



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0093757
(43) 공개일자 2024년06월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/464412 (2023.05)
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7016401(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년06월01일
심사청구일자 2024년05월17일
- (62) 원출원 특허 10-2016-7036828
원출원일자(국제) 2015년06월01일
심사청구일자 2020년06월01일
- (85) 번역문제출일자 2024년05월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/033473
- (87) 국제공개번호 WO 2015/187528
국제공개일자 2015년12월10일
- (30) 우선권주장
62/006,313 2014년06월02일 미국(US)

- (71) 출원인
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리
프리젠티드 바이 더 세크러테리, 디파트먼트 오브
헬쓰 앤드 휴먼 서비스즈
미국, 메릴랜드 20892, 베서스다, 엠에스 7788,
스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스
티튜츠 오브 헬스, 오피스 오브 테크놀로지 트랜
스퍼
- (72) 발명자
코첸더퍼 제임스 엔
미국 메릴랜드주 20814 베테스다 로즈우드 드라이
브 8500
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

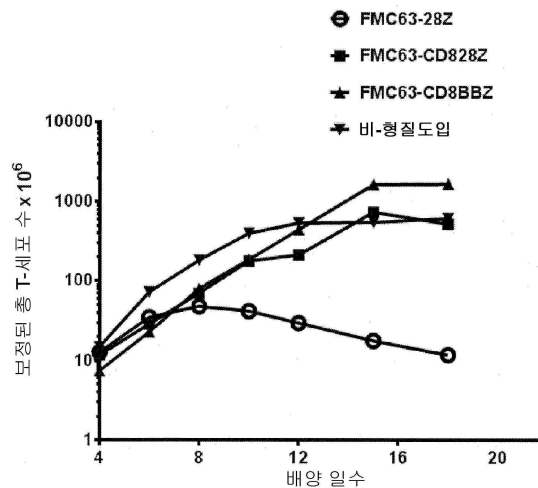
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, CD19에 대해 유도된 키메라 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 CAR을 발현하는 T 세포, 및 악성 B 세포를 파괴하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/02 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 2239/13 (2023.05)
A61K 2239/31 (2023.05)
A61K 2239/48 (2023.05)

명세서

청구범위

청구항 1

CD19 발현 세포에 대한 항원 특이적 반응을 유도하기 위한 의학적 조성물로서, 서열번호 1을 인코딩하는 핵산을 포함하는 T 세포를 포함하는, 의학적 조성물.

청구항 2

서열번호 1의 아미노산 22 내지 502를 포함하는, CD19에 대한 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 3

- (a) 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노산 22 내지 266을 포함하는, 인간 항-CD19 항체의 항원 결합 도메인;
 - (b) 세포외 스페이서;
 - (c) 막관통 도메인;
 - (d) 임의적으로, 인간 CD28 세포내 T 세포 신호전달 도메인; 및
 - (e) 인간 CD3 ζ 세포내 T 세포 신호전달 도메인
- 을 포함하는, CD19에 대한 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 4

- (a) 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노산 22 내지 266을 포함하는, 인간 항-CD19 항체의 항원 결합 도메인;
 - (b) 서열번호 1의 아미노산 267 내지 321을 포함하는 인간 CD8 α 힌지(hinge);
 - (c) 서열번호 1의 아미노산 322 내지 342를 포함하는 인간 CD8 α 막관통 도메인;
 - (d) 서열번호 1의 아미노산 351 내지 390을 포함하는 인간 CD38 세포내 T 세포 신호전달 도메인; 및
 - (e) 서열번호 1의 아미노산 391 내지 502를 포함하는 인간 CD3 ζ 세포내 T 세포 신호전달 도메인
- 을 포함하는, CD19에 대한 키메라 항원 수용체(CAR).

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원의 교차-참조

[0002] 본원은 2014년 6월 2일자 출원된 미국 가출원 제 62/006,313 호(참고로 혼입됨)를 우선권 주장한다.

[0003] 연방정부가 지원한 연구 또는 개발에 관한 언급

[0004] 본 발명은 미국 국립 의료원 국립 암 협회에 의해 프로젝트 번호 Z01BC001415 하에 정부 지원을 받았다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 가진다.

[0005] 전자적으로 제출된 자료의 참고 혼입

[0006] 본원과 동시에 제출되었고 다음과 같이 확인되는 컴퓨터-판독가능한 뉴클레오티드/아미노산 서열 목록이 전체적으로 본원에 참고로 혼입된다: 2015년 6월 1일자로 생성되어 "720755_ST25.TXT"로서 명명된 1개의 58,356 바이트 ASCII(텍스트) 파일.

배경기술

[0007] 림프종 및 백혈병과 같은 B 세포 악성종양은 B 세포 분화 및 활성화의 조절이 방해될 때 일어난다. 성숙한 B

세포의 악성종양으로는 여포성 림프종, 외투세포 림프종, 버킷(Burkitt) 림프종, 다발성 골수종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 호지킨(Hodgkin) 림프종, 림프형질세포성 림프종, 변연부 림프종 및 만성 림프구성 백혈병이 포함된다(문헌[Shaffer et al., *Nature Reviews Immunology*, 2:920-933 (2002)]). 화학치료, 치료성 단일클론 항체(예를 들어, 리툭시맙(Rituximab)(리툭산(RITUXAN™)), 및 동종이계(allogeneic) 줄기 세포 이식(alloHSC T)과 같은 표준 치료들은 B 세포 악성종양을 치유하지 못한다(예를 들어, 문헌[Dreger et al., *Leukemia*, 21(1): 12-17 (2007); Gribben, J.G., *Blood*, 109(11): 4617-4626 (2007); and Armitage, J.O., *Blood*, 110(1): 29-36 (2007)] 참조). 특히, 단일클론 항체는 단일 약제로서는 치료효력이 없고, alloHSC T는 높은 수준의 사망률 및 이환율과 연관된다(예를 들어, 상기 문헌[Dreger et al.], 상기 문헌[Armitage et al.] 및 문헌[McLaughlin et al., *Journal of Clinical Oncology*, 16(8): 2825-2833 (1998)] 참조).

[0008] T 세포는, 항원 인식 잔기와 T 세포 활성화 도메인으로 이루어진 융합 단백질인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전자 변형될 수 있다(예를 들어, 상기 문헌[Kershaw et al.], 문헌[Eshhar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(2): 720-724 (1993); and Sadelain et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 21(2): 215-223 (2009)] 참조). B 세포 계통 악성종양의 경우, CD19를 표적화하는 CAR을 이용하는 입양 T 세포 접근방법이 개발되었다(예를 들어, 문헌[Jensen et al., *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16: 1245-1256 (2010); Kochenderfer et al., *Blood*, 116(20): 4099-4102 (2010); Porter et al., *The New England Journal of Medicine*, 365(8): 725-733 (2011); Savoldo et al., *Journal of Clinical Investigation*, 121(5): 1822-1826 (2011), Cooper et al., *Blood*, 101(4): 1637-1644 (2003); Brentjens et al., *Nature Medicine*, 9(3): 279-286 (2003); Kalos et al., *Science Translational Medicine*, 3(95): 95ra73 (2011); Cheadle et al., *Journal of Immunology*, 184(4): 1885-1896 (2010); Brentjens et al., *Clinical Cancer Research*, 13(18 Pt 1): 5426-5435 (2007); Kochenderfer et al., *Blood*, 116(19): 3875-3886 (2010); Brentjens et al., *Blood*, 118(18): 4817-4828 (2011); and Kochenderfer et al., *Blood*, December 8, 2011 (epublication ahead of print (2012)] 참조). B 세포 항원 CD19는, 그 발현이 정상 및 악성 B 세포로 한정되기 때문에 CAR에 대한 표적으로 선택되었다(예를 들어, 문헌[Nadler et al., *Journal of Immunology*, 131(1): 244-250 (1983)] 참조).

[0009] 현재까지 보고된 항-CD19 CAR 치료와 연관된 한가지 단점은 상기 치료가 상승된 수준의 혈청 사이토카인과 연관된 심각한 독성을 야기할 수 있다는 것이다. 인간 항-마우스 면역 반응의 유발도 또한 무린 서열을 함유하는 현행 항-CD19 CAR과 연관된 잠재적인 위험이다(예를 들어, 상기 문헌[Jensen et al.], 문헌[Lamers et al., *Blood*, 117(1): 72-82 (2011); and Maus et al., *Cancer Immunol Res*, 2: 112-120 (2014)] 참조).

[0010] 따라서, 인간에서 감소된 독성 및 면역원성을 갖는, B 세포 악성종양을 치료하는 방법에 사용될 수 있는 조성물에 대한 필요성이 남아있다. 본 발명은 이러한 조성물 및 방법을 제공한다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은, 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는, CD19에 대해 유도된 단리되거나 정제된 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 CAR을 암호화하는 단리되거나 정제된 핵산 서열, 상기 핵산 서열을 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 단리된 T 세포, 및 상기 단리된 T 세포를 악성 CD19-발현 B 세포의 집단과 생체내 또는 생체의에서 접촉시킴으로써 악성 B 세포를 파괴하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 서열번호 4 또는 서열번호 9에 존재하는 하기의 요소들을 포함하는 단리되거나 정제된 CAR을 제공한다: (i) 세포의 스페이서, (ii) 인간 CD8 α 분자로부터 유래된 막관통 도메인, 및 (iii) 인간 CD28 분자, 인간 CD27 분자 및 인간 CD3 ζ 분자로부터 유래된 세포내 T 세포 신호전달 도메인.

[0014] 본 발명은 서열번호 10 또는 서열번호 11에 존재하는 하기의 요소들을 포함하는 단리되거나 정제된 CAR을 제공한다: (i) 세포의 스페이서, (ii) 인간 CD8 α 분자로부터 유래된 막관통 도메인, 및 (iii) 인간 CD28 분자, 인간 CD27 분자, 및 Fc ϵ RI의 감마쇄로부터 유래된 세포내 T 세포 신호전달 도메인.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 실시예 2에 기술된 바와 같은 명시된 CAR을 발현하는 T 세포의 시험관내 생존율을 보여주는 실험 결과를 나타내는 그래프이다. 배양 제7일에 명시된 CAR을 발현하는 T 세포의 백분율은 다음과 같았다: FMC63-28Z, 71%; FMC63-CD828Z, 88%; 및 FMC63-CD8BBZ, 87%.

도 2A 내지 2D는 T 세포의 표면에 CD27 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 명시된 완전 인간 CAR의 발현을 보여주는 FAC 도표의 이미지들이다. 도표는 살아있는 CD3+ 림프구에 대해 게이팅되었다.

도 3A 및 3B는 비형질도입 대조군(도 3B)과 비교한 T 세포의 표면상에서의 47G4-CD828Z CAR(도 3A)의 발현을 보여주는 FAC 도표의 이미지들이다. 도표는 살아있는 CD3+ 림프구에 대해 게이팅되었다.

도 4A 및 4B는 CD19+ T 세포주 CD19-K562(도 3A) 및 NALM6(도 3B)에서 FMC63-28Z, FMC63-CD828Z 또는 FMC63-CD8BBZ CAR을 발현하는 T 세포에 의한 TNF의 생성을 보여주는 실험 결과를 나타내는 그래프이다. 배양 상등액 중 TNF의 양(pg/mL)을 측정하기 위해 표준 TNF ELISA를 수행하였다. TNF 수준은 각각의 CAR을 발현한 각 배양물 중 T 세포의 분획으로 정규화시켰다. 결과는 2명의 상이한 공여자들로부터의 정규화된 TNF 수준의 평균 및 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 5는 CD19+ T 세포주 CD19-K562 및 NALM6에서 47G4-CD828Z CAR을 발현하는 T 세포에 의한 IFN γ 의 생성을 보여주는 실험 결과를 나타내는 그래프이다. A549, TC71 및 CCRF-CEM은 CD19-음성 세포주이다.

도 6A 내지 6D는, CD107a 상향조절에 의해 측정시, 명시된 CAR로 형질도입된 T 세포가 CD19-특이적 방식으로 탈과립화되었음을 보여주는 FAC 도표이다.

도 7A 내지 7C는, 카복시플루오레세인 다이아세테이트 숙신이미딜 에스터(CFSE) 형광으로 측정시, 명시된 CAR을 발현하는 T 세포가 CD19에 반응하여 증식할 수 있음을 보여주는 FAC 도표이다. 명시된 CAR을 발현하는 T 세포는 IL-2를 함유하지 않은 배지중에서 CD19+ 세포주 CD19-K562(검정색 폐곡선) 또는 CD19-음성 세포주 NGFR-K562(개곡선)와 함께 배양하였다. 모든 도표는 살아있는 CD3+CAR+ 림프구에 대해 게이팅되었다.

도 8은 FMC63-CD828Z CAR을 암호화하는 MSGV-FMC63-CD828Z 플라스미드로 형질도입된 T 세포가 1차 만성 림프구성 백혈병(CLL) 세포에 세포독성임을 보여주는 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 FMC63-28Z CAR 또는 47G4-CD8CD28Z CAR을 발현하는 T 세포가 NSG 면역저하 마우스에서 NALM6 종양의 크기를 감소시킴을 보여주는 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 항원 인식 잔기 및 T 세포 활성화 잔기를 포함하는, 단리되거나 정제된 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. 키메라 항원 수용체(CAR)는 T 세포 신호전달 또는 T 세포 활성화 도메인에 연결된 항체의 항원 결합 도메인(예를 들어, 단일쇄 가변 단편(scFv))을 함유하는 인공적으로 제작된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩티드이다. CAR은, 단일클론 항체의 항원-결합 성질을 이용하여 비-MHC-제한 방식으로, 선택된 표적에 대한 T 세포 특이성 및 반응성을 재유도하는 능력을 갖는다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR을 발현하는 T 세포에게 항원 처리와 무관하게 항원을 인식하는 능력을 제공하여, 종양 도피의 주요 메커니즘을 회피시킨다. 또한, CAR은, T 세포에서 발현될 때, 유리하게는 내재성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 쇄와 이량체화되지 않는다.

[0017] "단리된"은 물질(예를 들어, 단백질 또는 핵산)을 그의 천연 환경으로부터 분리하는 것을 의미한다. "정제된"은, 천연에서 분리된 것(예를 들어, 게놈 DNA 및 mRNA)이든지 또는 실험실 조건하에서 합성(예를 들어, cDNA)되고/되거나 증폭된 것이든지, 해당 물질(예를 들어, 단백질 또는 핵산)의 순도가 증가된 것을 의미하며, 이때 "순도"는 상대적 용어이고, "절대적 순도"가 아니다. 그러나, 핵산 및 단백질은 희석제 또는 보조제를 사용하여 제형화될 수 있고 또한 실용적인 목적으로 단리될 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 단백질은 전형적으로, 세포 내로의 도입을 위해 사용될 때, 허용되는 담체 또는 희석제와 혼합된다.

