 또는 각인된 부위의 조절원(Brother of the Regulator of Imprinted Sites)), T 세포 3에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원 (SART3); 쌍형성된 박스 단백질 Pax-5 (PAX5); 프로아크로신 결합 단백질 sp32 (OY-TES1); 림프구-특이적 단백질 티로신 키나제 (LCK); A 키나제 앵커 단백질 4 (AKAP-4); 활막 육종, X 절단점 2 (SSX2); 진행성 당화 최종산물에 대한 수용체 (RAGE-1); 신장 편재 1 (RU1); 신장 편재 2 (RU2); 레구마인; 인간 유두종 바이러스 E6 (HPV E6); 인간 유두종 바이러스 E7 (HPV E7); 장 카르복실 에스테라제; 돌연변이된 열 쇼크 단백질 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 백혈구-연관 이뮤노글로불린-유사 수용체 1 (LAIR1); IgA 수용체의 Fc 단편 (FCAR 또는 CD89); 백혈구 이뮤노글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 구성원 2 (LILRA2); CD300 분자-유사 패밀리 구성원 f (CD300LF); C-유형 렉틴 도메인 패밀리 12 구성원 A (CLEC12A); 골수 기질 세포 항원 2 (BST2); EGF-유사 모듈-함유 뮤신-유사 호르몬 수용체-유사 2 (EMR2); 림프구 항원 75 (LY75); 글리피칸-3 (GPC3); Fc 수용체-유사 5 (FCRL5); 및 이뮤노글로불린 람다-유사 폴리펩티드 1 (IGLL1) 중 1종 이상으로부터 선택된다.

[0272] 한 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 상기 열거된 항체로부터의 1, 2, 3 (예를 들어, 모든 3)개의 중쇄 CDR, HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3 및/또는 상기 열거된 항체로부터의 1, 2, 3 (예를 들어, 모든 3)개의 경쇄 CDR, LC CDR1, LC CDR2 및 LC CDR3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 상기 열거되거나 기재된 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함한다.

[0273] 한 측면에서, 항-종양 항원 결합 도메인은 단편, 예를 들어 단일쇄 가변 단편 (scFv)이다. 한 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-암 연관 항원 결합 도메인은 Fv, Fab, (Fab')₂, 또는 이중-기능적 (예를 들어 이중-특이적) 하이브리드 항체이다 (예를 들어, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). 한 측면에서, 본 발명의 항체 및 그의 단편은 본원에 기재된 바와 같은 암 연관 항원 단백질에 야생형 또는 증진된 친화도로 결합한다.

[0274] 일부 경우에, scFv는 관련 기술분야에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., (1988) Science 242:423-426 및 Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조). scFv 분자는 VH 및 VL 영역을 가요성 폴리펩티드 링커를 사용하여 함께 연결시킴으로써 생성될 수 있다. scFv

분자는 최적 길이 및/또는 아미노산 조성을 갖는 링커 (예를 들어, Ser-Gly 링커)를 포함한다. 링커 길이는 scFv의 가변 영역이 폴딩하고 상호작용하는 방식에 크게 영향을 미칠 수 있다. 실제로, 짧은 폴리펩티드 링커가 사용된 경우에 (예를 들어, 5-10개 아미노산), 쇠내 폴딩이 방지된다. 쇠간 폴딩은 또한 2개의 가변 영역을 함께 모아 기능적 에피토프 결합 부위를 형성하기 위해 필요하다. 링커 배향 및 크기의 예에 대해서는, 예를 들어 본원에 참조로 포함된 문헌 [Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448], 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, 및 PCT 공개 번호 W02006/020258 및 W02007/024715를 참조한다.

[0275] scFv는 그의 VL 및 VH 영역 사이에 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개, 또는 그 초과 아미노산 잔기의 링커를 포함할 수 있다. 링커 서열은 임의의 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 아미노산 글리신 및 세린을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 링커 서열은 글리신 및 세린 반복부의 세트, 예컨대 (Gly₄Ser)_n을 포함하며, 여기서 n은 1 이상의 양의 정수이다 (서열식별번호: 25). 한 실시양태에서, 링커는 (Gly₄Ser)₄ (서열식별번호: 27) 또는 (Gly₄Ser)₃(서열식별번호: 28)일 수 있다. 링커 길이에서의 변동은 활성을 유지 또는 증진시켜 활성 연구에서 뛰어난 효능을 생성할 수 있다.

[0276] 또 다른 측면에서, 항원 결합 도메인은 T 세포 수용체 ("TCR") 또는 그의 단편, 예를 들어 단일 쇠 TCR (scTCR)이다. 이러한 TCR을 제조하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어 문헌 [Willemsen RA et al., Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al., Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al., Gene Ther. 19(4):365-74 (2012)]을 참조한다 (참고문헌은 그 전문이 본원에 포함됨). 예를 들어, 링커 (예를 들어, 가요성 펩티드)에 의해 연결된 T 세포 클론으로부터의 V α 및 V β 유전자를 함유하는 scTCR이 조작될 수 있다. 이러한 접근법은 그 자체는 세포내에 있지만, 이러한 항원의 단편 (펩티드)이 MHC에 의해 암 세포의 표면 상에 제시되는 암 연관 표적에 대해 매우 유용하다.

[0277] 막횡단 도메인

[0278] 막횡단 도메인과 관련하여, 다양한 실시양태에서, CAR은 CAR의 세포외 도메인에 부착된 막횡단 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 막횡단 도메인은 막횡단 영역에 인접한 1개 이상의 추가 아미노산, 예를 들어 막횡단 도메인이 유래된 단백질의 세포외 영역과 회합된 1개 이상의 아미노산 (예를 들어, 세포외 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 최대 15개의 아미노산) 및/또는 막횡단 도메인이 유래된 단백질의 세포내 영역과 회합된 1개 이상의 추가 아미노산 (예를 들어, 세포내 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 최대 15개의 아미노산)을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 CAR의 다른 도메인 중 1개와 회합된 것이다. 일부 경우에, 막횡단 도메인은 이러한 도메인이 동일 또는 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에 결합하는 것을 피하기 위해, 예를 들어 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 선택될 수 있거나 또는 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 CAR-발현 세포의 세포 표면 상의 또 다른 CAR과 동종이량체화가 가능하다. 상이한 측면에서, 막횡단 도메인의 아미노산 서열은 동일한 CART에 존재하는 천연 결합 파트너의 결합 도메인과의 상호작용을 최소화하기 위해 변형되거나 치환될 수 있다.

[0279] 막횡단 도메인은 천연 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우에, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 CAR이 표적에 결합할 때마다 세포내 도메인(들)에 신호전달을 할 수 있다. 본 발명에서 특히 유용한 막횡단 도메인은 적어도 예를 들어 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 쇠, CD28, CD27, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 막횡단 영역(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 적어도, 예를 들어 KIR2DS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C, 또는 CD19의 막횡단 영역(들)을 포함할 수 있다.

[0280] 일부 경우에, 막횡단 도메인은 힌지, 예를 들어 인간 단백질로부터의 힌지를 통해 CAR의 세포외 영역, 예를 들

어 CAR의 항원 결합 도메인에 부착될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지는 인간 Ig (이뮤노글로불린) 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지 또는 CD8a 힌지일 수 있다. 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 그로 이루어진다). 한 측면에서, 막횡단 도메인은 서열식별번호: 6의 막횡단 도메인을 포함한다 (예를 들어, 그로 이루어진다).

[0281] 한 측면에서, 힌지 또는 스페이서는 IgG4 힌지를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 하기 아미노산 서열의 힌지를 포함한다:

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGKM
(SEQ ID NO:36)

[0282]

[0283] 일부 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 하기 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 힌지를 포함한다:

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGG
ACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCACAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA
CCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG
GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
TGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
GGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA
GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:37)

[0284]

[0285] 한 측면에서, 힌지 또는 스페이서는 IgD 힌지를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 하기 아미노산 서열의 힌지를 포함한다:

RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
KTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG
GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQA
PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG
STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH (SEQ ID
NO:38)

[0286]

[0287] 일부 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 하기 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 힌지를 포함한다:

AGGTGGCCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA
GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT
GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA
GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATAACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT
TTCGTCTGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGA
GGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT
CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC
TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG
AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAAGCTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG
ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCC
AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG
CTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC
TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTC
CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACG
TGACTGACCATT (SEQ ID NO:103)

[0288]

[0289] 한 측면에서, 막횡단 도메인은 재조합될 수 있고, 이 경우에 이는 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 우세하게 포함할 것이다. 한 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체가 재조합 막횡단 도메인의 각각의 말단에서 발견될 수 있다.

[0290] 임의로, 2 내지 10개 아미노산 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 CAR의 막횡단 도메인과 세포질 영역 사이에 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중체는 특히 적합한 링커를 제공한다. 예를 들어, 한 측면에서, 링커는 GGGSGGGGS (서열식별번호: 5)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 GGTGGCGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTCC (서열식별번호: 8)의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

[0291] 한 측면에서, 힌지 또는 스페이서는 KIR2DS2 힌지를 포함한다.

[0292] 세포질 도메인

[0293] CAR의 세포질 도메인 또는 영역은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 신호전달 도메인은 일반적으로 CAR이 도입된 면역 세포의 정상 이펙터 기능 중 적어도 1종의 활성화를 담당한다.

[0294] 본원에 기재된 CAR에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 항원 수용체 관여 후에 신호 전달을 개시하기 위해 함께 작용하는 T 세포 수용체 (TCR) 및 보조-수용체의 세포질 서열, 뿐만 아니라 동일한 기능적 능력을 갖는 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 임의의 재조합 서열을 포함한다.

[0295] TCR을 통해 생성된 신호 단독은 T 세포의 완전한 활성화를 위해 불충분하고 2차 및/또는 공동자극 신호가 또한 필요함이 공지되어 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포질 신호전달 서열의 2개의 별개의 부류에 의해 매개된다고 언급될 수 있다: TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것 (1차 세포내 신호전달 도메인) 및 2차 또는 공동자극 신호를 제공하기 위해 항원-비의존성 방식으로 작용하는 것 (2차 세포질 도메인, 예를 들어 공동자극 도메인).

[0296] 1차 신호전달 도메인은 TCR 복합체의 1차 활성화를 자극 방식으로 또는 억제 방식으로 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.

[0297] 본 발명에 특히 유용한 1차 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"으로도 공지됨), FcεRI, DAP10, DAP12 및 CD66d의 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 CD3-

제타, 예를 들어 본원에 기재된 CD3-제타 서열의 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0298] 한 실시양태에서, 1차 신호전달 도메인은 천연 ITAM 도메인과 비교 시 변경된 (예를 들어, 증가된 또는 감소된) 활성을 갖는 변형된 ITAM 도메인, 예를 들어 돌연변이된 ITAM 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 1차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM-함유 1차 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 최적화된 및/또는 말단절단된 ITAM-함유 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 1차 신호전달 도메인은 1, 2, 3 또는 4개 또는 그 초과 ITAM 모티프를 포함한다.

[0299] 공동자극 신호전달 도메인

[0300] CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인을 단독으로 포함할 수 있거나, 또는 본 발명의 CAR과 관련하여 유용한 임의의 다른 목적하는 세포내 신호전달 도메인(들)과 조합될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타쇄 부분 및 공동자극 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 도메인은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다. 한 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, 세포내 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 ICOS의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다.

[0301] 공동자극 분자는 항원 수용체 이외의 세포 표면 분자 또는 림프구의 항원에 대한 효율적인 반응을 위해 필요한 그의 리간드일 수 있다. 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 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다. 예를 들어, CD27 공동자극은 시험관내에서 인간 CART 세포의 확장, 이펙터 기능, 및 생존을 증진시키는 것으로 입증된 바 있고, 생체내에서 인간 T 세포 지속성 및 항종양 활성을 증대시킨다 (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706). 이러한 공동자극 분자의 추가의 예는 CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp30, NKp44, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, NKG2D, NKG2C 및 PAG/Cbp를 포함한다.

[0302] CAR의 세포질 부분 내의 세포내 신호전달 서열은 서로 무작위로 또는 명시된 순서로 연결될 수 있다. 임의로, 예를 들어 2 내지 10개 아미노산 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산) 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 세포내 신호전달 서열 사이에 연결을 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 글리신-세린 이중체가 적합한 링커로서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 단일 아미노산, 예를 들어 알라닌, 글리신이 적합한 링커로서 사용될 수 있다.

[0303] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 공동자극 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 실시양태에서, 2개 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 공동자극 신호전달 도메인은 링커 분자, 예를 들어 본원에 기재된 링커 분자에 의해 분리된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개의 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 분자는 글리신 잔기이다. 일부 실시양태에서, 링커는 알라닌 잔기이다.

[0304] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, 4-1BB의 신호전달 도메인은 서열식별번호: 7의 신호전달 도메인이다. 한 측면에서, CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열식별번호: 9의 신호전달 도메인이다.

[0305] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD27의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, CD27의 신호전달 도메인은 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

[0306] QRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO:16)

[0307] 한 측면에서, CD27의 신호전달 도메인은 하기 핵산 서열에 의해 코딩된다:

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
GCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA
GCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:14)

[0308]

[0309] 한 측면에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 제2 CAR, 예를 들어, 예를 들어 동일한 표적 또는 상이한 표적 (예를 들어, 본원에 기재된 암 연관 항원 또는 본원에 기재된 상이한 암 연관 항원 이외의 표적, 예를 들어 CD19, CD33, CLL-1, CD34, FLT3, 또는 플레이트 수용체 베타)에 대한 상이한 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 CAR을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제2 CAR은 암 연관 항원과 동일한 암 세포 유형 상에서 발현된 표적에 대한 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR-발현 세포는 제1 항원을 표적화하고 공동 자극 신호전달 도메인을 갖지만 1차 신호전달 도메인은 갖지 않는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR, 및 제2의 상이한 항원을 표적화하고 1차 신호전달 도메인을 갖지만 공동자극 신호전달 도메인은 갖지 않는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다. 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 공동자극 신호전달 도메인, 예를 들어 4-1BB, CD28, ICOS, CD27 또는 OX-40을 제1 CAR에, 및 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 CD3 제타를 제2 CAR에 배치하면, CAR 활성을 둘 다의 표적이 발현되는 세포로 제한할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR 발현 세포는 본원에 기재된 표적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 공동자극 도메인을 포함하는 제1 암 연관 항원 CAR, 및 상이한 표적 항원 (예를 들어, 제1 표적 항원과 동일한 암 세포 유형 상에서 발현된 항원)을 표적화하고 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 1차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CAR 발현 세포는 본원에 기재된 표적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 1차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR, 및 제1 표적 항원 이외의 항원 (예를 들어, 제1 표적 항원과 동일한 암 세포 유형 상에서 발현된 항원)을 표적화하고 항원에 대한 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 공동자극 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다.

[0310] 또 다른 측면에서, 개시내용은 CAR-발현 세포, 예를 들어 CART 세포의 집단을 특색으로 한다. 일부 실시양태에서, CAR-발현 세포의 집단은 상이한 CAR을 발현하는 세포의 혼합물을 포함한다.

[0311] 예를 들어, 한 실시양태에서, CART 세포의 집단은 본원에 기재된 암 연관 항원에 대한 항원 결합 도메인 갖는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 상이한 항원 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 상이한 암 연관 항원에 대한 항원 결합 도메인, 예를 들어 제1 세포에 의해 발현된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합되는 암 연관 항원과 상이한 본원에 기재된 암 연관 항원에 대한 항원 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함할 수 있다.

[0312] 또 다른 예로서, CAR-발현 세포의 집단은 본원에 기재된 암 연관 항원에 대한 항원 결합 도메인 포함하는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 본원에 기재된 바와 같은 암 연관 항원 이외의 표적에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR-발현 세포의 집단은 예를 들어 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 2차 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함한다.

[0313] 또 다른 측면에서, 개시내용은 집단 내의 적어도 1종의 세포는 본원에 기재된 암 연관 항원에 대한 항원 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하고, 제2 세포는 또 다른 작용제, 예를 들어 CAR-발현 세포의 활성을 증진시키는 작용제를 발현하는 세포의 집단을 특색으로 한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 작용제는 억제 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 억제 분자, 예를 들어 PD-1은 일부 실시양태에서 면역 이펙터 반응을 일으키는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제 분자의 예는 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3, 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아테노신, 및 TGFR (예를 들어, TGFR베타)을 포함한다. 한 실시양태에서, 억제 분자를 억제하는 작용제는 양성 신호를 세포에 제공하는 제2 폴리펩티드, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인과 회합된 제1 폴리펩티드, 예를 들어 억제 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 예를 들어 억제 분자, 예컨대 PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3, 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TGFR 베타의 제1 폴리펩티드 또는 이들 중 임의의 것의 단편, 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 (예를 들어 본원에 기재된 바와 같은, 예를 들어 41BB, CD27, OX40 또는 CD28) 및/또는 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)을 포함)인 제2 폴리펩티드를 포함한다.

한 실시양태에서, 작용제는 PD-1의 제1 폴리펩티드 또는 그의 단편, 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD28 신호전달 도메인 및/또는 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)의 제2 폴리펩티드를 포함한다.

[0314] 항-CD19 결합 도메인의 서열이 본원에서 표 1에 제공된다. 전체 CAR 구축물은 표 1에 기재된 항원 결합 도메인 중 임의의 것을 하기 제공된 1종 이상의 추가의 CAR 성분과 함께 사용하여 생성될 수 있다.

[0315] • 리더 (아미노산 서열) (서열식별번호: 1)

[0316] MALPVTALLLPLALLLHAARP

[0317] • 리더 (핵산 서열) (서열식별번호: 12)

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATG
CCGCTAGACCC

[0319] • CD8 힌지 (아미노산 서열) (서열식별번호: 2)

[0320] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0321] • CD8 힌지 (핵산 서열) (서열식별번호: 13)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTC
GCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTG
CACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

[0323] • CD8 막횡단 (아미노산 서열) (서열식별번호: 6)

[0324] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0325] • 막횡단 (핵산 서열) (서열식별번호: 17)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC
TGGTTATCACCTTTACTGC

[0327] • 4-1BB 세포내 도메인 (아미노산 서열) (서열식별번호: 7)

[0328] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0329] • 4-1BB 세포내 도메인 (핵산 서열) (서열식별번호: 18)

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAG
ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAA
GAAGAAGGAGGATGTGAACTG

[0331] • CD3 제타 도메인 (아미노산 서열) (서열식별번호: 9)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

[0333]

- CD3 제타 (핵산 서열) (서열식별번호: 20)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA
GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCC
TGCCCCCTCGC

[0334]

[0335]

- CD3 제타 도메인 (아미노산 서열; NCBI 참조 서열 NM_000734.3) (서열식별번호: 10)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

[0336]

[0337]

- CD3 제타 (핵산 서열; NCBI 참조 서열 NM_000734.3); (서열식별번호: 21)

agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctag
gacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaagccgagaaggaagaacctca
ggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtggatgggatgaaaggcgagcggcgaggggca
agggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaagacacctacgacgccttcacatgcagggcctgccccctgcg

[0338]

[0339]

IgG4 힌지 (아미노산 서열) (서열식별번호: 36)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
KM

[0340]

[0341]

IgG4 힌지 (뉴클레오타이드 서열) (서열식별번호: 37)

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTG
GGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG
CCGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCGAG
GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC
CCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG
CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCC
TGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCC
CCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC
CTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGA
CGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAG
GGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA
GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

[0342]

[0343] EF1 알파 프로모터

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCC
 CCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCG
 CGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG
 GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGG
 TTTGCCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTT
 TACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT
 TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTT
 AAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGC
 CGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTA
 GCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTT
 GTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGG
 CGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCG
 CGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGC
 CTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCTG
 GCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCT
 CAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAA
 GGAAAAGGGCCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGAGTACCGG
 GCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCCTTAGGT
 TGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTG
 AAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGT
 TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCAT
 TTCAGGTGTCGTGA (SEQ ID NO: 11)

[0344]

[0345] Gly/Ser (서열식별번호: 25)

[0346] GGGGS

[0347] Gly/Ser (서열식별번호: 26): 이 서열은 1-6개의 "Gly Gly Gly Gly Ser" 반복 단위를 포괄할 수 있다

[0348] GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS

[0349] Gly/Ser (서열식별번호: 27)

[0350] GGGSGGGGS GGGSGGGGS

[0351] Gly/Ser (서열식별번호: 28)

[0352] GGGSGGGGS GGGGS

[0353] Gly/Ser (서열식별번호: 29)

[0354] GGGGS

[0355] 폴리A (서열식별번호: 30): A5000

[0356] 폴리A (서열식별번호: 31): A100

[0357] 폴리T (서열식별번호: 32): T5000

[0358] 폴리A (서열식별번호: 33): A5000

[0359] 폴리A (서열식별번호: 34): A400

[0360] 폴리A (서열식별번호: 35): A2000

[0361] • Gly/Ser (서열식별번호: 15): 이 서열은 1-10개의 "Gly Gly Gly Ser" 반복 단위를 포괄할 수 있다

[0362] GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS

[0363] 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있는 예시적인 CD19 CAR 구축물이 표 3에 제시된다:

[0364] 표 3: CD19 CAR 구축물

명칭	SEQ ID	서열
CAR 1		
CAR1 scFv 도메인	39	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGGTDTLTITSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTlVTVSS
103101 CAR1 가용성 scFv - nt	52	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgagacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gaggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgactgtactgtgagc ggagtgtctctcccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgtttggggtctgagactacttactactcttcatccc tcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgctgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtactctggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR1 가용성 scFv - aa	64	~~MALPVTALLPLALLHAARP~~ eivmtqspatls slpgeratls crasqdiskylnw yqqkpggqaprrlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqg ntlpytfgggk leikggggsgggsgggsgvqlqesgpglvkps etlsltctvs gvslpdygvswir qppgkglewigviwgsettyssslksrvtiskd nsknqvslk lssvtaadtavyyca khyyyggsyamdywgqgtlvtvss <u>hhhhhhhh</u>
104875 CAR 1 - 전장 - nt	90	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgagacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg

[0365]

		tggcagccggagggtgggtccggcggtgaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaacggggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcacagaccacggggaaggg tctggaatggattggagtgtttggggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtcaacggtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgacccgagccgacacgcggtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgagggccaccccccggctcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatattctacatttggggccctctggctggta cttcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcgatccgggttccagaggaggaggaaggcggtcgcgaac tgcgctgaaattcagccgacgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggcaa gcggaaggagcgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggccaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctc gg
104875 CAR 1 - 전장 - aa	77	MALPVTALLLPLALLHAAReivmtqspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskyl</u><u>nw</u> yqqkpggqaprlliyhtsrlhs<u>giparfsgsgsgtdytl</u>tisslqpedfavfyc<u>qgg</u> <u>ntlpyt</u>fgggtkleikggggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetslslctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslskrtviskdnknqvslklssvtaadvayycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvsssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrrkllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqggnqllynelnlgrreeydvldkrgrdpemgkprprknpqeglynelqkdmaeysei gmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 2		
CAR2 scFv 도메인	40	eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwqqkpggqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavfycqggntlpytfgggtkleikgggsg gggsgggsgvqlqesgpglvkpsetslslctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyyqsslskrtviskdnknqvslklssvtaadvayycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvss
103102 CAR2 - 가용성	53	atggccctccctgtcacgcgcctgctgcttcctgctggtctctctgctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcaccgcgcactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgacagacccccaagacatctcaaaataccttaattgg

[0366]

scFv - nt		tatcaacagaagcccgagcaggtctctgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacctactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctattttctgcagcaagggaaacacctgcacctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcgaggagggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcgaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagggctctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcggtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtagctctggtcaccgtgtccagccaccacatcatcaccatcaccat
103102 CAR2 - 가용성 scFv - aa	65	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> ei vmtqspatls l spgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprl liyhtsrl hsgiparfsgsgsgtdytl ti sslqp edfavyf cqqg ntlpytfgqg tkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswir qppkglew igviwgsettyyqsslk srvtiskdnskngvslk lssvtaadtavvyca khyyyggsyamdywgggtlvtvss <u>hhhhhhhh</u>
104876 CAR 2 - 전장 - nt	91	atggccctcctgtcaccgcctgctgcttcgctggctcttctgctccacgcgcctcgcccgaaattgtgatgaccagtcaccgcctcttagcctttcaccggtagcgcgcaacctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccgagcaggtctctgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacctactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctattttctgcagcaagggaaacacctgcacctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcgaggagggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcgaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagggctctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcggtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtagctctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtcctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggccctctgggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtagactctttactgtaagcgcggtcgaagaaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgcgggttccagaggaggaggaaggcggtcgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaa

[0367]

		cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtagcgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagggccacgacggactgtaccagggaact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104876 CAR 2 - 전장 - aa	78	MALPVTALLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdiskyl</u> nw yqqkpgqaprlliy <u>htsrllhsg</u> iparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfc <u>ggg</u> <u>ntlpyt</u> fgggtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycakhyvyggsyamydgwgggtlvtssttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreedyldkrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 3		
CAR3 scFv 도메인	41	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyyssslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyvyggsyamydgwq gtlvtsvsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskyl nwyyqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleik
103104 CAR 3 - 가용성 scFv - nt	54	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcgagtgatttggggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacggcctgacacggcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgcoatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggtccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggtaccctttcttgtcgggcacacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagccccctaggtcttcttatctacc acacctctcgctcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggttaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR 3 -	66	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta

[0368]

가용성 scFv - aa		vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytltissslqpedfavycqgntlpytfgggtkleik <hu>hhhhhhh</hu>
104877 CAR 3 - 전장 - nt	92	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgacacgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tgattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgtgacacgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgcatggactactg ggggcagggaaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggtccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccgggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagcccttaggcttcttatctacc acacctctcgctgcatagcgggattccgcacgcttttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcccagccatcgctct cagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatctacatttgggccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcacgcttccagaggaggaggaaggcggtgcgaac tgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggaccagaaatggcggaagccgcgcagaaagaatcccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgcccacgaagacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104877 CAR 3 - 전장 - aa	79	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytltissslqpedfavycqgntlpytfgggtkleiktttpprpptpaptias qpplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckgr klllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeysei

[0369]

		gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 4		
CAR4 scFv 도메인	42	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgq gtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpggaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcq qgntlpytfqggtkleik
103106 CAR4 - 가용성 scFv - nt	55	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tgattagacagcctcccgaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaagaatcaagtgaacctcaagctctcatcagtcaccgccgtgacacgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgcatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggtccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggccctaggtcttcttatctacc acacctctcgcctgcatagcgggattcccgacgcttttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggttaacaccctgcccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103106 CAR4 - 가용성 scFv - aa	67	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamdywggtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytlttisslqpedfavyfcqgntlpytfqggtkleik <u>hhhhhhh</u>
104878 CAR 4 - 전장 - nt	93	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tgattagacagcctcccgaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaagaatcaagtgaacctcaagctctcatcagtcaccgccgtgacacgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgcatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggtccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggccctaggtcttcttatctacc

[0370]

		acacctctcgccctgcatagcgggattcccgcacgcttttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgcggtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaaccactactcccgtccaaggccaccacccctgccccgaccatcgccctct cagccgctttccctcgctccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggccctctggtggtgta cttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgccgctgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104878 CAR 4 - 전장 - aa	80	MALPVTALLLPLALLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyyca <hyvyggsyamydgqgtlvtvssggggsgggsgggseivmtqspatls< h=""> lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsg tdytltiisslqpedfavfycggqntlpytfgqgtkleiktttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcclrvkfsrsadapaykqqqn qlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprknpqeglynelqdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</hyvyggsyamydgqgtlvtvssggggsgggsgggseivmtqspatls<>
CAR 5		
CAR5 scFv 도메인	43	eivmtqspatlsfspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggaprlliyhtsrhls giparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavfycggqntlpytfgqgtkleikggggs ggggsgggsgggsgqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyyca hyvyggsyamydgqgtlvtvss
99789 CAR5 - 가용성 scFv - nt	56	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgatcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgctgctgatctaccacaccagccgcct ccacagcggtatccccgccagattttcggggagcgggtctggaaccgactacaccc tcaccatctcttctctgcagcccaggatttcgcgctctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggagggcg

[0371]

		aggatcaggcgggtggcggaagcggagaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctg acttgtaccgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactactt actactcttcatcacttaagtacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgtgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctgggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR5 - 가용성 scFv -aa	68	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> <u>Peivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprllyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsl tctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyssslksrvtiskdnsk qvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgggtlvtvss<u>hhhhhhh</u>
104879 CAR 5 - 전장 - nt	94	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggtcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaagggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggcggaggcgggagccagg tccaactccaagaaagcggacccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccccggtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctgtgtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccacccacccggct cctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttggg cccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttctactcgtgatcactctttac tgtaagcgcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggagg aaggcgggtcggaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaaccagctctacaacgaactcaatcttgggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcggaagccgcgca gaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagatttggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg

[0372]

		actgtaccaggagactcagaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgccgcctcgg
104879 CAR 5 - 전장 - aa	81	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlsispgeratls ~~crasqdiskylnw~~ yqqkpgqaprrlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl ~~tisslqpedfavyfcqqg~~ ~~ntlpytf~~ gqgtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkps ~~etls~~ l tctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyy ~~ssls~~ ksrvtiskd ~~nsk~~ kn qvs ~~lkl~~ ssvtaadtavyyca ~~khyyyggsyamdy~~ wgggtlv ~~tv~~ ss ~~ttt~~ ppaprp ~~tpa~~ ptiasqpsl ~~r~~ peacrpaaggavhtrgl ~~d~~ fadciyiwaplagtcgvll ~~sl~~ vitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvq ~~tt~~ qeedgcs ~~cr~~ fpeeeeggcelrvkfs ~~r~~ sadapay kqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemgkpr ~~r~~ kn ~~np~~ qeglynelqkd ~~k~~ mae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatk ~~tdy~~ dalhm ~~q~~ alppr
CAR 6		
CAR6 scFv 도메인	44	eivmtqspatlsispgeratls ~~crasqdiskylnw~~ yqqkpgqaprrlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl ~~tisslqpedfavyfcqqg~~ ntlpytf ~~gqgt~~ kleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkps ~~etls~~ l tctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyq ~~ssls~~ ksrvtiskd ~~nsk~~ knqvs ~~lkl~~ ssvtaadtavyyca ~~khyyyggsyamdy~~ wgggtlv ~~tv~~ ss
99790 CAR6 - 가용성 scFv - nt	57	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgctcctctcgca ~~ttctt~~ ctccatgcgcctcgccctgagatcg ~~tc~~ atgacccaaagcccgctac ~~cctgt~~ cctctg ~~c~~ accggcgagagaggcaac ~~cctt~~ catgcagggccagccaggacatttctaag ~~tac~~ ctcaactggtatcagcagaagccagggcaggtcctcg ~~cctg~~ ctgatctaccacaccagccgcctccacagcgg ~~tatcccc~~ gccagatttccgggagcgggtctggaaccgactacaccc ~~tc~~ accatctcttctctgcagcccag ~~gattt~~ cgccgtctatttctgcagcaggggaatactctg ~~ccgt~~ acac ~~cttc~~ gggtcaaggtaccaagctggaatcaaggagggcgaggatcaggcgg ~~tggc~~ ggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcaga ~~aac~~ cctctcctctgactgtaccgtgtccggtgtgagcctcccgactacggagtctcttggattcgccagcctccgggaagggtcttgaatggattgggggtatttggggatcagagactacttactaccagtcac ~~tta~~ agtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaaccaagtgtcact ~~ta~~ agctgtcatctgtgaccgcgctgacaccgccgtgtactattgtgcaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ~~ccct~~ ggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99790 CAR6 - 가용성 scFv - aa	69	~~MALPVTALLLPLALLLHAAR~~ Peivmtqspatlsispgeratls ~~crasqdiskylnw~~ yqqkpgqaprrlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl ~~tisslqpedfavyfcqqg~~ ntlpytf ~~gqgt~~ kleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkps ~~etls~~ l tctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyq ~~ssls~~ ksrvtiskd ~~nsk~~ knqvs ~~lkl~~ ssvtaadtavyyca ~~khyyyggsyamdy~~ wgggtlv ~~tv~~ ss ~~hhhhhhhh~~
104880	95	atggccctccctgtcacccgcctgctgcttcctcgctggctcttctgctccacgcgcg

[0373]

CAR6 - 전장 - nt		tcggccccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctccaagacatctcaaaatccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacaccttttgacagggcaccaagctcgagattaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggagggcggaggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgtttggggtctgagactactt actaccaatcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaat cagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccggtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggt cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttggg cccctctggtggtacttgccggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaacgcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgcgggttcccagaggaggagg aaggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcagggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgca gaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggaactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104880 CAR6 - 전장 - aa	82	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc <u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlly <u>htsrllhs</u> giparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfc <u>qgg</u> <u>ntlpyt</u> fgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslp <u>dygvs</u> wirqppgkglewig <u>viwgsettyygsslks</u> rvtiskdnsk qvsllkssvtaadtavyycak <u>hyvyggsyamdy</u> wgqgtlvtvssttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqgnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 7		
CAR7 scFv 도메인	45	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyssslksrvtiskdnskqvsllkssvtaadtavyycakhyvyggsyamdywgq

[0374]

		gtlvtvssggsgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasqd iskylwnyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfa vyfcqqgntlpytfqggtkleik
100796 CAR7 - 가용성 scFv - nt	58	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc cagggcccaagtccagctgcaagagtccaggaccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgaccgtcagcggcggtgcctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctcccggaagggttgatgattggtgtcatctggggttc tgaaaccactactactcatcttccctgaagtcagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgtgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggagggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatgactcagtca ccagccaccctttctctttcacccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtaacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcagccttactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgacctttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgatatttctgccagcagggaataacccttcttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccacccat
100796 CAR7 - 가용성 scFv - aa	70	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdnknqvsklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywggtlvtvssggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylwnyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfqggtkleik <hh<hh<hh<hh<hh< h=""></hh<hh<hh<hh<hh<>
104881 CAR 7 전장 - nt	96	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggetctgctgcttcacgccgc tcgcccaacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggtccggagggtggcgaagcgaaatcgtgatgaccagagc cctgcaaccctgtccctttctcccggaacgggctaccctttcttgcgggcac acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccctta ggcttcttatctaccacacctctgcctgcatagcgggattccgcacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgacctctcatctctccagcccaggga cttcgcgctctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccaccacccctgcc

[0375]

		ccgaccatcgccctctcagccgctttccctgcgtccggagggcatgtagaccgcagc tggtggggccgtgcatacccgggtcttgacttcgcctgcgatctctacatttggg cccctctggctggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcgggtcggaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctac aagcagggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgactgtctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcggaagccgcgca gaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104881 CAR 7 전장 - aa	83	MALPVTALLLPLALLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdsknqvslklssvtaadta vyycahhyvggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlsispgeratlsrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrllhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqggntlpytfgggkcleiktttpaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqggnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemmkgprrrknpgelynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 8		
CAR8 scFv 도메인	46	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqssslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahhyvggsyamdywgq gtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlsrasqd iskylnwyqqkpgqaprllyhtsrllhsgiparfsqsgsgtdytlitisslqpedfa vyfcqggntlpytfgggkcleik
100798 CAR8 - 가용성 scFv - nt	59	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggccccaaagtccagctgcaagagtcaggacccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaaccgtcagcggcggtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaaacctcccggaagggccttgatgattggtgtcatctggggttc tgaaaccacctactaccagtcttccctgaagtcagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggag gatccggtggtggtggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatgactcagtc ccagccaccctttctctttcaccggcgagagagcaacctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc

[0376]

		gctcctgatctaccatacctcacgccttactctggtatccccgctcggttttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgatatttctgccagcagggaataacccttcttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcatcaccac
100798 CAR8 - 가용성 scFv - aa	71	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvs1klssvtaadta vyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylwnyqqkpgqaprlliyhtsr1hsgiparfs gsgsgtdytl1tisslqpedfavyfcqqgnt1pytfqggtkleik <u>hhhhhhh</u>
104882 CAR 8 - 전장 - nt	97	atggctctgcccgtgaccgactcctcctgcccactggctctgctgcttcacgccgc tcgccacacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaggactggagtggatcgagtgatttgggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgaagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggctccggaggcgggtgggtcagaaatcgtgatgaccagagc cctgcaacccctgtcccttctcccggggaacgggctacccttcttgtcgggcatc acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccta ggcttcttatctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggga cttcgcgctctacttctgcccagcagggttaacacccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccaccacccctgcc ccgaccatcgctctcagccgcttccctcgctccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggcgtgcatacccggggtcttgacttcgctcgcatatctacatttggg ccctctggtggtacttgcgggggtcctgctgcttctactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgcccgttccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcagggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgca gaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgcagg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggcctgcccgcctcgg
104882 CAR 8 -	84	MALPVTALLPLALLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp <u>dygvs</u> wirqppgkglewig <u>viwgsettyyqsslks</u> rvtiskdnknqvs1klssvtaadta

[0377]

전장 - aa		vyyca <hu>kyvyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlslspgeratlsc<u>rasqdiskyl</u>nwyqqkpgqaprllyhtsrlhs gsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqgntlpytfgqgtkleiktttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqggnglynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</hu>
CAR 9		
CAR9 scFv 도메인	47	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqgntlpytfgqgtkleikggggs gggsgggsgggsggsgvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789 CAR9 - 가용성 scFv - nt	60	atggccctccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgatcatgacccaaagcccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggaaccccttcatgcaggccagccaggacatttctaagtaacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggtcctcgctgctgatctaccacaccagccgcct ccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacc tcaccatctcttctctgagcccgaggatttcgccgtctatttctgcccagcagggg aatactctgcccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaatcaaggaggcg aggatcaggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttccaa gtcagcttcaagaatcaggacccgacttgtaagccatcagaacccctctccctg acttgtaacctgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggtatcgca gcctccggggaagggtcttgatggattgggggtatttggggatcagagactactt actacaattcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR9 - 가용성 scFv - aa	72	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprllyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqgg ntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsk qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss <hu>hhhhhhh</hu>
105974 CAR 9 - 전장 - nt	98	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaacccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc

[0378]

		tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacaccttttgacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggagaggtgggtccggcgggtggaggaagcggagggcgggtgggagccaggccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgagggcaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggaatgtagaccgcagctgggtggggcgtgcatacccggggtcttgacttcgctcgatatactacatttgggccccctctggctggtaacttgcggggctctgctgtcttctactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggccgtgacagactactcaagaggagacggctgttcatgccgggtcccagaggagggaagggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtagacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaaacccatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgaggccctgcgcctcgg
105974 CAR 9 - 전장 - aa	85	MALPVTALLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlly <u>htsrllhs</u> giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc <u>gggntlpyt</u> fgqgtkleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp <u>dygvswir</u> qppgkglewig <u>viwgsettyynsslks</u> rvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycak <u>hyyyggsyamy</u> wgggtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfdacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrpfeeeeggcclrvkfsrsadapaykqqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR10		
CAR10 scFv 도메인	48	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamywgggtlvtvssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrllhsiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqggntlpytfgqgtkleik
100796	61	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcacgcgc

[0379]

CAR10 - 가용성 scFv - nt		caggccccaagtccagctgcaagagtcaggacccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaaccgtcagcgcggtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaaacctcccggaagggcttgatggattggtgtcatctggggttc tgaaaccacctactacaactcttccctgaagtccagggtgacatcagcaaggata attccaagaaccagggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcgcggtggagggtctggagggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatgactcagtca ccagccaccctttctctttcaccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttttaagtaacctcaactggtatcagcaaaaaccgggagggccctc gcctctgatctaccataacctcagccttactctggtatccccgctcggttttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggaataacccttcttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccacat
100796 CAR10 - 가용성 scFv - aa	73	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgggtlvtvssgggsgggsgggsgggseivmtqs patlsispgeratlsctasqdiskylwnyqkpgqaprllyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavycqqgntlpytfgqgkkleik <u>hhhhhhh</u>
105975 CAR 10 전장 - nt	99	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttcgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgacagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggtcctcgccttctgatctaccacaccagccggtc ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaggtggagg tggcagcgaggagggtgggtccggcggtggaggaagcgaggcggtgggagccagg tccaactccaagaaagcggaaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactg acttgtactgtgagcgagtggtctctctcccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggtctgagactactt actacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat cagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccacccacccgggtc cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggcggtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttggg cccctctggtctggtacttgcggggtctctgctgcttctactcgtgateactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc

[0380]

		tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggtcggaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcagggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105975 CAR 10 전장 - aa	86	MALPVTALLLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNW YQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQG NTLPYTFGQGTGLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR11		
CAR11 scFv 도메인	49	eivmtqspatlspsgeratlsccrasqdiskylnwyqqkpgqaprrliiyhtsrhls giparfsgsgsgtdytltiisslpedfavyfcqqgntlpvtfgqgtkleikggggs ggggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvsllklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvss
103101 CAR11 - 가용성 scFv - nt	62	Atggccctccctgtcaccgcctgtgcttccgctggctcttctgctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcaccgcctcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgagcaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggtc ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgctcagcaagg aacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaagggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggacgggtcttctgtaagccatcagaaactctttcactgacttgactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtatttggggtctgagactacttactacaattcatccc tcaagtacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcgtgtactattgcgctaagcattacta

[0381]

		ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtactctggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR11 - 가용성 scFv - aa	74	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> ei vmtqspatls l s pgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsr l hsgiparfsgsgsgtdytl t i s s l qpedfav y f c q q g ntlpytfgqgk k l e i k g g g s g g g s g g g s q v l q e s g p g l v k p s e t l s l t c t v s g v s l p d y g v s w i r q p p g k l e w i g v i w g s e t t y n s s l k s r v t i s k d n s k n q v s l k l s s v t a a d t a v y y c a k h y y y g g s y a m d y w g g t l v t v s s <u>hhhhhhhh</u>
105976 CAR 11 전장 - nt	100	atggctctgcccgtagccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgacccgtgagcggagtgctccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaggactggagtgatcgagtgatttggggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacgcgcgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggctactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgtggagggtggctccggagggtggcgaagcgaatcgtgatgaccagagc cctgcaacctgtccctttctcccggggaacgggtaccctttctgtcgggcatc acaagatatctaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccta ggcttcttatctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggga cttcgcgctacttcttgccagcagggttaacacctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccacccacctgccc ccgaccatcgctctcagcgcgtttccctgctccggaggcatgtagacccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccccctctggctggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcagggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaaagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgcgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105976 CAR 11 전장 - aa	87	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGVSLP <u>DYGV</u> WIRQPPGKLEWIG <u>VIWGSETTYYNSSLKS</u> RVTIISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYCAK <u>HYYGGGYAMDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSEIVMTQS

[0382]

		PATLSLSLSPGERATLS <u>CRASQDISKYL</u> NWYQKPGQAPRLLIY <u>HTSRLHS</u> GIPARFS GSGSGTDYTLTISLQPEDFAVYFC <u>QQGNTLPYT</u> FGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGGQQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR12		
CAR12 scFv 도메인	50	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgq gtlvtvssggsgsgsgsgsgseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskyl nwyyqkpggqaprllyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcq qgntlpypfsggtkleik
103104 CAR12 - 가용성 scFv - nt	63	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgcccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgctccctcccagactacggagtgagc tggttagacagcctcccgaaaggagtgagtgatcgagtgatttggggttag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacggcgcgtgacacggcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgcatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgttgagggtggtccgaaatcgatgacccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggtaccccttctgtcgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggccctaggtcttctatctacc acacctctcgctgcatacgaggattcccgacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgacctctcatctctccagccgaggacttcgctgctactt ctgccagcagggttaacaccctgcgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR12 - 가용성 scFv -aa	75	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadta vyycahyyyggsyamdywggtlvtvssggsgsgsgsgggseivmtqspatls lspgeratlsctasqdiskylnwyyqkpggqaprllyhtsrlhsgiparfsgsgs tdytltisslqpedfavyfcqgntlpypfsggtkleik <u>hhhhhhh</u>
105977 CAR 12 - 전장 - nt	101	atggccctcctgtcaccgccctgctgcttcgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgacagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagcgggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc

[0383]

		tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacaccctgcccctacacctttggacagggcaccagctcgagattaaaggtggag tggcagcggaggaggtgggtccggcggagggaagccaggtccaactccaagaa gcggaaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttgggctctgagactacttactacaactcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtaactctggtcaccgtgt ccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccgctcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggccctctggtggta cttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcagactactca agaggaggacgggtgttcagccggttccagaggagggaaggcggtgcgaac tgccggtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagAAC cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggaca gcggaaggagcgggacccagaaatggcggaagccgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctc gg
105977 CAR 12 - 전장 - aa	88	MALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAQDISKYLNW YQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGI PARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG NLPLYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTSSTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALFPR
CTL019		
CTL019 - 가용성 scFv-Histag - nt	22	atggccctgcccgtcaccgctctgctgctgccccttgctctgcttcttcatgcagc aaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgcctctcttgag acagggtgaccatttcttgcgcgcagccaggacatcagcaagtatctgaactgg tatcagcagaagccggacggaaccgtagctcctgatctaccatacctctcgct

[0384]

		gcatagcggcggtgccctcacgcttctctggaagcggatcaggaaccgattattctc tcactatttcaaattcttgagcaggaagataattgccacctatttctgccagcagggg aataccctgccctacaccttcggaggagggaccaagctcgaatcacgggtggagg aggcagcggcggtggagggtctggtggagggtggttctgaggtgaagctgcaagaat caggccctggacttgtggcccttcacagtccttgagcgtgacttgaccgtgtcc ggagtctccctgcccactacggagtgtcatggatcagacaacctccacgaaagg actggaatggctcggtgtcatctgggtagcgaaactacttactacaattcagccc tcaaaagcaggctgactattatcaaggacaacagcaagtcccaagtctttcttaag atgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgtgctaagcactacta ctacggaggatcctacgctatggattactggggacaaggtacttccgtcactgtct cttcacaccatcatcaccatcaccatcac
CTL019 - 가용성 scFv-Histag - aa	76	<u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u> diqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgvtvkliiyhtsrllhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevkqlqesgpglvapsqslsvtctvs gvsldpygvswirqprrkglewlgviwgsettyynsalksrliikdnksqvflk mnsldtddtaiyycahyyyggsyamdywgqgtsvtvss <u>hhhhhhhh</u>
CTL019 전장 - nt	102	atggccttaccagtaccgccttgctcctgcccgtggccttgctgctccacgccgc caggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggag acagagtccaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaattgg tatcagcagaaccagatggaactgttaactcctgatctaccatacatcaagatt acactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtggtctggaacagattattctc tcaccattagcaacctggagcaagaagataattgccacttacttttgccaacagggg aatacgttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacagggtggcgg tggtcggggcggtggtgggtcgggtggcgcggtatctgaggtgaaactgcaggagt caggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctca gggggtctcattaccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaaggg tctggagtggctgggagtaatatgggtagtgaaaccacatactataattcagctc tcaaatccagactgacctcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaa atgaacagtctgcaactgatgacacagccatttactactgtgccaacattatta ctacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaaacctcagtcaccgtct cctcaaccacgacgccagcgccgacccaacaaccggcgcccaaccatcgcgctcg cagccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcgcgggggcgcgagtgc cacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctggcgcccttgccggga cttggtgggtccttctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaacggggcaga aagaaactcctgtatataattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactca agaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaac tgagagtgaagttcagcaggagcgacagcggcccgctacaagcaggggccagaac cagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaa

[0385]

		gagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcagg aaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgcagatt gggatgaaagcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtct cagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccctc gc
CTL019 전장 - aa	89	MALPVTALLPLALLHARPdiqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkllyhtsrhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevkqlqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqprrkglewlgviwgsettyynsalksrliikdnksqvfllk mmslqtdtdtaiyycahyyyggsyamywgqgtsvtvsssttpprppptaptias qpplsrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcclrvkfsrsadapaykqqgn qlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CTL019 scFv 도메인	51	diqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwqqkpdgtvkllyhtsrhsg gvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitgggs ggggsggggsevkqlqesgpglvapsqslsvtctvsqslpdygvswirqprrkgle wlgviwgsettyynsalksrliikdnksqvfllkmmslqtdtdtaiyycahyyyg gsyamywgqgtsvtvss

[0386]

[0387]

CAR과 다른 분자 또는 작용제의 공동발현

[0388]

제2 CAR의 공동발현

[0389]

한 측면에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 제2 CAR, 예를 들어 동일한 표적 (예를 들어, CD19) 또는 상이한 표적 (예를 들어, CD19 이외의 표적, 예를 들어 본원에 기재된 표적)에 대한 상이한 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 CAR을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR-발현 세포는 제1 항원을 표적화하고 공동자극 신호전달 도메인을 갖지만 1차 신호전달 도메인은 갖지 않는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR, 및 제2의 상이한 항원을 표적화하고 1차 신호전달 도메인을 갖지만 공동자극 신호전달 도메인은 갖지 않는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다. 공동자극 신호전달 도메인, 예를 들어 4-1BB, CD28, CD27, OX-40 또는 ICOS를 제1 CAR에, 및 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 CD3 제타를 제2 CAR에 배치하면, CAR 활성을 둘 다의 표적이 발현되는 세포로 제한할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR 발현 세포는 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 공동자극 도메인을 포함하는 제1 CAR, 및 또 다른 항원을 표적화하고 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 1차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CAR 발현 세포는 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 1차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CAR, 및 또 다른 항원을 표적화하고 항원에 대한 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 공동자극 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CAR을 포함한다.

