



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0013291
(43) 공개일자 2025년01월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 40/11 (2025.01)
A61K 40/32 (2025.01) A61K 40/42 (2025.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2025.01)
A61K 40/11 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7000732(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년10월05일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7012975
원출원일자(국제) 2016년10월05일
심사청구일자 2021년09월30일
(85) 번역문제출일자 2025년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/055492
(87) 국제공개번호 WO 2017/062451
국제공개일자 2017년04월13일
(30) 우선권주장
62/297,426 2016년02월19일 미국(US)
62/237,394 2015년10월05일 미국(US)
- (71) 출원인
프리지전 바이오사이언시스 인코포레이티드
미국 노스캐롤라이나주 27701 스위트 에이-100 더
램 디브렐 빌딩 302 이스트 페티그루 스트리트
- (72) 발명자
잔트 데릭
미국 노스캐롤라이나주 27703 더램 215 힐뷰 درا
이브
스미스 제임스 제퍼슨
미국 노스캐롤라이나주 27703 더램 1808 카네이션
드라이브
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

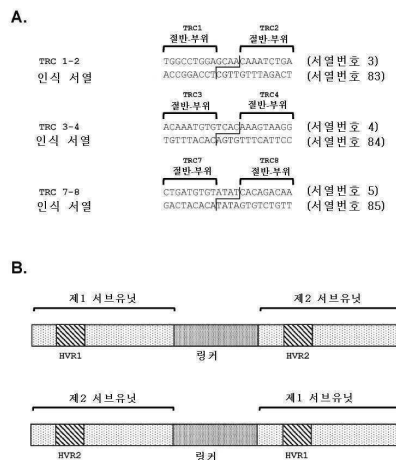
전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 변형된 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포

(57) 요약

본 명세서에는 게놈에 변형된 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포로서, 세포가 내인성 T 세포 수용체의 세포-표면 발현을 감소시키는, 유전자 변형된 세포가 개시되어 있다. 본 개시내용은 또한 이러한 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법, 및 대상체에서 질병을 치료하기 위한 이러한 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 40/32 (2025.01)

A61K 40/4211 (2025.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/02 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

니콜슨 마이클지.

미국 노스캐롤라이나주 27517 채플 힐 1200 윌로우
드라이브

매클라우드 다니엘 티.

미국 노스캐롤라이나주 27713 더랩 101 위트니 레
인

안토니 예야라즈

미국 노스캐롤라이나주 27516 채플 힐 102 소노마
웨이

바트스비치 빅터

미국 노스캐롤라이나주 27713 더랩 1008 오디세이
드라이브

명세서

청구범위

청구항 1

계놈에 변형된 인간 T 세포 수용체(TCR) 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포(genetically-modified cell)로서, 상기 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역은, 5'에서 3'로,

- (a) 상기 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자의 5' 영역;
- (b) 외인성 폴리뉴클레오타이드; 및
- (c) 상기 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자의 3' 영역을 포함하고;

상기 유전자 변형된 세포는 유전자 변형된 인간 T 세포 또는 인간 T 세포로부터 유도된 유전자 변형된 세포이며, 상기 유전자 변형된 세포는 변형되지 않은 대조 세포와 비교할 때 상기 내인성 TCR의 세포-표면 발현을 감소시키는, 유전자 변형된 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드가 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 상기 키메라 항원 수용체가 세포외 리간드-결합 도메인 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체가 서열번호 112에 대해 적어도 80%의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 세포외 리간드-결합 도메인을 포함하며, 상기 세포외 리간드-결합 도메인이 CD19에 결합하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체가 서열번호 113에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 세포내 세포질 신호전달 도메인을 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체가 서열번호 114에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 세포내 보조 자극 신호전달 도메인을 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체가 신호 펩타이드를 더 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 신호 펩타이드가 서열번호 115에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 유전자 변형된 세포.

청구항 8

제2항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체가 힌지 도메인(hinge domain)을 더 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 힌지 도메인이 서열번호 116에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 유전자 변형된 세

포.

청구항 10

제2항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체가 막관통 도메인을 더 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 막관통 도메인이 서열번호 117에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 유전자 변형된 세포.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체가 서열번호 111에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 유전자 변형된 세포.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드가 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드의 발현을 유도하는 프로모터 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 프로모터 서열이 서열번호 118에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 유전자 변형된 세포.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 119에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 유전자 변형된 세포.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 3을 포함하는 인식 서열 내의 위치에서 상기 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입되는, 유전자 변형된 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자가 서열번호 120에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 4를 포함하는 인식 서열 내의 위치에서 상기 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입되는, 유전자 변형된 세포.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자가 서열번호 121에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 20

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 5를 포함하는 인식 서열 내의 위치에서 상기 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입되는, 유전자 변형된 세포.

청구항 21

제21항에 있어서, 상기 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자가 서열번호 122에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 22

변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법으로서,

(a) 세포에,

(i) 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 제1 핵산 서열; 또는

(ii) 조작된 뉴클레아제 단백질을 도입하는 단계로서,

상기 조작된 뉴클레아제가 상기 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 인식 서열에서 절단부위를 생성시키는, 상기 도입하는 단계; 및

(b) 상기 세포에 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 핵산 서열을 도입하는 단계를 포함하되,

상기 세포는 인간 T 세포이거나, 인간 T 세포로부터 유도되고; 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드의 상기 서열은 상기 절단부위에서 상기 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입되며; 추가로, 상기 유전자 변형된 세포는 변형되지 않은 대조 세포와 비교할 때 상기 내인성 TCR의 세포-표면 발현을 감소시키는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 제2 핵산 서열이, 5'에서 3'로,

(a) 상기 절단부위 측면의 상기 5' 업스트림 서열에 대해 상동성인 5' 상동성 암(homology arm);

(b) 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드; 및

(c) 상기 절단부위 측면의 상기 3' 다운스트림 서열에 대해 상동성인 3' 상동성 암을 포함하며,

상기 외인성 폴리뉴클레오타이드의 상기 서열은 상동 재조합에 의해 상기 절단부위에서 상기 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입되는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드가 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 상기 키메라 항원 수용체가 세포의 리간드-결합 도메인 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드가 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드의 발현을 유도하는 제1 프로모터 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 상기 제2 핵산이 상기 세포를 상기 제2 핵산 서열을 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터와 접촉시킴으로써 상기 세포에 도입되는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 제2 핵산이 상기 5' 상동성 암의 5' 업스트림에 정위되거나 상기 3' 상동성 암의 3' 다운스트림에 정위된 제2 프로모터 서열을 더 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 재조합 AAV 벡터가 자가-상보적 AAV 벡터인, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 AAV 벡터가 AAV2 또는 AAV6의 혈청형을 갖는, 유전자

변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 뉴클레아제가 재조합 메가뉴클레아제, 재조합 아연-핑거 뉴클레아제(ZFN), 재조합 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), CRISPR/Cas 뉴클레아제, 또는 megaTAL 뉴클레아제인, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 31

제22항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 뉴클레아제가 재조합 메가뉴클레아제인, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 재조합 메가뉴클레아제가 상기 야생형 인간 TCR 알파 불변 영역(서열번호 1)의 93 내지 208번 잔기 내의 인식 서열을 인식하고 절단하며, 상기 재조합 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하며, 상기 제1 서브유닛은 상기 인식 서열의 제1 인식 절반-부위에 결합하고, 제1 초가변(HVR1) 영역을 포함하며, 상기 제2 서브유닛은 상기 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고, 제2 초가변(HVR2) 영역을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 상기 인식 서열이 서열번호 3을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 제1 서브유닛이 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 198 내지 344번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 7 내지 153번 잔기에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 제2 서브유닛이 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 7 내지 153번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 198 내지 344번 잔기에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 HVR1 영역이,

(a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 215번 위치; 또는

(b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 24번 위치에 해당하는 위치에서 Y를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 215 내지 270번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 24 내지 79번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 37

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 24 내지 79번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 215 내지 270번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 38

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 서브유닛이 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 198 내지 344번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 7 내지 153번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 39

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 서브유닛이 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 7 내지 153번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 198 내지 344번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 40

제33항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 메가뉴클레아제가 링커를 포함하는 단쇄 메가뉴클레아제이며, 상기 링커가 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 결합하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 41

제33항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 메가뉴클레아제가 서열번호 8 내지 27 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 42

제32항에 있어서, 상기 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 상기 인식 서열이 서열번호 4를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 제1 서브유닛이 서열번호 28 또는 29의 7 내지 153번 잔기에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 제2 서브유닛이 서열번호 28 또는 29의 198 내지 344번 잔기에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열번호 28 또는 29의 24번 위치에 해당하는 위치에 Y를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 45

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열번호 28 또는 29의 26번 위치에 해당하는 위치에 T를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 46

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열번호 28 또는 29의 46번 위치에 해당하는 위치에 Y를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 47

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열번호 28 또는 29의 215번 위치에 해당하는 위치에 H를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 48

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열번호 28 또는 29의 266번 위치에 해당하는 위치에 T를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 49

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열번호 28 또는 29의 268번 위치에 해당하는 위치에 C를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 50

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열번호 28 또는 29의 24 내지 79번 잔기를 포

합하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 51

제42항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열번호 28 또는 29의 215 내지 270번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 52

제42항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 서브유닛이 서열번호 28 또는 29의 7 내지 153번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 53

제42항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 서브유닛이 서열번호 28 또는 29의 198 내지 344번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 54

제42항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 메가뉴클레아제가 링커를 포함하는 단쇄 메가뉴클레아제이고, 상기 링커가 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛에 공유 결합하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 55

제42항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 메가뉴클레아제가 서열번호 28 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 56

제32항에 있어서, 상기 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 상기 인식 서열이 서열번호 5를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 제1 서브유닛이 서열번호 30의 7 내지 153번 잔기 또는 서열번호 31 또는 32의 198 내지 344번 잔기에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 제2 서브유닛이 서열번호 30의 198 내지 344번 잔기 또는 서열번호 31 또는 32의 7 내지 153번 잔기에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 HVR1 영역이,

(a) 서열번호 30의 24번 위치, 또는

(b) 서열번호 31 또는 32의 215번 위치에 해당하는 위치에 Y를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열번호 30의 24 내지 79번 잔기 또는 서열번호 31 또는 32의 215 내지 270번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 60

제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열번호 30의 215 내지 270번 잔기 또는 서열번호 31 또는 32의 24 내지 79번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 61

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 서브유닛이 서열번호 30의 7 내지 153번 잔기 또는 서열

번호 31 또는 32의 198 내지 344번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 62

제56항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 서브유닛이 서열번호 30의 198 내지 344번 잔기 또는 서열번호 31 또는 32의 7 내지 153번 잔기를 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 63

제56항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 메가뉴클레아제가 링커를 포함하는 단쇄 메가뉴클레아제이며, 상기 링커가 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 결합시키는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 64

제56항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 메가뉴클레아제가 서열번호 30 내지 32 중 어느 하나의 상기 아미노산 서열을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법.

청구항 65

암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법으로서, 상기 대상체에 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 세포, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법.

청구항 66

암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법으로서, 상기 대상체에 제22항 내지 제64항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 세포, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서, 상기 암이 암종, 림프종, 육종, 모세포종, 및 백혈병의 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법.

청구항 68

제65항 또는 제66항에 있어서, 상기 암이 B-세포 기원의 암, 유방암, 위암, 신경모세포종, 골육종, 폐암, 흑색종, 전립선암, 결장암, 신세포 암종, 난소암, 횡문근 육종, 백혈병, 및 호지킨 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 B-세포 기원의 암이 B-계통 급성 림프구성 백혈병, B-세포 만성 림프성 백혈병, 및 B-세포 비-호지킨 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조문헌

[0002] 본 출원은 2016년 2월 19일자로 출원된 발명의 명칭이 "Genetically-Modified Cells Comprising a Modified Human T Cell Receptor Alpha Constant Region Gene"인 미국 가출원 제62/297,426호, 및 2015년 10월 5일자로 출원된 발명의 명칭이 "Genetically-Modified Cells Comprising a Modified Human T Cell Receptor Alpha Constant Region Gene"인 미국 가출원 제62/237,394호를 우선권으로 주장하며, 이들의 개시내용은 이들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은 종양학, 암 면역요법, 분자 생물학 및 재조합 핵산 기술의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 이

의 게놈에 변형된 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포(genetically-modified cell)로서, 내인성 T 세포 수용체의 세포-표면 발현을 감소시키는, 유전자 변형된 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법, 및 대상체에서 암을 포함하는 질병을 치료하기 위해 이러한 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0005] EFS-WEB를 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록에 대한 참조문헌

[0006] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 포함하고, 이의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다. 2016년 10월 3일에 생성된 ASCII 사본명은 2000706_00180W01.txt이고, 크기는 264,046 바이트이다.

배경 기술

[0007] T 세포 입양 면역요법은 암 치료를 위한 유망한 방법이다. 이러한 전략은 특정 종양 관련 항원에 대한 이의 특이성을 향상시키기 위해 유전자 변형된 단리된 인간 T 세포를 사용한다. 유전적 변형(genetic modification)은 T 세포 상에 항원 특이성을 이식하기 위해 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체의 발현을 수반할 수 있다. 외인성 T 세포 수용체와는 달리, 키메라 항원 수용체는 단클론성 항체의 가변 도메인으로부터 이의 특이성을 유도한다. 이에 따라, 키메라 항원 수용체를 발현시키는 T 세포(CAR T 세포)는 주요 조직적합성 복잡한 비-제한적 방식으로 종양 면역반응성을 유발시킨다. 최근에, T 세포 입양 면역요법은 B 세포 악성 종양(예를 들어, 급성 림프구성 백혈병(ALL), B 세포 비호지킨 림프종(NHL), 및 만성 림프성 백혈병), 다발성 골수종, 신경모세포종, 아교모세포종, 진행 신경교종, 난소암, 중피종, 흑색종, 및 췌장암을 포함하는, 다수의 암에 대한 임상 치료법으로서 사용되고 있다.

[0008] 암 치료로서 이의 가능한 유용성에도 불구하고, CAR T 세포로의 입양 면역요법은 부분적으로, 세포 표면 상에서 내인성 T 세포 수용체의 발현에 의해 제한되었다. 내인성 T 세포 수용체를 발현시키는 CAR T 세포는 동족이게 환자에게 투여 후 주요 조직적합성 항원 및 소수 조직적합성 항원을 인식할 수 있으며, 이는 이식편-숙주-질병(GVHD)의 발달로 이어질 수 있다. 결과적으로, 임상 시험은 자가조직 CAR T 세포의 사용에 주로 집중하였으며, 여기서, 환자의 T 세포는 단리되고, 유전적으로 변형되어 키메라 항원 수용체를 도입하고, 이후에, 동일한 환자에게 재-주입된다. 자가조직 방법은 투여된 CAR T 세포에 면역 내성을 제공한다. 그러나, 이러한 방법은 환자의 암이 진단된 후에 환자-특이적 CAR T 세포를 생산하기 위해 필요한 시간 및 비용 둘 모두에 의해 제한된다.

[0009] 이에 따라, 내인성 T 세포 수용체의 발현을 감소시키고 투여 시에 GVHD를 개시하지 않는, 제3자 공여자로부터 T 세포를 사용하여 제조된, "기성품(off the shelf)" CAR T 세포를 개발하는 것이 유리할 것이다. 이러한 제품은 진단에 앞서 생성 및 검증될 수 있고, 필요할 때 즉시 환자에게 이용 가능하게 만들 수 있다. 이에 따라, GVHD의 발생을 방지하기 위해 내인성 T 세포 수용체가 결여된 동족이게 CAR T 세포의 개발이 요구되고 있다.

[0010] 게놈 DNA의 유전적 변형은 고려되는 유전자 좌(locus)에서 DNA 서열을 인식하도록 조작된 부위-특이적, 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 사용하여 수행될 수 있다. 조작된, 부위-특이적 엔도뉴클레아제를 생산하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 아연-핑거 뉴클레아제(ZFN)는 게놈에서 사전-결정된 부위를 인식하고 절단하기 위해 조작될 수 있다. ZFN은 FokI 제한 효소의 뉴클레아제 도메인에 융합된 아연 핑거 DNA-결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 아연 핑거 도메인은 길이가 약 18개의 염기쌍인 사전결정된 DNA 서열에 결합하는 단백질 생산하기 위해 합리적 또는 실험적 수단을 통해 재설계될 수 있다. 이러한 조작된 단백질을 FokI 뉴클레아제에 융합시킴으로써, 게놈-수준 특이성을 갖는 DNA 손상(DNA break)을 표적화하는 것이 가능하다. ZFN은 광범위한 진핵 생물에서 유전자 추가, 제거 및 대체를 표적화하기 위해 광범위하게 사용되고 있다[문헌 [Durai *et al.* (2005), *Nucleic Acids Res* **33**, 5978] 참조]. 마찬가지로, TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN)는 게놈 DNA에서 특정 부위를 절단하기 위해 생성될 수 있다. ZFN과 마찬가지로, TALEN은 FokI 뉴클레아제 도메인에 융합된 조작된 부위-특이적 DNA-결합 도메인을 포함한다[문헌[Mak *et al.* (2013), *Curr Opin Struct Biol.* 23:93-9] 참조]. 그러나, 이러한 경우에, DNA 결합 도메인은 TAL-효과기 도메인의 탠덤 어레이를 포함하며, 이들 각각은 단일 DNA 염기쌍을 특이적으로 인식한다. ZFN 및 TALEN이 본 발명의 실행을 위해 갖는 한계는 이러한 것이 헤테로다이머이고, 이에 따라, 세포에서 단일 작용성 뉴클레아제의 생산이 두 개의 단백질 모노머의 동시-발현을 필요하다는 것이다.

[0011] 컴팩트 TALEN은 다이머화에 대한 필요성을 피하는 대안적인 엔도뉴클레아제 구조를 갖는다[Beurdeley *et al.* (2013), *Nat Commun.* 4:1762]. 컴팩트 TALEN은 I-TevI 호밍(homing) 엔도뉴클레아제로부터 뉴클레아제 도메인에 융합된 조작된, 부위-특이적 TAL-효과기 DNA-결합 도메인을 포함한다. FokI와는 달리, I-TevI는 이중 가닥 DNA 손상을 생성시키기 위해 다이머화할 필요가 없으며, 이에 따라, 컴팩트 TALEN은 모노머로서 기능한다.

- [0012] CRISPR/Cas9 시스템을 기반으로 한 조작된 엔도뉴클레아제는 또한, 당해 분야에 공지되어 있다[Ran *et al.* (2013), *Nat Protoc.* 8:2281-2308; Mali *et al.* (2013), *Nat Methods* 10:957-63]. CRISPR 엔도뉴클레아제는 두 가지 성분, 즉 (1) 카스파제 효소기 뉴클레아제, 통상적으로 미생물 Cas9; 및 (2) 게놈에서 고려되는 위치로 뉴클레아제를 유도하는 약 20개의 뉴클레오타이드 표적화 서열을 포함하는 짧은 "가이드 RNA"를 포함한다. 동일한 세포에서 각각이 상이한 표적화 서열을 갖는 다수의 가이드 RNA를 발현시킴으로써, 게놈에서 다수의 부위에 동시에 DNA 손상을 표적화하는 것이 가능하다. 이에 따라, CRISPR/Cas9 뉴클레아제는 본 발명을 위해 적합하다. CRISPR/Cas9 시스템의 주요 단점은 이의 보고된 높은 빈도의 오프-표적 DNA 손상으로서, 이는 인간 환자를 치료하기 위한 시스템의 유용성을 제한할 수 있다[Fu *et al.* (2013), *Nat Biotechnol.* 31:822-6].
- [0013] 호밍 엔도뉴클레아제는 식물 및 진균의 게놈에서 일반적으로 발견되는 15 내지 40개의 염기쌍 절단부위를 인식하는 자연 발생 뉴클레아제의 그룹이다. 이러한 것은 종종 기생 DNA 요소, 예를 들어, 그룹 1 자가-접합 인트론 및 인테인과 관련이 있다. 이러한 것은 염색체에서 이중 가닥 손상을 생성시킴으로써 숙주 게놈의 특정 위치에서의 상동 재조합 또는 유전자 삽입을 자연적으로 증진시키며, 이는 세포 DNA-수리 기구를 구성한다[Stoddard (2006), *Q. Rev. Biophys.* 38: 49-95]. 호밍 엔도뉴클레아제는 일반적으로 4개의 패밀리(family)로 그룹화된다: LAGLIDADG(서열번호 7) 패밀리, GIY-YIG 패밀리, His-Cys 박스 패밀리 및 HNH 패밀리. 이러한 패밀리들은 구조적 모티프에 의해 특징되는데, 이는 촉매 활성 및 인식 서열에 영향을 미친다. 예를 들어, LAGLIDADG(서열번호 7) 패밀리의 일원은 보존된 LAGLIDADG(서열번호 7) 모티프의 하나 또는 두 개의 복사체 중 어느 하나를 가짐으로써 특징된다[Chevalier *et al.* (2001), *Nucleic Acids Res.* 29(18): 3757-3774 참조]. LAGLIDADG(서열번호 7) 모티프의 단일 복사체를 갖는 LAGLIDADG(서열번호 7) 호밍 엔도뉴클레아제는 호모다имер을 형성하며, LAGLIDADG(서열번호 7) 모티프의 두 개의 복사체를 갖는 일원은 모노머로서 발견된다.
- [0014] I-CreI(서열번호 6)는 조류 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 염색체 염색체에서 22개의 염기쌍 인식 서열을 인식하고 절단하는 호밍 엔도뉴클레아제의 LAGLIDADG(서열번호 7) 패밀리의 일원이다. 유전적 선택 기술은 야생형 I-CreI 절단부위 선호도를 변형시키기 위해 사용되었다[Sussman *et al.* (2004), *J. Mol. Biol.* 342: 31-41; Chames *et al.* (2005), *Nucleic Acids Res.* 33: e178; Seligman *et al.* (2002), *Nucleic Acids Res.* 30: 3870-9, Arnould *et al.* (2006), *J. Mol. Biol.* 355: 443-58]. 더욱 최근에, 포유류, 효모, 식물, 박테리아, 및 바이러스 게놈에서의 부위를 포함하는, 광범위하게 다른 DNA 부위를 표적화하기 위해 I-CreI 및 다른 호밍 엔도뉴클레아제를 포괄적으로 재설계할 수 있는 모노-LAGLIDADG(서열번호 7) 호밍 엔도뉴클레아제를 합리적으로 설계하는 방법이 기술되었다[WO 2007/047859호].
- [0015] WO 2009/059195호에서 처음 기술된 바와 같이, I-CreI 및 이의 조작된 유도체는 대개 다이머이지만, 제1 서브유닛(subunit)의 C-말단을 제2 서브유닛의 N-말단에 결합시키는 짧은 펩타이드 링커를 사용하여 단일 폴리펩타이드에 융합될 수 있다[Li *et al.* (2009), *Nucleic Acids Res.* 37:1650-62; Grizot *et al.* (2009), *Nucleic Acids Res.* 37:5405-19]. 이에 따라, 작용성 "단쇄" 메가뉴클레아제는 단일 전사체로부터 발현될 수 있다.
- [0016] 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역에서 DNA 표적을 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의 사용은 이전에 국제 공개 WO 2014/191527호에 개시되었다. '527 공개에는 TCR 알파 불변 영역 유전자의 엑손 1 내에 인식 서열('527 공개의 서열번호 3)을 표적화하기 위해 조작된 I-OnuI 메가뉴클레아제의 변종이 개시되어 있다. '527 공개에는 키메라 항원 수용체가 TCR 넉아웃 세포에서 발현될 수 있다는 것이 논의되어 있지만, 저자는 TCR 알파 불변 영역 유전자에서 메가뉴클레아제 절단부위에 키메라 항원 수용체 암호화 서열의 삽입을 기술하지 않았다.
- [0017] 내인성 TCR의 발현을 방해하기 위한 다른 뉴클레아제 및 메커니즘의 사용이 또한 개시되어 있다. 예를 들어, 인간 T 세포에서 TCR 유전자를 방해하기 위한 아연 핑거 뉴클레아제의 사용은 미국 특허 제8,95,828호 및 미국특허출원공개번호 US2014/034902호에 의해 기술되었다. 미국공개번호 US2014/0301990호에는 아연 핑거 뉴클레아제 및 효소기 뉴클레아제(TALEN)와 같은 전사-활성제의 사용, 및 단리된 T 세포에서 TCR 유전자를 표적화하기 위한 조작된 단일 가이드 RNA를 갖는 CRISPR/Cas 시스템이 기술되어 있다. 미국특허출원공개번호 US2012/0321667호에는 T 세포에서 특이적 TCR 및/또는 CD3 사슬을 암호화하는 핵산을 표적화하는 짧은-헤어핀 RNA의 사용이 기재되어 있다.
- [0018] 그러나, 본 발명은 종래 기술의 교시를 개선한다. 본 발명자는 세포 표면에 내인성 T 세포 수용체의 발현을 방해함과 동시에, 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입된 외인성 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 키메라 항원 수용체 또는 외인성 TCR 암호화 서열)을 포함하는 유전자 변형된 세포를 최초로 교시한다. 또한, 종래 기술에는 본 명세서에 기술된 메가뉴클레아제 또는 인식 서열, 또는 이러한 유전자 변형된 세포를 생산하기 위한 이의 사용이 개시되어 있지 않다.

발명의 내용

- [0019] 본 발명은 계놈에 변형된 T 세포 수용체(TCR) 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포를 제공한다. 이러한 세포는 유전자 변형된 인간 T 세포, 또는 인간 T 세포로부터 유도된 유전자 변형된 세포이다. 또한, 이러한 세포는 변형되지 않은 대조 세포와 비교할 때, 내인성 TCR의 세포-표면 발현을 감소시킨다. 본 발명은 또한, 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 유전자 변형된 세포를 투여함으로써 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법을 제공한다.
- [0020] 이에 따라, 일 양태에서, 본 발명은 계놈에 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포로서, 여기서, 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자가 5'에서 3'로, (a) 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자의 5' 영역; (b) 외인성 폴리뉴클레오타이드; 및 (c) 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자의 3' 영역을 포함하는, 유전자 변형된 세포를 제공한다. 유전자 변형된 세포는 인간 T 세포 또는 유전자 변형된 인간 T 세포로부터 유도된 유전자 변형된 세포이다. 또한, 유전자 변형된 세포는 변형되지 않은 대조 세포와 비교할 때 내인성 TCR의 세포-표면 발현을 감소시킨다.
- [0021] 일 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서, 키메라 항원 수용체는 세포의 리간드-결합 도메인 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0022] 하나의 이러한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체는 서열번호 112에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는 세포의 리간드-결합 도메인을 포함하며, 여기서, 세포의 리간드-결합 도메인은 CD19에 결합한다.
- [0023] 다른 이러한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체는 서열번호 113에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는 세포내 세포질 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0024] 다른 이러한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체는 서열번호 114에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는 세포내 보조 자극 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0025] 다른 이러한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체는 신호 펩타이드를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 서열번호 115에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0026] 다른 이러한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체는 힌지 도메인(hinge domain)을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 116에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0027] 다른 이러한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체는 막관통 도메인을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 서열번호 117에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0028] 다른 이러한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체는 서열번호 111에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0029] 다른 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 외인성 폴리뉴클레오타이드의 발현을 유도하는 프로모터 서열을 포함한다. 하나의 이러한 실시형태에서, 프로모터 서열은 서열번호 118에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0030] 다른 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드의 핵산 서열은 서열번호 119에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0031] 다른 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 3을 포함하는 인식 서열 내의 위치에서 TCR 유전자에 삽입된다. 하나의 이러한 실시형태에서, 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자는 서열번호 120에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0032] 다른 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 4를 포함하는 인식 서열 내의 위치에서 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입된다. 하나의 이러한 실시형태에서, 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자는 서열번호 121에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

- [0033] 다른 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 5를 포함하는 인식 서열 내의 위치에서 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입된다. 하나의 이러한 실시형태에서, 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자는 서열번호 122에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 최대 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0034] 다른 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 유전자 변형된 세포, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.
- [0035] 다른 양태에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 유전자 변형된 세포를 제공한다. 본 발명은 약제를 필요로 하는 대상체에서 질병을 치료하기 위한 약제의 제조에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 유전자 변형된 세포의 용도를 추가로 제공한다. 이러한 일 양태에서, 약제는 암의 치료에서 유용하다. 일부 실시형태에서, 암의 치료는 면역요법이다.
- [0036] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 세포에, (i) 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 제1 핵산 서열; 또는 (ii) 조작된 뉴클레아제 단백질을 도입하는 단계로서, 조작된 뉴클레아제가 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 인식 서열에서 절단부위를 생성시키는 단계; (b) 세포에 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 핵산 서열을 도입하는 단계를 포함하는, 변형된 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 이러한 방법에서, 세포는 인간 T 세포이거나 인간 T 세포로부터 유도된다. 추가적으로, 외인성 폴리뉴클레오타이드의 서열은 절단부위에서 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입된다. 또한, 유전자 변형된 세포는 TCR 변형되지 않은 대조 세포와 비교할 때 내인성의 세포-표면 발현을 감소시킨다.
- [0037] 본 방법의 다양한 실시형태에서, 제1 핵산 서열 또는 조작된 뉴클레아제 단백질은 제2 핵산을 도입하기 전, 또는 제2 핵산을 도입한 후에, 세포에 도입될 수 있다.
- [0038] 본 방법의 일 실시형태에서, 제2 핵산 서열은 5'에서 3'로, (a) 절단부위 측면의 5' 업스트림 서열에 대해 상동인 5' 상동성 암(homology arm); (b) 외인성 폴리뉴클레오타이드; 및 (c) 절단부위 측면의 3' 다운스트림 서열에 대해 상동인 3' 상동성 암을 포함한다. 이러한 일 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드의 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에서 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입된다.
- [0039] 본 방법의 다른 실시형태에서, 제2 핵산은 절단부위에 대한 실질적인 상동성이 결여되어 있으며, 외인성 폴리뉴클레오타이드의 서열은 비-상동 말단-연결(non-homologous end-joining)에 의해 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입된다.
- [0040] 본 방법의 다른 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0041] 본 방법의 다른 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 외인성 폴리뉴클레오타이드의 발현을 유도하는 제1 프로모터 서열을 포함한다.
- [0042] 본 방법의 다른 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 제1 핵산은 mRNA를 사용하여 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 본 명세서에 기술된 적어도 하나의 조작된 뉴클레아제를 위한 암호화 서열 및 적어도 하나의 추가적인 단백질(예를 들어, 제2 뉴클레아제)를 위한 암호화 서열을 포함하는 다시스트론성(polycistronic) mRNA일 수 있다. 특정 실시형태에서, 다시스트론성 mRNA는 동일한 유전자(예를 들어, T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자) 내에 상이한 인식 서열을 표적화하는 본 명세서에 기술된 둘 이상의 조작된 뉴클레아제를 암호화할 수 있다. 다른 실시형태에서, 다시스트론성 mRNA는 본 명세서에 기술된 조작된 뉴클레아제, 및 동일한 유전자(예를 들어, T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자) 내에 상이한 인식 서열을 인식하고 절단하거나, 대안적으로 계놈에서 고려되는 다른 유전자 내에 상이한 인식 서열을 인식하고 절단하는 제2 뉴클레아제를 암호화할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 다시스트론성 mRNA를 사용하여 생성된 유전자 변형된 세포는 다수의 유전자를 동시에 녹아웃시킬 수 있다. 추가적인 실시형태에서, 다시스트론성 mRNA는 본 명세서에 기술된 적어도 하나의 조작된 뉴클레아제, 및 세포에 유익하고/하거나 절단 부위에 고려되는 외인성 서열의 삽입의 효율을 개선시키고/시키거나 질병의 치료에서 유익한 하나의 추가적인 단백질을 암호화할 수 있다.
- [0043] 본 방법의 다른 실시형태에서, 적어도 제2 핵산 서열은 제2 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 세포와 접촉시킴으로써 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열 둘 모두는 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열 둘 모두를 포함하는 단일 바이러스 벡터를 세포와 접촉시킴으로써 도입된다. 대안적으로, 세포는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 바이러스 벡터 및 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 바이러스 벡터와 접촉될 수 있다.

다.

- [0044] 본 방법의 이러한 실시형태에서, 제2 핵산 서열이 바이러스 벡터에 의해 도입되는 경우에, 제2 핵산은 5' 상동성 암의 5' 업스트림에 정위되거나 대안적으로 3' 상동성 암의 3' 다운스트림에 정위된 제2 프로모터 서열을 더 포함할 수 있다. 제2 프로모터가 3' 상동성 암의 3' 다운스트림에 정위된 실시형태에서, 프로모터는 반전될 수 있다.
- [0045] 본 방법의 다른 특정 실시형태에서, 적어도 the 제2 핵산 서열은 제2 핵산 서열을 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 세포와 접촉시킴으로써 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열 둘 모두는 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열 둘 모두를 포함하는 단일 재조합 AAV를 세포와 접촉시킴으로써 도입된다. 대안적으로, 세포는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 재조합 AAV 및 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 재조합 AAV와 접촉될 수 있다.
- [0046] 본 방법의 이러한 실시형태에서, 제2 핵산 서열이 재조합 AAV 벡터에 의해 도입되는 경우에, 제2 핵산은 5' 상동성 암의 5' 업스트림에 정위되거나 대안적으로 3' 상동성 암의 3' 다운스트림에 정위된 제2 프로모터 서열을 더 포함할 수 있다. 제2 프로모터가 3' 상동성 암의 3' 다운스트림에 정위되는 실시형태에서, 프로모터는 반전될 수 있다.
- [0047] 본 방법의 다른 이러한 실시형태에서, 재조합 AAV 벡터는 자가-상보적 AAV 벡터이다.
- [0048] 본 방법의 다른 이러한 실시형태에서, 재조합 AAV 벡터는 임의의 혈청형을 가질 수 있다. 본 방법의 특정 실시형태에서, 재조합 AAV 벡터는 AAV2의 혈청형을 갖는다. 본 방법의 다른 특정 실시형태에서, 재조합 AAV 벡터는 AAV6의 혈청형을 갖는다.
- [0049] 본 방법의 다른 실시형태에서, 적어도 제2 핵산 서열은 단일 가닥 DNA 주형을 사용하여 세포에 도입된다.
- [0050] 본 방법의 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 제1 핵산 서열은 mRNA에 의해 세포에 도입되며, 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 핵산 서열은 바이러스 벡터, 바람직하게는, 재조합 AAV 벡터를 사용하여 세포에 도입되며, 여기서, 세포는 인간 T 세포이며, 고려되는 서열은 키메라 항원 수용체를 암호화한다. 이러한 실시형태에서, 본 방법은 키메라 항원 수용체를 포함하는 유전자 변형된 T 세포를 생성시키고, 대조 세포와 비교할 때 내인성 T 세포 수용체의 세포-표면 발현을 감소시킨다.
- [0051] 본 방법의 다른 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제는 재조합 메가뉴클레아제, 재조합 아연-핑거 뉴클레아제(ZFN), 재조합 전사 활성제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), CRISPR/Cas 뉴클레아제, 또는 megaTAL 뉴클레아제이다. 본 방법의 특정 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제는 재조합 메가뉴클레아제이다.
- [0052] 본 방법의 이러한 실시형태에서, 재조합 메가뉴클레아제는 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역(서열번호 1)의 93 내지 208번 잔기 내에서 인식 서열을 인식하고 절단한다. 이러한 재조합 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하며, 여기서, 제1 서브유닛은 인식 서열의 제1 인식 절반-부위에 결합하고, 제1 초가변(HVR1) 영역을 포함하며, 제2 서브유닛은 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고, 제2 초가변(HVR2) 영역을 포함한다.
- [0053] 본 방법의 이러한 일 실시형태에서, 인식 서열은 서열번호 3(즉, TRC 1-2 인식 서열)을 포함한다.
- [0054] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 198 내지 344번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 7 내지 153번 잔기에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 제2 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 7 내지 153번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 198 내지 344번 잔기에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0055] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR1 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 215번 위치; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 24번 위치에 해당하는 위치에서 Y를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR1 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 233번 위치; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 42번 위치에 해당하는 위치에서 G를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR1 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 각각 215번 및 233번 위치; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 각각의 24번 및 42번 위치에 해당하는 위치에서 Y 및 G 중 하나 이상을 포함한다.