[0018] 본 발명의 CAR은 CD19(B-림프구 항원 CD19, B4 및 CVID3으로도 알려짐)에 대해 유도된 항원 인식 잔기를 포함한다. CD19는 조혈계의 B 림프구 및 여포성 수지상 세포에 의해서만 발현되는 세포 표면 분자이다. 이것은 발현될 B-계통-제한 항원 중 가장 빠른 것이며, 대부분의 전구-B 세포 및 대부분의 비-T 세포 급성 림프구성 백혈병 세포 및 B 세포형 만성 림프구성 백혈병 세포 상에 존재한다(문헌[Tedder and Isaacs, *J. Immunol.*, 143: 712-717 (1989)]). CD19는 주로 CD21 및 CD81과 함께 B 세포 보조수용체로서의 역할을 한다(문헌[Bradbury et al., *J. Immunol.*, 149(9): 2841-2850 (1992); Horvath et al., *J. Biol. Chem.*, 273 (46): 30537-30543 (1998); and Imai et al., *J. Immunol.*, 155 (3): 1229-1239 (1995)]). 활성화시, CD19의 세포질내 꼬리는 포스포릴화되어, Src-계열 키나제에 의한 결합 및 PI-3 키나제의 동원을 유도한다. CD19는 또한 다른 세포 신호전달 단백질, 예를 들어, B 세포내 주된 Src 키나제인 Lyn 티로신 단백질 키나제(문헌[Fujimoto et al., *Immunity*, 13: 47-57 (2000)]), CD82(상기 문헌[Imai et al.]), 보체 수용체 2(상기 문헌[Bradbury et al.] 및 상기 문헌[Horvath et al.]), 및 VAV2(문헌[Doody et al., *EMBO J.*, 19 (22): 6173-6184 (2000)])와 상호작용

하는 것으로 밝혀졌다.

[0019] 본 발명의 CAR은 CD19에 대해 유도된 단일클론 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 함유하는 항원 인식 잔기를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "단일클론 항체"는 B 세포의 단일 클론에 의해 생성되고 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 말한다. 대조적으로, "다중클론 항체"는 상이한 B 세포들에 의해 생성되고 동일한 항원의 상이한 에피토프들에 결합하는 항체들의 집단을 말한다. 본 발명의 CAR의 항원 인식 잔기는 전체 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 전체 항체는 전형적으로 4개의 폴리펩티드들로 이루어진다: 중쇄(H) 폴리펩티드의 2개의 동일한 복사체 및 경쇄(L) 폴리펩티드의 2개의 동일한 복사체. 각각의 중쇄는 1개의 N-말단 가변(VH) 영역 및 3개의 C-말단 불변(CH1, CH2 및 CH3) 영역을 함유하고, 각각의 경쇄는 1개의 N-말단 가변(VL) 영역 및 1개의 C-말단 불변(CL) 영역을 함유한다. 경쇄 및 중쇄의 각 쌍의 가변 영역들은 항체의 항원 결합 부위를 형성한다. VH 및 VL 영역은 동일한 일반 구조를 갖는데, 이때 각각의 영역은 그 서열들이 상대적으로 보존되는 4개의 골격 영역을 포함한다. 골격 영역은 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된다. CDR1, CDR2 및 CDR3으로 알려져 있는 3개의 CDR은 항원 결합을 담당하는, 항체의 "초가변 영역"을 형성한다.

[0020] 용어 "항체의 단편", "항체 단편", "항체의 기능성 단편" 및 "항원-결합 부분"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 부분들을 의미하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다 (예를 들어, 일반적으로, 문헌[Holliger et al., *Nat. Biotech.*, 23(9): 1126-1129 (2005)] 참조). 본 발명의 CAR의 항원 인식 잔기는 임의의 CD19-결합 항체 단편을 함유할 수 있다. 항체 단편은 바람직하게는, 예를 들어, 하나 이상의 CDR, 가변 영역(또는 그의 부분), 불변 영역(또는 그의 부분), 또는 이들의 조합을 포함한다. 항체 단편의 예로는 다음이 포함되나 이들로 한정되지 않는다: (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어지는 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 다이설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편들을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 이루어지는 Fv 단편; (iv) Fv 단편의 2개의 도메인들(즉, VL 및 VH)이 단일 폴리펩티드 쇄로서 합성될 수 있게 하는 합성 링커에 의해 연결된 상기 2개의 도메인들로 이루어지는 1가 분자인 단일 쇄 Fv(scFv)(예를 들어, 문헌[Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988); and Osbourn et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 778 (1998)] 참조); 및 (v) 동일한 폴리펩티드 쇄 상의 VH와 VL 사이에 쌍을 이루도록 하기에는 너무 짧아서 상이한 VH-VL 폴리펩티드 쇄 상의 상보적 도메인들 사이의 쌍을 유도하여 2개의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 이량체 분자를 생성하는 펩티드 링커에 의해 VL에 연결된 VH를 포함하는 각각의 폴리펩티드 쇄의 이량체인 다이아바다. 항체 단편은 당해 분야에서 공지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허출원 공개 제 2009/0093024 A1 호에 더 상세히 기술되어 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 CAR의 항원 인식 잔기는 항-CD19 단일 쇄 Fv(scFv)를 포함한다.

[0021] 단일클론 항체의 항원-결합 부분 또는 단편은, 상기 부분이 CD19에 결합하는 한, 임의의 크기를 가질 수 있다. 이와 관련하여, CD19에 대해 유도된 단일클론 항체(본원에서 "항-CD19 단일클론 항체"로도 지칭됨)의 항원 결합 부분 또는 단편은 바람직하게는 약 5 내지 18개(예를 들어, 약 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위)의 아미노산을 포함하는 CDR을 하나 이상 포함한다.

[0022] 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 항-CD19 단일클론 항체의 가변 영역을 포함하는 항원 인식 잔기를 포함한다. 항-CD19 단일클론 항체는 마우스, 래트 또는 인간을 포함하지만 이로 한정되지 않는 포유동물로부터 수득되거나 유도될 수 있다. 바람직하게, 항원 인식 잔기는 마우스 또는 인간 항-CD19 단일클론 항체의 가변 영역을 포함한다. 이와 관련하여, 항원 인식 잔기는 마우스 또는 인간 항-CD19 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역, 또는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 둘 다를 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 CAR의 항원 인식 잔기는 마우스 또는 인간 항-CD19 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한다. FMC63 항체(문헌[Nicholson et al., *Molecular Immunology*, 34(16-17): 1157-1165 (1997)]에 기술됨)는 본 발명에 사용될 수 있는 뮤린 항-CD19 단일클론 항체의 한 예이다. FMC63 단일클론 항체의 가변 영역들은 임상 시험에서 시험된 CAR에 사용되어 왔다(예를 들어, 문헌[Kochenderfer et al., *Nature Review Clinical Oncol.*, 10(5): 267-276 (2013); Porter et al., *New Eng. J. Med.*, 365(8): 725-733 (2011); Kalos et al., *Science Translational Medicine*, 3(95): 95ra73 (2011); Kochenderfer et al., *Blood*, 116(20): 4099-4102 (2010); and Kochenderfer et al., *Blood*, 119(12): 2709-2720 (2012)] 참조). 47G4 항체(미국 특허출원 공개 제 2010/0104509 호에 기술됨)는 본 발명에 사용될 수 있는 인간 항-CD19 단일클론 항체의 한 예이다.

[0023] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 신호 서열을 포함한다. 상기 신호 서열은 항원 인식 잔기(예를 들어, 항-CD19 항체의 가변 영역)의 아미노 말단에 위치할 수 있다. 신호 서열은 임의의 적합한 신호 서열을 포함할

수 있다. 한 실시양태에서, 신호 서열은 인간 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 수용체 신호 서열 또는 CD8 α 신호 서열이다. 예를 들어, 뮤린 항-CD19 scFv를 포함하는 본 발명의 CAR은 GM-CSF 신호 서열을 포함할 수 있는 반면, 인간 항-CD19 scFv를 포함하는 본 발명의 CAR은 CD8 α 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0024] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 세포의 스페이스 서열을 포함한다. 세포의 스페이스 서열은 항체 유연성을 증진시키는 아미노산의 짧은 서열이며(예를 들어, 문헌[Woof et al., Nat. Rev. Immunol., 4(2): 89-99 (2004)] 참조), 항원 인식 잔기(예를 들어, 항-CD19 scFv)와 T 세포 활성화 잔기 사이에 위치할 수 있다. 세포의 스페이스 서열은 임의의 막관통 단백질의 세포의 영역 전체 또는 일부분을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 세포의 스페이스 서열은 인간 CD8 α 분자 또는 CD28 분자로부터 유래된다.

[0025] 본 발명의 CAR은 또한 막관통 도메인을 포함한다. 막관통 도메인은 당해 분야에서 공지된 임의의 분자로부터 유래되거나 수득된 임의의 막관통 도메인일 수 있다. 예를 들어, 막관통 도메인은 CD8 α 분자 또는 CD28 분자로부터 수득되거나 유래될 수 있다. CD8은 T 세포 수용체(TCR)에 대한 보조수용체로서 작용하는 막관통 당단백질이며 주로 세포독성 T 세포의 표면 상에서 발현된다. CD8의 가장 보편적인 형태는 CD8 α 및 CD8 β 쇄로 이루어진 이량체로서 존재한다. CD28은 T 세포 상에서 발현되고 T 세포 활성화에 필요한 보조자극 신호를 제공한다. CD28은 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2)에 대한 수용체이다. 바람직한 실시양태에서, CD8 α 및 CD28은 인간으로부터 유래된다.

[0026] 본 발명의 CAR은 T 세포 활성화 잔기를 포함한다. T 세포 활성화 잔기는 하나 이상의 세포내(즉, 세포질) T 세포 신호전달 도메인("보조자극 도메인"으로도 지칭됨)을 포함한다. CAR에 사용되는 가장 통상적인 세포내 T 세포 신호전달 도메인은, TCR과 결합하여 신호를 발생하고 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유하는 CD3 제타(CD3 ζ)이다. 바람직하게, T 세포 활성화 잔기는 다수(즉, 2개 이상)의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 T 세포 신호전달 도메인은 CD28 분자, CD3 제타(ζ) 분자 또는 그의 변형된 버전, 인간 고-친화성 IgE 수용체(FcεRI)의 감마쇄, CD27 분자, OX40 분자, 4-1BB 분자, 또는 당해 분야에서 공지된 다른 세포내 신호전달 분자로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, CD28은 T 세포 보조자극에 있어서 중요한 T 세포 마커이다. CD137로도 알려진 4-1BB는 강력한 보조자극 신호를 T 세포에 전달하여, 분화를 촉진하고 T 림프구의 장기간 생존을 향상시킨다. CD27은 TNF 수용체 상과의 구성원이며, T 세포 면역의 발생 및 장기간 유지에 필요하다. 인간 고-친화성 IgE 수용체(FcεRI)는 1개의 알파, 1개의 베타, 및 2개의 다이설파이드 가교 연결된 감마 쇄로 이루어진 사량체 수용체 복합체이다. FcεRI는 비만 세포 및 호염기구 상에서 구성적으로 발현되며, 호산구에서 유도가능하다. 바람직한 실시양태에서, 세포내 T 세포 신호전달 도메인은 인간으로부터 유래된다.

[0027] 본 발명의 CAR은 전술한 막관통 도메인들중 어느 하나 및 전술한 세포내 T 세포 신호전달 도메인들중 임의의 하나 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개 또는 4개)을 임의의 조합으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 CAR은 CD28 막관통 도메인, 및 CD28 및 CD3 ζ의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 또는, 예를 들어, 본 발명의 CAR은 CD8 α 막관통 도메인, 및 CD28, CD3 ζ, FcεRI의 감마쇄 및/또는 4-1BB의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 CD8 α 막관통 도메인, 및 CD28, CD3 ζ 및 CD27의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 CD28 막관통 도메인, 및 CD27, 4-1BB 및 FcεRI의 감마쇄의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한 본 발명의 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 단리되거나 정제된 핵산 서열도 제공한다. "핵산 서열"은 DNA 또는 RNA의 중합체, 즉 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있고 비-천연 또는 변이된 뉴클레오티드를 함유할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포괄하는 것이다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드(RNA) 또는 데옥시리보뉴클레오티드(DNA)인 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 말한다. 이들 용어들은 상기 분자의 일차 구조를 말하므로, 이중- 및 단일-가닥 DNA, 및 이중- 및 단일-가닥 RNA를 포함한다. 상기 용어들은, 등가물로서, 뉴클레오티드 유사체로부터 만들어진 RNA 또는 DNA의 유사체, 및 변형된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 메틸화되고/되거나 캡핑된 폴리뉴클레오티드(이들로 한정되지는 않음)를 포함한다.

[0029] 본 발명의 CAR은, 상기 CAR이 그의 생물학적 활성, 예를 들어, 항원에 특이적으로 결합하거나, 포유동물에서 질환에 걸린 세포를 검출하거나, 포유동물에서 질환을 치료하거나 예방하는 등의 능력을 보유하는 한, 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR은 50개 이상(예를 들어, 60개 이상, 100개 이상 또는 500개 이상)의 아미노산 내지 1,000개 미만(예를 들어, 900개 미만, 800개 미만, 700개 미만 또는 600개 미만)의 아미노산을 포함할 수 있다. 바람직하게, CAR은 약 50 내지 약 700개의 아미노산(예를 들어, 약 70개, 약 80개, 약

90개, 약 150개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 550개 또는 약 650개의 아미노산), 약 100 내지 약 500개의 아미노산(예를 들어, 약 125개, 약 175개, 약 225개, 약 250개, 약 275개, 약 325개, 약 350개, 약 375개, 약 425개, 약 450개 또는 약 475개의 아미노산), 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위이다.

[0030] 본원에 기술된 본 발명의 CAR의 기능성 부분도 본 발명의 범위에 포함된다. CAR과 관련하여 사용될 때 용어 "기능성 부분"은 본 발명의 CAR의 임의의 부분 또는 단편을 말하며, 이때 상기 부분 또는 단편은 그의 기원이 되는 CAR(모 CAR)의 생물학적 활성을 보유한다. 기능성 부분은, 예를 들어, 모 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하거나, 질환을 검출하거나, 치료하거나 예방하는 능력을 보유하는 CAR의 부분들을 포함한다. 모 CAR을 암호화하는 핵산 서열과 관련하여, CAR의 기능성 부분을 암호화하는 핵산 서열은, 예를 들어, 모 CAR의 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% 이상을 포함하는 단백질을 암호화할 수 있다.

[0031] CAR의 기능성 부분은 상기 부분의 아미노 또는 카복시 말단, 또는 양쪽 말단에 추가의 아미노산을 함유할 수 있으며, 이때 상기 추가의 아미노산은 모 CAR의 아미노산 서열에서는 발견되지 않는다. 바람직하게, 상기 추가의 아미노산은 상기 기능성 부분의 생물학적 기능을 방해하지 않고, 예를 들어, 표적 세포를 인식하거나, 암을 검출하거나, 암을 치료하거나 예방한다. 보다 바람직하게는, 상기 추가의 아미노산은 모 CAR의 생물학적 활성에 비해 CAR의 생물학적 활성을 증대시킨다.