[0390]

한 실시양태에서, CAR-발현 세포는 본원에 기재된 XCAR 및 억제 CAR을 포함한다. 한 실시양태에서, 억제 CAR은 암 세포에서는 발견되지 않지만 정상 세포, 예를 들어 X를 또한 발현하는 정상 세포에서 발견되는 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 억제 CAR은 억제 분자의 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 도메인을 포함한다. 예를 들어, 억제 CAR의 세포내 도메인은 PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3, 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 및 TGFR (예를 들어, TGFR베타)의 세포내 도메인일 수 있다.

[0391]

한 실시양태에서, CAR-발현 세포가 2개 이상의 상이한 CAR을 포함하는 경우에, 상이한 CAR의 항원 결합 도메인은 항원 결합 도메인이 서로 상호작용하지 않도록 하는 것일 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 CAR을 발현하는 세포는 제1 CAR의 항원 결합 도메인을, 예를 들어 제2 CAR의 항원 결합 도메인과 회합을 형성하지 않는 단편, 예를 들어 scFv로서 가질 수 있고, 예를 들어 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 VHH이다.

[0392]

일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 그의 상보성 결정 영역이 단일 도메인 폴리펩티드의 일부인 분자를 포함하는 단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자를 포함한다. 예는 중쇄 가변 도메인, 자연적으로 경쇄가 결합된 결합 분자, 통상적인 4-쇄 항체로부터 유래된 단일 도메인, 조작된 도메인 및 항체로부터 유래된 것 이외의 단일 도메인 스캐폴드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. SDAB 분자는 임의의 관련 기술분야의 것, 또는 임의의 향후 단일 도메인 분자일 수 있다. SDAB 분자는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 칠성장어, 어류, 상어, 염소,

토끼, 및 소를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 이 용어는 또한 낙타과 및 상어 이외의 종으로부터의 자연 발생 단일 도메인 항체 분자를 포함한다.

- [0393] 한 측면에서, SDAB 분자는 어류에서 발견된 이뮤노글로불린의, 예컨대 예를 들어 상어의 혈청에서 발견된 신규 항원 수용체 (NAR)로서 공지된 이뮤노글로불린 이소형으로부터 유래된 가변 영역으로부터 유래될 수 있다. NAR의 가변 영역으로부터 유래된 단일 도메인 분자 ("IgNAR")를 생산하는 방법은 WO 03/014161 및 문헌 [Streltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909]에 기재되어 있다.
- [0394] 또 다른 측면에 따르면, SDAB 분자는 경쇄가 결여된 중쇄로서 공지된 자연 발생 단일 도메인 항원 결합 분자이다. 이러한 단일 도메인 분자는 예를 들어 WO 9404678 및 문헌 [Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448]에 개시되어 있다. 명확성을 위해, 자연적으로 경쇄가 결여된 중쇄 분자로부터 유래된 이러한 가변 도메인은 4쇄 이뮤노글로불린의 통상적인 VH와 구별하기 위해 본원에서 VHH 또는 나노바디로 공지된다. 이러한 VHH 분자는 낙타과 종으로부터, 예를 들어 낙타, 라마, 단봉낙타, 알파카 및 구아나코에서 유래될 수 있다. 낙타과 외에도 다른 종이 자연적으로 경쇄가 결여된 중쇄 분자를 생산할 수 있고; 이러한 VHH는 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0395] SDAB 분자는 재조합, CDR-그래프팅, 인간화, 낙타화, 탈-면역화 및/또는 시험관내 생성될 (예를 들어, 파지 디스플레이에 의해 선택될) 수 있다.
- [0396] 또한, 수용체의 항원 결합 도메인 사이의 상호작용은 예를 들어 항원 결합 도메인 중 1종 이상이 그의 동족 항원에 결합하는 능력을 억제하기 때문에, 항원 결합 도메인을 포함하는 복수의 키메라 막 포매된 수용체를 갖는 세포는 바람직하지 않을 수 있는 것으로 밝혀진 바 있다. 따라서, 이러한 상호작용을 최소화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 및 제2 비-자연 발생 키메라 막 포매된 수용체를 갖는 세포가 본원에 개시된다. 또한, 이러한 상호작용을 최소화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 및 제2 비-자연 발생 키메라 막 포매된 수용체를 코딩하는 핵산, 뿐만 아니라 이러한 세포 및 핵산의 제조 및 사용 방법이 본원에 개시된다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 비-자연 발생 키메라 막 포매된 수용체 중 하나의 항원 결합 도메인은 scFv를 포함하고, 다른 것은 단일 VH 도메인, 예를 들어 낙타류, 상어, 또는 칠성장어 단일 VH 도메인, 또는 인간 또는 마우스 서열로부터 유래된 단일 VH 도메인을 포함한다.
- [0397] 일부 실시양태에서, 본원의 조성물은 제1 및 제2 CAR을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 CAR 중 하나의 항원 결합 도메인은 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CAR 중 하나의 항원 결합 도메인은 scFv이고, 다른 것은 scFv가 아니다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CAR 중 하나의 항원 결합 도메인은 단일 VH 도메인, 예를 들어 낙타류, 상어, 또는 칠성장어 단일 VH 도메인, 또는 인간 또는 마우스 서열로부터 유래된 단일 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CAR 중 하나의 항원 결합 도메인은 나노바디를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CAR 중 하나의 항원 결합 도메인은 낙타류 VHH 도메인을 포함한다.
- [0398] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CAR 중 하나의 항원 결합 도메인은 scFv를 포함하고, 다른 것은 단일 VH 도메인, 예를 들어 낙타류, 상어 또는 칠성장어 단일 VH 도메인, 또는 인간 또는 마우스 서열로부터 유래된 단일 VH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CAR 중 하나의 항원 결합 도메인은 scFv를 포함하고, 다른 것은 나노바디를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CAR 중 하나의 항원 결합 도메인은 scFv를 포함하고, 다른 것은 낙타류 VHH 도메인을 포함한다.
- [0399] 일부 실시양태에서, 세포의 표면에 존재할 때, 제1 CAR의 항원 결합 도메인의 그의 동족 항원에 대한 결합은 제2 CAR의 존재에 의해 실질적으로 감소되지 않는다. 일부 실시양태에서, 제2 CAR의 존재 하의 제1 CAR의 항원 결합 도메인의 그의 동족 항원에 대한 결합은 제2 CAR의 부재 하의 제1 CAR의 항원 결합 도메인의 그의 동족 항원에 대한 결합의 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 예를 들어 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다.
- [0400] 일부 실시양태에서, 세포의 표면에 존재할 때, 제1 및 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 둘 다 scFv 항원 결합 도메인인 경우보다 서로 덜 회합한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 둘 다 scFv 항원 결합 도메인인 경우보다 서로 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 덜, 예를 들어 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 덜 회합한다.
- [0401] CAR 활성을 증진시키는 작용제의 공동발현
- [0402] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또 다른 작용제, 예를 들어 CAR-발현 세포의 활성 또는 적합

도를 증진시키는 작용제를 추가로 발현할 수 있다.

[0403] 예를 들어, 한 실시양태에서, 작용제는 T 세포 기능을 조정하거나 조절하는, 예를 들어 억제하는 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포 기능을 조정하거나 조절하는 분자는 억제 분자이다. 억제 분자, 예를 들어 PD1은 일부 실시양태에서 면역 이펙터 반응을 일으키는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 또는 TGFR 베타를 포함한다.

[0404] 실시양태에서, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 작용제, 예를 들어 억제 핵산, 예를 들어 dsRNA, 예를 들어 siRNA 또는 shRNA; 또는 예를 들어, 억제 단백질 또는 시스템, 예를 들어 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (CRISPR), 전사-활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 또는 아연 핑거 엔도뉴클레아제 (ZFN)가 CAR-발현 세포에서 T 세포 기능을 조정하거나 조절하는, 예를 들어 억제하는 분자의 발현을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 작용제는 shRNA, 예를 들어 본원에 기재된 shRNA이다. 한 실시양태에서, T 세포 기능을 조정하거나 조절하는, 예를 들어 억제하는 작용제는 CAR-발현 세포 내에서 억제된다. 예를 들어, T 세포 기능을 조정하거나 조절하는, 예를 들어 억제하는 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자는 CAR의 성분, 예를 들어 모든 성분을 코딩하는 핵산에 연결된다.

[0405] 한 실시양태에서, 억제 분자를 억제하는 작용제는 양성 신호를 세포에 제공하는 제2 폴리펩티드, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인과 회합된 제1 폴리펩티드, 예를 들어 억제 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 예를 들어 억제 분자, 예컨대 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 또는 CD270), KIR, A2aR, MHC 부류 I, MHC 부류 II, GAL9, 아데노신, 또는 TGFR 베타의 제1 폴리펩티드, 또는 이들 중 임의의 것의 단편 (예를 들어, 이들 중 임의의 것의 세포외 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 (예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 예를 들어 41BB, CD27 또는 CD28) 및/또는 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인) 포함)인 제2 폴리펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 PD1의 제1 폴리펩티드 또는 그의 단편 (예를 들어, PD1의 세포외 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD28 신호전달 도메인 및/또는 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)의 제2 폴리펩티드를 포함한다. PD1은 CD28, CTLA-4, ICOS, 및 BTLA를 또한 포함하는 CD28 패밀리의 수용체의 억제 구성원이다. PD-1은 활성화된 B 세포, T 세포 및 골수 세포 상에서 발현된다 (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). PD1에 대한 2개의 리간드, PD-L1 및 PD-L2는 PD1에 결합 시 T 세포 활성화를 하향조절하는 것으로 제시된 바 있다 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1은 인간 암에서 풍부하다 (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). 면역 억제는 PD1과 PD-L1의 국부 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있다.

[0406] 한 실시양태에서, 작용제는 억제 분자의 세포외 도메인 (ECD)을 포함하고, 예를 들어 프로그램화된 사멸 1 (PD1)은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인 예컨대 41BB 및 CD3 제타에 융합될 수 있다 (본원에서 PD1 CAR로도 지칭됨). 한 실시양태에서, PD1 CAR은 본원에 기재된 XCAR과 조합되어 사용되는 경우에, T 세포의 지속성을 개선시킨다. 한 실시양태에서, CAR은 서열식별번호: 105에 밑줄로 표시된 PD1의 세포외 도메인을 포함하는 PD1 CAR이다. 한 실시양태에서, PD1 CAR은 서열식별번호: 105의 아미노산 서열을 포함한다.

Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptsfpallvvtgednatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaaf
pedrsqpgqdcfrvtqlpngrdfhmsvrrrndsrgtlycgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsrpagqfqltyttt
paprptptaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqee
dgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrgrdpemggkprknpqeglynelqkdma
eayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO:105).

[0407]

[0408] 한 실시양태에서, PD1 CAR은 하기 제공된 아미노산 서열 (서열식별번호: 106)을 포함한다.

pgwflsdprpwnpftspallvvtgednatftcsfntsesevlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvtqlp
ngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprpptpaptiasqplslrp
eaacrpaggavhtrglfdacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrpfeeeeggcelrvkf
srSadapaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprknqpqglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdgl
yqglstatkdydalhmqlppr (SEQ ID NO:106).

[0409]

[0410] 한 실시양태에서, 작용제는 PD1 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 PD1 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, PD1 CAR에 대한 핵산 서열이 하기 제시되고, PD1 ECD는 하기 서열식별번호: 107에서 밑줄로 표시된다.

atggccctccctgtcactgcctgtcttccccctgcactcctgtccacgccgctagaccacccggatggtttctgactctc
cggatcgccccgtggaatcccccaaccttctaccggcactcttggtgtgactgaggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctccaa
cacctccgaatcattcgtgctgaactggtagccgatgagccccgtaaacagaccgacaaagctcgcgcgtttccggaagatcggtcgc
aaccgggacagagattgctggttccgcgtgactcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctagggcgaacga
ctccgggacctacgtgctggagccatctcgtggcgcttaaggcccaataaagagagcttgaggccgaactgagagtaccga
gcgcagagctgaggtgccaaactgcacatccatccccatcgccctggcctgaggggcagtttcagaccctggtcacgaccactccggcg
ccgcgcccaccgactccggccccaactatcgcgagccagcccctgtcgtgagggcgaagcatgccgcctgccgcccggaggtgc
tgtgcatacccggggattggacttcgatcgacatctacatttgggctcctctcgccggaacttggcgtgctccttctgtccctgtgcat
cacctgtactgcaagcggggtcgaaaaagcttctgtacatttcaagcagcccttcatgaggcccggtgcaaaccaccaggaggagg
acggttgcctcctccggttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgctgaagttctccggagcgccgacgcccccgct
ataagcaggggcagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcggaagagtacgatgtgctggacaagcggcgccggccg
ggacccccgaatggcggggaagcctagaagaagaaccctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgag
gcctactccgaattgggatgaaggagagcggcgagggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccacca
aggacacatacgcctgcacatgcaggcccttccccctcgc (SEQ ID NO: 107).

[0411]

[0412] 또 다른 예에서, 한 실시양태에서, CAR-발현 세포의 활성을 증진시키는 작용제는 공동자극 분자 또는 공동자극 분자 리간드일 수 있다. 공동자극 분자의 예는 MHC 부류 I 분자, BTLA 및 To11 리간드 수용체, 뿐만 아니라 OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 및 4-1BB (CD137)를 포함한다. 이러한 공동자극 분자의 추가의 예는, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다. 공동자극 분자 리간드의 예는 CD80, CD86, CD40L, ICOSL, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL, 및 LIGHT를 포함한다. 실시양태에서, 공동자극 분자 리간드는 CAR의 공동자극 분자 도메인과 상이한 공동자극 분자에 대한 리간드이다. 실시양태에서, 공동자극 분자 리간드는 CAR의 공동자극 분자 도메인과 동일한 공동자극 분자에 대한 리간드이다. 한 실시양태에서, 공동자극 분자 리간드는 4-1BBL이다. 한 실시양태에서, 공동자극 리간드는 CD80 또는 CD86이다. 한 실시양태에서, 공동자극 분자 리간드는 CD70이다. 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 면역 이펙터 세포는 1종 이상의 추가의 공동자극 분자 또는 공동자극 분자 리간드를 발현하도록 추가로 조작될 수 있다.

[0413]

CAR과 케모카인 수용체의 공동발현

[0414]

실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포, 예를 들어 CD19 CAR-발현 세포는 케모카인 수용체 분자를 추가로 포함한다. T 세포에서 케모카인 수용체 CCR2b 또는 CXCR2의 트랜스제닉 발현은 흑색종 및 신경모세포종을 포함한 CCL2- 또는 CXCL1-분비 고형 종양으로의 트래픽킹을 증진시킨다 (Craddock et al., J Immunother. 2010

Oct; 33(8):780-8 및 Kershaw et al., Hum Gene Ther. 2002 Nov 1; 13(16):1971-80). 따라서, 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 종양, 예를 들어 고형 종양에 의해 분비되는 케모카인을 인식하는 CAR-발현 세포에서 발현된 케모카인 수용체는 CAR-발현 세포가 종양으로 귀속하는 것을 개선시킬 수 있고, CAR-발현 세포가 종양에 침윤하는 것을 용이하게 할 수 있고, CAR-발현 세포의 항종양 효능을 증진시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 케모카인 수용체 분자는 자연 발생 또는 재조합 케모카인 수용체 또는 그의 케모카인-결합 단편을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 CAR-발현 세포 (예를 들어, CAR-Tx)에서의 발현에 적합한 케모카인 수용체 분자는 CXC 케모카인 수용체 (예를 들어, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, 또는 CXCR7), CC 케모카인 수용체 (예를 들어, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, 또는 CCR11), CX3C 케모카인 수용체 (예를 들어, CX3CR1), XC 케모카인 수용체 (예를 들어, XCR1), 또는 그의 케모카인-결합 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR과 함께 발현될 케모카인 수용체 분자는 종양에 의해 분비되는 케모카인(들)에 기초하여 선택된다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 CCR2b 수용체 또는 CXCR2 수용체를 추가로 포함, 예를 들어 발현한다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR 및 케모카인 수용체 분자는 동일한 벡터 상에 존재하거나, 또는 2개의 상이한 벡터 상에 존재한다. 본원에 기재된 CAR 및 케모카인 수용체 분자가 동일한 벡터 상에 존재하는 실시양태에서, CAR 및 케모카인 수용체 분자는 각각 2개의 상이한 프로모터의 제어 하에 있거나, 또는 동일한 프로모터의 제어 하에 있다.

[0415] CAR을 코딩하는 핵산 구축물

[0416] 본 발명은 또한 본원에 기재된 1종 이상의 CAR 구축물을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 제조되는, 면역 이펙터 세포를 제공한다. 한 측면에서, 핵산 분자는 메신저 RNA 전사체로서 제공된다. 한 측면에서, 핵산 분자는 DNA 구축물로서 제공된다.

[0417] 본원에 기재된 핵산 분자는 DNA 분자, RNA 분자, 또는 그의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같은 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA이다. 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 상기 핵산 분자 중 임의의 것을 포함하는 벡터이다.

[0418] 한 측면에서, 본 발명의 CAR의 항원 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 그의 서열이 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 핵산 분자에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 본 발명의 전체 CAR 구축물은 그의 전체 서열이 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 핵산 분자에 의해 코딩된다. 코돈 최적화는 코딩 DNA 내의 동의 코돈 (즉, 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈)의 발생 빈도가 상이한 종에서 편향된다는 발견을 지칭한다. 이러한 코돈 축적성은 동일한 폴리펩티드가 다양한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩될 수 있도록 한다. 다양한 코돈 최적화 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 적어도 미국 특허 번호 5,786,464 및 6,114,148에 개시된 방법을 포함한다.

[0419] 따라서, 한 측면에서, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 면역 이펙터 세포는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 분자를 포함하며, 여기서 CAR은 본원에 기재된 종양 항원에 결합하는 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 막횡단 도메인), 및 자극 도메인, 예를 들어 공동자극 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 공동자극 신호전달 도메인) 및/또는 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 제타 쇄)를 포함하는 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인)을 포함한다.

[0420] 본 발명은 또한 본 발명은 또한 CAR을 코딩하는 핵산 분자, 예를 들어 본원에 기재된 핵산 분자가 삽입된 벡터를 제공한다. 레트로바이러스, 예컨대 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 딸세포에서 트랜스진의 장기간의 안정한 통합 및 그의 증식을 가능하게 하기 때문에 장기간의 유전자 전달을 달성하기 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 비-증식 세포, 예컨대 간세포를 형질도입할 수 있다는 점에서 종양-레트로바이러스, 예컨대 무린 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 추가의 이점을 갖는다. 이는 또한 낮은 면역원성의 추가의 이점을 갖는다. 레트로바이러스 벡터는 또한, 예를 들어 감마레트로바이러스 벡터일 수 있다. 감마레트로바이러스 벡터는, 예를 들어 프로모터, 패키징 신호 (Ψ), 프라이머 결합 부위 (PBS), 1개 이상 (예를 들어, 2개)의 긴 말단 반복부 (LTR), 및 관심 트랜스진, 예를 들어 CAR을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 감마레트로바이러스 벡터는 바이러스 구조 유전자, 예컨대 gag, pol, 및 env가 결합되어 있을 수 있다. 예시적인 감마레트로바이러스 벡터는 무린 백혈병 바이러스 (MLV), 비장-초점 형성 바이러스 (SFFV), 및 골수증식성 육종 바이러스 (MPSV), 및 그로부터 유래된 벡터를 포함한다. 다른 감마레트로바이러스 벡터가, 예를 들어 문헌 [Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713]에 기재되어 있다.

- [0421] 또 다른 실시양태에서, 목적하는 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터는 아데노바이러스 벡터 (A5/35)이다. 또 다른 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산의 발현은 트랜스포손, 예컨대 슬리핑 뷰티, 크리스퍼, CAS9, 및 아연 핑거 뉴클레아제를 사용하여 달성할 수 있다. 하기 문헌 [June et al. 2009Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716]을 참조하고, 이는 본원에 참조로 포함된다.
- [0422] 간단히 요약하면, CAR을 코딩하는 천연 또는 합성 핵산의 발현은 전형적으로 CAR 폴리펩티드 또는 그의 부분을 코딩하는 핵산을 프로모터에 작동가능하게 연결하고, 구축물을 발현 벡터 내로 혼입시킴으로써 달성된다. 벡터는 진핵세포에서의 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열, 및 목적하는 핵산 서열의 발현의 조절을 위해 유용한 프로모터를 함유한다.
- [0423] 핵산은 수많은 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드를 포함하나 이에 제한되지는 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특정한 관심 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 및 서열분석 벡터를 포함한다.
- [0424] 또한, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY], 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로 적합한 벡터는 적어도 1종의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 1개 이상의 선택 마커를 함유한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193).
- [0425] 수많은 바이러스 기반 시스템이 포유동물 세포 내로의 유전자 전달을 위해 개발된 바 있다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 벡터 내로 삽입되고 관련 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 레트로바이러스 입자 내에 패키징될 수 있다. 이어서, 재조합 바이러스는 단리되고, 생체내에서 또는 생체외에서 대상체의 세포로 전달될 수 있다. 수많은 레트로바이러스 시스템이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 수많은 아데노바이러스 벡터가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0426] 추가의 프로모터 요소, 예를 들어 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 개시 부위의 30-110 bp 상류의 영역에 위치하지만, 수많은 프로모터는 기능적 요소를 또한 개시 부위의 하류에 함유하는 것으로 밝혀진 바 있다. 프로모터 요소 사이의 간격은 빈번하게 탄력적이어서, 프로모터 기능은 요소가 역전되거나 서로에 대해 이동할 때 보존된다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전 50 bp까지 증가할 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소는 전사를 활성화하기 위해 협동적 또는 독립적으로 기능할 수 있는 것으로 보인다. 예시적인 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1 α , 유비퀴틴 C, 또는 포스포글리세로키나제 (PGK) 프로모터를 포함한다.
- [0427] 포유동물 T 세포에서 CAR 코딩 핵산 분자를 발현할 수 있는 프로모터의 예는 EF1 α 프로모터이다. 천연 EF1 α 프로모터는 아미노아실 tRNA의 리보솜으로의 효소적 전달을 담당하는 신장 인자-1 복합체의 알파 서브유닛의 발현을 구동한다. EF1 α 프로모터는 포유동물 발현 플라스미드에서 광범하게 사용된 바 있고, 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝된 핵산 분자로부터 CAR 발현을 구동하는데 유효한 것으로 밝혀진 바 있다. 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]을 참조한다. 한 측면에서, EF1 α 프로모터는 실시예에 제공된 서열을 포함한다.
- [0428] 프로모터의 또 다른 예는 극초기 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 그에 작동가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 구동할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 그러나, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 극초기 프로모터, 라우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터, 뿐만 아니라 예컨대 비제한적으로 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 신장 인자-1 α 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나제 프로모터인 인간 유전자 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되지 않아야 한다. 유도성 프로모터가 또한 본 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 발현을 목적으로 하는 경우에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 턴 온할 수 있거나, 또는 발현을 목적으로 하지 않는 경우에 발현을 턴 오프할 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드

프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라시클린 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0429] 프로모터의 또 다른 예는 포스포글리세레이트 키나제 (PGK) 프로모터이다. 실시양태에서, 말단절단된 PGK 프로모터 (예를 들어, 야생형 PGK 프로모터 서열과 비교 시 1개 이상, 예를 들어 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 또는 400개의 뉴클레오티드 결실을 갖는 PGK 프로모터)가 바람직할 수 있다.

[0430] 예시적인 PGK 프로모터의 뉴클레오티드 서열이 하기 제공된다.

[0431] WT PGK 프로모터:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTC
GTCCTTCGCAGCGGCCCCCGGGTGTTCCTCATCGCCGCTTCTAGGCCCCACTGCGAC
GCTTGCCTGCACCTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCT
TGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCG
CGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT (SEQ ID NO: 109)

[0432]

[0433] 예시적인 말단절단된 PGK 프로모터:

PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTG (SEQ ID NO: 110)

PGK200:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACG (SEQ ID NO:111)

PGK300:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGGAAGGGCTGAATCCCCG (SEQ
ID NO:112)

PGK400:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTC
GTCCTTCGCAGCGGCCCCCGGGTGTTCCTTCGCGCTTCTAGGCCCACTGCGAC
GCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG (SEQ ID NO:113)

[0434]

[0435]

벡터는 또한, 예를 들어 분비를 용이하게 하는 신호 서열, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결인자 (예를 들어, 소 성장 호르몬 (BGH) 유전자로부터), 에피솜 복제 및 원핵생물에서의 복제를 가능하게 하는 요소 (예를 들어 SV40 기원 및 CoIE1 또는 관련 기술분야에 공지되어 있는 다른 것) 및/또는 선택을 가능하게 하는 요소 (예를 들어, 암피실린 저항성 유전자 및/또는 제오신 마커)를 포함할 수 있다.

[0436]

CAR 폴리펩티드 또는 그의 부분의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입되는 발현 벡터는 또한 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염될 것이 모색되는 세포의 집단으로부터 발현 세포의 확인 및 선택을 용이하게 하기 위한 선택 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 다를 함유할 수 있다. 다른 측면에서, 선택 마커는 DNA의 개별 조각 상에 보유하고, 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택 마커 및 리포터 유전자 둘 다는 숙주 세포에서 발현이 가능하도록 하는 적절한 조절 서열과 플랜킹될 수 있다. 유용한 선택 마커는 예를 들어 항생제-저항성 유전자, 예컨대 neo 등을 포함한다.

[0437]

리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고 조절 서열의 기능성을 평가하기 위해 사용된다. 일반적으로 리포터 유전자는, 수용자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되지 않고, 그의 발현이

일부 용이하게 검출가능한 특성, 예를 들어 효소적 활성화에 의해 표시되는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후 적합한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제를 코딩하는 유전자, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82]). 적합한 발현 시스템은 널리 공지되어 있고, 공지된 기술을 사용하여 제조하거나 상업적으로 입수할 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 최고 수준의 발현을 보이는, 최소 5' 플랜킹 영역을 갖는 구축물은 프로모터로서 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결되고, 프로모터-구동 전사를 조정하는 능력에 대해 작용제를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0438] 실시양태에서, 벡터는 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 CD19 CAR, 및 제2 CAR, 예를 들어 억제 CAR 또는 CD19 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 CAR을 코딩하는 2개 이상의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 실시양태에서, CAR을 코딩하는 2개 이상의 핵산 서열은 동일한 프레임 내에서 및 단일 폴리펩티드 쇠로서 단일 핵산 분자에 의해 코딩된다. 이러한 측면에서, 2개 이상의 CAR은, 예를 들어 1개 이상의 펩티드 절단 부위 (예를 들어, 세포내 프로테아제에 대한 자가-절단 부위 또는 기질)에 의해 분리될 수 있다. 펩티드 절단 부위의 예는 T2A, P2A, E2A, 또는 F2A 부위를 포함한다.

[0439] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현시키는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 발현 벡터와 관련하여, 벡터는 임의의 방법, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 것에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모, 또는 곤충 세포 내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 옮겨질 수 있다.

[0440] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주사, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY]을 참조한다. 숙주 세포 내로 폴리뉴클레오티드의 도입을 위한 적합한 방법은 인산칼슘 형질감염이다.

[0441] 숙주 세포 내로 관심 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포 내로 삽입하기 위해 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0442] 숙주 세포 내로 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드성 분산액 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합된 미셀, 및 리포솜을 포함한 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내에서 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포)이다. 핵산의 최신 기술 표적화된 전달, 예컨대 표적화된 나노입자 또는 다른 적합한 마이크로미터-미만 크기의 전달 시스템을 사용한 폴리뉴클레오티드의 전달의 다른 방법이 이용가능하다.

[0443] 비-바이러스 전달 시스템이 이용되는 경우에, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제제의 사용은 숙주 세포 내로의 핵산의 도입 (시험관내, 생체외 또는 생체내)을 위해 고려된다. 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 회합될 수 있다. 지질과 회합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 점재되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 다와 회합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜 내에 포획되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질 함유 용액 중에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 내에 현탁액으로서 함유되거나, 미셀과 함께 함유 또는 복합체화되거나, 또는 지질과 달리 회합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 회합 조성물은 용액 중의 임의의 특정한 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중층 구조로, 미셀로서, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액 중에 점재되고, 가능하게는 크기 또는 형상이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 자연 발생하는 지방 액적, 뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체, 예컨대 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜, 및 알데히드를 함유하는 화합물의 부류를 포함한다.

[0444] 사용하기 적합한 지질은 상업적 공급원으로부터 취득할 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 미주리주 세인트 루이스의 시그마(Sigma)로부터 취득할 수 있고; 디세틸 포스페이트 ("DCP")는 케이 & 케이 래보라토리즈(K & K Laboratories) (뉴욕주 플레인뷰)로부터 취득할 수 있고; 콜레스테롤 ("Chol")은 칼

바이오켄-베링(Calbiochem-Behring)으로부터 취득할 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 다른 지질은 아반티 폴라 리피즈, 인크.(Avanti Polar Lipids, Inc.) (앨라배마주 버밍엄)로부터 취득할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄을 내의 지질의 원액은 약 -20℃에서 저장될 수 있다. 클로로포름이 메탄올보다 더 용이하게 증발되기 때문에, 클로로포름이 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 둘러싸는 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다층막 지질 비히클을 포괄하는 일반적 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 다층 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다층 지질 층을 갖는다. 이들은 인지질이 과량의 수용액 중에 현탁될 경우에 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 폐쇄된 구조의 형성 전에 자기-재배열을 거치고, 물 및 지질 이중층들 사이의 용해된 용질을 포획한다 (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나, 정상 소포 구조가 아니라 용액 중에서 상이한 구조를 갖는 조성물도 포괄된다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조를 가정할 수 있거나 또는 단지 지질 분자의 불균일 응집체로서 존재할 수 있다. 또한, 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0445] 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 도입하거나 또는 달리 세포를 본 발명의 억제제에 노출시키기 위해 사용된 방법과 상관없이, 숙주 세포에서 재조합 핵산 서열의 존재를 확인하기 위해 다양한 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정은, 예를 들어 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 "분자 생물학적" 검정, 예컨대 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR; 예를 들어 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범주 내에 포함되는 작용제를 확인하기 위해 본원에 기재된 검정에 의해, 예컨대 특정한 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 "생화학적" 검정을 포함한다.

[0446] 자연 킬러 세포 수용체 (NKR) CAR

[0447] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR 분자는 자연 킬러 세포 수용체 (NKR)의 1종 이상의 성분을 포함하며, 이에 의해 NKR-CAR을 형성한다. NKR 성분은 임의의 하기 자연 킬러 세포 수용체: 킬러 세포 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR), 예를 들어, KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1, 및 KIR3DP1; 천연 세포독성 수용체 (NCR), 예를 들어, NKp30, NKp44, NKp46; 면역 세포 수용체의 신호전달 림프구 활성화 분자 (SLAM) 패밀리를, 예를 들어, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME, 및 CD2F-10; Fc 수용체 (FcR), 예를 들어, CD16, 및 CD64; 및 Ly49 수용체, 예를 들어 LY49A, LY49C로부터의 막횡단 도메인, 힌지 도메인, 또는 세포질 도메인일 수 있다. 본원에 기재된 NKR-CAR 분자는 어댑터 분자 또는 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 DAP12와 상호작용할 수 있다. NKR 성분을 포함하는 CAR 분자의 예시적인 구성 및 서열은 국제 공개 번호 WO2014/145252에 기재되어 있고, 그 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0448] 스플릿 CAR

[0449] 일부 실시양태에서, CAR-발현 세포는 스플릿 CAR을 사용한다. 스플릿 CAR 접근법은 공개 WO2014/055442 및 WO2014/055657에 보다 상세하게 기재되어 있다. 간략하게, 스플릿 CAR 시스템은 제1 항원 결합 도메인 및 공동 자극 도메인 (예를 들어, 41BB)을 갖는 제1 CAR을 발현하는 세포를 포함하고, 세포는 또한 제2 항원 결합 도메인 및 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, CD3 제타)을 갖는 제2 CAR을 발현한다. 세포가 제1 항원을 만난 경우에, 공동자극 도메인이 활성화되고 세포는 증식한다. 세포가 제2 항원을 만난 경우에, 세포내 신호전달 도메인이 활성화되고 세포-사멸 활성이 개시된다. 따라서, CAR-발현 세포는 오직 둘 다의 항원의 존재 하에서만 활성화된다.

[0450] 키메라 항원 수용체를 조절하기 위한 전략

[0451] 일부 실시양태에서, CAR 활성이 제어될 수 있는 조절성 CAR (RCAR)은 CAR 요법의 안전성 및 효능을 최적화하는데 바람직하다. CAR 활성을 조절할 수 있는 많은 방식이 존재한다. 예를 들어, 이량체화 도메인에 융합된 카스파제를 사용한 예를 들어 유도성 아포토시스 (예를 들어, 문헌 [Di Stasi et al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3; 365(18):1673-1683] 참조)는 본 발명의 CAR 요법에서 안전성 스위치로서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR을 발현하는 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)는 유도성 아포토시스 스위치를 추가로 포함하며, 여기서 인간 카스파제 (예를 들어, 카스파제 9) 또는 변형된 버전이 조건화 이량체화를 가능하게 하는 인간 FKB 단백질의 변형에 융합된다. 소분자, 예컨대 라파로그 (예를 들어, AP 1903, AP20187)의 존재 하에, 유도성 카스파제 (예를 들어, 카스파제 9)가 활성화되고, 이는 본 발명의 CAR을 발현하는 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)의 신속한 아포토시스 및 사멸로 이어진다. 카스파제-기반 유도성 아포토시스 스위치 (또는 이러한 스위치의 1종 이상의 측면)의 예는, 예를 들어 US2004040047; US20110286980; US20140255360; WO1997031899; WO2014151960; WO2014164348; WO2014197638; WO2014197638에 기재되어 있고; 이는 모두 본원에

참조로 포함된다.

- [0452] 또 다른 예에서, CAR-발현 세포는 또한 유도성 카스파제-9 (i카스파제-9) 분자를 발현할 수 있고, 이는 이량체화 약물 (예를 들어, 리미두시드 (AP1903 (벨리쿰 파마슈티칼스(Bellicum Pharmaceuticals)) 또는 AP20187 (아리아드(Ariad))로도 불림)의 투여 시, 카스파제-9의 활성화 및 세포의 아포토시스로 이어진다. i카스파제-9 분자는 CID의 존재 하에 이량체화를 매개하는 이량체화 (CID) 결합 도메인의 화학적 유도제를 함유한다. 이는 CAR-발현 세포의 유도적 및 선택적 고갈을 발생시킨다. 일부 경우에, i카스파제-9 분자는 CAR-코딩 벡터(들)와 별개의 핵산 분자에 의해 코딩된다. 일부 경우에, i카스파제-9 분자는 CAR-코딩 벡터와 동일한 핵산 분자에 의해 코딩된다. i카스파제-9는 CAR-발현 세포의 임의의 독성을 피하기 위한 안전성 스위치를 제공할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; 및 Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83]을 참조한다.
- [0453] 본 발명의 CAR 요법을 조절하기 위한 대안적 전략은 예를 들어 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 유도함으로써, 예를 들어 CAR-발현 세포를 결실시킴으로써 CAR 활성을 비활성화하거나 턴 오프하는 소분자 또는 항체를 이용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또한 세포 사멸, 예를 들어 ADCC 또는 보체-유도 세포 독성을 유도할 수 있는 분자에 의해 인식되는 항원을 발현할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 CAR 발현 세포는 또한 항체 또는 항체 단편에 의해 표적화될 수 있는 수용체를 발현할 수 있다. 이러한 수용체의 예는 EpCAM, VEGFR, 인테그린 (예를 들어, 인테그린 $\alpha v \beta 3$, $\alpha 4$, $\alpha I \beta 3$, $\alpha 4 \beta 7$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, αv), TNF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원 (예를 들어, TRAIL-R1, TRAIL-R2), PDGF 수용체, 인터페론 수용체, 플레이트 수용체, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, IL-6 수용체, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/IgE 수용체, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/바시긴, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7, 및 EGFR, 및 그의 말단절단된 버전 (예를 들어, 1개 이상의 세포의 에피토프는 보존되었지만 세포질 도메인 내 1개 이상의 영역이 결여된 버전)을 포함한다.
- [0454] 예를 들어, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또한 신호전달 능력은 결여되었지만 ADCC를 유도할 수 있는 분자, 예를 들어 세톡시맵 (에르비투스(ERBITUX)®)에 의해 인식되는 에피토프를 보유하는 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)를 발현할 수 있어서, 세톡시맵의 투여는 ADCC를 유도하고 이어서 CAR-발현 세포를 고갈시킨다 (예를 들어, W02011/056894, 및 문헌 [Jonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860] 참조). 또 다른 전략은 본원에 기재된 CAR-발현 세포에서 CD32 및 CD20 항원 둘 다로부터의 표적 에피토프를 합한 고도로 치밀한 마커/자살 유전자를 발현시키는 것을 포함하고, 이는 리톡시맵에 결합하고, 예를 들어 ADCC에 의해 CAR-발현 세포의 선택적 고갈을 발생시킨다 (예를 들어, 문헌 [Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287] 참조). 본원에 기재된 CAR-발현 세포를 고갈시키는 다른 방법은 예를 들어 ADCC를 유도함으로써 파괴를 위해 성숙한 림프구, 예를 들어 CAR-발현 세포에 선택적으로 결합하고 표적화하는 모노클로날 항-CD52 항체인 캄파트(CAMPATH)의 투여를 포함한다. 다른 실시양태에서, CAR-발현 세포는 CAR 리간드, 예를 들어 항-이디오타입 항체를 사용하여 선택적으로 표적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-이디오타입 항체는 이펙터 세포 활성화, 예를 들어 ADCC 또는 ADC 활성을 유발하여 CAR-발현 세포의 수를 감소시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, CAR 리간드, 예를 들어 항-이디오타입 항체는 세포 사멸을 유도하는 작용제, 예를 들어 독소에 커플링되어 CAR-발현 세포의 수를 감소시킬 수 있다. 대안적으로, CAR 분자 그 자체가 활성이 조절될 수 있도록, 예를 들어 하기 기재된 바와 같이 턴 온 및 오프될 수 있도록 구성될 수 있다.
- [0455] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또한 T 세포 고갈제에 의해 인식되는 표적 단백질을 발현할 수 있다. 한 실시양태에서, 표적 단백질은 CD20이고, T 세포 고갈제는 항-CD20 항체, 예를 들어 리톡시맵이다. 이러한 실시양태에서, T 세포 고갈제는 CAR-발현 세포를 감소 또는 제거하는 것, 예를 들어 CAR 유도된 독성을 완화시키는 것이 바람직하다면 투여된다. 다른 실시양태에서, T 세포 고갈제는 항-CD52 항체, 예를 들어 본원의 실시예에 기재된 바와 같은 알렘투주맵이다.
- [0456] 다른 실시양태에서, RCAR은 가장 단순한 실시양태에서 전형적으로 2개인 폴리펩티드의 세트를 포함하며, 여기서 본원에 기재된 표준 CAR의 성분, 예를 들어 항원 결합 도메인 및 세포내 신호전달 도메인은 개별 폴리펩티드 또는 구성원 상에 분할된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 세트는 이량체화 분자의 존재 시 폴리펩티드를 서로 커플링시킬 수 있는, 예를 들어 항원 결합 도메인을 세포내 신호전달 도메인에 커플링시킬 수 있는 이량체화 스위치를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR은, 예를 들어 본원에 참조로 포함되는 W02014127261에 기재된 것과 같은 이량체화 스위치를 사용한다. 이러한 조절성 CAR의 추가의 설명 및 예시적인 구성이 본원, 및 예를 들어 그 전문이 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 공개 번호 WO 2015/090229의 단락 527-

551에 제공된다. 일부 실시양태에서, RCAR은 스위치 도메인, 예를 들어 서열식별번호: 114에 제시된 바와 같은 FKBP 스위치 도메인을 수반하거나, 또는 예를 들어 서열식별번호: 115에 제시된 바와 같은 FRB와 결합하는 능력을 갖는 FKBP의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, RCAR은 예를 들어 서열식별번호: 116에 제시된 바와 같은 FRB 서열을 포함하는 스위치 도메인, 또는 예를 들어 서열식별번호: 117-122 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 돌연변이체 FRB 서열을 수반한다.

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPRKGQTCVVHYTGMLE
DGKKFDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHP
GIIPPHATLVFDVELLKLETSY (SEQ ID NO: 114)

VQVETISPGDGRTFPRKGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFFKMLGKQE
VIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (SEQ
ID NO: 115)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ
AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO: 116)

표 4. 이량체화 분자에 대해 증가된 친화도를 갖는 예시적인 돌연변이체 FRB

FRB 돌연변이체	아미노산 서열	SEQ ID NO:
E2032I 돌연변이체	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	117
E2032L 돌연변이체	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	118
T2098L 돌연변이체	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	119
E2032, T2098 돌연변이체	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	120
E2032I, T2098L 돌연변이체	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	121
E2032L, T2098L 돌연변이체	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	122

RNA 형질감염

시험관내 전사된 RNA CAR을 생산하는 방법이 본원에 개시된다. RNA CAR 및 그의 사용 방법은, 예를 들어 그 문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 W02015/142675의 단락 553-570에 기재되어 있다.

면역 이펙터 세포는 메신저 RNA (mRNA)에 의해 코딩된 CAR을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 mRNA는 CAR-발현 세포의 생산을 위해, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 면역 이펙터 세포 내로 도입된다.

한 실시양태에서, 시험관내 전사된 RNA CAR은 일시적 형질감염의 형태로서 세포에 도입될 수 있다. RNA는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)-생성 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생산된다. 임의의 공급원으로부터의 관심 DNA는 적절한 프라이머 및 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 PCR에 의해 직접 전환될 수 있다. DNA의 공급원은 예를 들어 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 임의의 다른 적절한 DNA 공급원일 수 있다. 시험관내 전사를 위한 목적하는 주형은 본원에 기재된 CAR이다. 예를 들어, RNA CAR을 위한 주형은 본원에 기재된 종양 연관 항원에 대한 항체의 단일쇄 가변 도메인을 포함하는 세포외 영역; 힌지 영역 (예를 들어, 본원에 기재된 힌지 영역), 막횡단 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 막횡단 도메인 예컨대 CD8a의 막횡단 도메인); 및 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하는, 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함한다.

한 실시양태에서, PCR을 위해 사용되는 DNA는 오픈 리딩 프레임을 함유한다. DNA는 유기체의 게놈으로부터 자

연 발생 DNA 서열로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산은 일부 또는 모두의 5' 및/또는 3' 비번역 영역 (UTR)을 포함할 수 있다. 핵산은 엑손 및 인트론을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, PCR을 위해 사용되는 DNA는 인간 핵산 서열이다. 또 다른 실시양태에서, PCR을 위해 사용되는 DNA는 5' 및 3' UTR을 포함하는 인간 핵산 서열이다. DNA는 대안적으로 자연 발생 유기체에서 정상적으로는 발현되지 않는 인공 DNA 서열일 수 있다. 예시적인 인공 DNA 서열은 함께 라이게이션되어 융합 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 형성하는 유전자의 부분을 함유하는 것이다. 함께 라이게이션되는 DNA의 부분은 단일 유기체로부터 또는 1종 초과 유기체로부터 유래될 수 있다.

[0465] PCR은 형질감염을 위해 사용되는 mRNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성하기 위해 사용된다. PCR을 수행하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는 PCR을 위한 주형으로서 사용되는 DNA의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 갖도록 설계된다. 본원에 사용된 "실질적으로 상보적인"은 프라이머 서열 내의 대부분의 또는 모든 염기가 상보적이거나 또는 1개 이상의 염기가 비-상보적이거나 미스매치된 뉴클레오타이드의 서열을 지칭한다. 실질적으로 상보적인 서열은 PCR을 위해 사용되는 어닐링 조건 하에서 의도된 DNA 표적과 어닐링하거나 혼성화할 수 있다. 프라이머는 DNA 주형의 임의의 부분에 실질적으로 상보적으로 설계될 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함하는, 세포에서 정상적으로 전사되는 핵산의 부분 (오픈 리딩 프레임)을 증폭하도록 설계될 수 있다. 프라이머는 또한 특정한 관심 도메인을 코딩하는 핵산의 부분을 증폭하도록 설계될 수 있다. 한 실시양태에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR의 모두 또는 일부를 포함하는 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭하도록 설계될 수 있다. PCR을 위해 유용한 프라이머는 관련 기술분야에 널리 공지된 합성 방법에 의해 생성될 수 있다. "정방향 프라이머"는 증폭될 DNA 서열의 상류에 존재하는 DNA 주형상의 뉴클레오타이드에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드의 영역을 함유하는 프라이머이다. "상류"는 코딩 가닥과 관련하여 증폭시킬 DNA 서열에 대해 위치 5를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. "역방향 프라이머"는 증폭시킬 DNA 서열의 하류에 존재하는 이중-가닥 DNA 주형에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드의 영역을 함유하는 프라이머이다. "하류"는 코딩 가닥과 관련하여 증폭시킬 DNA 서열의 3' 위치를 지칭하기 위해 본원에 사용된다.

[0466] PCR에 유용한 임의의 DNA 폴리머라제가 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 시약 및 폴리머라제는 수많은 공급원으로부터 상업적으로 입수가능하다.

[0467] 안정성 및/또는 번역 효율을 촉진하는 능력을 갖는 화학 구조도 사용될 수 있다. 실시양태에서 RNA는 5' 및 3' UTR을 갖는다. 한 실시양태에서, 5' UTR은 1 내지 3000개 뉴클레오타이드 길이이다. 코딩 영역에 추가되는 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTR의 상이한 영역에 어닐링하는 PCR용 프라이머의 설계를 포함하나 이에 제한되지는 않는 상이한 방법에 의해 변경될 수 있다. 이러한 접근법을 사용하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 전사된 RNA의 형질감염 후에 최적 번역 효율을 달성하기 위해 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 변형시킬 수 있다.

[0468] 5' 및 3' UTR은 관심 핵산에 대한 자연 발생, 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 대안적으로, 관심 핵산에 내인성이 아닌 UTR 서열은 UTR 서열을 정방향 및 역방향 프라이머 내로 혼입시킴으로써 또는 주형의 임의의 다른 변형에 의해 추가될 수 있다. 관심 핵산에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율의 변형을 위해 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열 내의 AU-풍부 요소가 mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있다고 공지되어 있다. 따라서, 3' UTR은 관련 기술분야에 널리 공지된 UTR의 특성을 기초로 하여 전사되는 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택되거나 설계될 수 있다.

[0469] 한 실시양태에서, 5' UTR은 내인성 핵산의 코작(Kozak) 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 관심 핵산에 내인성이 아닌 5' UTR이 상기 기재된 바와 같이 PCR에 의해 추가되는 경우에, 컨센서스 코작 서열은 5' UTR 서열의 추가에 의해 재설계될 수 있다. 코작 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 효율적인 번역을 가능하게 하기 위해 모든 RNA에 필요한 것으로 보이지는 않는다. 많은 mRNA에 대한 코작 서열의 필요성은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 다른 실시양태에서, 5' UTR은 그의 RNA 게놈이 세포에서 안정한 RNA 바이러스의 5'UTR일 수 있다. 다른 실시양태에서, 다양한 뉴클레오타이드 유사체가 mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 저해하기 위해 3' 또는 5' UTR에 사용될 수 있다.