- [0056] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 26번 위치; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 217번 위치에 해당하는 위치에서 T를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 28번 위치; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 219번 위치에 해당하는 위치에서 F 또는 Y를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 38번 위치; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 229번 위치에 해당하는 위치에서 F를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 44번 위치; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 235번 위치에 해당하는 위치에서 S를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 46번 위치; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 237번 위치에 해당하는 위치에서 F 또는 Y를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 26, 28, 38, 44 및 46번 위치 각각; 또는 (b) 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 217, 219, 229, 235 및 237번 위치 각각에 해당하는 위치에서 T, F 또는 Y, F, S, 및 F 또는 Y, 및 R 중 하나 이상을 포함한다.
- [0057] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR1 영역은 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 215 내지 270번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 24 내지 79번 잔기를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 서열번호 8 내지 18 중 어느 하나의 24 내지 79번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 215 내지 270번 잔기를 포함한다.
- [0058] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛은 8 내지 18 중 어느 하나의 198 내지 344번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 7 내지 153번 잔기를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, 제2 메가뉴클레아제 서브유닛은 8 내지 18 중 어느 하나의 7 내지 153번 잔기 또는 서열번호 19 내지 27 중 어느 하나의 198 내지 344번 잔기를 포함한다.
- [0059] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 재조합 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서, 링커는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 공유 결합시킨다.
- [0060] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 재조합 메가뉴클레아제는 서열번호 8 내지 27 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0061] 본 방법의 추가 실시형태에서, 인식 서열은 서열번호 4(즉, TRC 3-4 인식 서열)를 포함한다.
- [0062] 본 방법의 이러한 일 실시형태에서, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 28 또는 29의 7 내지 153번 잔기에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 제2 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 28 또는 29의 198 내지 344번 잔기에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0063] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR1 영역은 서열번호 28 또는 29의 24번 위치에 해당하는 위치에서 Y를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR1 영역은 서열번호 30 또는 31의 26번 위치에 해당하는 위치에서 T를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR1 영역은 서열번호 28 또는 29의 46번 위치에 해당하는 위치에서 Y를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR1 영역은 서열번호 28 또는 29의 24번 위치, 26, 및 46 각각에 해당하는 위치에서 Y, T 및 Y 중 하나 이상을 포함한다.
- [0064] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR2 영역은 서열번호 28 또는 29의 215번 위치에 해당하는 위치에서 H를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 서열번호 28 또는 29의 266번 위치에 해당하는 위치에서 T를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 서열번호 28 또는 29의 268번 위치에 해당하는 위치에서 C를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 서열번호 28 또는 29의 215, 266 및 268번 위치에 해당하는 위치에서 H, T 및 C 중 하나 이상을 포함한다.
- [0065] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR1 영역은 서열번호 28 또는 29의 24 내지 79번 잔기를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 서열번호 28 또는 29의 215 내지 270번 잔기를 포함한다.
- [0066] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 28 또는 29의 7 내지 153번 잔기를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, 제2 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 28 또는 29의 198 내지 344번 잔기를 포함한다.
- [0067] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 재조합 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서, 링커는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 공유 결합시킨다.

- [0068] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 재조합 메가뉴클레아제는 서열번호 28 또는 29의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0069] 본 방법의 추가 실시형태에서, 인식 서열은 서열번호 5(즉, TRC 7-8 인식 서열)를 포함한다.
- [0070] 본 방법의 이러한 일 실시형태에서, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 30의 7 내지 153번 잔기 또는 서열번호 31 또는 32의 198 내지 344번 잔기에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 제2 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 30의 198 내지 344번 잔기 또는 서열번호 31 또는 32의 7 내지 153번 잔기에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0071] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR1 영역은 (a) 서열번호 30의 24번 위치; 또는 (b) 서열번호 31 또는 32의 215번 위치에 해당하는 위치에서 Y를 포함한다.
- [0072] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 30의 215번 위치; 또는 (b) 서열번호 31 또는 32의 24번 위치에 해당하는 위치에서 Y 또는 W를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 30의 231번 위치; 또는 (b) 서열번호 31 또는 32의 40번 위치에 해당하는 위치에서 M, L, 또는 W를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 30의 237번 위치; 또는 (b) 서열번호 31 또는 32의 46번 위치에 해당하는 위치에서 Y를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 (a) 서열번호 30의 215, 231 및 237번 위치 각각; 또는 (b) 서열번호 31 또는 32의 24, 40 및 46번 위치 각각에 해당하는 위치에서 Y 또는 W, M, L, 또는 W, 및 Y 중 하나 이상을 포함한다.
- [0073] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, HVR1 영역은 서열번호 30의 24 내지 79번 잔기, 또는 서열번호 31 또는 32의 215 내지 270번 잔기를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, HVR2 영역은 서열번호 30의 215 내지 270번 잔기, 또는 서열번호 31 또는 32의 24 내지 79번 잔기를 포함한다.
- [0074] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 30의 7 내지 153번 잔기, 또는 서열번호 31 또는 32의 198 내지 344번 잔기를 포함한다. 다른 이러한 실시형태에서, 제2 메가뉴클레아제 서브유닛은 서열번호 30의 198 내지 344번 잔기, 또는 서열번호 31 또는 32의 7 내지 153번 잔기를 포함한다.
- [0075] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 재조합 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서, 링커는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 공유 결합시킨다.
- [0076] 본 방법의 이러한 다른 실시형태에서, 재조합 메가뉴클레아제는 서열번호 30 내지 32 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0077] 다른 양태에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 면역요법의 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 대상체에 본 명세서에 기술된 바와 같은 유전자 변형된 세포, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 대상체에 본 명세서에 기술된 방법에 따라 생성된 유전자 변형된 세포, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0078] 본 방법의 다른 실시형태에서, 치료될 암은 B-세포 기원의 암, 유방암, 위암, 신경모세포종, 골육종, 폐암, 흑색종, 전립선암, 결장암, 신세포 암종, 난소암, 횡문근 육종, 백혈병, 및 호지킨 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0079] 본 방법의 다른 실시형태에서, B-세포 기원의 암은 B-계통 급성 림프구성 백혈병, B-세포 만성 림프성 백혈병, 및 B-세포 비-호지킨 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0080] 일부 실시형태에서, CAR은 세포외 항원-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포외 리간드-결합 도메인 또는 모이어티는 단클론성 항체로부터 유도된 단쇄 가변 분절(scFv) 형태일 수 있으며, 이는 특정 에피토프 또는 항원(예를 들어, 세포, 예를 들어, 암 세포 또는 다른 질병-유발 세포 또는 입자의 표면 상에 우선적으로 존재하는 에피토프 또는 항원)에 대한 특이성을 제공한다. scFv는 링커 서열을 통해 부착될 수 있다. 세포외 리간드-결합 도메인은 고려되는 임의의 항원 또는 에피토프에 대해 특이적일 수 있다. 일부 실시형태에서, scFv는 인간화될 수 있다. 키메라 항원 수용체의 세포외 도메인은 또한 자가항원을 포함할 수 있으며[Payne *et al.* (2016), *Science* 353(6295): 179-184 참조], 이는 B 림프구 상의 자가항원-특이적 B 세포 수용체에 의해 인식될 수 있고, 이에 따라, 항체-매개 자가면역 질병에서 자가반응성 B 림프구를 특이적으로 표적화하고 사멸시키기 위해 T 세포를 유도할 수 있다. 이러한 CAR은 키메라 자가항원 수용체(CAAR)로서 지칭될 수 있으며, 이의 사

용은 본 발명에 의해 포함된다.

[0081]

본 발명의 상기 및 다른 양태 및 실시형태는 하기 상세한 설명 및 청구범위를 참조로 함으로써 더욱 충분히 이해될 수 있다. 명확하게 하기 위해 별개의 실시형태의 문맥에 기술되는 본 발명의 특정 특징은 또한, 단일 실시형태에서 조합하여 제공될 수 있다. 실시형태들의 모든 조합은 본 발명에 의해 상세하게 포함되고, 각각 및 모든 조합이 개별적으로 및 명시적으로 개시된 것처럼 본 명세서에 개시된다. 반대로, 간략화를 위해, 단일 실시형태의 문맥에 기술된 본 발명의 다양한 특징은 또한, 별도로 또는 임의의 적합한 하위-조합으로 제공될 수 있다. 실시형태에 나열된 특징들의 모든 하위-조합은 또한 본 발명에 의해 상세하게 포함되고, 각각 및 모든 이러한 하위-조합이 본 명세서에 개별적으로 및 명시적으로 개시된 것처럼 본 명세서에 개시된다. 본 명세서에 개시된 본 발명의 각 양태의 실시형태는 본 발명의 각 다른 양태를 필요한 부분만 약간 수정하여 적용한다.

도면의 간단한 설명

[0082]

도 1은 인간 TRC 알파 불변 영역 유전자에서의 TRC 인식 서열을 도시한 것이다. A) 본 발명의 재조합 메가뉴클레아제에 의해 표적화된 각 인식 서열은 두 개의 인식 절반-부위를 포함한다. 각 인식 절반-부위는 4개 염기쌍 중심 서열에 의해 분리된 9개의 염기쌍을 포함한다. TRC 1-2 인식 서열(서열번호 3)은 인간 T 세포 알파 불변 영역(서열번호 1)의 뉴클레오타이드 187 내지 208을 포괄하고, TRC1 및 TRC2로서 지칭되는 두 개의 인식 절반-부위를 포함한다. TRC 3-4 인식 서열(서열번호 4)은 인간 T 세포 알파 불변 영역(서열번호 1)의 뉴클레오타이드 93-114를 포괄하고, TRC3 및 TRC4로서 지칭되는 두 개의 인식 절반-부위를 포함한다. TRC 7-8 인식 서열(서열번호 5)은 인간 T 세포 알파 불변 영역(서열번호 1)의 뉴클레오타이드 118 내지 139를 포괄하고, TRC7 및 TRC8로서 지칭되는 두 개의 인식 절반-부위를 포함한다. B) 본 발명의 재조합 메가뉴클레아제는 두 개의 서브유닛을 포함하며, 여기서, HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛은 제1 인식 절반-부위(예를 들어, TRC1, TRC3, 또는 TRC7)에 결합하며, HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛은 제2 인식 절반-부위(예를 들어, TRC2, TRC4, 또는 TRC8)에 결합한다. 재조합 메가뉴클레아제가 단쇄 메가뉴클레아제인 실시형태에서, HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛은 N-말단 또는 C-말단 서브유닛 중 어느 하나로서 정위될 수 있다. 마찬가지로, HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛은 N-말단 또는 C-말단 서브유닛 중 어느 하나로서 정위될 수 있다.

도 2a 및 도 2b는 TRC1-결합 서브유닛의 아미노산 정렬을 도시한 것이다. A-B) 본 발명에 의해 포함되는 일부 재조합 메가뉴클레아제는 서열번호 3의 9개의 염기쌍 TRC1 인식 절반-부위를 결합하는 하나의 서브유닛을 포함한다. 서열번호 8 내지 27에 기술된 재조합 메가뉴클레아제의 TRC1-결합 서브유닛(서열번호 33 내지 52)에 대한 아미노산 서열 정렬이 제공된다. 도시된 바와 같이, 서열번호 8 내지 18의 TRC1-결합 서브유닛은 198 내지 344번 잔기를 포함하며, 서열번호 19 내지 27의 TRC1-결합 서브유닛은 7 내지 153번 잔기를 포함한다. 각 TRC1-결합 서브유닛은 명시된 바와 같이 56개의 아미노산 추가변 영역을 포함한다. 추가변 영역 내의 가변 잔기는 음영으로 표시되며, 각 위치에서의 가장 흔한 아미노산은 추가로 강조 표시되며, 가장 관련된 잔기는 진하게 표시되며, 두 번째가 관련된 것은 진하게 그리고 이탤릭체로 표시된다. 추가변 영역 외측의 잔기는 각 서브유닛에서 동일하며, 80번 위치 또는 271번 위치에서 Q 또는 E 잔기는 제외된다[미국 특허 제8,021,867호 참조]. 도 2에 제공된 모든 TRC1-결합 서브유닛은 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제(서열번호 33)의 TRC1-결합 서브유닛(198 내지 344번 잔기)에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유한다. 나타난 잔기 번호는 서열번호 8 내지 27의 번호이다.

도 3a 및 도 3b는 TRC2-결합 서브유닛의 아미노산 정렬을 도시한 것이다. a-b) 본 발명에 의해 포함되는 일부 재조합 메가뉴클레아제는 서열번호 3의 9 염기쌍 TRC2 인식 절반-부위를 결합하는 하나의 서브유닛을 포함한다. 서열번호 8 내지 27에 기술된 재조합 메가뉴클레아제의 TRC2-결합 서브유닛(서열번호 58 내지 77)에 대한 아미노산 서열 정렬이 제공된다. 도시된 바와 같이, 서열번호 8 내지 18의 TRC2-결합 서브유닛은 7 내지 153번 잔기를 포함하며, 서열번호 19 내지 27의 TRC2-결합 서브유닛은 198 내지 344번 잔기를 포함한다. 각 TRC2-결합 서브유닛은 명시된 바와 같이 56개의 아미노산 추가변 영역을 포함한다. 추가변 영역 내의 가변 잔기는 음영으로 표시되며, 각 위치에서의 가장 흔한 아미노산은 추가로 강조 표시되며, 가장 관련된 잔기는 진하게 표시되며, 두 번째로 관련된 잔기는 진하고 이탤릭체로 표시된다. 추가변 영역 외측의 잔기는 각 서브유닛에서 동일하며, 80번 위치 또는 271번 위치에서 Q 또는 E 잔기[미국 특허 제8,021,867호 참조], 메가뉴클레아제 TRC 1-2x.87 EE, TRC 1-2x.87 QE, TRC 1-2x.87 EQ, TRC 1-2x.87, 및 TRC 1-2x.163의 330번 위치에서의 R 잔기(회색 음영 및 밑줄로 표시됨)는 제외된다. 도 3에 제공된 모든 TRC2-결합 서브유닛은 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제(서열번호 58)의 TRC2-결합 서브유닛(7 내지 153번 잔기)에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유한다. 도시된 잔기 숫자는 서열번호 8 내지 27의 것이다.

도 4는 TRC3-결합 서브유닛의 아미노산 정렬을 도시한 것이다. 본 발명에 의해 포함되는 일부 제조합 메가뉴클레아제는 서열번호 4의 9 염기쌍 TRC3 인식 절반-부위를 결합하는 하나의 서브유닛을 포함한다. 서열번호 28 및 29에 기술된 제조합 메가뉴클레아제의 TRC3-결합 서브유닛(서열번호 53 및 54)에 대한 아미노산 서열 정렬이 제공된다. 도시된 바와 같이, 서열번호 28 및 29의 TRC3-결합 서브유닛은 7 내지 153번 잔기를 포함한다. 각 TRC3-결합 서브유닛은 명시된 바와 같이 56개의 아미노산 추가변 영역을 포함한다. 추가변 영역 내의 가변 잔기는 음영으로 표시된다. 추가변 영역 외측의 잔기는 각 서브유닛에서 동일하며, 80번 위치에서 Q 또는 E 잔기는 제외된다[미국 특허 제8,021,867호 참조]. TRC 3-4x.3 및 TRC 3-4x.19 메가뉴클레아제의 TRC3-결합 서브유닛은 97%의 서열 동일성을 공유한다. 도시된 잔기 숫자는 서열번호 28 및 29의 것이다.

도 5는 TRC4-결합 서브유닛의 아미노산 정렬을 도시한 것이다. 본 발명에 의해 포함된 일부 제조합 메가뉴클레아제는 서열번호 4의 9개의 염기쌍 TRC4 인식 절반-부위를 결합하는 하나의 서브유닛을 포함한다. 서열번호 28 및 29에 기술된 제조합 메가뉴클레아제의 TRC4-결합 서브유닛(서열번호 78 및 79)에 대한 아미노산 서열 정렬이 제공된다. 도시된 바와 같이, 서열번호 28 및 29의 TRC4-결합 서브유닛은 198 내지 344번 잔기를 포함한다. 각 TRC4-결합 서브유닛은 명시된 바와 같이 56개의 아미노산 추가변 영역을 포함한다. 추가변 영역 내의 가변 잔기는 음영으로 표시된다. 추가변 영역 외측의 잔기는 각 서브유닛에서 동일하며, 80번 위치에서 Q 또는 E 잔기는 제외된다[미국 특허 제8,021,867호 참조]. TRC 3-4x.3 및 TRC 3-4x.19 메가뉴클레아제의 TRC4-결합 서브유닛은 97%의 서열 동일성을 공유한다. 도시된 잔기 숫자는 서열번호 28 및 29의 것이다.

도 6a 내지 도 6b는 TRC7-결합 서브유닛의 아미노산 정렬을 도시한 것이다. A-B) 본 발명에 의해 포함된 일부 제조합 메가뉴클레아제는 서열번호 5의 9개의 염기쌍 TRC7 인식 절반-부위를 결합하는 하나의 서브유닛을 포함한다. 서열번호 30 내지 32에 기술된 제조합 메가뉴클레아제의 TRC7-결합 서브유닛(서열번호 55 내지 57)에 대한 아미노산 서열 정렬이 제공된다. 도시된 바와 같이, 서열번호 30의 TRC7-결합 서브유닛은 7 내지 153번 잔기를 포함하며, 서열번호 31 및 32의 TRC7-결합 서브유닛은 198 내지 344번 잔기를 포함한다. 각 TRC7-결합 서브유닛은 명시된 바와 같이 56개의 아미노산 추가변 영역을 포함한다. 추가변 영역 내의 가변 잔기는 음영으로 표시되며, 각 위치에서 가장 흔한 아미노산은 추가로 강조 표시되며, 가장 관련된 잔기는 진하게 표시되며, 두 번째 가장 관련된 것은 진하게 그리고 이탤릭체로 표시된다. 추가변 영역 외측의 잔기는 각 서브유닛에서 동일하며, 80번 위치 또는 271번 위치에서 Q 또는 E 잔기는 제외된다[미국 특허 제8,021,867호 참조]. 도 6에 제공된 모든 TRC7-결합 서브유닛은 TRC 7-8x.7 메가뉴클레아제(서열번호 55)의 TRC7-결합 서브유닛(7 내지 153번 잔기)에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유한다. 도시된 잔기 숫자는 서열번호 30 내지 32의 것이다.

도 7a 및 도 7b는 TRC8-결합 서브유닛의 아미노산 정렬을 도시한 것이다. A-B) 본 발명에 의해 포함된 일부 제조합 메가뉴클레아제는 서열번호 5의 9개의 염기쌍 TRC8 인식 절반-부위를 결합시키는 하나의 서브유닛을 포함한다. 서열번호 30 내지 32에 기술된 제조합 메가뉴클레아제의 TRC8-결합 서브유닛(서열번호 80 내지 82)에 대한 아미노산 서열 정렬이 제공된다. 도시된 바와 같이, 서열번호 30의 TRC8-결합 서브유닛은 198 내지 344번 잔기를 포함하며, 서열번호 31 및 32의 TRC8-결합 서브유닛은 7 내지 153번 잔기를 포함한다. 각 TRC8-결합 서브유닛은 명시된 바와 같이 56개의 아미노산 추가변 영역을 포함한다. 추가변 영역 내의 가변 잔기는 음영으로 표시되며, 각 위치에서 가장 흔한 아미노산은 추가로 강조 표시되며, 가장 관련된 잔기는 진하게 표시되며, 두 번째 가장 관련된 것은 진하게 그리고 이탤릭체로 표시된다. 추가변 영역 외측의 잔기는 각 서브유닛에서 동일하며, 80번 위치 또는 271번 위치에서 Q 또는 E 잔기는 제외된다[미국 특허 제8,021,867호 참조]. 도 7에 제공된 모든 TRC8-결합 서브유닛은 TRC 7-8x.7 메가뉴클레아제(서열번호 80)의 TRC8-결합 서브유닛(198 내지 344번 잔기)에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유한다. 도시된 잔기 숫자는 서열번호 30 내지 32의 것이다.

도 8은 T 세포 수용체 알파 불변 영역(서열번호 1)에서 발견된 인식 서열을 표적화하는 제조합 메가뉴클레아제를 평가하기 위한 CHO 세포에서의 리포터 검정의 개략도를 도시한 것이다. 본 명세서에 기술된 제조합 메가뉴클레아제에 대하여, CHO 세포주가 생성되었으며, 여기서, 리포터 카세트는 세포의 게놈에 안정적으로 통합되었다. 리포터 카세트는 5'에서 3' 순서로, SV40 초기 프로모터; GFP 유전자의 5' 2/3; 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열(예를 들어, TRC 1-2 인식 서열, TRC 3-4 인식 서열, 또는 TRC 7-8 인식 서열); CHO-23/24 메가뉴클레아제(WO/2012/167192)에 대한 인식 서열; GFP 유전자의 3' 2/3을 포함하였다. 이러한 카세트로 안정적으로 트랜스펙션된 세포는 DNA 손상-유도제의 부재 하에서 GFP를 발현시키지 못한다. 메가뉴클레아제는 각 메가뉴클레아제를 암호화하는 플라스미드 DNA 또는 mRNA의 형질도입에 의해 도입되었다. DNA 손상이 메가뉴클레아제 인식 서열들 중 어느 하나에서 유도되었을 때, GFP 유전자의 중복 영역은 기능성 GFP 유전자를 생성시키기 위해 서로 제조합되었다. GFP-발현 세포의 백분율은 이후에, 메가뉴클레아제에 의한 게놈 절단의 횟수의 간접적 수단으로서 유세포 분석법에 의해 결정될 수 있다.

도 9는 CHO 세포 리포터 검정에서 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역(서열번호 1)에서의 인식 서열을 인식하고 절단하기 위한 재조합 메가뉴클레아제의 효율을 도시한 것이다. 서열번호 8 내지 32에 기술된 재조합 메가뉴클레아제 각각은 TRC 1-2 인식 서열(서열번호 3), TRC 3-4 인식 서열(서열번호 4), 또는 TRC 7-8 인식 서열(서열번호 5)을 표적화하기 위해 조작되었고, CHO 세포 리포터 검정에서 효능에 대해 스크리닝되었다. 나타난 결과는 각 검정에서 관찰된 GFP-발현 세포의 백분율을 제공하며, 이는 TRC 표적 인식 서열 또는 CHO-23/24 인식 서열을 절단하기 위한 각 메가뉴클레아제의 효능을 지시한다. 음성 대조군(RHO 1-2 bs)은 각 검정에서 더 포함되었다. A) 내지 C) TRC 1-2 인식 서열을 표적화하는 메가뉴클레아제. D) TRC 3-4 인식 서열을 표적화하는 메가뉴클레아제. E) 내지 F) TRC 7-8 인식 서열을 표적화하는 메가뉴클레아제. G) TRC 1-2x.87 메가뉴클레아제의 변종, 여기서, 271번 위치에서 Q는 E(TRC 1-2x.87 QE)로 치환되거나, 80번 위치에서 Q는 E(TRC 1-2x.87 EQ)로 치환되거나, 80번 위치에서 Q 및 271번 위치에서 Q 둘 모두는 E(TRC 1-2x.87 EE)로 치환된다.

도 10은 CHO 세포 리포터 검정에서 재조합 메가뉴클레아제 효능의 시간 코스를 도시한 것이다. TRC 1-2x.87 QE, TRC 1-2x.87 EQ, 및 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제는 CHO 리포터 검정에서 평가되었으며, GFP-발현 세포의 백분율은 CHO 리포터 세포에 메가뉴클레아제-암호화 mRNA의 도입 후 1, 4, 6, 8, 및 12일째에 결정되었다.

도 11은 TRC 1-2 메가뉴클레아제로 트랜스펙션 후 주르카트 세포 계놈 DNA의 분석을 도시한 것이다. TRC 1-2 메가뉴클레아제를 암호화하는 mRNA로 트랜스펙션 후 72시간에, 계놈 DNA가 수확되었으며, T7 엔도뉴클레아제 검정은 내인성 TRC 1-2 인식 서열에서 유전자 변형을 추정하기 위해 수행되었다.

도 12는 내인성 TRC 1-2 인식 서열에서 유전자 변형에 대한 주르카트 세포에서의 TRC 1-2 메가뉴클레아제 발현의 용량-반응을 도시한 것이다. 주르카트 세포는 3 μ g 또는 1 μ g의 제공된 TRC 1-2 메가뉴클레아제 mRNA로 트랜스펙션되었다. 96시간에, 계놈 DNA는 T7 엔도뉴클레아제 검정을 이용하여 분석되었다.

도 13은 인간 T 세포에서 TRC 1-2 인식 서열의 절단을 도시한 것이다. A) CD3+ T 세포는 3일 동안 항-CD3 및 항-CD28 항체로 자극화되고, 이후에, TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제를 암호화하는 mRNA로 전기천공되었다. 계놈 DNA는 트랜스펙션 후 3일 및 7일째에 수확되고, T7 엔도뉴클레아제 검정을 이용하여 분석되었다. B) 내인성 TRC 1-2 인식 서열에서의 돌연변이가 T 세포 수용체의 표면 발현을 제거하기에 충분한 지의 여부를 결정하기 위해, 세포는 항-CD3 항체를 사용하여 유세포 분석법에 의해 분석되었다. 대조 세포(물로 트랜스펙션됨) 및 TRC 1-2x.87 EE-트랜스펙션된 세포는 트랜스펙션 후 3일 및 7일째에 분석되었으며, CD3-양성 세포 및 CD3-음성 T 세포의 백분율이 결정되었다.

도 14는 TRC 1-2 메가뉴클레아제의 발현 후 인간 T 세포에서의 TRC 1-2 인식 서열에서 관찰된 대표적인 결실의 핵산 서열을 도시한 것이다.

도 15는 재조합 AAV 벡터의 서열 엘리먼트, 및 내인성 TCR 알파 불변 영역 유전자에 외인성 핵산 서열을 삽입하기 위한 조작된 뉴클레아제와 조합한 이의 사용을 예시한 다이어그램이다.

도 16은 AAV405 벡터를 생산하기 위해 사용되는 플라스미드의 지도(map)이다.

도 17은 AAV406 벡터를 생산하기 위해 사용되는 플라스미드의 지도이다.

도 18은 AAV 형질도입 효율을 향상시키기 위한 메가뉴클레아제 mRNA 트랜스펙션 및 재조합 AAV 형질도입의 시점(timing)의 결정을 도시한 것이다. 인간 CD3+ T 세포는 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고, 트랜스펙션 후 2, 4, 또는 8시간에, 세포는 GFP를 암호화하는 재조합 AAV 벡터(GFP-AAV)로 형질도입되었다. T 세포는 형질도입 효율을 결정하기 위해 형질도입 후 72시간에 GFP 발현에 대한 유세포 분석법에 의해 분석되었다.

도 19는 재조합 AAV 벡터를 사용하여 외인성 핵산 서열의 삽입을 위한 인간 T 세포를 분석하는 것이다. CD3+ T 세포는 TRC 1-2x.87 EE mRNA로 트랜스펙션되고, 후속하여, (트랜스펙션 후 2시간째에) AAV405 또는 AAV406으로 형질도입되었다. 단지 형질도입 대조군은 (물로) 모의 트랜스펙션되고, AAV405 또는 AAV406 중 어느 하나로 형질도입되었다. 단지-메가뉴클레아제 대조군은 TRC 1-2x.87 EE로 트랜스펙션되었고, 이후에, 트랜스펙션 후 2시간째에 (물과 함께) 모의 형질도입되었다. 계놈 DNA는 T 세포로부터 수확되었으며, TRC 1-2 유전자 좌는 AAV 벡터에서 상동성의 영역을 넘는 서열을 인식한 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭되었다. 상동성 영역 외측의 PCR 프라이머는 단지 AAV 벡터가 아닌, T 세포 계놈의 증폭을 허용하였다. PCR 생성물은 정제되고 EagI로 소화되었다. PCR 생성물은 이후에, 절단에 대해 분석되었다.

도 20은 AAV405를 사용한 인간 T 세포의 TRC 1-2 인식 서열에 EagI 삽입의 특징분석을 도시한 것이다. A) 이전

실험으로부터 생성된 소화되지 않은 PCR 생성물은 pCR-블런트 벡터에 클로닝되었다. 콜로니 PCR은 M13 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 사용하여 수행되었으며, TRC 1-2x.87 EE 및 AAV405로 트랜스펙션된 세포로부터의 PCR 생성물의 일부는 겔 전기영동에 의해 분석되었다. 분석은 전장 PCR 생성물(대략 1600 bp), 보다 작은 삽입물, 및 빈 플라스미드(대략 300 bp)의 혼합물을 나타낸다. B) 병행하여, PCR 생성물의 다른 부분은 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 EagI 인식 부위를 함유하는 클론의 백분율을 결정하기 위해 EagI로 소화되었다. 생성된 EagI로 절단된 PCR 생성물은 대략 700 및 800 bp의 분절을 예상하였다.

도 21은 AAV406을 사용한 인간 T 세포의 TRC 1-2 인식 서열의 EagI 삽입의 특징분석을 도시한 것이다. A) 이전 실험으로부터 생성된 소화되지 않은 PCR 생성물은 pCR-블런트 벡터에 클로닝되었다. 콜로니 PCR은 M13 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 사용하여 수행되었으며, TRC 1-2x.87 EE 및 AAV406으로 트랜스펙션된 세포로부터의 PCR 생성물의 일부는 겔 전기영동에 의해 분석되었다. 분석은 전장 PCR 생성물(대략 1600 bp), 보다 작은 삽입물, 및 빈 플라스미드(대략 300 bp)의 혼합물을 나타낸다. B) 병행하여, PCR 생성물의 다른 부분은 TRC 1-2 인식 서열에서 삽입된 EagI 인식 부위를 함유하는 클론의 백분율을 결정하기 위해 EagI로 소화되었다. 생성된 EagI로 절단된 PCR 생성물은 대략 700 및 800 bp의 분절을 예상하였다.

도 22. A) TRC 1-2 메가뉴클레아제의 발현 후 인간 T 세포에서의 TRC 1-2 인식 서열에서 관찰된 대표적인 결실 및 삽입의 핵산 서열(즉, 인델). B) EagI 제한 부위를 포함하는 외인성 핵산 서열의 삽입을 확인하는 TRC 1-2 인식 서열의 핵산 서열.

도 23은 재조합 AAV 형질도입 효율의 향상을 도시한 것이다. 형질도입 효율은 메가뉴클레아제 mRNA 트랜스펙션 및 후속 AAV 형질도입의 시점을 최적화함으로써 추가로 분석되었다. 인간 CD3+ T 세포는 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제를 암호화하는 mRNA로 전기전공되었고, 후속하여, 트랜스펙션 직후 또는 트랜스펙션 후 2시간에 GFP-AAV로 형질도입되었다. 추가적으로, 비-자극 휴지 T 세포는 GFP-AAV로 형질도입되었다. 모의 형질도입된 세포가 또한 분석되었다. 형질도입 후 72시간에, 세포는 AAV 형질도입 효율을 결정하기 위해 GFP 발현에 대한 유세포 분석법에 의해 분석되었다.

도 24는 AAV-CAR100(AAV408) 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 지도이다.

도 25는 AAV-CAR763(AAV412) 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 지도이다.

도 26은 인간 T 세포에서의 TRC 1-2 인식 부위에서 키메라 항원 수용체 암호화 서열의 삽입을 도시한 것이다. PCR-기반 검정은 AAV412 HDR 주형이 TRC 1-2 인식 서열에서 이중 가닥 손상을 복원시키기 위해 사용되었는지의 여부를 결정하기 위해 개발되었다.

도 27은 인간 T 세포에서의 TRC 1-2 인식 부위에서 키메라 항원 수용체 암호화 서열의 삽입을 도시한 것이다. PCR-기반 검정은 AAV408 HDR 주형이 TRC 1-2 인식 서열에서 이중 가닥 손상을 복원하기 위해 사용되었는지의 여부를 결정하기 위해 개발되었다. A) CAR 유전자가 그러한 유전자 좌에 삽입된 경우에 단지 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌의 5' 단부 상에서 생성물을 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용하여 생성된 PCR 생성물. B) CAR 유전자가 유전자 좌에 삽입된 경우에 단지 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌의 3' 단부 상에서 생성물을 증폭시키는 프라이머 쌍을 사용하여 생성된 PCR 생성물.

도 28은 디지털 PCR을 도시한 것이다. A) 인간 T 세포에서의 RC 1-2 인식 부위에 키메라 항원 수용체 암호화 서열의 삽입 효율을 정량적으로 결정하기 위해 개발된 디지털 PCR 검정의 개략도. B) TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제 mRNA 및/또는 증가 양의 AAV408로 전기전공된 인간 T 세포로부터 게놈 DNA 상에서의 디지털 PCR의 결과.

도 29는 인간 T 세포 상에서 CD19 키메라 항원 수용체의 세포-표면 발현을 도시한 것이다. 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현 수준은 HDR 주형으로서 AAV408을 사용하여 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 CAR 유전자를 갖는 세포에서 결정되었다. 세포-표면 발현은 유세포 분석법에 의해 분석되었다. a) 모의 전기전공되고 모의 형질도입된 세포(MOI = 0), 및 모의 전기전공되고 증가 양의 AAV408로 형질도입된 세포. b) TRC 1-2x.87EE로 전기전공되고 모의 형질도입된 세포(MOI = 0), 및 TRC 1-2x.87EE로 전기전공되고 증가 양의 AAV408로 형질도입된 세포.