[0032] 본 발명은 또한 본 발명 CAR의 기능성 변이체도 제공한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "기능성 변이체"는 본 발명의 CAR에 대해 실질적이거나 상당한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 CAR, 폴리펩티드 또는 단백질을 말하며, 이때 상기 기능성 변이체는 그의 모체인 CAR의 생물학적 활성을 보유한다. 기능성 변이체는, 예를 들어, 모 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는, 본원에 기술된 CAR(모 CAR)의 변이체를 포함한다. 모 CAR을 암호화하는 핵산 서열과 관련하여, CAR의 기능성 변이체를 암호화하는 핵산 서열은, 예를 들어, 모 CAR을 암호화하는 핵산 서열과 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 65%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 약 99% 동일할 수 있다.

[0033] 기능성 변이체는, 예를 들어, 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 갖는 본 발명의 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 어구 "보존적 아미노산 치환" 또는 "보존적 돌연변이"는 공통된 성질을 갖는 또 다른 아미노산에 의한 한 아미노산의 치환을 말한다. 개개 아미노산들 사이의 공통된 성질을 정의하는 기능적 방법은 상동성 유기체들의 상응하는 단백질들 사이의 아미노산 변화의 정규화된 빈도를 분석하는 것이다(문헌[Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York (1979)]). 이러한 분석에 따르면, 아미노산의 균은 균 내의 아미노산들이 서로 우선적으로 교환되어 전체 단백질 구조에 대한 그들의 영향 면에서 서로 가장 유사한 경우 정의될 수 있다(상기 문헌[Schulz, G. E. and Schirmer, R. H.]). 보존적 돌연변이의 예로는 동일한 아미노산 부분군 내의 아미노산들의 아미노산 치환, 예를 들어, 양성 전하가 유지될 수 있도록 라이신에 의한 아르기닌의 치환 및 아르기닌에 의한 라이신의 치환; 음성 전하가 유지될 수 있도록 글루탐산에 의한 아스파르트산의 치환 및 아스파르트산에 의한 글루탐산의 치환; 유리 -OH가 유지될 수 있도록 세린에 의한 트레오닌의 치환; 및 유리 -NH₂가 유지될 수 있도록 글루타민에 의한 아스파라긴의 치환이 포함된다.

[0034] 대안적으로 또는 추가로, 기능성 변이체는 하나 이상의 비-보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. "비-보존적 돌연변이"는 상이한 군들 사이의 아미노산 치환, 예를 들어, 라이신에 의한 트립토판의 치환, 또는 페닐알라닌에 의한 세린의 치환 등을 포함한다. 이 경우, 비-보존적 아미노산 치환이 기능성 변이체의 생물학적 활성을 방해하지 않거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 비-보존적 아미노산 치환은 기능성 변이체의 생물학적 활성이 모 CAR에 비해 증가되도록 기능성 변이체의 생물학적 활성을 증대시킬 수 있다.

[0035] 본 발명의 CAR(그의 기능성 부분 및 기능성 변이체 포함)은 하나 이상의 천연 아미노산 대신에 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 합성 아미노산은 당해 분야에서 공지되어 있으며, 예를 들어, 아미노사이클로헥산 카복실산, 노르류신, α-아미노 n-데카노산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-하이드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카복시페닐알라닌, β-페닐세린 β-하이드록시페닐알라닌, 페닐글리신, α-나프틸알라닌, 사이클로헥실알라닌, 사이클로헥실글리신, 인돌린-2-카복실산, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N'-벤질-N'-메틸-라이신, N',N'-다이벤질-라이신, 6-하이드록시라이신, 오르니틴, α-아미노사이클로헥탄 카복실산, α-아미노사이클로헥산 카복실산, α-아미노사이클로헥탄 카복실산, α-(2-아미노-2-노르보난)-카복실산, α, γ-다이아미노부티르산, α, β-다이아미노프로피온산, 호모페닐알라닌 및 α-3급-부틸글리신을 포함한다.

- [0036] 본 발명의 CAR(그의 기능성 부분 및 기능성 변이체 포함)은 글리코실화되거나, 아미드화되거나, 카복실화되거나, 포스포틸화되거나, 에스터화되거나, N-아실화되거나, 예를 들어, 다이설파이드 가교를 통해 환화되거나, 산부가염으로 전환되고/되거나 선택적으로 이량체화되거나 중합되거나, 접합될 수 있다.
- [0037] 본 발명은 또한, 전술한 세포의 스페이서 중 어느 하나, 막관통 도메인, 및 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 임의의 조합으로 포함하는 임의의 해당 표적 분자로 향하는(즉, 임의의 항원 인식 잔기를 포함하는) CAR을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 CAR은 (i) 세포의 스페이서, (ii) 인간 CD8 α 분자로부터 유래된 막관통 도메인, 및 (iii) 인간 CD3 제타(CD3 ζ) 분자 및 인간 CD28 분자로부터 유래된 세포내 T 세포 신호전달 도메인(서열번호 1의 CAR에 사용된 바와 같음)을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 (i) 세포의 스페이서, (ii) 인간 CD8 α 분자로부터 유래된 막관통 도메인, 및 (iii) 인간 CD28 분자, 인간 CD27 분자 및 인간 CD3 ζ 분자로부터 유래된 세포내 T 세포 신호전달 도메인(서열번호 4의 CAR에 사용된 바와 같음)을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 (i) 세포의 스페이서, (ii) 인간 CD8 α 분자로부터 유래된 막관통 도메인, 및 (iii) 인간 CD28 분자, 인간 CD27 분자 및 Fc ϵ RI의 감마쇄로부터 유래된 세포내 T 세포 신호전달 도메인(서열번호 10의 CAR에 사용된 바와 같음)을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 (i) 세포의 스페이서, (ii) 인간 CD8 α 분자로부터 유래된 막관통 도메인, 및 (iii) 인간 CD28 분자 및 Fc ϵ RI의 감마쇄로부터 유래된 세포내 T 세포 신호전달 도메인(서열번호 12의 CAR에 사용된 바와 같음)을 포함할 수 있다.
- [0038] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.
- [0039] 본 발명의 CAR은 당해 분야에서 공지된 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 핵산 서열, 폴리펩티드 및 단백질은 표준 재조합 DNA 방법을 이용하여 재조합적으로 제조될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994] 참조). 또한, CAR을 암호화하는 합성적으로 제조된 핵산 서열은 공급원, 예를 들어, 식물, 세균, 곤충 또는 포유동물, 예를 들어, 래트, 인간 등으로부터 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 단리 및 정제 방법은 당해 분야에서 공지되어 있다. 또는, 본원에 기술된 핵산 서열은 상업적으로 합성될 수 있다. 이와 관련하여, 핵산 서열은 합성, 재조합, 단리 및/또는 정제된 핵산 서열일 수 있다.
- [0040] 본 발명은 또한 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 상기 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스) 또는 파지일 수 있다. 적합한 벡터 및 벡터 제조 방법은 당해 분야에서 공지되어 있다(예를 들어, 상기 문헌 (Sambrook et al.) 및 상기 문헌(Ausubel et al.) 참조).
- [0041] 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 서열 이외에, 벡터는 바람직하게는 숙주 세포에서 상기 핵산 서열의 발현을 제공하는 발현 조절 서열, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결인자, 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 등을 포함한다. 예시적인 발현 조절 서열은 당해 분야에서 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 기술되어 있다.
- [0042] 다양한 상이한 공급원들로부터의 항시성, 유도성 및 억제성 프로모터를 비롯한 다수의 프로모터들이 당해 분야에서 공지되어 있다. 프로모터의 대표적인 공급원으로는, 예를 들어, 바이러스, 포유동물, 곤충, 식물, 효모 및 세균이 포함되고, 이들 공급원들로부터의 적합한 프로모터들이 용이하게 이용가능하거나, 예를 들어, 수탁기관, 예를 들어, ATCC뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개별적 공급원으로부터 공개적으로 이용가능한 서열을 기반으로 합성적으로 제조될 수 있다. 프로모터는 일방향(즉, 한 방향으로 전사를 개시함) 또는 이방향(즉, 3' 또는 5' 방향으로 전사를 개시함) 프로모터일 수 있다. 프로모터의 비-제한적 예로는, 예를 들어, T7 세균 발현 시스템, pBAD(araA) 세균 발현 시스템, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터 및 RSV 프로모터가 포함된다. 유도성 프로모터로는, 예를 들어, Tet 시스템(미국 특허 제 5,464,758 호 및 제 5,814,618 호), 엑다이손(Ecdysone) 유도성 시스템(문헌[No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 3346-3351 (1996)]), T-REXTM 시스템(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), LACSWITCHTM 시스템(스트라타진(Stratagene), 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재) 및 Cre-ERT 타목시펜 유도성 재조합효소 시스템(문헌[Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, 27: 4324-4327 (1999); *Nuc. Acid. Res.*, 28: e99 (2000)]; 미국 특허 제

7,112,715 호; 및 문헌[Kramer & Fussenegger, *Methods Mol. Biol.*, 308: 123-144 (2005)]이 포함된다.

- [0043] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "인헨서"는, 예를 들어, DNA 서열이 작동가능하게 연결되는 핵산 서열의 전사를 증가시키는 DNA 서열을 말한다. 인헨서는 핵산 서열의 암호화 영역으로부터 수 킬로염기만큼 떨어져 위치할 수 있고, 조절 인자의 결합, DNA 메틸화의 패턴 또는 DNA 구조의 변화를 매개할 수 있다. 다양한 상이한 공급원들로부터의 다수의 인헨서들이 당해 분야에서 공지되어 있고, (예를 들어, ATCC와 같은 수탁기관뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개별적 공급원으로부터의) 클로닝된 폴리뉴클레오티드로서 또는 그 안에서 이용가능하다. 프로모터(예를 들어, 통상적으로 사용되는 CMV 프로모터)를 포함하는 다수의 폴리뉴클레오티드도 또한 인헨서 서열을 포함한다. 인헨서는 암호화 서열의 상류, 내부 또는 하류에 위치할 수 있다. 용어 "Ig 인헨서"는 면역글로불린(Ig) 유전자좌 내에 맵핑된 인헨서 영역으로부터 유래된 인헨서 요소를 말한다(상기 인헨서는, 예를 들어, 중쇄 (뮤) 5' 인헨서, 경쇄 (카파) 5' 인헨서, 카파 및 뮤 인트론성 인헨서, 및 3' 인헨서를 포함한다) (일반적으로 문헌[Paul W.E. (ed), *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993), pages 353-363] 및 미국 특허 제 5,885,827 호 참조).
- [0044] 벡터는 또한 "선택성 마커 유전자"를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "선택성 마커 유전자"는 상응하는 선택적 약제의 존재하에서 상기 핵산 서열을 발현하는 세포가 그에 대해 특이적으로 선택되게 하는 핵산 서열을 말한다. 적합한 선택성 마커 유전자는 당해 분야에서 공지되어 있고, 예를 들어, 국제 특허출원 공개 제 WO 1992/08796 호 및 제 WO 1994/28143 호; 문헌[Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3567 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1527 (1981); Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2072 (1981); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1981); Santerre et al., *Gene*, 30: 147 (1984); Kent et al., *Science*, 237: 901-903 (1987); Wigler et al., *Cell*, 11: 223 (1977); Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48: 2026 (1962); Lowy et al., *Cell*, 22: 817 (1980)]; 및 미국 특허 제 5,122,464 호 및 제 5,770,359 호에 기술되어 있다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 벡터는, 숙주 세포에서 복제될 수 있고 적절한 선택 압력의 존재하에서 숙주 세포내에 DNA의 염색체의 분절로서 존속하는 "에피솜 발현 벡터" 또는 "에피솜"이다(예를 들어, 문헌[Conese et al., *Gene Therapy*, 11: 1735-1742 (2004)] 참조). 대표적인 상업적으로 시판되는 에피솜 발현 벡터로는 엡스테인 바르(Epstein Barr) 핵 항원 1(EBNA1) 및 엡스테인 바 바이러스(EBV) 복제기점(oriP)을 이용하는 에피솜 플라스미드가 포함되나 이로 한정되지는 않는다. 인비트로젠(미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)의 벡터 pREP4, pCEP4, pREP7 및 pcDNA3.1, 및 스트라타진(미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)의 pBK-CMV는 EBNA1 및 oriP 대신에 T-항원 및 SV40 복제기점을 이용하는 에피솜 벡터의 비-제한적 예를 나타낸다.
- [0046] 다른 적합한 벡터로는 숙주 세포의 DNA 내로 무작위적으로 통합될 수 있거나 발현 벡터와 숙주 세포의 염색체 사이의 특이적 재조합을 가능하게 하는 재조합 부위를 포함할 수 있는 통합 발현 벡터가 포함된다. 상기 통합 발현 벡터는 목적 단백질의 발현을 수행하기 위해 숙주 세포의 염색체의 내재성 발현 조절 서열을 이용할 수 있다. 부위 특이적 방식으로 통합되는 벡터의 예로는, 예를 들어, 인비트로젠(미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)의 flp-in 시스템(예를 들어, pcDNATM5/FRT), 또는 스트라타진(미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)의 pExchange-6 코어 벡터에서 발견될 수 있는 바와 같은 cre-lox 시스템의 구성성분들이 포함된다. 숙주 세포의 염색체 내로 무작위적으로 통합되는 벡터의 예로는, 예를 들어, 인비트로젠(미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)의 pcDNA3.1(T-항원의 부재하에서 도입될 때), 및 프로메가(Promega)(미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 pCI 또는 pFN10A(ACT) FLEXITM이 포함된다.
- [0047] 바이러스 벡터도 사용될 수 있다. 대표적인 바이러스 발현 벡터로는 아데노바이러스-기반 벡터(예를 들어, 크루셀 인코포레이티드(Crucell, Inc.)(네덜란드 레이덴 소재)에서 시판하는 아데노바이러스-기반 Per.C6 시스템), 렌티바이러스-기반 벡터(예를 들어, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)(미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)에서 시판하는 렌티바이러스-기반 pLP1), 및 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 스트라타진(미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)에서 시판하는 pFB-ERV 플러스 pCFB-EGSH)가 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0048] 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터는, 임의의 적합한 원핵 또는 진핵 세포를 포함하여, CAR을 발현할 수 있는 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 바람직한 숙주 세포는, 용이하게 및 확실하게 성장될 수 있고, 적절하게 빠른 성장 속도를 가지고, 잘 특성화된 발현 시스템을 가지며, 용이하게 및 효율적으로 형질전환되거나 형질감염될 수 있는 숙주 세포이다.
- [0049] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 발현 벡터를 함유할 수 있는 임의 유형의 세포를 말한다. 숙

주 세포는 진핵 세포, 예를 들어, 식물, 동물, 진균 또는 조류(algae)일 수 있거나, 원핵 세포, 예를 들어, 세균 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 세포 또는 1차 세포일 수 있다. 즉, 유기체, 예를 들어, 인간으로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 숙주 세포는 부착 세포 또는 현탁된 세포, 즉 현탁 상태로 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당해 분야에서 공지되어 있고, 예를 들어, DH5 α 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포, 차이니즈 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HEK293 세포 등을 포함한다. 재조합 발현 벡터를 증폭시키거나 복제하기 위해, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어, DH5 α 세포일 수 있다. 재조합 CAR을 생성하기 위해, 숙주 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 숙주 세포는 바람직하게는 인간 세포이다. 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있고, 임의 유형의 조직으로부터 유래될 수 있고, 임의의 발생 단계의 세포일 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 말초혈 림프구(PBL), 말초혈 단핵 세포(PBMC) 또는 천연 살해세포(NK), 또는 T 세포일 수 있다. 바람직하게, 숙주 세포는 T 세포가다. 적합한 포유동물 숙주 세포를 선별하는 방법, 및 세포의 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝 및 정제 방법은 당해 분야에서 공지되어 있다.