[0470] 유전자 클로닝을 필요로 하지 않으면서 RNA를 DNA 주형으로부터 합성할 수 있기 위해, 전사 프로모터는 전사시킬 서열의 상류의 DNA 주형에 부착되어야 한다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터로서 기능하는 서열이 정방향 프라이머의 5' 말단부에 추가되는 경우에, RNA 폴리머라제 프로모터는 전사되는 오픈 리딩 프레임의 상류의 PCR 생성물 내로 혼입된다. 한 실시양태에서, 프로모터는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 T7 폴리머라제 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터는 T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오타이드 서열이 관련 기술분야에 공지되어 있다.

- [0471] 한 실시양태에서, mRNA는 세포에서 리보솜 결합, 번역의 개시 및 mRNA의 안정성을 결정하는 5' 말단 및 3' 폴리(A) 테일 상에 둘 다의 캡을 갖는다. 원형 DNA 주형, 예를 들어 플라스미드 DNA에서, RNA 폴리머라제는 진핵 세포에서의 발현에 적합하지 않은 긴 콘카테머 생성물을 생산한다. 3' UTR의 말단에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는 전사 후에 폴리아데닐화된 경우에도 진핵 형질감염에 유효하지 않은 정상 크기의 mRNA를 생성한다.
- [0472] 선형 DNA 주형 상에서, 파지 T7 RNA 폴리머라제는 주형의 마지막 염기를 넘어 전사체의 3' 말단을 연장시킬 수 있다 (Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)).
- [0473] 폴리A/T 스트레치의 DNA 주형 내로의 통상적인 통합 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA 내로 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 유발할 수 있고, 이것은 박테리아 세포로부터 수득된 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 다른 이상에 의해 고도로 오염되는 이유이다. 이는 클로닝 절차를 어렵고 시간 소모적으로 만들 뿐만 아니라 종종 실패할 수 없게 만든다. 이러한 이유 때문에, 클로닝 없이 폴리A/T 3' 스트레치를 갖는 DNA 주형의 구축을 가능하게 하는 방법이 매우 바람직하다.
- [0474] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 절편은 폴리T 테일, 예컨대 100T 테일 (서열식별번호: 31) (크기는 50-5000 T일 수 있음 (서열식별번호: 32))을 함유하는 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 동안, 또는 DNA 라이게이션 또는 시험관내 재조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 다른 방법에 의해 PCR 후에 생산될 수 있다. 폴리(A) 테일은 또한 안정성을 RNA에 제공하고, 그의 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 테일의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양의 상관관계가 있다. 한 실시양태에서, 폴리(A) 테일은 100 내지 5000개 아데노신 (예를 들어, 서열식별번호: 33)이다.
- [0475] RNA의 폴리(A) 테일은 폴리(A) 폴리머라제, 예컨대 이. 콜라이 폴리A 폴리머라제 (E-PAP)를 사용하여 시험관내 전사 후에 추가로 연장될 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리(A) 테일의 길이를 100개의 뉴클레오티드로부터 300 내지 400개의 뉴클레오티드 (서열식별번호: 34)로 증가시키는 것은, RNA의 번역 효율의 약 2-배 증가를 발생시킨다. 추가로, 상이한 화합물의 3' 말단에 대한 부작은 mRNA 안정성을 증가시킬 수 있다. 이러한 부작은 변형된/인공 뉴클레오티드, 압타머 및 다른 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, ATP 유사체는 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 폴리(A) 테일 내로 혼입될 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다.
- [0476] 5' 캡이 또한 RNA 분자에게 안정성을 제공한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 관련 기술분야에 공지되고 본원에 기재된 기술을 사용하여 제공된다 (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).
- [0477] 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 RNA는 또한 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열을 함유할 수 있다. IRES 서열은 mRNA에 대한 캡-비의존성 리보솜 결합을 개시하고 번역의 개시를 용이하게 하는 임의의 바이러스, 염색체 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 세포 투과성 및 생존을 용이하게 하는 인자, 예컨대 당, 펩티드, 지질, 단백질, 항산화제, 및 계면활성제를 함유할 수 있는, 세포 전기천공에 적합한 임의의 용질이 포함될 수 있다.
- [0478] RNA는 임의의 수많은 상이한 방법, 예를 들어 전기천공 (아막사 뉴클레오펙터(Amaxa Nucleofector)-II (아막사 바이오시스템즈(Amaxa Biosystems), 독일 쾰른), (ECM 830 (BTX) (하버드 인스트루먼트(Harvard Instruments), 매사추세츠주 보스턴) 또는 진 펄서(Gene Pulser) II (바이올라드(BioRad), 콜로라도주 덴버), 멀티포레이터 (Multiporator) (에펜도르프(Eppendorf), 독일 함부르크), 리포펙션을 사용한 양이온성 리보솜 매개 형질감염, 중합체 캡슐화, 펩티드 매개 형질감염, 또는 바이올리스틱 입자 전달 시스템, 예컨대 "유전자 총" (예를 들어, 문헌 [Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)] 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 상업적으로 입수가능한 방법을 사용하여 표적 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0479] 비-바이러스 전달 방법
- [0480] 일부 측면에서, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산을 세포 또는 조직 또는 대상체 내로 전달하는데 비-바이러스 방법이 사용될 수 있다.
- [0481] 일부 실시양태에서, 비-바이러스 방법은 트랜스포손 (전위가능 요소로도 불림)의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 트랜스포손은 게놈 내 위치에서 그 자체를 삽입할 수 있는 DNA 조각, 예를 들어 자기-복제 및 그의

카피의 게놈 내로의 삽입이 가능한 DNA 조각, 또는 보다 긴 핵산으로부터의 스플라이싱 및 게놈 내 또 다른 위치 내로의 삽입이 가능한 DNA 조각이다. 예를 들어, 트랜스포손은 전위를 위한 역전된 반복부 플랭킹 유전자로 구성된 DNA 서열을 포함한다.

[0482] 트랜스포손을 사용한 핵산 전달의 예시적인 방법은 슬리핑 뷰티 트랜스포손 시스템(Sleeping Beauty transposon system) (SBTS) 및 피기백(piggyBac) (PB) 트랜스포손 시스템을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al. Blood. 122.21(2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65; 및 Ding et al. Cell. 122.3(2005):473-83]을 참조하고, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다.

[0483] SBTS는 2개의 성분: 1) 트랜스젠을 함유하는 트랜스포손 및 2) 트랜스포사제 효소의 공급원을 포함한다. 트랜스포사제는 트랜스포손을 캐리어 플라스미드 (또는 다른 공여자 DNA)로부터 표적 DNA, 예컨대 숙주 세포 염색체/게놈으로 전위시킬 수 있다. 예를 들어, 트랜스포사제는 캐리어 플라스미드/공여자 DNA에 결합하고, 플라스미드로부터 트랜스포손 (트랜스젠(들) 포함)을 잘라내고, 이를 숙주 세포의 게놈 내로 삽입한다. 예를 들어, 상기 문헌 [Aronovich et al.]을 참조한다.

[0484] 예시적인 트랜스포손은 pT2-기반 트랜스포손을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47; 및 Singh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971]을 참조하고, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다. 예시적인 트랜스포사제는 Tc1/마리너-유형 트랜스포사제, 예를 들어 SB10 트랜스포사제 또는 SB11 트랜스포사제 (예를 들어 시토메갈로바이러스 프로모터로부터 발현될 수 있는 과다활성 트랜스포사제)를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Aronovich et al.; Kebriaei et al.; 및 Grabundzija et al.]을 참조하고, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다

[0485] SBTS의 사용은 트랜스젠, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산의 효율적인 통합 및 발현을 허용한다. 예를 들어 트랜스포손 시스템, 예컨대 SBTS를 사용하여 본원에 기재된 CAR을 안정적으로 발현하는 세포, 예를 들어 T 세포 또는 NK 세포를 생성하는 방법이 본원에 제공된다.

[0486] 본원에 기재된 방법에 따라, 일부 실시양태에서, 1종 이상의 핵산, 예를 들어 SBTS 성분을 함유하는 플라스미드가 세포 (예를 들어, T 또는 NK 세포)에게 전달된다. 예를 들어, 핵산(들)은 핵산 (예를 들어, 플라스미드 DNA) 전달의 표준 방법, 예를 들어 본원에 기재된 방법, 예를 들어 전기천공, 형질감염 또는 리포펙션에 의해 전달된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 트랜스젠, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 트랜스포손을 함유한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 트랜스젠 (예를 들어, 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산) 뿐만 아니라 트랜스포사제 효소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 트랜스포손을 함유한다. 다른 실시양태에서, 2개의 핵산을 갖는 시스템, 예를 들어 이중-플라스미드 시스템이 제공되며, 예를 들어 여기서 제1 플라스미드는 트랜스젠을 포함하는 트랜스포손을 함유하고, 제2 플라스미드는 트랜스포사제 효소를 코딩하는 핵산 서열을 함유한다. 예를 들어, 제1 및 제2 핵산은 숙주 세포 내로 공동-전달된다.

[0487] 일부 실시양태에서, SBTS를 사용한 유전자 삽입 및 뉴클레아제 (예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), CRISPR/Cas 시스템, 또는 조작된 메가뉴클레아제 재조합된 귀소 엔도뉴클레아제)를 사용한 유전자 편집의 조합을 사용하는 것에 의해, 본원에 기재된 CAR을 발현하는 세포, 예를 들어 T 또는 NK 세포가 생성된다.

[0488] 일부 실시양태에서, 비-바이러스 전달 방법의 사용은 세포, 예를 들어 T 또는 NK 세포의 재프로그래밍 및 세포의 대상체 내로의 직접 주입을 허용한다. 비-바이러스 벡터의 이점은 환자 집단을 충족시키는데 필요한 충분한 양을 생산하는 것의 용이성 및 상대적으로 낮은 비용, 저장 동안의 안정성, 및 면역원성의 결여를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0489] 제조/생산 방법

[0490] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 세포 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 면역 이펙터 세포)로 처리한 후 T 세포 고갈제를 투여하여 CAR-발현 세포 (예를 들어, CD19CAR-발현 세포)를 감소시키는 (예를 들어, 고갈시키는) 것을 추가로 포함한다. 이러한 T 세포 고갈제는 CAR-발현 세포 (예를 들어, CD19CAR-발현 세포)를 효과적으로 고갈시켜 독성을 완화시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR-발현 세포는 본원의 방법에 따라 제조되었고, 예를 들어 본원의 방법에 따라 (예를 들어, 형질감염 또는 형질도입 전 또는 후에) 검정

되었다.

- [0491] 일부 실시양태에서, T 세포 고갈제는 세포, 예를 들어 본원에 기재된 면역 이펙터 세포의 집단의 투여의 1, 2, 3, 4 또는 5주 후에 투여된다.
- [0492] 한 실시양태에서, T 세포 고갈제는, 예를 들어 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-유도 세포 사멸을 유도함으로써 CAR-발현 세포를 고갈시키는 작용제이다. 예를 들어, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또한 세포 사멸, 예를 들어 ADCC 또는 보체-유도 세포 사멸을 유도할 수 있는 분자에 의해 인식되는 항원 (예를 들어, 표적 항원)을 발현할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 CAR 발현 세포는 또한 항체 또는 항체 단편에 의해 표적화될 수 있는 표적 단백질 (예를 들어, 수용체)을 발현할 수 있다. 이러한 표적 단백질의 예는 EpCAM, VEGFR, 인테그린 (예를 들어, 인테그린 $\alpha v \beta 3$, $\alpha 4$, $\alpha I3/4 \beta 3$, $\alpha 4 \beta 7$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, αv), TNF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원 (예를 들어, TRAIL-R1, TRAIL-R2), PDGF 수용체, 인터페론 수용체, 플레이트 수용체, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, IL-6 수용체, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/IgE 수용체, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/바시긴, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7, 및 EGFR, 및 그의 말단절단된 버전 (예를 들어, 1개 이상의 세포외 에피토프가 보존되어 있으나 세포질 도메인 내의 1개 이상의 영역이 결여된 버전)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0493] 일부 실시양태에서, CAR 발현 세포는 CAR 및 표적 단백질을 공동-발현하고, 예를 들어 표적 단백질을 자연 발현 하거나 표적 단백질을 발현하도록 조작된다. 예를 들어, 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포의 집단은 CAR 핵산 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 CAR 핵산) 및 표적 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 핵산 (예를 들어, 벡터)을 포함할 수 있다.
- [0494] 한 실시양태에서, T 세포 고갈제는 CD52 억제제, 예를 들어 항-CD52 항체 분자, 예를 들어 알렘투주맙이다.
- [0495] 다른 실시양태에서, 세포, 예를 들어 면역 이펙터 세포의 집단은 본원에 기재된 바와 같은 CAR 분자 (예를 들어, CD19CAR) 및 T 세포 고갈제에 의해 인식되는 표적 단백질을 발현한다. 한 실시양태에서, 표적 단백질은 CD20이다. 표적 단백질이 CD20인 실시양태에서, T 세포 고갈제는 항-CD20 항체, 예를 들어 리툽시맙이다.
- [0496] 임의의 상기 방법의 추가 실시양태에서, 방법은 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 골수를 포유동물 내로 이식하는 것을 추가로 포함한다.
- [0497] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포 이식 전에 포유동물을 조건화하는 방법을 특색으로 한다. 상기 방법은 포유 동물에게 CAR 핵산 또는 폴리펩티드, 예를 들어 CD19 CAR 핵산 또는 폴리펩티드를 포함하는 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 이식은 줄기 세포 이식, 예를 들어 조혈 줄기 세포 이식 또는 골수 이식이다. 다른 실시양태에서, 세포 이식 전에 대상체를 조건화하는 것은 대상체에서 표적-발현 세포, 예를 들어 CD19-발현 정상 세포 또는 CD19-발현 암 세포의 수를 감소시키는 것을 포함한다.
- [0498] 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포)의 활성화 및 확장
- [0499] 면역 이펙터 세포 예컨대 T 세포는 일반적으로 예를 들어 미국 특허 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 특허 출원 공개 번호 20060121005에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 활성화 및 확장될 수 있다.
- [0500] 일반적으로, 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 조절 세포 고갈된 세포의 집단은 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 T 세포의 표면 상의 공동자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과의 접촉에 의해 확장된다. 특히, T 세포 집단은 본원에 기재된 바와 같이, 예컨대 표면에 고정된 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 항-CD2 항체와의 접촉에 의해, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자의 공동자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포의 집단은 T 세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 사용될 수 있다. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28 (디아클론 (Diaclone), 프랑스 브장송)을 포함하고, 관련 기술분야에 통상적으로 공지된 다른 방법이 사용될 수 있다 (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

- [0501] 특정 측면에서, T 세포에 대한 1차 자극 신호 및 공동자극 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각각의 신호를 제공하는 작용제는 용액 중에 존재하거나 표면에 커플링될 수 있다. 표면에 커플링되는 경우에, 작용제는 동일한 표면 (즉, "시스" 형태) 또는 개별 표면 (즉, "트랜스" 형태)에 커플링될 수 있다. 대안적으로, 한 작용제는 표면에 커플링되고 다른 작용제는 용액 중에 존재할 수 있다. 한 측면에서, 공동자극 신호를 제공하는 작용제는 세포 표면에 결합되고, 1차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 용액 중에 존재하거나 표면에 커플링된다. 특정 측면에서, 둘 다의 작용제는 용액 중에 존재할 수 있다. 한 측면에서, 작용제는 가용성 형태로 존재한 후, 표면, 예컨대 Fc 수용체 또는 항체 또는 다른 결합제를 발현하는 세포에 가교될 수 있고, 이것이 작용제에 결합할 것이다. 이와 관련하여, 본 발명에서 T 세포를 활성화 및 확장하는데 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)에 대한, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 번호 20040101519 및 20060034810을 참조한다.
- [0502] 한 측면에서, 2종의 작용제는 동일한 비드, 즉 "시스" 또는 개별 비드, 즉 "트랜스"의 비드 상에 고정된다. 예로서, 1차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 공동자극 신호를 제공하는 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며; 둘 다의 작용제는 동일한 비드에 동등한 분자량으로 공동-고정된다. 한 측면에서, CD4+ T 세포 확장 및 T 세포 성장을 위해 1:1 비의 비드에 결합된 각각의 항체가 사용된다. 본 발명의 특정 측면에서, 비드에 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비는 1:1의 비를 사용하여 관찰된 확장과 비교 시 T 세포 확장의 증가가 관찰되도록 사용된다. 하나의 특정한 측면에서, 1:1의 비를 사용하여 관찰된 확장과 비교 시 약 1 내지 약 3배의 증가가 관찰된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100 및 그 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 한 측면에서, 항-CD3 항체보다 많은 항-CD28 항체가 입자에 결합되고, 즉 CD3:CD28의 비는 1 미만이다. 특정 측면에서, 비드에 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비는 2:1보다 크다. 하나의 특정한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:100 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:75 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:50 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:30 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:10 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:3 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 3:1 CD3:CD28 비가 사용된다.
- [0503] 1:500 내지 500:1 및 그 사이의 임의의 정수 값의 입자 대 세포의 비가 T 세포 또는 다른 표적 세포를 자극하기 위해 사용될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 인식할 수 있는 바와 같이, 입자 대 세포의 비는 표적 세포에 대한 입자 크기에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 작은 크기의 비드는 소수의 세포에만 결합할 수 있지만, 보다 큰 비드는 많은 세포에 결합할 수 있다. 특정 측면에서, 세포 대 입자의 비는 1:100 내지 100:1 및 그 사이의 임의의 정수 값의 범위이고, 추가 측면에서 비는 1:9 내지 9:1 및 그 사이의 임의의 정수 값을 포함하고, 이는 또한 T 세포를 자극하기 위해 사용될 수 있다. T 세포 자극을 발생시키는 항-CD3- 및 항-CD28-커플링된 입자 대 T 세포의 비는 상기 언급된 바와 같이 달라질 수 있지만, 특정의 적합한 값은 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1을 포함하고, 하나의 적합한 비는 T 세포 당 적어도 1:1 입자이다. 한 측면에서, 1:1 이하의 입자 대 세포의 비가 사용된다. 하나의 특정한 측면에서, 적합한 입자: 세포 비는 1:5이다. 추가 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극 일에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 입자 대 세포의 비는 제1일에 1:1 내지 10:1이고, 추가의 입자는 이후에 10일까지 매일 또는 격일로, 1:1 내지 1:10의 최종 비 (첨가 일의 세포 수 기준)로 세포에 첨가된다. 하나의 특정한 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극 제1일에 1:1이고, 자극 제3일 및 제5일에 1:5로 조정된다. 한 측면에서, 입자는 매일 또는 격일 기준으로 자극의 제1일에 1:1, 제3일 및 제5일에 1:5의 최종 비로 첨가된다. 한 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극 제1일에 2:1이고, 자극 제3일 및 제5일에 1:10으로 조정된다. 한 측면에서, 입자는 매일 또는 격일 기준으로 자극의 제1일에 1:1, 제3일 및 제5일에 1:10의 최종 비로 첨가된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 다양한 다른 비가 본 발명에서 사용하기에 적합할 수 있음을 이해할 것이다. 특히, 비는 입자 크기 및 세포 크기 및 종류에 따라 달라질 것이다. 한 측면에서, 사용하기에 가장 일반적인 비는 제1일에 대략 1:1, 2:1 및 3:1이다.
- [0504] 추가 측면에서, 세포, 예컨대 T 세포는 작용제-코팅된 비드와 조합되고, 비드 및 세포를 후속적으로 분리한 후, 세포를 배양한다. 대안적 측면에서, 배양 전에, 작용제-코팅된 비드 및 세포를 분리하지 않고, 함께 배양한다. 추가 측면에서, 비드 및 세포는 먼저 힘, 예컨대 자력을 인가하여 농축함으로써, 세포 표면 마커의 라이게이션을 증가시켜 세포 자극을 유도한다.
- [0505] 예로서, 세포 표면 단백질은 항-CD3 및 항-CD28이 부착되는 상자성 비드 (3x28 비드)가 T 세포에 결합하도록 함으로써 라이게이션될 수 있다. 한 측면에서, 세포 (예를 들어, 10^4 내지 10^9 개 T 세포) 및 비드 (예를 들어,

1:1 비의 디나비즈® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)를 완충제, 예를 들어 PBS (2가 양이온, 예컨대, 칼슘 및 마그네슘 미함유) 내에 조합한다. 다시, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있음을 쉽게 이해할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포는 샘플에 매우 드물 수 있고, 단지 샘플의 0.01%만을 이루거나 또는 전체 샘플 (즉, 100%)이 관심 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수가 본 발명의 측면에 포함된다. 특정 측면에서, 세포 및 입자의 최대 접촉을 보장하기 위해 입자 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 (즉, 세포의 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 약 100억개 세포/ml, 90억개/ml, 80억개/ml, 70억개/ml, 60억개/ml, 50억개/ml, 또는 20억개 세포/ml의 농도가 사용된다. 한 측면에서, 1억개 세포/ml 초과와 농도가 사용된다. 추가 측면에서, 1천만, 1천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만, 또는 5천만개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 한 측면에서 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억개 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 측면에서, 1억2천5백만 또는 1억5천만개 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도의 사용은 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장을 발생시킬 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포의 보다 효율적인 포획을 가능하게 한다. 이러한 세포의 집단은 치료 가치를 가질 수 있고, 특정 측면에서 수득하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 높은 농도의 세포를 사용하면, 정상적으로는 보다 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T 세포를 보다 효율적으로 선택하는 것이 가능하다.

[0506] 한 실시양태에서, CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 코당하는 핵산으로 형질도입된 세포는, 예를 들어 본원에 기재된 방법에 의해 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 배양 중 수시간 (예를 들어, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21시간) 내지 약 14일 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일)의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 4 내지 9일의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 8일 이하, 예를 들어 7, 6 또는 5일의 기간 동안 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 배양 중 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양 중 9일 동안 확장된 동일한 세포보다 더 강력하다. 효력은, 예를 들어 다양한 T 세포 기능, 예를 들어 증식, 표적 세포 사멸, 시토카인 생산, 활성화, 이동, 또는 그의 조합에 의해 정의될 수 있다. 한 실시양태에서, 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양 중 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 항원 자극 시에 세포 배가에서 적어도 1, 2, 3 또는 4배 증가를 보인다. 한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR을 발현하는 세포는 배양 중 5일 동안 확장되고, 생성된 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양 중 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 보다 높은 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준을 나타낸다. 한 실시양태에서, 5일 동안 확장된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 세포는 동일한 배양 조건 하에 배양 중 9일 동안 확장된 동일한 세포와 비교 시 pg/ml 단위의 염증유발 시토카인 생산, 예를 들어 IFN- γ 및/또는 GM-CSF 수준에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10배 또는 그 초과와 증가를 보인다.

[0507] 또한, T 세포의 배양 시간이 60일 이상이 될 수 있도록 여러 사이클의 자극이 바람직할 수 있다. T 세포 배양을 위해 적절한 조건은 혈청 (예를 들어, 소 태아 또는 인간 혈청), 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , 및 TNF- α 또는 통상의 기술자에게 공지된 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함하는 증식 및 생존에 필요한 인자를 포함할 수 있는 적절한 배지 (예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는, 엑스-비보(X-vivo) 15 (론자(Lonza)))를 포함한다. 세포의 성장을 위한 다른 첨가제는 계면활성제, 플라스마네이트, 및 환원제, 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-메르캅토에탄올을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 배지는 혈청-비함유 또는 적절한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 정의된 세트의 호르몬으로 보충된 아미노산, 피루브산나트륨, 및 비타민, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장을 위해 충분한 양의 시토카인(들)과 함께 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, 엑스-비보 15, 및 엑스-비보 20, 최적화제를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험적 배양에만 포함되고, 대상체 내에 주입되어야 하는 세포의 배양물에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 지지하기 위해 필요한 조건, 예를 들어 적절한 온도 (예를 들어, 37°C) 및 분위기 (예를 들어, 공기 플러스 5% CO₂) 하에 유지된다.

[0508] 한 실시양태에서, 세포는, 예를 들어 본원에 기재된 방법, 예컨대 유동 세포측정법에 의해 측정 시 14일 확장 기간에 걸쳐 세포의 적어도 200-배 (예를 들어, 200-배, 250-배, 300-배, 350-배) 증가를 발생시키는, 1종 이상의 인터류킨을 포함하는 적절한 배지 (예를 들어, 본원에 기재된 배지 중에서 확장된다. 한 실시양태에서, 세포는 IL-15 및/또는 IL-7 (예를 들어, IL-15 및 IL-7)의 존재 하에 확장된다.

[0509] 실시양태에서, 본원에 기재된 방법, 예를 들어 CAR-발현 세포 제조 방법은, 예를 들어 항-CD25 항체 또는 그의 단편, 또는 CD25-결합 리간드, IL-2를 사용하여 세포 집단으로부터 T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포를 제거하는 것을 포함한다. 세포 집단으로부터 T 조절 세포, 예를 들어 CD25+ T 세포를 제거하는 방법은 본원에 기

재되어 있다. 실시양태에서, 방법, 예를 들어 제조 방법은 세포 집단 (예를 들어, T 조절 세포, 예컨대 CD25+ T 세포가 고갈된 세포 집단; 또는 항-CD25 항체, 그의 단편, 또는 CD25-결합 리간드와 이전에 접촉시킨 세포 집단을 IL-15 및/또는 IL-7과 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 세포 집단 (예를 들어, 항-CD25 항체, 그의 단편, 또는 CD25-결합 리간드와 이전에 접촉시킨 것)은 IL-15 및/또는 IL-7의 존재 하에 확장된다.

[0510] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 CAR-발현 세포의 제조 동안 인터류킨-15 (IL-15) 폴리펩티드, 인터류킨-15 수용체 알파 (IL-15Ra) 폴리펩티드, 또는 IL-15 폴리펩티드 및 IL-15Ra 폴리펩티드, 예를 들어 het IL-15 둘 다의 조합을 포함하는 조성물과, 예를 들어 생체외에서 접촉된다. 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 CAR-발현 세포의 제조 동안 IL-15 폴리펩티드를 포함하는 조성물과, 예를 들어 생체외에서 접촉된다. 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 CAR-발현 세포의 제조 동안 IL-15 폴리펩티드 및 IL-15Ra 폴리펩티드 둘 다의 조합을 포함하는 조성물과, 예를 들어 생체외에서 접촉된다. 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 CAR-발현 세포의 제조 동안 het IL-15를 포함하는 조성물과, 예를 들어 생체외에서 접촉된다.

[0511] 한 실시양태에서 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 생체외 확장 동안 het IL-15를 포함하는 조성물과 접촉된다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 생체외 확장 동안 IL-15 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 접촉된다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 생체외 확장 동안 IL-15 폴리펩티드 및 IL-15Ra 폴리펩티드 둘 다를 포함하는 조성물과 접촉된다. 한 실시양태에서, 접촉은 림프구 하위집단, 예를 들어 CD8+ T 세포의 생존 및 증식을 발생시킨다.

[0512] 상이한 자극 횟수에 노출된 T 세포는 상이한 특징을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 분리반출술을 거친 말초 혈액 단핵 세포 생성물은 세포독성 또는 억제자 T 세포 집단 (TC, CD8+)보다 큰 헬퍼 T 세포 집단 (TH, CD4+)을 갖는다. CD3 및 CD28 수용체를 자극하는 것에 의한 T 세포의 생체외 확장은 T 세포의 집단을 생산하고, 이는 약 8-9일 전에는 주로 TH 세포로 이루어지는 반면에, 약 8-9일 후 T 세포의 집단은 점점 더 큰 TC 세포의 집단을 포함한다. 따라서, 치료의 목적에 따라, 대상체에게 주로 TH 세포를 포함하는 T 세포 집단을 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, TC 세포의 항원-특이적 하위세트가 단리되면, 이 하위세트를 더 큰 정도로 확장시키는 것이 유리할 수 있다.

[0513] 추가로, CD4 및 CD8 마커에 더하여, 다른 표현형 마커는 세포 확장 과정 동안 유의하게, 그러나 대부분 재현가능하게 상이하다. 따라서, 그러한 재현가능성 때문에, 특정 목적을 위해 활성화된 T 세포 생성물을 적절하게 조정할 수 있다.

[0514] 본원에 기재된 CAR이 구축되면, 다양한 검정을 사용하여 분자의 활성, 예컨대 비제한적으로 항원 자극 후 T 세포를 확장시키는 능력, 재자극의 부재 하에 T 세포 확장을 지속시키는 능력, 및 적절한 시험관내 및 동물 모델에서의 항암 활성을 평가할 수 있다. 본 발명의 CAR의 효과를 평가하기 위한 검정이 하기에 추가로 상세하게 기재되어 있다.

[0515] 1차 T 세포에서 CAR 발현의 웨스턴 블롯 분석은, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 695에 기재된 바와 같이 단량체 및 이량체의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0516] 항원 자극 후에 CAR⁺ T 세포의 시험관내 확장은 유동 세포측정법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 혼합물을 αCD3/αCD28 aAPC로 자극한 후, 분석할 프로모터의 제어 하에 GFP를 발현하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입한다. 예시적인 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1α, 유비퀴틴 C, 또는 포스포글리세로키나제 (PGK) 프로모터를 포함한다. GFP 형광은 유동 세포측정법에 의해 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ T 세포 하위세트에서 배양 제6일에 평가된다. 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)]을 참조한다. 대안적으로, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 혼합물을 제0일에 αCD3/αCD28 코팅된 자기 비드로 자극하고, 2A 리보솜 스킵핑 서열을 사용하여 eGFP와 함께 CAR을 발현하는 비시스트론 렌티바이러스 벡터를 사용하여 제1일에 CAR로 형질도입한다. 배양물을 세척 후 본원에 기재된 바와 같은 암 연관 항원 K562 세포 (본원에 기재된 바와 같은 K562-발현 암 연관 항원), 야생형 K562 세포 (K562 야생형), 또는 항CD3 및 항-CD28 항체의 존재 하에 hCD32 및 4-1BBL을 발현하는 K562 세포 (K562-BBL-3/28)로 재-자극한다. 외인성 IL-2를 배양물에 격일로 100 IU/ml로 첨가한다. GFP⁺ T 세포를 비드-기반 카운팅을 사용하여 유동 세포측정법에 의해 카운팅한다. 예

를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)]을 참조한다.

- [0517] 재-자극의 부재 하에 지속되는 CAR⁺ T 세포 확장을 또한 측정할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)]을 참조한다. 간략하게, 평균 T 세포 부피 (fl)는 제0일에 αCD3/αCD28 코팅된 자기 비드를 사용한 자극, 및 제1일에 나타낸 CAR을 사용한 형질도입 후에 쿨터 멀티사이저 III(Coulter Multisizer III) 입자 계수기, 넥셀롬 셀로미터 비전(Nexcelom Cellometer Vision) 또는 밀리포어 셉터(Millipore Scepter)를 사용하여 배양 제8일에 측정한다.
- [0518] 동물 모델이 또한, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 698에 기재된 바와 같이 CAR-발현 세포 활성을 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0519] 용량 의존성 CAR 치료 반응은, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 699에 기재된 바와 같이 평가될 수 있다.
- [0520] 세포 증식 및 시토킨 생산의 평가는, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 700에 기재된 바와 같이 이전에 기재된 바 있다.
- [0521] 세포독성은, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 701에 기재된 바와 같은 표준 51Cr-방출 검정에 의해 평가될 수 있다.
- [0522] 세포독성은 또한, 예를 들어 엑스셀리전스(xCELLigence) 실시간 세포 분석기 (RTCA)를 사용하여 부착 세포의 전기 임피던스에서의 변화를 측정함으로써 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성은 다중 시점에서 측정된다.
- [0523] 영상화 기술은, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 WO2015/142675의 단락 702에 기재된 바와 같이 종양-보유 동물 모델에서 CAR의 특이적 트래킹 및 증식을 평가하기 위해 사용될 수 있다.
- [0524] 본원의 실시예 섹션에 기재된 것 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 것을 포함한 다른 검정이 또한 본원에 기재된 CAR을 평가하는데 사용될 수 있다.
- [0525] 대안적으로, 또는 본원에 개시된 방법과 조합하여, CAR-발현 세포의 검출 및/또는 정량화 (예를 들어, 시험관내 또는 생체내 (예를 들어, 임상 모니터링)); 면역 세포 확장 및/또는 활성화; 및/또는 CAR 리간드의 사용을 수반하는 CAR-특이적 선택 중 하나 이상을 위한 방법 및 조성물이 개시된다. 하나의 예시적인 실시양태에서, CAR 리간드는 CAR 분자에 결합하는, 예를 들어 CAR의 세포의 항원 결합 도메인에 결합하는 항체 (예를 들어, 항원 결합 도메인에 결합하는 항체, 예를 들어 항-이디오타입 항체; 또는 세포의 결합 도메인의 불변 영역에 결합하는 항체)이다. 다른 실시양태에서, CAR 리간드는 CAR 항원 분자 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 CAR 항원 분자)이다.
- [0526] 한 측면에서, CAR-발현 세포를 검출 및/또는 정량화하는 방법이 개시된다. 예를 들어, CAR 리간드는 시험관내 또는 생체내에서 CAR-발현 세포를 검출 및/또는 정량화하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 환자에서 CAR-발현 세포의 임상 모니터링, 또는 환자에서의 투여). 방법은
- [0527] CAR 리간드 (임의로, 표지화 CAR 리간드, 예를 들어 태그, 비드, 방사성 또는 형광 표지를 포함하는 CAR 리간드)를 제공하는 단계;
- [0528] CAR-발현 세포를 획득하는 단계 (예를 들어, CAR-발현 세포를 함유하는 샘플, 예컨대 제조 샘플 또는 임상 샘플을 획득하는 단계);
- [0529] CAR-발현 세포를 CAR 리간드와 결합이 일어나는 조건 하에 접촉시켜, 존재하는 CAR-발현 세포의 수준 (예를 들어, 양)을 검출하는 단계를 포함한다. CAR-발현 세포와 CAR 리간드의 결합은 FACS, ELISA 등과 같은 표준 기술을 사용하여 검출될 수 있다.
- [0530] 또 다른 측면에서, 세포 (예를 들어, 면역 이펙터 세포)를 확장 및/또는 활성화하는 방법이 개시된다. 방법은
- [0531] CAR-발현 세포 (예를 들어, 제1 CAR-발현 세포 또는 일시적 발현 CAR 세포)를 제공하는 단계;
- [0532] 상기 CAR-발현 세포를 CAR 리간드, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CAR 리간드와 면역 세포 확장 및/또는 증식이 일어나는 조건 하에 접촉시켜, 활성화 및/또는 확장된 세포 집단을 생산하는 단계

- [0533] 를 포함한다.
- [0534] 특정 실시양태에서, CAR 리간드가 기질 상에 존재한다 (예를 들어, 기질, 예를 들어 비-자연 발생 기질에 고정되거나 부착됨). 일부 실시양태에서, 기질은 비-세포 기질이다. 비-세포 기질은 플레이트 (예를 들어, 마이크로타이터 플레이트), 막 (예를 들어, 니트로셀룰로스 막), 매트릭스, 칩 또는 비드로부터 선택된 고체 지지체일 수 있다. 실시양태에서, CAR 리간드는 기질에 (예를 들어, 기질 표면 상에) 존재한다. CAR 리간드는 기질에 공유 또는 비-공유 고정되거나, 부착되거나, 회합된다 (예를 들어 가교된다). 한 실시양태에서, CAR 리간드는 비드에 부착된다 (예를 들어, 공유 부착된다). 상기 실시양태에서, 면역 세포 집단은 시험관내 또는 생체의 확장될 수 있다. 방법은 CAR 분자의 리간드의 존재 하에, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 면역 세포의 집단을 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0535] 다른 실시양태에서, 세포를 확장 및/또는 활성화하는 방법은 추가로 제2 자극 분자, 예를 들어 CD28의 첨가를 포함한다. 예를 들어, CAR 리간드 및 제2 자극 분자는 기질, 예를 들어 1개 이상의 비드에 고정되어, 증가된 세포 확장 및/또는 활성화를 제공할 수 있다.
- [0536] 또 다른 측면에서, CAR 발현 세포를 선택 또는 풍부화하는 방법이 제공된다. 방법은 CAR 발현 세포를 본원에 기재된 바와 같은 CAR 리간드와 접촉시키는 단계; 및 CAR 리간드의 결합에 기초하여 세포를 선택하는 단계를 포함한다.
- [0537] 또 다른 실시양태에서, CAR 발현 세포를 고갈, 감소 및/또는 사멸시키는 방법이 제공된다. 방법은 CAR 발현 세포를 본원에 기재된 바와 같은 CAR 리간드와 접촉시키는 단계; 및 CAR 리간드의 결합에 기초하여 세포를 표적화하여, CAR-발현 세포의 수를 감소시키고/거나 그를 사멸시키는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 리간드는 독성제 (예를 들어, 독소 또는 세포 제거 약물)에 커플링된다. 또 다른 실시양태에서, 항-이디오타입 항체는 이펙터 세포 활성화, 예를 들어 ADCC 또는 ADC 활성을 유발할 수 있다.
- [0538] 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있는 예시적인 항-CAR 항체가 예를 들어 WO 2014/190273 및 문헌 [Jena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS March 2013 8:3 e57838]에 기재되어 있고, 그의 내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0539] 일부 측면 및 실시양태에서, 본원의 조성물 및 방법은, 예를 들어 2015년 7월 31일에 출원된 미국 일련 번호 PCT/US2015/043219에 기재된 바와 같이 T 세포의 특정 하위세트에 대해 최적화되고, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, T 세포의 최적화된 하위세트는 대조군 T 세포, 예를 들어 동일한 구조물을 발현하는 상이한 유형 (예를 들어, CD8+ 또는 CD4+)의 T 세포와 비교 시 증진된 지속성을 나타낸다.
- [0540] 일부 실시양태에서, CD4+ T 세포는 본원에 기재된 CAR을 포함하며, 상기 CAR은 CD4+ T 세포에 적합한 (예를 들어 그에 최적화된, 예를 들어 증진된 지속성으로 이어지는) 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 ICOS 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD8+ T 세포는 본원에 기재된 CAR을 포함하며, 상기 CAR은 CD8+ T 세포에 적합한 (예를 들어 그에 최적화된, 예를 들어 증진된 지속성으로 이어지는) 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 4-1BB 도메인, CD28 도메인, 또는 ICOS 도메인 이외의 또 다른 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 본원에 기재된 항원 결합 도메인, 예를 들어 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 포함한다.
- [0541] 한 측면에서, 대상체, 예를 들어 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법이 본원에 기재된다. 방법은 상기 대상체에 유효량의
- [0542] 1) 항원 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 항원 결합 도메인;
- [0543] 막횡단 도메인; 및
- [0544] 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 제1 공동자극 도메인, 예를 들어 ICOS 도메인
- [0545] 을 포함하는 CAR을 포함하는 CD4+ T 세포 (CARCD4+); 및
- [0546] 2) 항원 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 항원 결합 도메인;
- [0547] 막횡단 도메인; 및
- [0548] 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 제2 공동자극 도메인, 예를 들어 4-1BB 도메인, CD28 도메인, 또는 ICOS 도메인 이외의 또 다른 공동자극 도메인

- [0549] 을 포함하는 CAR을 포함하는 CD8+ T 세포 (CARCD8+)
- [0550] 를 투여하는 것을 포함하며;
- [0551] 여기서 CARCD4+ 및 CARCD8+는 서로 상이하다.
- [0552] 임의로, 방법은
- [0553] 3) 항원 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 항원 결합 도메인;
- [0554] 막횡단 도메인; 및
- [0555] 세포내 신호전달 도메인
- [0556] 을 포함하는 CAR을 포함하는 제2 CD8+ T 세포 (제2 CARCD8+)
- [0557] 를 투여하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 제2 CARCD8+은 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 CARCD8+ 상에 존재하지 않는 공동자극 신호전달 도메인을 포함하고, 임의로 ICOS 신호전달 도메인은 포함하지 않는다.
- [0558] 생체중합체 전달 방법
- [0559] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 1종 이상의 CAR-발현 세포는 생체중합체 스캐폴드, 예를 들어 생체중합체 이식물을 통해 대상체에게 투여 또는 전달될 수 있다. 생체중합체 스캐폴드는 본원에 기재된 CAR-발현 세포의 전달, 확장, 및/또는 분산을 지지하거나 증진시킬 수 있다. 생체중합체 스캐폴드는 자연 발생적 또는 합성적일 수 있는 생체적합성 (예를 들어, 염증 또는 면역 반응을 실질적으로 유도하지 않음) 및/또는 생분해성 중합체를 포함한다. 예시적인 생체중합체는, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 2015년 3월 13일에 출원된 국제 출원 W02015/142675의 단락 1004-1006에 기재되어 있다.
- [0560] 제약 조성물 및 치료
- [0561] 일부 측면에서, 개시내용은 본원에 기재된 바와 같이 생산된 CAR-발현 세포를, 임의로 1종 이상의 다른 요법과 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 CAR-발현 세포를 포함하는 반응 혼합물을, 임의로 1종 이상의 다른 요법과 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 CAR-발현 세포를 포함하는 반응 혼합물을 운송 또는 수신하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 개시내용은 본원에 기재된 바와 같이 생산된 CAR-발현 세포를 수신하는 것을 포함하고, 추가로 환자에게 CAR-발현 세포를, 임의로 1종 이상의 다른 요법과 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 개시내용은 CAR-발현 세포를 본원에 기재된 바와 같이 생산하는 것을 포함하고, 추가로 환자에게 CAR-발현 세포를, 임의로 1종 이상의 다른 요법과 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 다른 요법은, 예를 들어 암 요법 예컨대 화학요법일 수 있다.
- [0562] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR을 발현하는 세포는 Treg 세포 집단을 감소시키는 분자와 조합되어 대상체에게 투여된다. Treg 세포의 수를 감소시키는 (예를 들어, 고갈시키는) 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 CD25 고갈, 시클로포스파미드 투여, GITR 기능 조절을 포함한다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 분리반출술 전 또는 본원에 기재된 CAR-발현 세포의 투여 전에 대상체에서 Treg 세포의 수를 감소시키는 것은 종양 미세환경에서 원치않는 면역 세포 (예를 들어, Treg)의 수를 감소시키고 대상체의 재발 위험을 감소시키는 것으로 여겨진다.
- [0563] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 요법, 예를 들어 CAR-발현 세포는 GITR을 표적화하고/거나 GITR 기능을 조정하는 분자, 예컨대 조절 T 세포 (Treg)를 고갈시키는 GITR 효능제 및/또는 GITR 항체와 조합되어 대상체에게 투여된다. 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR을 발현하는 세포는 시클로포스파미드와 조합되어 대상체에게 투여된다. 한 실시양태에서, GITR 결합 분자 및/또는 GITR 기능을 조정하는 분자 (예를 들어, GITR 효능제 및/또는 Treg 고갈 GITR 항체)는 CAR-발현 세포 전에 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, GITR 효능제는 세포의 분리반출술 전에 투여될 수 있다. 실시양태에서, 시클로포스파미드는 CAR-발현 세포의 투여 (예를 들어, 주입 또는 재-주입) 전 또는 세포의 분리반출술 전에 대상체에게 투여된다. 실시양태에서, 시클로포스파미드 및 항-GITR 항체는 CAR-발현 세포의 투여 (예를 들어, 주입 또는 재-주입) 전 또는 세포의 분리반출술 전에 대상체에게 투여된다. 한 실시양태에서, 대상체는 암 (예를 들어, 고형 암 또는 혈액암 예컨대 ALL 또는 CLL)을 갖는다. 한 실시양태에서, 대상체는 CLL을 갖는다. 실시양태에서, 대상체는 ALL을 갖는다. 실시양태에서, 대상체는 고형 암, 예를 들어 본원에 기재된 고형 암을 갖는다. 예시적인 GITR 효능제는, 예를 들어 GITR 융합 단백질

질 및 항-GITR 항체 (예를 들어, 2가 항-GITR 항체) 예컨대, 예를 들어 미국 특허 번호 6,111,090, 유럽 특허 번호 090505B1, 미국 특허 번호 8,586,023, PCT 공개 번호 WO 2010/003118 및 2011/090754에 기재된 GITR 융합 단백질, 또는 예를 들어 미국 특허 번호 7,025,962, 유럽 특허 번호 1947183B1, 미국 특허 번호 7,812,135, 미국 특허 번호 8,388,967, 미국 특허 번호 8,591,886, 유럽 특허 번호 EP 1866339, PCT 공개 번호 WO 2011/028683, PCT 공개 번호: WO 2013/039954, PCT 공개 번호 WO2005/007190, PCT 공개 번호 WO 2007/133822, PCT 공개 번호 WO2005/055808, PCT 공개 번호 WO 99/40196, PCT 공개 번호 WO 2001/03720, PCT 공개 번호 WO99/20758, PCT 공개 번호 WO2006/083289, PCT 공개 번호 WO 2005/115451, 미국 특허 번호 7,618,632, 및 PCT 공개 번호 WO 2011/051726에 기재된 항-GITR 항체를 포함한다.

[0564] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR 발현 세포는 GITR 효능제, 예를 들어 본원에 기재된 GITR 효능제와 조합되어 대상체에 투여된다. 한 실시양태에서, GITR 효능제는 CAR-발현 세포 전에 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, GITR 효능제는 세포의 분리반출술 전에 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체는 CLL을 갖는다.

[0565] 본원에 기재된 방법은 CAR-발현 세포를 제약 조성물 중에 제제화하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 제약 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 CAR-발현 세포, 예를 들어 복수의 CAR-발현 세포를 1종 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함할 수 있다. 상기 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 조성물은, 예를 들어 정맥내 투여를 위해 제제화될 수 있다.

[0566] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 예를 들어 내독소, 미코플라스마, 복제 적격 렌티바이러스 (RCL), p24, VSV-G 핵산, HIV gag, 잔류 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드, 마우스 항체, 폴딩된 인간 혈청, 소 혈청 알부민, 소 혈청, 배양 배지 성분, 박터 패키징 세포 또는 플라스미드 성분, 박테리아 및 진균으로 이루어진 군으로부터 선택된 오염물이 실질적으로 없고, 예를 들어 검출가능한 수준의 오염물이 없다. 한 실시양태에서, 박테리아는 알칼리 게네스 파에칼리스(*Alcaligenes faecalis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스태필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 및 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 군 A로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종이다.

[0567] "면역학적 유효량", "항암 유효량", "암-억제 유효량", 또는 "치료량"이 제시되는 경우에, 투여할 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 및 환자 (대상체)의 상태에서의 개별 차이를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 본원에 기재된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^9 개 세포/kg 체중, 일부 경우에 10^5 내지 10^6 개 세포/kg 체중 (상기 범위 내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여될 수 있는 것으로 일반적으로 언급될 수 있다. T 세포 조성물은 또한 이들 투여량으로 다중 횟수로 투여될 수 있다. 세포는 면역요법에서 통상적으로 공지되어 있는 주입 기술을 사용함으로써 투여될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988] 참조).

[0568] 일부 실시양태에서, CAR 세포 (예를 들어, CD19 CAR 세포)의 용량은 약 1×10^6 , 1.1×10^6 , 2×10^6 , 3.6×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1.8×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 또는 5×10^8 개 세포/kg을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 세포 (예를 들어, CD19 CAR 세포)의 용량은 적어도 약 1×10^6 , 1.1×10^6 , 2×10^6 , 3.6×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1.8×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 또는 5×10^8 개 세포/kg을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 세포 (예를 들어, CD19 CAR 세포)의 용량은 최대 약 1×10^6 , 1.1×10^6 , 2×10^6 , 3.6×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1.8×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 또는 5×10^8 개 세포/kg을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 세포 (예를 들어, CD19 CAR 세포)의 용량은 약 $1.1 \times 10^6 - 1.8 \times 10^7$ 개 세포/kg을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 세포 (예를 들어, CD19 CAR 세포)의 용량은 약 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 또는 5×10^8 개 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 세포 (예를 들어, CD19 CAR 세포)의 용량은 적어도 약 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , $5 \times$

10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 또는 5×10^9 개 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 세포 (예를 들어, CD19 CAR 세포)의 용량은 최대 약 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 또는 5×10^9 개 세포를 포함한다.

[0569] 특정 측면에서, 활성화된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)를 대상체에게 투여한 후, 후속적으로 혈액을 채취하고 (또는 분리반출술을 수행하고), 그로부터 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)를 활성화하고, 환자에게 이들 활성화되고 확장된 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)를 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 과정은 수주마다 다중 횟수로 수행될 수 있다. 특정 측면에서, 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)는 10cc 내지 400cc의 혈액 채취물로부터 활성화될 수 있다. 특정 측면에서, 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc 또는 100cc의 혈액 채취물로부터 활성화된다.

[0570] 대상 조성물의 투여는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 경동맥으로, 피하로, 피내로, 종양내로, 결절내로, 수질내로, 근육내로, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해, 또는 복강내로, 예를 들어 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 면역 이펙터 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포)의 조성물은 종양, 림프절, 또는 감염 부위 내로 직접 주사될 수 있다.