도 30은 AAV421 벡터를 생성하기 위해 사용되는 플라스미드의 지도이다.

도 31은 AAV422 벡터를 생성하기 위해 사용되는 플라스미드의 지도이다.

도 32는 키메라 항원 수용체 암호화 서열의 삽입을 도시한 것이다. PCR 방법은 TRC 1-2 인식 부위에 삽입된 AAV421 또는 AAV422에 의해 도입된 키메라 항원 수용체 암호화 서열이 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제에 의해 절단되는지의 여부를 결정하기 위해 사용되었다. A) AAV421로 형질도입 후 삽입의 분석. B) AAV422와 함께 형질도

입 후 삽입의 분석.

도 33은 인간 T 세포 상의 CD19 키메라 항원 수용체의 세포-표면 발현을 도시킨 것이다. 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현 수준은 HDR 주형으로서 AAV421을 사용하여 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 CAR 유전자를 갖는 세포에서 결정되었다. 세포-표면 발현은 유세포 분석법에 의해 분석되었다. a) 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI = 0), 및 모의 전기천공되고 증가된 양의 AAV421로 형질도입된 세포. b) TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI = 0), 및 TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 증가 양의 AAV421로 형질도입된 세포.

도 34는 세포-표면 키메라 항원 수용체를 발현시키는 인간 T 세포의 증식을 도시킨 것이다. TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제에 대한 mRNA로의 전기천공 및 AAV421로의 형질도입 후 CD3-/CAR+ T 세포 집단을 우선적으로 증식시키고 농축시키기 위한 방법이 결정되었다. a) IL-7(10 ng/mL) 및 IL-15(10 ng/mL)의 보충. b) IL-7(10 ng/mL) 및 IL-15(10 ng/mL)의 보충, 및 미토마이신 C-비활성화 IM-9 세포와 함께 인큐베이션. c) IL-7(10 ng/mL) 및 IL-15(10 ng/mL)의 보충, 및 미토마이신 C-비활성화 IM-9 세포와 함께 2회 인큐베이션.

도 35는 인간 T 세포 상에서 CD19 키메라 항원 수용체의 세포-표면 발현을 도시킨 것이다. 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현 수준은 HDR 주형으로서 AAV422를 사용하여 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 CAR 유전자를 갖는 세포에서 결정되었다. 세포-표면 발현은 유세포 분석법에 의해 분석되었다. a) 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI = 0), 및 모의 전기천공되고 증가 양의 AAV422로 형질도입된 세포. b) TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI = 0), 및 TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 증가 양의 AAV422로 형질도입된 세포.

도 36은 세포-표면 키메라 항원 수용체를 발현시키는 인간 T 세포의 증식을 도시킨 것이다. TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제에 대한 mRNA로의 전기천공 및 AAV422로의 형질도입 후 CD3-/CAR+ T 세포 집단을 우선적으로 증식시키고 농축하기 위한 방법이 결정되었다. A) IL-7(10 ng/mL) 및 IL-15(10 ng/mL)의 보충. B) IL-7(10 ng/mL) 및 IL-15(10 ng/mL)의 보충, 및 미토마이신 C-비활성화 IM-9 세포와 함께 인큐베이션. C) IL-7(10 ng/mL) 및 IL-15(10 ng/mL)의 보충, 및 미토마이신 C-비활성화 IM-9 세포와 함께 2회 인큐베이션.

도 37은 단일 가닥 AAV를 사용한 메가뉴클레아제 Nick-out 효율을 도시킨 것이다. 실험은 단일 가닥 AAV 벡터로 동시에 형질도입되었을 때 인간 T 세포에서 두 개의 메가뉴클레아제의 Nick-out 효율을 시험하기 위해 수행되었다. a) TRC 1-2x.87EE에 대해 mRNA로 전기천공되고 증가 양의 단일 가닥 AAV412로의 형질도입된 세포. b) 베타-2 마이크로글로불린 유전자를 표적화하는 메가뉴클레아제에 대한 mRNA로 전기천공되고 증가 양의 단일 가닥 AAV412로 형질도입된 세포. c) TRC 1-2x.87EE에 대해 mRNA로 전기천공되고 증가 양의 단일 가닥 AAV422로 형질도입된 세포.

도 38은 항-CD19 CAR T 세포의 기능적 활성을 도시킨 것이다. A) IFN-감마 ELISPOT 검정, 여기서, CD19+ Raji 세포 또는 CD19- U937 세포 중 어느 하나는 표적 집단임. B) 세포 사멸 검정, 여기서, 루시페라제-표지화된 CD19+ Raji 세포가 표적임.

도 39는 선형화된 DNA 공여자 주형으로 형질도입 후 키메라 항원 수용체의 발현을 도시킨 것이다. 이러한 실험은 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌에 대해 상동성인 상동성 암에 의해 측면에 있는 항-CD19 CAR 유전자를 함유한 플라스미드를 생성하였다. 상이한 프로모터는 일부 플라스미드에서 사용되었으며, 상동성 암은 "짧은"(5' 상동성 암 상에서 200 bp 및 3' 상동성 암 상에서 180 bp) 또는 "길"(5' 상동성 암 상에서 985 bp 및 3' 상동성 암 상에서 763 bp)다. CAR 공여자 플라스미드는 벡터 골격에서의 제한 부위에서 선형화되고 겔 정제되었다. A) 백그라운드 CD3-/CAR+ 염색. B) 단지 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공된 세포. C) TRC 1-2x.87EE mRNA 및 HTLV 인핸서와 함께 EF1 α 코어 프로모터를 갖는 긴 상동성 암 벡터로의 동시-전기천공된 세포. D) TRC 1-2x.87EE mRNA, 및 EF1 α 코어 프로모터(인핸서 없음)를 갖는 짧은 상동성 암 벡터로 동시-전기천공된 세포. E) TRC 1-2x.87EE mRNA 부재 하에 HTLV 인핸서와 함께 EF1 α 코어 프로모터를 갖는 긴 상동성 암 벡터로 전기천공된 세포. F) TRC 1-2x.87EE mRNA 부재 하에 EF1 α 코어 프로모터(인핸서 없음)를 갖는 짧은 상동성 암 벡터로 전기천공된 세포. G) TRC 1-2x.87EE mRNA뿐만 아니라, CAR 및 CAR 유전자의 5' 단부에서의 인트론의 발현을 유도하는 MND 프로모터를 함유한 긴 상동성 암 작제물로 전기천공된 세포. H) TRC 1-2x.87EE mRNA뿐만 아니라 인트론 없이 CAR의 발현을 유도하는 NMD 프로모터를 함유한 긴 상동성 암 작제물로 전기천공된 세포. I) TRC 1-2x.87EE mRNA뿐만 아니라 인트론 없이 MND 프로모터를 갖는 짧은 상동성 암 플라스미드로 전기천공된 세포. J) TRC 1-2x.87EE mRNA 없이, CAR 및 CAR 유전자의 5' 단부에서의 인트론의 발현을 유도하는 MND 프로모터를 함유한 긴 상동성 암 작제물로 전기천공된 세포. K) TRC 1-2x.87EE mRNA 없이, 인트론이 아닌, CAR의 발현을 유도하는 MND 프로모터를 함유한 긴 상동성 암 작제물로 전기천공된 세포. L) TRC 1-2x.87EE mRNA 없이, 인트론이 아닌 MND 프로모터를 갖는 짧은 상동성 암 플라스미드로 전기천공된 세포. M) TRC 1-2x.87EE mRNA뿐만 아니라 JeT 프로모

터를 함유한 짧은 상동성 암 작제물로 전기천공된 세포. N) TRC 1-2x.87EE mRNA뿐만 아니라 CMV 프로모터를 함유한 긴 상동성 암 작제물로 전기천공된 세포. O) TRC 1-2x.87EE mRNA 없이, JeT 프로모터를 함유한 짧은 상동성 암 작제물로 전기천공된 세포. P) TRC 1-2x.87EE mRNA 없이, CMV 프로모터를 함유한 긴 상동성 암 작제물로 전기천공된 세포.

도 40은 선형화된 DNA 작제물에 의해 전달된 키메라 항원 수용체 코딩 영역이 인간 T 세포에서 TRC 1-2 인식 서열에 삽입되었는지의 여부를 결정하기 위한 PCR 분석을 도시한 것이다.

도 41은 AAV423 백터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 지도이다.

도 42는 인간 T 세포 상에서 CD19 키메라 항원 수용체의 세포-표면 발현을 도시한 것이다. 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현 수준은 HDR 주형으로서 AAV423을 사용하여 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 CAR 유전자를 갖는 세포에서 결정되었다. 세포-표면 발현은 유세포 분석법에 의해 분석되었다. A) 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI = 0), 및 모의 전기천공되고 증가 양의 AAV423으로 형질도입된 세포. B) TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI = 0), 및 TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 증가 양의 AAV423으로 형질도입된 세포.

도 43은 키메라 항원 수용체 암호화 서열의 삽입을 도시한 것이다. PCR 방법은 키메라 항원 수용체 암호화 서열이 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제에 의해 절단된 TRC 1-2 인식 부위에서 삽입된 AAV423에 의해 도입되었는지의 여부를 결정하기 위해 사용되었다.

도 44는 항-CD19 CAR T 세포의 표현형 분석을 도시한 것이다. A) 활성화된 T 세포는 TRC 1-2x.87 EE mRNA로 전기천공되었고, 이후에 JeT 프로모터에 의해 유도되고 상동성 암의 측면에 있는 항-CD19 CAR 발현 카세트를 포함하는 AAV6 백터로 형질도입되었다. IL-2(10 ng/mL)와 함께 5일 배양한 후에, 세포는 유세포 분석법에 의해 세포-표면 CD3 및 항-CD19 CAR 발현에 대해 분석되었다. B) CD3-세포는 항-CD3 자성 비드를 사용하여 CD3+ 세포를 고갈시킴으로써 농축되었다. 고갈된 세포는 이후에, IL-15(10 ng/mL) 및 IL-21(10 ng/mL)에서 3일 동안 배양되고, CD3 및 항-CD19 CAR의 세포-표면 발현에 대해 재-분석되었다. C) CD3⁻ CD19-CAR T 세포의 정제된 집단은 CD4⁺ 및 CD8⁺인 세포의 백분율을 결정하기 위해 유세포 분석법에 의해 분석되었다. D) CD3⁻ CD19-CAR T 세포의 정제된 집단은 이러한 것이 CD62L 및 CD45RO에 대한 염색에 의해 중추 기억 T 세포, 전이 기억 T 세포, 또는 효과기 기억 T 세포인 지의 여부를 결정하기 위해 유세포 분석법에 의해 추가로 분석되었다.

도 45는 Raji 과중성 림프종 모델을 도시한 것이다. 반딧불이 루시페라제 (ffLuc)⁴⁴를 안정적으로 발현시키는 Raji 세포는 마우스 당 2.0×10^5 세포의 용량으로, 1일째에 5 내지 6주령 암컷 NSG 마우스에 정맥내로 주사되었다. 4일째에 마우스에 PBS 또는 동일한 건강한 공여자 PBMC로부터 제조된 유전자 편집 대조 TCR KO T 세포를 함유한 PBS 또는 동일한 공여자로부터 제조된 명시된 용량의 CAR T 세포를 함유한 PBS가 정맥내로 주사되었다. 명시된 날짜에, 살아있는 마우스에는 루시페린 기질(염수 중 150 mg/kg)가 i.p. 주사되고, 마취되고, 루시페라제 활성화는 IVIS SpectrumCT®(Perkin Elmer, Waltham, MA)를 이용하여 7분 동안 측정되었다. 데이터는 Living Image software 4.5.1(Perkin Elmer, Waltham, MA)을 이용하여 분석되고 내보내었다. 발광 신호 강도는 p/초/cm²/sr 단위의 복사조도(radiance)로 표현된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0083] 서열의 간단한 설명
- [0084] 서열번호 1은 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자(NCBI 유전자 번호: 28755)의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0085] 서열번호 2는 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역에 의해 암호화된 아미노산 서열을 기술한다.
- [0086] 서열번호 3은 TRC 1-2 인식 서열의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0087] 서열번호 4는 TRC 3-4 인식 서열의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0088] 서열번호 5는 TRC 7-8 인식 서열의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0089] 서열번호 6은 I-CreI의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0090] 서열번호 7은 LAGLIDADG 모티프의 아미노산 서열을 기술한다.

- [0091] 서열번호 8은 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0092] 서열번호 9는 TRC 1-2x.87 QE 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0093] 서열번호 10은 TRC 1-2x.87 EQ 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0094] 서열번호 11은 TRC 1-2x.87 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0095] 서열번호 12는 TRC 1-2x.6 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0096] 서열번호 13은 TRC 1-2x.20 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0097] 서열번호 14는 TRC 1-2x.55 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0098] 서열번호 15는 TRC 1-2x.60 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0099] 서열번호 16은 TRC 1-2x.105 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0100] 서열번호 17은 TRC 1-2x.163 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0101] 서열번호 18은 TRC 1-2x.113_3 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0102] 서열번호 19는 TRC 1-2x.5 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0103] 서열번호 20은 TRC 1-2x.8 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0104] 서열번호 21은 TRC 1-2x.25 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0105] 서열번호 22는 TRC 1-2x.72 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0106] 서열번호 23은 TRC 1-2x.80 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0107] 서열번호 24는 TRC 1-2x.84 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0108] 서열번호 25는 TRC 1-2x.120 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0109] 서열번호 26은 TRC 1-2x.113_1 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0110] 서열번호 27은 TRC 1-2x.113_2 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0111] 서열번호 28은 TRC 3-4x.3 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0112] 서열번호 29는 TRC 3-4x.19 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0113] 서열번호 30은 TRC 7-8x.7 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0114] 서열번호 31은 TRC 7-8x.9 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0115] 서열번호 32는 TRC 7-8x.14 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0116] 서열번호 33은 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0117] 서열번호 34는 TRC 1-2x.87 QE 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0118] 서열번호 35는 TRC 1-2x.87 EQ 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0119] 서열번호 36은 TRC 1-2x.87 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0120] 서열번호 37은 TRC 1-2x.6 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0121] 서열번호 38은 TRC 1-2x.20 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0122] 서열번호 39는 TRC 1-2x.55 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0123] 서열번호 40은 TRC 1-2x.60 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0124] 서열번호 41은 TRC 1-2x.105 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0125] 서열번호 42는 TRC 1-2x.163 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0126] 서열번호 43은 TRC 1-2x.113_3 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.

- [0127] 서열번호 44는 TRC 1-2x.5 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0128] 서열번호 45는 TRC 1-2x.8 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0129] 서열번호 46은 TRC 1-2x.25 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0130] 서열번호 47은 TRC 1-2x.72 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0131] 서열번호 48은 TRC 1-2x.80 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0132] 서열번호 49는 RC 1-2x.84 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0133] 서열번호 50은 TRC 1-2x.120 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0134] 서열번호 51은 TRC 1-2x.113_1 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0135] 서열번호 52는 TRC 1-2x.113_2 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0136] 서열번호 53은 TRC 3-4x.3 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0137] 서열번호 54는 TRC 3-4x.19 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0138] 서열번호 55는 TRC 7-8x.7 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0139] 서열번호 56은 TRC 7-8x.9 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0140] 서열번호 57은 TRC 7-8x.14 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0141] 서열번호 58은 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0142] 서열번호 59는 TRC 1-2x.87 QE 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0143] 서열번호 60은 TRC 1-2x.87 EQ 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0144] 서열번호 61은 TRC 1-2x.87 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0145] 서열번호 62는 RC 1-2x.6 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0146] 서열번호 63은 TRC 1-2x.20 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0147] 서열번호 64는 TRC 1-2x.55 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0148] 서열번호 65는 TRC 1-2x.60 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0149] 서열번호 66은 TRC 1-2x.105 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0150] 서열번호 67은 TRC 1-2x.163 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0151] 서열번호 68은 TRC 1-2x.113_3 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0152] 서열번호 69는 TRC 1-2x.5 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0153] 서열번호 70은 TRC 1-2x.8 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0154] 서열번호 71은 TRC 1-2x.25 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0155] 서열번호 72는 TRC 1-2x.72 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0156] 서열번호 73은 TRC 1-2x.80 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0157] 서열번호 74는 TRC 1-2x.84 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0158] 서열번호 75는 TRC 1-2x.120 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0159] 서열번호 76은 TRC 1-2x.113_1 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0160] 서열번호 77은 TRC 1-2x.113_2 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0161] 서열번호 78은 TRC 3-4x.3 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0162] 서열번호 79는 TRC 3-4x.19 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.

- [0163] 서열번호 80은 TRC 7-8x.7 메가뉴클레아제의 198 내지 344번 잔기를 기술한다.
- [0164] 서열번호 81은 TRC 7-8x.9 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0165] 서열번호 82는 TRC 7-8x.14 메가뉴클레아제의 7 내지 153번 잔기를 기술한다.
- [0166] 서열번호 83은 TRC 1-2 인식 서열의 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0167] 서열번호 84는 TRC 3-4 인식 서열의 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0168] 서열번호 85는 TRC 7-8 인식 서열의 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0169] 서열번호 86은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0170] 서열번호 87은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0171] 서열번호 88은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0172] 서열번호 89는 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0173] 서열번호 90은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0174] 서열번호 91은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0175] 서열번호 92는 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0176] 서열번호 93은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0177] 서열번호 94는 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 삽입을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0178] 서열번호 95는 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 삽입을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0179] 서열번호 96은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0180] 서열번호 97은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0181] 서열번호 98은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0182] 서열번호 99는 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0183] 서열번호 100은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0184] 서열번호 101은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0185] 서열번호 102는 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0186] 서열번호 103은 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.

- [0187] 서열번호 104는 절단 및 NHEJ로부터 야기되는 결실을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 162 내지 233을 기술한다.
- [0188] 서열번호 105는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 181 내지 214를 기술한다.
- [0189] 서열번호 106은 상동 재조합을 통해 삽입된 외인성 핵산 서열을 포함하는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 181 내지 214를 기술한다.
- [0190] 서열번호 107은 AAV405 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0191] 서열번호 108은 AAV406 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0192] 서열번호 109는 AAV-CAR100(AAV408) 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0193] 서열번호 110은 AAV-CAR763(AAV412) 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0194] 서열번호 111은 항-CD19 키메라 항원 수용체의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0195] 서열번호 112는 항-CD19 세포외 리간드-결합 도메인의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0196] 서열번호 113은 키메라 항원 수용체 세포내 세포질 신호전달 도메인의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0197] 서열번호 114는 키메라 항원 수용체 세포내 보조 자극 도메인의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0198] 서열번호 115는 키메라 항원 수용체 신호 펩타이드 도메인의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0199] 서열번호 116은 키메라 항원 수용체 힌지 영역의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0200] 서열번호 117은 키메라 항원 수용체 막관통 도메인의 아미노산 서열을 기술한다.
- [0201] 서열번호 118은 EF-1 알파 코어 프로모터의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0202] 서열번호 119는 외인성 폴리뉴클레오타이드 삽입물의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0203] 서열번호 120은 TRC 1-2 인식 서열 내에 삽입된 외인성 핵산 서열을 포함하는 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0204] 서열번호 121는 TRC 3-4 인식 서열 내에 삽입된 외인성 핵산 서열을 포함하는 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0205] 서열번호 122는 TRC 7-8 인식 서열 내에 삽입된 외인성 핵산 서열의 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 기술한다.
- [0206] 서열번호 123은 AAV421 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 핵산 서열을 기술한다.
- [0207] 서열번호 124는 AAV422 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 핵산 서열을 기술한다.
- [0208] 서열번호 125는 AAV423 벡터를 생성시키기 위해 사용되는 플라스미드의 핵산 서열을 기술한다.
- [0209] 본 발명의 상세한 설명
- [0210] 1.1 참조문헌 및 정의
- [0211] 본 명세서에서 언급된 특허 및 과학 문헌은 당업자가 이용 가능한 지식을 확립시킨다. 본 명세서에서 인용된, 발행된 US 특허, 등록된 출원, 공개된 외국 출원, 및 GenBank 데이터베이스 서열을 포함하는 참고문헌은 각각이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 포함되도록 명시되는 것과 동일한 범위로 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0212] 본 발명은 상이한 형태로 구현될 수 있고, 본 명세서에 기술된 실시형태로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다. 오히려, 이러한 실시형태는 본 개시내용이 철저하고 완전할 수 있도록 제공되고, 당업자에게 본 발명의 범위를 충분히 전달할 것이다. 예를 들어, 일 실시형태와 관련하여 예시된 특징은 다른 실시형태에 통합될 수 있으며, 특정 실시형태와 관련하여 예시된 특징은 그러한 실시형태로부터 삭제될 수 있다. 또한, 본 명세서에 제시된 실시형태에 대한 다수의 변형 및 부가는 본 발명으로부터 벗어나지 않는, 본 개시내용에 비추어 당업자에게 명백할 것이다.

- [0213] 달리 규정하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원의 본 발명의 설명에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시형태를 기술할 목적을 위한 것이고, 본 발명을 제한하도록 의도되는 것은 아니다.
- [0214] 본 명세서에서 언급된 모든 공개, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0215] 본 명세서에서 사용되는 단수 용어("a," "an," 또는 "the")는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 예를 들어, 세포(a cell)는 단일 세포 또는 다수의 세포를 의미할 수 있다.
- [0216] 달리 상세하게 명시하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 단어 "또는"은 "및/또는"의 포괄적인 의미로 사용되고, "어느 하나/또는"의 배타적인 의미로 사용되지는 않는다.
- [0217] 본 명세서에서 사용되는 용어 "메가뉴클레아제"는 12개 초과인 염기쌍인 인식 서열에서 이중 가닥 DNA를 결합하는 엔도뉴클레아제를 지칭한다. 바람직하게는, 본 발명의 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열은 22개의 염기쌍이다. 메가뉴클레아제는 I-CreI로부터 유도된 엔도뉴클레아제일 수 있고, 예를 들어, DNA-결합 특이성, DNA 절단 활성, DNA-결합 친화력, 또는 다이머화 성질과 관련하여 천연 I-CreI에 대해 변형된 I-CreI의 조작된 변종을 지칭할 수 있다. I-CreI의 이러한 변형된 변종을 생성시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다[예를 들어, WO 2007/047859호]. 본 명세서에서 사용되는 메가뉴클레아제는 헤테로다이머로서 또는 "단쇄 메가뉴클레아제"로서 이중 가닥 DNA에 결합하며, 여기서, DNA-결합 도메인의 쌍은 펩타이드 링커를 사용하여 단일 폴리펩타이드에 결합된다. 용어 "호밍 엔도뉴클레아제"는 용어 "메가뉴클레아제"와 동의어이다. 본 발명의 메가뉴클레아제는 세포에, 특히, 인간 T 세포에서 발현될 때 실질적으로 비-독성이며, 이에 따라, 세포는 본 명세서에 기술된 방법을 이용하여 측정할 때 세포 생존력에 대한 유해한 효과 또는 메가뉴클레아제 절단 활성의 상당한 감소가 관찰되지 않으면서 37°C에서 트랜스펙션되고 유지될 수 있게 한다.
- [0218] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단쇄 메가뉴클레아제"는 링커에 의해 결합된 뉴클레아제 서브유닛의 쌍을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 단쇄 메가뉴클레아제는 조직화(organization)를 갖는다: N-말단 서브유닛-링커-C-말단 서브유닛. 두 개의 메가뉴클레아제 서브유닛은 일반적으로, 아미노산 서열에 있어서 동일하지 않을 것이고, 동일하지 않은 DNA 서열을 인식할 것이다. 이에 따라, 단쇄 메가뉴클레아제는 통상적으로 유사-회문식 또는 비-회문식 인식 서열을 절단한다. 단쇄 메가뉴클레아제는 "단쇄 헤테로다이머" 또는 "단쇄 헤테로다이머형 메가뉴클레아제"로서 지칭될 수 있지만, 이는 실제로, 다이머는 아니다. 명확히 하기 위해, 달리 특정하지 않는 한, 용어 "메가뉴클레아제"는 다이머 또는 단쇄 메가뉴클레아제로서 지칭될 수 있다.
- [0219] 본 명세서에서 사용되는 용어 "링커"는 단일 폴리펩타이드에 두 개의 메가뉴클레아제 서브유닛을 결합시키기 위해 사용되는 외인성 펩타이드 서열을 지칭한다. 링커는 천연 단백질에서 발견된 서열을 가질 수 있거나, 임의의 천연 단백질에서 발견되지 않는 인공 서열일 수 있다. 링커는 유연하고 2차 구조에 결여될 수 있거나, 생리학적 조건 하에서 특정 3차원 구조를 형성하는 경향을 가질 수 있다. 링커는 비제한적으로, 미국 특허 제8,445,251호에 포함되는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 서열번호 8 내지 32 중 어느 하나의 154 내지 195번 잔기를 포함하는 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0220] 본 명세서에서 사용되는 용어 "TALEN"은 FokI 뉴클레아제 도메인의 임의의 부분에 융합된 16 내지 22개의 TAL 도메인 반복부위를 포함하는 DNA-결합 도메인을 포함하는 엔도뉴클레아제를 지칭한다.
- [0221] 본 명세서에서 사용되는 용어 "컴팩트 TALEN"은 I-TevI 호밍 엔도뉴클레아제의 뉴클레아제 도메인의 임의의 촉매적 활성 부분에 모든 방향으로 융합된 16-22 TAL 도메인 반복부위를 갖는 DNA-결합 도메인을 포함하는 엔도뉴클레아제를 지칭한다.
- [0222] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CRISPR"은 게놈 DNA에서 인식 부위를 혼성화함으로써 카스파제의 DNA 절단을 유도하는 가이드 RNA, 및 Cas9과 같은 카스파제를 포함하는 카스파제-기반 엔도뉴클레아제를 지칭한다.
- [0223] 본 명세서에서 사용되는 용어 "megaTAL"은 조작된, 서열-특이적 호밍 엔도뉴클레아제를 갖는 전사 활성제-유사 효과기(TALE) DNA 결합 도메인을 포함하는 단쇄 뉴클레아제를 지칭한다.
- [0224] 단백질과 관련하여, 본 명세서에서 사용되는 용어 "재조합"은 단백질을 암호화하는 핵산, 및 단백질을 발현시키는 세포 또는 유기체에 유전공학기술의 적용의 결과로서 변형된 아미노산 서열을 갖는 것을 의미한다. 핵산과 관련하여, 용어 "재조합"은 유전공학기술의 적용 결과로서 변형된 핵산 서열을 갖는 것을 의미한다. 유전공학기술은 PCR 및 DNA 클로닝 기술; 트랜스펙션, 형질도입 및 다른 유전자 전환 기술; 상동 재조합; 부위-지향 돌연변이; 및 유전자 융합을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 이러한 정의에 따르면, 자연 발생 단백질과 동일하

지만 이중 숙주에서 클로닝 및 발현에 의해 생성되는 아미노산 서열을 갖는 단백질은 재조합이 고려되지 않는다.

[0225] 본 명세서에서 사용되는 용어 "야생형"은 동일한 타입의 유전자의 대립유전자 집단에서의 가장 흔한 자연 발생 대립유전자(즉, 폴리뉴클레오타이드 서열)를 지칭하며, 여기서, 야생형 대립유전자에 의해 암호화된 폴리펩타이드는 이의 본래 기능을 갖는다. 용어 "야생형"은 또한, 야생형 대립유전자에 의해 암호화된 폴리펩타이드를 지칭한다. 야생형 대립유전자(즉, 폴리뉴클레오타이드) 및 폴리펩타이드는 돌연변이체 또는 변종 대립유전자 및 폴리펩타이드와 구별 가능하며, 이는 야생형 서열(들)에 대해 하나 이상의 돌연변이 및/또는 치환을 포함한다. 야생형 대립유전자 또는 폴리펩타이드가 유기체에서 정상 표현형을 부여할 수 있지만, 돌연변이체 또는 변종 대립유전자 또는 폴리펩타이드는 일부 경우에, 변형된 표현형을 부여할 수 있다. 야생형 뉴클레아제는 재조합 또는 비-자연 발생 뉴클레아제와 구별 가능하다.

[0226] 재조합 단백질과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "변형(modification)"은 기준 서열(예를 들어, 야생형 또는 고유 서열(native sequence))에 대해 재조합 서열에서의 아미노산 잔기의 임의의 삽입, 결실 또는 치환을 의미한다.

[0227] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인식 서열"은 엔도뉴클레아제에 의해 결합되고 절단되는 DNA 서열을 지칭한다. 메가뉴클레아제의 경우에, 인식 서열은 4개의 염기쌍에 의해 분리된 한 쌍의 역전된 9개의 염기쌍 "절반 부위"를 포함한다. 단쇄 메가뉴클레아제의 경우에, 단백질의 N-말단 도메인은 제1 절반-부위와 접촉하며, 단백질의 C-말단 도메인은 제2 절반-부위와 접촉한다. 메가뉴클레아제에 의한 절단은 4개의 염기쌍 3' "오버행(overhang)"을 생성시킨다. "오버행" 또는 "점착성 단부(sticky end)"는 이중 가닥 DNA 서열의 엔도뉴클레아제 절단에 의해 생성될 수 있는 짧은, 단일 가닥 DNA 세그먼트이다. I-CreI로부터 유도된 메가뉴클레아제 및 단쇄 메가뉴클레아제의 경우에, 오버행은 22개의 염기쌍 인식 서열의 염기 10-13을 포함한다. 콤팩트 TALEN의 경우에, 인식 서열은 I-TevI 도메인에 의해 인식되고 이후에 길이가 4-16 염기쌍의 비-특이적 스페이스에 의해 인식되는 제1 CNNNGN 서열을 포함하고, 이후에 TAL-효과기 도메인(이러한 서열은 통상적으로 5' T 염기를 가짐)에 의해 인식되는 길이가 16-22 bp의 제2 서열을 포함한다. 콤팩트 TALEN에 의한 절단은 두 개의 염기쌍 3' 오버행을 생성시킨다. CRISPR의 경우에, 인식 서열은 통상적으로 16-24 염기쌍인 서열이며, 여기에 가이드 RNA가 결합하여 Cas9 절단을 유도한다. CRISPR에 의한 절단은 블런트 단부(blunt end)를 생성시킨다.

[0228] 본 명세서에서 사용되는 용어 "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 뉴클레아제를 위한 인식 서열을 포함하는 세포의 염색체 DNA의 영역을 지칭한다.

[0229] 본 명세서에서 사용되는 용어 "DNA-결합 친화력" 또는 "결합 친화력"은 메가뉴클레아제가 기준 DNA 분자(예를 들어, 인식 서열 또는 임의 서열)과 비-공유 결합하는 경향을 의미한다. 결합 친화력은 해리 상수, K_d 에 의해 측정된다. 본 명세서에서 사용되는 뉴클레아제는 기준 인식 서열에 대한 뉴클레아제의 K_d 가 기준 뉴클레아제에 대해 통계학적으로 유의미한 백분율 변화에 의해 증가되거나 감소되는 경우에 "변형된" 결합 친화력을 갖는다.

[0230] 본 명세서에서 사용되는 용어 "상동 재조합" 또는 "HR"은 이중 가닥 DNA-손상이 수리 주형으로서 상동성 DNA 서열을 사용하여 수리되는 천연 세포 과정을 지칭한다[예를 들어, 문헌[Cahill *et al.* (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976] 참조]. 상동성 DNA 서열은 내인성 염색체 서열 또는 세포로 전달된 외인성 핵산일 수 있다.

[0231] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비-상동 말단-연결" 또는 "NHEJ"는 이중 가닥 DNA-손상이 두 개의 비-상동성 DNA 세그먼트의 직접적인 결합에 의해 수리되는 천연, 세포 과정을 지칭한다[예를 들어, 문헌[Cahill *et al.* (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976] 참조]. 비-상동 말단-연결에 의한 DNA 수리는 오류가 발생하기 쉽고 수리 부위에서 DNA 서열의 비주형화된 첨가 또는 결실을 종종 야기시킨다. 일부 경우에, 표적 인식 서열에서의 절단은 표적 인식 부위에서 NHEJ를 야기시킨다. 유전자의 암호화 서열에서의 표적 부위의 뉴클레아제-유도 절단, 이후 NHEJ에 의한 DNA 수리는 암호화 서열에 유전자 기능을 방해하는, 돌연변이, 예를 들어, 프레임시프트 돌연변이(frameshift mutation)를 도입할 수 있다. 이에 따라, 조작된 뉴클레아제는 세포의 집단에서 유전자를 효과적으로 녹아웃시키기 위해 사용될 수 있다.

[0232] 본 명세서에서 사용되는 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 면역 효과기 세포(예를 들어, 인간 T 세포) 상에서 항원에 대한 특이성을 부여하거나 이식하는 조작된 수용체를 지칭한다. 키메라 항원 수용체는 통상적으로 세포 외 리간드-결합 도메인 또는 모이어티, 및 T 세포 활성화를 위해 필수적인 신호를 전달하는 하나 이상의 자극 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포외 리간드-결합 도메인 또는 모이어티는 단클론성 항체로부터 유도된 단쇄 가변 분절(scFv)의 형태일 수 있으며, 이는 특정 에피토프 또는 항원(예를 들

어, 암 세포 또는 다른 질병-유발 세포 또는 입자의 표면 상에 우선적으로 존재하는 에피토프 또는 항원)에 대한 특이성을 제공한다. 세포의 리간드-결합 도메인은 고려되는 임의의 항원 또는 에피토프에 대해 특이적일 수 있다. 특정 실시형태에서, 리간드-결합 도메인은 CD19에 대해 특이적이다.

[0233] 키메라 항원 수용체의 세포의 도메인은 또한, B 림프구 상에 자가항원-특이적 B 세포 수용체에 의해 인식되어, 항체-매개 자가면역 질병에서 자가반응성 B 림프구를 특이적으로 표적화하고 사멸시키기 위해 T 세포를 유도할 수 있는, 자가항원을 포함할 수 있다[Payne *et al.* (2016), *Science* 353 (6295): 179-184 참조]. 이러한 CAR은 키메라 자가항체 수용체(CAAR)로서 지칭될 수 있으며, 이의 사용은 본 발명에 포함된다.

[0234] scFv는 링커 서열을 통해 부착될 수 있다. 세포내 자극 도메인은 항원 결합 후면역 효과기 세포에 활성화 신호를 전달하는 하나 이상의 세포질 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 세포질 신호전달 도메인은 비제한적으로, CD3-제타를 포함할 수 있다. 세포내 자극 도메인은 또한, 리간드 결합 후 증식 및/또는 세포-생존 신호를 전달하는 하나 이상의 세포내 보조 자극 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 세포내 보조 자극 도메인은 비제한적으로, CD28 도메인, 4-1BB 도메인, OX40 도메인, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 키메라 항원 수용체는 힌지 또는 스페이스 서열을 통해 세포의 리간드-결합 도메인에 부착된 막관통 도메인을 포함하는, 추가적인 구조적 구성요소를 더 포함할 수 있다.