[0050] 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 발현하는 단리된 T 세포를 제공한다. 본 발명의 T 세포는 임의의 T 세포, 예를 들어, 배양된 T 세포, 예를 들어, 1차 T 세포, 또는 배양된 T 세포로부터의 T 세포, 또는 포유동물로부터 획득된 T 세포일 수 있다. 포유동물로부터 획득되는 경우, T 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 다른 조직 또는 체액을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 공급원으로부터 획득될 수 있다. T 세포는 또한 농축되거나 정제될 수도 있다. T 세포는 바람직하게는 인간 T 세포가다(예를 들어, 인간으로부터 단리된다). T 세포는 CD4⁺/CD8⁺ 이중 양성 T 세포, CD4⁺ 헬퍼 T 세포, 예를 들어, Th₁ 및 Th₂ 세포, CD8⁺ T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포), 중앙 침윤 세포, 기억 T 세포, 미접촉(naive) T 세포 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 임의의 발생 단계의 T 세포일 수 있다. 한 실시양태에서, T 세포는 CD8⁺ T 세포 또는 CD4⁺ T 세포가다. T 세포주는, 예를 들어, 미국 균주 보존기관(American Type Culture Collection(ATCC), 미국 버지니아주 매너서스 소재) 및 독일 미생물 균주 보존기관(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ)으로부터 이용가능하고, 예를 들어, Jurkat 세포(ATCC TIB-152), Sup-T1 세포(ATCC CRL-1942), RPMI 8402 세포(DSMZ ACC-290), Karpas 45 세포(DSMZ ACC-545) 및 이들의 유도체를 포함한다.

[0051] 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 서열은 "형질감염", "형질전환" 또는 "형질도입"에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "형질감염", "형질전환" 또는 "형질도입"은 물리적 또는 화학적 방법을 이용하여 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 것을 말한다. 많은 형질감염 기술들이 당해 분야에서 공지되어 있고, 예를 들어, 인산칼슘 DNA 공-침전(예를 들어, 문헌[Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press (1991)] 참조); DEAE-덱스트란; 전기천공; 양이온성 리포솜-매개 형질감염; 텅스텐 입자-촉진된 미세입자 충격(문헌 [Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)]); 및 스트론튬 포스페이트 DNA 공-침전(문헌[Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)]을 포함한다. 파지 또는 바이러스 벡터는 적합한 패키징 세포(이의 대다수는 상업적으로 시판중임)에서의 감염성 입자의 성장 후에 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.

[0052] 특정 이론 또는 메카니즘에 결부되지 않고, 본 발명의 CAR은 CD19에 대한 항원 특이적 반응을 유도함으로써 다 음중 하나 이상을 제공하는 것으로 생각된다: CD19-발현 암세포의 표적화 및 파괴, 암세포의 감소 또는 제거, 중앙 부위(들)로의 면역 세포의 침윤 촉진, 및 항암 반응의 증대/확장. 따라서, 본 발명은, 전술한 단리된 T 세포들 중 하나 이상을, CD19를 발현하는 악성 B 세포의 집단과 접촉시키는 것을 포함하는, 악성 B 세포를 파괴하는 방법을 제공하며, 이때 CAR이 생성되어 악성 B 세포 상의 CD19에 결합하고 악성 B 세포가 파괴된다. 상기 논의된 바와 같이, B 세포 악성종양의 치료는 전형적으로 화학치료, 치료성 단일클론 항체 및 동종이계 줄기세포 이식을 포함하나; 상기 치료를 받았던 환자들에서 높은 비율의 재발이 통상적이다. 상기 논의된 바와 같이, CD19는 악성 B 세포에 의해 고도로 발현되며(예를 들어, 상기 문헌[Nadler et al.] 참조), 본 발명의 방법은 당해 분야에서 공지된 임의의 B 세포 악성종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 성숙 B 세포의 악성종양으로는 여포성 림프종, 외투세포 림프종, 버킷 림프종, 다발성 골수종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 호지킨 림프종, 림프형질세포성 림프종, 변연부 림프종 및 만성 림프구성 백혈병이 포함되나, 이로 한정되지 않는다(상기 문헌 [Sjhaffer et al.]).

[0053] 본원에 기술된 본 발명의 항-CD19 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 발현하는 하나 이상의 단리된 T 세포는 생체외, 생체내 또는 시험관내에서 CD19를 발현하는 악성 B 세포의 집단과 접촉될 수 있다. "생체외"는 천연

조건의 최소한의 변화하에 유기체 외부의 인공적 환경에서 세포 또는 조직 내에서 또는 세포 또는 조직 상에서 수행되는 방법을 말한다. 대조적으로, 용어 "생체내"는 정상적인 온전한 상태의 살아있는 유기체 내에서 수행되는 방법을 말하는 반면, "시험관내" 방법은 그의 통상적인 생물학적 환경으로부터 단리된 유기체의 성분들을 사용하여 수행된다. 본 발명의 방법은 바람직하게는 생체의 및 생체내 성분을 수반한다. 이와 관련하여, 예를 들어, 전술한 단리된 T 세포는 본 발명의 항-CD19 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 발현하는 조건하에서 생체외에서 배양된 후, B 세포 악성종양에 걸린 포유동물(바람직하게는 인간)에게 직접 전달될 수 있다. 이러한 세포 전달 방법은, 공여자 면역-유도 세포의 기능성을 새로운 숙주에게 전달하기 위해 면역-유도 세포를 새로운 수용자 숙주에게 수동적으로 전달하는 "입양 세포 전달(ACT)"로서 당해 분야에서 지칭된다. 혈액암, 예를 들어, B 세포 악성종양을 포함한 다양한 유형의 암들을 치료하기 위한 입양 세포 전달 방법은 당해 분야에서 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Gattinoni et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 6(5): 383-393 (2006); June, CH, *J. Clin. Invest.*, 117(6): 1466-76 (2007); Rapoport et al., *Blood*, 117(3): 788-797 (2011); and Barber et al., *Gene Therapy*, 18: 509-516 (2011)]에 개시되어 있다.

[0054] T 세포가 포유동물에게 투여될 때, 상기 세포는 상기 포유동물에 대해 동종이계 또는 자가유래 세포일 수 있다. "자가유래" 투여 방법에서, 세포(예를 들어, 조절 줄기 세포 또는 림프구)는 포유동물로부터 분리되고 저장되고 (및 선택적으로 변형되고) 동일한 포유동물에게 다시 복귀된다. "동종이계" 투여 방법에서는, 포유동물은 유전적으로 유사하지만 동일하지는 않은 공여자로부터 세포(예를 들어, 조절 줄기 세포 또는 림프구)를 제공받는다. 바람직하게는, 세포는 포유동물에 대해 자가유래 세포이다.

[0055] T 세포는 바람직하게는 조성물, 예를 들어, 약학 조성물의 형태로 인간에게 투여된다. 또는, 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 서열 또는 CAR-암호화 핵산 서열을 포함하는 벡터는 조성물, 예를 들어, 약학 조성물로 제형화되어 인간에게 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 CAR을 발현하는 T 세포의 집단을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 서열 또는 본 발명의 CAR을 발현하는 숙주 세포 이외에, 약학 조성물은 다른 약학적 활성 약제 또는 약물, 예를 들어, 화학치료제, 예를 들어, 아스파라기나제, 부설판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 하이드록시우레아, 메토타렉세이트, 파클리탁셀, 리투시맙, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 약학 조성물은 본 발명의 CAR을 발현하는 단리된 T 세포, 보다 바람직하게는 본 발명의 CAR을 발현하는 T 세포의 집단을 포함한다.

[0056] 본 발명의 T 세포는 염, 예를 들어, 약학적으로 허용되는 염의 형태로 제공될 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 산부가염은 염산, 브롬화수소산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산과 같은 무기산, 및 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아틸설포산, 예를 들어, *p*-톨루엔설포산과 같은 유기산으로부터 유도된 산부가염을 포함한다.

[0057] 담체의 선택은 부분적으로, 특정한 본 발명의 CAR, CAR-암호화 핵산 서열, 벡터, 또는 CAR을 발현하는 숙주 세포뿐만 아니라, 본 발명의 CAR, CAR-암호화 핵산 서열, 벡터, 또는 CAR을 발현하는 숙주 세포를 투여하기 위해 사용되는 특정 방법에 의해 결정될 것이다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물의 다양한 적합한 제형들이 존재한다. 예를 들어, 약학 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제로는, 예를 들어, 메틸파라벤, 프로필 파라벤, 나트륨 벤조에이트 및 벤즈알코늄 클로라이드가 포함될 수 있다. 선택적으로 2개 이상의 보존제들의 혼합물이 사용될 수 있다. 보존제 또는 그의 혼합물은 전형적으로 총 조성물의 약 0.0001 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다.

[0058] 또한, 완충제가 조성물에 사용될 수 있다. 적합한 완충제로는, 예를 들어, 시트르산, 나트륨 시트레이트, 인산, 인산칼슘, 및 다양한 다른 산 및 염이 포함된다. 선택적으로 2개 이상의 완충제들의 혼합물이 사용될 수 있다. 완충제 또는 그의 혼합물은 전형적으로 총 조성물의 약 0.001 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다.

[0059] 투여가능한(예를 들어, 비경구 투여가능한) 조성물의 제조 방법은 당해 분야에 숙련된 자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 더 상세히 기술되어 있다.

[0060] 본 발명의 CAR, CAR-암호화 핵산 서열, 벡터, 또는 CAR을 발현하는 숙주 세포를 포함하는 조성물은 봉입 복합체, 예를 들어, 사이클로덱스트린 봉입 복합체로서 또는 리포솜으로서 제형화될 수 있다. 리포솜은 숙주 세포(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포) 또는 본 발명의 핵산 서열을 특정 조직으로 표적화하는 역할을 할 수 있다. 리포솜은 또한 본 발명의 핵산 서열의 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9: 467 (1980)] 및 미국 특허 제 4,235,871 호, 제 4,501,728 호, 제

4,837,028 호 및 제 5,019,369 호에 기술된 바와 같은 많은 방법들이 리포솜을 제조하기 위해 이용될 수 있다.

[0061] 본 발명의 조성물의 전달이 치료될 부위의 감각 전에 이러한 감각을 야기하기에 충분한 시간동안 일어나도록 상기 조성물은 시간-방출, 지연 방출 및 지속 방출 전달 시스템을 이용할 수 있다. 많은 유형의 방출 전달 시스템이 이용가능하며 당해 분야의 통상의 기술을 가진 자들에게 공지되어 있다. 상기 시스템들은 조성물의 반복된 투여를 피함으로써 대상 및 의사의 편의를 증가시킬 수 있고, 본 발명의 특정 조성물 실시양태에 특히 적합할 수 있다.

[0062] 조성물은 바람직하게는 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 상기 핵산 서열을 포함하는 벡터를 B 세포 악성종양을 치료 또는 예방하기에 효과적인 양으로 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료", "치료하는" 등은 목적하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 말한다. 바람직하게, 상기 효과는 치료적이다. 즉, 상기 효과는 질환 및/또는 상기 질환에 기인하는 이상 증상을 부분적으로 또는 완전히 치유한다. 이를 위해, 본 발명의 방법은 본 발명의 CAR을 발현하는 숙주 세포, 또는 CAR-암호화 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 "치료 효과량"으로 투여하는 것을 포함한다. "치료 효과량"은 필요한 투여량에서 필요한 시간동안 목적하는 치료 결과를 달성하기에 효과적인 양을 말한다. 치료 효과량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 이끌어내는 CAR의 능력과 같은 요인들에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 CAR의 치료 효과량은 다발성 골수종 세포상의 CD19에 결합하여 이를 파괴하는 양이다.

[0063] 또는, 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 예방적일 수 있다, 즉, 상기 효과는 질환 또는 그의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 본 발명의 CAR을 발현하는 숙주 세포 또는 CAR-암호화 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 "예방 효과량"으로 B 세포 악성종양에 취약한 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. "예방 효과량"은 필요한 투여량에서 필요한 시간동안 목적하는 예방 결과(예를 들어, 질환 발병의 예방)를 달성하기에 효과적인 양을 말한다.

[0064] 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여되는 숙주 세포의 전형적인 양은, 예를 들어, 100만 내지 1000억개 세포의 범위일 수 있으나; 상기 예시적 범위보다 낮거나 높은 양도 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어, 본 발명의 숙주 세포의 1일 용량은 약 100만 내지 약 500억개 세포(예를 들어, 약 500만개 세포, 약 2500만개 세포, 약 5억개 세포, 약 10억개 세포, 약 50억개 세포, 약 200억개 세포, 약 300억개 세포, 약 400억개 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위), 바람직하게는 약 1000만 내지 약 1000억개 세포(예를 들어, 약 2000만개 세포, 약 3000만개 세포, 약 4000만개 세포, 약 6000만개 세포, 약 7000만개 세포, 약 8000만개 세포, 약 9000만개 세포, 약 100억개 세포, 약 250억개 세포, 약 500억개 세포, 약 750억개 세포, 약 900억개 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위), 보다 바람직하게는 약 1억 내지 약 500억개 세포(예를 들어, 약 1억2000만개 세포, 약 2억5000만개 세포, 약 3억5000만개 세포, 약 4억5000만개 세포, 약 6억5000만개 세포, 약 8억개 세포, 약 9억개 세포, 약 30억개 세포, 약 300억개 세포, 약 450억개 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위)일 수 있다.

[0065] 치료 또는 예방 효능은 치료된 환자의 주기적 평가에 의해 모니터링될 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복된 투여의 경우, 상태에 따라서, 질환 증상의 목적하는 역제가 일어날 때까지 치료가 반복된다. 그러나, 다른 투약 요법이 유용할 수도 있으며 본 발명의 범위 내에 있다. 목적하는 투여량은 조성물의 단일 볼루스(bolus) 투여에 의해, 조성물의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0066] 본 발명의 CAR을 발현하는 숙주 세포 또는 CAR-암호화 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물은 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비내, 구강, 설하 또는 좌약 투여를 포함한 표준 투여 기술을 이용하여 포유동물에게 투여될 수 있다. 상기 조성물은 바람직하게는 비경구 투여에 적합하다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 보다 바람직하게는, 조성물은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초계 전달을 이용하여 포유동물에게 투여된다.