[0571] 실시예

[0572] 본 발명은 하기 실험 실시예를 참조하여 추가로 상세히 기재된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되고, 달리 명시되지 않는 한 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 어떠한 방식으로든 하기 실시예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안되고, 대신에 본원에 제공된 교시의 결과로서 분명해지는 임의의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0573] 실시예 1: 외인성 시토카인에 의한 CART 생산 최적화

[0574] 시토카인은 T 세포 확장, 분화, 생존 및 항상성과 관련된 중요한 기능을 갖는다. 임상 용도를 위한 가장 중요한 시토카인 패밀리 중 하나는 인터류킨 (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21을 포함한, 공통 γ -쇄 (γ_c) 패밀리 시토카인이다 (Liao et al., 2013, Immunity, 38:13-25). IL-2는 암에 대한 면역요법제로서 광범위하게 연구되어 왔다. IL-2의 보충은 임상 시험에서 항-CD19 CAR-T 세포의 항종양 능력을 증진시켰다 (Xu et al., 2013, Lymphoma, 54:255-60). 그러나, IL-2의 투여는 부작용 및 조절 T 세포의 확장 성향 및 활성화된 유도된 세포 사멸 (AICD)의 효과에 의해 제한된다 (Malek et al., 2010, Immunity, 33:153-65; 및 Lenardo et al., 1999, Annu Rev Immunol, 17:221-53). IL-7, IL-15, 및 IL-21은 각각 임상 면역요법의 유효성을 증진시킬 수 있고, IL-2에 비해 덜 독성인 것으로 보인다 (Alves et al., 2007, Immunol Lett, 108:113-20). 상기 시토카인의 역할에 대한 광범위한 전임상 및 임상 연구에도 불구하고, CAR-T 세포 임상 요법에 대한 다양한 외인성 γ_c 시토카인의 역할에 대한 다중-파라미터 비교에 연구는 부족하다.

[0575] γ -쇄 시토카인 외에, IL-18은 면역 반응을 조절하는 또 다른 면역자극 시토카인으로, 이는 T 세포에 의해 IFN- γ 의 생산을 증진시키고 CTL의 세포용해 활성을 증대시킨다 (Srivastava et al., 2010, Curr Med Chem, 17:3353-7). IL-18의 투여는, 용량이 $1000 \mu\text{g/kg}$ 만큼 높게 달하는 경우에도, 안전하고 잘 허용된다 (Robertson et al., 2006, Clin Cancer Res, 12:4265-73). 따라서, IL-18은 CAR-T 세포의 항종양을 부스팅하는데 사용되는 또 다른 후보일 수 있다.

[0576] 본 실시예에서, 상이한 외인성 시토카인의 투여의 효과를 T 세포 및 플레이트 수용체 알파 (FR α) CART 세포의 확장, 표현형, 시험관내 이펙터 기능, 및 생체내 항종양 효능에 대해 검사하였다.

[0577] 하기 물질 및 방법을 본 실시예에 기재된 실험에 사용하였다.

[0578] CAR 구축 및 렌티바이러스 제조

[0579] pELNS-C4-27z CAR 벡터를 이전에 기재된 바와 같이 구축하였다 (검토 하의 원고). 간략하게, 항-FR α C4/AFRA4 scFv를 함유하는 pHEN2 플라스미드를 5'-ataggatcccagctggtggagctctggggaggc-3' (서열식별번호: 19) 및 5'-atagctagcaccctaggacggtcagcttggtccc-3' (서열식별번호: 24) (BamHI 및 NheI는 밑줄로 표시됨)의 프라이머를 사용한 C4 단편의 PCR 증폭을 위한 주형으로서 사용하였다. PCR 생성물 및 제3 세대 자기-불활성화 렌티바이러스 발현 벡터 pELNS를 BamHI 및 NheI로 소화하였다. 이어서 소화된 PCR 생성물을 트랜스진 발현이 신장 인자-1 α (EF-1 α) 프로모터에 의해 구동되는 CD27-CD3z T-세포 신호전달 도메인을 함유하는 pELNS 벡터 내로

삽입하였다.

- [0580] 이전에 기재된 바와 같은 익스프레스 인(Express In) (오픈 바이오시스템즈(Open Biosystems))을 사용하여 인간 배아 신장 세포주 293T (293T) 세포를 4종의 플라스미드 (pVSV-G, pRSV.REV, pMDLg/p.RRE 및 pELNS-C4-27z CAR)로 형질감염시켜 고-역가 복제-결합 렌티바이러스를 생성하였다. 형질감염 24시간 및 48시간 후에 상청액을 수집하고, 초원심분리에 의해 농축시켰다. 바이러스 역가는 한계 희석 방법을 사용하여 SupT1 세포에 대한 렌티바이러스의 형질도입 효율에 기초하여 결정하였다.
- [0581] T 세포 및 세포주
- [0582] 말초 혈액 림프구는 펜실베이니아 대학교의 대학교 임상시험 심사 위원회에 의해 승인받은 프로토콜 하에 사전 동의 후에 건강한 공여자로부터 획득하였다. 1차 T 세포는 음성 선택에 의한 정제 후에 인간 면역학 코어로부터 구입하였다. T 세포를 완전 배지 (10% FBS, 100U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신 술페이트에 의해 보충된 RPMI 1640)에서 배양하고, 지침에 따라 항-CD3 및 항-CD28 mAb-코팅된 비드 (인비트로젠(Invitrogen)) 1:1 비로 자극하였다. 활성화 24시간 후에, 세포를 렌티바이러스로 MOI 5로 형질도입하였다. 다음날부터 표시된 시토카인을 형질도입된 T 세포에 10ng/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 시토카인은 3일마다 대체하였다.
- [0583] 렌티바이러스 패키징에 사용된 293T 세포 및 렌티바이러스 적정에 사용된 SupT1 세포는 ATCC로부터 획득하였다. 확립된 난소암 세포주 SKOV3 (FR α+) 및 C30 (FR α-)은 시토카인-분비 및 세포독성 검정을 위한 표적 세포로서 사용하였다. 생물발광 검정을 위해, 반딧불이 루시페라제 (fLuc)를 발현하도록 SKOV3을 렌티바이러스로 형질도입하였다.
- [0584] 유동 세포측정 분석 및 세포 분류
- [0585] 유동 세포측정법을 BD FACS칸토 상에서 수행하였다. 항-인간 CD45 (HI30), CD3 (HIT3a), CD8 (HIT8a), CD45RA (HI100), CD62L (DREG-56), CCR7 (G043H7), IL-7R α (A019D5), CD27 (M-T271), CD28 (CD28.2), CD95 (DX2), TNF-α (MAb11), IFN-γ (4S.B3), IL-2 (MQ1-17H12), 퍼포린 (B-D48), 그랜자임-B (GB11)를 바이오레전드 (Biolegend)로부터 획득하였다. 비오틴-SP-접합된 토끼 항-인간 IgG (H+L)는 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)에서 구입하였고 APC 접합된 스트렙타비딘은 바이오레전드에서 구입하였다. 항-인간 Bcl-x1 (7B2.5)은 서던바이오테크에서 구입하였다. 아포토시스 키트 및 트루카운트(TruCount) 튜브는 BD 바이오사이언스(BD Bioscience)에서 획득하였다. 말초 혈액 T 세포 카운트를 위해, 안와후 채혈을 통해 혈액을 획득하고, 인간 CD45, CD3, CD4 및 CD8 T 세포의 존재에 대해 염색하였다. 인간 CD45+-게이팅된, CD3+, CD4+ 및 CD8+ 하위세트를 트루카운트 튜브를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 정량화하였다.
- [0586] 입양 세포 요법의 생체내 연구
- [0587] 8 내지 12주령의 암컷 비-비만 당뇨병성/중증 조합 면역결핍/γ-쇄^{-/-}(NSG) 마우스를 펜실베이니아 대학교, 아브람슨 암 센터의 줄기 세포 및 이종이식편 코어로부터 획득하였다. 마우스에게 제0일에 3×10^6 개의 fLuc⁺ SKOV3 세포를 옆구리로 피하로 접종하였다. 처리 전에 군당 4 또는 5마리의 마우스로 무작위화하였다. 종양이 측정성으로 된 후에, 인간 1차 T 세포를 이전에 기재된 바와 같이 활성화하고 형질도입하였다. T 세포를 IL-2 (5ng/mL)의 존재 하에 약 2주 동안 확장시켰다. 종양 부피가 $\sim 250\text{--}300 \text{ mm}^3$ 일 때, 마우스에게 5×10^6 개의 CAR-T 세포 또는 100 µl 염수를 정맥내로 주사한 다음, 7일 동안 매일 5 µg의 IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21 또는 포스페이트 완충제 용액 (PBS)의 복강내 주사를 제공하였다. 종양 치수를 캘리퍼로 측정하고, 종양 부피를 하기 식: 종양 부피 = (길이×너비²)/2로 계산하였다. 수용자 마우스 혈액 중 전달된 T 세포의 수 및 표현형을 안와후 채혈 후에 유동 세포측정법에 의해 결정하였다. 종양 부피가 2000 mm^3 초과일 때 마우스를 안락사시키고 추가의 분석을 위해 종양을 즉시 절제하였다.
- [0588] 통계적 분석
- [0589] 통계적 분석은 프리즘 5 (그래프패드 소프트웨어) 및 IBM SPSS 통계 20.0 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 명확하게 하지 않는 한, 데이터는 평균±SEM으로 제시되었다. 2개의 군의 비교를 위해 대응표본 샘플 t-검정 또는 비파라미터 윌콕슨 순위 검정을 사용하였고, 3개 이상의 군 사이의 차이의 통계적 유의성을 시험하기 위해 반복 측정 ANOVA 또는 프리드만 검정을 사용하였다. 발견된 것은 P-값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

- [0590] 결과
- [0591] 1. 항-FR α C4 CAR의 구축 및 발현
- [0592] pELNS-C4-27z CAR은 CD8 α 힌지에 연결된 항-FR α C4 scFv 및 막횡단 영역, 이어서 CD27 세포내 신호전달 모터프와 탠덤으로의 CD3 ζ 신호전달 모이어티로 구성되었다 (도 1a). 1차 인간 T 세포는 형질도입 48시간 후에 검출했을 때 43%~65%의 형질도입 효율으로 C4 CAR 렌티바이러스 벡터에 의해 효율적으로 형질도입되었다 (도 1b). CAR 발현 수준은 CD4+ 및 CD8+ T 세포 사이에 대등하였다 ($52.6 \pm 10.2\%$ vs. $49.5 \pm 17.1\%$, $P=0.713$).
- [0593] 2. CAR 형질도입된 T (CAR-T) 세포의 확장에 대한 시토카인의 영향
- [0594] 다양한 γc 시토카인 및 IL-18의 존재 하에서의 CAR-T 세포의 확장 및 축적을 조사하였다. 배양물에서 상이한 시토카인에의 노출 3주 후에, IL2, IL-7 또는 IL-5의 존재 하에 배양된 CAR-T 세포는 1000-2000배 확장되었다. IL-18, IL-21 또는 NC (대조군, 시토카인 없음)의 존재 하에 배양된 CAR-T 세포는 200배 미만의 확장을 입증하였다 (도 1c).
- [0595] 상이한 T 세포 집단: CD3+, CD4+, 및 CD8+ T 세포에서 형질도입 15일 후에 CAR 발현 수준을 비교하였다. 상이한 시토카인의 존재 하에 성장된 각각의 군의 CAR-T 세포의 CAR 발현 수준은 CD3+, CD4+, 및 CD8+ T 세포 집단에서 유사하였다. IL-21의 존재 하에 배양된 CAR-T 세포는 다른 시토카인에 노출된 CAR-T 세포보다 더 높은 수준의 CAR 발현을 제시하였다 (CD3+ 및 CD4+ T 세포 집단에서 IL-2, 및 시토카인의 존재 하에 성장되지 않은 대조군 세포 (NC) 포함) (도 1d).
- [0596] CAR-T 세포의 보다 높은 축적에 기여하는 이유를 분석하였고, 구체적으로, T 세포의 증식 및 아포토시스를 평가하였다. 증식 반응은 7일 동안 배양된 CFSE 표지된 T 세포의 세포 분열을 모니터링함으로써 측정하였다. 도 1e에 제시된 바와 같이, IL-2 및 IL-15와 함께 배양된 T 세포는 최대의 증식 능력을 제시하였고, 이어서 IL-7인 한편; IL-21 및 IL-18은 덜 강력한 유사분열촉진 자극제였다. 상이한 시토카인에서 배양된 T 세포의 아포토시스를 아넥신-V 염색을 사용하여 시험하였다. 결과는 IL-2, IL-7 및 IL-15에서 배양된 T 세포가 NC, IL-18 및 IL-21 군과 비교 시 아포토시스를 덜 겪는다는 것을 나타내었다 (도 1f). 다음으로, 림프구 아포토시스의 주요 음성 조절제인 Bcl-xL의 발현을 FACs 분석에 의해 검사하였다. 도 1f에서의 아포토시스 결과와 일치하여, IL-2, IL-7 및 IL-15 노출은 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다에서 Bcl-xL 발현의 상향-조절을 발생시키는 한편, IL-21은 Bcl-xL 발현을 증가시키지 않는다는 경향이 존재하였다 (도 1g 및 1h). 이들 결과는 시토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7, 또는 IL-15의 존재 하에 확장된 T 세포의 증가된 축적이 Bcl-xL 항아포토시스 경로의 활성화에 의한 증식에서의 증가 및 아포토시스에서의 감소 둘 다에 의해 유발될 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0597] 3. CAR-T 세포의 표현형에 대한 시토카인의 영향
- [0598] 다음으로, 외인성 시토카인의 존재 하에 확장된 CAR-T 세포의 표현형을 검사하였다. 건강한 공여자로부터의 신선한 T 세포를 일반적으로 CD45RA 및 CD62L 발현에 기초하여 4개의 하위세트: 1) 나이브 T 세포 (CD45RA+CD62L+, Tn으로 지칭됨), 2) 중심 기억 T 세포 (CD45RA-CD62L+, Tcm으로 지칭됨), 3) 이펙터 기억 T 세포 (CD45RA-CD62L-, Tem으로 지칭됨) 및 4) CD45RA 양성 이펙터 T 세포 (CD45RA+CD62L-, Temra로 지칭됨)로 나누었다. 이어서 각각의 하위세트에 대해 CCR7, CD27, CD28, 및 CD95의 발현을 추가로 평가하였다 (도 2a). 후자의 3개의 T 세포 하위세트는 CD95에 대해 양성인 한편 Tn의 오직 작은 부분만이 CD95를 발현하였다 (CD4+에서 $3.6 \pm 1.4\%$ 및 CD8+ T 세포에서 $3.7 \pm 1.3\%$). 이러한 작은 집단은 또한 CD27, CD28 및 CCR7을 공동-발현하였고, 기억 줄기 T 세포 (Tscm)로 간주되었다. 그러나, CAR에 의한 렌티바이러스 형질도입 전 및 후의 항-CD3/CD28 비드에 의한 자극 후에, CD95는 이러한 집단에서 거의 100%로 매우 상향-조절되었다 (도 2b). CD45RA+CD62L+CD95+ T 세포의 백분율은 신선한 T 세포와 비교 시 항-CD3/CD28 비드 자극 후 둘 다의 CD4+ 및 CD8+ T 및 CAR-T 세포에서 매우 확장되었다 (도 2c 및 2d). 이러한 집단은 CD27, CD28 및 CCR7을 동시에 매우 발현하였고 (도 2a), 이는 이것이 Tscm으로 정의될 수 있다는 것을 나타낸다. 게다가, CD8+ CAR-T 세포는 보다 높은 백분율의 Tscm 세포를 가졌고, 이는 초기 CD8+ T 세포에서의 Tn의 보다 높은 비율과 관련될 수 있다 (도 2f 및 2g).
- [0599] 다양한 시토카인과의 공동-배양 14일 후에, CD45RA, CD62L 및 CD95의 발현을 측정함으로써 CAR-T 세포의 T 세포 하위세트의 비율을 조사하였다. CD4+ CAR-T 세포의 도 2e에 제시된 바와 같이, 유의하게 보다 높은 백분율의 Tscm 세포가 IL-2 군과 비교 시 IL-7 군에서 존재하였고, NC 및 IL-18 군은 보다 낮은 백분율의 Tscm을 나타내었지만 보다 높은 백분율의 Tcm을 나타내었다. IL-15 군에서의 T 세포 하위세트의 분포는 IL-2 군과 유사하였고, IL-21 군은 보다 높은 백분율의 Tcm을 나타낸 한편, Tscm의 백분율은 IL-2 군과 대등하였다. CD8+ CAR-T

세포는 각각의 시토카인-투여 군에 대한 4개의 T 세포 하위세트의 분화 및 분포에 대해 CD4+ CAR-T 세포의 그것과 유사한 경향을 입증하였고, CD8+ CAR-T 세포의 상응하는 군에서 CD4+ CAR-T 세포와 비교되는 보다 높은 비율의 Tscm을 가졌다.

[0600] 다양한 CAR-T 세포 하위집단이 자기-재생하고 다른 세포 유형으로 분화하는 능력을 추가로 연구하였다. CAR-T 세포의 4개의 하위세트를 CAR, CD45RA 및 CD62L 발현에 기초하여 분류하고, IL-2를 함유하는 배지에서 3일 동안 개별적으로 배양하였다. 도 2h에 제시된 바와 같이, Tscm 하위세트는 모든 다른 3개의 하위세트로 분화할 수 있었고, Tcm 및 Temra 하위세트는 Tem으로 분화할 수 있었다. 이들 결과는 CD62L+ 및 CD45RA+ T 세포가 각각 CD62L- 및 CD45RA- T 세포로 분화할 수 있다는 것을 나타낸다. 4개의 하위세트의 증식 능력을 CFSE 희석에 의해 평가한 다음 비교하였다. 결과는 Tscm이 다른 하위세트보다 더 강한 증식 능력을 나타낸다는 것을 제시하였다 (도 2i). 게다가, CD45RA발현은 CFSE 강도와 역 상관되는 한편 CD62L 및 CCR7 발현은 증식과 직접 상관되었다. 모든 시토카인 군에서, CD45RA+ T 세포는 CD45RA dim 및 음성 T 세포보다 훨씬 더 낮은 CFSE 수준을 나타내었고 (도 3), 이는 CD45RA+ T 세포가 CD45RA- T 세포보다 더 강한 증식 활성을 갖는다는 것을 나타낸다. 따라서, IL-2, IL-7 및 IL-15의 존재 하에 성장된 T 세포의 증가된 축적은 CD45RA+ T 세포의 증가된 비율과 관련될 수 있다 (이는 증가된 증식 능력을 가짐) (도 4b).

[0601] CAR-T 세포의 표현형과 관련하여, CAR-T 세포는 T 세포의 표면 상에서 CD45RA, CD62L, CD27 및 CD28의 보다 낮은 발현을 나타내었지만, CCR7의 보다 높은 발현을 나타내었다 (도 4a). CAR-T 세포의 표현형에 대한 시토카인의 영향을 하기 표면 마커: CD27, CD28, CD62L, CCR7 및 IL7R α 의 발현에 기초하여 추가로 평가하였다. IL-18의 존재 하에 성장된 CAR-T 세포는 시토카인 보충 없이 성장된 것과 상당히 유사한 발현 패턴을 제시하였다. IL-2는 NC 대조군과 비교 시 CD27, CD28 CD62L, CCR7 및 IL7R α 의 발현을 현저하게 하향-조절하였다. 다른 γ c 시토카인 중에서, IL-2 노출된 CAR-T 세포와 비교 시, IL-7 노출된 CAR-T 세포는 보다 높은 CD62L, CD27 및 CD28 발현을 나타내었지만 유의하게 감소된 CCR7 발현을 나타내었고; IL-15 군 CAR-T 세포는 보다 높은 CD27 및 CD28 발현을 나타내었고; IL-21 노출된 CAR-T 세포는 보다 높은 CD62L, CCR7, CD27 및 CD28 발현을 나타내었으며, 이는 IL-2 노출이 모든 다른 군보다 훨씬 더 성숙한 T 세포 표현형을 갖는 T 세포의 하위세트의 확장을 유도한다는 것을 나타낸다 (도 4b).

[0602] 4. CAR-T 세포의 이펙터 기능에 대한 시토카인의 영향

[0603] CAR-T 세포 이펙터 기능에 대한 시토카인의 영향을 조사하기 위해, FR α -발현 SKOV3 세포에 의한 자극 후 CAR-T 세포의 시토카인 생산 능력을 평가하였다. 자극 5시간 후에, TNF- α , IFN- γ 및 IL-2가 CAR-T 세포의 세포질에서 검출가능하였고, 41.5-54.0%의 CAR-T 세포는 TNF- α 를 생산하였고, 12.4-15.3%의 CAR-T 세포는 IFN γ 를 생산하였고, 4.3-6.5%의 CAR-T 세포는 IL-2를 생산하였다 (도 5a&b). 확장 동안 IL-2, IL-7 및 IL-15 노출은 CAR-T 세포가 TNF- α 를 생산하는 것을 촉진한 한편, IFN- γ 및 IL-2 생산 CAR-T 세포의 수는 모든 시토카인 군 사이에 대등하였다 (도 5b, 5c, 및 5d). 다음으로, 반응 CAR-T 세포의 분획 및 그의 다중기능성을 비교하였다 (도 5e). 확장 동안 IL-2에 대한 노출과 비교 시, 확장 동안 IL-18, IL-21에의 노출 또는 시토카인 노출 부재는 적은 시토카인-생산 CAR-T 세포를 유도하였고, 적은 CAR-T 세포는 표적 세포에 의한 자극 시 다중 시토카인을 생산하는 능력을 보유하였다. 이들 결과는 IL-18, IL-21 및 NC 군에서의 CAR-T 세포가 IL-2 노출된 군에서의 것보다 덜 분화된다는 표현형과 일치한다.

[0604] 이어서, 항원 자극 후 세포용해 분자 퍼포린 및 그랜자임-B의 발현에 대한 확장 동안의 시토카인 노출의 효과를 결정하였다 (도 5i). TNF- α 생산과 유사하게, IL-2, IL-7, 및 IL-15에 노출된 CAR-T 세포는 NC, IL-18 및 IL-21에 노출된 CAR-T 세포와 비교 시 증가된 퍼포린 발현을 입증하였다. 그러나, IL-21에 노출된 CAR-T 세포가 TNF- α 및 퍼포린을 적게 생산하였지만, 그랜자임-B는 최고 수준으로 생산하였다. 그 다음의 최고 수준의 그랜자임-B 생산은 확장 동안 IL-2 및 IL-15에 노출된 CAR-T 세포에서 관찰되었다. IL-18 군의 CAR-T 세포는 항원 자극 후에 퍼포린 및 그랜자임-B 발현 둘 다의 최저 양을 나타내었다 (도 5g 및 5h).

[0605] 마지막으로, 노출 동안 다양한 시토카인에 노출된 CAR-T 세포에 의한 종양 용해 활성을 루시페라제 검정에 의해 정량화하였다. 도 5f에 제시된 바와 같이, IL-2 및 IL-15와 공동-배양된 CAR-T 세포는 NC 및 IL-18와의 것보다 더 효율적으로 SKOV3을 용해시켰다 (둘 다 $P < 0.05$).

[0606] CAR-T 세포의 표현형과 그의 기능 사이의 연관성을 추가로 확인하였다. 렌티바이러스 형질도입 14일 후에 T 세포를 CAR 및 CD62L 발현에 기초하여 분류하였다. CD62L+ CAR-T 세포 (Tscm 및 Tcm)는 CD62L- CAR-T 세포 (Tem 및 Temra)와 비교 시 낮은 시토카인 생산 활성 및 더 약한 세포용해 능력을 나타내었다 (도 6). 이러한 관점에서, IL-2 및 IL-15에 노출된 CAR-T 세포는 더 많은 시토카인을 생산하였고, 더 강한 종양 용해 활성을 나타내었

으며, 이는 이들 군에서의 Tem 및 Temra의 보다 높은 비율이 부분적으로 기여할 수 있다.

[0607] 5. 항원 펄렌지 후의 CAR-T 세포의 확장 및 표현형

[0608] 특이적 항원의 펄렌지 하에서의 CAR-T 세포 확장에 대한 시토카인의 영향을 조사하기 위해, 2주 동안 IL-2에 노출된 CAR-T 세포를 표시된 시토카인의 존재 하에 7일 동안 SKOV3 (FR α +) 또는 C30 (FR α -) 세포와 함께 공동-배양하였다. 무항원 상황과 유사하게, IL-2, IL-7 및 IL-15에 노출된 CAR-T 세포는 다른 시토카인에 노출된 CAR-T 세포보다 더 높은 배수 확장을 나타내었다. 확장 동안 IL-21에 노출된 CAR-T 세포는 아폽토시스를 겪을 가능성이 더 컸다 (도 7a). 그러나, 2주 동안 표시된 시토카인에 노출된 CAR-T 세포를 7일 동안 추가의 시토카인 보충 없이 SKOV3 또는 C30 세포와 함께 공동-배양한 경우에, CAR-T 세포의 축적은 모든 군 사이에 대등하였고, IL-15 및 IL-18에 노출된 것은 최저 양의 아폽토시스를 겪었다 (도 7b). 최고 CAR 발현을 갖는 T 세포는 확장 동안 IL-21에 노출된 군이었다 (도 7c). CAR-T 세포의 표현형을 또한 분석하였다. CD27 및 CD28은 모든 시토카인 군에서 CD8+ 및 CD4+ CAR-T 세포에서 각각 고도로 발현되었다. 무항원 확장과 유사하게, IL-21 노출은 CAR-T 세포에서 CD27 및 CD28의 발현을 증가시켰다 (도 7d). 기억 T 세포의 4개의 하위세트와 관련하여, 결과는 무항원 연구와 상이하였다: 시토카인 부재, IL-18 및 IL-21 모든 군에서 Tscm은 드물었고 Tem은 50% 초과를 차지하였다. 시토카인은 기억 T 하위세트의 구성에 대해 어떠한 유의한 영향도 갖지 않았고, IL-7 노출은 Tscm의 증가에 유리하지 않았다 (도 7e).

[0609] 6. 동물 모델에서의 다양한 시토카인의 항종양 효능

[0610] 생체내 CAR-T 세포의 효능에 대한 CAR-T 세포의 생체의 확장 동안의 다양한 시토카인의 효과를 평가하기 위해, 난소암의 NSG 마우스 이종이식편 모델을 사용하여 CAR-T 세포의 지속성 및 결과를 조사하였다. 피하 SKOV3 종양을 보유하는 마우스에게 이전에 2주 동안 생체외에서 표시된 시토카인에 노출된 5x10⁶개의 C4-27z CAR-T 세포의 2회 용량을 정맥내로 주사하였다 (도 8a). C4-27z CAR-T 세포 주입을 제공받은 모든 마우스는 비형질도입된 T 세포 및 항-CD19 CAR-T 세포가 주사된 것과 비교 시 더 낮은 종양 부담을 나타내었다 (도 8b&8c). 다양한 시토카인 군 중에서, 이전의 IL-2 노출이 있는 CAR-T 세포를 제공받은 마우스는 이들 마우스에서의 최저 양의 순환 인간 T 세포와 일치하는, 최고 종양 부담을 제시하였다. NC, IL-7, IL-15, IL-18 및 IL-21 군에서의 종양은 모두 유의하게 억제되거나 심지어 사라졌고, 종양 크기에 대해 어떠한 통계적 차이도 없었다. 말초 혈액 중 전달된 T 세포의 지속성은 입양 전달 15 및 32일 후에 결정하였다. IL-7 및 IL-21 처리된 CAR-T 세포를 제공받은 마우스는 제+15일에 말초 혈액 중 다른 군보다 더 많은 양의 인간 T 세포를 갖는 것으로 보인 한편, IL-2 처리된 CAR-T 세포를 제공받은 마우스는 최저 수의 인간 T 세포를 가졌다 (도 8d). 상이한 CAR-T 세포 집단의 백분율과 관련하여, NC, IL-15, IL-18 및 IL-21 노출된 군은 모두 IL-2 군과 비교 시 더 높은 CD4+ CAR-T 세포를 나타낸 한편, CD8+ CAR-T 세포의 백분율은 모든 군 사이에 대등하였다 (도 8e). T 세포 표현형 중에서, CD62L, CD27 및 CD28은 단지 약 5-10%의 T 세포 상에서만 발현되었고, IL-21 군에서의 CD8+ T 세포가 IL-2 및 NC 군에서의 것보다 더 높게 CD28을 발현한 것을 제외하고, 이는 모든 군 사이에 대등하였다 (둘 다 P<0.05) (도 8f&8g). 흥미롭게도, NC 및 IL-18은 혈액 중 훨씬 더 높은 양의 CD45RA+CD62L+ T 세포를 가졌고, 이는 시험관내 실험으로부터 수득한 결과와 대조적이었다 (도 8f, 2e&2f). 제+32일에, 모든 CAR-T 세포 군에서의 순환 인간 T 세포는 IL-2 군을 제외하고 유의하게 확장되었고, 평균 T 세포 양은 14907/ μ l 내지 19651/ μ l (및 IL-2 군에서는 단지 242/ μ l)였다. 2마리의 마우스는 종양이 퇴행하였음에도 사망하였다.

[0611] 논의

[0612] IL-2는 입양 면역요법을 위한 림프구를 생성하기 위해 가장 빈번하게 사용되는 시토카인이다. 이는 T 세포 생존 및 확장을 촉진하고, T 세포의 종양-사멸 능력을 증진시킨다. 그러나, IL-2의 작용은 T-세포의 활성화 유도 세포 사멸 (AICD) 및 조절 T-세포의 발생을 야기하기 때문에 제한된다 (Malek et al., Immunity, 2010, 33:153-65; 및 Lenardo et al., Annu Rev Immunol, 1999, 17:221-53). 본 실시예에서, IL-2는 CAR-T 세포의 축적 및 그의 세포독성 능력을 유의하게 증가시켰지만, IL-2 노출된 CAR-T 세포는 입양 전달 후 열등한 생체내 항종양 면역을 나타내었다. 이러한 발견은 시험관내 종양-용해와 생체내 종양 근절 사이의 역전 관계를 입증한다. IL-2 노출된 CAR-T 세포는 CD62L, CCR7, CD27 및 CD28의 낮은 발현을 갖는 상대적으로 성숙한 표현형을 디스플레이하였고, 이는 생체내에서 덜 지속적이었다 (Yang et al., Cancer Immunol Immunother, 2013, 62:727-36). 최근 연구는 덜 분화된 T 세포의 입양 전달이 뛰어난 종양 퇴행과 상관된다는 것을 제시한 바 있고, 이는 IL-2 노출된 CAR-T 세포가 다른 군보다 덜 효과적이라는 발견을 지지한다 (Gattinoni et al., Nat Med, 2011, 17:1290-7; 및 Markley et al., Blood, 2010, 115:3508-19).

[0613] IL-15는 IL-2와 유사한 성능의 CAR-T 세포 확장의 자극 및 종양-용해 기능을 나타내었지만, 덜 분화된 표현형을

유도하였다 (CD27 및 CD28의 보다 높은 발현). 따라서, IL-15는 CAR-T 세포의 생체내 지속성을 지지하고 동물 모델에서 보다 우수한 항종양 면역을 제시한다.

[0614] IL-2 및 IL-15와 비교하면, IL-7은 CAR-T 세포 확장을 촉진하는 유사한 능력을 제시하였지만, 무항원 상황에서 보다 높은 수준의 CD62L 발현을 제시하였고 최고 비율의 CAR-Tscm 세포를 나타내었다. 따라서, IL-2에 노출된 CAR-T 세포와 비교 시, 항원 챌린지의 부재 하의 IL-7의 생체외 노출은 CAR-T 세포의 항종양 효능을 증진시켰다. IL-7 노출된 CAR-T 세포는 IL-2보다 더 우수한 생체내 항종양 효능을 발생시키지 않았고, 항원 챌린지 하에서의 CAR-T 세포의 낮은 확장으로 인해 효능은 IL-15보다 열등하였다.

[0615] IL-21은, 예를 들어 Bcl-xL 발현을 촉진함으로써 항아포토시스 능력을 증진시킬 수 없기 때문에, CAR-T 세포 측적에 대해 거의 효과를 발휘하지 않았다. 그러나, IL-21은 심지어 항원 챌린지의 상황 하에서도 CD62L, CCR7, CD27 및 CD28의 높은 발현의 표현형을 갖는 덜 분화된 CAR-T 세포의 확장을 유도하였다. 따라서, IL-21 노출된 CAR-T 세포는 동물 모델에서 최상의 지속성을 제시하였고, IL-21 생체내 주사는 또한 IL-15를 제외한 다른 시토카인 군보다 종양 근절을 촉진하는데 있어서 보다 우수한 효능을 나타내었다. 이들 결과는 덜 분화된 CAR-T 세포가 뛰어난 종양 퇴행과 상관된다는 이전의 발견과 일치한다.

[0616] IL-18은 IL-1 패밀리에 속하는 염증유발 시토카인으로, 이는 단핵구, NK 세포, 및 T 세포를 활성화함으로써 선천성 및 적응성 면역 반응 둘 다, 및 IFN- γ 뿐만 아니라 다른 시토카인의 생체내 생산을 조절한다 (Srivastava et al., Curr Med Chem, 2010, 17:3353-7). 본원에 제시된 결과는, IL-18 군에서의 대부분의 결과가 NC 군과 유사하고 대등하기 때문에, IL-18이 생체외 실험에서 CAR-T 세포의 확장, 표현형 및 기능에 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. IL-18은 대조 (NC) 군과 비교 시 항원 챌린지 하에 T 세포의 증식을 거의 촉진하지 않았고 더 많은 T 세포 생존을 유지하였다. 생체내 연구는 IL-18이 시토카인 보충의 부재 하의 마우스와 비교 시 CAR-T 세포 효능에 대해 어떠한 유의한 영향도 갖지 않는다는 것을 제시한다.

[0617] 요약하면, 이들 실험의 발견은 CAR-T 세포 확장을 위한 생체외 IL-2 보충이, 그것이 폭넓게 사용되기는 하지만, 최적 전략이 아니라는 것을 나타낸다. IL-18, IL-21 또는 시토카인 보충 부재와 관련하여, 이들이 상대적으로 효과적인 CAR-T 세포를 유도할 수 있지만, CAR-T 세포 확장을 충분히 효과적으로 촉진하지 않아서, 충분한 CAR-T 세포는 임상 용도를 위해 제한된 확장 시간 내에 제조될 수 있다. 따라서, IL-15 및 IL-7이 CAR-T 세포 확장을 위한 보다 우수한 작용제일 수 있다. 게다가, IL-7 및 IL-15 보충의 조합은 Tscm의 생성을 지지하고, 이는 더 "어린" CAR-T 세포를 생산하는데 유익하다. 생체내 시토카인 주사와 관련하여, 모든 γ c 시토카인 보충은, 이들 중 많은 것이 CAR-T 세포의 확장에 유리하기 때문에 항종양 효능을 증진시키며, IL-15가 최상의 효과를 나타낸다. 주사에 의해 IL-15 노출된 CAR-T 세포를 제공받은 마우스는, 부분적으로는 종양 치료 동안의 CAR-T 세포의 증가된 확장 능력 및 증가된 지속성으로 인해, 증가된 효능을 가졌다. 따라서, 이들 실험의 결과는 IL-7 및 IL-15가 치유적 치료를 위해 가장 효과적인 CAR-T 세포 확장을 촉진하고 T 세포 표현형을 유도할 가능성을 제시한다는 것을 나타낸다.

[0618] 실시예 2: 세포 성장 및 형질도입 효율에 대한 CD25 고갈의 효과

[0619] CD25로도 공지되어 있는 인터류킨-2 α -쇄는 조절 T 세포 (Treg)에 의해 발현되지만 또한 만성 B 세포 백혈병 (CLL) 세포 상에서도 발견된 바 있다 (CLL 환자의 85% 초과에서). Treg는, 예를 들어 T 세포 증식을 억제함으로써, 면역 억제 기능을 갖고 면역요법의 효능을 저해할 수 있다. 분리반출술에 의한 CLL 환자로부터의 T 세포의 현행 단리 또는 풍부화는 통상적으로 유의하게 증가된 비율의 Treg 뿐만 아니라 CLL 세포를 함유한다. CD25 고갈 방법에 의한 출발 물질에서의 Treg 및 CLL 세포의 고갈은 이펙터 T 세포의 순도를 유의하게 개선시키고, 이에 의해 CAR19 발현 T 세포, 예를 들어 CART19 세포의 효력을 증가시킬 수 있다.

[0620] 도 9a는 CLL 환자의 분리반출술로부터의 세포의 유동 세포측정법 분석 플롯을 제시한다. 세포를 먼저 CD45 발현에 대해 분류한 다음, CD45-발현 (CD45+) 하위세트를 추가로 CD25 및 CD3 발현에 대해 분석하였다. 도 9a의 우측 패널에 제시된 바와 같이, CLL 환자는 높은 백분율의 CD25 발현 세포를 나타낸다.

[0621] CD25 고갈 최적화

[0622] 클리니맥스(CliniMACS) 시스템에서 밀테니로부터의 CD25 시약을 사용하여 2명의 환자로부터 분리반출술로부터의 CD25 고갈을 위한 최적 조건을 확인하기 위해 검증 실험을 수행하였다. 동일한 고갈 효율이 더 적은 시약을 사용하는 것에 의해 수득될 수 있는지 확인하기 위해 CD25 고갈 시약을 제조업체의 권장 양의 100%, 70%, 및 30%로 사용하였다. 밀테니로부터의 2개의 상이한 튜빙 세트를 또한 시험하였다. 고갈을 제조업체의 지시에 따라 수행하였다. 실험으로부터의 결과를 하기 표에 제시한다. 제어용을 위해, 항-CD3/CD28 면역자기 비드를 사용한

선택을 수행하였다.

표 5. CD25 고갈로부터의 실험 결과.

CD25 고갈 부분		100%	70%	30%
밀테니 튜빙 세트	161-01			
클리닉스 프로그램	엔리치먼트 1.1			
환자 세포	UPCC04409-15			
%CD45+CD25+ 세포	83.56%			
%CD45+CD3+ 세포	8.66%			
%CD45+CD3+CD25- 세포	5.70%			
표적에 대한 CD25+ 세포#		2.E+09	2.E+09	2.E+09
CD25 고갈을 위해 분리반출된 세포#		2.39E+09	3.41E+09	7.97.E+09
사용된 CD25 비드 부피 (mL)		2.5	2.5	2.5
CD25-고갈 분획에서의 세포#		1.05E+09	1.86E+09	3.36E+09
CD25-풍부화 분획에서의 세포#		2.05E+08	2.58E+08	5.19E+08
예상된 CD25- T-세포 수율		1.36E+08	1.95E+08	4.54E+08
고갈 분획에서의 %T 세포		6.26%	4.06%	2.50%
관찰된 수율 CD25- T 세포		6.57E+07	7.55E+07	8.40E+07
예상치의 %로서 CD3+ CD25-의 수율		48%	39%	18%
고갈 분획에서의 %B 세포		90.50%	91.6%	95.30%
생존율 CD25+ 분획		94.4%	96.2%	91.1%
생존율 CD25- 분획		95.8%	95.0%	99.0%

예상된 CD25- (CD25-음성) T 세포 수율은 각각의 조작에서 100% 효율을 가정하는 것에 의해 계산된 계산 CD25- T 세포 수율을 나타낸다. CD25- T 세포의 관찰된 수율은 각각의 조작 후의 CD25- T 세포의 수를 나타낸다. 표 5에 제시된 바와 같이, 제조업체가 권장하는 것보다 적은 시약을 사용하는 것은 CD25 고갈에서 동일한 효율을 발생시키지 않았다. 상이한 튜빙을 사용한 것은 T 세포 풍부화에서 1 로그 증가를 발생시켰다.

도 9b는 분리반출술로부터의 총 세포 (도 9b의 상부 좌측 패널), 대조군 CD3/CD28 선택된 세포 (도 9b의 상부 중간 좌측 패널), CD25 고갈된 세포 (도 9b의 상부 중간 우측 패널), 및 CD25 풍부화 세포 (도 9b의 상부 우측 패널)를 비교한 CD25 고갈의 효율을 입증하는 대표적인 유동 세포측정법 분석 플롯이다 (상부 패널). 히스토그램 (하부 패널)은 CD3-CD19- 하위세트의 CD14 발현에 의해 결정된 바와 같은 세포 집단의 단핵구 함량을 제시한다. 이들 결과는 효율적인 CD25 고갈, 및 CD25 고갈이 또한 유의한 단핵구 함량을 발생시킨다는 것을 나타낸다 (분리반출술로부터의 총 세포, 대조군, 및 CD25 풍부화 세포에서의 2% 미만과 비교 시, 61.1% CD14-발현 세포).

T 세포 집단 및 증식에 대한 CD25 고갈의 효과

다음으로, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 비율 및 증식 능력을 결정함으로써 CD25 고갈 후의 T 세포 생성물의 품질을 평가하였다.

특이적 T 세포 집단의 비율을 결정하기 위해, 상기 기재된 바와 같은 항-CD3/CD28에 의한 선택 또는 CD25 고갈 9일 후에 유동 세포측정법에 의해 세포를 분석하였다. 결과는 CD3/CD28-선택된 T 세포가 CD25 고갈된 세포와 비교 시 더 큰 비율의 CD4+ T 세포를 갖는다는 것을 제시한다 (46.8% CD4+ T 세포와 비교 시 84.6%, 도 10에서 패널의 상부 좌측의 박스). 반대로, CD25 고갈된 세포는 CD3/CD28-선택된 세포와 비교 시 더 큰 비율의 CD8+ T 세포를 가졌다 (11.5% CD8+ T 세포와 비교 시 47.2%; 도 10에서 패널의 하부 우측의 박스). 따라서, CD25 고갈은 더 큰 비율의 CD8+ T 이펙터 세포를 갖는 T 세포를 발생시킨다.

증식 능력 및 세포 생존율을 또한 대조군 (CD3/CD28 선택된 세포) 및 CD25 고갈된 세포에서 평가하였다. 대조군 및 CD25 고갈된 세포로부터의 1.6×10^7 개의 세포를 플레이팅하고, 10-13일에 걸쳐 세포 수 및 생존율을 결정하였다. 도 11a는 시간의 경과에 따른 총 세포 수를 제시하고, 도 11b는 계산된 집단 배가 (세포의 총 수로부터 계산됨)를 제시한다. 결과는 CD25 고갈된 세포가 대조군 세포와 유사한 성장 특징을 입증한다는 것을 나타낸다. 도 11c는 생존 세포의 백분율을 제시하고, 결과는 생존율이 또한 대조군과 CD25 고갈된 세포 사이에 유사하다는 것을 제시한다.

- [0631] 렌티바이러스 형질도입 효율에 대한 CD25 고갈의 효과
- [0632] 렌티바이러스 형질도입 효율에 대한 CD25 고갈의 효과는 형질도입 후 CAR의 발현을 결정함으로써 평가하였다. 상기 기재된 바와 같이 환자 분리반출술로 CD25 세포를 고갈시켰다. CD25 고갈의 효율은 CD25 고갈 전 (분리반출술 샘플) 및 후 (CD25-고갈된 분획) CD25-발현 집단을 비교한 유동 세포측정법 분석 플롯에서 입증되었다 (도 12a). CD25 고갈 후에, CD25 고갈된 분획은 약 59.2%의 CD25 음성 세포 및 단지 10.3%의 CD25 양성 세포를 함유하였다.
- [0633] CD25 고갈된 분획을 CAR19를 코딩하는 렌티바이러스 구축물로 형질도입하였다. 배양 11일 후에, CAR 발현을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. 비형질도입된 세포 및 형질도입된 CD3 선택된 세포를 대조군으로서 사용하였다. 도 12b에 제시된 바와 같이, CAR19 발현은 CD3 선택된 세포와 비교 시 CD25 고갈된 세포에서 유의하게 더 높았다 (12.8%와 비교 시 51.4%). 이 결과는 CD25 고갈된 세포가 개선된 렌티바이러스 형질도입 효율을 갖는다는 것을 입증하고, 이는 CART 요법에서 개선된 치료 효과를 위해 중요할 수 있다.
- [0634] 실시예 3: 시토카인과 CD25-고갈된 세포의 사용
- [0635] 본 실시예에서, 배양물에서의 확장 동안 시토카인 보충과 함께 CD25 고갈의 효과를 검사하였다. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 환자로부터 분리하고, 비조작으로 두거나 또는 실시예 2에 기재된 바와 같이 CD25-발현 세포를 고갈시켰다. 항-CD3 및 CD28 코팅된 비드에 의한 자극에 의해 T 세포 풍부화가 달성되었다. T 세포를 10ng/ml IL-7, 10ng/ml IL-15, 또는 10ng/ml IL-7 및 10ng/ml IL-15의 조합이 보충된 배지에서 즉시 배양하였다. 제3일에, 배지를 교체하고 동일한 시토카인을 첨가하였다. 제5일에, 100 IU IL-2/ml를 함유하는 배지를 첨가하고, 세포를 총 10일 동안 성장시켰다.
- [0636] 유동 세포측정 분석은 IL7, IL-15, 또는 IL7 및 IL15의 존재 하에서의 배양 후 비조작된 PBMC (표준 CD3/CD28 선택)와 비교 시 CD25 고갈된 세포에서의 CD3 및 CD19 세포의 분포에서의 변화를 제시한다. 출발 집단 (예를 들어, CD25 고갈 전 및 시토카인 보충과의 배양 전)에서의 CD3, CD19, 및 CD25 발현 세포의 분포를 도 13에 제시한다. 출발 집단은 높은 비율의 CD3-CD19+ 세포 (상부 패널, 도 11) 및 높은 비율의 CD25-발현 세포 (하부 패널, 도 13)를 가졌다. 조작 (CD25 고갈) 및 시토카인과의 배양 후, 분포는 도 14에 제시된 바와 같이 변화되었다. CD25 고갈된 세포는 전체적으로 비조작된 세포와 비교 시 CD19-발현 세포에서 더 큰 감소를 제시하였다.
- [0637] 증식 능력은 또한, 항-CD3 및 항-CD28 코팅된 비드에 의한 자극 후 제10일에 배양물에서 세포의 총수를 결정함으로써 동일한 세포 샘플에 대해 평가하였다. 각각의 세포 샘플에 대한 세포 수를 하기 및 도 15에 제시한다.
- [0638] 표 6. 시험관내 확장

세포	첨가된 시토카인	배양물 중 세포 #
비조작	IL-7	1.24×10^6
	IL-15	0.92×10^6
	IL-7 + IL-15	0.52×10^6
CD25-고갈	IL-7	0.93×10^6
	IL-15	1.95×10^6
	IL-7 + IL-15	3.03×10^6

- [0639]
- [0640] 이들 결과는 CD25 고갈된 T 세포의 배양 동안 IL-15의 보충이 비조작된 세포와 비교 시 증가된 확장을 발생시킨다는 것을 제시한다. 배양 동안 배지에의 IL-7 및 IL-15의 첨가는 비조작된 세포와 비교 시, 및 시토카인 IL-7 또는 IL-15를 독립적으로 첨가한 것과 비교 시 확장에서 유의한 증가를 발생시켰다. 따라서, IL-7 및 IL-15 보충의 조합은 가장 증가된 증식 능력을 갖는 T 세포를 발생시켰다.
- [0641] 실시예 4: 3-일 제조 방법
- [0642] 유전자 전달 기술의 사용에 의해, T 세포는 주요 조직적합성 복합체 (MHC)에 의해 부과되는 제약과 독립적인 특이성을 T 세포에게 부여하는 항체 결합 도메인을 그의 표면 상에서 안정적으로 발현하도록 유전자 변형될 수 있다. CAR 요법은 항체의 항원 인식 단편 (scFv, 또는 단일-쇄 가변 영역 단편)을 CD3-제타 쇄의 세포내 도메인과 융합시킨 T-세포 상에서 발현되는 합성 단백질을 이용할 수 있다. scFv의 동족 항원을 발현하는 표적 세포와의 상호작용 시, T 세포 상에서 발현된 CAR은 T-세포 활성화를 촉발하고, 이는 표적 세포 사멸 (표적 세포 용

해로도 지칭됨)로 이어질 수 있다. 추가의 공동자극 신호 예컨대 CD137 또는 CD28의 세포질 도메인과 조합된 경우에, 이들 수용체는 또한 생체내에서 T 세포 증식을 자극할 수 있고 CAR-변형된 T 세포 (CART) 지속성을 증가시킬 수 있다.