[0235] 본 명세서에서 사용되는 "외인성 T 세포 수용체" 또는 "외인성 TCR"은 서열이 TCR을 내인성으로 발현시킬 수 있거나 발현시킬 수 없는 면역 효과기 세포(예를 들어, 인간 T 세포)의 게놈에 도입된, TCR을 지칭한다. 면역 효과기 세포 상에서의 외인성 TCR의 발현은 특정 에피토프 또는 항원(예를 들어, 암 세포 또는 다른 질병-유발 세포 또는 입자의 표면 상에 우선적으로 존재하는 에피토프 또는 항원)에 대한 특이성을 부여할 수 있다. 이러한 외인성 T 세포 수용체는 알파 및 베타 사슬을 포함할 수 있거나, 대안적으로, 감마 및 델타 사슬을 포함할 수 있다. 본 발명에서 유용한 외인성 TCR은 고려되는 임의의 항원 또는 에피토프에 대한 특이성을 가질 수 있다.

[0236] 본 명세서에서 사용되는 용어 "감소된 발현"은 대조 세포와 비교할 때 유전자 변형된 세포의 세포 표면에서 내인성 T 세포 수용체의 발현의 임의의 감소를 지칭한다. 이러한 용어 감소된(reduced)은 또한, 대조 세포의 집단과 비교할 때 세포 표면에서 내인성 폴리펩타이드(즉, 내인성 T 세포 수용체)를 발현시키는 세포의 집단에서의 세포의 백분율의 감소를 지칭할 수 있다. 이러한 감소는 최대 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 최대 100%일 수 있다. 이에 따라, 용어 "감소된"은 내인성 T 세포 수용체의 부분 녹다운 및 완전 녹다운 둘 모두를 포함한다.

[0237] 아미노산 서열 및 핵산 서열 둘 모두와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "퍼센트 동일성," "서열 동일성," "백분율 유사성," "서열 유사성" 등은 정렬된 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드 간에 유사성을 최대화하고 동일하거나 유사한 잔기 또는 뉴클레오타이드의 수, 전체 잔기 또는 뉴클레오타이드의 수, 및 서열 정렬에서의 겹의 존재 및 길이의 함수인, 서열을 정렬을 기준으로 한 두 개의 서열의 유사성의 정도의 척도를 지칭한다. 다양한 알고리즘 및 컴퓨터 프로그램은 표준 파라미터를 이용하여 서열 유사성을 결정하기 위해 이용 가능하다. 본 명세서에서 사용되는 서열 유사성은 아미노산 서열을 위한 BLASTp 프로그램 및 핵산 서열을 위한 BLASTn 프로그램을 이용하여 측정되며, 이들 둘 모두는 National Center for Biotechnology Information(www.ncbi.nlm.nih.gov/)을 통해 입수 가능하고, 예를 들어, 문헌[Altschul *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Gish and States (1993), *Nature Genet.* 3:266-272; Madden *et al.* (1996), *Meth. Enzymol.* 266:131-141; Altschul *et al.* (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:33 89-3402); Zhang *et al.* (2000), *J. Comput. Biol.* 7(1-2):203-14]에 기술된다. 본 명세서에서 사용되는, 두 개의 아미노산 서열의 퍼센트 유사성은 BLASTp 알고리즘을 위한 하기 파라미터를 기초로 한 스코어이다: 워드 크기(word size)=3; 겹 개방 패널티=-11; 겹 확장 패널티=-1; 및 스코어링 매트릭스=BLOSUM62. 본 명세서에서 사용되는, 두 개의 핵산 서열의 퍼센트 유사성은 BLASTn 알고리즘을 위한 하기 파라미터를 기초로 한 스코어이다: 워드 크기=11; 겹 개방 패널티=-5; 겹 확장 패널티=-2; 매치 리워드(match reward)=1; 및 미스매치 패널티=-3.

[0238] 두 개의 단백질 또는 아미노산의 변형과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "...에 해당하는"은 제1 단백질에서의 특정 변형이 제2 단백질에서의 변형에서와 동일한 아미노산 잔기의 치환이며 두 개의 단백질이 표준 서열 정렬(예를 들어, BLASTp 프로그램을 이용함)로 처리될 때 제1 단백질에서의 변형의 아미노산 위치가 제2 단백질에서의 변형의 아미노산 위치에 해당하거나 이와 정렬하는 것을 명시하기 위해 사용된다. 이에 따라, 제1 단백질에서 잔기 "X"의 아미노산 "A"로의 변형은 잔기 X 및 Y가 서열 정렬에서 서로 일치하는 경우, 및 X 및 Y가 상이한 수일 수 있다는 사실에도 불구하고, 제2 단백질에서 잔기 "Y"의 아미노산 "A"로의 변형에 해당할 것이다.

- [0239] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인식 절반-부위," "인식 서열 절반-부위," 또는 간단하게 "절반-부위"는 호모다 이머 또는 헤테로다 이머 메가뉴클레아제의 모노머에 의해 또는 단쇄 메가뉴클레아제의 하나의 서브유닛에 의해 인식되는 이중 가닥 DNA 분자에서의 핵산 서열을 의미한다.
- [0240] 본 명세서에서 사용되는 용어 "초가변 영역"은 비교적 높은 높은 가변성을 갖는 아미노산을 포함하는 메가뉴클레아제 모노머 또는 서브유닛 내의 국소화된 서열을 지칭한다. 초가변 영역은 약 50 내지 60개 인접한 잔기, 약 53 내지 57개 인접한 잔기, 또는 바람직하게는, 약 56개 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 초가변 영역의 잔기는 서열번호 8 내지 32 중 어느 하나의 24 내지 79번 위치 또는 215 내지 270번 위치에 해당할 수 있다. 초가변 영역은 인식 서열에서 DNA 염기와 접촉하는 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있고, 모노머 또는 서브유닛의 염기 선호도를 변경하도록 변형될 수 있다. 초가변 영역은 또한, 메가뉴클레아제가 이중 가닥 DNA 인식 서열과 결합할 때 DNA 골격에 결합하는 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 잔기는 DNA 골격 및 표적 인식 서열에 대한 메가뉴클레아제의 결합 친화력을 변경하도록 변형될 수 있다. 본 발명의 상이한 실시형태에서, 초가변 영역은 가변성을 나타내고 염기 선호도 및/또는 DNA-결합 친화력에 영향을 미치도록 변형될 수 있는 1 내지 20개 잔기를 포함한다. 특정 실시형태에서, 초가변 영역은 가변성을 나타내고 염기 선호도 및/또는 DNA-결합 친화력에 영향을 미치도록 변형될 수 있는 약 15-18개 잔기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열번호 8 내지 32의 어느 하나의 24, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 66, 68, 70, 72, 73, 75 및 77번 위치 중 하나 이상에 해당한다. 다른 실시형태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열번호 8 내지 32의 어느 하나의 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 248, 257, 259, 261, 263, 264, 266 및 268번 위치 중 하나 이상에 해당한다.
- [0241] 본 명세서에서 사용되는 용어 "T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자" 및 "TCR 알파 불변 영역 유전자"는 교호적으로 사용되고, NCBI Gen ID NO. 28755(서열번호 1)와 동일한 인간 유전자를 지칭한다.
- [0242] 용어 "재조합 DNA 작제물," "재조합 작제물," "발현 카세트," "발현 작제물," "키메라 작제물," "작제물," 및 "재조합 DNA 분절"은 본 명세서에서 교호적으로 사용되고, 단일 또는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드이다. 재조합 작제물은 비제한적으로, 자연에서 함께 발견되지 않는 조절서열 및 암호화 서열을 포함하는, 단일 또는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드의 인공 조합을 포함한다. 예를 들어, 재조합 DNA 작제물은 상이한 소스로부터 유도된 조절 서열 및 암호화 서열, 또는 동일한 소스로부터 유도되고 자연에서 발견되는 것과는 다른 방식으로 배열되는 조절 서열 및 암호화 서열을 포함할 수 있다. 이러한 작제물은 그 자체로 사용될 수 있거나, 벡터와 함께 사용될 수 있다.
- [0243] 본 명세서에서 사용되는 "벡터" 또는 "재조합 DNA 벡터"는 제공된 숙주 세포에서 폴리펩타이드-암호화 서열의 전사 및 번역을 가능하게 하는 복제 시스템 및 서열을 포함하는 작제물일 수 있다. 벡터가 사용되는 경우에, 벡터의 선택은 당업자에게 널리 공지된 바와 같이 숙주 세포를 형질도입시키기 위해 사용되는 방법에 의존적이다. 벡터는 비제한적으로, 플라스미드 벡터 및 재조합 AAV 벡터, 또는 표적 세포에 본 발명의 메가뉴클레아제를 암호화하는 유전자를 전달하기에 적합한 당해 분야에 공지된 임의의 다른 벡터를 포함할 수 있다. 당업자는 본 발명의 임의의 단리된 뉴클레오타이드 또는 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포를 성공적으로 형질도입시키고, 선택하고, 번식시키기 위해, 벡터 상에 존재해야 하는 유전적 요소를 잘 인식한다.
- [0244] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 또한 바이러스 벡터를 지칭할 수 있다. 바이러스 벡터는 비제한적으로 레트로 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 아데노-관련 바이러스 벡터(AAV)를 포함할 수 있다.
- [0245] 본 명세서에서 사용되는 "다시스트론성" mRNA는 둘 이상의 암호화 서열(즉, 시스트론)을 포함하고 하나 초과와 단백질을 암호화하는, 단일 메신저 RNA를 지칭한다. 다시스트론성 mRNA는 IRES 요소, T2A 요소, P2A 요소, E2A 요소, 및 F2A 요소를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 동일한 mRNA 분자로부터 둘 이상의 유전자의 번역을 가능하게 하기 위해 당해 분야에 공지된 임의의 요소를 포함할 수 있다.
- [0246] 본 명세서에서 사용되는 "인간 T 세포" 또는 "T 세포"는 인간 공여자로부터 단리된 T 세포를 지칭한다. 인간 T 세포, 및 이로부터 유도된 세포는 계대배양되지 않은 단리된 T 세포, 불명화 없이 세포 배양 조건 하에서 계대배양되고 유지된 T 세포, 및 불멸화되고 세포 배양 조건 하에서 무기한으로 유지될 수 있는 T 세포를 포함한다.
- [0247] 본 명세서에서 사용되는 "대조군" 또는 "대조 세포"는 유전자 변형된 세포의 유전자형 또는 표현형의 변화를 측정하기 위한 기준점을 제공하는 세포를 지칭한다. 대조 세포는 예를 들어, (a) 야생형 세포, 즉, 유전자 변형된 세포를 야기시키는 유전적 변형을 위한 출발 물질과 동일한 유전자형의 야생형 세포; (b) 유전자 변형된 세포와

동일한 유전자형이지만, 널 작제물(null construct)로(즉, 고려되는 형질에 공지된 효과를 나타내지 않는 작제물로) 변형된 세포; 또는 (c) 유전자 변형된 세포와 유전적으로 동일하지만, 변형된 유전자형 또는 표현형의 발현을 유발시키는 조건 또는 자극 또는 추가의 유전자 변형에 노출되지 않는 세포를 포함할 수 있다.

[0248] 본 명세서에서 사용되는 변수에 대한 수치 범위의 인용은 본 발명이 그러한 범위 내의 임의의 값과 동일한 변수로 실행될 수 있음을 전달하고자 의도된다. 이에 따라, 본질적으로 이산인 변수의 경우에, 변수는 그러한 범위의 종결점을 포함하는, 수치 범위 내의 정수 값과 같을 수 있다. 유사하게, 본질적으로 연속적인 변수의 경우에, 변수는 그러한 범위의 종결점을 포함하는, 수치 범위 내의 임의의 실제 값과 같을 수 있다. 일 예로서, 그리고 비제한적으로, 0 내지 2의 값을 갖는 것으로서 기술된 변수는 변수가 본질적으로 이산인 경우에, 0, 1 또는 2의 값을 취할 수 있고, 변수가 본질적으로 연속적인 경우에, 0.0, 0.1, 0.01, 0.001 값, 또는 0 이상 2 이하의 임의의 다른 실제 값을 취할 수 있다.

[0249] 2.1 본 발명의 원리

[0250] 본 발명은 절단부위에서의 NHEJ가 TCR 알파 사슬 서브유닛의 발현을 방해하고 궁극적으로 세포 표면에서의 T 세포 수용체의 발현을 방해하도록, 조작된 뉴클레아제가 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자(서열번호 1) 내에서 발견된 인식 서열을 인식하고 절단하기 위해 사용될 수 있다는 발견을 일부 기초로 한 것이다. 또한, 본 발명에 따르면, 외인성 폴리뉴클레오타이드 서열은, 고려되는 서열이 세포에서 동시에 발현되도록, 예를 들어, 상동 재조합에 의해 뉴클레아제 절단부위에서의 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입된다. 이러한 외인성 서열은 예를 들어, 키메라 항원 수용체, 외인성 TCR 수용체, 또는 고려되는 임의의 다른 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0251] 이에 따라, 본 발명은 단일 조작된 뉴클레아제로 단일 인식 부위를 표적화시킴으로써, 내인성 T 세포 수용체의 넥아웃 및 외인성 핵산 서열(예를 들어, 키메라 항원 수용체 또는 외인성 TCR)의 발현 둘 모두를 가능하게 한다. 키메라 항원 수용체를 암호화하는 서열이 TCR 알파 불변 영역 유전자에 삽입되는 특정 실시형태에서, 본 발명은 항원-특이적 CAR을 발현시키고 내인성 TCR의 감소된 발현 또는 완전한 넥아웃을 갖는, 동종이계 T 세포를 생성시키는 단순화된 방법을 제공한다. 이러한 세포는 동종이계 대상체에 투여할 때 이식편-숙주-질병(GVHD) 유발의 감소 또는 비유발을 나타낼 수 있다.

[0252] 2.2 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자 내의 인식 서열을 인식하고 절단하기 위한 뉴클레아제

[0253] 당해 분야에서는, 살아있는 세포의 게놈에서 DNA 손상을 형성시키기 위해 부위-특이적 뉴클레아제를 사용하는 것이 가능하며 이러한 DNA 손상이 돌연변이 NHEJ 수리를 통해 또는 형질도입 DNA 서열과의 상동 재조합을 통해 게놈의 영구적 변형을 야기시킬 수 있다는 것이 가능하다는 것은 알려져 있다. NHEJ는 절단부위에서 돌연변이유발을 생성시켜, 대립유전자의 비활성화를 야기시킬 수 있다. NHEJ-관련 돌연변이유발은 초기 정지 코돈, 비정상적 비-기능적 단백질을 생성시키는 프레임시프트 돌연변이의 생성을 통해 대립유전자를 비활성화시킬 수 있거나, 비센스-매개 mRNA 붕괴와 같은 메커니즘을 촉발시킬 수 있다. NHEJ를 통해 돌연변이유발을 유도하기 위한 뉴클레아제의 사용은 야생형 대립유전자에 존재하는 특정 돌연변이 또는 서열을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 표적 유전자 좌에서 이중-가닥 손상을 유도하기 위한 뉴클레아제의 사용은 게놈 표적에 대해 상동성인 서열 측면에 있는 특히 형질도입 DNA 서열의 상동 재조합을 자극시키기 위해 알려진 것이다. 이러한 방식으로, 외인성 핵산 서열은 표적 유전자 좌에 삽입될 수 있다. 이러한 외인성 핵산은 예를 들어, 키메라 항원 수용체, 외인성 TCR, 또는 고려되는 임의의 서열 또는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0254] 상이한 실시형태에서, 다양한 상이한 타입의 뉴클레아제는 본 발명을 실행하는데 유용하다. 일 실시형태에서, 본 발명은 재조합 메가뉴클레아제를 사용하여 실행될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 CRISPR 뉴클레아제 또는 CRISPR Nickase를 사용하여 실행될 수 있다. 사전결정된 DNA 부위를 인식하는 CRISPR 및 CRISPR Nickase를 제조하는 방법은 당해 분야에, 예를 들어, 문헌[Ran, et al. (2013) Nat Protoc. 8:2281-308]에 공지되어 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 TALEN 또는 컴팩트 TALEN을 사용하여 실행될 수 있다. 사전결정된 DNA 부위에 결합하는 TALE 도메인을 제조하는 방법은 당해 분야에, 예를 들어, 문헌[Reyon et al. (2012) Nat Biotechnol. 30:460-5]에 공지되어 있다. 추가 실시형태에서, 본 발명은 megaTAL을 사용하여 실행될 수 있다.

[0255] 바람직한 실시형태에서, 본 발명을 실행하기 위해 사용되는 뉴클레아제는 단쇄 메가뉴클레아제이다. 단쇄 메가뉴클레아제는 링커 펩타이드에 의해 결합된 N-말단 서브유닛 및 C-말단 서브유닛을 포함한다. 두 개의 도메인 각각은 인식 서열의 절반(즉, 인식 절반-부위)을 인식하며, DNA 절단의 부위는 두 개의 서브유닛의 계면 부근의 인식 서열의 중간에 존재한다. DNA 가닥 손상은 메가뉴클레아제에 의한 DNA 절단이 한 쌍의 4개의 염기쌍, 3' 단일-가닥 오버행을 생성시키도록 4개의 염기쌍에 의해 오프셋된다.

- [0256] 일부 예에서, 본 발명의 재조합 메가뉴클레아제는 TRC 1-2 인식 서열(서열번호 3)을 인식하고 절단하도록 조작되었다. 이러한 재조합 메가뉴클레아제는 본 명세서에서 총괄적으로 "TRC 1-2 메가뉴클레아제"로서 지칭된다. 예시적인 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 서열번호 8 내지 27에 제공된다.
- [0257] 추가적인 예에서, 본 발명의 재조합 메가뉴클레아제는 TRC 3-4 인식 서열(서열번호 4)을 인식하고 절단하도록 조작되었다. 이러한 재조합 메가뉴클레아제는 본 명세서에서 총괄적으로 "TRC 3-4 메가뉴클레아제"로서 지칭된다. 예시적인 TRC 3-4 메가뉴클레아제는 서열번호 28 및 29에 제공된다.
- [0258] 추가 예에서, 본 발명의 재조합 메가뉴클레아제는 TRC 7-8 인식 서열(서열번호 5)을 인식하고 절단하도록 조작되었다. 이러한 재조합 메가뉴클레아제는 본 명세서에서 총괄적으로 "TRC 7-8 메가뉴클레아제"로서 지칭된다. 예시적인 TRC 7-8 메가뉴클레아제는 서열번호 30 내지 32에 제공된다.
- [0259] 본 발명의 재조합 메가뉴클레아제는 제1 초가변(HVR1) 영역을 포함하는 제1 서브유닛, 및 제2 초가변(HVR2) 영역을 포함하는 제2 서브유닛을 포함한다. 또한, 제1 서브유닛은 인식 서열(예를 들어, TRC1, TRC3, 또는 TRC7 절반-부위)에서 제1 인식 절반-부위에 결합하며, 제2 서브유닛은 인식 서열(예를 들어, TRC2, TRC4, 또는 TRC8 절반-부위)에서 제2 인식 절반-부위에 결합한다. 재조합 메가뉴클레아제가 단쇄 메가뉴클레아제인 실시형태에서, 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛은 HVR1 영역을 포함하고 제1 절반-부위를 결합하는 제1 서브유닛이 N-말단 서브유닛으로서 정위되며, HVR2 영역을 포함하고 제2 절반-부위를 결합하는 제2 서브유닛이 C-말단 서브유닛으로서 정위되도록 지향될 수 있다. 대안적인 실시형태에서, 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛은 HVR1 영역을 포함하고 제1 절반-부위를 결합하는 제1 서브유닛이 C-말단 서브유닛으로서 정위되고 HVR2 영역을 포함하고 제2 절반-부위를 결합하는 제2 서브유닛이 N-말단 서브유닛으로서 정위되도록 지향될 수 있다. 본 발명의 예시적인 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 표 1에 제공된다. 본 발명의 예시적인 TRC 3-4 메가뉴클레아제는 표 2에 제공된다. 본 발명의 예시적인 TRC 7-8 메가뉴클레아제는 표 3에 제공된다.

표 1

TRC 1-2 인식 서열(서열번호 3)을 인식하고 절단하도록 조작된 예시적인 재조합 메가뉴클레아제

메가뉴클레아제	AA 서열목록	TRC1 서브유닛 잔기	TRC1 서브유닛 서열목록	*TRC1 서브유닛 % %	TRC2 서브유닛 잔기	TRC2 서브유닛 서열목록	*TRC2 서브유닛 % %
TRC 1-2x.87 EE	8	198-344	33	100	7-153	58	100
TRC 1-2x.87 QE	9	198-344	34	100	7-153	59	99.3
TRC 1-2x.87 EQ	10	198-344	35	99.3	7-153	60	100
TRC 1-2x.87	11	198-344	36	99.3	7-153	61	99.3
TRC 1-2x.6	12	198-344	37	99.3	7-153	62	94.6
TRC 1-2x.20	13	198-344	38	99.3	7-153	63	91.2
TRC 1-2x.55	14	198-344	39	95.9	7-153	64	91.8
TRC 1-2x.60	15	198-344	40	91.8	7-153	65	91.2
TRC 1-2x.105	16	198-344	41	95.2	7-153	66	95.2
TRC 1-2x.163	17	198-344	42	99.3	7-153	67	99.3
TRC 1-2x.113_3	18	198-344	43	99.3	7-153	68	91.2
TRC 1-2x.5	19	7-153	44	99.3	198-344	69	93.2
TRC 1-2x.8	20	7-153	45	92.5	198-344	70	92.5
TRC 1-2x.25	21	7-153	46	99.3	198-344	71	98.6
TRC 1-2x.72	22	7-153	47	99.3	198-344	72	92.5
TRC 1-2x.80	23	7-153	48	99.3	198-344	73	92.5
TRC 1-2x.84	24	7-153	49	95.2	198-344	74	98.6
TRC 1-2x.120	25	7-153	50	99.3	198-344	75	92.5
TRC 1-2x.113_1	26	7-153	51	100	198-344	76	92.5
TRC 1-2x.113_2	27	7-153	52	99.3	198-344	77	92.5

*"TRC1 서브유닛 %" 및 "TRC2 서브유닛 %"는 각각, 각 메가뉴클레아제의 TRC1-결합과 TRC2-결합 서브유닛 영역 간, 및 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제의 TRC1-결합과 TRC2-결합 서브유닛 영역 간의 아미노산 서열 동일성을 나타낸다.

[0260]

표 2

TRC 3-4 인식 서열(서열번호 4)을 인식하고 절단하도록 조작된 예시적인 재조합 메가뉴클레아제

메가뉴클레아제	AA 서열목록	TRC3 서브유닛 잔기	TRC3 서브유닛 서열목록	*TRC3 서브유닛 %	TRC4 서브유닛 잔기	TRC4 서브유닛 서열목록	TRC4 서브유닛 %
TRC 3-4x.3	28	7-153	53	100	198-344	78	100
TRC 3-4x.19	29	7-153	54	96.6	198-344	79	96.6

*"TRC3 서브유닛 %" 및 "TRC4 서브유닛 %"는 각각, 각 메가뉴클레아제의 TRC3-결합과 TRC4-결합 서브유닛 영역 간, 및 TRC 3-4x.3 메가뉴클레아제의 TRC3-결합과 TRC4-결합 서브유닛 영역 간의 아미노산 서열 동일성을 나타낸다.

[0261]

표 3

TRC 7-8 인식 서열(서열번호 5)을 인식하고 절단하도록 조작된 예시적인 재조합 메가뉴클레아제

메가뉴클레아제	AA 서열목록	TRC7 서브유닛 잔기	TRC7 서브유닛 서열목록	*TRC7 서브유닛 %	TRC8 서브유닛 잔기	TRC8 서브유닛 서열목록	TRC8 서브유닛 %
TRC 7-8x.7	30	7-153	55	100	198-344	80	100
TRC 7-8x.9	31	198-344	56	97.3	7-153	81	91.2
TRC 7-8x.14	32	198-344	57	97.9	7-153	82	90.5

*"TRC7 서브유닛 %" 및 "TRC8 서브유닛 %"는 각각, 각 메가뉴클레아제의 TRC7-결합과 TRC8-결합 서브유닛 영역 간, 및 TRC 7-8x.7 메가뉴클레아제의 TRC7-결합과 TRC8-결합 서브유닛 영역 간의 아미노산 서열 동일성을 나타낸다.

[0262]

[0263]

2.3 유전자 변형된 세포를 생성시키는 방법

[0264]

본 발명은 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자(서열번호 1) 내에서 발견된 인식 서열을 인식하고 절단하는 조작된 뉴클레아제를 사용하여 유전자 변형된 세포를 생성시키는 방법을 제공한다. 이러한 인식 서열에서의 절단은 절단부위에서의 NHEJ 및 인간 T 세포 수용체 알파 사슬 서브유닛의 방해된 발현을 가능하게 하여, 세포 표면에서 T 세포 수용체의 감소된 발현 및/또는 기능을 초래할 수 있다. 추가적으로, 이러한 인식 서열에서의 절단은 TCR 알파 불변 영역 유전자에 직접적으로 외인성 핵산 서열의 상동 재조합을 추가로 가능하게 할 수 있다.

[0265]

본 발명의 조작된 뉴클레아제는 단백질 형태의 세포에, 또는 바람직하게는, 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 핵산으로서 전달될 수 있다. 이러한 핵산은 DNA(예를 들어, 원형 또는 선형화된 플라스미드 DNA 또는 PCR 생성물) 또는 RNA일 수 있다. 조작된 뉴클레아제 암호화 서열이 DNA 형태로 전달되는 실시형태에서, 이는 메가뉴클레아제 유전자의 전사를 촉진시키기 위해 프로모터에 작동 가능하게 연결되어야 한다. 본 발명에 대해 적합한 포유류 프로모터는 보존적 프로모터, 예를 들어, 시토메갈로바이러스 초기(CMV) 프로모터[Thomsen *et al.* (1984), *Proc Natl Acad Sci USA*. 81(3):659-63] 또는 SV40 초기 프로모터[Benoist and Chambon (1981), *Nature*. 290(5804):304-10]뿐만 아니라 유도성 프로모터, 예를 들어, 테트라시클린-유도성 프로모터[Dingermann *et al.* (1992), *Mol Cell Biol*. 12(9):4038-45]를 포함한다.

[0266]

일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA는 이러한 것이 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 유전자가 세포의 계놈에 통합할 가능성을 감소시키기 때문에, 세포에 전달된다. 이러한 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA는 시험관내 전사와 같은 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA는 7-메틸-구아노신을 사용하여 캡핑된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 폴리아데닐화될 수 있다.

[0267]

특정 실시형태에서, 본 발명의 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA는 세포에서 동시에 발현되는 둘 이상의 뉴클레아제를 암호화하는 다시스트론성 mRNA일 수 있다. 다시스트론성 mRNA는 동일한 표적 유전자에서 상이한 인식 서열을 표적화하는 본 발명의 둘 이상의 뉴클레아제를 암호화할 수 있다. 대안적으로, 다시스트론성 mRNA는 본 명세서에 기술된 적어도 하나의 뉴클레아제, 및 동일한 유전자에 정위된 별도의 인식 서열을 표적화하거나 절단 부위가 둘 모두의 유전자에서 생성되도록 제2 유전자에 정위된 제2 인식 서열을 표적화하는 적어도 하나의 추가적인 뉴클레아제를 암호화할 수 있다. 다시스트론성 mRNA는 IRES 요소, T2A 요소, P2A 요소, E2A 요소, 및 F2A 요소를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 동일한 mRNA 분자로부터 둘 이상의 유전자(즉, 시스트론)의 번역을

가능하게 하기 위해 당해 분야에 공지된 임의의 요소를 포함할 수 있다.

- [0268] 정제된 뉴클레아제 단백질은 당해 분야에 공지된 다양한 상이한 메커니즘에 의해, 고려되는 서열을 갖는 절단부 위에서 상동 재조합 또는 비-상동 말단-연결을 가능하게 하는 게놈 DNA를 절단하기 위해 세포에 전달될 수 있다.
- [0269] 일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 DNA/mRNA는 세포 섭취를 촉진하기 위해 세포 침투 펩타이드 또는 표적화 리간드에 결합된다. 당해 분야에 공지된 세포 침투 펩타이드의 예는 폴리-아르기닌[Jearawiriyapaisarn, *et al.* (2008) *Mol Ther.* 16:1624-9], HIV 바이러스로부터의 TAT 펩타이드[Hudecz *et al.* (2005), *Med. Res. Rev.* 25: 679-736], MPG[Simeoni, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2717-2724], Pep-1[Deshayes *et al.* (2004) *Biochemistry* 43: 7698-7706], 및 HSV-1 VP-22[Deshayes *et al.* (2005) *Cell Mol Life Sci.* 62:1839-49]를 포함한다. 대안적인 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제, 또는 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 DNA/mRNA는 뉴클레아제 단백질/DNA/mRNA가 표적 세포에 결합하거나 이에 의해 내부화되도록, 표적 세포 상에서 발현된 특정 세포-표면 수용체를 인식하는 항체에 공유 결합되거나 비공유 결합된다. 대안적으로, 조작된 뉴클레아제 단백질/DNA/mRNA는 이러한 세포-표면 수용체에 대한 천연 리간드(또는 천연 리간드의 일부)에 공유 결합되거나 비공유 결합될 수 있다[McCall, *et al.* (2014) *Tissue Barriers.* 2(4):e944449; Dinda, *et al.* (2013) *Curr Pharm Biotechnol.* 14:1264-74; Kang, *et al.* (2014) *Curr Pharm Biotechnol.* 15(3):220-30; Qian *et al.* (2014) *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 10(11):1491-508].
- [0270] 일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 DNA/mRNA는 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 이러한 나노입자에 공유 결합되거나, 바람직하게는, 비공유 결합되거나, 이러한 나노입자 내에 캡슐화된다[Sharma, *et al.* (2014) *Biomed Res Int.* 2014]. 나노입자는 길이 스케일이 <1 μm , 바람직하게는, 100 nm인 나노스케일 전달 시스템이다. 이러한 나노입자는 금속, 지질, 폴리머, 또는 생물학적 거대분자로 이루어진 코어를 사용하여 설계될 수 있으며, 재조합 메가뉴클레아제 단백질, mRNA, 또는 DNA의 다수의 복사체는 나노입자 코어에 부착되거나 이로 캡슐화될 수 있다. 이는 각 세포에 전달되는 단백질/mRNA/DNA의 복사체 수를 증가시키고, 이에 따라, 표적 인식 서열이 절단될 가능성을 최대화하기 위해 각 조작된 뉴클레아제의 세포내 발현을 증가시킨다. 이러한 나노입자의 표면은 페이로드의 세포 전달 및 섭취를 향상시키도록 표면이 추가적인 작용성을 부여하는 코어-셸 나노입자를 형성시키기 위해 폴리머 또는 지질(예를 들어, 키토산, 양이온성 폴리머, 또는 양이온성 지질)로 추가로 변형될 수 있다. [Jian *et al.* (2012) *Biomaterials.* 33(30): 7621-30]. 나노입자는 추가적으로 나노입자를 적절한 세포 타입으로 유도하고/하거나 세포 섭취의 가능성을 증가시키기 위해 표적화 분자에 유리하게 결합될 수 있다. 이러한 표적화 분자의 예는 세포-표면 수용체에 대해 특이적인 항체, 및 세포 표면 수용체에 대한 천연 리간드(또는 천연 리간드의 일부)를 포함한다.
- [0271] 일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 DNA/mRNA는 리포솜 내에 캡슐화되거나 양이온성 지질을 사용하여 착물화된다[예를 들어, Lipofectamine™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA; Zuris *et al.* (2015) *Nat Biotechnol.* 33: 73-80; Mishra *et al.* (2011) *J Drug Deliv.* 2011:863734 참조]. 리포솜 및 리포플렉스 체형은 페이로드가 분해되는 것으로부터 보호할 수 있고, 세포의 세포막과의 융합 및/또는 이의 방해를 통해 세포 섭취 및 전달 효율을 촉진시킬 수 있다.
- [0272] 일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 DNA/mRNA는 폴리머 스케폴드(예를 들어, PLGA) 내에 캡슐화되거나 양이온성 폴리머(예를 들어, PEI, PLL)를 이용하여 착물화된다[Tamboli *et al.* (2011) *Ther Deliv.* 2(4): 523-536].
- [0273] 일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 DNA/mRNA는 마이셀에서 자가-결합하는 양친매성 분자와 합쳐진다[Tong *et al.* (2007) *J Gene Med.* 9(11): 956-66]. 폴리머 마이셀은 응집을 방해하고 전하 상호작용을 마스킹하고, 세포의 외층의 비특이적 상호작용을 감소시킬 수 있는 친수성 폴리머(예를 들어, 폴리에틸렌글리콜)로 형성된 마이셀 쉼을 포함할 수 있다.
- [0274] 일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 DNA/mRNA는 세포에 전달하기 위해 에멀전 또는 나노에멀전(즉, < 1 nm의 평균 입자 직경을 가짐)으로 제형화된다. 용어 "에멀전"은 비제한적으로, 비수혼화성 상이 수성 상과 혼합될 때, 비극성 잔기(예를 들어, 긴 탄화수소 사슬)를 물로부터 멀어지고 극성 헤드 기를 물쪽으로 유도하는 소수성 힘의 결과로서 형성할 수 있는 지질 구조를 포함하는, 임의의 수중유, 유중수, 수중유중수, 또는 유중수중유 분산물 또는 점적을 지칭한다. 이러한 다른 지질 구조는 단일라멜라, 소수라멜라, 및 다중 라멜라 지질 소포, 마이셀 및 라멜라 상을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 에멀전은 수성 상 및 친지성 상으로 이루어진다(통상적으로, 오일 및 유기 용매를 함유함). 에멀전은 또한, 흔히 하

나 이상의 계면활성제를 함유한다. 나노에멀전 제형은 예를 들어, 미국특허출원번호 제2002/0045667호 및 제 2004/0043041호, 및 미국 특허 제6,015,832호, 제6,506,803호, 제6,635,676호, 및 제6,559,189호에 기술된 바와 같이, 널리 공지되어 있으며, 이들 각각은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0275] 일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 DNA/mRNA는 다작용성 폴리머 컨쥬게이트, DNA 덴드리머, 및 폴리머 덴드리머에 공유 부착되거나 이와 비공유 결합된다[Mastorakos *et al.* (2015) *Nanoscale*. 7(9): 3845-56; Cheng *et al.* (2008) *J Pharm Sci.* 97(1): 123-43]. 덴드리머 생성은 페이로드 용량 및 크기를 조절할 수 있고, 높은 페이로드 용량(payload capacity)을 제공할 수 있다. 또한, 다수의 표면 기의 디스플레이는 안정성을 개선시키고 비특정 상호작용을 감소시키기 위해 활용될 수 있다.