[0067] 본 발명의 CAR을 발현하는 숙주 세포 또는 CAR-암호화 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물은 포유동물에게 공투여될 수 있는 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여될 수 있다. "공투여"는, 본 발명의 CAR이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 증대시킬 수 있거나 그 반대가 될 수 있도록 하기에 충분히 가까운 시간 내에 상기 하나 이상의 추가 치료제, 및 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 이와 관련하여, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물이 첫 번째로 투여될 수 있고 하나 이상의 추가 치료제가 두 번째로 투여될 수 있거나, 그 반대도 가능하다. 또는, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물 및 하나 이상의 추가의 치료제는 동시에 투여될 수 있다. 본 발

명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물과 공-투여될 수 있는 치료제의 한 예는 IL-2이다.

- [0068] 본 발명의 CAR을 발현하는 숙주 세포 또는 CAR-암호화 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물이 일단 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여되면, CAR의 생물학적 활성은 당해 분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 본 발명의 방법에 따르면, CAR은 악성 B 세포 상의 CD19에 결합하고, 악성 B 세포는 파괴된다. 표면 악성 B 세포 상의 CD19에 대한 CAR의 결합은, 예를 들어, ELISA 및 유세포분석을 포함하여, 당해 분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 방법을 이용하여 평가될 수 있다. 악성 B 세포를 파괴하는 CAR의 능력은 당해 분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 문헌[Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009); and Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004)]에 기술된 세포독성 분석을 이용하여 측정될 수 있다. CAR의 생물학적 활성은 또한 CD107a, IFN γ , IL-2 및 TNF와 같은 특정 사이토카인의 발현을 분석함으로써 측정될 수 있다.
- [0069] 당해 분야의 통상의 기술을 가진 자라면 CAR의 치료 또는 예방 효능이 변형을 통해 증가되도록 본 발명의 CAR이 다수의 방식으로 변형될 수 있음을 용이하게 인식할 것이다. 예를 들어, CAR은 직접적으로 또는 링커를 통해 간접적으로 표적화 잔기에 접합될 수 있다. 화합물, 예를 들어, CAR을 표적화 잔기에 접합시키는 절차는 당해 분야에서 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995)] 및 미국 특허 제 5,087,616 호 참조).
- [0070] 하기의 실시예는 본 발명을 더 예시하지만, 당연히 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0071] **실시예**
- [0072] **실시예 1**
- [0073] 본 실시예는 본 발명의 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR)를 생성하는 방법을 설명한다.
- [0074] 일련의 항-CD19 CAR을 설계하고 합성하였다. 모든 CAR은 무린 단일클론 항체 FMC63(문헌[Nicholson et al., *Molecular Immunology*, 34(16-17): 1157-1165 (1997)] 또는 완전 인간 단일클론 항체 47G4(미국 특허출원 공개 제 2010/0104509 호)로부터 유래된 단일쇄 가변 단편(scFv)으로 이루어진 항원-인식 도메인을 함유하였다. CAR은 인간 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 수용체로부터의 신호 서열, 또는 인간 CD8 분자로부터의 신호 서열을 포함하였다. CAR은 인간 CD3 ζ 분자, 인간 CD28 분자, 인간 4-1BB 분자, 인간 CD27 분자, 및/또는 Fc ϵ RI의 감마쇄로부터 유래된 세포내 T 세포 신호전달 도메인(또는 "보조자극 도메인")의 2개 이상의 조합을 함유하였다.
- [0075] 보다 특히, 플라스미드는, FMC63-유래 scFv, GM-CSF-수용체 신호 서열, CD8 세포의 및 막관통 성분, 및 인간 CD3 ζ 및 CD28 분자의 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 암호화하는 FMC63-CD828Z가 출발 물질로서 플라스미드 MSGV-FMC63-28Z(문헌[Kochenderfer et al., *Journal of Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009)]에 기술됨)를 사용하여 제작되었음을 나타내었다. MSGV-FMC63-28Z 플라스미드를 먼저 제한 효소 NotI 및 BmgBI(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 미국 매사추세츠주 입스위치 소재)로 절단하여, 상기 플라스미드의 전체 CD28 부분을 제거하였다. 다음으로, 인간 CD8 분자의 세포외 영역의 일부 및 막관통 영역 전체, CD28 분자의 세포질 부분, 및 CD3 ζ 분자의 세포질 부분을 암호화하는 DNA 단편(인비트로젠에 의해 합성됨, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)을 절단된 MSGV-FMC63-28Z 플라스미드 내에 접합시켰다. 인간 CD8, CD28 및 CD3 ζ 의 서열은 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information) 웹사이트로부터 취득하였다. CAR 내에 포함되는 각 분자의 부분들에 관한 지침은 문헌[Kochenderfer et al., *Journal of Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009)]에서 취득하였다.
- [0076] 완전 인간 항-CD19 CAR은 완전 인간 47G4 단일클론 항체(미국 특허출원 공개 제 2010/0104509 호에 기술되어 있음)의 서열을 사용하여 생성되었다. 47G4 항체는, 인간 카파 경쇄 전이유전자 및 인간 중쇄 트랜스염색체를 갖는 KM 균주의 마우스를 백신접종시킴으로써 생성되었다. 47G4 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 서열은 미국 특허출원 공개 제 2010/0104509 호로부터 취득하였다. 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소들을 포함하는 47G4 scFv를 설계하였다: CD8 신호 서열, 47G4 항체 경쇄 가변 영역, 아미노산 서열 GSTSGSGKPGSGEGSTKG(서열번호 14)를 포함하는 링커 펩티드(문헌[Cooper et al., *Blood*, 101(4): 1637-1644 (2003)] 참조), 및 47G4 항체 중쇄 가변 영역. 이어서, 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소들을 포함하는 CAR을 암호화하는 DNA를 설계하였다: 전술한 47G4 scFv, 인간 CD8 분자의 세포외 영역 일부 및 막관통 영역 전체, 및 인간 CD28 분자 및 인간 CD3 ζ 분자의 세포질 부분. 상기 CAR은 47G4-CD828Z로 지칭되었으며, 상기 서열은 인비트로젠(미국 캘리포니아주 칼즈배드

소재)에 의해 합성되었다.

[0077] 표준 방법을 이용하여, pRRLSIN.cPPT.MSCV.coDMF5.oPRE 렌티바이러스 플라스미드(문헌[Yang et al., *Journal of Immunotherapy*, 33(6): 648-658 (2010)]에 기술되어 있음)의 coDMF5 부분을 전술한 47G4-CD828Z CAR 서열로 치환시켜 상기 플라스미드를 변형시켰다. 생성된 플라스미드는 LSIN-47G4-CD8CD28Z로 나타내었다.

[0078] 표준 방법을 이용하여 전술한 MSGV-FMC63-CD828Z 플라스미드를 변형시켜 MSGV-47G4-CD8BBZ로 지칭된 플라스미드를 제작하였다. MSGV-47G4-CD8BBZ 플라스미드는 5'에서 3' 방향으로 다음을 포함하는 47G4-CD8BBZ로 지칭된 CAR을 암호화한다: 전술한 47G4 scFv, 인간 CD8 분자의 세포외 영역 일부 및 막관통 영역 전체, 아미노산 서열 RFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열번호 15)을 포함하는 인간 4-1BB(CD137) 분자의 일부분, 및 CD3 ζ 분자의 세포질 부분.

[0079] FMC63-CD8BBZ CAR로 지칭된 CAR을 암호화하는 MSGV-FMC63-CD8BBZ로 지칭된 플라스미드는 플라스미드 MSGV-FMC63-CD828Z의 CD28 서열을 MSGV-47G4-CD8BBZ에 포함된 동일한 4-1BB 서열로 치환시켜 제작하였다.

[0080] SP6 scFv(문헌[Ochi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(20):6351-6355 (1983)])를 암호화하는 DNA를 FMC63 scFv를 암호화하는 DNA의 절제 후에 MSGV-FMC63-CD828Z 레트로바이러스 벡터 내에 접합시켜 MSGV-SP6-CD828Z를 제조하였으며, 이것은 합텐 2,4,6-트라이니트로벤젠설포산을 인식하였고 일부 실험에서 음성 대조군으로 사용되었다.

[0081] 전술한 방법을 이용하여 생성된 항-CD19 CAR 모두를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0082]

항-CD19 CAR	아미노산 서열번호	신호 서열	세포외 및 막관통 영역	세포내 T 세포 신호전달 도메인
47G4-CD828Z	1	인간 CD8 α	인간 CD8 α	CD28 CD3 ζ
47G4-CD8BBZ	2	인간 CD8 α	인간 CD8 α	4-1BB CD3 ζ
47G4-CD827Z	3	인간 CD8 α	인간 CD8 α	CD27 CD3 ζ
47G4-CD82827Z	4	인간 CD8 α	인간 CD8 α	CD28 CD27 CD3 ζ
47G4-CD827BBZ	5	인간 CD8 α	인간 CD8 α	4-1BB CD27 CD3 ζ
FMC63-CD828Z	6	GM-CSF 수용체	인간 CD8 α	CD28 CD3 ζ
FMC63-CD827BBZ	7	GM-CSF 수용체	인간 CD8 α	CD27 4-1BB CD3 ζ
FMC63-CD827Z	8	GM-CSF 수용체	인간 CD8 α	CD27 CD3 ζ
FMC63-CD82827Z	9	GM-CSF 수용체	인간 CD8 α	CD28 CD27 CD3 ζ
47G4-CD82827GAMMA	10	인간 CD8 α	인간 CD8 α	CD28 CD27 Fc ϵ RI 감마쇄
FMC63-CD82827GAMMA	11	인간 CD8 α	인간 CD8 α	CD28 CD27 Fc ϵ RI 감마쇄
47G4-CD828GAMMA	12	인간 CD8 α	인간 CD8 α	CD28 Fc ϵ RI 감마쇄

FMC63-CD828GAMMA	13	GM-CSF 수용체	인간 CD8 α	CD28 Fc ε RI 감마쇄
------------------	----	------------	----------	---------------------

[0083] 본 실시예의 결과는 완전 인간 단일클론 항-CD19 항체 및 무린 단일클론 항-CD19 항체를 기반으로 하는 항-CD19 CAR의 생성을 입증한다.

[0084] **실시예 2**

[0085] 본 실시예는 본 발명의 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 발현하는 T 세포를 생성하는 방법을 설명한다.

[0086] 전술한 CAR을 암호화하는 복제 불능 감마레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 생성하고 T 세포를 형질도입시키는데 사용하였다. 복제-불능 감마레트로바이러스를 일시적으로 생성하기 위해, 리포펙타민(LIPOFECTAMINE)TM 2000(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)을 사용하여 293GP 패키징 세포(문헌[Burns et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90(17): 8033-8037 (1993)])를 RD114 외피 단백질(문헌[Porter et al., *Human Gene Therapy*, 7(8): 913-919 (1996)])을 암호화하는 플라스미드와 함께 실시예 1에서 기술된 CAR을 암호화하는 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포는 37 °C에서 항생물질을 함유하지 않는 D10 배지에서 6 내지 8 시간동안 배양하였다. 이어서, 형질감염에 사용된 배지를 새 D10 배지로 교체하고, 세포를 36 내지 48 시간동안 더 배양하였다. 형질감염 동안 및 후에, 293GP 세포를 폴리-D-라이신 코팅된 접시(비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences), 미국 캘리포니아주 새너제이 소재) 상에서 배양하였다. 레트로바이러스를 함유하는 상등액을 접시로부터 제거하고 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 상등액은 -80 °C에서 저장하였다.

[0087] 문헌[Yang et al., *Journal of Immunotherapy*, 33(6): 648-658 (2010)]에 기술된 프로토콜을 이용하여 실시예 1에서 기술된 각각의 CAR을 암호화하는 렌티바이러스를 함유한 상등액을 생성하였다.

[0088] 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 해동시키고 T 세포 배지로 1회 세척하였다. 50 ng/mL의 항-CD3 단일클론 항체 OKT3(오르토(Ortho), 미국 뉴저지주 브리지워터 소재) 및 300 IU/mL의 IL-2를 함유하는 T 세포 배지에 PBMC를 1×10^6 세포/mL의 농도로 현탁시켰다. 상기 현탁액 20 mL를 75 cm² 배양 플라스크(코닝(Corning), 미국 뉴욕주 코닝 소재)에 첨가하였다. 상기 플라스크를 37 °C 및 5% CO₂에서 수직으로 세워 배양하였다(예를 들어, 문헌[Kochenderfer et al., *Journal of Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009)] 참조).

[0089] 먼저 레트로넥틴(RETRONECTIN)TM(타카라/클론테크 래버러토리즈(Takara/ Clontech Laboratories), 미국 캘리포니아주 마운틴뷰 소재)을 PBS에 10 g/mL의 농도로 용해시켜 T 세포의 감마레트로바이러스 형질도입을 수행하고, PBS 용액중 상기 레트로넥틴TM 2 mL를 비-조직배양물 코팅된 6웰 플레이트(비디 바이오사이언시즈)의 각 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 실온(RT)에서 2 시간동안 배양하였다. 배양 후에, 레트로넥틴TM 용액을 흡인시키고 헵크스(Hanks) 균형 염 용액(HBSS)과 2% 소 혈청 알부민(BSA)으로 이루어진 차단 용액 2 mL를 각각의 레트로넥틴TM-코팅된 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 실온에서 30 분동안 배양하였다. 차단 용액을 흡인시키고, 웰을 HBSS+2.5% HEPES의 용액으로 세정하였다. 감마레트로바이러스 상등액을 신속하게 해동시키고 T 세포 배지로 1:1 희석시켰다. 이어서, 희석된 상등액 2 mL를 각각의 레트로넥틴TM-코팅된 웰에 첨가하였다.

[0090] 상등액 첨가 후, 플레이트를 32 °C에서 2000xg로 2 시간동안 원심분리하였다. 이어서, 상등액을 웰로부터 흡인시키고, OKT3 및 IL-2와 함께 2 일동안 배양된 2×10^6 T 세포를 각 웰에 첨가하였다. T 세포가 레트로바이러스-코팅된 플레이트에 첨가되었을 때, 이들을 T 세포 배지 + 300 IU/mL의 IL-2에 0.5×10^6 세포/mL의 농도로 현탁시켰다. T 세포를 각 웰에 첨가한 후에, 플레이트를 1000xg로 10 분동안 원심분리하고, 37 °C에서 밤새 배양하였다. 24 내지 30 시간동안 배양한 후, T 세포를 플레이트로부터 제거하고 300 IU/mL의 IL-2를 함유하는 새 T 세포 배지중에 0.5×10^6 세포/mL의 농도로 현탁하고, 37 °C 및 5% CO₂에서 배양하였다.