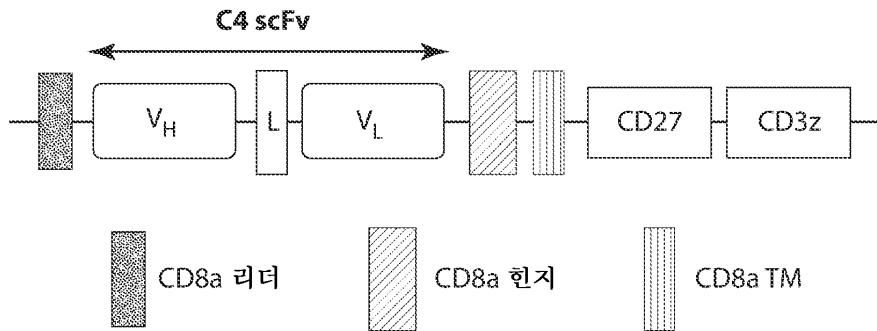
- [0643] CART 지속성의 기저 메카니즘은 연구 중이다. CAR의 신호전달 도메인은 지속성을 결정하는 중요한 인자인 것으로 보이지만; 마우스 및 비-인간 영장류에서의 수많은 공개된 연구 (Klebanoff, C. A., et al. (2005). "Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(27): 9571-9576, Berger, C., et al. (2008). "Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates." *J Clin Invest* 118(1): 294-305, Hinrichs, C. S., et al. (2009). "Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41): 17469-17474, Wang, X., et al. (2011). "Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice." *Blood* 117(6): 1888-1898) 및 인간 임상 시험 상환 연구로부터의 데이터는 임상 전달된 생성물에서의 T 세포의 표현형이 또한 임상 전달 후 T 세포 지속성의 중요한 결정인자라는 것을 시사한다 (Xu, Y., et al. (2014). "Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15." *Blood* 123(24): 3750-3759). 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 외인성 IL-2와 조합된 항-CD3 및 항-CD28 효능제 항체의 통상적으로 사용되는 시스템 하에 생체의 배양 동안 확장된 T 세포는 확장된 T 세포를 감소된 지속성을 갖는 더 분화된 세포로 편향시키는 것으로 가설화된다. IL-2를 IL-7 및 IL-15로 대체하는 것은 시간의 경과에 따라 생체의 배양물을 더 최적의 Tscm/cm 표현형을 갖는 세포로 편향시킬 것으로 가설화된다. 또한, 더 적은 생체의 배양물을 갖는 생성물은 임상 전달 후 생착 및 지속성을 위해 최적의 표현형을 갖는 세포를 더 큰 비율로 가질 수 있는 것으로 가설화된다.
- [0644] 본 실시예는 배양물에서의 시간의 경과에 따른 세포의 표현형의 특징화 및 활성화 및 형질도입 후 상이한 시점에서의 세포의 기능성의 평가 둘 다를 행한다.
- [0645] CD3/28-자극 비드에 의한 활성화 후 T 세포로부터의 비드 제거는 도 27a-27d에 제시된 바와 같은 기계적 파괴에 의해 높은 효율로 달성될 수 있다. 비드 탈착은 이들 전임상 연구에서 좁은 구멍 피펫 팁을 통한 세포 현탁액의 반복 통과 (압출)에 의해 달성하였다. 밀폐된 배양 시스템에서, 온화한 전단을 생성하기 위한 압출은 비드 제거 전 밀폐된 시스템에 좁은 구멍 튜브의 세트를 합체시킨 밀폐된 시스템을 사용하여 수행할 수 있었다.
- [0646] 도 28에 제시된 바와 같이, 활성화되고, BBz 신호전달을 보유하는 CD19-특이적 CAR로 형질도입되고, 활성화 후 제3일의 초기 시점에 T 세포 배양물로부터 수거된 T 세포는 시험관내 강력한, 항원-특이적 세포독성 활성을 가졌다. 이들 초기 수거 세포는 또한 생체외에서 5 또는 9일의 더 긴 기간 동안 배양된 것과 유사한 패턴 및 양으로 시토카인을 생산할 수 있었고 (도 29a) 유사한 기초 분비를 가졌다 (도 29b).
- [0647] 생체의 배양 동안, T 세포의 집단은 도 30a에 제시된 바와 같이 증가하는 비율의 T 이펙터 기억 (Tem) 및 Tcm 세포를 갖는 더 분화된 표현형으로의 점진적 전이를 거친다. Tem 및 Tcm 세포의 비율에서의 이러한 증가는 최소 확장을 갖는 더 분화된 T 세포 하위세트의 증가 및/또는 나이브-유사/Tscm 세포의 감소로 인한 것이다 (도 30b).
- [0648] 도 31a는 상이한 조건 하에 생산된 CART 세포의 효력을 시험하기 위한 실험 설정을 제시한다. 도 31b는 마우스에서 Na1m6 종양 성장을 늦추는데 있어서 IL2-처리된 CART 세포의 효력을 제시한다. 제3일 세포는 모든 용량에서 증진된 효력을 입증한다. 활성화되고 4-1BBz 신호전달 도메인을 보유하는 CD19-특이적 CAR로 형질도입된 T 세포는 초기 시점에 수거된 경우에 보다 강력한 생체내 항백혈병성 활성을 제시한다. 이러한 증가된 효력은 제5일 또는 제9일 수거된 세포와 비교 시 제3일 수거된 CART19 세포에 의한 백혈병 근절에 요구되는 T 세포의 보다 낮은 용량에 의해 입증된다. CAR+ 세포의 비율을 도 31c에 제시한다.
- [0649] IL-2 및 IL7/15로 처리한 세포를 2개의 상이한 날 (제3일, 제9일)에 수거하였다. 상대적으로 낮은 용량의 0.7e6 CAR+ 세포를 사용하였다. 활성화되고, 4-1BBz 신호전달 도메인을 보유하는 CD19-특이적 CAR로 형질도입되고, IL-7/IL-15에서 배양된 T 세포는 초기 (제3일) 및 후기 (제9일) 시점에 IL-2에서 확장된 세포보다 제한된 용량에서 보다 강력한 활성을 제시하였다 (도 31d). IL7/15로 처리된 제3일 세포는 초기 시점에 증진된 효력을 입증하였다.
- [0650] 등가물

[0651]

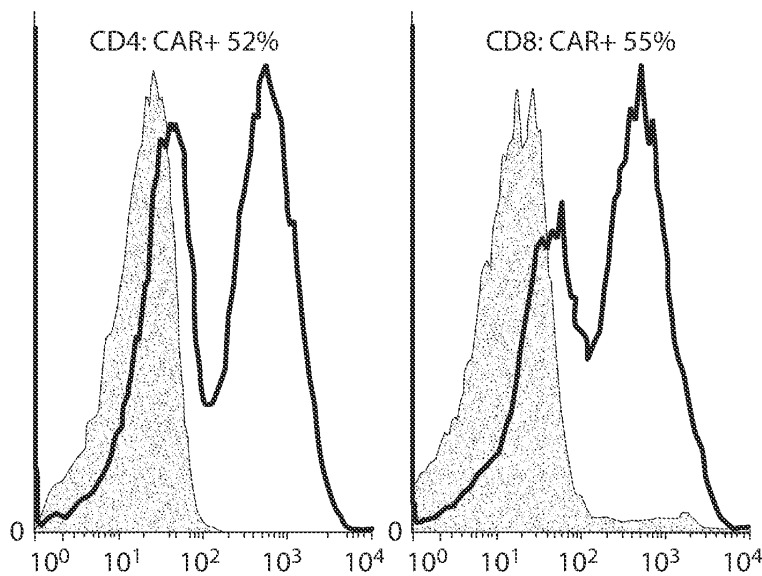
본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특허 출원, 및 공개의 개시 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명은 구체적 측면과 관련하여 개시되지만, 관련 기술분야의 다른 통상의 기술자가 본 발명의 진정한 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 본 발명의 다른 측면 및 변경을 고안할 수 있다는 것은 분명하다. 첨부된 청구범위는 모든 이러한 측면 및 동등한 변경을 포함하는 것으로 해석되는 것으로 의도된다.