[0276] 일부 실시형태에서, 조작된 뉴클레아제를 암호화하는 유전자는 바이러스 벡터를 사용하여 세포에 도입된다. 이러한 벡터는 당해 분야에 공지되어 있고, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함한다[문헌[Vannucci, *et al.* (2013) *New Microbiol.* 36:1-22]]에서 검토됨]. 본 발명에서 유용한 재조합 AAV 벡터는 세포에 바이러스의 형질도입 및 세포 계능에 뉴클레아제 유전자의 삽입을 가능하게 하는 임의의 혈청형을 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 재조합 AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6의 혈청형을 갖는다. 재조합 AAV 벡터는 또한, 이러한 것이 숙주 세포에서 제2-가닥 DNA 합성을 필요로 하지 않도록 자가-상보적일 수 있다[McCarty, *et al.* (2001) *Gene Ther.* 8:1248-54].

[0277] 조작된 뉴클레아제 유전자가 DNA 형태(예를 들어, 플라스미드)에서 및/또는 바이러스 벡터(예를 들어, AAV)를 통해 전달되는 경우에, 이러한 것은 프로모터에 작동 가능하게 연결되어야 한다. 일부 실시형태에서, 이러한 것은 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터의 LTR)로부터의 내인성 프로모터 또는 잘 알려진 시토메갈로바이러스- 또는 SV40 바이러스-초기 프로모터와 같은 바이러스 프로모터일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 뉴클레아제 유전자는 표적 세포(예를 들어, 인간 T 세포)에서 선호적으로 유전자 발현을 유도하는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0278] 본 발명은 또한, 외인성 핵산 서열이 뉴클레아제 절단부위에서 TRC 알파 불변 영역 유전자에 삽입되도록, 세포에 외인성 핵산의 도입을 제공한다. 일부 실시형태에서, 외인성 핵산은 뉴클레아제 절단부위에서 세포 계능에 핵산 서열의 재조합을 증진시키기 위해 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암을 포함한다.

[0279] 본 발명의 외인성 핵산은 상기에 논의된 임의의 수단에 의해 세포에 도입될 수 있다. 특정 실시형태에서, 외인성 핵산은 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 또는 바람직하게는, 재조합 AAV 벡터에 의해 도입된다. 외인성 핵산을 도입하는데 유용한 재조합 AAV 벡터는 세포에 바이러스의 형질도입 및 세포 계능에 외인성 핵산 서열의 삽입을 가능하게 하는 임의의 혈청형을 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 재조합 AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6의 혈청형을 갖는다. 재조합 AAV 벡터는, 또한, 이러한 것이 숙주 세포에서 제2-가닥 DNA 합성을 필요로 하지 않도록, 자가-상보적일 수 있다.

[0280] 다른 특정 실시형태에서, 외인성 핵산은 단일 가닥 DNA 주형을 사용하여 세포에 도입될 수 있다. 단일 가닥 DNA는 외인성 핵산을 포함할 수 있고, 바람직한 실시형태에서, 상동 재조합에 의해 뉴클레아제 절단 부위에 핵산 서열의 삽입을 증진시키기 위해 5' 및 3' 상동성 암을 포함할 수 있다. 단일 가닥 DNA는 5' 상동성 암의 5' 업스트림의 5' AAV 반전 말단 반복부(ITR) 서열 및 3' 상동성 암의 3' 다운스트림의 3' AAV ITR 서열을 포함한다.

[0281] 다른 특정 실시형태에서, 본 발명의 엔도뉴클레아제 및/또는 본 발명의 외인성 핵산 서열을 암호화하는 유전자는 선형화된 DNA 주형으로 트랜스팩션에 의해 세포에 도입될 수 있다. 일부 예에서, 엔도뉴클레아제 및/또는 외인성 핵산 서열을 암호화하는 플라스미드는 세포에 트랜스팩션 전에 원형 플라스미드 DNA가 선형화되도록 하나 이상의 제한 효소에 의해 소화될 수 있다.

[0282] 세포에 전달될 때, 본 발명의 외인성 핵산은 그러한 포유류 프로모터 및 상기에서 논의된 유도성 프로모터를 포함하는, 세포에서 암호화된 폴리펩타이드의 발현을 위해 적합한 임의의 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 본 발명의 외인성 핵산은 또한 합성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 합성 프로모터는 비제한적으로 Jet 프로모터를 포함할 수 있다[WO 2002/012514호].

[0283] 본 발명의 유전자 변형된 세포가 인간 T 세포, 또는 이로부터 유도된 세포인 예에서, 이러한 세포는 메가뉴클레아제 및/또는 외인성 핵산 서열의 도입 이전에 활성화를 필요로 할 수 있다. 예를 들어, T 세포는 세포를 활성화시키기 위해 충분한 시기 동안 가용성이거나 지지체(즉, 비드)에 컨쥬게이션된 항-CD3 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다.

[0284] 본 발명의 유전자 변형된 세포는 하나 이상의 유도성 자살 유전자를 발현시키기 위해 추가로 변형될 수 있으며,

이의 유도는 세포 사멸을 유발하고, 시험관내 또는 생체내에서 세포의 선택적 파괴를 허용한다. 일부 예에서, 자살 유전자는 세포독성 폴리펩타이드, 비-독성 전구-약물을 세포독성 약물로 전환시키는 능력을 갖는 폴리펩타이드, 및/또는 세포 내에서 세포독성 유전자 경로를 활성화시키는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 즉, 자살 유전자는 자체적으로 또는 다른 화합물의 존재 하에서 세포 사멸을 야기시키는 산물을 암호화하는 핵산이다. 이러한 자살 유전자의 대표적인 예는 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘 키나제를 암호화하는 것이다. 추가적인 예는 수두 대상 포진 바이러스의 티미딘 키나제 및 5-플루오로시토신을 고도로 독성의 화합물인 5-플루오로우라실을 전환시킬 수 있는 박테리아 유전자 시토신 데아미나아제를 암호화하는 유전자이다. 자살 유전자는 또한, 비제한적인 예로서, 카스파제-9, 카스파제-8 또는 시토신 데아미나아제를 암호화하는 유전자를 포함한다. 일부 예에서, 카스파제-9는 다이머화의 특정 화학적 유도제(CID)를 사용하여 활성화될 수 있다. 자살 유전자는 또한, 치료 및/또는 세포독성 단클론성 항체에 대해 감작성인 세포를 제조하는 세포의 표면에서 발현되는 폴리펩타이드를 암호화한다. 추가 예에서, 자살 유전자는 항-CD20 mAb 루시투시맵에 의해 인식되는 항원성 모티프 및 자살 유전자를 발현시키는 세포의 선택을 가능하게 하는 에피토프를 포함하는 재조합 항원성 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다[예를 들어, W02013153391호에 기술된 RQR8 폴리펩타이드 참조, 이는 두 개의 리투시맵-결합 에피토프 및 QBEnd10-결합 에피토프를 포함함]. 이러한 유전자에 대하여, 리투시맵은 필요할 때 세포 결실을 유도하기 위해 대상체에 투여될 수 있다.

[0285] 2.4 약제 조성물

[0286] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 유전자 변형된 세포, 또는 본 발명의 유전자 변형된 세포의 집단, 및 약제학적 담체를 포함하는 약제 조성물을 제공한다. 이러한 약제 조성물은 공지된 기술에 따라 제조될 수 있다 [예를 들어, Remington, *The Science And Practice of Pharmacy* (21st ed. 2005) 참조]. 본 발명에 따른 약제학적 제형의 제조에서, 세포는 통상적으로 약제학적으로 허용 가능한 담체와 혼합되며, 얻어진 조성물은 대상체에 투여된다. 담체는 물론, 제형에서 임의의 다른 구성성분과 혼합 가능한 측면에서 허용 가능할 수 있고, 대상체에 유해하지 않아야 한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 약제 조성물은 대상체에서 질병의 치료에서 유용한 하나 이상의 추가적인 제제를 더 포함할 수 있다. 추가적인 실시형태에서, 유전자 변형된 세포가 유전자 변형된 인간 T 세포(또는 이로부터 유도된 세포)인 경우에, 본 발명의 약제 조성물은 생물학적 분자, 예를 들어, 시토카인(예를 들어, IL-2, IL-7, IL-15, 및/또는 IL-21)을 더 포함할 수 있으며, 이는 생체내 세포 증식 및 이식(engraftment)을 증진시킨다. 본 발명의 유전자 변형된 세포를 포함하는 약제 조성물은 추가적인 제제 또는 생물학적 분자와 동일한 조성물로 투여될 수 있거나, 별도의 조성물로 동시 투여될 수 있다.

[0287] 본 발명의 약제 조성물은 T 세포 입양 면역요법에 의해 표적화될 수 있는 임의의 질병 상태를 치료하기 위해 유용할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 약제 조성물은 암의 치료에서 유용하다. 이러한 암은 비제한적으로, 암종, 림프종, 육종, 모세포종, 백혈병, B-세포 기원의 암, 유방암, 위암, 신경모세포종, 골육종, 폐암, 흑색종, 전립선암, 결장암, 신세포 암종, 난소암, 횡문근 육종, 백혈병, 및 호지킨 림프종을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, B-세포 기원의 암은 비제한적으로, B-계통 급성 림프구성 백혈병, B-세포 만성 림프성 백혈병, 및 B-세포 비-호지킨 림프종을 포함한다.

[0288] 2.5 재조합 AAV 벡터를 생성하는 방법

[0289] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 재조합 AAV 벡터를 제공한다. 재조합 AAV 벡터는 통상적으로 HEK-293과 같은 포유류 세포에서 생성된다. 바이러스 cap 및 rep 유전자가 전달될 치료 유전자(들)(예를 들어, 엔도뉴클레아제 유전자)를 위한 공간을 만들기 위해 이의 자가 복제를 방지하도록 벡터로부터 제거되기 때문에, 패키징 세포주에서 트랜스의 이러한 것을 제공하는 것이 필요하다. 또한, 복제를 지지하는데 필요한 "헬퍼"(예를 들어, 아테노바이러스) 성분을 제공하는 것이 필요하다[Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) *Curr. Gene Ther.* 13(5): 370-81]. 흔히, 재조합 AAV 벡터는 삼중-트랜스팩션을 이용하여 생성되는데, 여기서, 세포주는 "헬퍼" 성분을 암호화하는 제1 플라스미드, cap 및 rep 유전자를 포함하는 제2 플라스미드, 및 바이러스에 패키징되도록 개재 DNA 서열을 함유하는 바이러스 ITR을 포함하는 제3 플라스미드와 트랜스팩션된다. 캡시드에 싸인 게놈(고려되는 ITR 및 개재 유전자(들))을 포함하는 바이러스 입자는 이후에 냉동-해동 사이클, 초음파처리, 세제, 또는 당해 분야에 공지된 다른 수단에 의해 세포로부터 단리된다. 입자는 이후에 세습-클로라이드 밀도 구배 원심분리 또는 친화력 크로마토그래피를 이용하여 정제되고, 후속하여 고려되는 유전자(들)로, 세포, 조직, 또는 유기체, 예를 들어, 인간 환자에게 전달된다.

[0290] 재조합 AAV 입자가 통상적으로 세포에서 생성(제조)되기 때문에, 부위-특이적 엔도뉴클레아제가 패키징 세포에서 발현되지 않게 하기 위하여 본 발명을 실행하는 데 주의를 기울인다. 본 발명의 바이러스 게놈이 엔도뉴클레

아제에 대한 인식 서열을 포함하기 때문에, 패키징 세포주에서 발현된 임의의 엔도뉴클레아제는 바이러스 입자에 패키징될 수 있기 전에 바이러스 계놈을 절단할 수 있을 것이다. 이는 감소된 패키징 효율 및/또는 분절된 계놈의 패키징을 야기시킬 것이다. 여러 방법은 하기를 포함하는, 패키징 세포에서 엔도뉴클레아제 발현을 방지하기 위해 사용될 수 있다:

[0291]

1. 엔도뉴클레아제는 패키징 세포에서 활성적이지 않은 조직-특이적 프로모터의 조절 하에서 배치될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터가 근육 조직에 엔도뉴클레아제 유전자(들)의 전달을 위해 개발되는 경우에, 근육-특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 근육-특이적 프로모터의 예는 C5-12(Liu, *et al.* (2004) *Hum Gene Ther.* 15:783-92), 근육-특이적 크레아틴 키나제(MCK) 프로모터(Yuasa, *et al.* (2002) *Gene Ther.* 9:1576-88), 또는 평활근 22(SM22) 프로모터(Haase, *et al.* (2013) *BMC Biotechnol.* 13:49-54)를 포함한다. CNS(뉴런)-특이적 프로모터의 예는 NSE, 시냅신, 및 MeCP2 프로모터(Lentz, *et al.* (2012) *Neurobiol Dis.* 48:179-88)를 포함한다. 간-특이적 프로모터의 예는 알부민 프로모터(예를 들어, Palb), 인간 $\alpha 1$ -항트립신(예를 들어, PalAT), 및 헤모펙신(예를 들어, Phpx)(Kramer, MG *et al.*, (2003) *Mol. Therapy* 7:375-85)을 포함한다. 눈-특이적 프로모터의 예는 옵신, 및 각각 상피-특이적 K12 프로모터(Martin KRG, Klein RL, and Quigley HA (2002) *Methods* (28): 267-75)(Tong Y, *et al.*, (2007) *J Gene Med*, 9:956-66)를 포함한다. 이러한 프로모터, 또는 당해 분야에 공지된 다른 조직-특이적 프로모터는 HEK-293 세포에서 고도로-활성적이지 않고, 이에 따라, 본 발명의 바이러스 벡터에 도입될 때 패키징 세포에서 상당한 수준의 엔도뉴클레아제 유전자 발현을 산출할 것으로 예상되지 않을 것이다. 유사하게, 본 발명의 바이러스 벡터는 양립 불가능한 조직 특이적 프로모터(즉, 널리 공지된 HeLa 세포주(인간 상피 세포))를 사용하거나 간-특이적 헤모펙신 프로모터를 사용하면서 다른 세포주의 사용을 고려한다. 조직 특이적 프로모터의 다른 예는 활액 육종 PDZD4(소뇌), C6(간), ASB5(근육), PPP1R12B(심장), SLC5A12(신장), 콜레스테롤 조절 APOM(간), ADPRHL1(심장), 및 단일 유전자 기형 중후군 TP73L(근육)(Jacox E, *et al.*, (2010) *PLoS One* v.5(8):e12274)을 포함한다.

[0292]

2. 대안적으로, 벡터는 엔도뉴클레아제가 발현될 가능성이 없는 상이한 종으로부터의 세포에서 패키징될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 입자는 비-포유류 패키징 세포에서 활성적이지 않는, 널리 공지된 시토메갈로바이러스 - 또는 SV40 바이러스-초기 프로모터와 같은 포유류 프로모터를 사용하여 미생물, 곤충, 또는 식물 세포에서 생성될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 바이러스 입자는 문헌[Gao, *et al.* (Gao, H., *et al.* (2007) *J. Biotechnol.* 131(2):138-43)]에 기술된 바와 같이 바쿨로바이러스 시스템을 사용하여 곤충 세포에서 생성된다. 포유류 프로모터의 조절 하에서 엔도뉴클레아제는 이러한 세포에서 발현될 가능성이 없다[Airenne, KJ, *et al.* (2013) *Mol. Ther.* 21(4):739-49]. 또한, 곤충 세포는 포유류 세포와는 다른 mRNA 접합 모티프를 사용한다. 이에 따라, 엔도뉴클레아제의 암호화 서열에 포유류 인트론, 예를 들어, 인간 성장 호르몬(HGH) 인트론 또는 SV40 큰 T 항원 인트론을 도입하는 것이 가능하다. 이러한 인트론이 곤충 세포에서 전-mRNA 전사체로부터 효과적으로 스플라이싱되지 않기 때문에, 곤충 세포는 기능적 엔도뉴클레아제를 발현시키지 않을 것이고, 전장 계놈을 패키징할 것이다. 반대로, 얻어진 재조합 AAV 입자가 전달되는 포유류 세포는 전-mRNA를 적절하게 접합할 것이고, 기능적 엔도뉴클레아제 단백질을 발현시킬 것이다. Haifeng Chen은 곤충 패키징 세포에서 독성 단백질 바르나제 및 디프테리아 독소 분절 A의 발현을 감소시켜 이들 독소 유전자를 보유하는 재조합 AAV 벡터의 생성을 가능하게 하는, HGH 및 SV40 큰 T 항원 인트론의 사용을 보고하였다[Chen, H (2012) *Mol Ther Nucleic Acids.* 1(11): e57].

[0293]

3. 엔도뉴클레아제 유전자는 소-분자 유도제가 엔도뉴클레아제 발현을 위해 요구되도록, 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 유도성 프로모터의 예는 Tet-On 시스템(Clontech; Chen H., *et al.*, (2015) *BMC Biotechnol.* 15(1):4) 및 RheoSwitch 시스템(Intrexon; Sowa G., *et al.*, (2011) *Spine*, 36(10): E623-8)을 포함한다. 두 시스템 모두뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 유사한 시스템은 소분자 활성제(독시시클린 또는 엑디손, 각각)에 반응하여 전사를 활성화시키는 리간드-유도성 전사 인자(Tet 억제제 및 엑디손 수용체 각각의 변종)에 의존적이다. 이러한 리간드-유도성 전사 활성제를 사용하여 본 발명을 실행하는 것은 1) (a) 전사 인자를 위한 결합 부위(들)를 갖는 엔도뉴클레아제 유전자를 상응하는 전사 인자에 반응하는 프로모터의 조절 하에 배치시키고; 2) 패키징된 바이러스 계놈에서 전사 인자를 암호화하는 유전자를 포함하는 것을 포함한다. 후자 단계는 전사 활성제가 또한 동일한 세포에 제공되지 않는 경우에, 재조합 AAV 전달 이후에 엔도뉴클레아제가 표적 세포 또는 조직에서 발현되지 않기 때문에 필요하다. 전사 활성제는 이후에, 동족 소-분자 활성제로 처리되는 세포 또는 조직에서만 엔도뉴클레아제 유전자 발현을 유도한다. 이러한 방법은 소-분자 유도제가 언제 그리고 어떤 조직에 전달되는 지를 선택함으로써 엔도뉴클레아제 유전자 발현을 시공간적인 방식으로 조절할 수 있기 때문에 유리하다. 그러나, 상당히 제한된 운반 능력을 갖는, 바이러스 계놈에서 유도제를 포함한다는 요구는 이

러한 방법에 단점을 생성시킨다.

[0294] 4. 다른 바람직한 실시형태에서, 재조합 AAV 입자는 엔도뉴클레아제의 발현을 방해하는 전사 억제제를 발현시키는 포유류 세포주에서 생성된다. 전사 억제제는 당해 분야에 공지되어 있고, Tet-억제제, Lac-억제제, Cro 억제제, 및 Lambda-억제제를 포함한다. 다수의 핵 호르몬 수용체, 예를 들어, 엑디손 수용체는 또한, 이의 동족 호르몬 리간드의 부재 하에서 전사 억제제로서 작용한다. 본 발명을 실행하기 위해, 패키징 세포는 전사 억제제를 암호화하는 벡터로 트랜스펙션/형질도입되며, 바이러스 게놈(패키징 벡터)에서의 엔도뉴클레아제 유전자는 억제제가 프로모터를 침묵시키도록 억제제에 대한 결합 부위를 포함하도록 변형된 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 전사 억제제를 암호화하는 유전자는 다양한 위치에 배치될 수 있다. 이는 별도의 벡터 상에서 암호화될 수 있다. 이는 ITR 서열의 외측의 패키징 벡터에 도입될 수 있으며, 이는 cap/rep 벡터 또는 아데노바이러스 헬퍼 벡터에 도입될 수 있거나, 가장 바람직하게는, 이는 구성적으로 발현되도록, 패키징 세포의 게놈에 안정적으로 통합될 수 있다. 전사 억제제 부위를 도입하기 위해 통상적인 포유류 프로모터를 변형시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Chang 및 Roninson은 Lac 억제제에 대한 작동제를 포함하기 위해 강한 구성적 CMV 및 RSV 프로모터를 변형시켰고, 변형된 프로모터로부터의 유전자 발현이 억제제를 발현시키는 세포에서 크게 감소됨을 나타낸다[Chang BD, and Roninson IB (1996) *Gene* 183:137-42]. 비-인간 전사 억제제의 사용은, 엔도뉴클레아제 유전자의 전사가 얻어진 재조합 AAV 벡터로 형질도입된 표적 세포 또는 조직에서가 아닌, 억제제를 발현시키는 패키징 세포에서만 억제될 것임을 보장한다.

[0295] 2.6 조작된 뉴클레아제 변종

[0296] 본 발명의 실시형태는 본 명세서에 기술된, 조작된 뉴클레아제, 및 특히 재조합 메가뉴클레아제, 및 이의 변종을 포함한다. 본 발명의 추가 실시형태는 본 명세서에 기술된 재조합 메가뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 및 이러한 폴리뉴클레오타이드의 변종을 포함한다.

[0297] 본 명세서에서 사용되는 "변종"은 실질적으로 유사한 서열을 의미하는 것으로 의도된다. "변종" 폴리펩타이드는 천연 단백질에서 하나 이상의 내부 부위에서의 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 첨가 및/또는 천연 폴리펩타이드에서 하나 이상의 부위에서의 하나 이상의 아미노산의 치환에 의한 "천연" 폴리펩타이드로부터 유도된 폴리펩타이드를 의미하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 사용되는 "천연" 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 변동이 유도된 모 서열을 포함한다. 실시형태에 포함된 변종 폴리펩타이드는 생물학적 활성이다. 즉, 이러한 것은 천연 단백질의 요망되는 생물학적 활성, 즉, 예를 들어, TRC 1-2 인식 서열(서열번호 3), TRC 3-4 인식 서열(서열번호 4), 및 TRC 7-8 인식 서열(서열번호 5)을 포함하는 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역(서열번호 1)에서 발견된 인식 서열을 인식하고 절단하는 능력을 계속 지닌다. 이러한 변종은 예를 들어, 인간 조작으로부터 얻어질 수 있다. 실시형태의 천연 폴리펩타이드의 생물학적 활성 변종(예를 들어, 서열번호 8 내지 32), 또는 본 명세서에 기술된 인식 절단-부위 결합 서브유닛의 생물학적 활성 변종(예를 들어, 서열번호 33-82)은 본원의 다른 곳에 기술된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정하는 경우 천연 폴리펩타이드 또는 천연 서브유닛의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99%의 서열 동일성을 가질 것이다. 실시형태의 폴리펩타이드 또는 서브유닛의 생물학적 활성 변종은 그러한 폴리펩타이드 또는 서브유닛과 약 1 내지 40개의 아미노산 잔기만큼 적게, 약 1 내지 20개만큼 적게, 약 1 내지 10개만큼 적게, 약 5개만큼 적게, 4, 3, 2, 또는 심지어 1개의 아미노산 잔기만큼 적게 다를 수 있다.

[0298] 실시형태의 폴리펩타이드는 아미노산 치환, 결실, 절단, 및 삽입을 포함하는 다양한 방식으로 변경될 수 있다. 이러한 조작 방법은 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 변종은 DNA에서 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 돌연변이 유발 및 폴리뉴클레오타이드 변형을 위한 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다[예를 들어, 문헌[Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; 미국 특허 제4,873,192호; Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) 및 여기에 인용된 참고문헌] 참조]. 고려되는 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 적절한 아미노산 치환과 관련한 안내는 문헌[Dayhoff *et al.* (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)]의 모델에서 발견될 수 있으며, 이러한 문헌은 본 명세서에 참고로 포함된다. 보존적 치환, 예를 들어, 하나의 아미노산을 유사한 성질을 갖는 다른 아미노산으로의 교환은 최적일 수 있다.

[0299] 야생형 I-CreI 메가뉴클레아제의 DNA 인식 도메인에 대한 아미노산 변형의 실질적인 수가 이전에 확인되었으며 [예를 들어, 미국특허 제8,021,867호], 이는 단독으로 또는 조합하여, 얻어진 적합하게 설계된 메가뉴클레아제

가 야생형 효소와 상이한 절반-부위 특이성을 갖도록, DNA 인식 서열 절반-부위 내의 개별 염기에서 변형된 특이성을 갖는 재조합 메가뉴클레아제를 야기시킨다. 표 4는 인식 절반-부위의 각 절반-부위 위치(-1 내지 -9)에 존재하는 염기를 기초로 한 특이성을 향상시키기 위해 재조합 메가뉴클레아제 모노머 또는 서브유닛에서 제조될 수 있는 잠재적인 치환을 제공한다.

표 4

Posn.	선호된 센스-가닥 염기										
	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	R70* H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75* H139 Q46* H46*				T46*			G70 A70 S70 G46*
-2	Q70 T44* A44* V44* I44* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	Q44*	C44*						
-3	Q68 C24* I24*	E68 F68 K24* R24*	R68	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 Q26*			S26*
-5		E42	R42			K28*	C28* Q42				M66 K66
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 I40 V40 C79 I79 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						S40 S28*
-7	N30* Q38	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38			C38				H38 N38 Q30*
-8	F33	E33	F33	L33		R32*	R33				

[0300]

선회된 센스-가닥 염기										
	Y33	D33	H33	V33 I33 F33 C33						
-9		E32	R32 K32	L32 V32 A32 C32				D32 I32		S32 N32 H32 Q32 T32

[0301]

[0302]

폴리뉴클레오타이드에 대하여, "변종"은 천연 폴리뉴클레오타이드 내의 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 및/또는 첨가를 포함한다. 당업자는 개방 리딩 프레임이 유지되도록 실시형태의 핵산의 변종이 삭제화될 것을 인식할 것이다. 폴리뉴클레오타이드에 대하여, 보존적 변종은, 유전 코드의 퇴화로 인하여 실시형태의 폴리펩타이드 중 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 그러한 서열을 포함한다. 변종 폴리뉴클레오타이드는 합성적으로 유도된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 부위-지향 돌연변이유발을 이용함으로써 생성된 것을 포함하지만, 이는 실시형태의 재조합 메가뉴클레아제를 암호화한다. 일반적으로, 실시형태의 특정 폴리뉴클레오타이드의 변종은 본원의 다른 곳에 기술된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정하는 경우 특정 폴리뉴클레오타이드에 대해 적어도 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상의 서열 동일성을 가질 것이다. 실시형태의 특정 폴리뉴클레오타이드의 변종(즉, 기준 폴리뉴클레오타이드)는 또한, 변종 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 기준 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드 간의 퍼센트 서열 동일성의 비교에 의해 평가될 수 있다.

[0303]

본 명세서에 포함된 단백질 서열의 결실, 삽입, 및 치환은 폴리펩타이드의 특징에서 라디칼 변화를 생성시키는 것으로 예상되지 않는다. 그러나, 그렇게 하기 전에 치환, 결실 또는 삽입의 정확한 효과를 예측하기 어려울 때, 당업자는 그러한 효과가 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자(서열번호 1) 내에서 발견된 인식 서열을 우선적으로 인식하고 절단하는 이의 능력에 대해 폴리펩타이드를 스크리닝함으로써 평가될 것을 인식할 것이다.

[0304]

실시에

[0305]

본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되는데, 이러한 실시예는 제한적인 것으로 해석되지 않아야 한다. 당업자는 본 명세서에 기술된 특정 물질 및 절차에 대한 다수의 균등물을 일상적인 실험을 이용하여 인식하거나 확인할 수 있다. 이러한 균등물은 하기 실시예에 따른 청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

[0306]

실시에 1

[0307]

TRC 인식 서열을 인식하고 절단하는 메가뉴클레아제의 특징분석

[0308]

1. TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 절단하는 메가뉴클레아제

[0309]

인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역에 존재하는, TRC 1-2 인식 서열(서열번호 3)을 인식하고 절단하기 위해, 본 명세서에서 총괄적으로 "TRC 1-2 메가뉴클레아제"로서 지칭되는, 재조합 메가뉴클레아제(서열번호 8 내지 27)를 조작하였다. 각 TRC 1-2 재조합 메가뉴클레아제는 SV40으로부터 유도된 N-말단 뉴클레아제-국소화 신호, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛, 링커 서열, 및 제2 메가뉴클레아제 서브유닛을 포함한다. 각 TRC 1-2 메가뉴클레아제에서 제1 서브유닛은 서열번호 3의 TRC1 인식 절반-부위에 결합하며, 제2 서브유닛은 TRC2 인식 절반-부위에 결합한다(도 1a 참조).

[0310]

도 2 및 도 3에 예시된 바와 같이, TRC1-결합 서브유닛 및 TRC2-결합 서브유닛 각각은 각각 HVR1 및 HVR2로서 지칭되는 56개의 염기쌍 초가변 영역을 포함한다. TRC1-결합 서브유닛은 80번 위치 또는 271번 위치(Q 또는 E 잔기를 포함함)를 제외하고 HVR1 영역 외측에서 일치하고, HVR1 영역 내에서 고도로 보존된다. 유사하게, TRC2-결합 서브유닛은 또한 80번 위치 또는 271번 위치(Q 또는 E 잔기를 포함함) 및 R 잔기(회색 음영처리되고 밑줄 치짐)를 포함하는 메가뉴클레아제 TRC 1-2x.87 EE, TRC 1-2x.87 QE, TRC 1-2x.87 EQ, TRC 1-2x.87, 및 TRC 1-2x.163의 330번 위치를 제외하고 HVR2 영역 외측에서 일치한다. HVR1 영역과 같이, HVR2 영역은 또한 고도로 보

존된다.

- [0311] 서열번호 8 내지 27의 TRC1-결합 영역은 도 2에 예시되어 있고, 각각 서열번호 33 내지 52로서 제공된다. 서열번호 33 내지 52 각각은 서열번호 33에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유하며, 이는 메가뉴클레아제 TRC 1-2x.87 EE(서열번호 8)의 TRC1-결합 영역이다. 서열번호 8 내지 27의 TRC2-결합 영역은 도 3에 예시된 바와 같이, 각각 서열번호 58 내지 77로서 제공된다. 서열번호 58 내지 77 각각은 서열번호 58에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유하며, 이는 메가뉴클레아제 TRC 1-2x.87 EE(서열번호 8)의 TRC2-결합 영역이다.
- [0312] 2. TRC 3-4 인식 서열을 인식하고 절단하는 메가뉴클레아제
- [0313] 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역에 존재하는 TRC 3-4 인식 서열(서열번호 4)을 인식하고 절단하기 위해 본 명세서에서 총괄적으로 "TRC 3-4 메가뉴클레아제"로서 지칭되는, 재조합 메가뉴클레아제(서열번호 28 및 29)를 조작하였다. 각 TRC 3-4 재조합 메가뉴클레아제는 SV40으로부터 유도된 N-말단 뉴클레아제-국소화 신호, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛, 링커 서열, 및 제2 메가뉴클레아제 서브유닛을 포함한다. 각 TRC 3-4 메가뉴클레아제에서 제1 서브유닛은 서열번호 4의 TRC3 인식 절반-부위에 결합하며, 제2 서브유닛은 TRC4 인식 절반-부위에 결합한다(도 1a 참조).
- [0314] 도 4 및 도 5에 예시된 바와 같이, TRC3-결합 서브유닛 및 TRC4-결합 서브유닛 각각은 각각 HVR1 및 HVR2로서 지칭되는 56개의 염기쌍 초가변 영역을 포함한다. TRC3-결합 서브유닛은 80번 위치 또는 271번 위치(Q 또는 E 잔기를 포함함)를 제외하고 HVR1 영역 외측에서 일치하고, HVR1 영역 내에서 고도로 보존된다. 유사하게, TRC4-결합 서브유닛은 80번 위치 또는 271번 위치(Q 또는 E 잔기를 포함함)를 제외하고 HVR2 영역 외측에서 일치하고, HVR2 영역 내에서 고도로 보존된다.
- [0315] 서열번호 28 및 29의 TRC3-결합 영역은 도 4에 예시되고, 각각 서열번호 53 및 54로서 제공된다. 서열번호 53 및 54는 96.6%의 서열 동일성을 공유한다. 서열번호 28 및 29의 TRC4-결합 영역은 도 5에 예시되고, 각각 서열번호 78 및 79로서 제공된다. 서열번호 78 및 79는 또한 96.6%의 서열 동일성을 공유한다.
- [0316] 3. TRC 7-8 인식 서열을 인식하고 절단하는 메가뉴클레아제
- [0317] 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역에 존재하는 TRC 7-8 인식 서열(서열번호 5)을 인식하고 절단하기 위해 본 명세서에서 총괄적으로 "TRC 7-8 메가뉴클레아제"로서 지칭되는, 재조합 메가뉴클레아제(서열번호 30 내지 32)를 조작하였다. 각 TRC 7-8 재조합 메가뉴클레아제는 SV40으로부터 유도된 N-말단 뉴클레아제-국소화 신호, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛, 링커 서열, 및 제2 메가뉴클레아제 서브유닛을 포함한다. 각 TRC 7-8 메가뉴클레아제에서 제1 서브유닛은 서열번호 5의 TRC7 인식 절반-부위에 결합하며, 제2 서브유닛은 TRC8 인식 절반-부위에 결합한다(도 1a 참조).
- [0318] 도 6 및 7에 예시된 바와 같이, TRC7-결합 서브유닛 및 TRC8-결합 서브유닛 각각은 각각 HVR1 및 HVR2로서 지칭된 56개의 염기쌍 초가변 영역을 포함한다. TRC7-결합 서브유닛은 80번 위치 또는 271번 위치(Q 또는 E 잔기를 포함함)를 제외하고 HVR1 영역 외측에서 일치하고, HVR1 영역 내에서 고도로 보존된다. 유사하게, TRC8-결합 서브유닛은 80번 위치 또는 271번 위치(Q 또는 E 잔기를 포함함)를 제외하고 HVR2 영역 외측에서 일치하고, HVR2 영역 내에서 고도로 보존된다.
- [0319] 서열번호 30 내지 32의 TRC7-결합 영역은 도 6에 예시되어 있고, 각각 서열번호 55 내지 57로서 제공된다. 서열번호 55 내지 57 각각은 서열번호 55에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유하며, 이는 메가뉴클레아제 TRC 7-8x.7(서열번호 30)의 TRC7-결합 영역이다. 서열번호 30 내지 32의 TRC8-결합 영역은 도 7에 예시되어 있고, 각각 서열번호 80 내지 82로서 제공된다. 서열번호 80 내지 82 각각은 서열번호 80에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유하며, 이는 메가뉴클레아제 TRC 7-8x.7(서열번호 30)의 TRC8-결합 영역이다.
- [0320] 4. CHO 세포 리포터 검정에서 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 인식 서열의 절단
- [0321] TRC 1-2, TRC 3-4, 및 TRC 7-8 메가뉴클레아제가 이의 개개 인식 서열(각각 서열번호 3, 4 및 5)을 인식하고 절단할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, 각 재조합 메가뉴클레아제를 전술된 CHO 세포 리포터 검정을 이용하여 평가하였다[W0/2012/167192호 및 도 8 참조]. 검정을 수행하기 위해, 세포의 계층에 통합된 비-작용성 녹색 형광 단백질(GFP) 유전자 발현 카세트를 운반하는 CHO 리포터 세포주를 생성하였다. 메가뉴클레아제에 의해 인식 서열의 세포내 절단이 기능적 GFP 유전자를 야기시키는 상동 재조합 이벤트를 자극하도록, 한 쌍의 인식 서열에 의해 각 세포주에서 GFP 유전자를 중단시켰다.
- [0322] 본 연구를 위해 개발된 CHO 리포터 세포주에서, GFP 유전자에 삽입된 하나의 인식 서열은 TRC 1-2 인식 서열(서

열번호 3), TRC 3-4 인식 서열(서열번호 4), 또는 TRC 7-8 인식 서열(서열번호 5)이었다. GFP 유전자에 삽입된 제2 인식 서열은 CHO-23/24 인식 서열이었으며, 이는 "CHO-23/24"로 불리는 대조 메가뉴클레아제에 의해 인식되고 절단된다. TRC 1-2 인식 서열 및 CHO-23/24 인식 서열을 포함하는 CHO 리포터 세포는 본 명세서에서 "TRC 1-2 세포"로서 지칭된다. TRC 3-4 인식 서열 및 CHO-23/24 인식 서열을 포함하는 CHO 리포터 세포는 본 명세서에서 "TRC 3-4 세포"로서 지칭된다. TRC 7-8 인식 서열 및 CHO-23/24 인식 서열을 포함하는 CHO 리포터 세포는 본 명세서에서 "TRC 7-8 세포"로서 지칭된다.