[0091] T 세포의 렌티바이러스 형질도입을 위해, 활성화된 PBMC를 프로타민 설페이트 및 300 IU/mL IL-2를 함유하는 렌티바이러스 상등액에 현탁하였다. 상기 세포를 1200xg에서 1시간동안 원심분리하였다. 이어서, 상기 세포를 37 °C에서 3 시간동안 배양하였다. 다음으로, 상등액을 RPMI 배지(메디아텍 인코포레이티드(Mediatech, Inc.), 미국 버지니아주 매너서스 소재) + 10% 태아 소 혈청(인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재) 및 IL-2로 1:1 희석하였다. 상기 세포를 희석된 상등액에서 밤새 배양한 후, IL-2를 갖는 AIM V 배지 + 5% 인간 AB 혈청중에서 다시 배양하였다.

- [0092] 형질도입된 T 세포 상에서의 FMC63-기반 CAR의 발현을 평가하였다. 구체적으로, 형질도입된 T 세포를 세척하고 FACs 완충액(포스페이트-완충 식염수(PBS) + 0.1% 나트륨 아지드 및 0.4% BSA)에 현탁하였다. 비오틴-표지된 다중클론 염소 항-마우스 F(ab)2 항체(항-Fab, 잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch), 미국 펜실베이니아 주 웨스트 그로브 소재)를 첨가하여 FMC63 scFv를 검출하였다. 세포를 4 °C에서 25 분동안 배양하고 1회 세척하였다. 세포를 FACs 완충액에 현탁하고 정상 마우스 IgG(인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)로 차단시켰다. 이어서, 상기 세포를 피코에리트린(PE)-표지된 스트렙타비딘(비디 파밍엔(BD Pharmingen), 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재), 항-CD4, 항-CD8 및 항-CD3으로 염색시켰다. LSR II 유세포분석기(비디 바이오사이언시즈)를 사용하여 유세포분석 포착을 수행하였으며, FlowJo 소프트웨어(트리스타 인코포레이티드(Treestar, Inc.), 미국 오레곤주 애슬랜드 소재)를 사용하여 분석을 수행하였다. 형질도입된 T 세포 상에서의 47G4-기반 CAR의 발현은, 비오틴-표지된 다중클론 염소 항-마우스-F(ab)2 항체 대신 비오틴-표지된 단백질 L(젠스크립트(GenScript), 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용한 것을 제외하고는 거의 동일한 방법을 이용하여 평가하였다.
- [0093] CAR-발현(CAR+) T 세포의 백분율은, 각각의 실험에서 항-Fab 항체 또는 단백질 L로 염색된 CAR-형질도입된 배양물 중의 T 세포의 백분율에서 항-Fab 또는 단백질 L로 염색된 동일 공여자로부터의 동일하게 배양된 비형질도입 T 세포의 백분율을 뺀 값으로서 산출하였다.
- [0094] 배양 제7일에, 무린 FMC63 항체로부터 유래된 scFv를 포함하는 CAR을 발현하는 T 세포의 백분율은 다음과 같았다: FMC63-28Z, 71%; FMC63-CD828Z, 88%; 및 FMC63-CD8BBZ, 87%. FMC63-28Z CAR 발현 T 세포는, 도 1에 나타낸 바와 같이, IL-2-함유 배양물 중에서 FMC63-CD828Z CAR 또는 FMC63-CD8BB CAR을 발현하는 T 세포에 비해 더 짧은 시험관내 생존율을 나타내었다. FMC63-CD828Z, FMC63-CD8BBZ 및 FMC63-CD827Z를 암호화하는 감마레트로바이러스로 형질도입된 T 세포 상에서 높은 수준의 CAR 발현이 또한 검출되었다.
- [0095] 47G4 항체로부터 유래된 scFv를 포함하는 CAR은 인간 T 세포의 표면상에서 높은 수준으로 발현되었다. 특히, 도 2A 내지 2D는 CD27 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 47G4-기반 CAR의 발현을 나타내는 반면, 도 3A 및 3B는 47G4-CD828Z CAR의 발현을 나타낸다.
- [0096] 본 실시예의 결과는 T 세포가 본 발명의 항-CD19 CAR을 발현하도록 조작될 수 있음을 입증한다.
- [0097] **실시예 3**
- [0098] 본 실시예는 CD19에 대한 본 발명 CAR의 특이성을 측정하기 위해 사용된 일련의 실험을 기술한다.
- [0099] 환자 샘플 및 세포주
- [0100] 국립 암 연구소(National Cancer Institute, NCI)의 외과부서에서 임상시험 심사위원회 승인된 프로토콜에 등록된 흑색종, 만성 림프구성 백혈병(CLL) 또는 림프종 환자들로부터 비-백혈병 PBMC 샘플을 수득하였다. 5명의 상이한 환자들로부터의 세포를 사용하였다. 공여자 1은 CLL을 가졌고, 공여자 2는 정상적인 공여자였으며, 공여자 3 및 공여자 5는 둘 다 림프종을 가졌고, 공여자 4는 흑색종을 가졌다. PBMC는 90% FBS + 10% DMSO(시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트루이스 소재)에 냉동보존하였다. 표적 세포로서 1차 CLL 세포를 사용한 실험에서는, CLL을 갖는 환자로부터의 비조작 PBMC를 사용하였다. 하기의 CD19-발현 불멸화 세포주를 사용하였다: NALM-6(DSMZ, 독일 브라운슈바이크의 DSMZ에서 입수한 급성 림프성 백혈병) 및 CK19-K562. 하기의 CD19-음성 세포주를 사용하였다: A549(폐암종, ATCC에서 입수), CCRF-CEM(ATCC에서 입수한 T 세포 백혈병), MDA231(ATCC에서 입수한 유방암종), 및 TC71(유잉(Ewing) 육종, 국립 암연구소(미국 메릴랜드주 베테스다 소재)의 닥터 엠 소코스(M. Tsokos)의 친절한 선물). 모든 세포주들은 R10 배지중에서 유지되었다. CLL PBMC를 분석에서 표적으로 사용하였을 때, 세포는 분석전 12 내지 18 시간동안 R10 배지중에서 배양되었다.
- [0101] 인터페론- 및 TNF 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)
- [0102] 임상 시험에서 CAR FMC63-28Z를 발현하는 T 세포를 주입받은 환자들에서 저혈압 및 다른 독성의 발생은 FMC63-28Z를 발현하는 T 세포에 의한 TNF 생성과 본 발명의 CAR을 발현하는 T 세포에 의한 TNF 생성의 비교를 용이하게 하였다.
- [0103] 표적 세포들을 세척하고 IL-2를 함유하지 않은 T 세포 배지에 1×10^6 세포/mL로 현탁시켰다. 각 표적 세포 유형의 100,000개 표적 세포들을 96웰 환자 플레이트(코닝, 미국 매사추세츠주의 텍스베리 소재)의 2개 웰의 각각에 첨가하였다. T 세포만을 함유하는 웰도 또한 준비하였다. 플레이트를 37 °C에서 18 내지 20 시간동안 배양하였다. 배양 후에, 표준 방법(피어스(Pierce), 미국 일리노이주 록포드 소재)을 이용하여 IFN γ 또는 TNF ELISA

분석을 수행하였다. 일부 실험에서, TNF 수준을 해당 CAR을 발현하는 밤새 배양한 배양물 중의 T 세포의 백분율로 나눔으로써 TNF ELISA 결과를 정규화시켰다. CAR 발현은 실시예 2에서 기술한 바와 같이 측정하였다.

[0104] 세포-표면 CAR 발현에 대해 정규화시켰을 때, FMC63-28Z를 발현하는 T 세포는, 도 4A 및 4B에 나타난 바와 같이, FMC-CD828Z CAR 및 FMC63-CD8BBZ CAR보다 더 많은 TNF를 지속적으로 생성하였다. FMC63-28Z CAR과 FMC63-CD828Z CAR 사이의 유일한 차이는 FMC63-28Z의 인간 CD28 세포외 및 막관통 성분들을 FMC63-CD828Z 중의 인간 CD8 단백질로부터의 세포외 및 막관통 성분들로 치환시킨 것이다. FMC63-28Z와 FMC63-CD828Z 사이의 T 세포 존속성 및 염증 사이토카인 생성에서의 현저한 차이는 후속 CAR 설계에서 CD8 세포의 스페이서 및 막관통 성분들의 사용을 이끌었다.

[0105] 표 2 및 3(모든 단위는 pg/mL IFN γ 이다)에 나타난 바와 같이, 항-CD19 CAR로 형질도입된 T 세포는 CD19-발현 세포주 CD19-K562와 함께 밤새 배양하였을 때 대량의 IFN γ 를 생성하였지만, CAR-형질도입된 T 세포는 음성 대조군 세포주와 함께 배양하였을 때 단지 배경 수준의 IFN γ 를 생성하였다. 47G4-CD828Z CAR에 대한 IFN γ ELISA의 결과는 도 5에 나타내었다.

표 2

[0106]

효과기 세포	CD19-양성 표적		CD19-음성 표적			T 세포 단독	CAR+T 세포 %
	CD19-K562	CLL	NGFR-K562	CEM	A549		
47G4-CD8BBZ	33926	10498	5885	6342	8188	5300	90
FMC63-CD8BBZ	44327	13919	4211	4405	5407	4003	86
비-형질도입	<12	1060	16	<12	<12		0

표 3

[0107]

효과기 세포	CD19-양성 표적		CD19-음성 표적		T 세포 단독
	CD19-K562	CLL	NGFR-K562	MDA231	
47G4-CD827Z	7435	1833	39	87	37
47G4-CD828Z	13819	1300	22	45	16
47G4-CD828GAMMA	9963	866	19	30	<12
47G4-CD82827Z	11874	2436	32	68	27
47G4-CD82827GAMMA	8351	870	23	46	18
47G4-CD8BBZ	13381	2394	87	175	82
비-형질도입	18	16	16	32	<12

[0108] 높은 배경 IFN γ 구획은 4-1BB 잔기를 함유하는 CAR과 일치하는 관찰 결과였다. FMC63-CD827Z CAR로 형질도입된 T 세포는 CD19-특이적 방식으로 IFN γ 를 생성하였다. FMC63-CD827Z 세포를, CD19-음성인 NGFR-K562 및 CCRF-CEM 세포와 함께 배양하였을 때 훨씬 더 낮은 수준의 IFN γ 가 생성되었다. FMC63-CD827Z-형질도입된 T 세포도 또한 항원-특이적 방식으로 TNF를 생성하였다.

[0109] CD107a 분석

[0110] 시험한 각각의 T 세포 배양물에 대해, 2개 또는 3개의 별도의 튜브를 준비하였다. 1개의 튜브는 CD19-K562 세포를 함유하였고, 1개의 튜브는 조작되지 않은 1차 CLL 세포를 함유하였으며, 다른 튜브는 NGFR-K562 세포를 함유하였다. 일부 실험에서 CD19-K562 튜브는 누락시켰다. 모든 튜브는 전술한 항-CD19 CAR로 형질도입된 T 세포, 1 mL의 AIM V™ 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재) + 5% 인간 혈청, 적정된 농도의 항-CD107a 항체(이바이오사이언시즈 인코포레이티드(eBioscience, Inc.), 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재; 클론 eBioH4A3), 및 1 μ L의 골지 스탱(Golgi Stop)(비디 바이오사이언시즈, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)을 함유하였다. 모든 튜브를 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 CD3, CD4 및 CD8의 발현에 대해 염색하였다.

[0111] CARs FMC63-CD828Z, FMC63-CD827Z, FMC63-CD8BBZ, 47G4-CD827Z, 47G4-CD82827Z, 47G4-CD827BBZ 또는 47G4-CD8BBZ를 발현하는 상이한 대상들로부터의 T 세포들은 CD19-발현 표적 세포들에 의한 자극에 반응하여 CD107a를 특이적으로 상향조절하였으며, 47G4-CD827Z, 47G4-CD82827Z, 47G4-CD827BBZ CAR에 대한 CD107a 분석의 결과는 도 6A 내지 6D에 나타내었다. 이것은 T 세포의 CD19-특이적 탈과립화의 발생을 시사하는데, 상기 탈과립화는

퍼포린-매개된 세포독성의 전제조건이다(예를 들어, 문헌[Rubio et al., *Nature Medicine*, 9(11): 1377-1382 (2003)] 참조).

[0112] 증식 분석

[0113] 항-CD19 CAR로 형질도입된 T 세포가 CD19-발현 표적 세포로 자극되었을 때 증식하는 능력을 평가하였다. 구체적으로, 0.5×10^6 개의 방사선조사된 CD19-K562 세포 또는 0.5×10^6 개의 방사선조사된 NGFR-K562 세포를 항-CD19 CAR로 형질도입된 총 0.75×10^6 개의 T 세포와 공-배양하였다. 상기 T 세포는 문헌[Mannering et al., *J. Immunological Methods*, 283(1-2): 173-183 (2003)]에 기술된 바와 같이 카복시플루오레세인 다이아세테이트 숙신이미딜 에스터(CFSE)(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)로 표지되었다. 상기 공-배양에서 사용된 배지는 AIM VTM 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재) + 5% 인간 AB 혈청이었다. IL-2는 상기 배지에 첨가되지 않았다. 개시 4일 후에, 각각의 공-배양물중 살아있는 세포의 수를 사멸 세포 배제를 위해 트립판 블루로 계수하고, 실시예 2에서 기술된 바와 같이 유세포분석을 수행하였다.

[0114] 도 7A 내지 7C에 나타난 바와 같이, CARs FMC63-CD8BBZ, FMC63-CD828Z, 및 47G4-CD8BBZ를 발현하는 T 세포들은 모두 음성 대조군 NGFR-K562 세포와 함께 배양하였을 때보다 CD19-K562 세포와 함께 배양하였을 때 CFSE의 더 큰 희석률을 나타내었다. 이들 결과는 항-CD19 CAR로 형질도입된 T 세포가 CD19 발현 표적 세포로 자극되었을 때 특이적으로 증식하였음을 시사한다.

[0115] 본 실시예의 결과는 본 발명의 CAR을 발현하는 T 세포가 CD19-특이적 사이토카인 생성, 탈과립화 및 증식을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0116] 실시예 4

[0117] 본 실시예는 본 발명의 항-CD19 CAR을 발현하는 T 세포가 만성 림프구성 백혈병(CLL) 세포를 파괴할 수 있음을 입증한다.

[0118] 본 발명의 FMC63-CD828Z CAR로 형질도입된 T 세포가 CLL을 갖는 환자로부터의 CD19-발현 비조작 PBMC를 파괴할 수 있는지를 측정하기 위해 세포독성 분석을 수행하였다. 구체적으로, 예를 들어, 문헌[Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009); and Hermans et al., *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004)]에 기술된 분석을 이용하여 CD19 발현 표적 세포(즉, CLL PBMC)의 생존을 음성 대조군 CCRF-CEM 세포의 생존에 대해 비교함으로써 표적 세포의 세포독성을 측정하였다.