도면

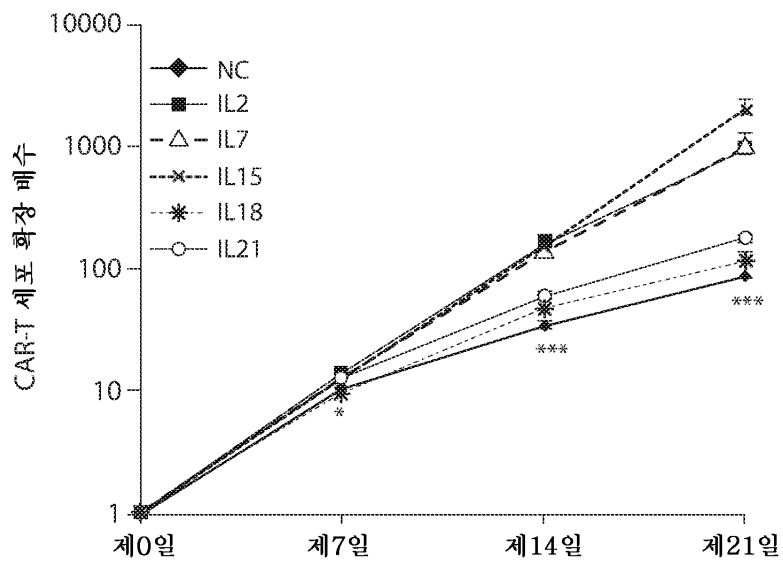
도면1a



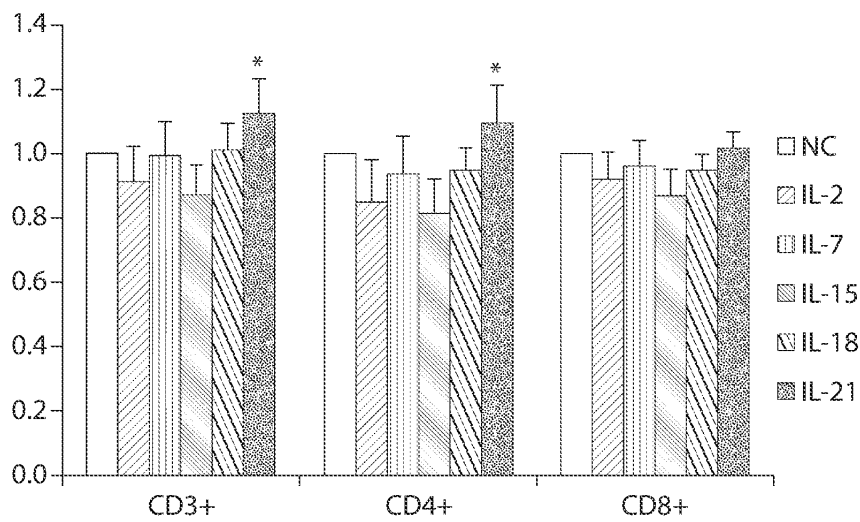
도면1b



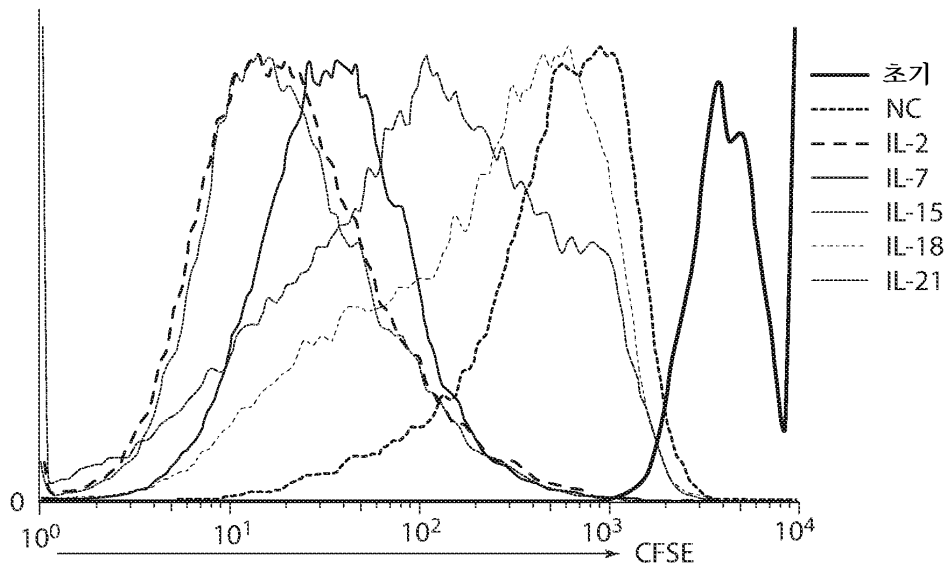
도면1c



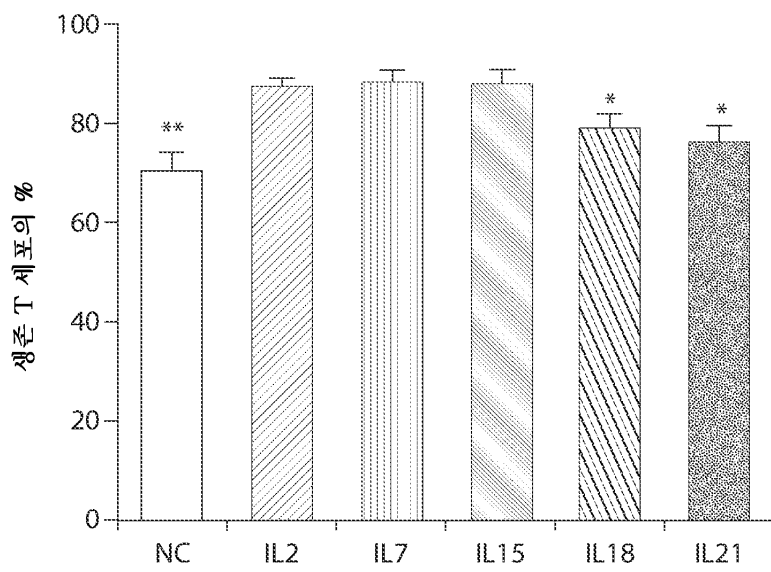
도면1d



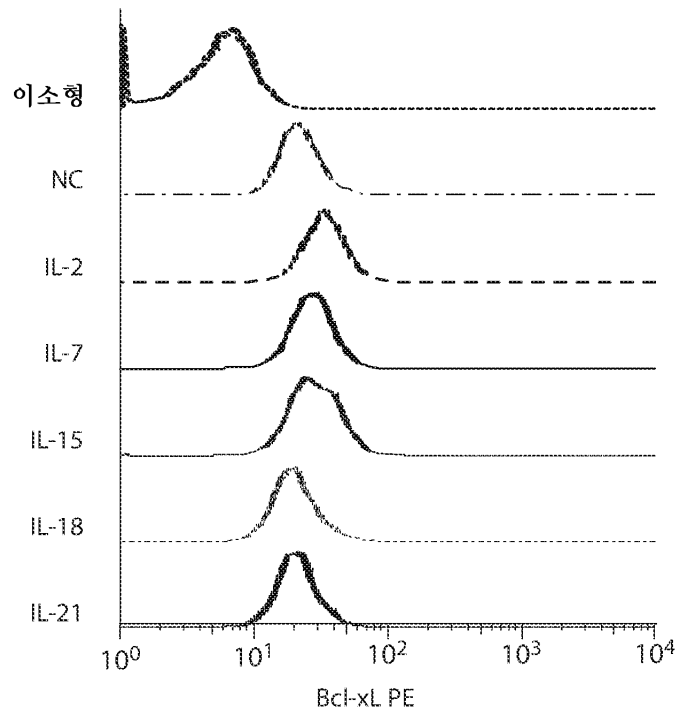
도면1e



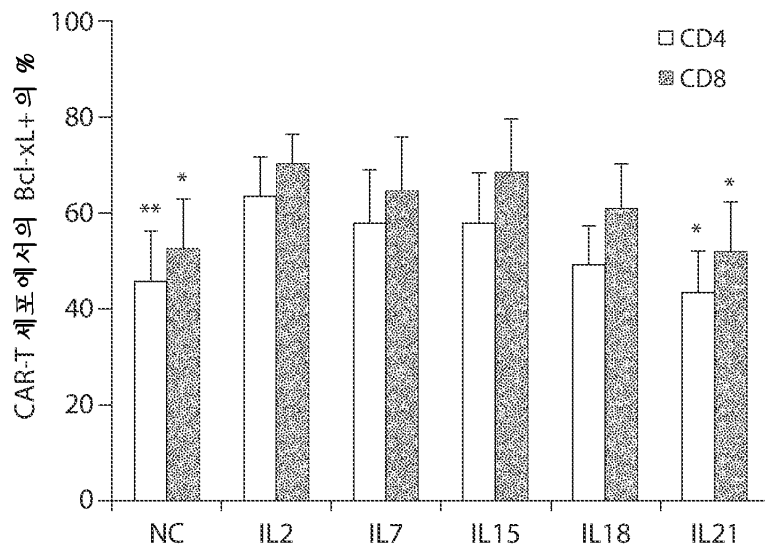
도면1f



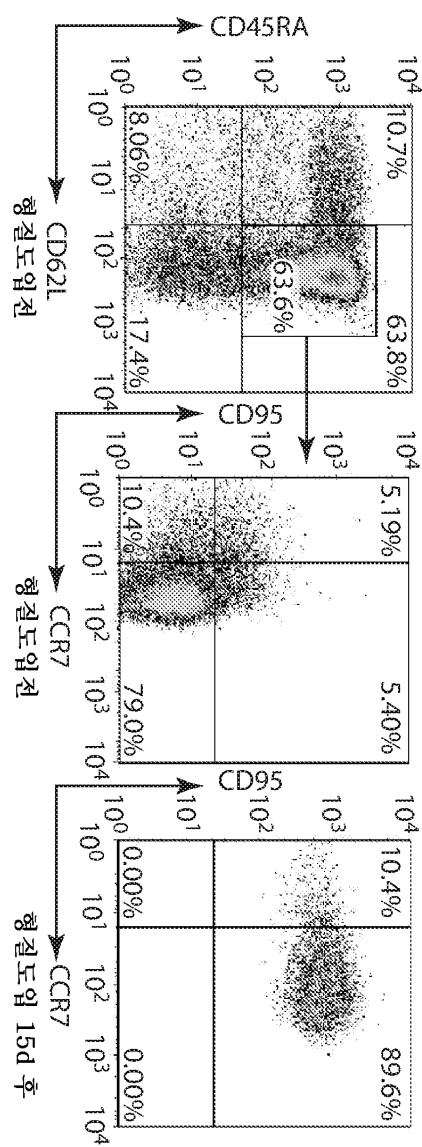
도면1g



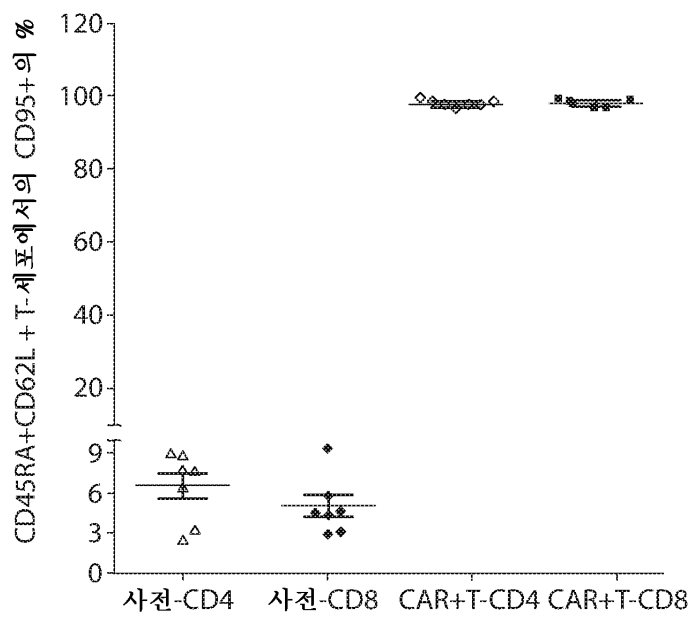
도면1h



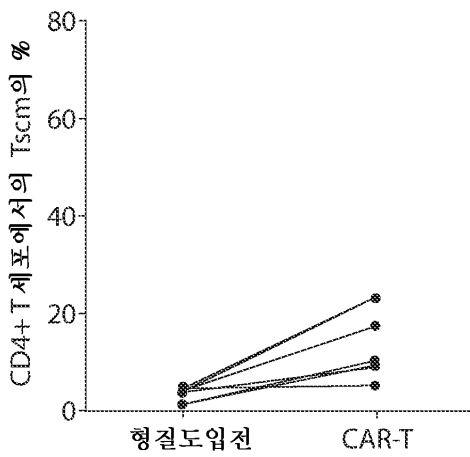
도면2a



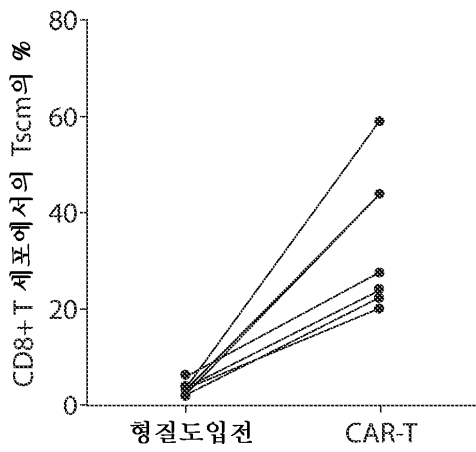
도면2b



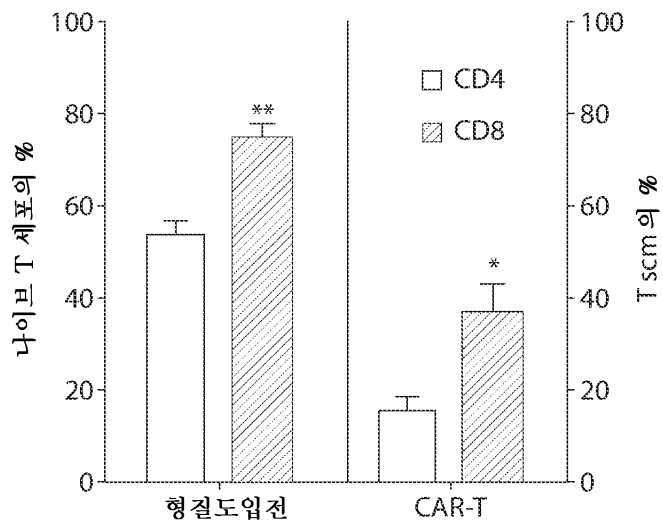
도면2c



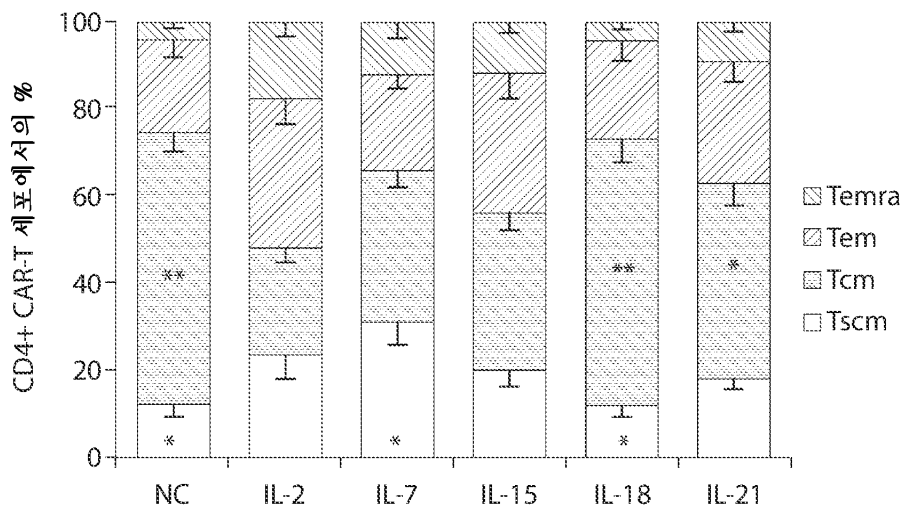
도면2d



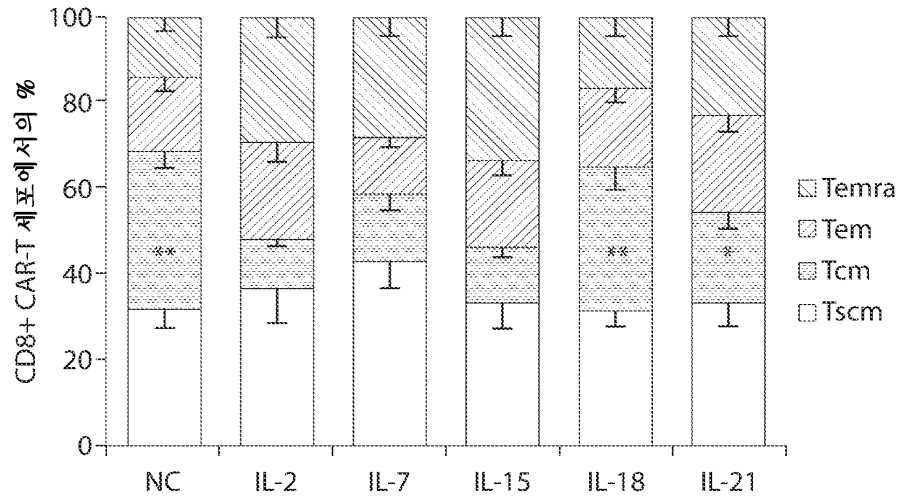
도면2e



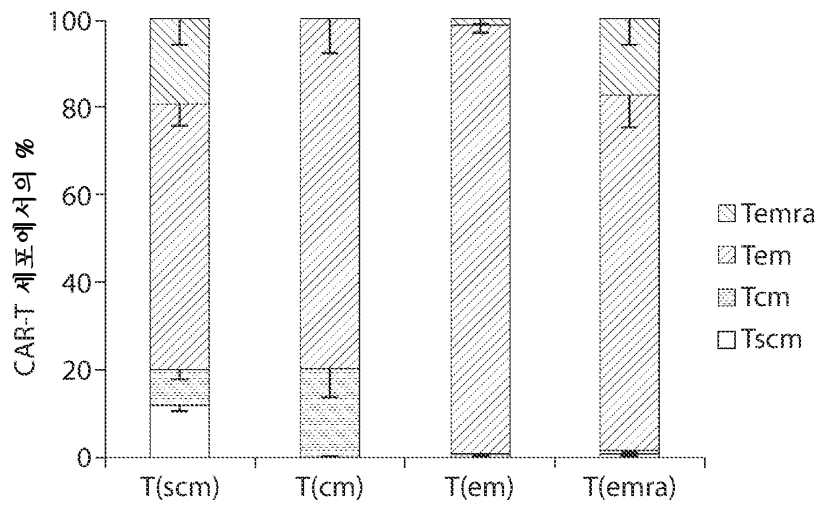
도면2f



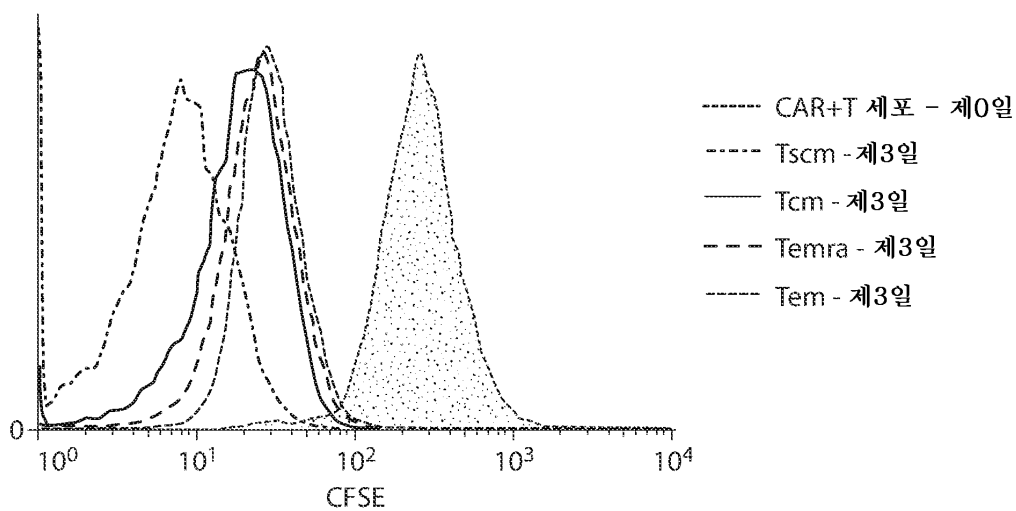
도면2g



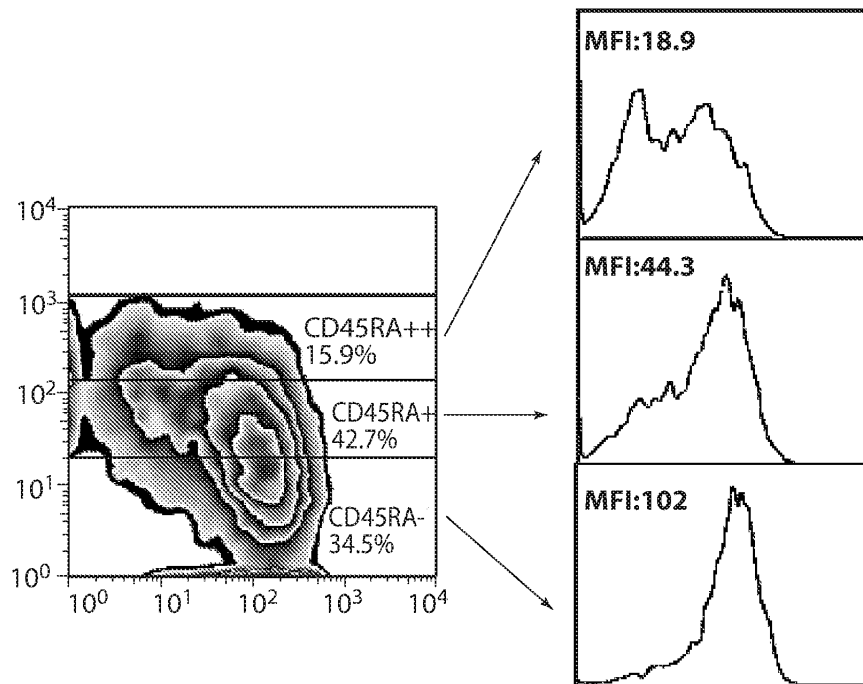
도면2h



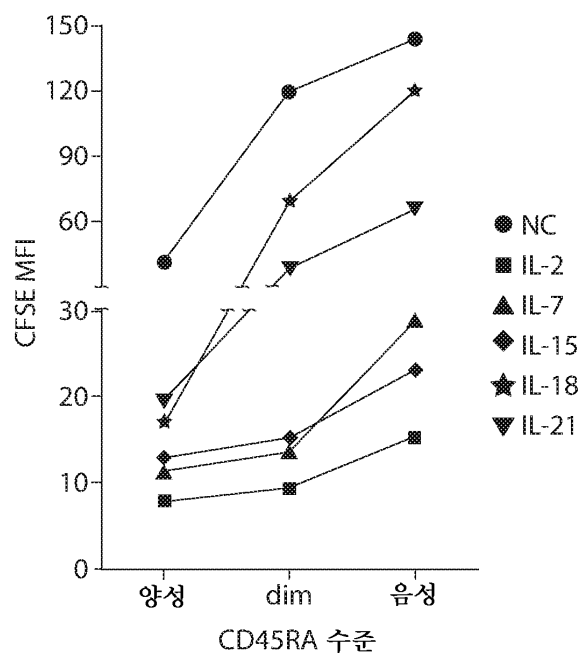
도면2i



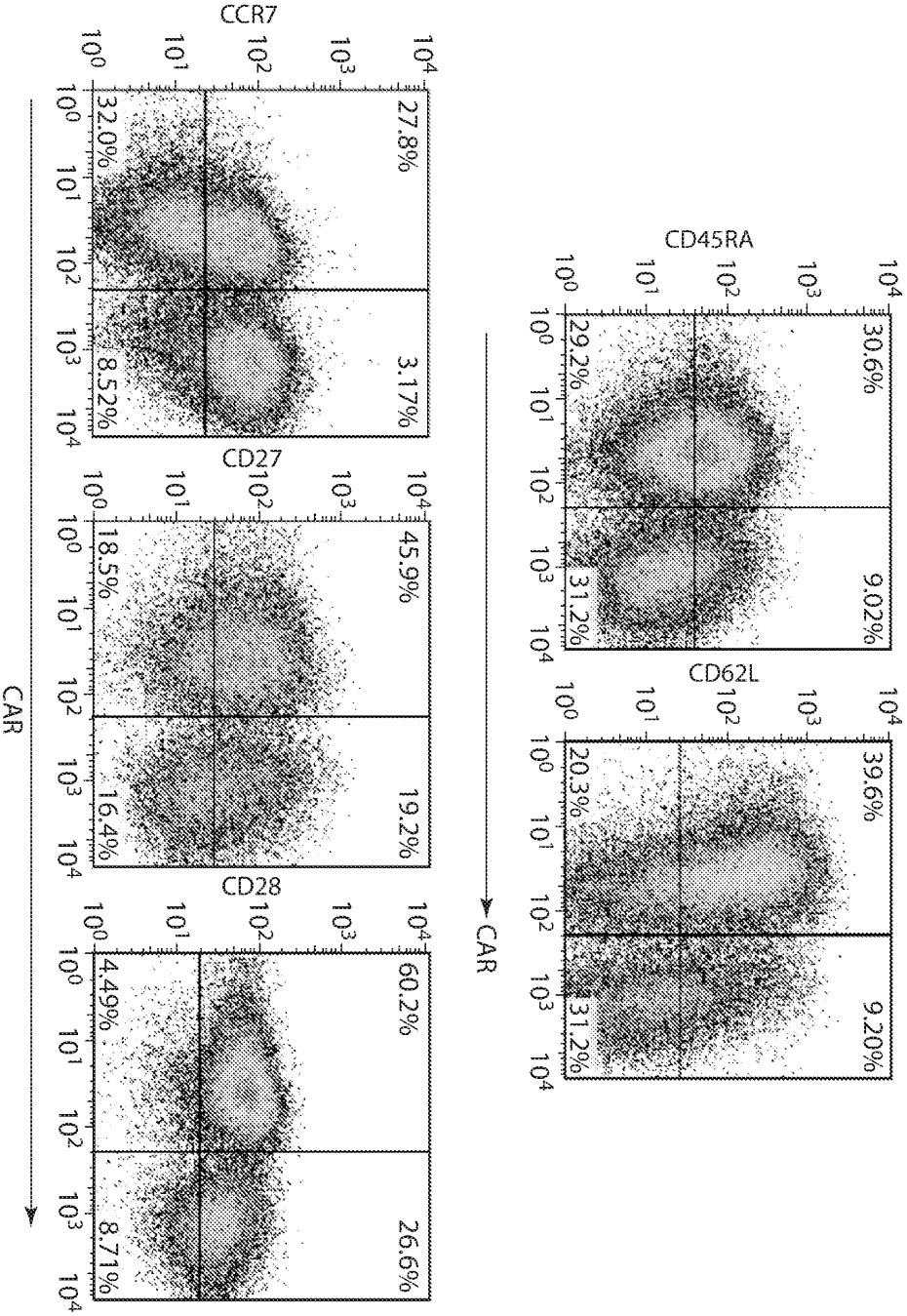
도면3a



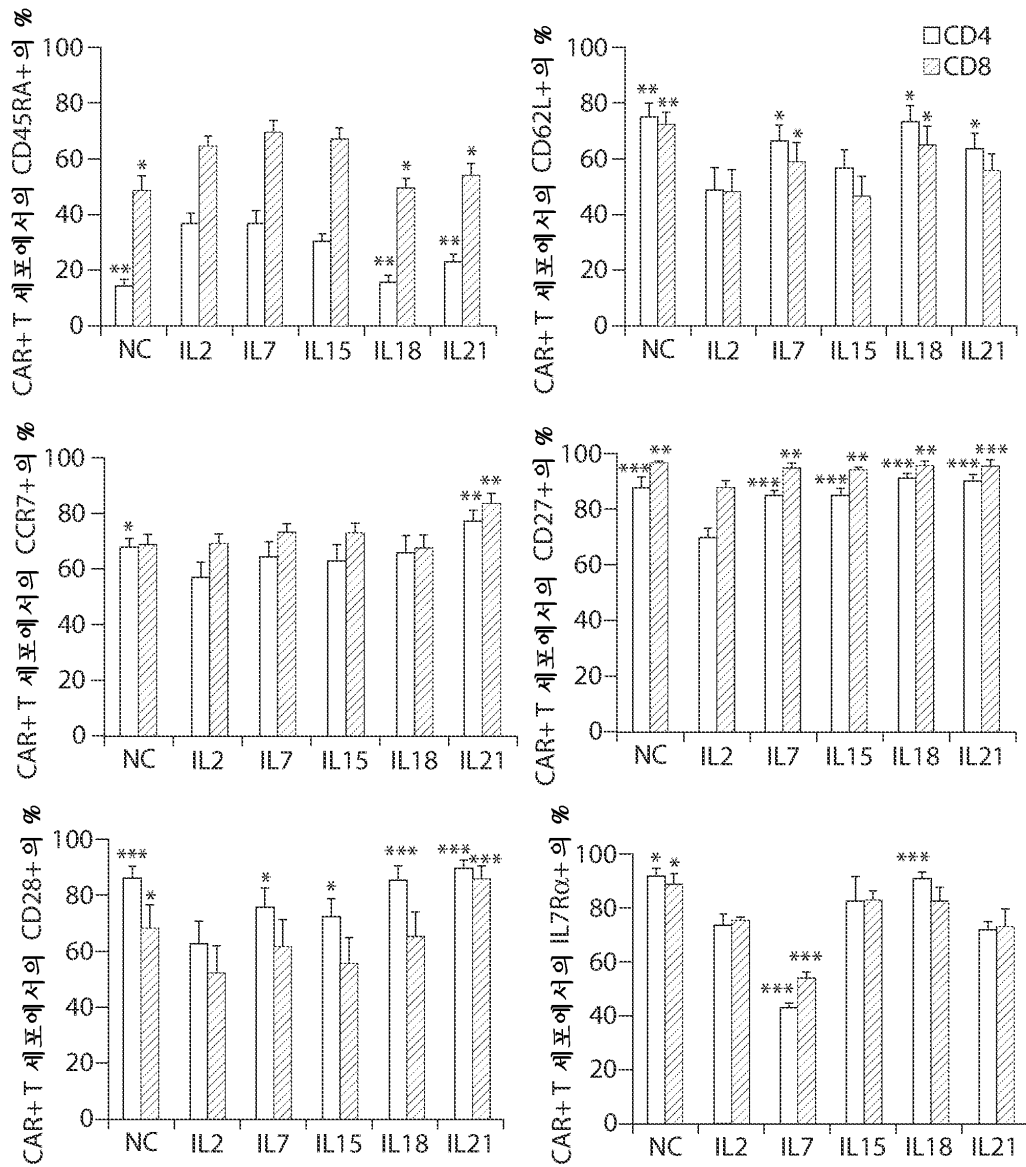
도면3b



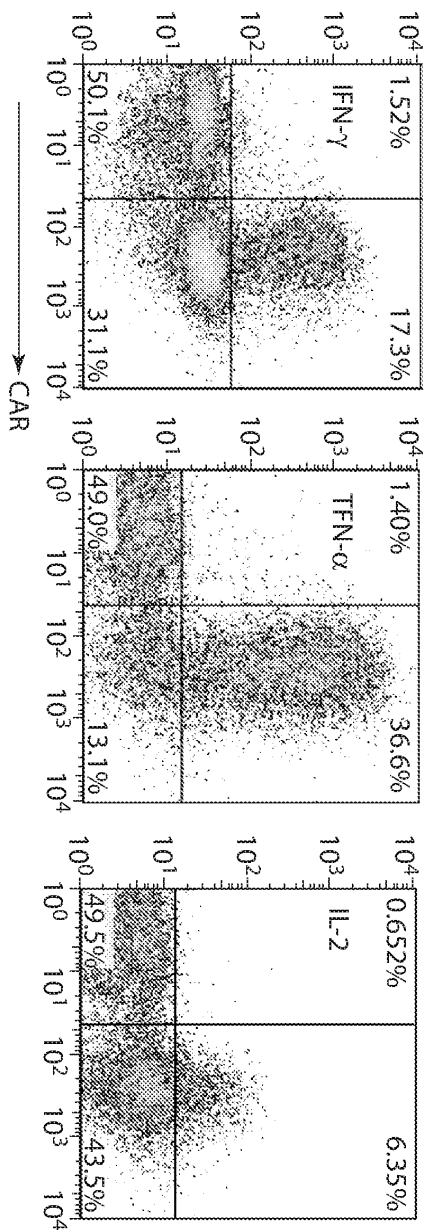
도면4a



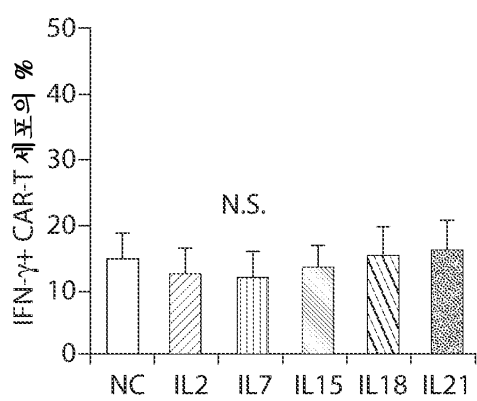
도면4b



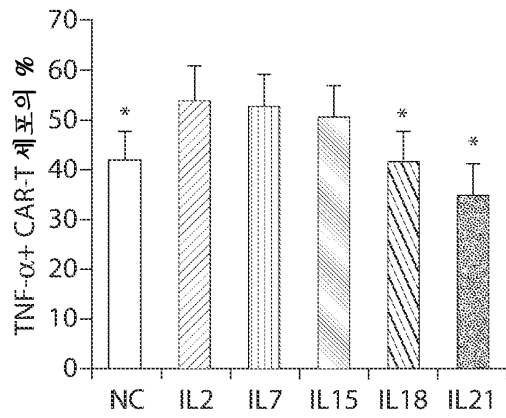
도면5a



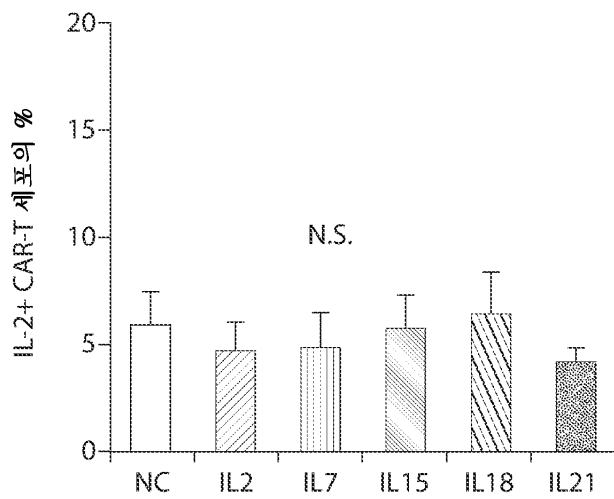
도면5b



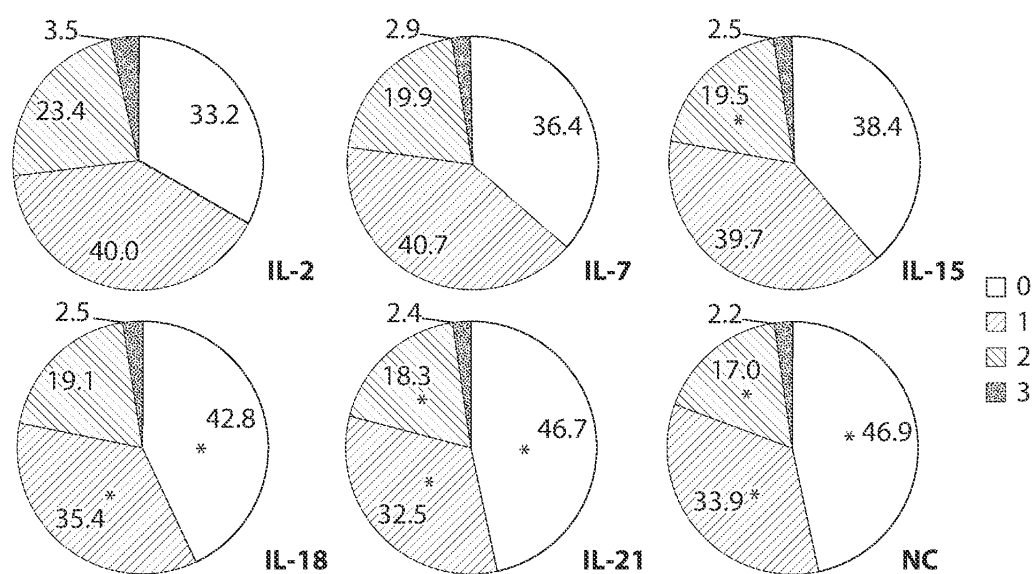
도면5c



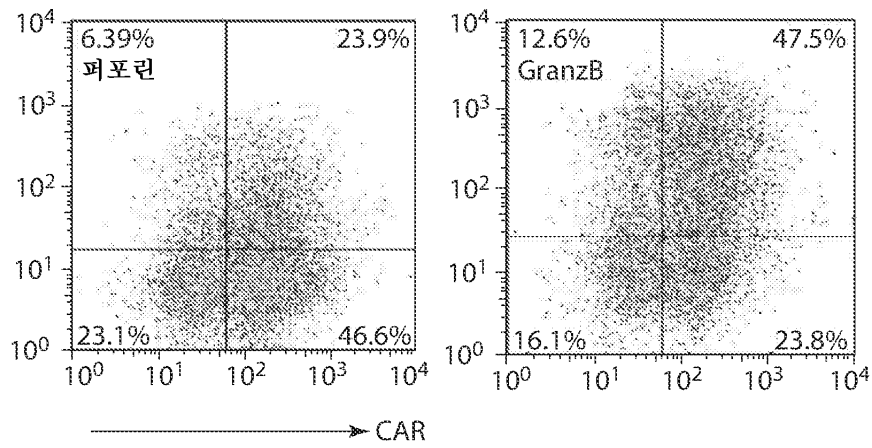
도면5d



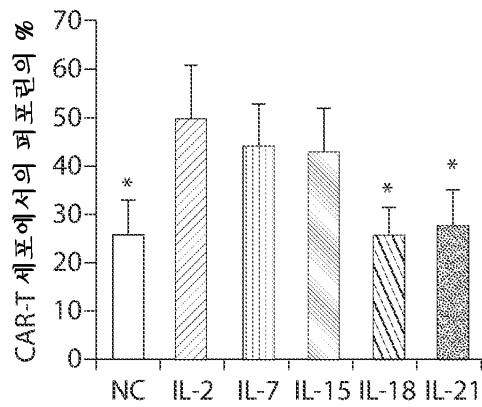
도면5e



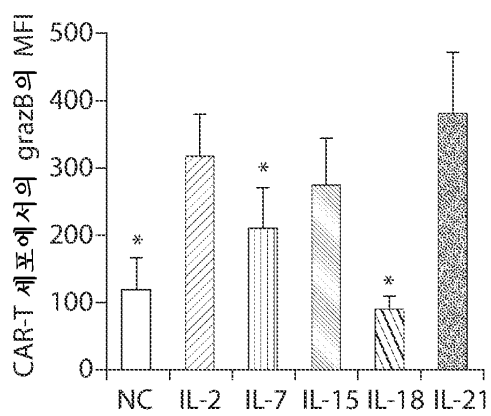
도면5f



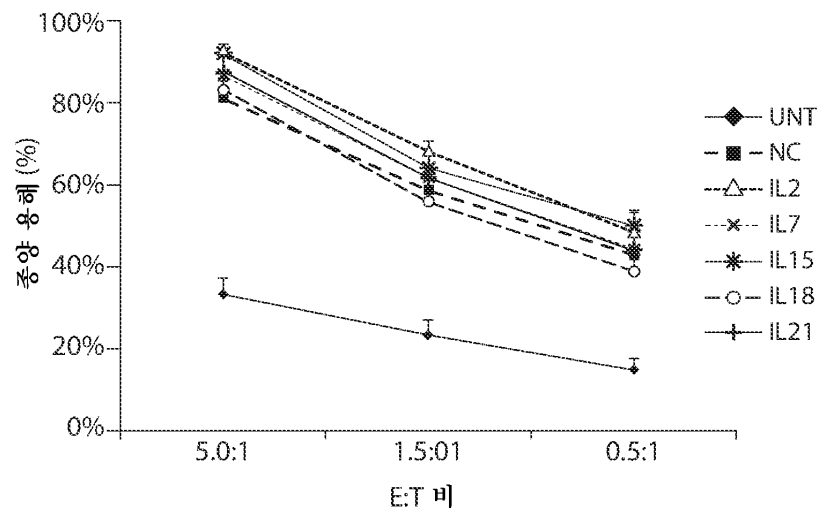
도면5g



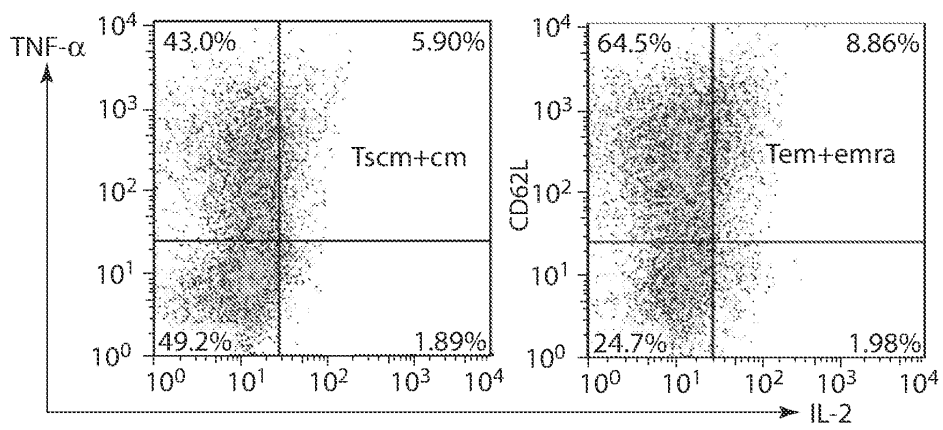
도면5h



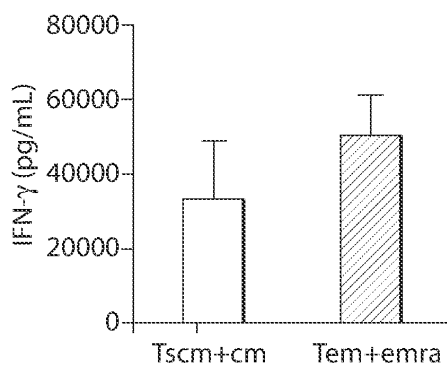
도면5i



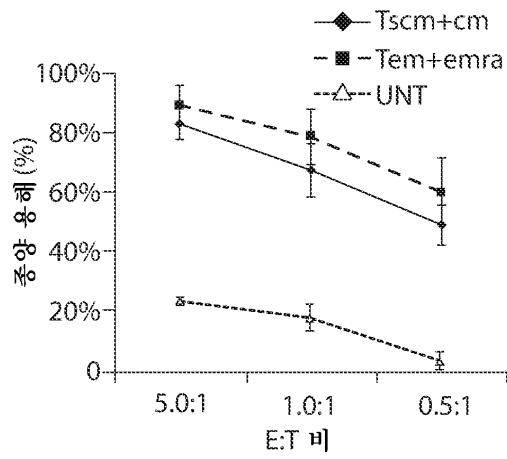
도면6a



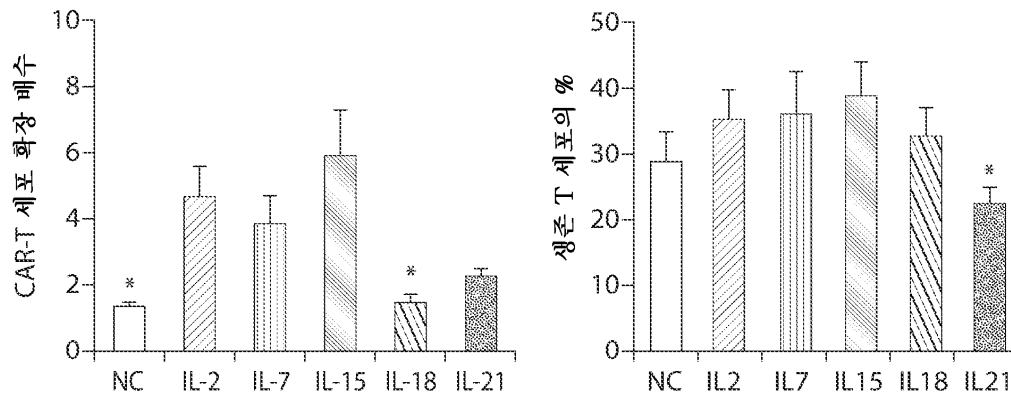
도면6b



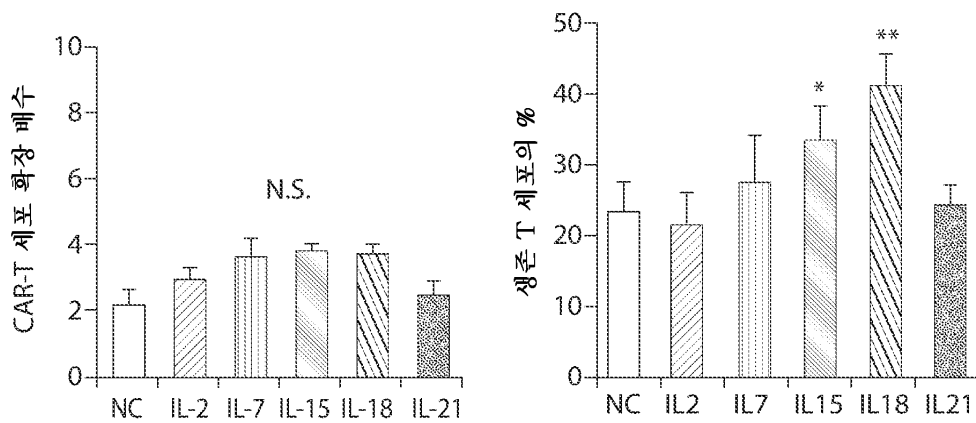
도면6c



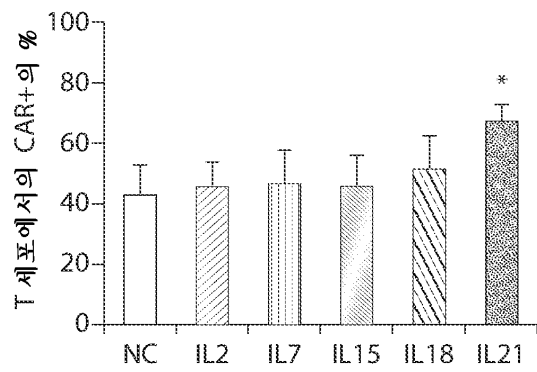
도면7a



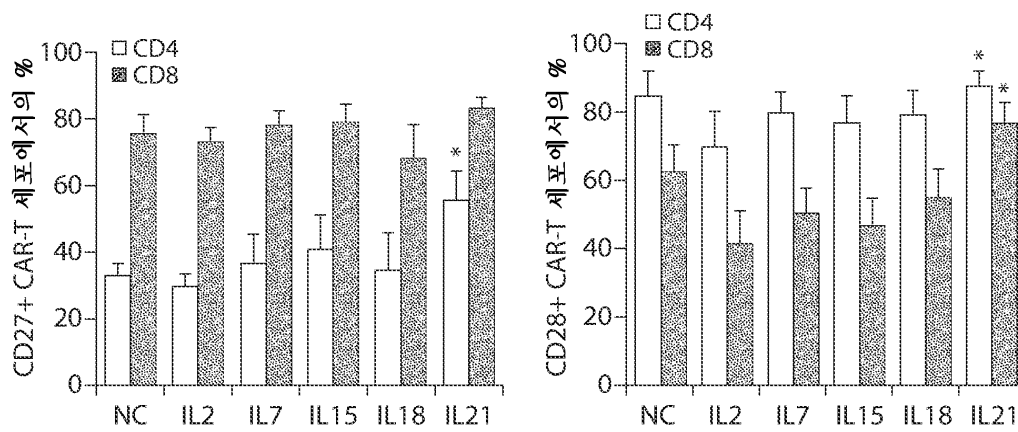
도면7b



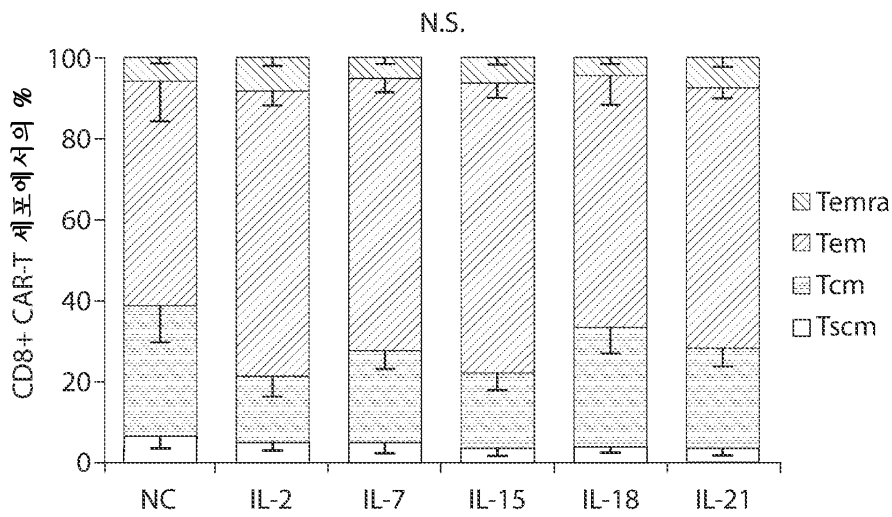
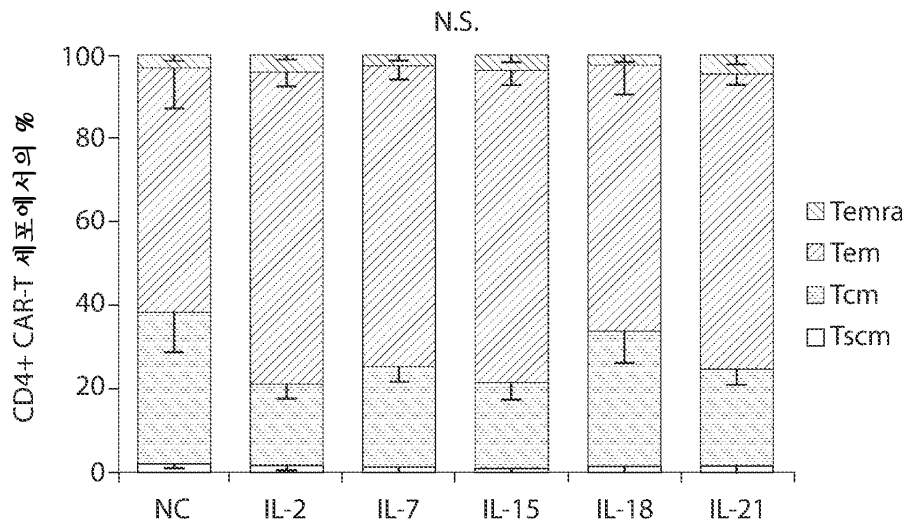
도면7c



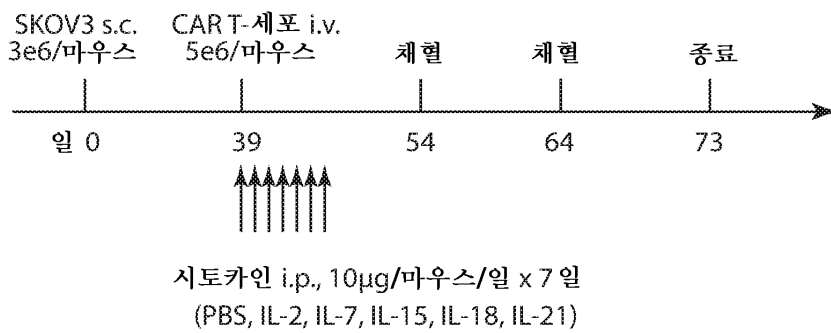
도면7d



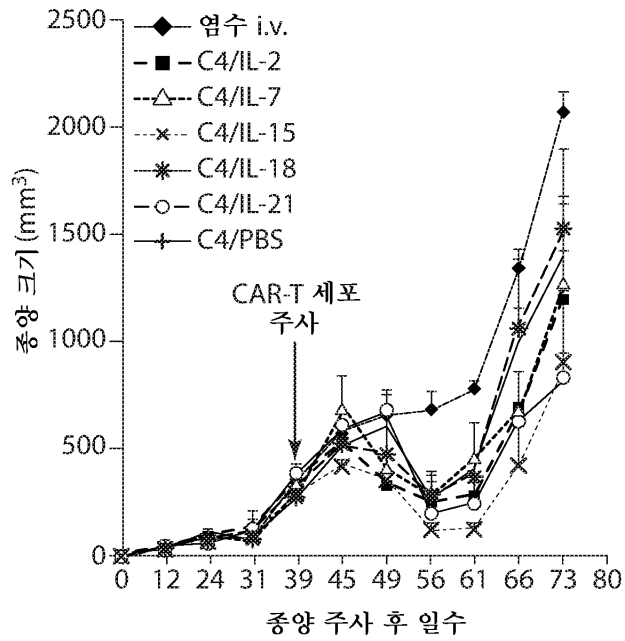
도면7e



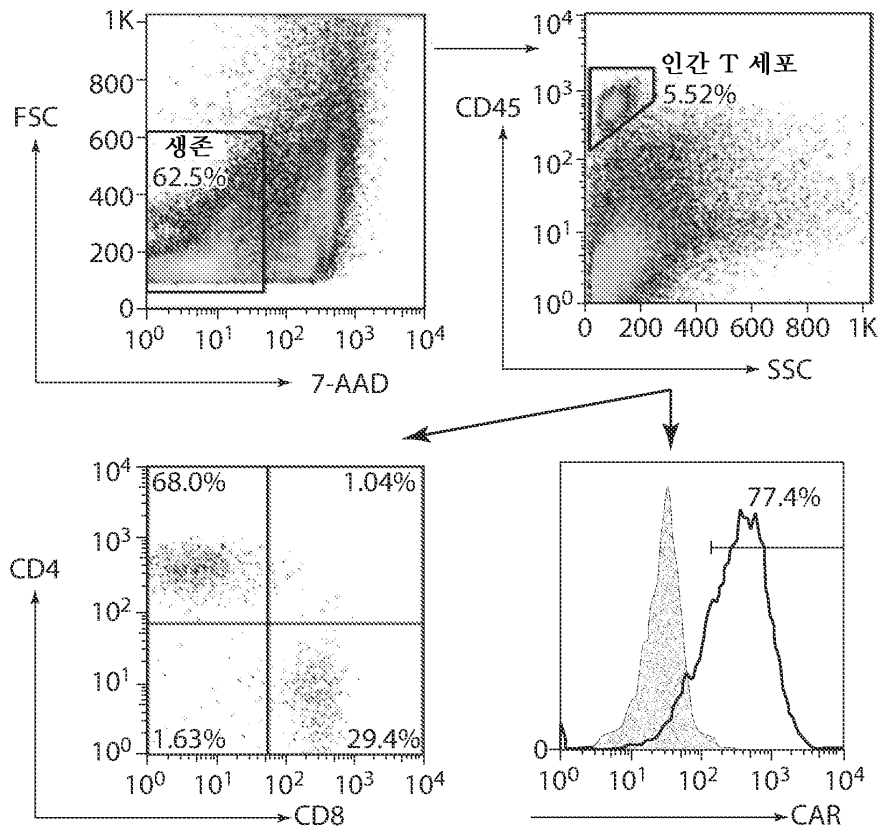
도면8a



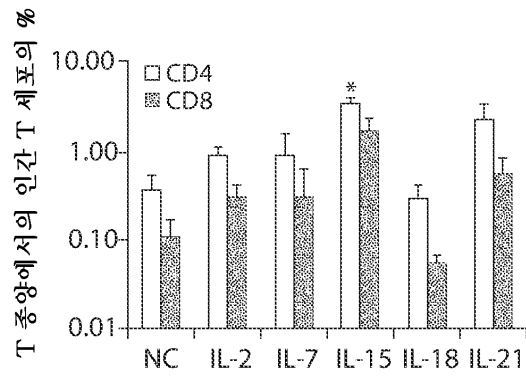
도면8b



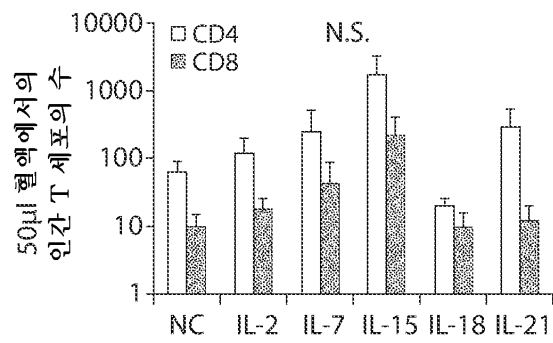
도면8c



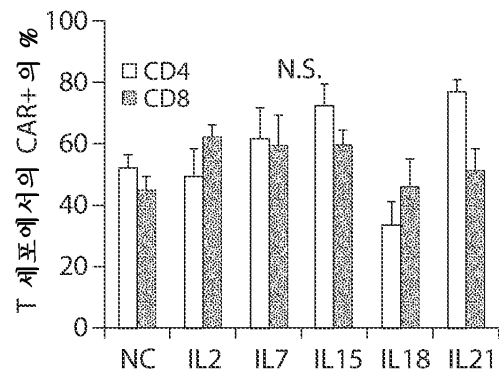
도면8d



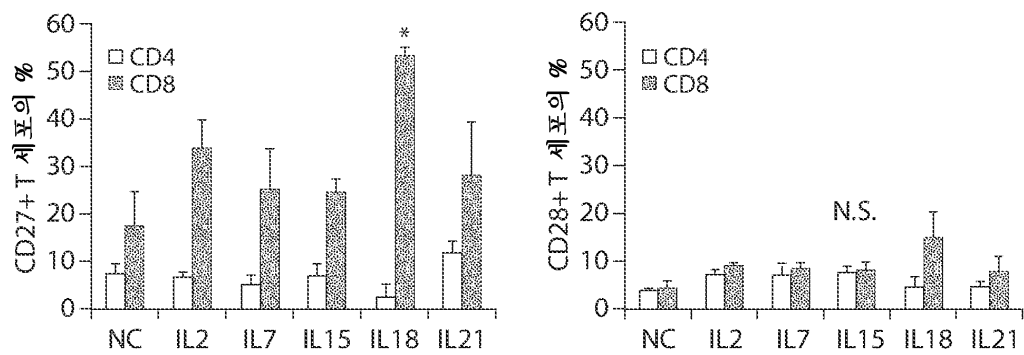
도면8e



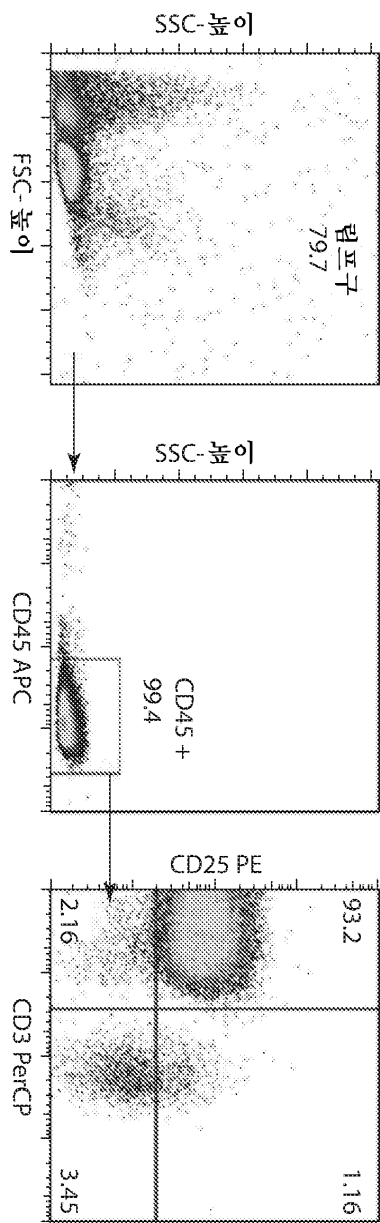
도면8f



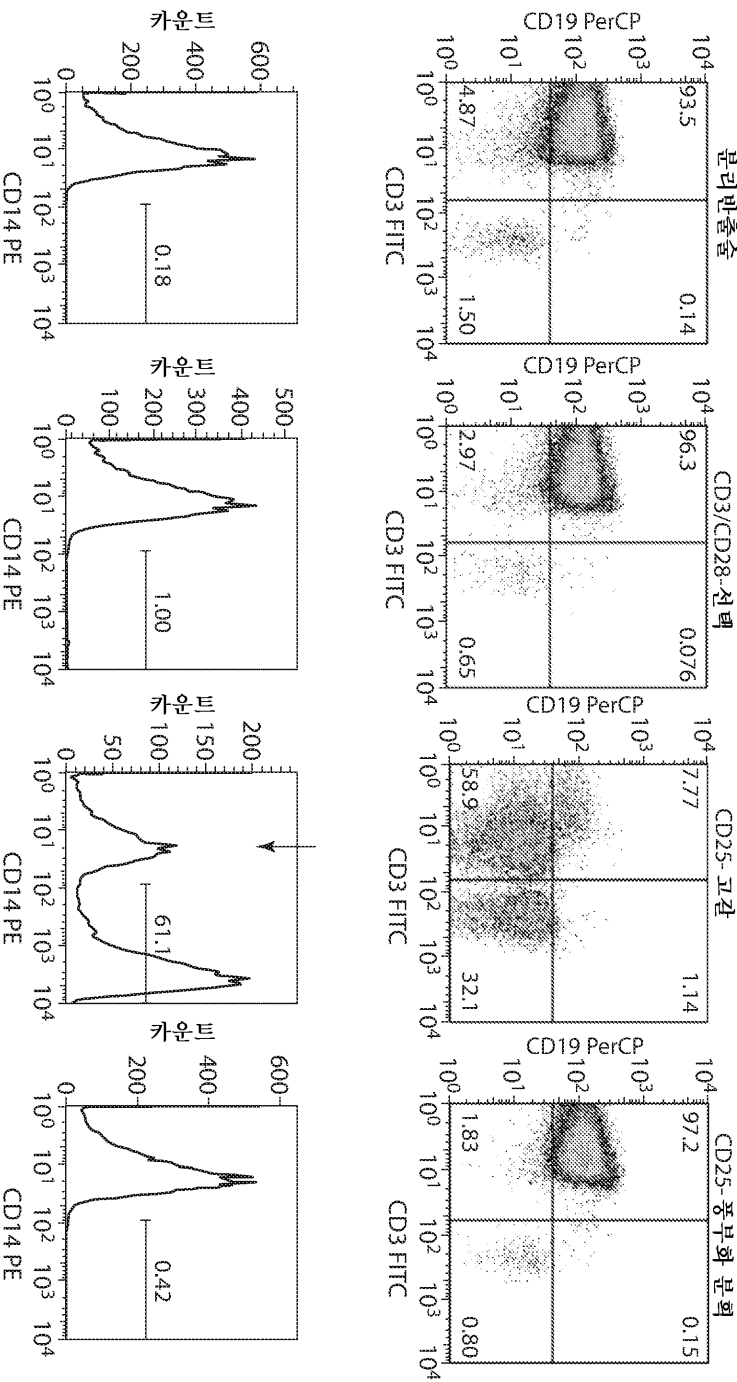
도면8g



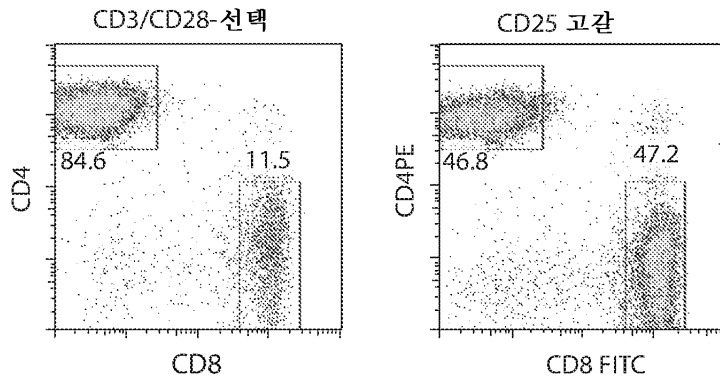
도면9a



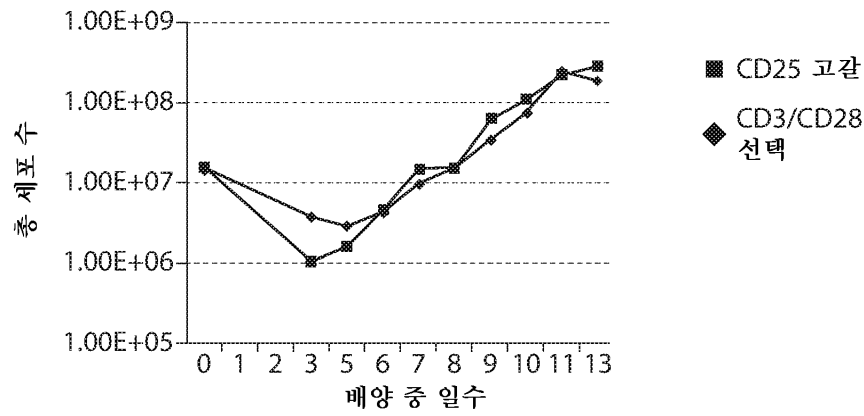
도면9b



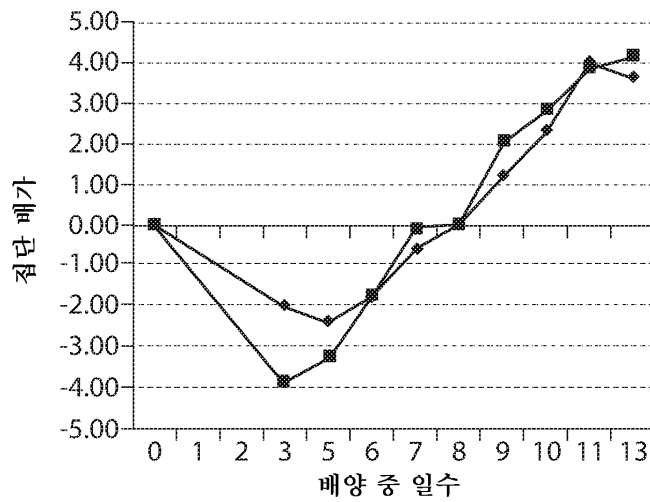
도면10



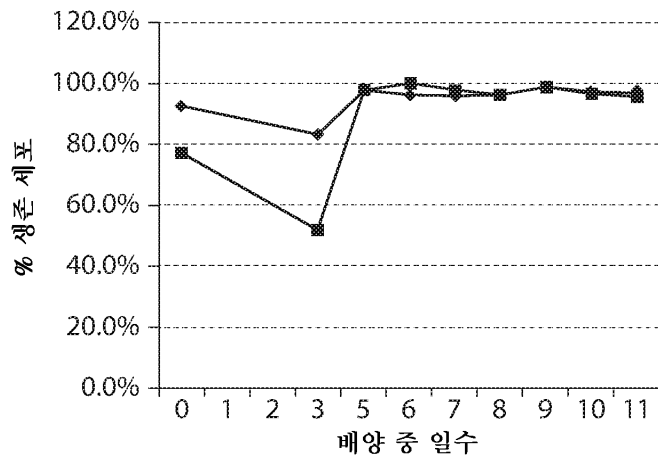
도면11a



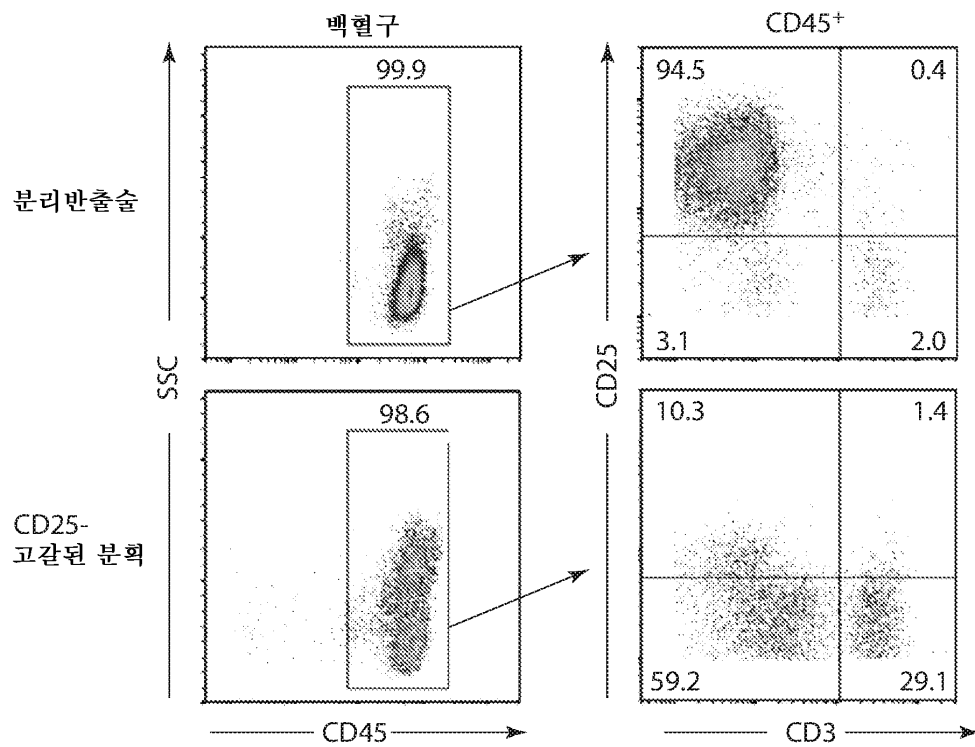
도면11b



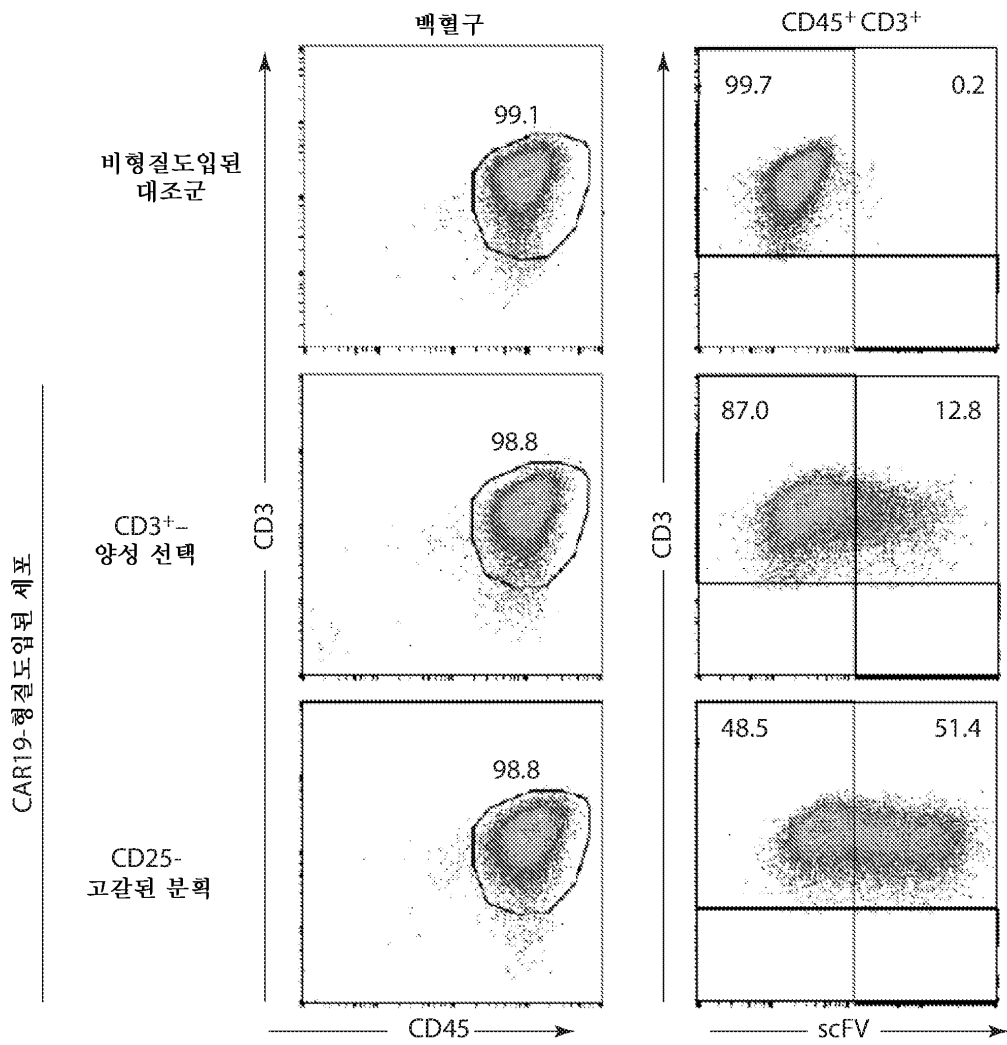
도면11c



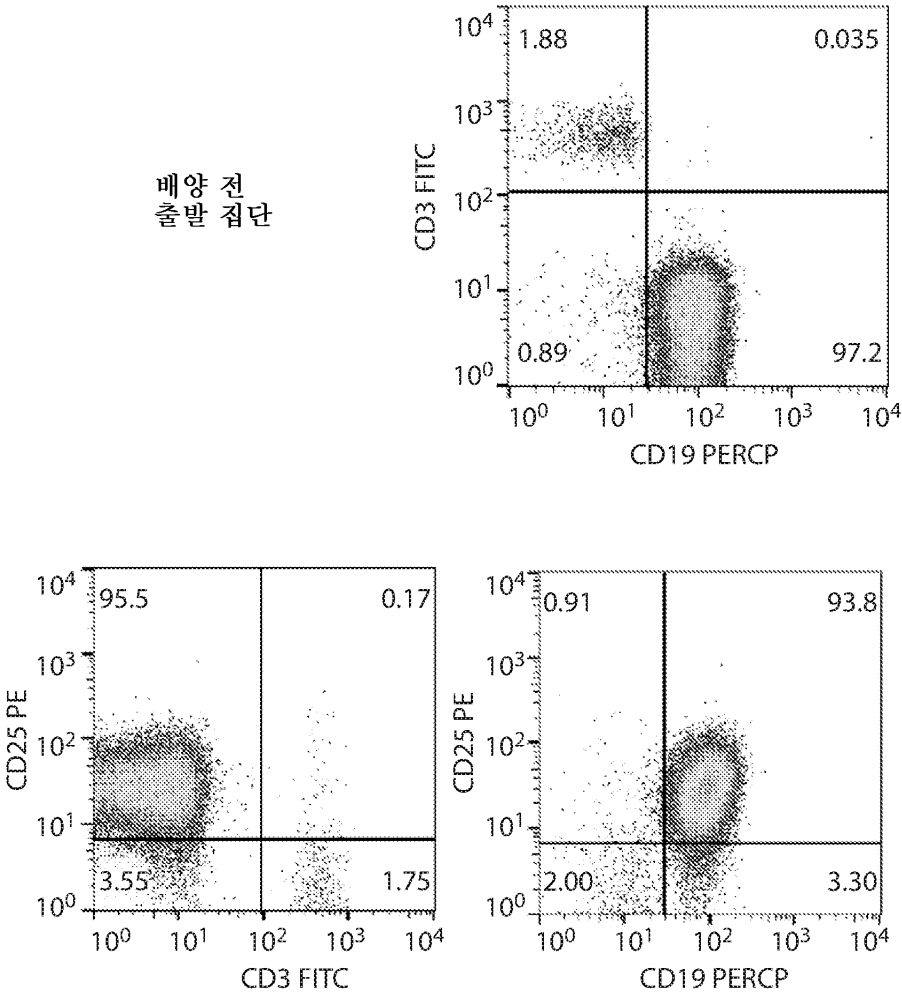
도면12a



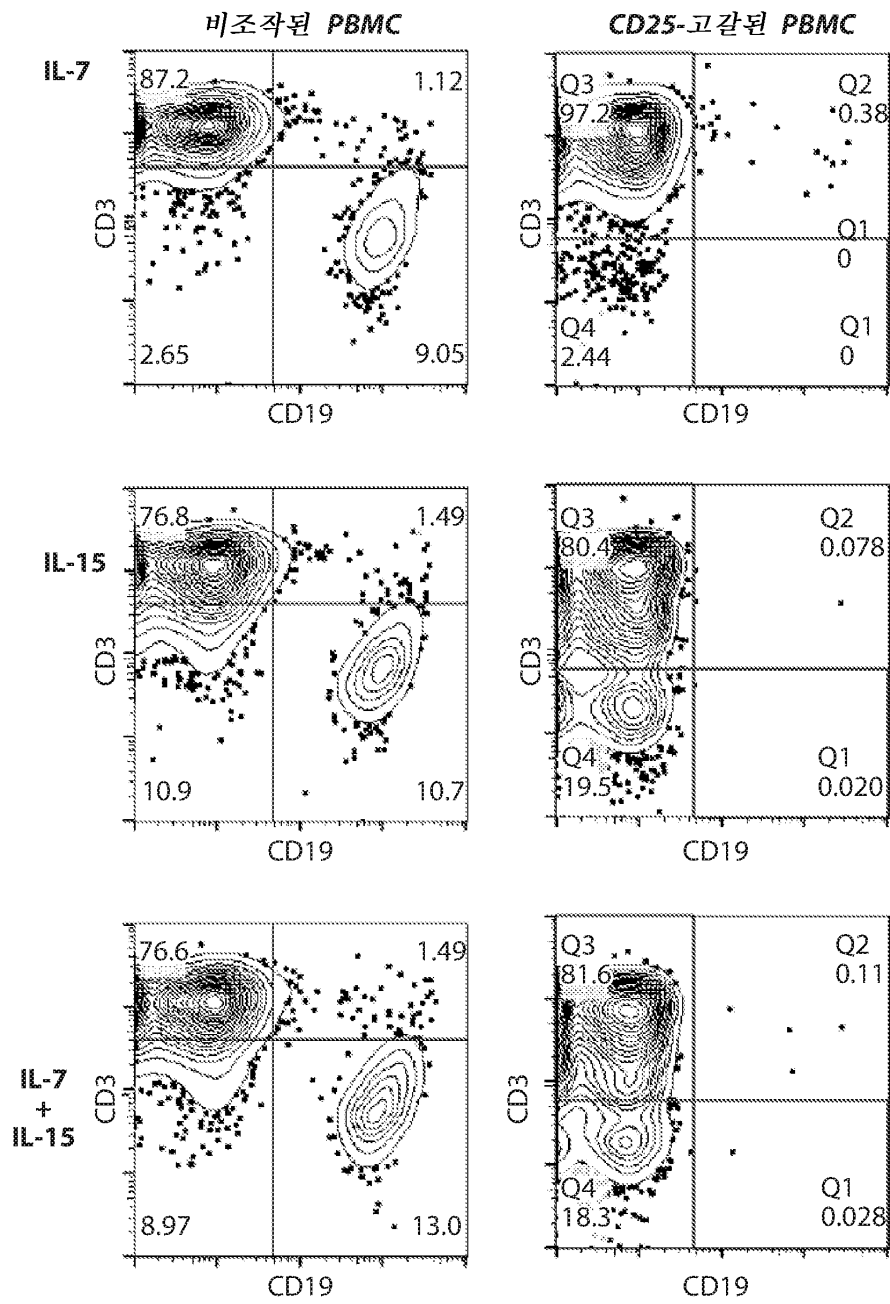
도면12b



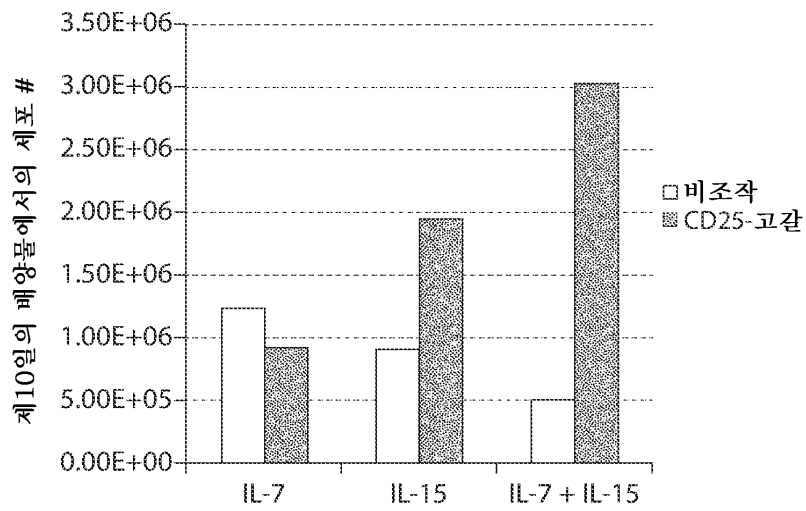
도면13



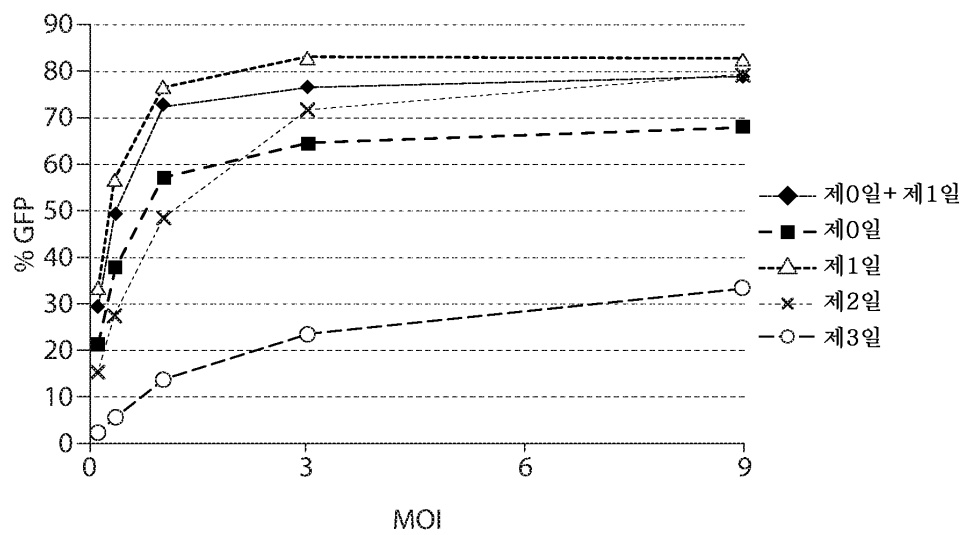
도면14



도면15



도면16



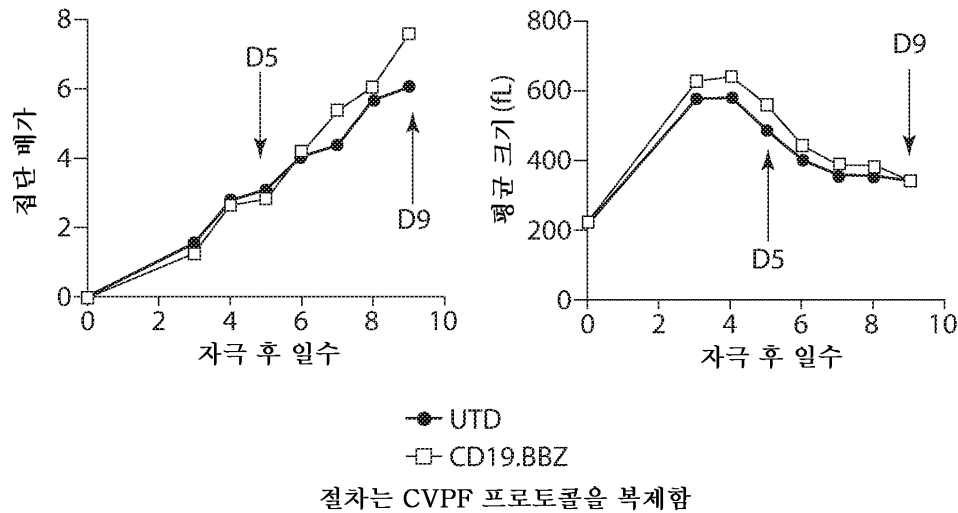
도면17

시험관내 및 생체내 비교 수행을 위한, 활성화되고, 형질도입되고,
비드-제거되고, 제5일 및 제9일에 수거된 ND447 PBMC

3x28 비드에 의한 초기 확장 프로파일

수거 시점은 화살표로 표시됨

정상 공여자 세포

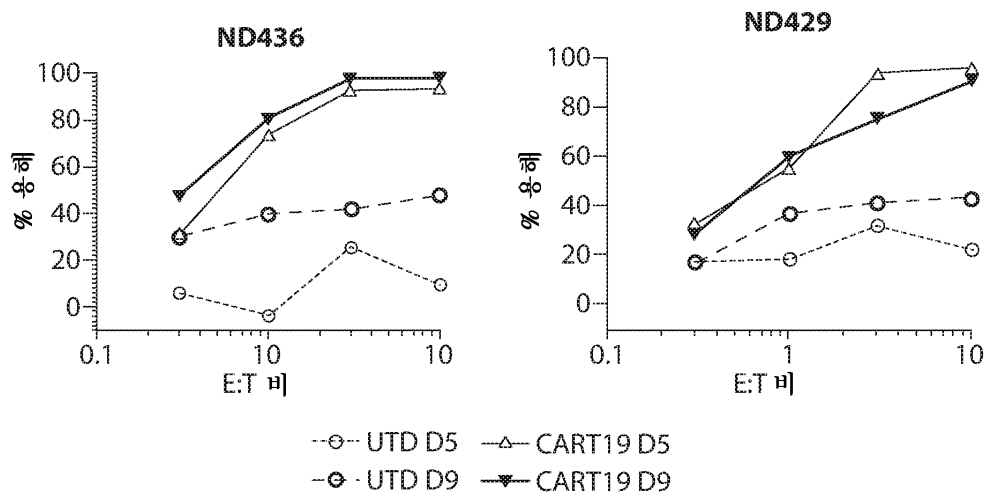


도면18

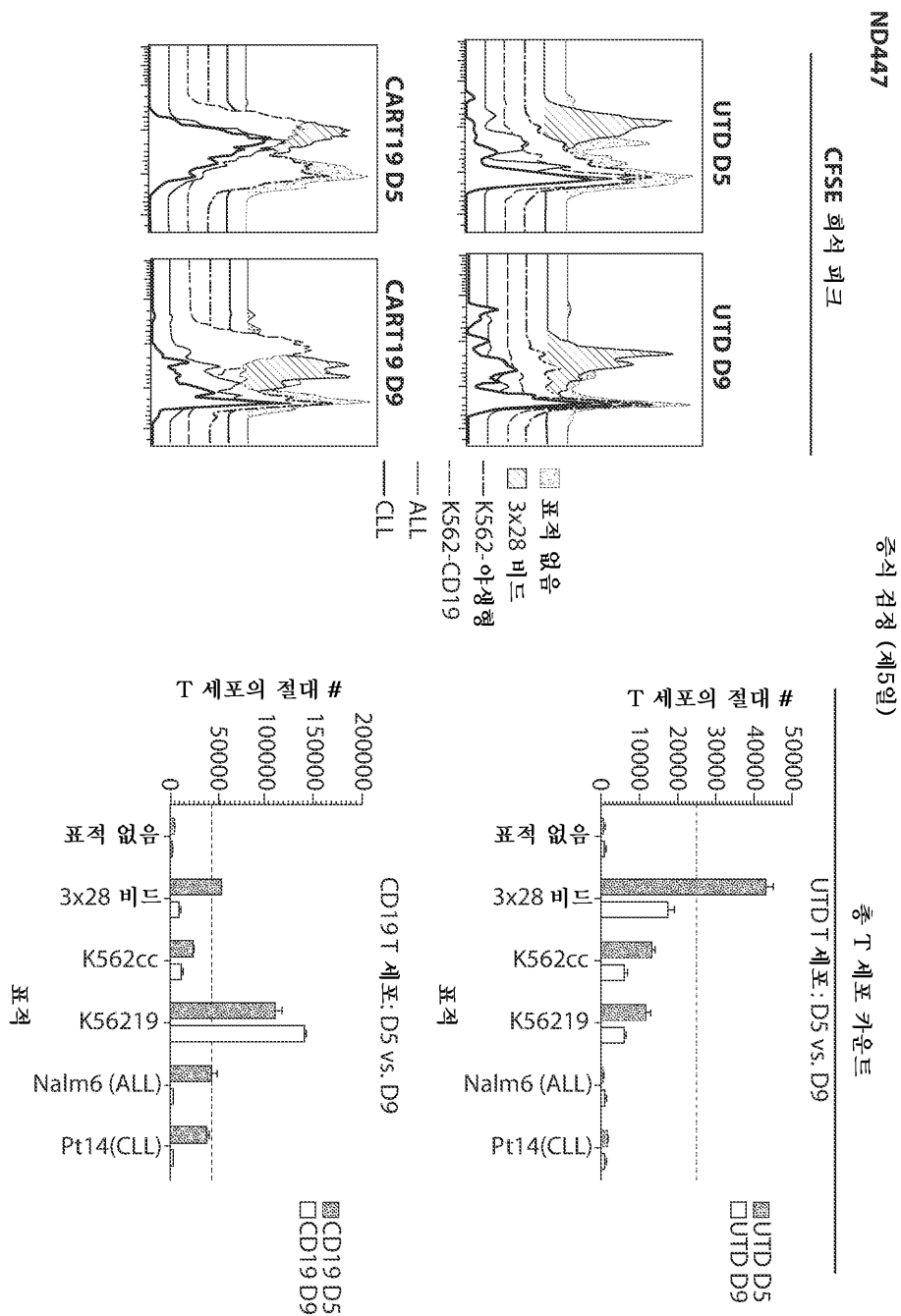
확장으로부터 제5일 및 제9일에 분리된 세포로부터의
CART19 세포 사멸에서 어떠한 차이도 존재하지 않았다