[0323] CHO 리포터 세포를 이의 상응하는 제조법 메가뉴클레아제(예를 들어, TRC 1-2 세포를 TRC 1-2 메가뉴클레아제를 암호화하는 플라스미드 DNA로 트랜스펙션시킴)를 암호화하고 CHO-23/34 메가뉴클레아제를 암호화하는 플라스미드 DNA로 트랜스펙션시켰다. 각 검정에서, 4×10^5 CHO 리포터 세포를 제조업체 설명서에 따라 Lipofectamine 2000(ThermoFisher)을 이용하여 96-웰 플레이트에서 50 ng의 플라스미드 DNA로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 48시간에, 트랜스펙션되지 않은 음성 대조군(TRC 1-2bs)과 비교하여 GFP-양성 세포의 백분율을 결정하기 위해 세포를 유세포 분석법에 의해 평가하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, 모든 TRC 1-2, TRC 3-4, 및 TRC 7-8 메가뉴클레아제는 음성 대조군을 크게 초과하는 빈도로 이의 상응하는 인식 서열을 포함하는 세포주에서 GFP-양성 세포를 생성시킨다는 것으로 발견되었다.

[0324] TRC 1-2x.87 QE, TRC 1-2x.87 EQ, 및 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제의 효능을 또한 시간-의존 방식으로 결정하였다. 이러한 연구에서, TRC 1-2 세포(1×10^6)를 제조업체 설명서에 따라 BioRad Gene Pulser Xcell을 이용하여 세포 당 메가뉴클레아제 mRNA의 1×10^6 복사체로 전기천공하였다. 트랜스펙션 후 1, 4, 6, 8, 및 12일째에, GFP-양성 세포의 백분율을 결정하기 위해 세포를 유세포 분석법에 의해 평가하였다. 도 10에 도시된 바와 같이, 각 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 트랜스펙션 후 2일째에 높은 효율을 나타내었으며, 50% 초과 GFP-양성 세포가 관찰되었다. 이러한 효과는 12일 기간에 걸쳐 지속되었으며, 세포 독성의 증거가 관찰되지 않았다.

[0325] 5. 결론

[0326] 이러한 연구는, 본 발명에 포함된 TRC 1-2 메가뉴클레아제, TRC 3-4 메가뉴클레아제, 및 TRC 7-8 메가뉴클레아제가 세포에서 이의 개개 인식 서열을 효율적으로 표적화하고 절단할 수 있음을 입증하였다.

[0327] 실시예 2

[0328] T 세포에서 TRC 인식 서열의 절단 및 세포-표면 T 세포 수용체 발현의 억제

[0329] 1. 주르카트 세포에서 TRC 1-2 인식 서열의 절단

[0330] 이러한 연구는 본 발명에 포함된 TRC 1-2 메가뉴클레아제가 주르카트 세포(불멸화된 인간 T 림프구 세포주)에서 TRC 1-2 인식 서열을 절단할 수 있다는 것을 입증하였다. 1×10^6 주르카트 세포를 제조업체 설명서에 따라 BioRad Gene Pulser Xcell을 이용하여 세포 당 제공된 TRC 1-2 메가뉴클레아제 mRNA의 8×10^6 복사체로 전기천공하였다. 트랜스펙션 후 72시간에, 게놈 DNA(gDNA)를 세포로부터 수확하고, 내인성 TRC 1-2 인식 서열에서 유전자 변형을 추정하기 위해 T7 엔도뉴클레아제 I(T7E) 검정을 수행하였다(도 11). T7E 검정에서, TRC 1-2 유전자 좌를 TRC 1-2 인식 서열의 측면에 있는 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다. TRC 1-2 유전자 좌 내에 인텔(랜덤 삽입 또는 결실)이 존재하는 경우에, 얻어진 PCR 생성물은 야생형 대립유전자와 돌연변이 대립유전자의 혼합물로 이루어질 것이다. PCR 생성물을 변형시키고, 서서히 재어닐링하였다. 느린 재어닐링은 미스매칭 염기 및/또는 벌지(bulge)를 야기시키는, 야생형 및 돌연변이 대립유전자로 이루어진 헤테로듀플렉스를 형성할 수 있다. T7E1 효소는 미스매치 부위에서 절단하여, 겔 전기영동에 의해 시각화될 수 있는 절단 생성물을 형성시킨다. 도 11은 T7E1 검정에서 TRC 1-2 메가뉴클레아제의 13개의 상이한 버전이 양성 결과를 생성하였음을 나타내는데, 이는 내인성 TRC 1-2 인식 서열에서 인텔의 효과적인 생성을 명시하는 것이다.

[0331] TRC 1-2 메가뉴클레아제의 절단 성질을 추가로 시험하기 위해, 용량-반응 실험을 주르카트 세포에서 수행하였다. 1×10^6 주르카트 세포를 제조업체 설명서에 따라 BioRad Gene Pulser Xcell을 이용하여 세포 당 3 μ g 또는 1 μ g의 제공된 TRC 1-2 메가뉴클레아제 mRNA로 전기천공하였다. 트랜스펙션 후 96시간에, gDNA를 수확하고, T7E1 검정을 상술한 바와 같이 수행하였다. 도 12에 도시된 바와 같이, 15개의 상이한 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 3개의 상이한 버전의 TRC 1-2x.87 메가뉴클레아제를 포함하는 내인성 TRC 1-2 인식 부위에서의 절단을 나타내었다. TRC 1-2x.87 EE는 주르카트 세포에서 독성을 거의 없거나 전혀 나타내지 않으면서 T7E1 검정에서 강한 신호를 발생시키는, 특히 잘 작동하였다.

2. 인간 T 세포에서 TRC 1-2 인식 서열의 절단

이러한 연구는 본 발명에 포함된 TRC 1-2 메가뉴클레아제가 공여자로부터 얻어진 인간 T 세포에서 TRC 1-2 인식 서열을 절단할 수 있음을 나타내었다. CD3⁺ T 세포를 3일 동안 항-CD3 및 항-CD28 항체로 자극시키고, 이후에, 제조업체 설명서에 따라 Amaxa 4D-Nucleofector(Lonza)를 이용하여 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제를 암호화하는 mRNA로 전기천공하였다. 트랜스펙션 후 3일 및 7일째에, gDNA를 수확하고, T7E1 검정을 상술한 바와 같이 수행하였다. 도 13A는 TRC 1-2x.87 EE가 인간 T 세포에서의 내인성 TRC 1-2 인식 서열에서 돌연변이를 효과적으로 도입함을 나타내는데, 이는 메가뉴클레아제가 TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 절단함을 명시하는 것이다. 절단 생성물의 강도는 트랜스펙션 후 3일 내지 7일 사이에 변동을 나타내지 않는데, 이는 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제로 인해 독성이 거의 없거나 전혀 없음을 시사하는 것이다. 내인성 TRC 1-2 인식 서열에서의 돌연변이가 T 세포 수용체의 표면 발현을 제거하는데 충분한 지의 여부를 결정하기 위해, 세포를 항-CD3 항체를 사용하여 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 도 13B는 트랜스펙션된 T 세포의 대략 50%가 CD3에 대해 음성으로 염색되었음을 나타내는데, 이는 T 세포 수용체의 턴아웃을 명시하는 것이다. CD3 음성 집단은 트랜스펙션 후 3일 내지 7일 사이에 현저하게 변하지 않았으며, 이는 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제와 관련된 독성이 거의 없거나 전혀 없거나, T 세포 수용체 발현의 손실을 추가로 명시하는 것이다.

CD3 발현의 상실이 TRC 1-2 인식 부위에서 돌연변이에 기인함을 입증하기 위해, gDNA를 트랜스펙션된 T 세포로부터 수확하고, TRC 1-2 인식 부위 유전자 좌를 PCR에 의해 증폭하였다. PCR 생성물을 제조업체 설명서에 따라 Zero Blunt PCR 클로닝 키트(Thermo Fisher)를 이용하여 pCR-블런트 벡터에 클로닝하였다. 개별 콜로니를 골라내고, 미니-준비된 플라스미드를 서열화하였다. 도 14는 TRC 1-2 인식 서열에서 관찰된 여러 대표적인 결실의 서열을 도시한 것이다. 관찰된 서열은 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 DNA 이중-가닥 손상의 수리를 연결하는 비-상동성 단부로부터 형성된 결실에 대해 통상적이다.

TRC 1-2x.87 EE 이외에, 다른 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 TRC 1-2x.87 EE에 대해 이전에 관찰된 턴아웃 보다 적은 정도이지만, TRC 1-2x.55, 및 TRC 1-2x.72를 포함하는, 인간 T 세포에서 T 세포 수용체를 턴아웃할 수 있다 [표 5 및 표 6]. TRC 1-2x.72 Q47E는 메가뉴클레아제(아미노산 47)의 활성 부위에서 돌연변이를 수반하고, 음성 대조군으로서 제공한다.

표 5

메가뉴클레아제	% CD3 ⁺ 세포	
	3 일	6 일
TRC 1-2x.72 Q47E	0.38	1.1
TRC 1-2x.55	3.11	10.84

표 6

메가뉴클레아제	% CD3 ⁺ 세포	
	3 일	5 일
TRC 1-2x.72 Q47E	0.29	0.4
TRC 1-2x.72	2.09	4.19

3. 결론

이러한 연구는, 본 발명에 포함된 TRC 1-2 메가뉴클레아제가 주르카트 세포(불멸화된 T 림프구 세포주) 및 인간 공여자로부터 얻어진 T 세포 둘 모두에서 TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 절단할 수 있음을 나타내었다. 또한, 이러한 연구는 NHEJ가 인텔의 출현에 의해 입증된 바와 같이, 메가뉴클레아제 절단부위에서 일어남을 나타내었다. 또한, TRC 1-2 메가뉴클레아제는 공여자로부터 얻어진 인간 T 세포 상에서 T 세포 수용체의 세포-표면 발현을 감소시킴을 나타내었다.

실시예 3

[0341] 인간 T 세포에 외인성 핵산을 도입하기 위한 재조합 AAV 벡터

[0342] 1. 재조합 AAV 벡터

[0343] 본 연구에서, 상동 재조합을 통해 TRC 1-2 인식 서열에서 인간 T 세포의 게놈에 EagI 제한 부위를 포함하는 외인성 핵산 서열을 도입하기 위해 두 개의 재조합 AAV 벡터(AAV405 및 AAV406로서 지칭됨)를 설계하였다. 각 재조합 AAV 벡터를 삼중-트랜스펙션 프로토콜을 이용하여 제조하였으며, 여기서, 세포주는 복제를 지지하기 위해 필요한 "헬퍼" 성분(예를 들어, 아데노바이러스)을 암호화하는 제1 플라스미드, cap 및 rep 유전자를 포함하는 제2 플라스미드, 및 바이러스(예를 들어, 외인성 핵산 서열)에 패키징되도록 중단 DNA 서열을 함유한 바이러스 반전 말단 반복부(ITR)를 포함하는 제3 플라스미드로 트랜스펙션된다[Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) *Curr. Gene Ther.* 13(5): 370-81 참조]. 도 15는 뉴클레아제 절단부위에서 세포 게놈에 외인성 핵산 서열을 도입하기 위해 재조합 AAV 벡터를 사용하기 위한 일반적인 방법을 예시한 것이다.

[0344] AAV405를 도 16에 예시된 플라스미드(서열번호 107)를 사용하여 제조하였다. 도시된 바와 같이, AAV405 플라스미드는 일반적으로 5' ITR에 대한 서열, CMV 인핸서 및 프로모터 서열, 5' 상동성 암, EagI 제한 부위를 포함하는 핵산 서열, SV40 폴리(A) 신호 서열, 3' 상동성 암, 및 3' ITR을 포함한다. AAV406을 도 17에 예시된 플라스미드(서열번호 108)를 사용하여 제조하였다. 도시된 바와 같이, AAV406 플라스미드는 AAV405의 서열과 유사한 서열을 포함하지만, 5' 상동성 암의 업스트림에 CMV 인핸서 및 프로모터 서열은 결여되어 있다. 본 AAV 연구는 AAV 형질도입 효율을 위한 양성 대조군으로서 도입된, GFP를 암호화하는 AAV 벡터(GFP-AAV)의 사용을 더 포함하였다.

[0345] 2. TRC 1-2 인식 서열에 외인성 핵산 서열을 도입한

[0346] TRC 1-2 메가뉴클레아제로 이중-가닥 손상의 생성 후에 AAV 주형이 상동성 유도 수리(HDR)를 위해 적합한 지의 여부를 시험하기 위하여, 일련의 실험을 인간 T 세포를 사용하여 수행하였다. 제1 실험에서, TRC 1-2 RNA로의 전기천공 및 재조합 AAV 벡터로의 형질도입의 시점을 결정하였다. 인간 CD3+ T 세포를 3일 동안 항-CD3 및 항-CD28 항체로 자극시키고, 이후에, 제조업체 설명서에 따라 Amaxa 4D-Nucleofector(Lonza)를 이용하여 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제(1 μ g)를 암호화하는 mRNA로 전기천공하였다. 트랜스펙션 후 2, 4, 또는 8시간째에, 세포를 GFP-AAV (세포 당 $1e^5$ 바이러스 게놈)로 형질도입하였다. 형질도입 후 72시간째에 GFP 발현에 대해 세포를 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 도 18에 도시된 바와 같이, 트랜스펙션 후 2시간째에 세포가 형질도입되었을 때(88% GFP-양성 세포) 가장 높은 형질도입 효율을 관찰하였다. 형질도입 효율은 트랜스펙션과 형질도입 사이의 시간이 증가함에 따라 상당히 감소하였으며, 4시간에 78% GFP-양성 세포를 가지며, 8시간에 65% GFP-양성 세포를 갖는다.

[0347] 세포가 트랜스펙션 후 2시간에 형질도입되었을 때 효율적인 바이러스 형질도입이 일어남을 결정하였을 때, AAV405 및 AAV406 벡터는 인간 T 세포에서 HDR 주형으로서 사용되었다. CD3+ T 세포를 자극시키고 전술한 바와 같이 1 μ g TRC 1-2x.87 EE mRNA로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 2시간째에, 세포를 AAV405 또는 AAV406(세포 당 $1e^5$ 바이러스 게놈)으로 형질도입하였다. 단지 형질도입 대조군으로서, 세포를 모의 트랜스펙션시키고(물로) AAV405 또는 AAV406(세포 당 $1e^5$ 바이러스 게놈)으로 형질도입하였다. 단지 메가뉴클레아제 대조군에 대하여, 세포를 TRC 1-2x.87 EE로 트랜스펙션시키고, 이후에 트랜스펙션 후 2시간째에 모의 형질도입하였다(물로)

[0348] AAV 벡터가 HDR 주형으로서 제공되는지의 여부를 결정하기 위하여, gDNA를 세포로부터 수확하고, TRC 1-2 유전자 좌를 AAV 벡터에서 상동성의 영역을 넘는 서열을 인식한 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다. 상동성 영역 외측의 PCR 프라이머는 단지 AAV 벡터로부터가 아닌 T 세포 게놈의 증폭을 허용하였다. PCR 생성물을 정제하고 EagI로 소화시켰다. 도 19는 TRC 1-2x.87 EE로 트랜스펙션되고 AAV 벡터로 형질도입된(화살표 참조) 세포로부터 증폭된 PCR 생성물의 절단을 나타내었으며, 이는 TRC 1-2 인식 서열에 EagI 부위의 삽입을 명시한 것이다. 모든 대조 세포 집단으로부터의 PCR 생성물은 EagI에 의해 절단되지 않으며, 이는 EagI 부위의 삽입이 TRC 1-2 메가뉴클레아제에 의해 DAN 이중-가닥 손상의 생성을 필요로 함을 나타낸다.

[0349] 인간 T 세포에 EagI 부위의 삽입을 추가로 규정하기 위하여, 벌크 PCR 생성물로부터의 개별 생성물을 시험하였다. 상기 실험으로부터 생성된 소화되지 않은 PCR 생성물을 제조업체 설명서에 따라 Zero Blunt PCR 클로닝 키트(Thermo Fisher)를 이용하여 pCR-블런트 벡터에 클로닝하였다. 콜로니 PCR을 M13 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 수행하였으며(pCR 블런트는 인서트 측면에 있는 M13 정방향 및 역방향 프라이밍 부위를 함유함), TRC 1-2x.87 EE 및 AAV405 또는 AAV406 중 어느 하나로 트랜스펙션된 세포로부터의 PCR 생성물의 일부를 겔 전

기영동에 의해 분석하였다(각각 도 20A 및 도 21A). 두 경우 모두에서, 전장 PCR 생성물(대략 1600 bp), 보다 작은 인서트, 및 일부 빈 플라스미드(대략 300 bp)의 혼합물이 존재한다. 이러한 검정에서, 전장 보다 작지만 빈 플라스미드 보다 큰 밴드는 종종 TRC 1-2 인식 서열 내에 큰 결실을 함유한 시점 시퀀스(times sequence)이다. 병행하여, PCR 생성물의 다른 부분을 EagI로 소화시켜 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 EagI 인식 부위를 함유한 클론의 백분율을 결정하였다. 도 20b 및 도 21b는, 여러 PCR 생성물이 EagI(예를 들어, 도 20b, 두 번째 열, 왼쪽으로부터 6 라인)로 절단되어, 대략 700 및 800 bp의 예상된 분절을 생성시킴을 나타낸다. 이러한 겔은 각각 AAV405 및 AAV406에 대하여 EagI 삽입의 추정치가 대략 25% 및 6%이도록 할 수 있다(빈 벡터에 대해 조정됨).

[0350] 절단되지 않은 PCR 생성물 및 EagI로 소화의 겔 전기영동으로부터의 관찰을 확인하기 위해, 각 PCR 생성물의 나머지 부분을 서열화하였다. 도 22A는 TRC 1-2 인식 서열에서 관찰된 여러 대표적인 결실 및 삽입의 서열을 도시한 것이다. 이러한 서열은 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 DNA 이중-가닥 손상의 수리를 연결하는 비-상동성 단부로부터 형성된 서열이 통상적이다. EagI로 절단된 모든 PCR 생성물은 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 EagI 부위를 함유하였다(도 22B).

[0351] 3. 향상된 AAV 형질도입 효율

[0352] 후에 수행될 때 보다 트랜스펙션 후 2시간을 수행하였을 때 AAV 형질도입이 더욱 효율적이라는 관찰을 고려하여, 실험을 트랜스펙션 및 형질도입의 시점을 최적화하기 위해 실험을 수행하였다. 인간 CD3+ T 세포를 3일 동안 항-CD3 및 항-CD28 항체로 자극시키고, 이후에, 제조업체 설명서에 따라 Amaxa 4D-Nucleofector(Lonza)를 이용하여 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제(1 μ g)로 전기천공하였다. 트랜스펙션 직후 또는 트랜스펙션 후 2시간째에, 세포를 GFP-AAV(세포 당 $1e^5$ 바이러스 게놈)로 형질도입하였다. 추가적으로, 비-자극화된 세포를 GFP-AAV(세포 당 $1e^5$ 바이러스 게놈)로 형질도입하였다. 형질도입 후 72시간째에, 세포를 GFP 발현에 대해 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 도 23은 트랜스펙션 후 2시간에 수행된 GFP-AAV 형질도입이 90% GFP-양성 세포를 야기시켰지만, 트랜스펙션 직후 형질도입이 98% GFP-양성 세포를 야기시켰음을 나타낸다. 휴지 T 세포는 대략 0% GFP-양성 세포와 함께, AAV 형질도입에 대해 굴절된 것으로 나타났다. 비-형질도입된 세포는 또한 대략 0% GFP-양성 세포를 나타내었다.

[0353] 4. 요약

[0354] 이러한 연구는 AAV 벡터가 상동 재조합을 통해 TCR 알파 불변 영역에서 절단 부위에 외인성 핵산 서열을 도입하기 위해 재조합 메가뉴클레아제와 함께 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0355] 실시예 4

[0356] 인간 T 세포에서 키메라 항원 수용체를 암호화하는 외인성 핵산을 도입하기 위한 재조합 AAV 벡터

[0357] 1. 재조합 AAV 벡터

[0358] 본 연구에서, 상동 재조합을 통해 TRC 1-2 인식 서열에서 인간 T 세포의 게놈에 키메라 항원 수용체를 암호화하는 외인성 핵산 서열을 도입하기 위해 두 개의 재조합 AAV 벡터(AAV-CAR100 및 AAV-CAR763으로서 지칭됨)를 설계하였다. 각 재조합 AAV 벡터를 전술된 삼중-트랜스펙션 프로토콜을 이용하여 제조하였다.

[0359] AAV-CAR100(본 명세서에서 또한 AAV408로서 지칭됨)을 도 24에 예시된 플라스미드(서열번호 109)를 사용하여 제조하였다. 도시된 바와 같이, 자가-상보적 AAV 벡터를 생성시키기 위해 AAV-CAR100(AAV408)을 설계하였으며, 이는 일반적으로, 5' ITR에 대한 서열, 5' 상동성 암, 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 서열, SV40 폴리(A) 신호 서열, 3' 상동성 암, 및 3' ITR을 포함한다. AAV-CAR763(본 명세서에서 또한 AAV412로서 지칭됨)을 도 25에 예시된 플라스미드(서열번호 110)를 사용하여 제조하였다. 도시된 바와 같이, AAV-CAR763(AAV412) 플라스미드는 일반적으로, AAV-CAR100(AAV408)과 동일한 서열을 포함하지만, 단일 가닥 AAV 벡터를 생성시키기 위해 설계된다. 단일 가닥 AAV 벡터가 보다 큰 페이로드를 수용할 수 있기 때문에, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 AAV-CAR100(AAV408)에서 보다 AAV-CAR763(AAV412)에서 더욱 길다. 본 AAV 연구는 AAV 형질도입 효율에 대한 양성 대조군으로서 도입되는, GFP를 암호화한 AAV 벡터(GFP-AAV)의 사용을 더 포함할 것이다.

[0360] 2. TRC 1-2 인식 서열에 키메라 항원 수용체 서열을 도입함

[0361] 연구는 내인성 TCR 수용체의 세포-표면 발현을 억누르면서 동시에, TCR 알파 불변 영역 유전자에 키메라 항원

수용체 서열을 삽입하기 위한 재조합 AAV 벡터 사용의 효율을 결정하기 위해 수행될 것이다.

[0362] 형질도입 효율을 확인하기 위해, 인간 CD3+ T 세포는 얻어지고 3일 동안 항-CD3 및 항-CD28 항체로 자극화될 것이고, 이후에, 제조업체 설명서에 따라 Amaxa 4D-Nucleofector(Lonza)를 이용하여 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제(1 μ g)를 암호화하는 mRNA로 전기천공될 것이다. 세포는 전술한 바와 같이 트랜스펙션 직후에 GFP-AAV (세포 당 $1e^5$ 바이러스 게놈)로 형질도입될 것이다. 세포는 형질도입 효율을 결정하기 위해 형질도입 후 72시간째에 GFP 발현에 대해 유세포 분석법에 의해 분석될 것이다.

[0363] AAV-CAR100(AAV408) 및 AAV-CAR763(AAV412) 벡터는 이후에, 항-CD19 키메라 항원 수용체 서열의 삽입을 위해 인간 T 세포에서 HDR 주형으로서 사용될 것이다. 인간 CD3+ T 세포는 전술한 바와 같이 1 μ g TRC 1-2x.87 EE mRNA로 자극화되고 트랜스펙션될 것이다. 세포는 이후에, 트랜스펙션 직후에 또는 트랜스펙션의 0 내지 8시간 내에 AAV-CAR100(AAV408) 또는 AAV-CAR763(AAV412)(세포 당 $1e^5$ 바이러스 게놈)로 형질도입될 것이다. 단지 형질도입 대조군으로서, 세포는 (물로) 모의 트랜스펙션되고 AAV-CAR100(AAV408) 또는 AAV-CAR763(AAV412)(세포 당 $1e^5$ 바이러스 게놈)으로 형질도입될 것이다. 단지 메가뉴클레아제 대조군에 대하여, 세포는 TRC 1-2x.87 EE를 암호화하는 mRNA로 트랜스펙션되고 이후에 트랜스펙션 직후에 (물로) 모의 형질도입될 것이다.

[0364] 키메라 항원 수용체 서열의 삽입은 TCR 알파 불변 영역 유전자에서 절단부위의 서열화에 의해 확인될 것이다. 키메라 항원 수용체의 세포-표면 발현은 항-Fab 또는 항-CD19 항체를 사용하여, 유세포 분석법에 의해 확인될 것이다. 세포 표면에서 내인성 T 세포 수용체의 넉아웃은 전술된 바와 같은 유세포 분석법에 의해 결정될 것이다.

[0365] 실시예 5

[0366] 키메라 항원 수용체의 삽입 및 발현

[0367] 1. TRC 1-2 인식 서열에 키메라 항원 수용체 서열의 삽입

[0368] 본 연구에서, 본 발명자는 AAV가 TCR 알파 불변 영역 유전자에 키메라 항원을 삽입하고 동시에, 내인성 TCR 수용체의 세포-표면 발현을 넉아웃시키기 위해 사용될 수 있는 HDR 주형을 제공할 수 있는지의 여부를 시험한다. 제1 실험에서, 인간 CD3+ T 세포($1e^6$ 세포)를 전술한 바와 같이 TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제(2 μ g)를 암호화하는 mRNA로 자극시키고 전기천공하였고, 이후에, 바로 AAV412($1e^5$ 바이러스 게놈/세포)로 형질도입하였다. 대조군으로서, 세포를 모의 전기천공하고 이후에 AAV412로 형질도입하거나 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공하고 이후에, 모의 형질도입하였다. 모의 전기천공된, 모의 형질도입된 세포의 추가적인 대조군이 포함되었다.

[0369] AAV HDR 주형이 TRC 1-2 인식 서열에서 이중-가닥 손상을 수리하기 위해 사용되었는지의 여부를 결정하기 위해 PCR-기반 검정을 개발하였다. 세 가지 세트의 프라이머 쌍을 PCR 분석을 위해 사용하였다. AAV412의 상동성 암으로 영역을 증폭시키기 위해 제1 세트를 설계하였다. 이러한 제1 프라이머 세트(표 7에서 내측 상동성 암/CAR 영역"으로서 지칭됨)가 상동성 영역 내에 놓여있기 때문에, 이는 게놈(349 bp)의 변형되지 않은 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌, AAV412 벡터 입력부(2603 bp), 또는 CAR 유전자가 삽입된 TRC 1-2 인식 서열(2603 bp) 중 어느 하나를 증폭시킬 것이다. 제2 프라이머 세트(표 7에서 "5' 상동성 암 외측"으로서 지칭됨)는 AAV412 HDR 주형의 5' 상동성 암의 외측에서 AAV412 HDR 주형의 CAR 영역 내에서 어닐링하는 하나의 프라이머, 및 인간 게놈에서 어닐링하는 하나의 프라이머를 포함하고, CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 성공적으로 삽입된 경우에만 1872 bp 분절을 증폭시킬 것이다. 제3 프라이머 세트(표 7에서 "3' 상동성 암 외측"으로서 지칭됨)는 HDR 주형의 3' 상동성 암의 외측에서, AAV412 HDR 주형의 CAR 영역 내에서 어닐링하는 하나의 프라이머, 및 인간 게놈에서 AAV412를 어닐링하는 하나의 프라이머를 포함한다. 제2 프라이머 세트와 유사하게, 제3 프라이머 세트는, CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 성공적으로 삽입된 경우에만 1107 bp 분절을 증폭할 것이다. 함께 고려하면, 모두 세 개의 프라이머 세트로부터의 PCR 생성물은 CAR 서열이 세포(프라이머 세트 1)에 존재하는지의 여부, 및 이러한 것이 TRC 1-2 인식 서열(프라이머 세트 2 및 3)에 삽입되었는지의 여부를 지시할 것이다.

[0370] 형질도입 후 4일째에, 세포를 전술한 PCR 프라이머 쌍을 사용하여 분석하였다. 간단하게, 대략 3,000개의 세포를 수확하고, 펠렛화하고, 용해하고, CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 삽입되었는지의 여부를 결정하기 위해 PCR을 수행하였다. PCR 생성물을 도 26에 도시된(레인 설명은 표 7에서 확인될 수 있음), 아가로스 겔 상에서 분해하였다. 레인 1-3은 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 모의 형질도입된 샘플로부터의 PCR

생성물이다.

[0371] 예상되는 바와 같이, 제1 프라이머 쌍("상동성 암 내측/CAR 영역")은 변형되지 않은 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌를 증폭하여, 레인 1에 나타난 349 bp 밴드를 생성시켰다. 레인 2 및 3은 CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 경우에만 생성물을 생성시키는 프라이머 쌍에 해당하는데, 이는 생성물을 나타내지 않는다. 레인 7-9는 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 샘플을 나타내는데, 이는 단지 전술한 대조군인 TRC 1-2x.87EE mRNA과 동일한 밴드를 나타낸다. 레인 4-6은 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 AAV412로 형질도입된 샘플로부터의 PCR 생성물을 나타낸다. 레인 4는 제1 프라이머 쌍("상동성 암 내측/CAR 영역")에 의해 생성된 두 개의 밴드를 나타내는데, 이는 게놈의 변형되지 않은 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌(349 bp) 및 AAV412 벡터 입력부(2603 bp) 또는 CAR 유전자가 삽입된 TRC 1-2 인식 서열(2603 bp)의 증폭을 지시한다. 레인 5 및 6은 단지 CAR 핵산 서열이 TRC 1-2x.87EE 인식 부위에 삽입되는 경우에 생성물을 증폭시키는 프라이머 쌍에 의해 생성된 생성물을 나타낸다. 두 밴드 모두는 예측된 크기이다(각각 1872 및 1107 bp). 레인 10-12는 모의 전기천공되고 AAV412로 형질도입된 샘플을 나타낸다. 레인 10은 제1 프라이머 쌍("상동성 암 내측/CAR 영역")에 의해 생성된 두 개의 밴드를 나타내는데, 이는 게놈의 변형되지 않은 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌(349 bp) 및 AAV412 벡터 입력부(2603 bp)의 증폭을 지시한다. 레인 11 및 12는 단지 CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 경우에 생성하는 프라이머 쌍에 해당하는데, 이는 생성물을 나타내지 않는다. 레인 11 및 12(상동성 암 외측에 프라이머를 포함함)에서 밴드의 부재는 레인 10에서 2603 bp 밴드가 AAV412 입력부의 증폭으로부터 생성됨을 지시한다.

[0372] 함께 고려하면, PCR 분석은 TRC 1-2x.87EE mRNA 및 AAV412 둘 모두가 세포에 존재할 때 CAR 유전자가 TRC 1-2x.87EE 인식 부위에 도입됨을 명확하게 나타낸다. 이에 따라, 본 발명자는, AAV412가 TRC 1-2x.87EE 인식 서열에 CAR 유전자를 삽입하기 위해 사용될 수 있는 적합한 HDR 주형을 생성시키는 역할을 한다고 결론을 내렸다.

[0373] 제2 실험에서, 인간 CD3+ T 세포를 전술한 바와 같이, TRC 1-2x.87 EE 메가뉴클레아제를 암호화하는 mRNA로 자극시키고 전기천공하고, 직후에 증가 양의 AAV408($0 \mu\text{l}$, $3.125 \mu\text{l}$, $6.25 \mu\text{l}$, $12.5 \mu\text{l}$, 또는 $25 \mu\text{l}$, 이는 대략 0 , 3.125×10^3 , 6.250×10^3 , 1.25×10^4 및 2.5×10^4 바이러스 게놈/세포에 해당함)로 형질도입하였다. 대조군으로서, 세포를 모의 전기천공하고, 이후에 증가 양의 AAV408로 형질도입하였다. 추가적인 대조군은 모의 천공되고 모의 형질도입된 세포뿐만 아니라 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 모의 형질도입된 세포를 포함하였다. 형질도입 후 4 일째에, 세포를 CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 삽입되는 경우에만 생성물을 증폭시키는 프라이머 쌍을 이용하는 것을 제외하고 상술한 바와 같이 수확하고 분석하였다. PCR 생성물을 도 27에 도시된 바와 같이 아가로스 겔 상에서 분해하였다. 도 27a는 CAR 유전자가 단지 그러한 유전자 좌에 삽입되는 경우에 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌의 5' 단부 상에 생성물을 증폭시키는 전술한 프라이머 쌍("5' 상동성 암 외측")을 사용하여 생성된 PCR 생성물을 도시한 것이다. 도 27b는 단지 CAR 유전자가 그러한 유전자 좌에 삽입된 경우에 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌의 3' 단부 상에 생성물을 증폭시키는 전술한 프라이머 쌍("3' 상동성 암 외측")을 사용하여 생성된 PCR 생성물을 도시한 것이다. 레인 설명은 표 8에서 확인될 수 있다. 도 27a 및 도 27b 둘 모두에서의 레인 1-5는 모의 전기천공되거나 모의 전기천공되고 이후 모의 형질도입된 샘플을 나타낸다. PCR 생성물은 모의 전기천공된 세포에서 확인되지 않는데, 이는 AAV408에 의해 생성된 HDR 주형이 TRC 1-2x.87EE mRNA의 부재 하에 TRC 1-2 인식 서열에 CAR 유전자를 삽입하지 못함을 나타낸다. 레인 6은 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 모의 형질도입된 샘플을 나타낸다. PCR 생성물은 확인되지 않는데, 이는 CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 삽입되지 못함을 지시하는 것이다. 레인 7-10은 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 증가 양의 AAV408로 형질도입된 샘플을 나타낸다. 각 PCR에 대한 적절한 크기의 밴드가 눈에 띄는데, 이는 AAV408이 TRC 1-2 인식 서열의 수리를 위해 HDR 공여자를 생성시켜, CAR 유전자의 삽입을 야기시킬 수 있음을 지시한다.