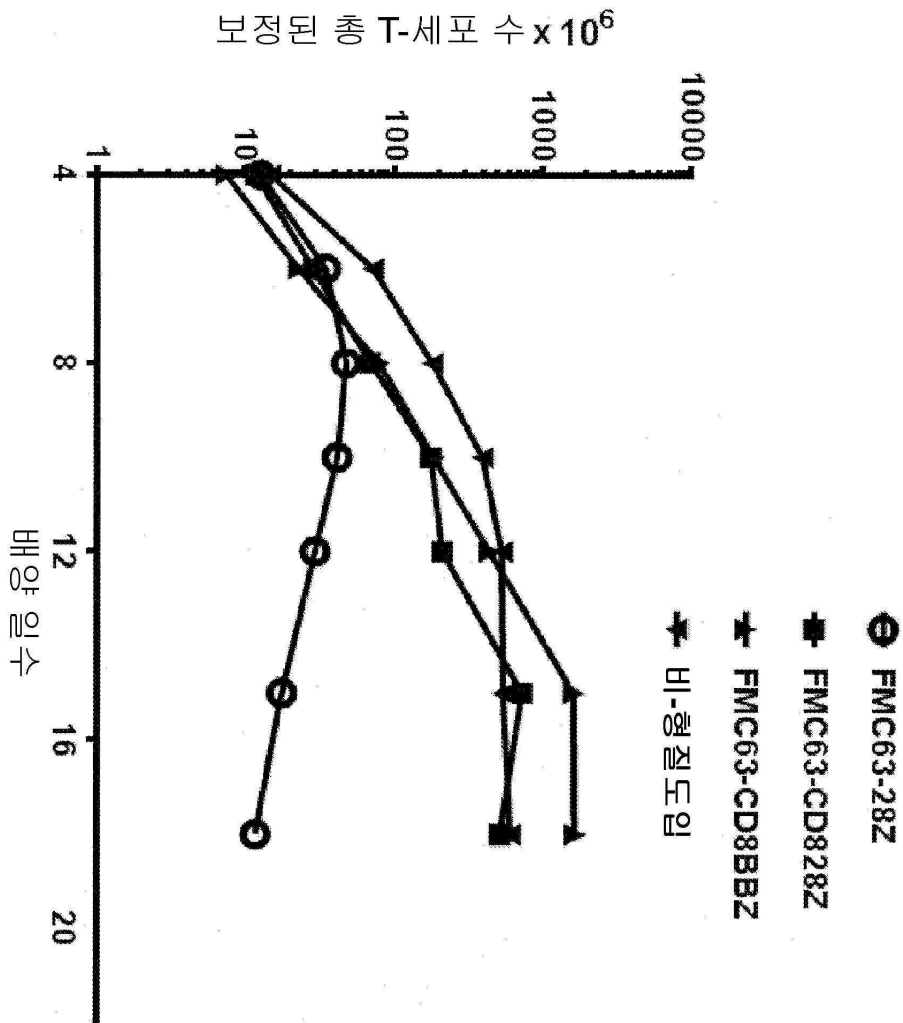
[0119] CCRF-CEM 세포를 1.5×10^6 세포/mL의 농도로 R10 배지에 현탁하고, 형광 염료 5-(및 -6)-((4-클로로메틸)벤조일)아미노)테트라메틸로다민(CMTMR)(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)을 5 M의 농도로 첨가하였다. 세포를 혼합한 다음 37 °C에서 30 분동안 배양하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 세포독성 배지에 현탁하고, 37 °C에서 60 분동안 배양하였다. 이어서, 세포를 2회 세척하고, 세포독성 배지에 현탁하였다. CLL PBMC를 PBS+0.1% BSA에 1×10^6 세포/mL로 현탁하였다. 형광 염료 카복시플루오레세인 다이아세테이트 숙신이미딜 에스터(CFSE)(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)를 1 M의 농도로 상기 세포 현탁액에 첨가하였다. 세포를 37 °C에서 10 분동안 배양하였다. 배양 후에, 세포 현탁액의 부피와 동일한 부피의 FBS를 첨가함으로써 표지화 반응을 중단시키고, 세포를 실온에서 2 분동안 배양하였다. 이어서, 세포를 세척하고 세포독성 배지에 현탁하였다.

[0120] 상이한 수의 CAR-형질도입된 T 세포를 갖는 동일한 튜브들에서 약 50,000개의 CD19-발현 CLL PBMC 및 50,000개의 CCRF-CEM 세포를 혼합하였다. 모든 실험들에서, FMC63-CD828Z CAR로 형질도입된 효과기 T 세포의 세포독성을, SP6-28Z 대조군 CAR로 형질도입되거나 형질도입되지 않은 동일한 대상으로부터의 음성 대조군 효과기 T 세포의 세포독성과 비교하였다. 하기의 T 세포:표적 세포 비에서 이중으로 멸균 5 ml 시험 튜브(비디 바이오사이언시즈, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)에서 공-배양물을 구축하였다: 20:1, 6.7:1, 2.2:1, 및 0.7:1. 배양물을 37 °C에서 4 시간 동안 배양하였다. 배양 직후, 7-아미노-액티노마이신 D(7AAD; 비디 바이오사이언시즈, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)를 제조사가 권장하는 바와 같이 첨가하고, BD FACS Canto II(비디 바이오사이언시즈)를 사용하여 유세포분석 포착을 수행하였다. 분석은 FlowJo 소프트웨어(트리스타 인코포레이티드, 미국 오리건주 애슬랜드 소재)를 사용하여 수행하였다. 분석은 7AAD-음성 (살아있는) 세포에 대해 게이팅되었으며, 살아있는 CLL 표적 세포 및 살아있는 CCRF-CEM 음성 대조군 세포의 백분율을 각각의 T 세포 + 표적 세포 배양물에 대해 측정하였다.

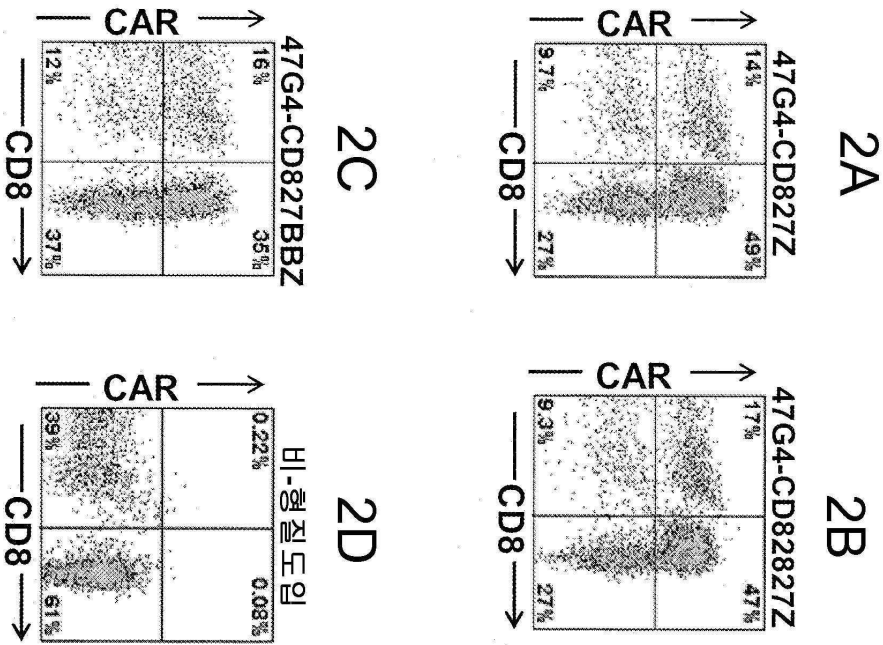
- [0121] 각각의 배양물에 대하여, CLL PBMC 세포%를 CCRF-CEM 음성 대조군 세포%로 나눔으로써 CLL PBMC의 %생존율을 측정하였다. 각각의 T 세포 + 표적 세포 배양물에서의 CLL PBMC의 %생존율을, 임의의 효과기 T 세포의 부재하에 CLL 표적 세포 및 CCRF-CEM 음성 대조군 세포만을 함유하는 튜브에서의 CLL 표적 세포%:CCRF-CEM 음성 대조군 세포%의 비로 나눔으로써 CLL PBMC의 보정된 %생존율을 산출하였다. 상기 보정은 출발 세포 수의 변동 및 자발적 표적 세포 사멸을 고려하기 위해 필요하였다. 세포독성은 CLL PBMC의 세포독성(%) = 100 - CLL PBMC의 보정된 %생존율로서 산출하였다. 모든 효과기:표적 세포 비에 대해, 세포독성은 이중으로 측정하였고 결과는 평균을 내었다.
- [0122] 세포독성 분석의 결과는 도 8에 나타내었으며, 본 발명의 항-CD19 CAR이 악성 B 세포를 파괴하는 방법에 사용될 수 있음을 입증한다.
- [0123] **실시예 5**
- [0124] 본 실시예는 본 발명의 항-CD19 CAR을 발현하는 T 세포가 동물 모델에서 악성 B 세포 종양 성장을 감소시킬 수 있음을 입증한다.
- [0125] 면역저하 NSG 마우스에게 400만개의 CD19+ NALM6 종양 세포를 피하 주사하였다. 6일 후에, 뚜렷한 종양이 형성된 후, MSGV-FMC63-28Z CAR 벡터(문헌[Kochenderfer et al., *Journal of Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009)]에 기술됨) 또는 LSIN-47G4-CD8CD28Z CAR 벡터(실시예 1에서 기술됨)로 형질도입된 인간 T 세포의 단일 정맥내 주사로 마우스를 처리하였다. 종양은 3일마다 측정하였으며 비처리 마우스에서의 종양과 비교하였다.
- [0126] 도 9에 나타난 본 실험의 결과는 FMC63-28Z CAR 또는 47G4-CD8CD28Z CAR을 발현하는 T 세포가 처리된 마우스에서 종양 크기를 현저히 감소시켰음을 시사한다.
- [0127] 본원에 인용된, 공개문헌, 특허출원 및 특허를 포함한 모든 참조문헌들은, 각각의 참조문헌들이 참고로 인용되는 것으로 개별적으로 및 명확하게 지적되고 본원에 전체로 나타낸 경우와 동일한 정도로 본원에 참고로 인용된다.
- [0128] 본 발명을 설명하는 맥락에서(특히 하기 청구범위의 맥락에서) 단수형 용어 및 "적어도 하나" 및 유사한 표현들의 사용은, 본원에 달리 나타내거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 단수형 및 복수형 둘 다를 포함하는 것으로 이해해야 한다. 용어 "적어도 하나" 다음에 하나 이상의 항목들의 목록(예를 들어, "A 및 B 중 적어도 하나")의 사용은, 본원에 달리 나타내거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 열거된 항목들로부터 선택된 1개의 항목(A 또는 B) 또는 열거된 항목들의 2개 이상의 임의의 조합(A 및 B)을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 용어 "이루어지는", "갖는", "포함하는" 및 "함유하는"은 달리 언급되지 않는 한, 제한이 없는(open-ended) 용어(즉, "포함하지만 그로 한정되지는 않는"을 의미하는 용어)로 이해해야 한다. 본원에서 값의 범위의 인용은, 본원에 달리 나타내지 않는 한, 단지 그 범위내에 속하는 각각의 별개의 값을 개별적으로 언급하는 간단한 방법으로 사용하기 위한 것이며, 각각의 별개의 값은 본원에 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 인용된다. 본원에 기술된 모든 방법들은 본원에 달리 나타내거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 및 모든 예, 또는 예시적 용어(예를 들어, "와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 예시하기 위한 것일 뿐이며, 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위에 제한을 제기하는 것이 아니다. 명세서의 어떤 용어도 임의의 비-청구된 요소를 본 발명의 실시예 필수적인 것으로서 나타내는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [0129] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 알려진 최적의 방식을 포함하여 본 발명의 바람직한 실시양태들이 본원에 기술되어 있다. 상기 바람직한 실시양태들의 변형은 상기 설명을 숙지할 때 당해 분야의 통상의 기술을 가진 자에게 명백해질 수 있다. 본 발명자들은 숙련된 전문가들이 상기 변형들을 적절하게 사용할 것으로 예상하며, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 구체적으로 기술된 바와 달리 실시될 수 있을 것으로 생각한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용되는 바와 같이 본원에 첨부된 청구범위에 인용된 대상 발명의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 또한, 그의 모든 가능한 변형들에서 진술한 요소들의 임의의 조합은 본원에 달리 나타내거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다.