세포독성 검정 (18hr)

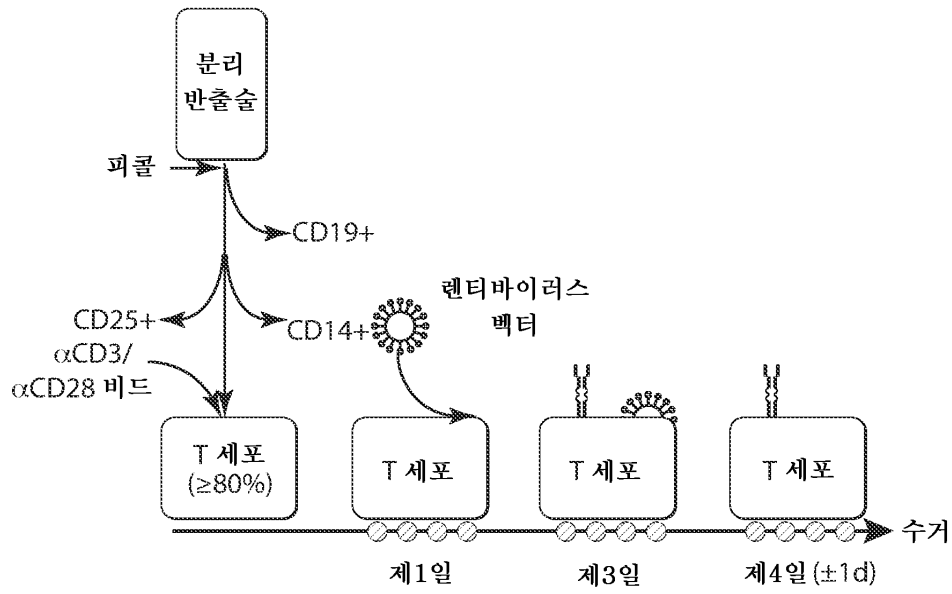
표적: K562-CD19



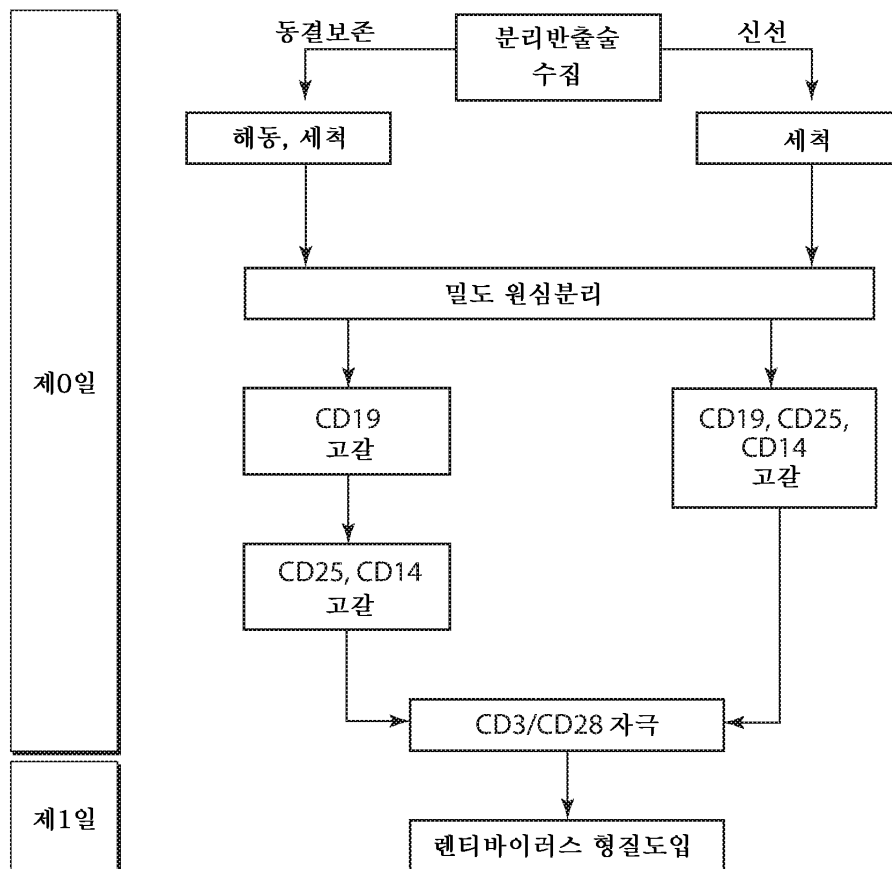
도면19



도면20

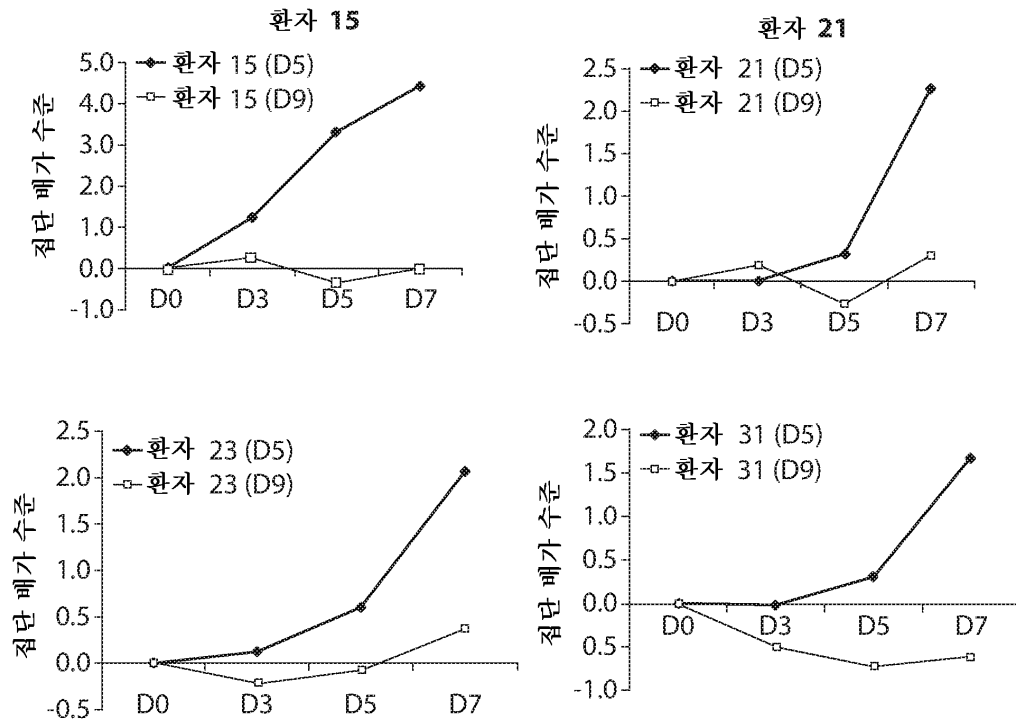


도면21



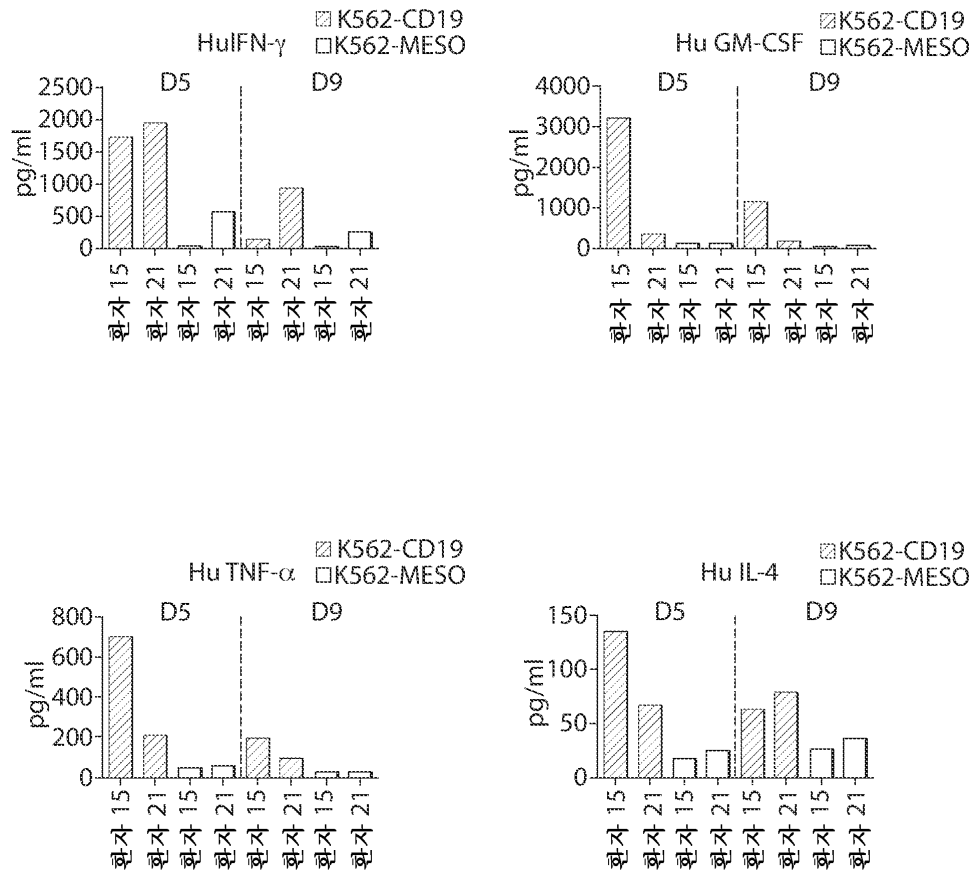
도면22

D5에 수거된 세포는 D9에 수거된 세포보다 CD19를 발현하는 K562에 의한 자극의 7일에 걸쳐 더 잘 증식하였다



도면23

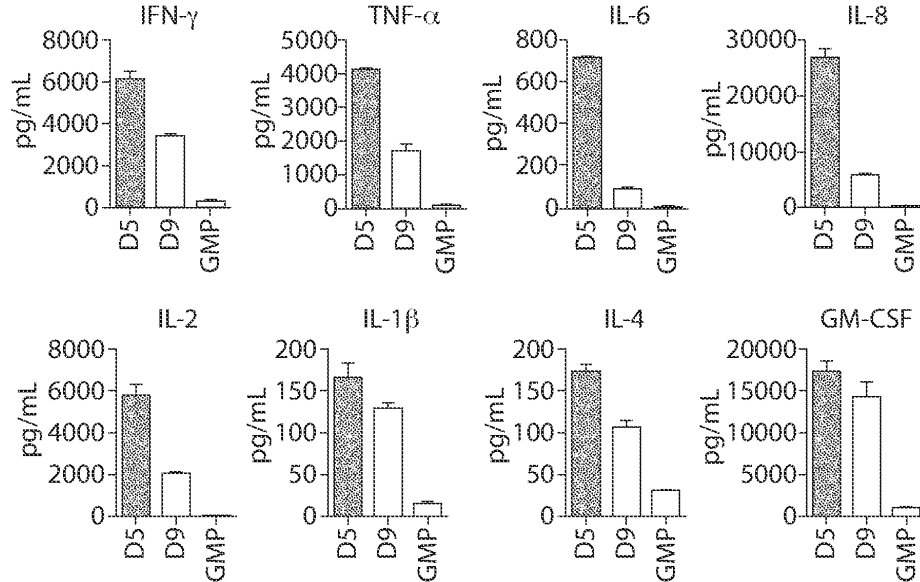
표적의 인식 시 D5에 수거된 CART19 세포로부터의 더 높거나 대등한 시토카인 생산



도면24

다중 시토카인의 증가된 수준은 표적의 인식 시 제5일에 수거된 CART19 세포에서 생산된다

ALL pt. ID 04

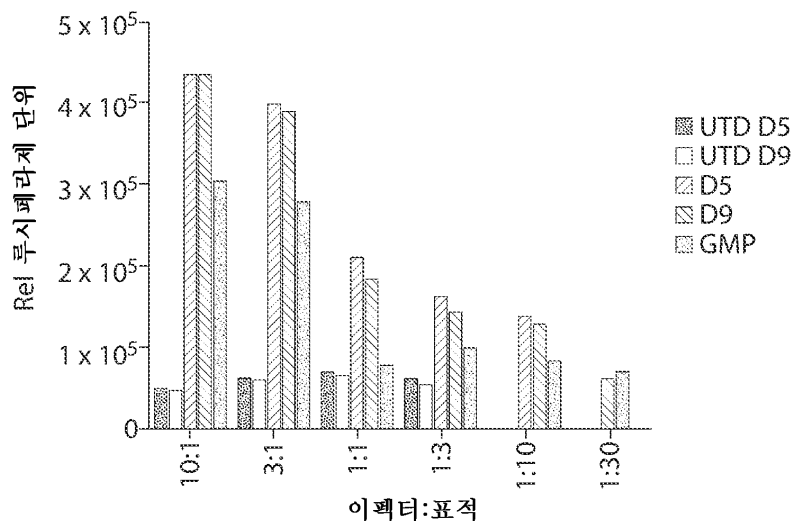


- CART19 세포를 항-CAR19-이디오타입-Ab-코팅된 또는 대조군 비드로 24시간 동안 자극하였다.
- 대조군 비드에 의해서는 어떠한 시토카인도 검출되지 않거나 낮은 수준 (<200 pg/ml)의 시토카인이 검출되었다.

도면25

제5일에 수거된 CART19 세포가 더 나은 세포-사멸 능력을 보유한다

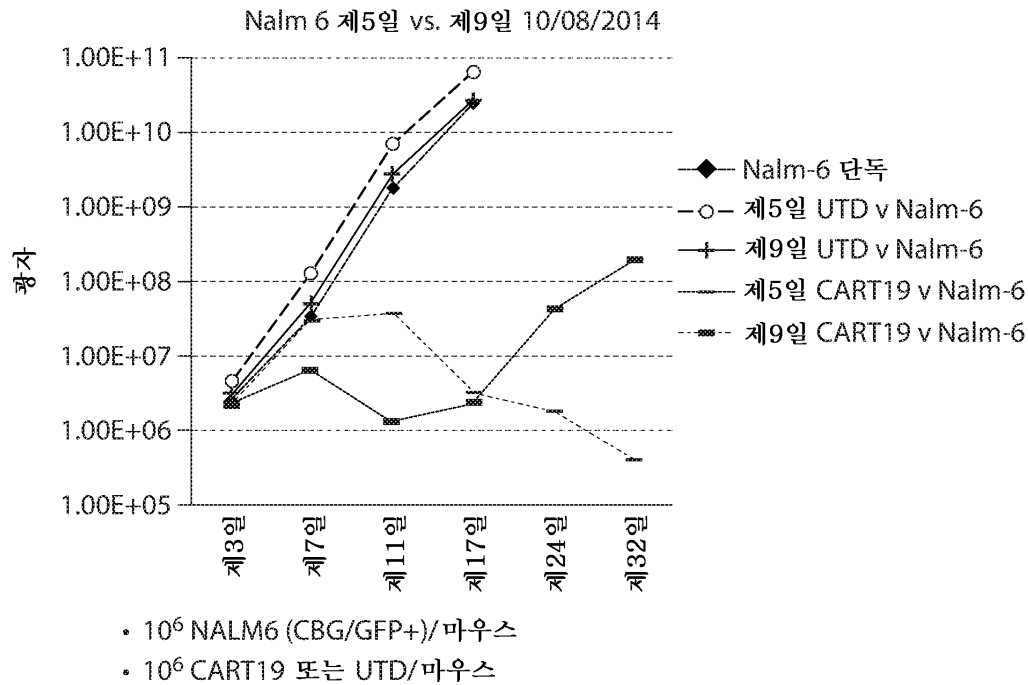
세포 사멸 검정 CART19 세포
(ALL pt. ID 04)



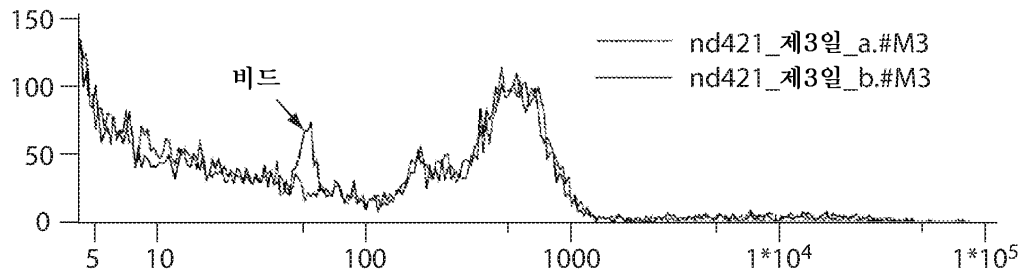
- CART19 세포를 NALM6-Luc 세포와 증가하는 E:T 비로 16시간 동안 공동-배양하였다.
- 총 세포 용해물을 루시페라제 검정에 의해 검사하였다.

도면26

제5일에 수거된 CART19 세포가
더 나은 생체내 장기간 세포-사멸 능력을 보유한다



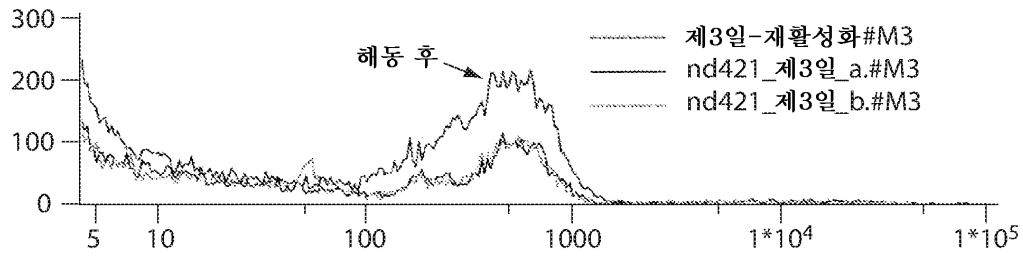
도면27a



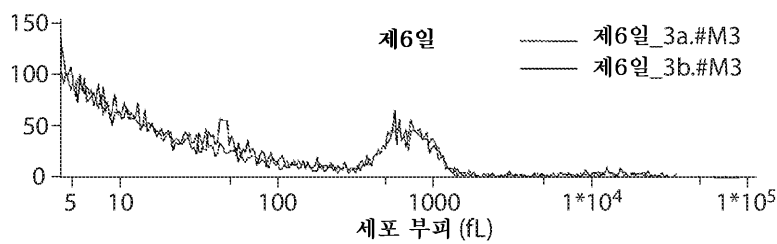
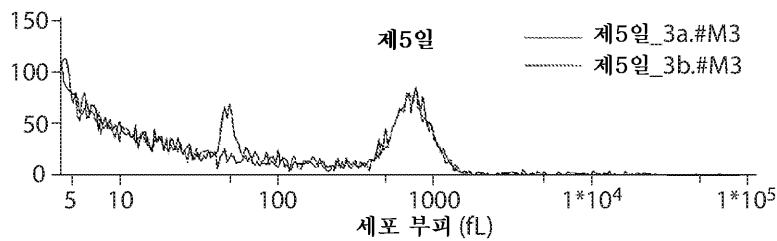
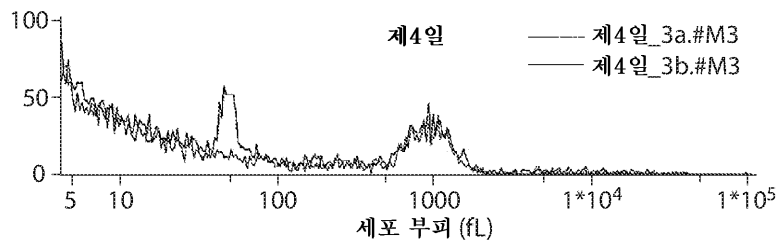
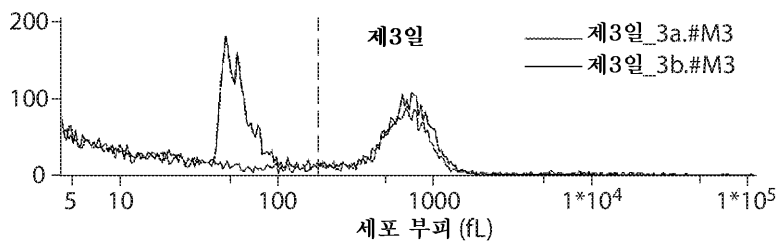
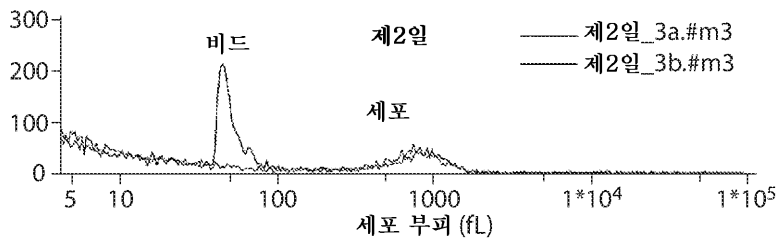
도면27b

비드 제거	제2일 e6	제3일 e6	제4일 e6	제5일 e6	제6일 e6
전	1.5	3	1.1	1.78	0.72
후	1.45	3	1.2	1.8	0.84

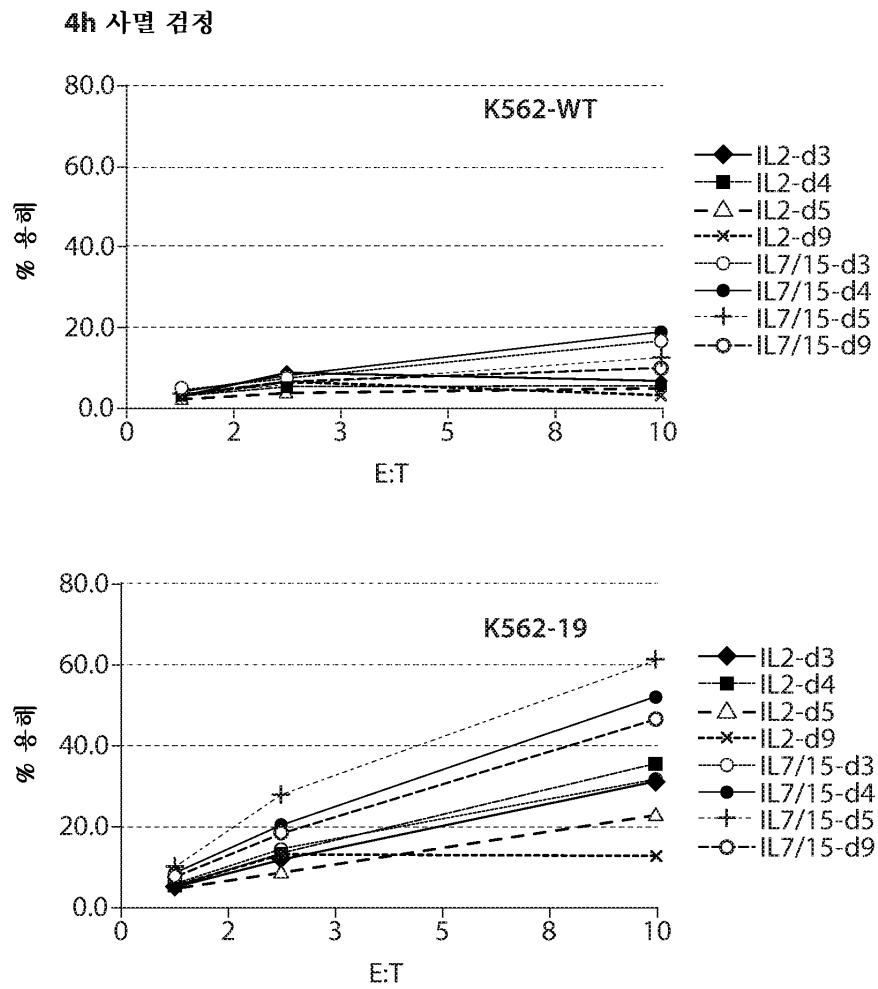
도면27c



도면27d

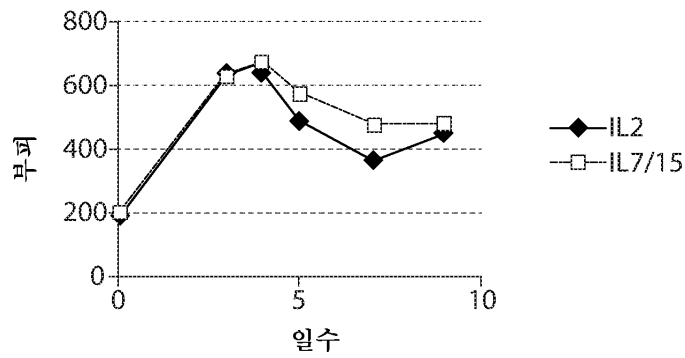
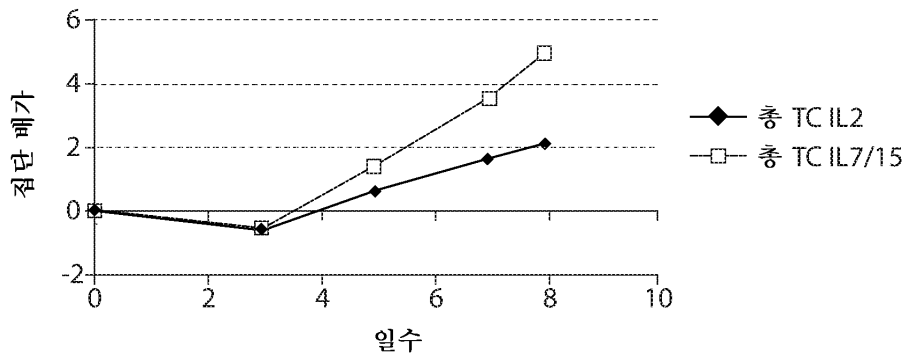
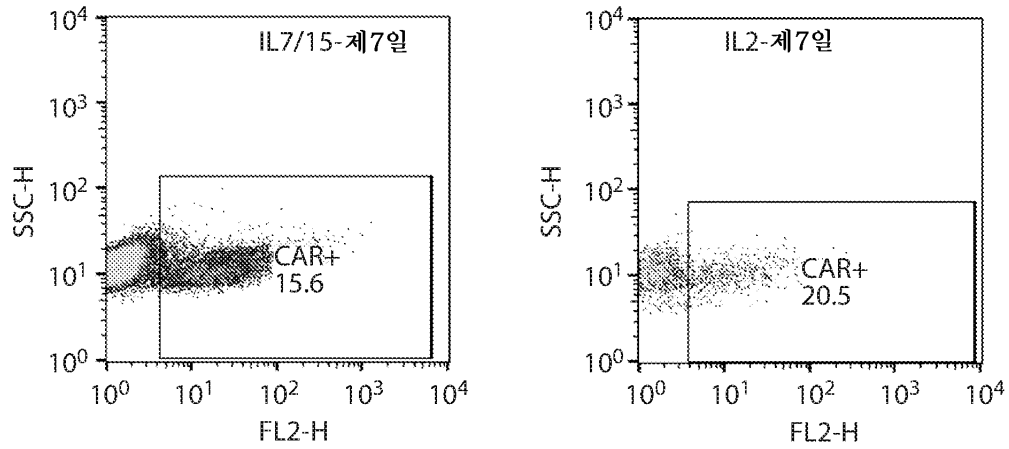


도면28a

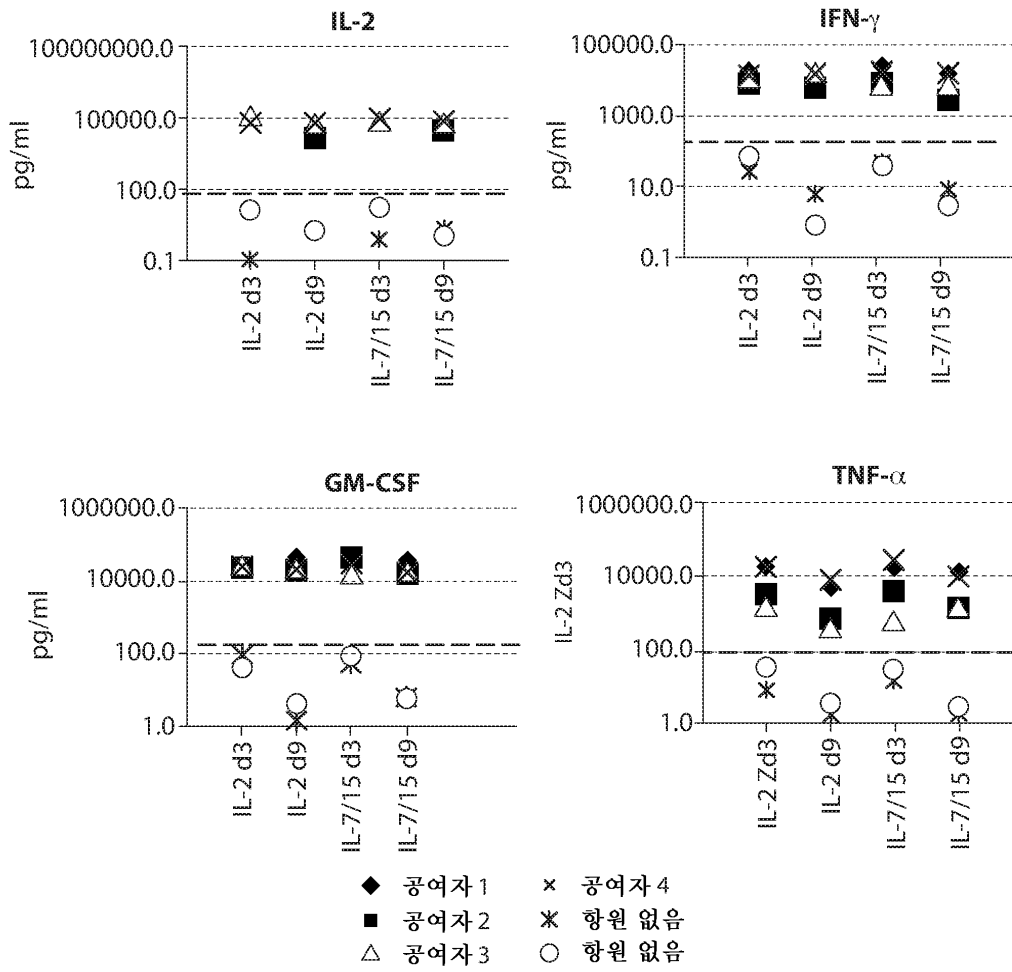


도면28b

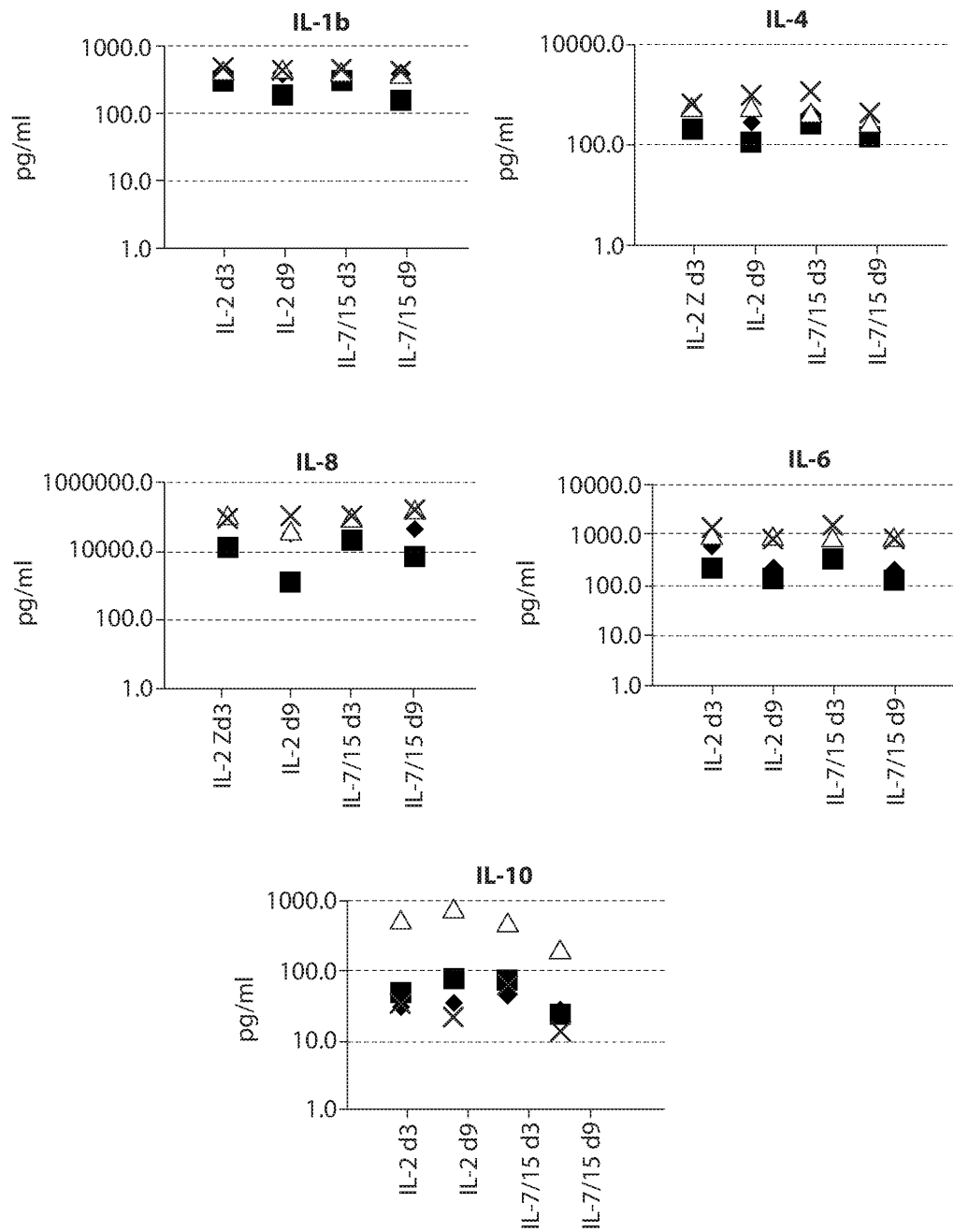
형질도입 효율 MOI = 0.5



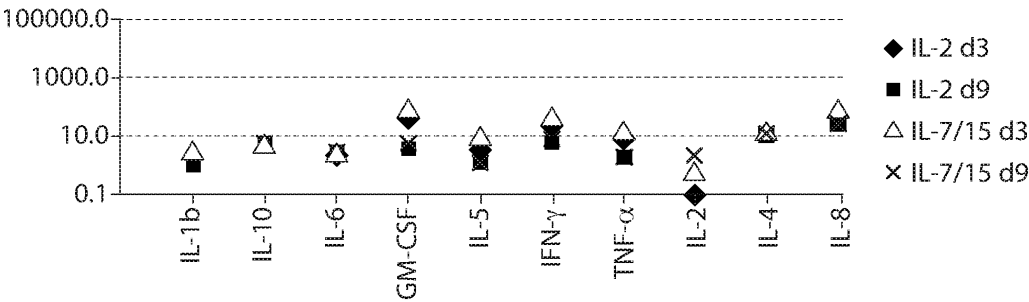
도면29a



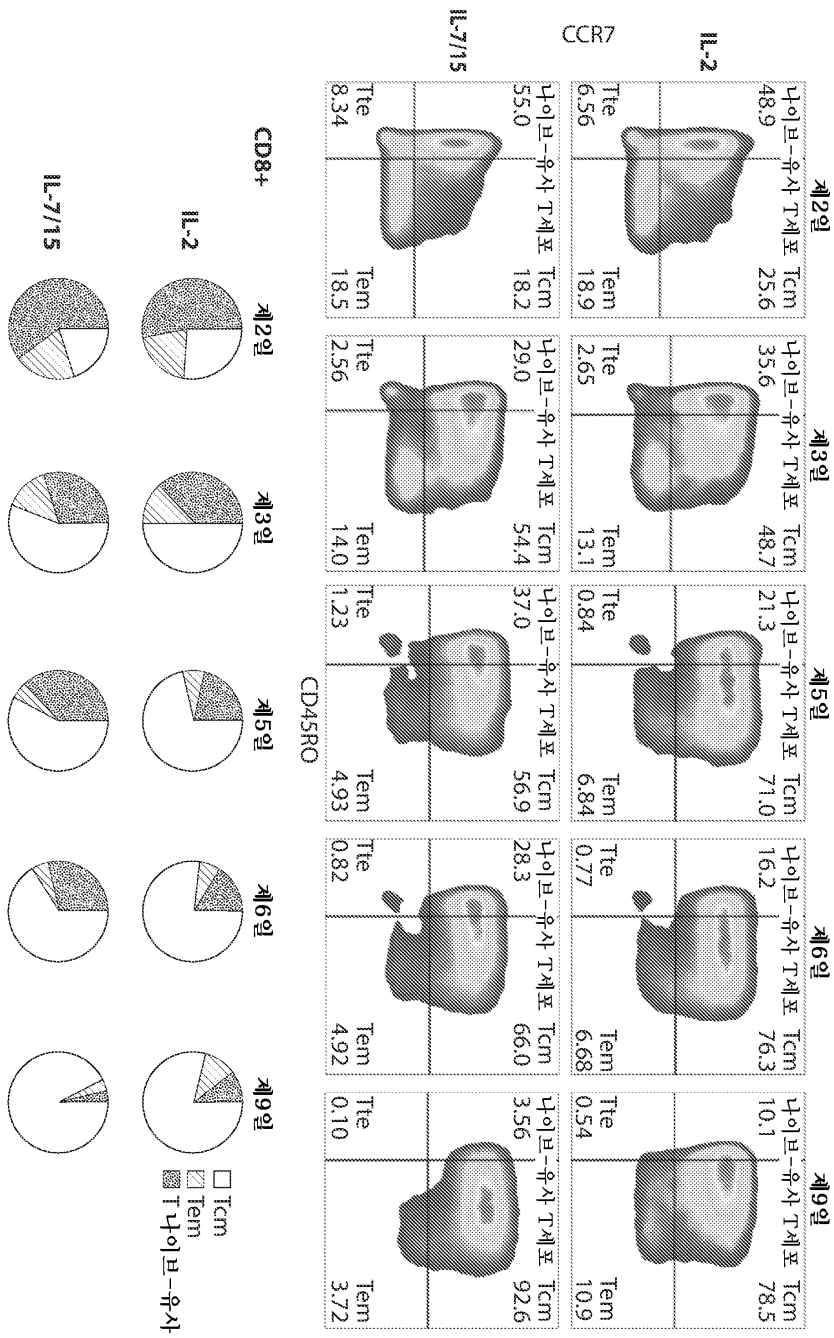
도면29b



도면29c

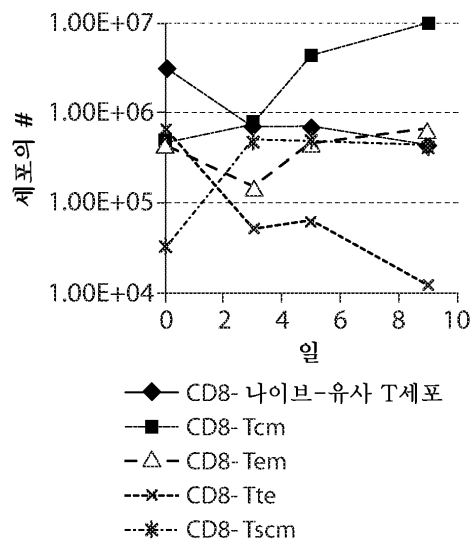
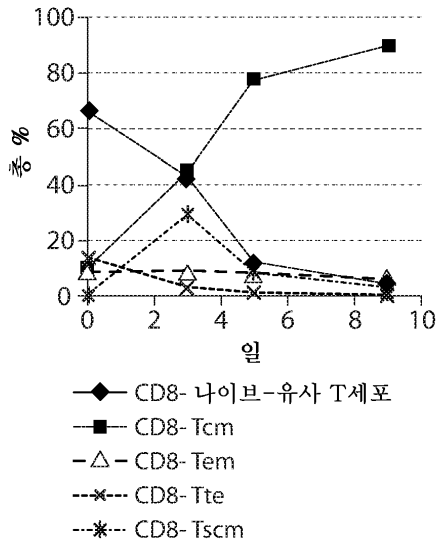


도면30a

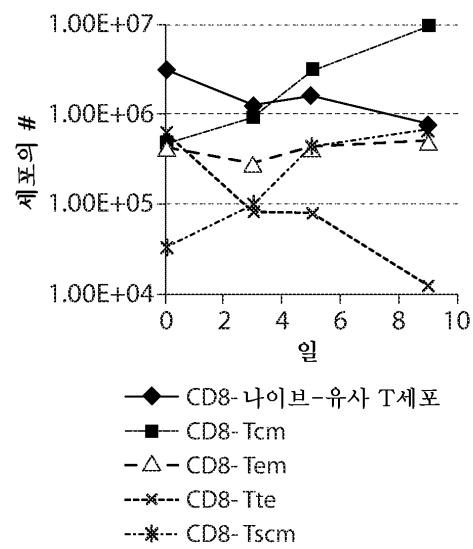
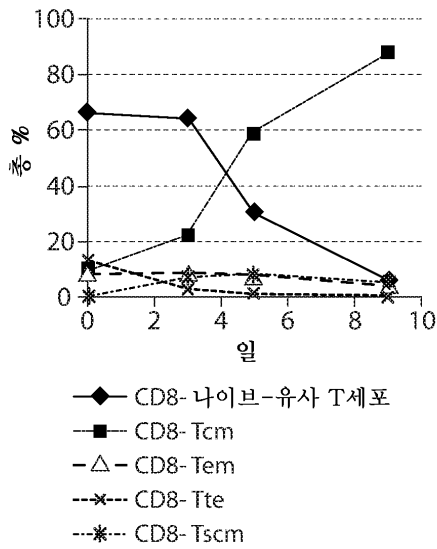