표 7

샘플	뉴클레오펙션	바이러스	PCR	생성물 크기
		(100k MOI)		
1	TRC1-2x87EE	---	상동성 압 내측/CAR 영역	계놈 = 349 bp + CD19 = 2603 bp
2	TRC1-2x87EE	---	5' 상동성 압 외측	1872 bp
3	TRC1-2x87EE	---	3' 상동성 압 외측	1107 bp
4	TRC1-2x87EE	AAV412	상동성 압 내측/CAR 영역	계놈 = 349 bp + CD19 = 2603 bp
5	TRC1-2x87EE	AAV412	5' 상동성 압 외측	1872 bp
6	TRC1-2x87EE	AAV412	3' 상동성 압 외측	1107 bp
7	모의(물)	---	상동성 압 내측/CAR 영역	계놈 = 349 bp + CD19 = 2603 bp
8	모의(물)	---	5' 상동성 압 외측	1872 bp
9	모의(물)	---	3' 상동성 압 외측	1107 bp
10	모의(물)	AAV412	상동성 압 내측/CAR 영역	계놈 = 349 bp + CD19 = 2603 bp
11	모의(물)	AAV412	5' 상동성 압 외측	1872 bp
12	모의(물)	AAV412	3' 상동성 압 외측	1107 bp

[0374]

표 8

샘플	뉴클레오펙션	바이러스 (AAV408)
		μL
1	모의(물)	0
2	모의(물)	3.125
3	모의(물)	6.25
4	모의(물)	12.5
5	모의(물)	25
6	TRC1-2x87EE	0
7	TRC1-2x87EE	3.125
8	TRC1-2x87EE	6.25
9	TRC1-2x87EE	12.5
10	TRC1-2x87EE	25

[0375]

[0376]

전술한 PCR-기반 검정은 CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 삽입되었는지의 여부를 결정하는데 유용하지만, 효율에 대한 정보를 제공하지 않는다. CAR 삽입의 효율을 결정하기 위해, 본 발명자는 디지털 PCR-기반 검정을 개발하였다(도 28a에 도시된 개략도). 이러한 검정에서, 두 개의 프라이머 세트를 사용하였다. 제1 세트는 관련없는 유전자 서열을 증폭하고, 주형 번호를 조절하기 위한 기준 서열을 제공한다. 제2 세트는 CAR 유전자 내에서 어닐링하는 하나의 프라이머, 및 3' 상동성 압 외측을 어닐링하는 하나의 프라이머로 이루어지며, 이에 따라, CAR 유전자가 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 경우에만 생성물이 증폭되게 한다. VIC-표지화된 프로브는 제1 프라이머 세트로부터 생성된 앰플리콘 내에서 어닐링하며, FAM-표지화된 프로브는 프라이머의 제2 세트에 의해 생성된 앰플리콘 내에서 어닐링한다. FAM-표지화된 프로브에 의해 검출된 앰플리콘의 수를 VIC-표지화된 프로브에 의해 검출된 기준 서열 앰플리콘의 수로 나눔으로써, CAR 유전자의 삽입에 의해 변형된 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌의 백분율을 정확하게 정량화하는 것이 가능하다.

[0377]

도 28B는 모의 전기천공되고 이후에 형질도입되거나, TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 이후에 모의 형질도입되거나, TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV408로 형질도입된 샘플에 대한 디지털 PCR 검정의 결과를 도시한 것이다. 디지털 PCR을 형질도입 후 대략 1주일에 세포로부터 단리된 계놈 DNA를 사용하여 수행하였다. 도 27에서 기술된 PCR로부터의 관찰과 일치하여, 대조 샘플(단지 형질도입 또는 단지 전기천공) 둘 모두는 TRC 1-2x.87EE 인식 서열에 삽입된 0% CAR 유전자를 갖는 것으로 확인되었다. TRC 1-2x.87EE를 암호화하

는 mRNA로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV408로 형질도입된 샘플은 대략 1.5% 내지 7%를 갖는 것으로 확인되었다. 검정은 두 개의 상이한 기기(표지화된 QX200 및 QS3D) 상에서 수행되었고, 주목할 만한 일치를 나타내었으며, 이는 이러한 디지털 PCR-기반 검정의 감수성 및 정밀도를 나타내었다.

[0378] 2. T 세포 상에서 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현

[0379] 분자 수준에서 CAR 삽입이 일어났는지의 여부를 결정하는 것 이외에, 본 발명자는 HDR 주형으로서 AAV408을 사용하여 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 CAR 유전자를 갖는 세포에서 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현 수준을 결정하고자 하였다. 추가적으로, 본 발명자는 TRC 1-2x.87EE 인식 서열에 CAR의 삽입이 T 세포 수용체의 넥아웃을 야기시킨 효율을 시험하였다. 도 27 및 도 28에서 상술되고 분석된 샘플은 또한, 유세포 분석법에 의해 CAR 및 CD3 발현에 대해 분석되었다. 형질도입 후 대략 4일째에, 세포를 항-CD19 CAR(항-Fab-Alexa647) 또는 CD3(CD3-BB515)을 인식하는 항체로 표지화하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 도 29a는 유세포 분석법 플롯을 도시한 것이며, 항-CAR 표지화는 Y 축 상에 나타내고, 항-CD3 표지화는 X 축 상에 나타내었다. 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI-0)는 압도적으로 $CD3^+/CAR^-$ (오른쪽 아래 사분면, 98.7%)이다. 모의 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV408로 형질도입된 세포는 본질적으로 대조 세포와 동일한 것으로 보였으며, $D3^+/CAR^-$ 집단은 98.8%, 99%, 99%, 및 99.1%이었다. 이에 따라, 본 발명자는 AAV408 바이러스 단독이 검출 가능한 수준의 CAR 발현을 유도하지 못하고, T 세포 수용체의 발현을 방해하지 못할 수 있다고 결론을 지었다.

[0380] 도 29B는 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 모의 형질도입된 샘플, 또는 TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV408로 형질도입된 세포에 대한 유세포 분석법을 도시한 것이다. 전기 천공되고 이후에 모의 형질도입된 세포는 47.1% $CD3^-$ 세포를 나타내는데, 이는 T 세포 수용체 착물의 효율적인 넥아웃을 지시하는 것이다. 항-CD19 CAR로 표지화한 백그라운드는 매우 낮으며, $CD3^-$ 집단에서 0.6%이고, $CD3^+$ 집단에서 0.78%이었다. TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV408로 형질도입된 샘플은 2.09% 내지 5.9% 범위의, $CD3^-$ 집단에서 CAR 표지화를 나타내었다. 또한, 1.08% 내지 1.91% 범위의, $CD3^+$ 집단에서 CAR 표지화가 약간 증가하였다. 본 발명자는 $CD3^+$ 집단에서 CAR^+ 세포에서의 증가 원인을 결정하지 못하였지만, CAR이 비-발현된 T 세포 수용체 대립유전자에 삽입되는 것이 가능하다(T 세포 수용체 알파 사슬의 단지 하나의 대립유전자는 발현되고 T 세포 수용체 착물에 도입됨).

[0381] 이러한 데이터는 전술한 정량적 디지털 PCR-기반 검정과 잘 관련이 있다. 예를 들어, 가장 높은 MOI의 AAV408($2.5e^4$ 바이러스 계능/세포)에서, 디지털 PCR 검정은 대략 6% CAR 삽입을 나타내었으며, 유세포 분석법 검정은 5.9% $CAR^+/CD3^-$ 세포를 나타내었다. $CAR^+/CD3^+$ 집단을 고려하는 경우에, 데이터는 여전히 상당히 유사한데, 유세포 분석법 검정은 디지털 PCR에 의한 6%와 비교하여 대략 7.8% CAR^+ 를 나타낸다.

[0382] 실시예 6

[0383] 추가적인 AAV 벡터의 특징분석

[0384] 1. TRC 1-2 인식 서열에 키메라 항원 수용체 서열의 삽입

[0385] TRC 1-2x.87EE 인식 서열에 CAR 유전자를 삽입하기 위해 AAV 벡터가 적합한 HDR 주형을 제공할 수 있음을 나타내는 경우에, 본 발명자는 AAV 벡터의 구성을 최적화하고자 하였다. 본 발명자는 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌 및 AAV ITR에 대한 상동성의 짧은 영역의 측면에 있는, Jet 프로모터에 의해 유도된 CAR 유전자 발현 카세트를 포함한 자가-상보적 AAV 계능을 생성시키기 위해 사용될 수 있는 벡터를 생성하였다. 이는 벡터는 AAV421로서 지칭된다(도 30; 서열번호 123). 짧은 상동성 압은 자가-상보적 AAV의 제한된 패키징 능력으로 인해 필요하였다. 추가적으로, 본 발명자는 긴 상동성 압 및 AAV ITR의 측면에 있는, CMV 프로모터에 의해 유도된 CAR 유전자 발현 카세트를 포함하는 단일-가닥 AAV 계능을 생성시키기 위해 사용될 수 있는 벡터를 생성하였다. 이러한 벡터는 AAV422로서 지칭된다(도 31; 서열번호 124). 단일 가닥 AAV 계능이 보다 큰 카고 용량(cargo capacity)을 갖기 때문에, 본 발명자는 자가-상보적 벡터에서 보다 더 긴 상동성 압을 사용할 수 있었다.

[0386] AAV421 및 AAV422가 TRC 1-2 인식 서열에 CAR 유전자의 삽입을 표적화하는데 유용한지의 여부를 시험하기 위하여, 전술한 것과 유사한 여러 실험을 인간 $CD3^+$ T 세포에서 수행하였다. 제1 실험에서, 인간 $CD3^+$ T 세포($1e^6$ 세포)를 모의 전기천공하고, 이후에 증가 양의 AAV421 또는 422로 형질도입하거나, TRC 1-2x.87EE mRNA($2 \mu g$)로 전기천공하고 이후에 증가 양의 AAV421 또는 AAV422로 형질도입하였다. AAV408로의 초기 실험이 보다 높은 MOI

가 더욱 효율적인 CAR 삽입을 야기시킬 것을 시사하기 때문에, AAV422 MOI는 전술한 실험에서 보다 이러한 실험에서 AAV421 보다 상당히 더 높았다(근사 MOI는 $1.25e^4$, $2.5e^4$, $5e^4$ a 및 $1e^5$ 바이러스 게놈/세포임). AAV421 바이러스, 모액은 전술한 실험에서 보다 상당히 더 높은 적가를 허용하기에 충분히 농축되지 않았다. 대조군으로서, 세포를 전기천공(모의 또는 TRC 1-2x.87EE mRNA로)하거나, 모의 형질도입하였다. 이러한 실험에 대한 추가적인 성분으로서, "큰 스케일" 조건을 수행하였으며, 여기서, $10e^6$ 세포(통상적인 실험 보다 10배 이상)를 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공하고, 이후에 AAV422($2.5e^4$ 바이러스 게놈/세포)로 형질도입하였다. 마지막으로, 본 발명자는 또한, 1차 바이러스 모액과 비교하기 위해 AAV421의 제2 바이러스 모액을 시험하였다.

[0387]

CAR의 삽입은, CAR 유전자가 TRC 1-2x.87EE 인식 서열에 삽입된 경우에 단지 생성물을 증폭하는 프라이머 쌍을 사용하여, 전술한 PCR에 의해 결정되었다. PCR은 도 32A 및 도 32B에 도시된, 아가로스 겔에 의해 분해되었다(레인 설명은 표 9 및 표 10에서 확인될 수 있음). 도 32A에서 샘플 1은 모의 전기천공되고 이후에 모의 형질도입되었으며, 샘플 2-5는 모의 전기천공되고 이후에 AAV421로 형질도입되었다. 겔은 이러한 샘플이 PCR 생성물을 생성하지 못함을 나타내는데, 이는 TRC 1-2x.87EE mRNA 부재 하에 AAV421이 TRC 1-2 인식 서열에 CAR유전자의 삽입을 유도하지 못할 수 있음을 지시한다. 추가적으로, TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 이후에 모의 형질도입된 대조 샘플(샘플 6)은 임의의 PCR 생성물을 나타내지 않는다. 도 32A에서 샘플 7-10은 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV421로 형질도입되었다. 겔은 5' 및 3' 상동성 암 둘 모두를 넘게 연장하는 생성물에 대한 PCR 밴드를 나타내는데(각 샘플 번호의 두 개의 밴드), TRC 1-2 인식 서열에 CAR 유전자의 통합을 나타낸다. 마지막으로, 도 32A에서, 레인 11 및 레인 12는 $1e^6$ 또는 $10e^6$ 세포/샘플 각각으로 출발하여, TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 AAV422로 형질도입된 샘플을 나타낸다. PCR 밴드 둘 모두(상이한 프라이머가 보다 긴 상동성 암을 고려하기 위해 사용되기 때문에, 제1 세트에서 보다 큼)의 존재는 TRC 1-2 인식 서열에 CAR유전자의 성공적인 삽입을 지시한다.

[0388]

도 32B에서 샘플 1은 모의 전기천공되고 이후에 모의 형질도입되었으며, 샘플 2-5는 모의 전기천공되고, 이후에 증가 양의 AAV422로 형질도입되었다(표 10). 겔은 이러한 샘플이 PCR 생성물을 생성하지 못함을 나타내는데, 이는 TRC 1-2x.87EE mRNA의 부재 하에서 AAV422가 TRC 1-2 인식 서열에 CAR 유전자의 삽입을 유도하지 못할 수 있음을 지시한다. 도 32B에서 샘플 7-10은 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고, 이후에 증가 양의 AAV422로 형질도입되었다. 겔은 5' 및 3' 상동성 암 둘 모두를 벗어나게 연장하는 생성물에 대한 PCR 밴드를 나타내며, 이는 TRC 1-2 인식 서열에 CAR유전자의 통합을 나타낸다. 마지막으로, 샘플 11은 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 이후에 도 32A에 도시된 샘플과는 상이한 바이러스 모액으로부터의 AAV421로 형질도입된 샘플을 나타낸다. 밴드의 존재는 TRC 1-2 인식 서열에 CAR 유전자의 삽입을 지시하고, 상이한 바이러스 모액들 간에 재현성을 확인한다. 함께 고려하여, 도 32는 AAV421 및 AAV422 둘 모두가 TRC 1-2 인식 서열에 CAR유전자를 삽입하기 위해 적합한 HDR 주형을 생성시킬 수 있음을 명확하게 나타낸다.

표 9

샘플	뉴클레오택션	AAV	μ l	MOI
		바이러스	AAV	(근사값)
1	모의(물)	421	0	0
2	모의(물)	421	3.125	3906
3	모의(물)	421	6.25	7813
4	모의(물)	421	12.5	15625
5	모의(물)	421	25	31250
6	TRC1-2x87EE	421	0	0
7	TRC1-2x87EE	421	3.125	3906
8	TRC1-2x87EE	421	6.25	7813
9	TRC1-2x87EE	421	12.5	15625
10	TRC1-2x87EE	421	25	31250
11	TRC1-2x87EE	422	6.25	25000
12	TRC1-2x87EE	422	62.5	25000
	큰 스케일			

[0389]

표 10

샘플	뉴클레오펙션	AAV	μ l	MOI
		바이러스	AAV	(근사값)
1	모의(물)	422	0	0
2	모의(물)	422	3.125	12500
3	모의(물)	422	6.25	25000
4	모의(물)	422	12.5	50000
5	모의(물)	422	25	100000
6	TRC1-2x87EE	422	0	0
7	TRC1-2x87EE	422	3.125	12500
8	TRC1-2x87EE	422	6.25	25000
9	TRC1-2x87EE	422	12.5	50000
10	TRC1-2x87EE	422	25	100000
11	TRC1-2x87EE	421B	25	10000

[0390]

[0391] 2. AAV421을 사용한 T 세포 상에서의 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현

[0392] 여기서, 본 발명자는 AAV421을 사용하여 TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 CAR 유전자를 갖는 세포에서 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현 수준을 결정하고자 하였다. 상술되고 도 32A에서 분석된 샘플은 또한, 유세포 분석법에 의해 CAR 및 CD3 발현에 대해 분석되었다. 형질도입 후 대략 4일째에, 세포는 항-CD19 CAR 또는 CD3을 인식하고 유세포 분석법에 의해 분석된 항체로 표지화되었다. 도 33A는 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 대조 세포와 함께, 모의 전기천공되고 AAV421로 형질도입된 세포에 대한 유세포 분석법 플롯을 도시한 것이다. 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI-0)는 압도적으로 $CD3^+/CAR^-$ 이었다(오른쪽 아래 사분면, 98.8%). 모의 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV421로 형질도입된 세포는 본질적으로 대조 세포와 동일한 것으로 보였으며, $CD3^+/CAR^-$ 집단은 98.8%, 98.6%, 98.8% 및 97.9%이었다. 이에 따라, 본 발명자는, AAV421 바이러스 단독이 검출 가능한 수준의 CAR 발현을 유도하지 못하고, T 세포 수용체의 발현을 방해하지 못할 수 있다고 결론 지었다.

[0393] 도 33B는 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 이후에 모의 형질도입된 샘플, 또는 TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV421로 형질도입된 세포에 대한 유세포 분석법 플롯을 도시한 것이다. 전기천공되고 이후에 모의 형질도입된 세포는 56.7% $CD3^-$ 세포를 나타내며, 이는 T 세포 수용체 착물의 효율적인 낙아웃을 지시한다. 항-CD19 CAR로 표지화된 백그라운드는 매우 낮았으며, $CD3^-$ 집단에서 0.48%이며, $CD3^+$ 집단에서 0.36%이었다. TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV421로 형질도입된 샘플은 4.99% 내지 13.4% 범위의, $CD3^-$ 집단에서 표지화하는 상당한 양의 CAR을 나타내었다. 또한, 1.27% 내지 3.95% 범위의, $CD3^+$ 집단에서 표지화하는 CAR이 약간 증가하였다. 전술한 바와 같이, CAR 유전자가 비-발현된 T 세포 수용체 대립유전자에 삽입된 것이 가능하다. 또한, AAV408로의 실험과는 상반되게, CAR^+ 집단은 훨씬 잘 규정되었으며, 보다 높은 평균 형광 강도를 갖는데, 이는 Jet 프로모터가 eF1 α 코어 프로모터에 비해 더욱 큰 발현을 유도함을 시사한다.

[0394] TRC 1-x.87EE와 함께 AAV421을 사용하여 CAR 유전자의 삽입을 평가하면서, 본 발명자는 $CD3^-/CAR^+$ 집단을 우선적으로 증식하고 농축시키는 방법을 결정하고자 하였다. 상술되고 도 33에 도시된 실험으로부터, 본 발명자는 TRC 1-2x.87EE mRNA(2 μ g)로 전기천공되고 이후에 AAV421(3.13e4 바이러스 게놈/세포)로 형질도입된 세포를 사용하였다. 대조 샘플을 모의 전기천공하고, 모의 형질도입하거나, 모의 전기천공하고 AAV421로 형질도입하거나, TRC 1-2x.87EE로 전기천공하고 상술되고 도 33에 도시된 실험으로부터 얻어진 모의 형질도입하였다. 대조 농축 및 증식 공정으로서, 이러한 세포를 6일 동안 IL-7 및 IL-15(둘 모두 10 ng/mL)가 보충된 완전 성장 배지에서 인큐베이션하였다. 이후에, 세포를 항-CD19 CAR 및 CD3에 대한 항체로 표지화하고, 유세포 분석법에 의해 분석

하였다(도 34a). 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 세포는 $CD3^-/CAR^+$ 사분면에서 낮은 수준의 백그라운드 염색을 나타내었다(0.13%). $CD3^-/CAR^+$ 집단은 모의 전기천공되고 이후에 AAV로 형질도입되거나 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 이후에 모의 형질도입된 샘플에서 본질적으로 동일하였다(각각 0.16% 및 0.55%). TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 모의 형질도입된 세포는 53.2%의 $CD3^-/CAR^-$ 집단을 가지며, 이는 도 33b에 도시된 이러한 실험의 제1 부분에서 염색된 양에 매우 가깝다(56.7%). TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 AAV로 형질도입된 세포는 12.6% $CD3^-/CAR^+$ 세포를 나타내는데, 이는 도 33에 도시된 이러한 세포의 본래 표지화와 거의 동일한 것으로(13.4%), IL-7 및 IL-15의 혼합물이 특정 $CD3^-/CAR^+$ 세포 집단을 농축하거나 증식시키는데 불충분함을 나타낸다.

[0395] 본 발명자는 세포 표면 상에 CD19가 존재하는 IM-9 세포와 함께 전술한 4개의 샘플을 인큐베이션함으로써 항원-특이적 방식으로 $CD3^-/CAR^+$ 집단을 농축시키고자 하였다. IM-9 세포를 미토마이신 C로의 사전-처리에 의해 비활성화시키고, IL-7 및 IL-15(10 ng/mL)의 존재 하에 6일 동안 1:1 비로 샘플과 함께 인큐베이션하였다. 이후에, 샘플을 CD3 및 항-CD19 CAR에 대한 항체로 표지화하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다(도 34b). 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 세포는 $CD3^-/CAR^+$ 사분면에서 낮은 수준의 백그라운드 염색을 나타내었다(0.2%). $CD3^-/CAR^+$ 집단은 모의 전기천공되고 이후에 AAV로 형질도입된 샘플에서 동일하였고(0.2%), TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 모의 형질도입된 세포에서 약간 더 높았다(1.24%). 단독 대조군으로서 TRC 1-2x.87EE로의 $CD3^-/CAR^+$ 세포의 증가는, CAR 핵산이 시스템에 도입되지 않기 때문에 백그라운드로 여겨진다. TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 모의 형질도입된 세포는 42.5%의 $CD3^-/CAR^-$ 집단을 갖는데, 이는 증식 이전에 비해 상당히 더 낮은 것으로(56.7%, 도 33), 이는 CD^+ 세포가 이러한 시스템에서 성장 이점을 가질 수 있음을 시사하는 것이다. 그러나, TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 AAV로 형질도입된 세포는 49.9% $CD3^-/CAR^+$ 세포를 나타내었으며, 이는 도 33에 도시된 이러한 세포의 본래 표지화(13.4%)와 비교하여 급격한 증가로서, 이는 IL-7 및 IL-15의 존재 하에 IM-9 세포와 함께 이러한 샘플의 인큐베이션이 $CD3^-/CAR^+$ 집단의 농축 및 증식에서 매우 효과적임을 나타내는 것이다. $CD3^+/CAR^+$ 집단은 또한, 이러한 조건 하에서 증식되었으며, 모의 전기천공/AAV 형질도입된 샘플 및 TRC 1-2x.87EE 전기천공/AAV 형질도입된 샘플은 각각 2.53% 및 15.3% $CD3^+/CAR^+$ 를 나타낸다.

[0396] TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 이후에 AAV421로 형질도입된 세포에서, 24.2%의 $CD3^-$ 집단은 증식 전의 CAR^+ 이다(도 33B). IL-7 및 IL-15가 보충된 배지 중에서 인큐베이션 후에, 25.3%의 $CD3^-$ 세포는 CAR^+ (도 34A)인데, 이는 유전자-넉아웃에 대한 유전자 녹인(knock-in)의 비율이 변하지 않음을 지시하는 것이다. 그러나, IL-7 및 IL-15 이외에 IM-9 세포와 함께 인큐베이션한 후에, 80% 이상(80.35%, 도 34B)의 $CD3^-$ 세포는 CAR^+ 인데, 이는 IM-9 세포와 함께 인큐베이션이 항원-특이적 농축을 야기시킴을 나타내는 것이다.

[0397] 미토마이신 C가 세포를 매우 강력하게 비활성화시키고 IM-9 세포가 혼합된 배양물 중에서 오래 지속되지 않기 때문에, 본 발명자는 IM-9 세포의 제2 주입이 $CD3^-/CAR^+$ 세포의 농축을 추가로 증가시킬 것으로 추론하였다. 상술되고 도 34b에 도시된 세포 중 일부를 IL-7 및 IL-15를 함유한 배지에서 새로운 IM-9 세포(미토마이신 C로 사전처리됨)와 혼합하고, 다른 6일 동안 인큐베이션하였다. 이후에 세포를 CD3 및 항-CD19 CAR에 대해 염색하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다(도 34C). 임의의 대조 샘플 중에서 $CD3^-/CAR^+$ 세포의 백분율은 IM-9 세포에 대한 농축의 제1 라운드와 비교하여 본질적으로 변하지 않았다.

[0398] 그러나, TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 AAV421로 형질도입된 세포는 49.9%(IM-9 세포와의 인큐베이션의 경우 제1 라운드 후, 도 34b)에서 65.7%(도 34C)로 증가하여 $CD3^-/CAR^+$ 집단의 상당한 농축을 나타내었다. 중요하게, 93.75%의 $CD3^-$ 집단은 CAR^+ 인데, 이는 추가 항원-특이적 증식을 지시하는 것이다.

[0399] 3. AAV422를 사용하여 T 세포 상에서 항-CD19 키메라 항원 수용체의 발현

[0400] 본 발명자는 또한, 세포로부터 항-CD19 CAR의 발현을 시험하였으며, 여기서, HDR 주형(상술한 바와 같음, 도 32B에 도시된 PCR 결과)을 제공하기 위해 AAV422를 사용하였다. 형질도입 후 대략 4일째에, 세포를 항-CD19 CAR 또는 CD3을 인식하는 항체로 표지화하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 도 35A는 모의 전기천공되고 모의

형질도입된 대조 세포와 함께, 모의 전기천공되고 증가 양의 AAV422로 형질도입된 세포에 대한 유세포 분석법 플롯을 나타낸 것이다. 모의 전기천공되고 모의 형질도입된 세포(MOI-0)는 압도적으로 $CD3^+/CAR^-$ (오른쪽 하부 사분면, 98.8%)이었다. 모의 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV422로 형질도입된 세포는 대조 세포와 본질적으로 동일하게 보였으며, $CD3^+/CAR^-$ 집단은 98.6%, 98.6%, 98.9% 및 98.4%이었다. 이에 따라, AAV422 벡터 단독은 검출 가능한 수준의 CAR 발현을 유도하지 않고, T 세포 수용체의 발현을 방해할 수 없다.

[0401] 도 35B는 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공되고 이후에 모의 형질도입된 샘플 또는 TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV422로 형질도입된 세포에 대한 유세포 분석법 플롯을 도시한 것이다. 전기천공되고 이후에 모의 형질도입된 세포는 59.3% $CD3^-$ 세포를 나타내는데, 이는 T 세포 수용체 착물의 효율적인 턴아웃을 지시하는 것이다. 항-CD19 CAR로의 백그라운드 표지화는 매우 낮으며, $CD3^-$ 집단에서 1.47%이며, $CD3^+$ 집단에서 0.52%이다. TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV422로 형질도입된 샘플은 14.7% 내지 20.3% 범위의, $CD3^-$ 집단에서의 상당한 양의 CAR 표지화를 나타내었다. 또한, 2.3% 내지 2.7% 범위의, $CD3^+$ 집단에서 CAR 표지화가 약간 증가되었다.

[0402] 놀랍게도, 본 발명자는 AAV422의 존재 하에서 T 세포 수용체 턴아웃 효율의 주목할 만한 증가를 관찰하였다. AAV422가 증가함에 따라 전체 $CD3^-$ 턴아웃 효율은 TRC 1-2x.87EE 전기천공 단독에서 59.3%와 비교하여 71.6%, 74.9%, 77.8% 및 74.4%이었다. 반대로, AAV421이 증가함에 따라 전체 $CD3^-$ 턴아웃 효율은 TRC 1-2x.87EE 전기천공 단독에서 57.18%와 비교하여 56.99%, 56.62%, 57.4% 및 55.4%이었다(도 33b). 이에 따라, 자가-상보적 AAV 게놈이 아닌 단일 가닥 AAV 게놈의 존재 하에 TRC 1-2x.87EE로의 전기천공이 TRC 1-2x.87EE 뉴클레아제의 전체 턴아웃 효율의 증가를 야기시키는 것이 나타난다. 이러한 증가로 인하여, CAR^+ 인 $CD3^-$ 세포의 백분율은 보다 많은 수의 $CD3^-/CAR^+$ 세포에도 불구하고, AAV421 및 AAV422로 형질도입된 세포 간에 큰 차이가 없다. AAV421를 사용하여 CAR^+ 인 가장 높은 백분율의 $CD3^-$ 세포는 AAV422와의 26.48%(MOI = $1e^5$ 바이러스 게놈/세포)와 비교하여 24.18%(MOI = $3.13e^4$ 바이러스 게놈/세포)이었다. 이러한 관찰은 AAV421과 AAV422 사이의 MOI의 큰 차이를 고려하여 특히 흥미로운 것이다.

[0403] $CD3^-/CAR^+$ 세포를 특이적으로 농축하기 위한 IM-9 세포를 사용하는 개념을 이러한 실험으로부터의 세포를 사용하여 시험하였다. 또한, 전체 패널을 시험하기 보다는, 본 발명자는 단지, 새로운 실험에서 모의 전기천공되고 이후에 AAV422로 형질도입된 세포 또는 TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 이후에 AAV422($2.5e^4$ 바이러스 게놈/세포)로 형질도입된 세포의 농축을 시도하였다. 도 36A는 형질도입후 대략 4일째에 유세포 분석법을 도시한 것이다. 모의 전기천공/형질도입된 세포는 0.13%에서 $CD3^-/CAR^+$ 세포의 백그라운드 염색을 나타내었다. TRC 1-2x.87EE로 전기천공되고 AAV422로 형질도입된 세포는 4.44% $CD3^-/CAR^+$ 세포를 나타내었다. 세포를 전술한 바와 같이 6일 동안 IL-7 및 IL-15의 존재 하에서 IM-9 세포(미토마이신으로 사전처리됨)와 함께 인큐베이션하고, 이후에, 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 도 36B는 IM-9 세포로의 인큐베이션이 AAV422 형질도입된 세포에서의 $CD3^-/CAR^+$ 집단을 35.8%까지 급격히 증가함을 나타낸다. CAR^+ 세포는 농축 전에 6.69%와 비교하여 전체 $CD3^-$ 집단의 45.2%를 구성한다(도 36A). 상기와 같이, 본 발명자는 또한, IM-9 세포의 제2 첨가에 의해 추가로 농축되었다(도 36C). IM-9 세포와의 제2 라운드의 인큐베이션은 65.1% $CD3^-/CAR^+$ 세포를 야기시켰다. CAR^+ 세포는 전체 $CD3^-$ 집단의 78.25%를 구성하는데, 이는 $CD3^-/CAR^+$ 세포의 상당한, 항원-의존적 농축을 지시하는 것이다.

[0404] 이러한 데이터는, 상기 제시된 데이터와 함께, TRC 1-2 인식 서열에 삽입된 항-CD19 CAR 유전자를 갖는 세포가 IL-7 및 IL-15의 존재 하에서 IM-9 세포와의 인큐베이션에 의해 성공적으로 농축될 수 있고, 12일 정도로 적은 배양 중에서 90% 이상의 CAR^+ 의 $CD3^-$ 집단을 야기시킬 수 있음을 명확하게 나타낸다.

[0405] 4. 단일-가닥 AAV 벡터를 사용할 때 관찰된 증가된 턴아웃 효율

[0406] 본 연구에서, 본 발명자는 단일 가닥 AAV 벡터가 TRC 1-2x.87EE 뉴클레아제의 턴아웃 효율을 증가시켰다는 관찰을 계속하였다. 제1 실험에서, 세포를 TRC 1-2x.87EE($2 \mu g$)로 전기천공하고, 모의 형질도입하거나 증가 양의 AAV412($6.25e^4$, $1.25e^4$, $2.5e^4$ 또는 $5e^4$ 바이러스 게놈/세포)로 형질도입하였다. 형질도입후 4일째에, 세포를

CD3에 대한 항체로 표지화하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다(도 37a). 모의 형질도입된 세포에서, 20.7%는 AAV412의 증가에 따라 21.6%, 23.7%, 25.5% 및 25%와 비교하여 CD3⁺이었으며, TRC 1-2x.87EE Nickout 효율이 AAV412의 존재 하에서 최대 23% 더 높음을 지시하는 것이다(20.7%와 비교하여 25.5%).

[0407] Nickout 효율의 이러한 증가가 뉴클레아제 특이적인 지의 여부를 결정하기 위하여, 추가적인 실험에서, 세포를 β 2-마이크로글로불린 유전자를 표적화하는 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA(2 μ g)로 전기천공하였고, 모의 형질도입하거나 증가 양의 AAV412로 형질도입하였다. 형질도입 후 4일째에 세포를 β 2-마이크로글로불린에 대해 염색하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다(도 37b). 모의 형질도입된 세포에서, β 2-마이크로글로불린 Nickout 효율은 64.5%이고, 형질도입된 세포에서 증가 양의 AAV412에 따라 68.6%, 70.7%, 77.2% 및 82.5%로 증가하였는데, 이는 최대 27.9%(64.5%와 비교하여 82.5%)의 Nickout 효율의 증가를 나타내는 것이다.

[0408] 병행 실험에서, 세포를 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공하고, 모의 형질도입하거나 AAV422로(AAV412와 동일한 MOI를 사용함) 형질도입하였다. 세포를 CD3에 대한 항체로 표지화하고, 세포를 유세포 분석법에 의해 분석하였다(도 37c). 모의 형질도입된 세포는 62.2% T 세포 수용체 Nickout을 나타내었으며, 증가 양의 AAV와 함께, T 세포 수용체 Nickout 빈도는 72.6%, 75.5%, 78.3% 및 75.1%로 증가하였다. 여기에서, AAV422의 존재는 TRC 1-2x.87EE의 Nickout 효율을 최대 25.8%까지(62.2%와 비교하여 78.3%) 증가한다. 백분율 Nickout 효율의 증가가 두 개의 상이한 뉴클레아제 및 두 개의 상이한 AAV 벡터를 사용하여, 이러한 세 가지 실험들 사이에 거의 동일하다는 것은 놀라운 것이다. 함께 고려하여, 이러한 데이터는, 단일 가닥 AAV 벡터로의 세포의 형질도입이 본 뉴클레아제 또는 AAV 카고와는 무관하게, 본 발명의 뉴클레아제의 Nickout 효율을 증가시킨다는 것을 강력하게 지시하는 것이다.