도면

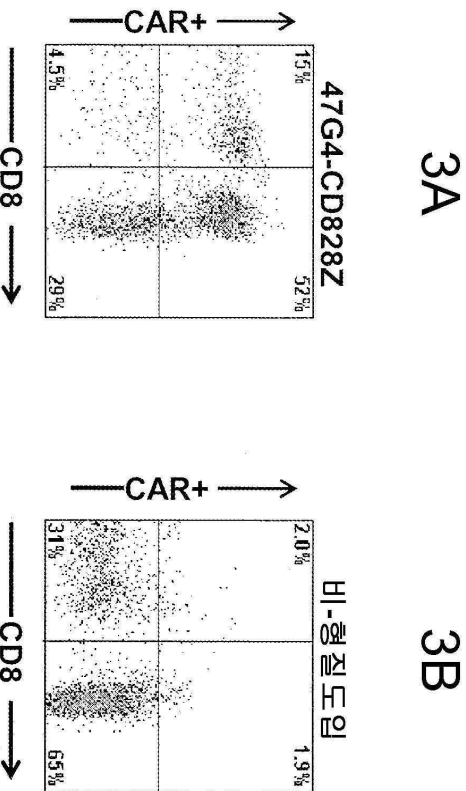
도면1



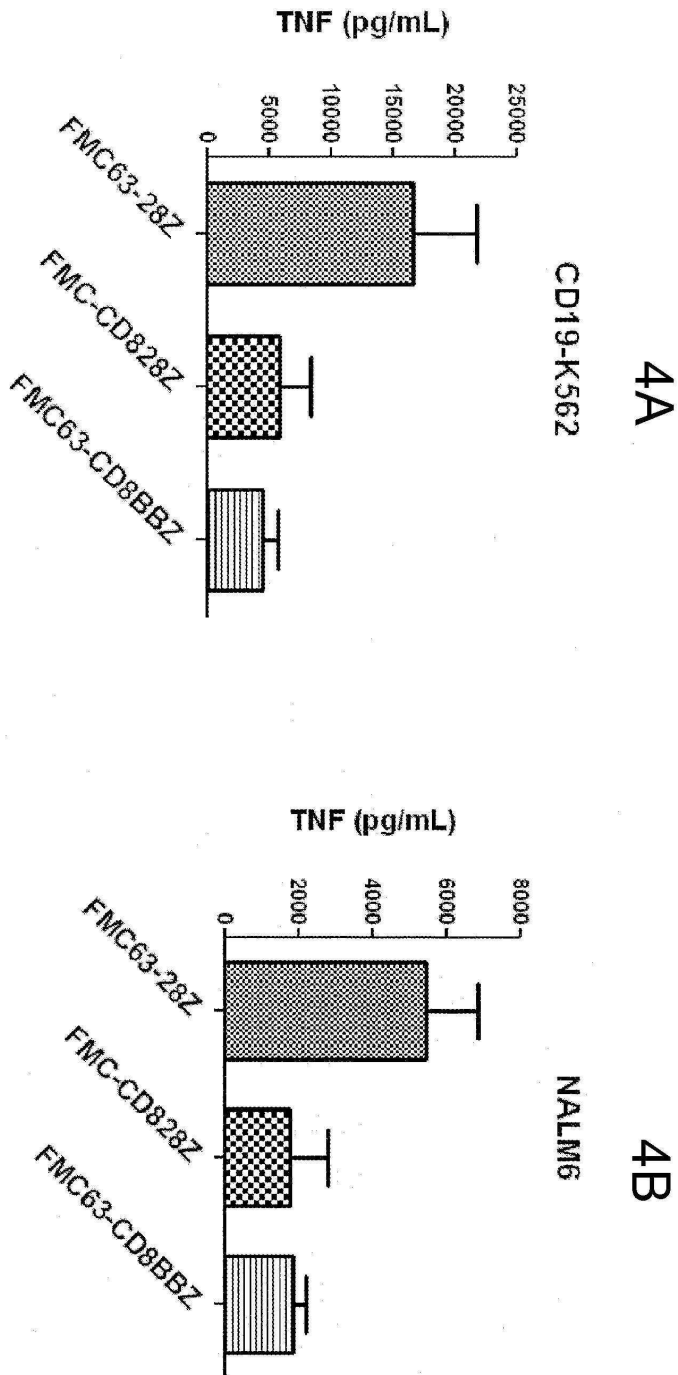
도면2



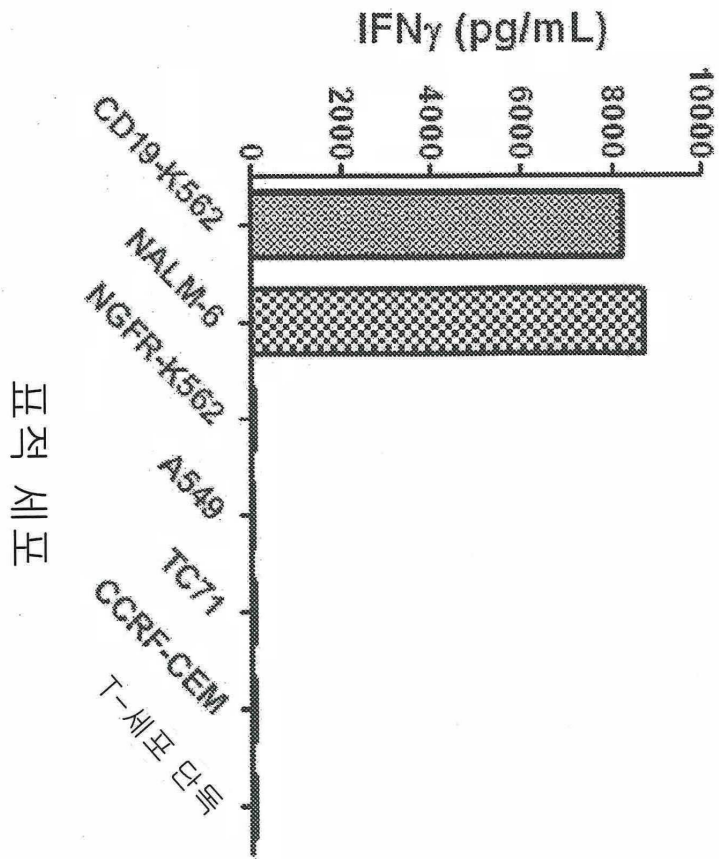
도면3



도면4



도면5

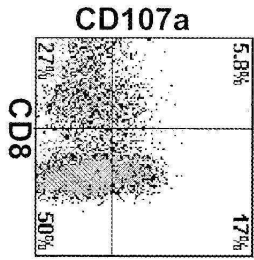


도면6

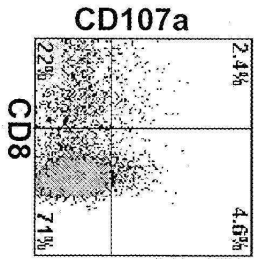
6A

47G4-CD827Z

CLL



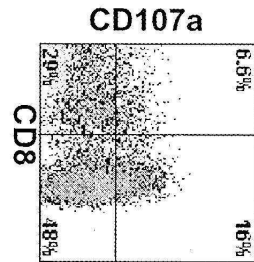
NGFR-K562



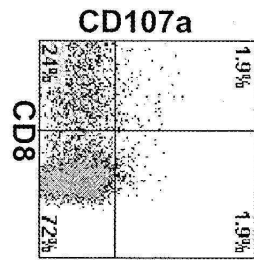
6B

47G4-CD82827Z

CLL



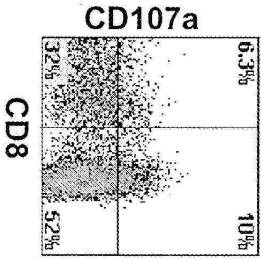
NGFR-K562



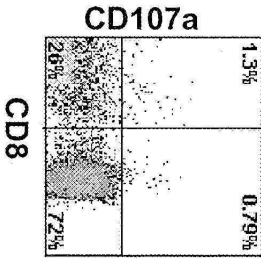
6C

47G4-CD827BBZ

CLL



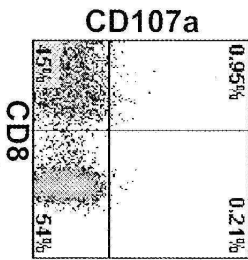
NGFR-K562



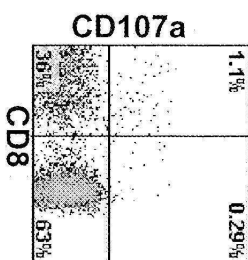
6D

비-형질도입

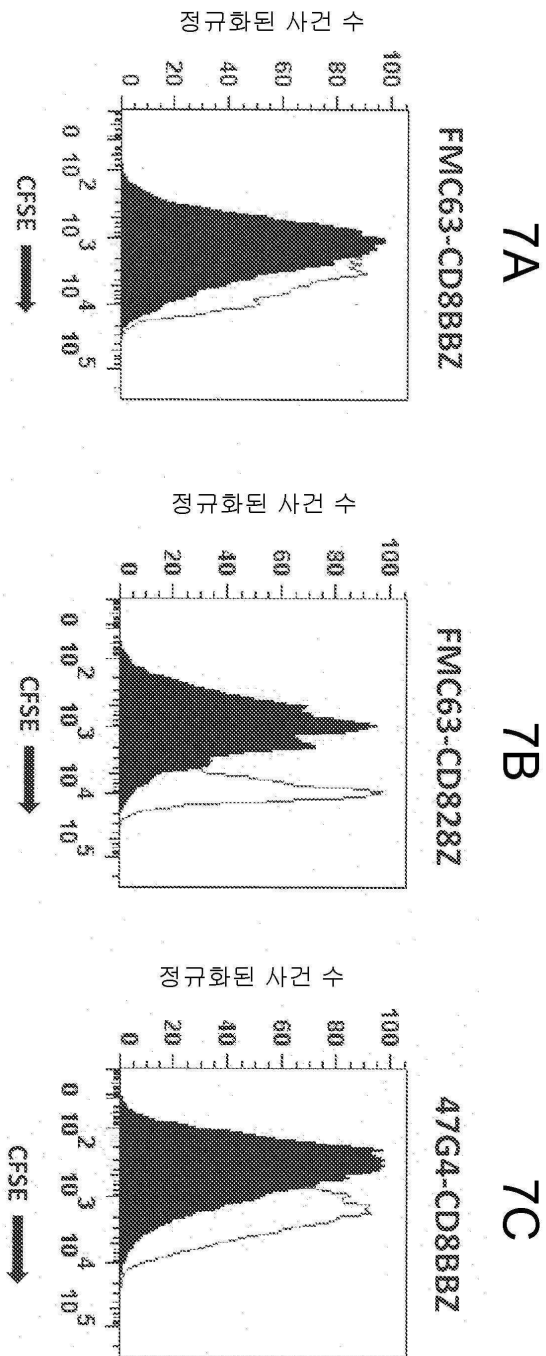
CLL



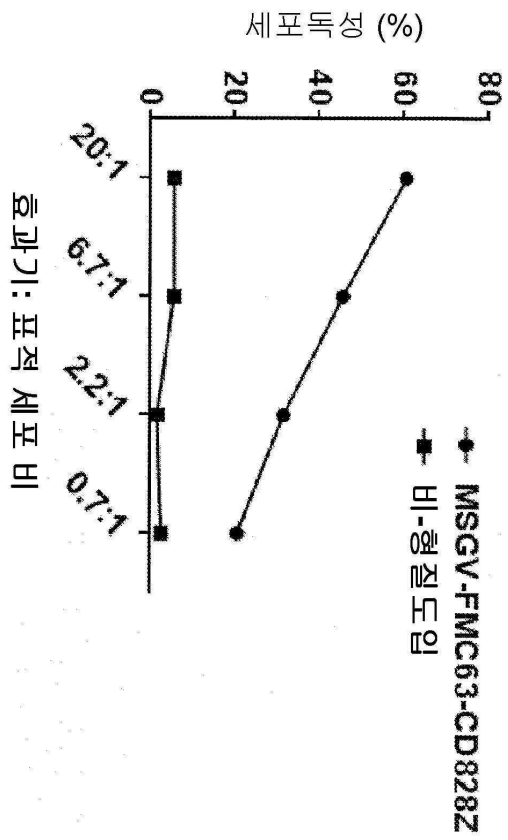
NGFR-K562



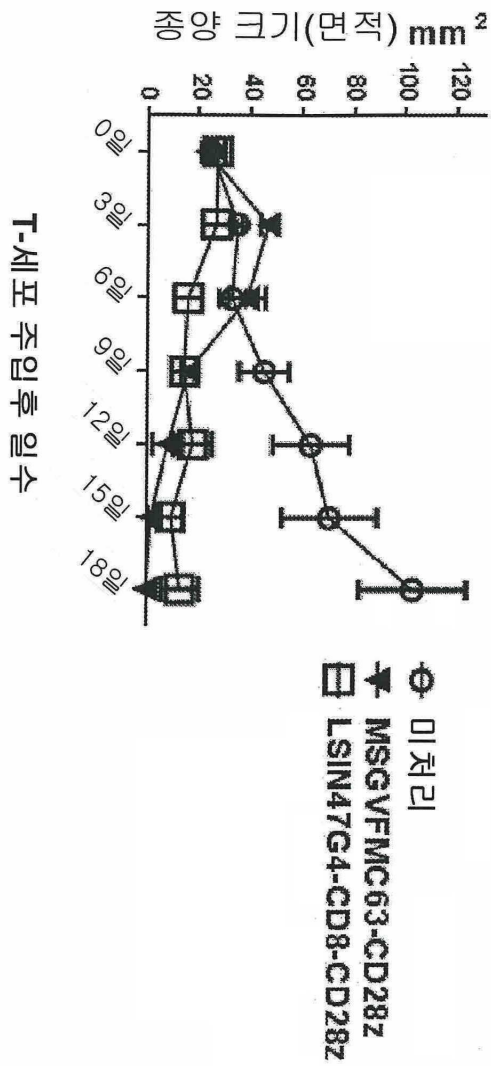
도면7



도면8



도면9



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> The United States of America, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services

<120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS TARGETING CD-19

<130> 720755

<140> PCT/US2015/033473

<141> 2015-06-01

<150> US 62/006,313

<151> 2014-06-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe

165 170 175

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

180 185 190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile

450 455 460

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

465 470 475 480

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

485 490 495

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

500

<210> 2

<211> 508

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 450 455 460
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 465 470 475 480
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 485 490 495
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505

<210> 4

<211> 550

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

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 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 20 25 30
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 50 55 60
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 65 70 75 80
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 115 120 125
 Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 145 150 155 160
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 180 185 190
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala
 195 200 205
 Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 210 215 220
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp
 245 250 255
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 515 520 525

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 530 535 540

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 545 550

<210> 5
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 5

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 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 50 55 60

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

65 70 75 80
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 115 120 125

Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

130 135 140
 Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 145 150 155 160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 180 185 190
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala
 195 200 205
 Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 210 215 220
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp
 245 250 255
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu
 260 265 270
 Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 275 280 285
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 290 295 300
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 305 310 315 320
 Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 325 330 335
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Gln Arg Arg
 340 345 350
 Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro
 355 360 365
 Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile
 370 375 380
 Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Phe Ser
 385 390 395 400
 Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
 305 310 315 320
 Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 325 330 335

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

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

 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 465 470 475 480
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 485 490 495
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505

 <210> 7
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 7

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

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln

 100 105 110

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

 115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu

 165 170 175

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

 180 185 190

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

195 200 205

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

 210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val

260 265 270
 Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro

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

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

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

325 330 335
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg

340 345 350
 Asn Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu

355 360 365
 Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser

370 375 380
 Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser

385 390 395 400
 Pro Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile

405 410 415
 Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp

420 425 430
 Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

435 440 445
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

450 455 460
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

465 470 475 480
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

485 490 495

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 500 505 510

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 515 520 525

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 530 535 540

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 545 550 555 560

<210> 8
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 8

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
 50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
 100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser
 385 390 395 400

Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 405 410 415

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 420 425 430

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 435 440 445

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 450 455 460

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 465 470 475 480

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 485 490 495

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 500 505 510

Arg

<210> 9

<211> 554

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

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

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
 50 55 60

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

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

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

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

 450 455 460
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 465 470 475 480
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 485 490 495
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 500 505 510
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His

 515 520 525
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 530 535 540
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 545 550

<210> 10

<211> 476

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

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 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 50 55 60

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 65 70 75 80

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 115 120 125

Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 130 135 140

Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 145 150 155 160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe
 165 170 175

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 180 185 190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala

Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu
 450 455 460

 Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
 465 470 475
 <210> 11
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 11
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
 50 55 60
 Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
 100 105 110
 Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu

Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp

420 425 430

Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Gln Val Arg Lys Ala Ala

435 440 445

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

450 455 460

Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln

465 470 475 480

<210> 12

<211> 428

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

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 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

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

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

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

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

Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr
 385 390 395 400
 Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu
 405 410 415
 Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
 420 425
 <210> 13
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 13
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

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

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

 130 135 140
 Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
 165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
 180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
 195 200 205

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

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 245 250 255

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

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
 275 280 285

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
 290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
 305 310 315 320

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
 340 345 350

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
 355 360 365

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
 370 375 380

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Val Arg Lys Ala Ala
 385 390 395 400

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

405 410 415
 Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
 420 425 430

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 15

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 1 5 10 15

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 20 25 30

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40 45