도면30b

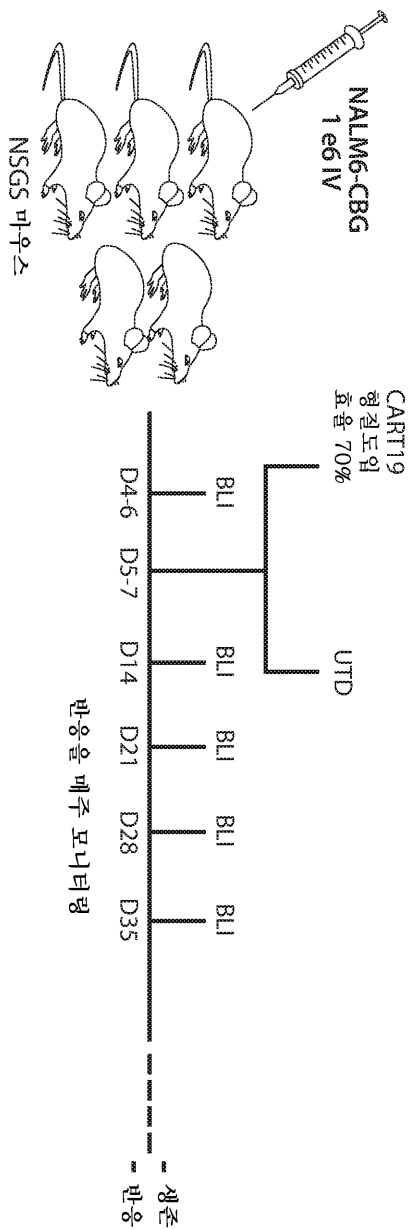
IL-2 CD8+



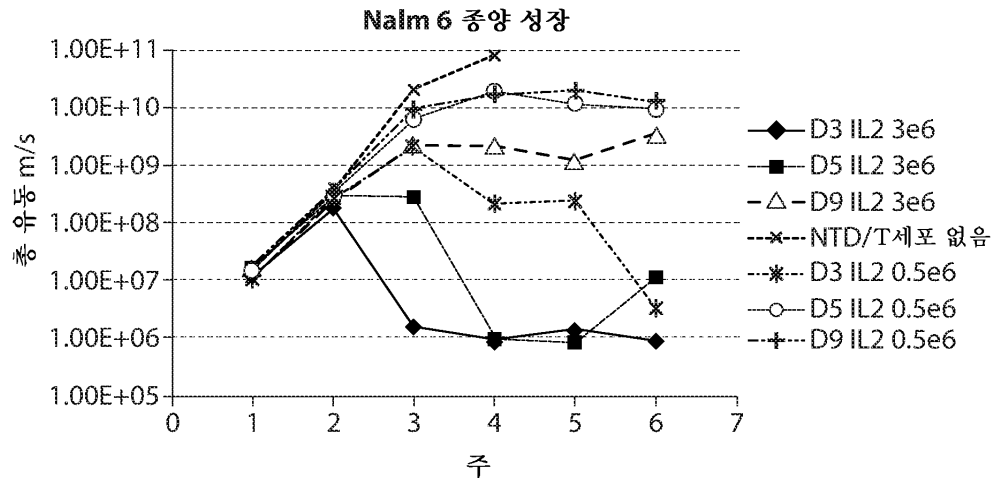
IL-7/15 CD8+



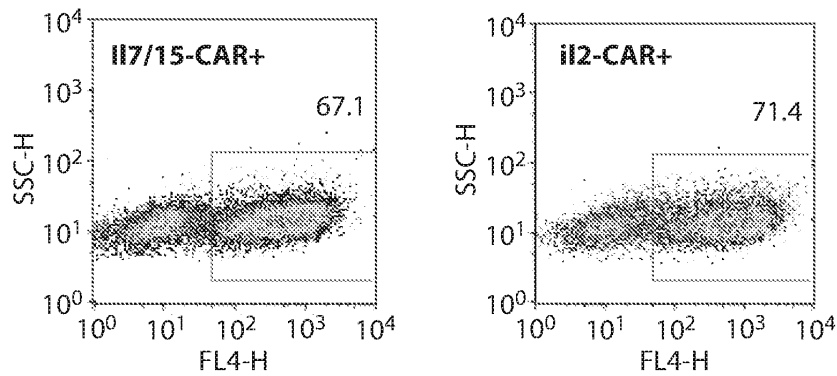
도면31a



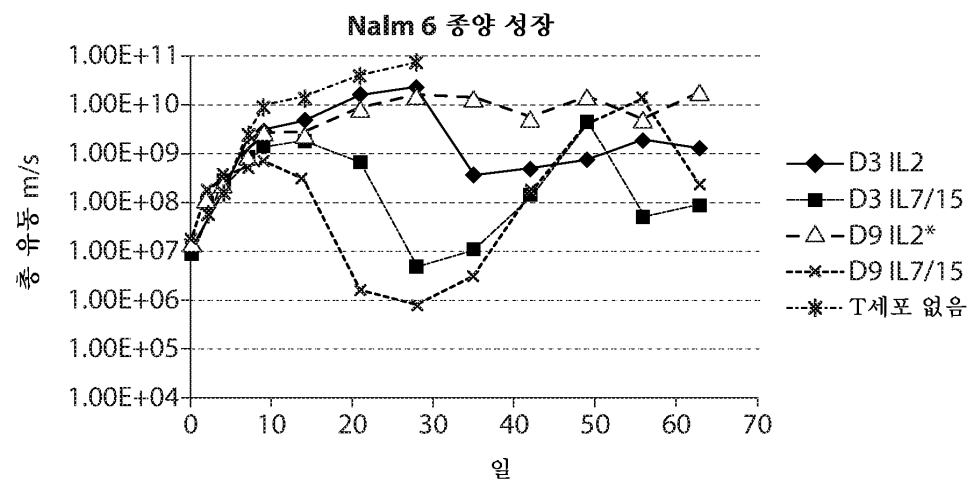
도면31b



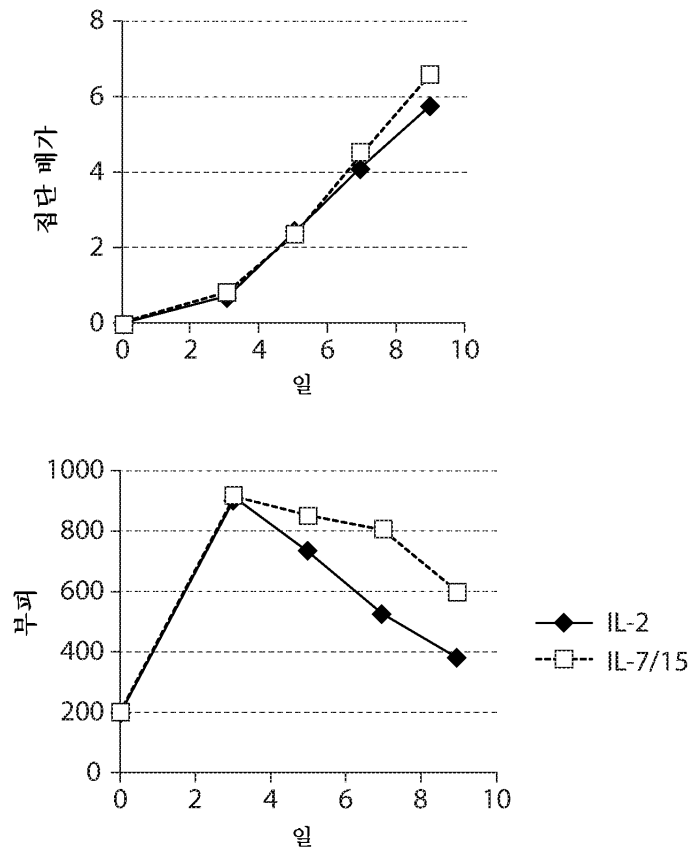
도면31c



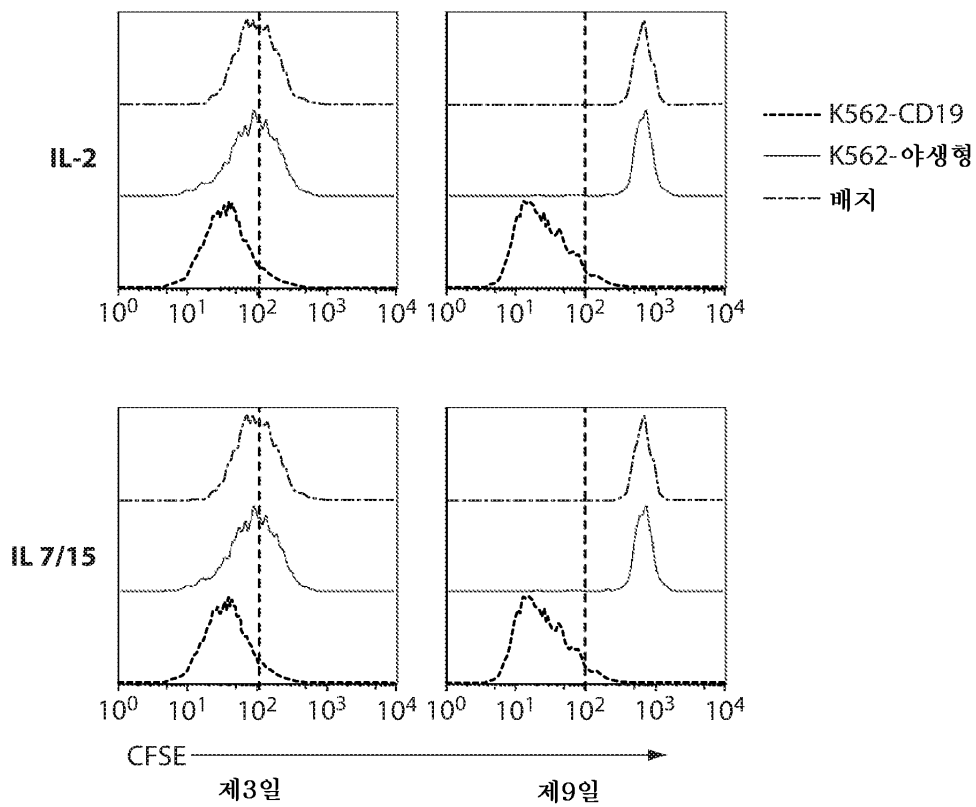
도면31d



도면32



도면33



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

<120> METHODS OF MAKING CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR-EXPRESSING CELLS

<130> N2067-7067WO

<140><141><150> 62/133,137

<151> 2015-03-13

<150> 62/097,375

<151> 2014-12-29

<160> 122

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 2

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 2

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

1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 3

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 115

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Cys Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro

85 90 95

Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Arg Ser

100 105 110

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

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

<400> 6

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc

30

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 11

<211> 1184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

cgtgaggctc cggcgccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaaactggg 120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cgcctgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
gtgccgtgtg tgggtcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300

gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360
ggtagggagag ttcgaggcct tgcgttaag gagcccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420
cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgtttttt 540
tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactgggtatt tcggtttttg 600
gggccgcggg cggcgacggg gcccggtgct cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcgacggg gtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720

tgcctggcct cgcgccgccc tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780

caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840
 ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900
 ttccgtcttc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgcgcg tccaggcacc 960
 tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020
 cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
 tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140

agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgac gtga 1184

<210> 12

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 12

atggccctgc ctgtgacagc cctgtgctg cctctgctc tgctgctga tgccgctaga 60

ccc 63

<210> 13

<211> 135

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccctg 60

ttcctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120

gacttcgcct gtgat 135

<210> 14

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc cgcgcgcccc 60

gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 15

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(40)

<223> /note="This sequence may encompass 1-10 'Gly Gly Gly Ser'
repeating units"

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

35 40

<210> 16

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 16

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro

1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr

20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro

35 40 45

<210> 17

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 17

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtec ttctcctgtc actggttatac 60

accctttact gc 72

<210> 18

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 18

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 19

<211> 33

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

```

    primer"
<400> 19
ataggatccc agctggtgga gtctggggga ggc
33
<210> 20
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    polynucleotide"
<400> 20
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc ccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc
60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc
120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat
180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc
240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc
300
tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc
336
<210> 21
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    polynucleotide"
<400> 21
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc ccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc
60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc
120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat
180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc
240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc
300
tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc
336
<210> 22
<211> 813

```

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 22

```
atggccctgc ccgtcacgcg tctgctgctg cccttgctc tgcttcttca tgcagcaagg      60
ccggacatcc agatgaccca aaccacctca tccctctctg cctctcttgg agacagggtg      120
accatttctt gtgcgccag ccaggacatc agcaagtatc tgaactggta tcagcagaag      180
ccggacggaa ccgtgaagct cctgatctac catacctctc gcctgcatag cggcgtgccc      240
tcacgttctt ctggaagcgg atcaggaacc gattattctc tcaacttttc aaatcttgag      300
caggaagata ttgccacctt tttctgccag cagggttaata cctgcccta caccttcgga      360
ggagggacca agctcgaaat caccggtgga ggaggcagcg gcggtggagg gtctggtgga      420
```

```
ggtggttctg aggtgaagct gcaagaatca ggccctggac ttgtggcccc ttcacagtec      480
ctgagcgtga ctgacacgt gtccggagtc tccctgcccg actacggagt gtcattggatc      540
agacaacctc cacggaaagg actggaatgg ctcggtgtca tctggggtag cgaaactact      600
tactacaatt cagccctcaa aagcaggctg actattatca aggacaacag caagtcccaa      660
gtctttctta agatgaactc actccagact gacgacaccg caatctacta ttgtgctaag      720
cactactact acggaggatc ctacgtatg gattactggg gacaaggtac ttccgtcact      780
gtctcttcac accatcatca ccatcaccat cac                                     813
```

<210> 23

<211> 4027

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

```
caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc      60
cgcgcgtcc ccgtgccga gccgtgcgct ccttgctgcg cagccactac cgcgagggtc      120
tgccgtggc cacgttcgtg cggcgccctg ggccccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg      180
gggacccggc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtcct ggtgtgcgtg ccttgggacg      240
cacggccgcc ccccgccgcc cctccttcc gccaggtgtc ctgctgaag gagctggtgg      300
cccagtgct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg      360
```

cgctgctgga cggggcccg cggggccccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct 420

acctgccccaa cacgggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggctggggg ctgctgttgc 480

gccgctggg cgacgacgtg ctggttcacc tgcctggcag ctgcgcgtc tttgtgctgg 540

tggtccag ctgcgcctac cagggtgtgc gccgcccgt gtaccagtc ggctgtgcca 600

ctcaggcccc gcccccgca cagctagtgc gacccgaag gcgtctggga tgcgaacggg 660

cctggaacca tagcgtcagg gaggccggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga 720

ggaggcgcgg gggcagtgc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg 780

ctgccccga gccggagcgg acgcccgtt ggccggggc ctggggccac ccgggcagga 840

cgctggacc gactgacctt ggtttctgt ttgtgtcacc tgccagacc gccgaagaag 900

ccacctctt ggagggtgc ctctctggca cgcgccact ccacctatc gtgggcccgc 960

agcaccagc gggccccca tccacatgc ggccaccag tccctgggac acgcttgtc 1020

ccccgtgta cgccgagacc aagcacttc tctactctc aggcgacaag gagcagctgc 1080

ggcctctct cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgtcgg aggcctgtg 1140

agacctctt tctgggttc aggccttga tgccagggac tccccgagg ttgccccgc 1200

tgccccagc ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg aaccacgcgc 1260

agtgcacct cggggtgtc ctcaagacg actgcccgt gcgagctgc gtcacccag 1320

cagccggtgt ctgtgcccg gagaagcccc agggctctgt ggccggcccc gaggaggagg 1380

acacagacc ccgtgcctg gtgcagctgc tccgcagca cagcagccc tggcaggtgt 1440

acggcttct ggggctgc ctgcgccgc ttgtgcccc aggcctctg ggctccaggc 1500

acaacgaac ccgttctc aggaacacca agaagttcat ctccctggg aagcatgcca 1560

agctctcgt gcaggagct acgtggaaga tgagcgtgc gggctgcgt ttgctgcga 1620

ggagcccagg ggttggtgt gttccggcg cagagcacc tctgcgtgag gagatcctgg 1680

ccaagttct gactggctg atgagtgtg acgtcgtca gctgctcagg tctttcttt 1740

atgtcacga gaccagtgt caaaagaaca ggctctttt ctaccggaag agtgtctgga 1800

gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt 1860

cggaagcaga ggtcaggcag catcggaag ccaggccgc cctgctgacg tccagactcc 1920

gcttcatccc caagcctgac gggctgcgc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag 1980

ccagaacgtt ccgcagagaa aagaggccg agcgtctac ctgagggtg aaggcactgt 2040

tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccgcct cctgggcgc tctgtgctgg 2100

gcctggacga tatccacagg gcctggcgca cttcgtgct gcgtgtgcgg gccagggacc 2160

cgccgcctga gctgtactt gtcaaggtg atgtgacggg cgcgtacgac accatcccc 2220

aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactgctgctc 2280
gtcggatgct cgtgggtccag aaggccgccc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc 2340
acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg 2400
agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctctccctg aatgaggcca 2460

gcagtggcct cttcgacgtc ttctacgtc tcatgtgcca ccacgccgtg cgcacaggg 2520
gcaagtccta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggtc catcctctcc acgtgctct 2580
gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc 2640
tgtctctgct tttgggtgat gatttcttgt tggtagacacc tcacctcacc cagcgaaaa 2700
ccttctcag gaccctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgctgggtg aacttgcgga 2760
agacagtggg gaacttcct gtagaagac aggccctggg tggcacggct tttgttcaga 2820
tgccggccca cggcctattc cctgggtgcg gcctgctgct ggatacccgg accctggagg 2880

tgcagagcga ctactccagc tatgcccga cctccatcag agccagtctc acctcaacc 2940
gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggtcttg cggctgaagt 3000
gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct 3060
acaagatcct ctgctgcag gcgtacaggt ttacgcatg tgtgctgcag ctccatttc 3120
atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tctgctgct catctctgac acggcctccc 3180
tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctggggggc aaggcgccg 3240
ccggccctct gccctccag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc 3300

tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tctggggtc actcaggaca gcccagacgc 3360
agctgagtgc gaagctccc gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaaaccgg 3420
cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgccac agccaggccg 3480
agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccg ggtcttacgt cccaggaggagg gagggcggc 3540
ccacaccag gcccgaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgagcct 3600
gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc 3660
tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc 3720

agggccagct tttctcacc aggagcccgg ctccactcc ccacatagga atagtccatc 3780
cccagattcg ccattgttca cccctgccc tgcctcctt tgcttccac ccccaccatc 3840
caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaaggtgt 3900
gccctgtaca caggcgagga cctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg 3960
ggagggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa 4020
aaaaaaa 4027

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 24

atagctagca cctaggacgg tcagcttggt ccc

33

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> /note="This sequence may encompass 1-6 'Gly Gly Gly Gly Ser'
repeating units"

<400> 26

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> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 27

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 28

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

1 5 10 15

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 29

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 30

<211> 5000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5000)

<223> /note="This sequence may encompass 50-5000 nucleotides"

<400> 30

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 960

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1260
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1320
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1380
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1440
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1500
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1560
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1620
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1680
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1740
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1800
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1860
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1920
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1980
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2040
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2100
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2160
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2220
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2280
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2340
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2400
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2460
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2520
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2580
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2640
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2700
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2760
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2820
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2880
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2940

[illegible]

```

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5000

```

<210> 31

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 31

```

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 100

```

<210> 32

<211> 5000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5000)

<223> /note="This sequence may encompass 50-5000 nucleotides"

<400> 32

```

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 120
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 180
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 240
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 300
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 360

```


tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4020
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4080
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4140
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4200
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4260
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4320
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4380
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4440
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4500
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4560
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4620
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4680
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4740
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4800
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4860
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4920
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4980
tttttttttt tttttttttt	5000

<210> 33

<211> 5000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5000)

<223> /note="This sequence may encompass 100-5000 nucleotides"

<400> 33

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120

[illegible]

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000
<210> 34	
<211> 400	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
<220><221> MISC_FEATURE	
<222> (1)..(400)	

<223> /note="This sequence may encompass 100-400 nucleotides"

<400> 34

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

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	400
--	-----

<210> 35

<211> 2000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2000)

<223> /note="This sequence may encompass 50-2000 nucleotides"

<400> 35

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	480
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	540
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	600
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	660
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	720

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1500
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1620
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2000
<210> 36	
<211> 230	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"	
<400> 36	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe	

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

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

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

 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys Met
 225 230
 <210> 37
 <211> 690
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 37

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggaccc 60

agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgag 120

gtgacctgtg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac 180

gtggacggcg tggagggtgca caacgccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240

acctaccggg tgggtgtccgt gctgacctg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300

tacaagtgtg aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360

gccaagggcc agcctcggga gccccagggtg tacacctgc cccctagcca agaggagatg 420

accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctacccag cgacatcgcc 480

gtggagtggg agagcaacgg ccagccccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 540

gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 600

gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag 660

aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690

<210> 38

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 38

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys

35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

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

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
275 280

<210> 39

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 39

Glu Ile Val Met 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 Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser

180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr

195 200 205

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240
Ser Ser

<210> 40

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 40

Glu Ile Val Met 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 Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser

180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr

195 200 205

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Ser

<210> 41

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 41

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys

50 55 60

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

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

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln
210 215 220
Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
225 230 235 240
Ile Lys

<210> 42

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 42

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

165 170 175

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

225 230 235 240

Ile Lys

<210> 43

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 43

Glu Ile Val Met 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 Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser

180 185 190

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys

195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 44

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 44

Glu Ile Val Met 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 Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

115 120 125
Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
130 135 140
Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
145 150 155 160
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser

180 185 190
Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
195 200 205
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 45

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 45

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35	40	45
Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys		
50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu		
65	70	75
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
115	120	125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met		
130	135	140
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr		
145	150	155
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr		
165	170	175
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser		
180	185	190
Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
195	200	205
Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala		
210	215	220
Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln		
225	230	235
240		
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
245		
<210> 46		
<211> 247		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220><221> source

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

<400> 46

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr

165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser

180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

245

<210> 47

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 47

Glu Ile Val Met 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 Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

145 150 155 160

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

 165 170 175

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser

 180 185 190

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys

 195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

 210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 245

<210> 48

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 48

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys

 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr

165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser

180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

195 200 205

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

210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

245

<210> 49

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 49

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

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

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

 Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
 210 215 220
 Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser

<210> 50

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 50

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

1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

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

35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys

50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala

130 135 140
Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala

145 150 155 160
Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

165 170 175
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly

180 185 190

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

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

<210> 51

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 51

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 Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu

115					120					125						
Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	
130					135					140						
Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	
145					150					155					160	
Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	
165					170					175						
Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	
180					185					190						
Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	
195					200					205						
Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	
210					215					220						
Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	
225					230					235					240	
Ser	Ser															

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420

ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480

ctttcactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc 540

agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactactctt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660

gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtag tctggtcacc 780

gtgtccagcc accacatca tcaccatcac cat 813

<210> 53

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 53

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg 60

ccgaaattg tgatgacca gtcaccgcc actcttagcc ttccaccgg tgagcgcga 120

accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc taaaataacc ttaattgta tcaacagaag 180

cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240

gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300

ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca cctgccta cactttgga 360

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420

ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480

ctttcactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc 540

agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660

gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtag tctggtcacc 780

gtgtccagcc accacatca tcaccatcac cat 813

<210> 54

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 54

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc	60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc	120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagttagctg gattagacag	180
cctcccgaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat	240
tcatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc	300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac	360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca	420
tctggtaggag gaggtagcgg aggagggcgg agcggtaggag gtggctccga aatcgtgatg	480
accagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg	540
gcatacaag atatttcaaa atacctcaat tggatatcaac agaagccggg acaggccct	600
aggcttctta tctaccacac ctctgcctg catagcggga ttccgcacg ctttagcggg	660
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc	720
gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt	780
gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac	813

<210> 55

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 55

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc	60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc	120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagttagctg gattagacag	180

cctcccgaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240
 caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
 tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480

accagagcc ctgcaacct gtccctttct cccggggaac gggtaccct ttcttgcgg 540
 gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggccct 600
 aggtcttta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttcccgacg ctttagcggg 660
 tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
 gtctacttct gccagcaggg taacacctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780
 gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac 813

<210> 56

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 56

atggccctcc cagtgaccgc tctgtctgtg cctctcgac ttcttctcca tgccgctcgg 60
 cctgagatcg tcatgacca aagccccgt accctgtccc tgtcaccgg cgagagggca 120
 accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggtc tcagcagaag 180
 ccagggcagg ctctcgct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggatcccc 240
 gccagatfff cgggagcgg gtctggaacc gactacacc tcaccatctc ttctctgcag 300
 cccgaggatt tcgccgtcta ttctgccag cagggaata ctctgccga cacttcggt 360

caaggtacca agctggaat caaggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420
 ggtggctccg gaggaggagg ttccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480
 aagccatcag aaacctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccactac 540
 ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggtcttg aatggattgg ggtgatttgg 600
 ggatcagaga ctacttacta ctcttcatca cttaagtcac gggtcaccat cagcaaagat 660
 aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcactgtga ccgcccgtga caccgccgtg 720

tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggctttatg ctatggacta ctggggacag 780

gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 57

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 57

atggccctcc cagtaccgc tctgtctg cctctcgac ttcttctcca tgccgtcgg 60

cctgagatcg tcatgacca aagccccgt accctgtccc tgtcaccgg cgagaggga 120

accctttcat gcaggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180

ccagggcagg ctctcgcct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggtatcccc 240

gccagatddd ccgggagcgg gtctggaacc gactacacc tcaccatctc ttctctgcag 300

cccaggatt tcgccgtcta ttctgccag cagggaata ctctgccga caccttcggt 360

caaggtacca agctggaat caaggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420

ggtggctcgg gaggaggagg ttccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480

aagccatcag aaacctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540

ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggtcttg aatggattgg ggtgatttgg 600

ggatcagaga ctacttacta ccagtcac caaagtcac gggtcacat cagcaaagat 660

aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcatctgtga ccgccgtga caccgccgtg 720

tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggctttatg ctatggacta ctggggacag 780

gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 58

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 58

atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg 60
 ccccaagtcc agctgcaaga gtcaggaccc ggactggtga agccgtctga gactctctca 120

ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcca 180
 cctcccgga aagggttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac 240
 tcactttccc tgaagtcagg ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc 300
 ctttaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac 360
 tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc 420
 agcggcggtg gaggtctgg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg 480
 agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcacccgg cgagagagca 540

accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggtg tcagcaaaaa 600
 ccggggcagg cccctcgct cctgatctac catacctcac gccttcaactc tggatcccc 660
 gctcggttta gcggtcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag 720
 ccagaagatt tcgcagtgt tttctgccag cagggaata ccttctctta caccttcggt 780
 cagggaacca agctgaaat caagcaccat caccatcacc accaccat 828

<210> 59
 <211> 828
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 59

atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg 60
 ccccaagtcc agctgcaaga gtcaggaccc ggactggtga agccgtctga gactctctca 120
 ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcca 180
 cctcccgga aagggttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac 240
 cagtcttccc tgaagtcagg ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc 300
 ctttaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac 360
 tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc 420

agcggcggtg gaggtctgg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg 480
 agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcacccgg cgagagagca 540

accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa 600
ccggggcagg cccctcgctt cctgatctac catacctcac gccttcactc tggatcccc 660
gctcggttta gcggatcagg atctgggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag 720
ccagaagatt tcgcagtgtt tttctgccag cagggcaata ccttcctta caccttcggt 780
cagggaaacca agctcgaaat caagcacat caccatcatc atcaccac 828

<210> 60

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 60

atggccctcc cagtaccgc tctgtctgt cctctcgac ttcttctcca tgccgtcgg 60
cctgagatcg tcatgacca aagccccgt accctgtccc tgtcaccgg cgagaggga 120
accctttcat gcaggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180
ccagggcagg ctctcgctt gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggatcccc 240
gccagatttt ccgggagcgg gtctggaacc gactacaccc tcaccatctc ttctctgcag 300

cccaggatt tcgccgtcta tttctgccag caggggaata ctctgccga caccttcggt 360
caaggtacca agctggaat caaggagggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420
ggtggctccg gaggaggagg ttccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480
aagccatcag aaacctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540
ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggtcttg aatggattgg ggtgatttgg 600
ggatcagaga ctacttacta caattcatca cttaagtcac gggtcaccat cagcaaagat 660
aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcactgtga ccgccgtga caccgccgtg 720

tactattgtg ccaaacatta ctattacgga ggtcttatg ctatggacta ctggggacag 780
gggaccttgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 61

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 61

atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg	60
ccccaagtcc agctgcaaga gtcaggaccc ggactggtga agccgtctga gactctctca	120
ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcca	180

cctcccggga aagggttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac	240
aactcttccc tgaagtcagg ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc	300
cttaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac	360
tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc	420
agcggcggtg gagggctctg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg	480
agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcacccgg cgagagagca	540
accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggtg tcagcaaaaa	600

ccggggcagg cccctcgctt cctgatctac catacctcac gccttcaactc tggatatccc	660
gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag	720
ccagaagatt tcgcagtgtg tttctgccag cagggaata ccttctctta caccttcggt	780
cagggaacca agctcgaaat caagcaccat caccatcacc accaccat	828

<210> 62

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 62

atggccctcc ctgtcacgc cctgctgctt ccgctggctc tttctctcca cgccgctcgg	60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca	120
accctgtctt gcagagctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag	300
ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaca ccttgccta cacctttgga	360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggt	420

ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480

ctttcactga cttgtactgt gacgggagtg tctctccccg attacgggtg gtcttggtac 540

agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactacaatt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660

gtgtcactga aactgtcacc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780

gtgtccagcc accacatca tcacatcac cat 813

<210> 63

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 63

atggctctgc ccgtgaccgc actcctctctg ccactggctc tgctgttca cgcgcctcgc 60

ccacaagtc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120

ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gactgagctg gattagacag 180

cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaac cacttactat 240

aactcttccc tgaagtacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300

ctcaagctct catcagtcac cgcgcgtgac accgcctgtg attactgtgc caagcattac 360

tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420

tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480

accagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgcgg 540

gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatatcaac agaagccggg acaggccct 600

aggcttttta tctaccacac ctctgcctg catagcggga ttccgcacg ctttagcggg 660

tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720

gtctacttct gccagcagg taacacctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780

gagatcaaac atcaccacca tcacacat cac 813

<210> 64

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 64

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

165 170 175

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

180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser

195 200 205

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His
260 265 270

<210> 65

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 65

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

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

115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175
 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190

 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
 260 265 270

 <210> 66
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 66
 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 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30

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

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
145 150 155 160

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

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

<210> 67

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr

180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser

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

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His His His
 260 265 270

<210> 68

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 68

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 145 150 155 160

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

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

<210> 69

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 69

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

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

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

 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser
 165 170 175
 Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

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

 245 250 255
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His
 260 265 270

His His His His

275

<210> 70

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 70

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 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
 180 185 190
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 195 200 205

Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 225 230 235 240
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His
 260 265 270

His His His His
 275

<210> 71

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 71

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

Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
165 170 175
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
180 185 190
Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
195 200 205
Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
210 215 220
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
225 230 235 240
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
245 250 255
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His
260 265 270
His His His His
275
<210> 72
<211> 276
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 72

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

210 215 220

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp
 245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His
 260 265 270
 His His His His
 275

<210> 73

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 73

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30
 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
 35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys

85 90 95
 Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

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

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

 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 225 230 235 240
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His
 260 265 270
 His His His His
 275
 <210> 74

 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 74
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser
195 200 205

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
260 265 270

<210> 75

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 75

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 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
20 25 30

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

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser

195	200	205	
Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly			
210	215	220	
Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala			
225	230	235	240
Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln			
245	250	255	
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His His His			
260	265	270	

<210> 76

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 76

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 His His His His His His His His
 260 265 270

<210> 77

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 77

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30

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

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

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

 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser 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> 78
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="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 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys

210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser 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> 79			
<211> 486			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"			
<400> 79			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1 5 10 15			
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu			
20 25 30			
Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val			
35 40 45			
Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys			
50 55 60			
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr			
65 70 75 80			
Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys			
85 90 95			
Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala			
100 105 110			
Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly			
130 135 140			
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met			
145 150 155 160			
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr			

165	170	175
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr		
180	185	190
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser		
195	200	205
Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
210	215	220
Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala		
225	230	235
Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln		
245	250	255
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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
485

<210> 80

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val

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

100 105 110

Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
145 150 155 160
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
165 170 175
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
180 185 190
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
195 200 205
Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220
Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
225 230 235 240
Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
245 250 255
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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> 81

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 81

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

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

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
305 310 315 320
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
325 330 335
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
340 345 350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
355 360 365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
370 375 380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465 470 475 480
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 82

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="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 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
20 25 30
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45
Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
145 150 155 160
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser
165 170 175
Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
180 185 190
Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln
195 200 205
Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
210 215 220
Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
225 230 235 240
Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp

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

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

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

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

<210> 83

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 83

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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> 84

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
35 40 45

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

Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130	135	140	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
145	150	155	160
Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro			
	165	170	175
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys			
	180	185	190
Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
	195	200	205
Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser			
	210	215	220
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln			
225	230	235	240
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro			
	245	250	255
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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> 85

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 85

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

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

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

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

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

<210> 86

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 86

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45

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

 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser
 165 170 175

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

 Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp
 245 250 255
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 87

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 87

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 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser

210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 225 230 235 240

 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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> 88

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 88

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val 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 Leu Val Thr Val Ser Ser 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> 89

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="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 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 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> 90

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 90

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgttggtc tttgtctcca cgccgtcgg	60
cccgaaattg tgatgacca gtcacccgc actcttagcc tttcaccgg tgagcgcga	120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc taaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccgacagg ctctcgcct tetgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag	300
ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga	360

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420

ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480

ctttcactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc 540

agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactactctt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660

gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780

gtgtccagca ccaactacccc agcaccgagg ccacccaccc cggctcctac catcgcctcc 840

cagcctctgt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccccgag ctggtggggc cgtgcatacc 900

cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggcc cttctggctgg tacttgcggg 960

gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020

tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080

tcatgccgtt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140

agcgagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200

ggtcggagag aggagtacga cgtgtgggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260

gggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320

atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaagggaac gcagaagagg caaaggccac 1380

gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440

caggccctgc cgcctcgg 1458

<210> 91

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 91

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtcct ccgtggctc ttctgtcca ccccgtcgg 60

cccgaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca 120

accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180

cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240

gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcactatcag ctactgcag 300
ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgggt 420
ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480

ctttcactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacgggtg gtcttggatc 540
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600
tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720
cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780
gtgtccagca ccaactaccc agcaccgagg ccaccacccc cggctcctac catcgctcc 840
cagcctctgt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900

cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg 960
gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
tcatgccgtt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
ggtcggagag aggagtacga cgtgtctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260
gggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaagataag 1320

atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaagccac 1380
gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440
caggccctgc cgcctcgg 1458

<210> 92
<211> 1458
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 92
atggctctgc ccgtgaccgc actcctctctg ccaactggctc tgctgcttca cgcgcctcgc 60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120

ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240
tcatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
ctcaagctct catcagtcac cgccgtgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcggaggag gtggtccga aatcgtgatg 480
accagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgcgg 540

gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatatcaac agaagccggg acaggccct 600
aggtttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttccgcacg ctttagcggg 660
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
gtctacttct gccagcagg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780
gagatcaaaa cactactcc cgctccaagg ccaccaccc ctgccccgac catcgctct 840
cagccgcttt cctgcgtcc ggagcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
cggggtcttg acttcgctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg 960

gtcctgctgc ttctactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
tcatgccgtt tccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
ggtcggagag aggagtacga cgtgtcggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260
gggaagccgc gcagaaagaa tccccaagag ggcctgtaca acgagctcca aaagataag 1320
atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaagggaac gcagaagagg caaaggccac 1380

gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440
caggccctgc cgctcgg 1458

<210> 93
<211> 1458
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 93
atggctctgc ccgtgaccgc actcctctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgtcgc 60

ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggctctggga agccatctga gactctgtcc 120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180

ccctccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240
caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccaat tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
ctcaagctct catcagtcac cgccgtgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
tctggtaggag gaggtagcgg aggaggcggg agcggtaggag gtggctccga aatcgtgatg 480
accagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgcgg 540
gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatatcaac agaagccggg acaggccct 600

aggcttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttccgcacg ctttagcggg 660
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
gtctacttct gccagcagg taacacctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780
gagatcaaaa ccactactcc cgctccaagg ccaccaccc ctgccccgac catcgctct 840
cagccgcttt cctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
cggggtcttg acttcgctg cgatatctac atttggggcc ctctggctgg tacttgcggg 960
gtctgtctgc ttctactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020

tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
tcatgccgtt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260
gggaagccgc gcagaaagaa tcccaagag ggctgtaca acgagctcca aaagataag 1320
atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaagggaac gcagaagagg caaagccac 1380
gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440

caggccctgc cgcctcgg 1458

<210> 94
<211> 1473
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 94

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgcgctcgg	60
cccgaaattg tgatgaccca gtcaccgcc actcttagcc ttccaccgg tgagcgcga	120
accctgtctt gcagagctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccggacagg ctctcgctt tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctactgcag	300
ccagaggact tcgtgtctta ttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga	360
cagggcacca agctcgagat taaagtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgg	420
ggaggaagcg gcggaggcgg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctttgtg	480
aagccatcag aaactctttc actgacttgi actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac	540
ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttg	600
ggctctgaga ctacttacta ctcttcaccc ctcaagtcac gcgtcaccat ctcaaaggac	660
aactctaaga atcagggtgc actgaaactg tcactgtga ccgcagccga caccgccgtg	720
tactattgcg ctaagcatta ctattatggc ggagagctacg caatggatta ctggggacag	780
ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgt	840
cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt	900
ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gctgcgata tctacatttg ggccctctg	960
gctggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcgg	1020
cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa ccttcatga ggctgtgca gactactcaa	1080
gaggaggacg gcgtttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc	1140
gtgaaattca gccgcagcgc agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac	1200
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg	1260
gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag	1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccacca ggacacctat	1440
gacgtcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg	1473

<210> 95

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 95

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc tctgtctcca cgccgtcgg	60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc ttccacccgg tgagcgcgca	120
acctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag	300
ccagaggact tcgtgtctta tttctgtcag caagggaaca cctgccta cacttttga	360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgggt	420
ggaggaagcg gaggcggagg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggtcttgtg	480
aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccattac	540
ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttgg	600
ggctctgaga ctacttacta ccaatcatcc ctcaagtac gcgtcacat ctcaaaggac	660
aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcatctgtga ccgcagccga caccgccgtg	720
tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag	780
ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact acccagcac cgaggccacc caccgccgt	840
cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catglagacc cgcagctggt	900
ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggccccctctg	960
gttggtactt gcgggttctt gctgttttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcgggt	1020
cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa	1080
gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc	1140
gtgaaattca gccgcagcg agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac	1200
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg	1260
gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagaggcct gtacaacgag	1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat	1440
gacgtcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg	1473

<210> 96

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 96

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc	60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc	120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gactgagctg gattagacag	180
cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat	240
tcatcttccc tgaagtcacg ggtcacatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc	300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac	360

tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca	420
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccgg aggtggcggga	480
agcgaatcgc tgatgaccca gagccctgca accctgtccc tttctcccgg ggaacgggct	540
accctttctt gtcgggcacg acaagatata taaaataacc tcaattggtg tcaacagaag	600
ccgggacagg cccttaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc	660
gcacgcttta ggggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag	720
cccaggagact tcgccgtcta cttctgccag cagggttaaca ccctgccgta caccttcggc	780

cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccctc caaggccacc caccctgcc	840
ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt	900
ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggccctctg	960
gctggtactt ggggggtcct gctgctttca ctcgtgatca ctctttactg taagcgcggt	1020
cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa	1080
gaggaggacg gctgttcatg ccggttcca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc	1140
gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac	1200

aacgaactca atcttggctg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg	1260
gaccagaaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag	1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat	1440
gacgtcttcc acatgcaggc cctgccgcct cgg	1473

<210> 97

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 97

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc	60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggatga agccatctga gactctgtcc	120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag	180
cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat	240
caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc	300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac	360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca	420
tctggtaggag gaggtagcgg aggaggcggg agcggtaggag gtggctccgg aggcggtggg	480
tcagaaatcg tgatgaccca gagccctgca accctgtccc tttctcccgg ggaacgggct	540
accctttctt gtcgggcacg acaagatac taaaataacc tcaattggta tcaacagaag	600
ccgggacagg cccctagctt tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc	660
gcacgcttta gcggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag	720
cccgaggact tcgccgtcta cttctgccag cagggttaaca cctgcccga caccttcggc	780
cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccctc caaggccacc caccctgcc	840
ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt	900
ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg	960
gctggtaactt gcggggtcct gctgctttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcggt	1020
cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cctttcatga ggctgtgca gactactcaa	1080
gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc	1140
gtgaaattca gccgcagcgc agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac	1200
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg	1260
gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag	1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat	1440

gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 98

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 98

atggccctcc ctgtcacgc cctgctgctt ccgtggctc tctgctcca cgccgctcgg 60

cccgaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc ttccacccgg tgagcgcgca 120

accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180

cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240

gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag 300

ccagaggact tcgtgtctta tttctgtcag caagggaaca cctgcccta cacctttgga 360

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420

ggaggaagcg gaggcgggtgg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc ggggtcttgtg 480

aagccatcag aaactcttct actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac 540

gggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtcttg aatggattgg agtgatttgg 600

ggctctgaga ctacttacta caactcatcc ctcaagtcac gcgtcaccat ctcaaaggac 660

aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcactgttga ccgcagccga caccgccgtg 720

tactatttgc ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780

ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccggt 840

cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900

ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gctgcgata tctacatttg ggccctctg 960

gctgggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgatca ctctttactg taagcgcggt 1020

cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa ccttcatga ggctgtgca gactactcaa 1080

gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140

gtgaaattca gccgcagcgc agatgtctca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200

aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260

gacccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320

ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca cgcaccacaa ggacacctat 1440
gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 99
<211> 1473
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 99

atggccctcc ctgtaccgc cctgtctgtt ccgtggctc ttctgtcca ccccgtcgg 60
cccgaaattg tgatgacca gtcaccgcc actcttagcc ttccaccgg tgagcgcga 120

accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300
ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca cctgcccta cacctttgga 360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420
ggaggaagcg gaggcgggtg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc ggggtcttgtg 480
aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac 540

gggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttgg 600
ggctctgaga ctacttacta caactcatcc ctcaagtcac gcgtcaccat ctcaaaggac 660
aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcactgtga ccgcagccga caccgccgtg 720
tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780
ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgt 840
cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctgg 900
ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggccctctg 960

gtgggtactt gcggggtcct gctgttttca ctctgatca ctctttactg taagcgcgg 1020
cggaagaagc tgctgtacat cttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa 1080
gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140
gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260

gaccagaaa tggcgaggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380

agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccacca ggacacctat 1440
gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 100
<211> 1473
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 100

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
cctcccgaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240

aactcttccc tgaagtcacg gggtaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
tctgggtggag gaggtagcgg agggagcggg agcgggtggag gtggctccgg aggtggcggg 480
agcgaatcgc tgatgaccca gagccctgca accctgtccc tttctcccg ggaacgggct 540
accctttctt gtcgggcacg acaagatatc taaaataacc tcaattggtg tcaacagaag 600
ccgggacagg cccctaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc 660

gcacgcttta gcgggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag 720
cccaggagct tcgccgtcta ctctgtccag cagggttaaca cctgcccga cactctcggc 780
cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc 840
ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900
ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggccctctg 960
gctggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgatca ctctttactg taagcgcggt 1020
cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa 1080

gaggaggacg gcgtttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140
gtgaaattca gccgcagcgc agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
gaccagaaa tggcgaggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320

ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440
gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 101

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 101

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg 60
cccgaaattg tgatgacca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca 120
acctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
cccgacagg ctctcgctt tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300

ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca cctgcccta cacctttgga 360
cagggcacca agctcgagat taaagtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgggt 420
ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
ctttcactga ctgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc 540
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600
tactacaact catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780
gtgtccagca ccaactaccc agcaccgagg ccaccacccc cggtcctac catgcctec 840
cagcctctgt ccttgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
cggggtcttg atttcgctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg 960
gtctgtctgc tticactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
tcatgccgtt tcccagagga ggaggaaggc ggtgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140

agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200

ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260
 gggaagccgc gcagaaagaa tccccaagag ggctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320
 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaagccac 1380
 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440
 caggccctgc cgcctcgg 1458

<210> 102

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 102

atggccttac cagtaccgc cttgctctg ccgtggcct tgctgtcca cgccgccagg 60
 ccggacatcc agatgacaca gactacatcc tcctgtctg cctctctggg agacagagtc 120
 accatcagtt gcagggcaag tcaggacatt agtaaatatt taaattggtg tcagcagaaa 180
 ccagatggaa ctgttaact cctgatctac catacatca gattacactc aggagtccca 240
 tcaagttca gtggcagtg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300
 caagaagata ttgccactta cttttgcaa cagggttaata cgcttcgta cacgttcgga 360

ggggggacca agctggagat cacaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
 ggcgatctg aggtgaaact gcaggagtca ggacctggcc tgggtggcgc ctacagagc 480
 ctgtccgtca catgactgt ctcaggggtc tcattaccgc actatggtgt aagctggatt 540
 cgccagcctc cagaaaagg tctggagtgg ctgggagtaa tatgggtag tgaaaccaca 600
 tactataatt cagctctcaa atccagactg accatcatca aggacaactc caagagccaa 660
 gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccatttacta ctgtgcaaaa 720
 cattattact acggtggtag ctatgctatg gactactggg gccaaggaac ctcagtcacc 780

gtctcctcaa ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaacac cggcgccac catcgctcg 840
 cagcccctgt cctgcgccc agaggcgtgc cgccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 900
 agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctggcgc ccttggccgg gacttgtggg 960
 gtctcttc tgctactggt tatccctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg 1020
 tatatattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1080
 agctgccgat ttccagaaga agaagaagga gtagtgtaac tgagagtga gttcagcagg 1140

agcgcagacg cccccgcgta caagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200

ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 1260

ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 1320

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380

gatggccttt accaggggtc cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg 1440

caggccctgc ccctcgc 1458

<210> 103

<211> 847

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 103

aggtggcccc aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gcccaggca 60

gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc 120

ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc 180

cctgaatgtc catccatac ccagccgtg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag 240

gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag 300

gatgccatt tgacttggga ggttgccgga aaggtaccca cagggggggg tgaggaaggg 360

ttgctggagc gccattcaa tggctctcag agccagcact caagactcac cttccgaga 420

tccctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactetaa atcctcctag cctgccccca 480

cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccaggcac cagttaagct tagcctgaat 540

ctgctcgcca gtagtgatcc ccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc 600

tttagccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc 660

ggcttcgctc cagcccggcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggcctggagt 720

gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc 780

catgaagata gcaggacct gctaaatgtc tctaggagtc tggaggtttc ctacgtgact 840

gaccatt 847

<210> 104

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 104

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 105

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 105

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 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro
20 25 30
Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly
35 40 45
Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe
50 55 60

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

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

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
370 375 380

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

385 390

<210> 106

<211> 373

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 106

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr

1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe

20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn

85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg

115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala

165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe

180 185 190

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

195 200 205

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys

210 215 220

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln

340 345 350

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

355 360 365

Ala Leu Pro Pro Arg

370

<210> 107

<211> 1182

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 107

```

atggccctcc ctgtcactgc cctgcttctc ccctcgcac tctgctcca cgccgctaga      60
ccaccgggat ggtttctgga ctctccgat cgcccggtgga atccccaac cttctcaccg    120

gcactcttgg ttgtgactga gggcgataat gcgaccttca cgtgctcgtt ctccaacacc    180
tccgaatcat tctgtctgaa ctggtaccgc atgagcccggt caaaccagac cgacaagctc    240
gccgcttttc cggaagatcg gtcgcaaccg ggacaggatt gtcggttccg cgtgactcaa    300
ctgccaatg gcagagactt ccacatgagc gtggtccgcg ctaggcgaaa cgactccggg    360
acctacctgt gcggagccat ctgctggcg cctaaggccc aaatcaaaga gagcttgagg    420
gccgaactga gagtgaccga gcgcagagct gaggtgcca ctgcacatcc atcccatcg     480
cctcggcctg cggggcagtt tcagaccctg gtcacgacca ctccggcgcc gcgcccaccg    540

actccggccc caactatcgc gagccagccc ctgtcgtga ggccggaagc atgccgcct      600
gccgcccggag gtgtgtgca taccggggga ttggacttgc catgcgacat ctacatttgg    660
gtctctctcg ccggaacttg tggcgtgctc cttctgtccc tggatcatcac cctgtactgc    720
aagcggggtc ggaaaaagct tctgtacatt ttcaagcagc cttcatgag gcccgtgcaa    780
accacccagg aggaggacgg ttgctcctgc cggttccccg aagaggaaga aggaggttgc    840
gagctgcgcg tgaagtctc ccggagcgcc gacgcccccg cctataagca gggccagaac    900
cagctgtaca acgaactgaa cctgggacgg cggaagagt acgatgtgct ggacaagcgg    960

cgcgcccggg accccgaaat gggcgggaag ctagaagaa agaaccctca ggaaggcctg    1020
tataacgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctact ccgaaatttg gatgaaggga    1080
gagcggcgga ggggaaaggg gcacgacggc ctgtaccaag gactgtccac cgccaccaag    1140
gacacatacg atgccctgca catgcaggcc cttccccctc gc                       1182

```

<210> 108

<211> 1132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser

1 5 10 15
 His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly

 20 25 30
 Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45
 Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50 55 60
 Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
 65 70 75 80
 Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val

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

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

 210 215 220
 Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
 225 230 235 240
 Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
 245 250 255

Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
260 265 270

Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
275 280 285

Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
290 295 300

Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
305 310 315 320

Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
325 330 335

Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
340 345 350

Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
370 375 380

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
385 390 395 400

Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
435 440 445

Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe
450 455 460

Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser
465 470 475 480

Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met

500 505 510
 Ser Val Arg Gly Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
 515 520 525
 Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe

530 535 540
 Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
 545 550 555 560
 Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
 565 570 575
 Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
 580 585 590
 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln

595 600 605
 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 610 615 620
 Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
 625 630 635 640
 Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
 645 650 655
 Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg

660 665 670
 Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
 675 680 685
 Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
 690 695 700
 Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
 705 710 715 720
 Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln

725 730 735
 Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
 740 745 750

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

755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser

770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu

785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His

805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro

820 825 830

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

835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu

850 855 860

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala

865 870 875 880

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys

885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu

900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe

915 920 925

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

930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe

945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly

965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn

980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln

995 1000 1005
 Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln
 1010 1015 1020
 Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp
 1025 1030 1035
 Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly

1040 1045 1050
 Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu
 1055 1060 1065
 Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr
 1070 1075 1080
 Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr
 1085 1090 1095
 Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr

1100 1105 1110
 Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys
 1115 1120 1125
 Thr Ile Leu Asp

1130

<210> 109

<211> 521

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 109

acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct	60
ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgcccc gggtgtgatg gcgggggtgtg	120
gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc	180
gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga	240
cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg	300
ttccttgga gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggcccccg gtgttcccat	360
cgccgcttct agggccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgtctt gggtccagc	420
cgcgcgacg caaagggcct tgggtcgggt ctgcgcggcg cagggacgcg ttgggtccc	480

gacggaacct ttcccgctt ggggttgggg caccataagc t 521

<210> 110

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 110

acccctctct ccagccacta agccagttgc tcctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgctcc ggggtgatg gcgggggtg 118

<210> 111

<211> 221

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 111

acccctctct ccagccacta agccagttgc tcctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgctcc ggggtgatg gcgggggtg 120

gggcggaggg cgtggcgggg aaggcccgcc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180

gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac g 221

<210> 112

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 112

acccctctct ccagccacta agccagttgc tcctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc ggggtgtgatg gcggggtgtg 120

gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180

gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240

cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300

ttccttggaa gggctgaatc cccg 324

<210> 113

<211> 422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 113

acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc ggggtgtgatg gcggggtgtg 120

gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180

gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240

cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300

ttccttggaa gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggccccccgg gtgttcccat 360

cgccgcttct aggccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgtct ggggtccagc 420

cg 422

<210> 114

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 114

Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Pro Lys Lys

1 5 10 15

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

20 25 30
Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr
35 40 45

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

Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu
115 120 125

Glu Thr Ser Tyr

130

<210> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 115

Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys
1 5 10 15
Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly

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

Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu

85 90 95

Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Thr Ser

100 105

<210> 116

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 116

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg

1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr

35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys

85 90

<210> 117

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 117

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Ile Glu Ala Ser Arg

1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr

35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser

85 90 95

<210> 118

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 118

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg

1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr

35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser

85 90 95

<210> 119

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 119

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg

1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr

35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp

50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala

65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser

85 90 95

<210> 120

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (78)..(78)

<223> Any amino acid

<400> 120

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Xaa Glu Ala Ser Arg

1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr

35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp

50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Xaa Gln Ala

65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser

85 90 95

<210> 121

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 121

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Ile Glu Ala Ser Arg

1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr

35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp

50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala

65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser

85 90 95

<210> 122

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 122

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg

1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr

35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp

50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala

65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser

85 90 95