[0409] 5. 항-CD19 키메라 항원 수용체를 발현시키는 T 세포의 활성화

[0410] 상기 실험은 세포를 TRC 1-2x.87EE mRNA로 전기천공하고 직후에 AAV421로 세포를 형질도입함으로써 CAR T 세포의 생성을 명확하게 나타내고, 이러한 세포가 IM-9 세포를 발현시키는 CD19와 공동-배양에 의해 CD3⁺/CAR⁺ 집단에 대해 농축될 수 있음을 나타낸다. 본 발명은 다음으로, 표적 세포에 대한 이러한 CAR T 세포의 활성을 시험하였다. 제1 실험에서, 상술되고 도 34c에 도시된 세포를 IFN-감마 ELISPOT에서 사용하였으며, 여기서, CD19⁺ Raji 세포 또는 CD19⁺ U937 세포는 표적 집단이었다. 도 38A에 도시된 바와 같이, 항-CD19 CAR T 세포가 U937 세포와 함께 인큐베이션되었을 때, 이러한 것은 표적:효과기 비와는 무관하게 IFN-감마를 분비하지 못하였다. 그러나, CAR T 세포를 Raji 세포와 함께 인큐베이션하는 것은 용량-의존 방식으로 높은 수준의 IFN-감마 분비를 야기시켰으며, 이는 IFN-감마의 분비가 항원-특이적임을 지시하는 것이다.

[0411] 이러한 CAR T 세포를 또한, 세포 사멸 검정에서 사용하였으며, 여기서, 루시페라제-표지화된 Raji 세포가 표적이었다. 간단하게, CAR T 세포를 10:1의 비의 루시페라제-표지화된 Raji 세포와 함께 인큐베이션하였다. 여러 시점에, 세포를 세척하고, 용해하여 얼마나 많은 세포가 잔류하는지의 척도로서 루시페라제 활성을 측정하였다. 대조 세포는 5500 임의 단위 이상의 루시페라제 활성을 나타내었다(도 38B). 2, 3, 4 및 5시간 동안의 동시-인큐베이션은 각각 4598, 3292, 2750 및 1932 임의 단위까지 루시페라제 활성의 감소를 야기시켰다. 이에 따라, 5시간의 동시-인큐베이션 내에, 루시페라제 활성은 대략 65%까지 감소되었는데, 이는 CAR T 세포의 강력한 세포 용해 활성을 지시하는 것이다.

[0412] 함께 고려하여, 이러한 데이터는 본 명세서에 기술된 방법에 따라 생성된 항-CD19 CAR T 세포가 CD19⁺ 세포를 사멸시키는데 효과적임을 나타낸다.

[0413] 실시예 7

[0414] 선형화된 플라스미드 DNA

[0415] 1. 선형화된 플라스미드 DNA로부터 키메라 항원 수용체의 발현

[0416] AAV에 의해 생성된 HDR 주형이 선형 DNA 분자이기 때문에, 본 발명자는, 임의 소스로부터의 선형 DNA가 TRC 1-2 인식 서열에 CAR 유전자를 삽입하기 위한 적합한 HDR 주형일 수 있다는 가설을 세웠다. 이를 시험하기 위하여, 본 발명자는 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌에 상동성인 상동성 암의 측면에 있는 항-CD19 CAR 유전자를 함유한 여러 플라스미드를 생성하였다. 상이한 프로모터를 일부 플라스미드에서 사용하였으며, 상동성 암은 자가-상보적인 AAV 벡터를 모방하기 위한 "짧은"(5' 상동성 암 상에서 200 bp 및 3' 상동성 암 상에서 180 bp), 또는 단일 가닥 AAV 벡터를 모방하기 위한 "긴"(5' 상동성 암 상에서 985 bp 및 3' 상동성 암 상에서 763 bp)

것이였다. 짧은 상동성 암을 갖는 플라스미드는 표지화된 "pDS"이며, 긴 상동성 암을 갖는 것은 표지화된 "pDI"이다. 추가적으로, 일부 플라스미드는 CAR 유전자의 업스트림에 인트론을 함유하였다.

[0417] CAR 공여자 플라스미드를 벡터 골격의 제한 부위에서 선형화하고, 겔 정제하였다. 인간 CD3+ T 세포를 선형화된 CAR 공여자 플라스미드 단독(정제화된 선형화된 플라스미드의 농도에 따라, 500 ng 내지 1000 ng의 다양한 양)으로 전기천공하거나, TRC 1-2.87EE mRNA(2 μ g)와 동시-전기천공하였다. 대조군으로서, 세포를 모의 전기천공하거나, TRC 1-2x.87EE 단독으로 전기천공하였다. 도 39에서의 그래프는 모든 전기천공에 대한 설명과 함께 표지화되었다. 전기천공후 대략 4일째에, 세포를 CD3 및 항-CD19에 대해 항체로 표지화하였고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다(도 39). 도 39A는 0.15%의 백그라운드 CD3⁻/CAR⁺ 염색을 나타낸다. 백그라운드 CD3⁺/CAR⁺ 염색이 비정상적으로 4.31%로 높았다는 것이 주지되어야 한다. 도 39B는 TRC 1-2x.87EE mRNA 단독으로 전기천공된 세포를 나타내는데, 이는 60.8% CD3⁺ 턴아웃을 나타내는 것이다. 도 39C 및 도 39D는 TRC 1-2x.87EE mRNA, 및 HTLV 인핸서를 갖는 EF1 α 코어 프로모터를 갖는 긴 상동성 암 벡터 또는 EF1 α 코어 프로모터(인핸서 없음)를 갖는 짧은 상동성 암 벡터 중 어느 하나로 동시-전기천공된 샘플을 나타낸다. 흥미롭게도, EF1 α 코어 프로모터 단독을 갖는 선형화된 CAR 공여자는 2.38%의 CD3⁻/CAR⁺ 집단을 생성하였으며, HTLV 인핸서를 갖는 EF1 α 코어 프로모터를 번식시키는 벡터는 상당한 백분율의 CD3⁻/CAR⁺ 세포를 생성시키지 못하였다. TRC 1-2x.87EE mRNA의 부재 하에 이러한 두 개의 벡터로 전기천공된 세포는 CD3⁻/CAR⁺ 집단에서의 상당한 증가를 나타내지 않는다(도 39E 및 도 39F). TRC 1-2x.87EE 존재 하에서의 EF1 α 코어 프로모터 벡터를 갖는 CD3⁻/CAR⁺ 집단의 증가는 선형화된 플라스미드가 TRC 1-2 인식 서열에서 이중 가닥 손상을 수리하기 위해 HDR 주형으로서 제공할 수 있음을 시사하였다.

[0418] 도 39G 및 도 39H는 둘 모두가 CAR의 발현을 유도하는 MND 프로모터를 함유한 두 개의 긴 상동성 암 작제물을 도시한 것이다. 도 39G에 도시된, 이러한 작제물들 중 하나는 또한, CAR 유전자의 5' 단부에서 인트론을 함유한다. 놀랍게도, NMD 프로모터 및 인트론을 갖는 긴 상동성 암 플라스미드는 상당한 CAR 발현을 나타내었으며(도 39G, 4.14% CD3⁻/CAR⁺), 인트론-부재 작제물(도 39H)은 TRC 1-2x.87EE mRNA로 동시-전기천공된 검출 가능한 CAR 발현을 나타내지 않았다. 인트론 없이 NMD 프로모터를 갖는 짧은 상동성 암 플라스미드는 또한, TRC 1-2x.87EE mRNA로 시험되었고, 임의의 CAR 발현을 나타내지 못하였다(도 39I). NMD 프로모터-함유 작제물은 TRC 1-2x.87EE mRNA의 부재 하에서 임의의 CAR⁺ 세포를 생성시키지 못하였다(도 39J, 39K 및 39L).

[0419] 마지막으로, 이러한 실험에서, 본 발명자는 CAR의 발현을 유도하는 JeT 프로모터를 함유한 짧은 상동성 암 작제물, 및 CAR의 발현을 유도하는 CMV 프로모터를 갖는 "긴" 상동성 암을 시험하였다. 단독으로, 이러한 선형화된 플라스미드는 상당한 CAR⁺ 세포를 야기시키지 못하였다(도 39O 및 도 39P). 세포가 TRC 1-2x.87EE mRNA로 동시-전기천공되었을 때, JeT 함유 작제물은 2.69% CD3⁻CAR⁺ 세포를 나타내었으며, CMV 함유 작제물은 2.7% CD3⁻/CAR⁺ 세포를 산출하였다.

[0420] 도 39에 도시된 흐름도는, 상동성 암의 측면에 있는, CAR을 암호화하는 선형화된 플라스미드 DNA가 TRC 1-2x.87EE에 의해 야기된 DNA 손상을 수리하여 CAR 핵산의 삽입을 야기시키기 위한 HDR 주형으로서 역할을 할 수 있다는 것을 명확하게 나타낸다. 프로모터강도가 CAR의 발현에 중요한 역할을 하며, 일부 프로모터가 유전자에 인트론이 존재할 때 더욱 효율적인 발현을 유도한다는 것이 명백하다.

[0421] 선형화된 DNA 작제물을 사용한 CAR의 삽입이 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌에 대해 특이적임을 확인하기 위하여, 본 발명자는 CAR 내에 그리고 상동성 암의 외측에서 포화하는 프라이머를 사용하여 전술한 바와 같이 세포를 분석하였다(도 40, 표 11). 샘플 1 및 샘플 2는 모의 전기천공되거나 단지 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공된 세포로부터의 PCR 생성물이다. 상기 결과와 일치하여, PCR 밴드가 존재하지 않았는데, 이는 TRC 1-2 인식 부위에서 CAR 유전자의 결여를 지시하는 것이다. 샘플 3, 샘플 4 및 샘플 5는 TRC 1-2x.87EE 및 선형화된 CAR 상동성 플라스미드(도 40에서의 샘플명)로 동시-전기천공된 세포로부터 얻어진 것이다. 각 샘플은 두 개의 예측된 크기의 PCR 밴드를 나타내는데, 이는 TRC 1-2 인식 부위에 CAR 유전자 발현 카세트의 삽입을 지시하는 것이다. 샘플 6, 샘플 7 및 샘플 8은 TRC 1-2x.87EE mRNA를 지니지 않는 것을 제외하고 샘플 3, 4 및 5와 동일한 선형화된 CAR 상동성 플라스미드로 전기천공된 세포로부터 얻어진 것이다. 예상되는 바와 같이, PCR 밴드가 존재하지 않는다. 샘플 9 및 샘플 10은 모의 전기천공되거나 단지 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공된 세포로부터의 PCR 생성물이고, PCR 밴드를 나타내지 않는다. 샘플 11, 12, 13 및 14는 TRC 1-2x.87EE 및 선형화된 CAR 상동성 플라스미드(도 40에서의 샘플명)로 동시-전기천공된 세포로부터 얻어진 것이다. 각 샘플은

두 개의 예측된 크기의 PCR 밴드를 나타내는데, 이는 TRC 1-2 인식 부위에 CAR 유전자의 삽입을 지시하는 것이다. 샘플 15, 16, 17, 및 18은 TRC 1-2x.87EE mRNA를 지니지 않는 것을 제외하고 샘플 11, 12, 13, 및 14와 동일한 선형화된 CAR 상동성 플라스미드로 전기천공된 세포로부터 얻어진 것이다. 예상되는 바와 같이, PCR 밴드가 존재하지 않는다.

[0422] 도 39 및 도 40은 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA 및 선형화된 CAR 상동성 플라스미드로 인간 CD3+ T 세포를 동시-전기천공하는 것이 TRC 1-2 인식 서열에 CAR 유전자를 삽입하는 효과적인 방법이라는 것을 명확하게 나타낸다.

표 11

샘플	뉴클레오펙션	선형화된 플라스미드
1	모의(물)	---
2	TRC1-2x87EE	---
3	TRC1-2x87EE	pDS EF1- α 코어
4	TRC1-2x87EE	pDS 200 MND NC
5	TRC1-2x87EE	pDS 200 JET NC
6	모의(물)	pDS EF1- α 코어
7	모의(물)	pDS 200 MND NC
8	모의(물)	pDS 200 JET NC
9	모의(물)	---
10	TRC1-2x87EE	---
11	TRC1-2x87EE	pDI EF1- α NC
12	TRC1-2x87EE	pDI MND 인트론 NC
13	TRC1-2x87EE	pDI MND NC
14	TRC1-2x87EE	pDI CMV 985 NC 763
15	모의(물)	pDI EF1- α NC
16	모의(물)	pDI MND 인트론 NC
17	모의(물)	pDI MND NC
18	모의(물)	pDI CMV 985 NC 763
19	모의(물)	---
20	TRC1-2x87EE	---
21	TRC1-2x87EE	pDS MCS
22	모의(물)	PDS MCS

[0423]

[0424] 실시예 8

[0425] 추가적인 AAV 벡터의 특징분석

[0426] 1. Jet 프로모터 및 긴 상동성 압을 갖는 AAV의 사용

[0427] 총괄적으로, 상기에 나타난 데이터는 JeT 프로모터를 사용하는 벡터가 CAR의 높은 일관성 있는 발현을 유도하며 보다 긴 상동성 압이 유전자 삽입 효율을 증가시킬 수 있음을 지시한다. 본 발명자는 도 41(서열번호 125)에 도시된 벡터를 설계하고 생성하였으며, 이는 긴 상동성 압, 및 항-CD19 CAR의 발현을 유도하는 JeT 프로모터를 갖는 단일-가닥 AAV(본 명세서에서 AAV423으로서 지칭됨)를 제조하기 위해 사용되었다. 인간 CD3+ T 세포를 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공하고, 증가 양의 AAV423으로 형질도입하였다. 상기에 나타난 데이터가 보다 높은 MOI가 증가된 삽입 효율을 야기시킬 수 있음을 시사하기 때문에, 본 발명자는 1.875×10^4 내지 1.5×10^5 범위의 역가를 사용하였다. 대조군으로서, 세포를 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공하고 이후에 모의 형질도입하거나, 모의 전기천공하고 이후에 증가 양의 AAV423으로 형질도입하였다. 형질도입 후 6일째에, 세포를 CD3 또는 항-CD19 CAR을 인식하는 항체로 표지화하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 도 42에 도시된 바와 같이, 모의 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV423으로 형질도입된 세포는 압도적으로 CD3⁺/CAR⁻(96.6% 내지 98.5%의 범위)이었다. TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 모의 형질도입된 세포는 39% CD3⁺이었

는데, 이는 T 세포 수용체의 효율적인 넥아웃을 지시하는 것이다. 이러한 세포에서, 백그라운드 CAR 염색은 매우 낮았다(대략 2%). TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 증가 양의 AAV423으로 형질도입된 세포는 CD3 넥아웃과 함께 극적인 CAR 염색을 나타내었다. $CD3^-/CAR^+$ 집단은 21.6% 내지 22.7%의 범위에었으며, $CD3^+/CAR^+$ 집단은 대략 2%이었다. 전술한 바와 같이, 단일-가닥 AAV의 존재는 TRC 1-2 인식 부위에서 전체 유전자 변형 효율을 증가시켰으며, 전체 $CD3^-$ 집단은 대조에서에서 41.44%에서, 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV423으로 형질도입된 세포에서 57.6%, 59.2%, 58.7%, 및 56.1%로 증가하였다. CAR^+ 인 $CD3^-$ 세포의 백분율은 37.5% 내지 39.9%의 범위인데, 이는 전술한 데이터와 비교하여 삽입 효율의 급격한 증가를 지시하는 것이다.

[0428] AAV423을 사용한 CAR의 삽입이 TRC 1-2 인식 서열 유전자 좌에 특이적임을 확인하기 위하여, 본 발명자는 CAR 내에서 그리고 상동성 암의 외측에서 포화하는 프라이머를 사용하여 전술한 바와 같이 세포를 분석하였다(도 43, 표 12).

표 12

샘플	뉴클레오펙션	AAV (μ l)	MOI
1	모의(물)	---	---
2	모의(물)	---	---
3	모의(물)	pDI JET Prep A (3.125)	18750
4	모의(물)	pDI JET Prep A (6.25)	37500
5	모의(물)	pDI JET Prep A (12.5)	7500
6	모의(물)	pDI JET Prep A (25)	150000
7	TRC1-2x87EE	---	---
8	TRC1-2x87EE	pDI JET Prep A (3.125)	18750
9	TRC1-2x87EE	pDI JET Prep A (6.25)	37500
10	TRC1-2x87EE	pDI JET Prep A (12.5)	7500
11	TRC1-2x87EE	pDI JET Prep A (25)	150000

[0429]

[0430] 샘플 1 및 샘플 2는 모의 전기천공된 세포로부터의 PCR 생성물이다. 상기 결과와 일치하여, PCR 밴드가 존재하지 않는데, 이는 TCR 1-2 인식 부위에서 CAR 유전자의 결핍을 지시하는 것이다. 샘플 3 내지 샘플 6은 모의 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV423으로 형질도입된 세포에서 유래된 것이다. 상기 결과와 일치하여, PCR 밴드가 존재하지 않는다. 샘플 7은 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 이후에 모의 형질도입된 세포에서 유래된 것이고, PCR 밴드를 나타내지 않는다. 샘플 8 내지 샘플 11은 TRC 1-2x.87EE를 암호화하는 mRNA로 전기천공되고 이후에 증가 양의 AAV423으로 형질도입된 세포에서 유래한 것이고, CAR이 TRC 1-2 인식 서열에 삽입되는 경우에 예상되는 PCR 밴드를 나타낸다.

[0431] 절단 후 TRC 1-2 인식 부위에 CAR 서열을 삽입하기 위한 AAV423의 능력을 고려하여, AAV423 플라스미드(도 41)가 하나 이상의 제한 효소로 소화에 의해 선형화되고 이러한 소화에 의해 세포에 전달될 수 있다는 것이 추가로 예상되며, 이에 따라, T 세포가 TRC 1-2 인식 부위에 통합하고 항-CD19 CAR을 암호화할 수 있는 선형화된 DNA 주형으로 형질도입될 수 있다.

[0432] 실시예 9

[0433] 항-CD19 TCR-음성 CAR T 세포의 생체내 효능

[0434] 1. 과중된 B 세포 림프종의 무린 모델

[0435] 유전자 조작된 항-CD19 CAR T 세포의 효능을 과중된 B 세포 림프종의 무린 모델에서 평가하였다. 활성화된 T 세포를 전술한 바와 같이 TRC 1-2x.87 EE mRNA로 전기천공하였고, 이후에, JeT 프로모터에 의해 유도되고 상동성 암의 측면에 있는 항-CD19 CAR 발현 카세트를 포함하는 AAV6 벡터로 형질도입하였다. IL-2(10 ng/mL)로 5일의 배양 후에, 세포를 전술된 바와 같은 유세포 분석법에 의해 세포-표면 CD3 및 항-CD19 CAR 발현에 대해 분석하였다(도 44A). 항-CD3 자성 비드를 사용하여 $CD3^+$ 세포를 고갈시킴으로써 $CD3^-$ 세포를 농축하였다. 고갈된 세포를 이후에 IL-15(10 ng/mL) 및 IL-21(10 ng/mL)에서 3일 동안 배양하고, CD3 및 항-CD19 CAR의 세포-표면 발현

에 대해 재-분석하였다(도 44B). $CD3^{-}$ 집단의 단리는 매우 효율적이었는데, 이는 $CD3^{+}$ 세포의 고갈 후 유세포 분석법에 의해 측정하여 99.9% 순도를 수득하였다(도 44B). 정제된 $CD3^{-}$ 집단은 56% $CD4^{+}$ 및 44% $CD8^{+}$ 세포를 포함하였고(도 44C), $CD62L$ 및 $CD45RO$ 에 대해 염색에 의해 결정하는 경우에, 주로 중추 기억/전이 기억 표현형을 갖는다(도 44D).

[0436] Raji 파종성 림프종 모델을 사용한 연구는 Charles River Laboratories International Inc.(Morrisville, NC, USA)에 의해 수행되었다. 반딧불이 루시페라제 (ffLuc)₄₄를 안정적으로 발현시키는 $CD19^{+}$ Raji 세포를 1일째에 5 내지 6주령 암컷 NSG 마우스에 마우스 당 2.0×10^5 세포의 용량으로 정맥 주사하였다. 4일째에 마우스에 PBS 또는 동일한 건강한 공여자 PBMC로부터 제조된 유전자 편집 대조 TCR KO T 세포를 함유한 PBS, 또는 동일한 공여자로부터 제조된 명시된 용량의 CAR T 세포를 함유한 동일한 건강한 공여자 PBS를 정맥 주사하였다. 명시된 날짜에, 살아있는 마우스에 루시페린 기질(염수 중 150 mg/kg)을 i.p. 주사하고, 안락사시키고, 루시페라제 활성을 IVIS SpectrumCT(Perkin Elmer, Waltham, MA)를 이용하여 7분 후에 측정하였다. 데이터를 Living Image software 4.5.1(Perkin Elmer, Waltham, MA)을 이용하여 분석하고, 내보내었다. 발광 신호 강도는 p/초/cm²/sr의 복사조도로 나타내었다.

[0437] 2. 결과

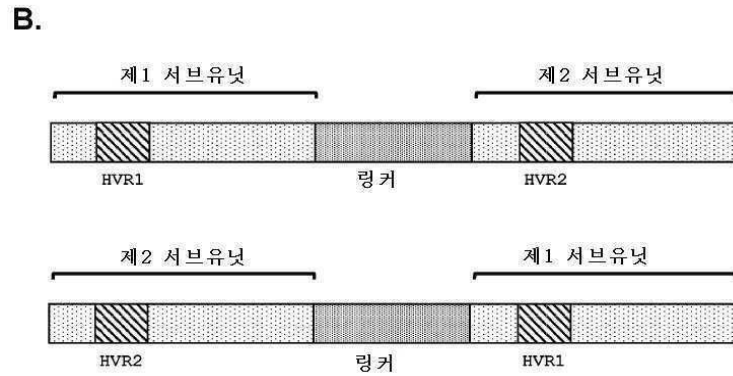
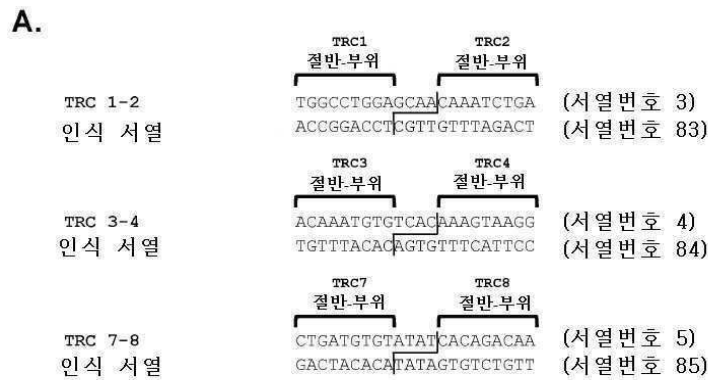
[0438] 도 45에 도시된 바와 같이, $CD19^{+}$ Raji 세포의 성장은 모든 마우스에서 8일째까지 낮은 수준에서 분명하였고, 11일째에 치료되지 않은 대조군 및 TCR⁻ 대조군에서 상당히 증가하였다. 대조군에서, 유의미한 종양 성장은 15일째에 관찰되었으며, 18일 또는 19일째에, 모든 대조군이 안락사되었다. 상반되게, 항- $CD19$ CAR T 세포로 처리된 모든 마우스 그룹은 11일째에 종양 성장의 증거를 나타내지 않았으며, 저용량 그룹의 단일 마우스를 제외하고, 29일의 연구를 통해 종양이 존재하지 않았다. 종양 재성장은 대략 36일 저용량 코호트에서 세 마리의 마우스에서 관찰되었다. 세 마리 중 한 마리는 42일에 사망하였는데, 이미징은 이러한 동물에서 단지 낮은 수준의 종양을 나타내었으며, 이에 따라, 사망이 종양과 관련이 거의 없었다.

[0439] 3. 결론

[0440] 이러한 결과는 유전자-편집된 $CD3^{-}$ CAR T 세포에 의해 $CD19^{+}$ 종양 세포의 생체내 클리어런스에 대한 분명한 증거를 제공하고, 동족이계 CAR T 세포 치료법을 위한 이러한 플랫폼의 전임상 개발을 추가로 지지한다.

도면

도면1



도면2a

서열 번호	198	초가변 영역 1 (HVR1)	271
33	TRC 1-2x.87 EE	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
34	TRC 1-2x.87 QE	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
35	TRC 1-2x.87 EQ	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
36	TRC 1-2x.87	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
37	TRC 1-2x.6	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
38	TRC 1-2x.20	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
39	TRC 1-2x.55	KEFLLYLAGFVDGDSIYATIAFCQRAKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
40	TRC 1-2x.60	KEFLLYLAGFVDGDSIYATIAFCQRAKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
41	TRC 1-2x.105	KEFLLYLAGFVDGDSIYASIRFSQRSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
42	TRC 1-2x.163	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
43	TRC 1-2x.113_3	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	

서열 번호	7	초가변 영역 1 (HVR1)	80
44	TRC 1-2x.5	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
45	TRC 1-2x.8	KEFLLYLAGFVDGDSIYATIRPAQRAKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
46	TRC 1-2x.25	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
47	TRC 1-2x.72	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
48	TRC 1-2x.80	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
49	TRC 1-2x.84	KEFLLYLAGFVDGDSIYATIAFCQRAKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
50	TRC 1-2x.120	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
51	TRC 1-2x.113_1	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	
52	TRC 1-2x.113_2	KEFLLYLAGFVDGDSIYACIAPRQGSKFKEHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGXVYDRGSVSEYVLSQ	

도면2b

272	344
TRC 1-2x.87 EE	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.87 QE	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.87 EQ	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.87	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.6	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.20	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.55	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.60	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.105	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.163	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.113_3	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
81	153
TRC 1-2x.5	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.8	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.25	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.72	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.80	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.84	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.120	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.113_1	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.113_2	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

도면3a

서열 번호	271	초가변 영역 2 (HVR2)	271
58 TRC 1-2x.87 EE	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	58
59 TRC 1-2x.87 QE	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	59
60 TRC 1-2x.87 EQ	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	60
61 TRC 1-2x.87	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	61
62 TRC 1-2x.6	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	62
63 TRC 1-2x.20	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	63
64 TRC 1-2x.55	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	64
65 TRC 1-2x.60	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	65
66 TRC 1-2x.105	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	66
67 TRC 1-2x.163	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	67
68 TRC 1-2x.113_3	KEFLLYLAGFVDGGS	FASITPHQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	68

서열 번호	7	초가변 영역 2 (HVR2)	80
69 TRC 1-2x.5	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	69
70 TRC 1-2x.8	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	70
71 TRC 1-2x.25	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	71
72 TRC 1-2x.72	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	72
73 TRC 1-2x.80	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	73
74 TRC 1-2x.84	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	74
75 TRC 1-2x.120	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	75
76 TRC 1-2x.113_1	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	76
77 TRC 1-2x.113_2	KEFLLYLAGFVDGGS	FATIPDQRAKFKHFLKLTFAVYQKQRRWFLDKLVDEIGVGYYDGSVSEYRLS	77

도면3b

272	344
TRC 1-2x.87 EE	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.87 QE	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.87 EQ	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.87	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.6	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.20	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.55	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.60	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.105	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.163	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.113_3	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
81	153
TRC 1-2x.5	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.8	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.25	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.72	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.80	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.84	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.120	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.113_1	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 1-2x.113_2	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

도면4

서열 번호	7	초가변 영역 1 (HVR1)	80
53 TRC 3-4x,3	KEFLLYLAGFVDGDSI	VATICPCQTLKFKHYLTLSFSVYQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDQGSVSCYRLSQ	
54 TRC 3-4x,19	KEFLLYLAGFVDGDSI	VATICPCDQALKFKHYLSLTFVYQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDQGSVSCYRLSQ	
	81		153
TRC 3-4x,3	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		
TRC 3-4x,19	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		

도면5

서열 번호	198	초가변 영역 2 (HVR2)	271
78 TRC 3-4x,3	KEFLLYLAGFVDGDSI	HACIQPQQDVKFKHQLHLRFVTHQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDAGSVSTYGLSQ	
79 TRC 3-4x,19	KEFLLYLAGFVDGDSI	HACIQPMQSMKFKHYLHLRFVTHQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDAGSVSTYGLSQ	
	272		344
TRC 3-4x,3	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		
TRC 3-4x,19	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		

도면6a

서열 번호	7	초가변 영역 1 (HVR1)	80
55 TRC 7-8x,7	KEFLLYLAGFVDGDSI	VACITPQQDMKFKHRLQLRFVCTQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDQGSVSEYRLSQ	
서열 번호	198	초가변 영역 1 (HVR1)	271
56 TRC 7-8x,9	KEFLLYLAGFVDGDSI	VACITPQQDMKFKHRLQLRFVCTQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDHGGASRYRLSQ	
57 TRC 7-8x,14	KEFLLYLAGFVDGDSI	VACITPQQDMKFKHRLQLRFVCTQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDHGGASRYRLSQ	

도면6b

	81		153
TRC 7-8x,7	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		
	272		344
TRC 7-8x,9	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		
TRC 7-8x,14	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		

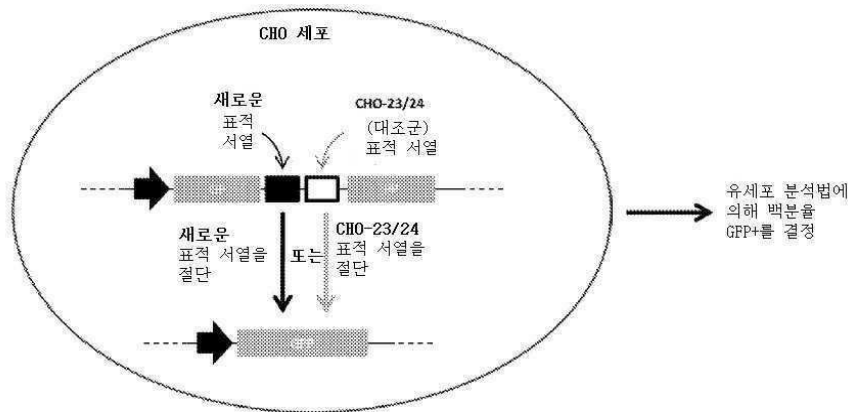
도면7a

서열 번호	198	초가변 영역 2 (HVR2)	271
80 TRC 7-8x,7	KEFLLYLAGFVDGDSI	VASIKPQQVAKFKHRLMLDFYVYQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDLGGASRYVLSQ	
서열 번호	7	초가변 영역 2 (HVR2)	80
81 TRC 7-8x,9	KEFLLYLAGFVDGDSI	VACIKPQDAKFKHRLLEFTVCQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDQGSVSEYRLSQ	
82 TRC 7-8x,14	KEFLLYLAGFVDGDSI	VASIRPTQLAKFKHALNLGFVYQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVDSGSVSKYTLSE	

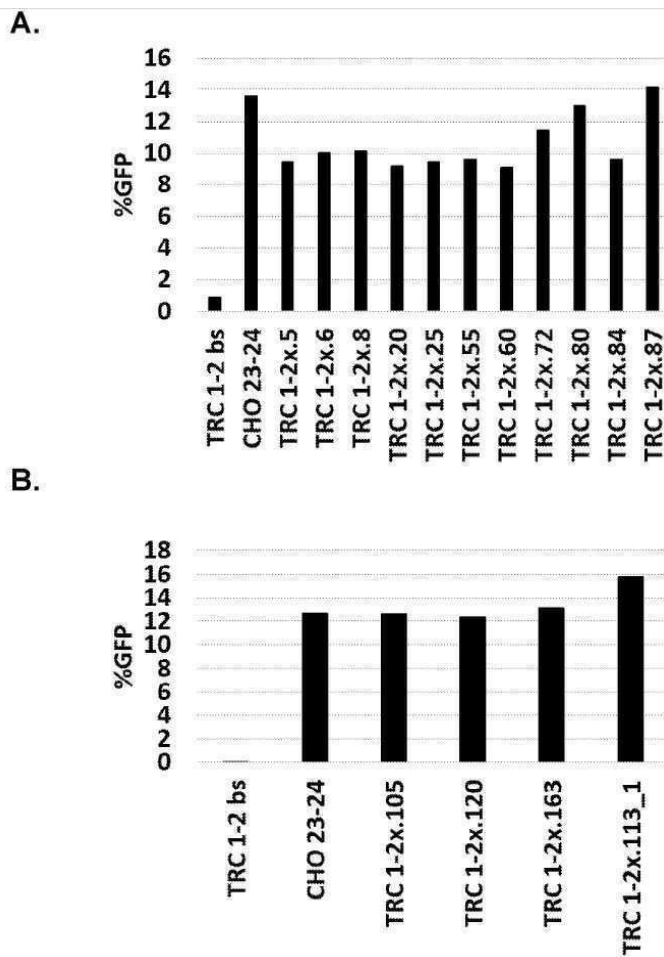
도면7b

	272		344
TRC 7-8x,7	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		
	81		153
TRC 7-8x,9	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		
TRC 7-8x,14	IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD		

도면8

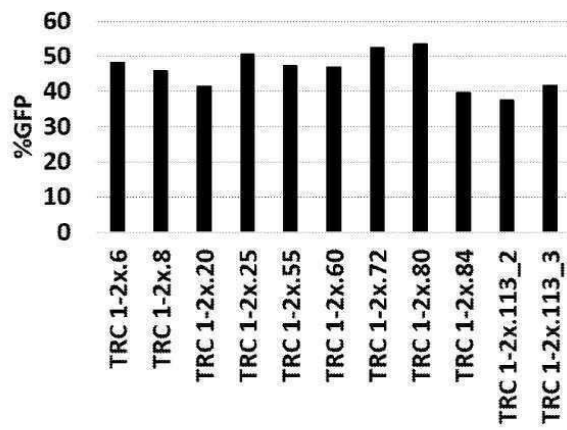


도면9ab

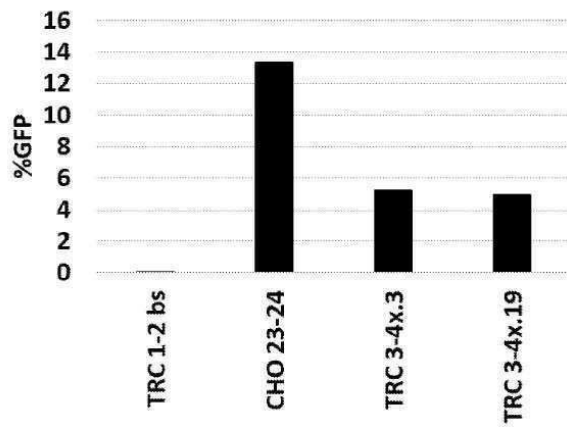


도면9cd

C.

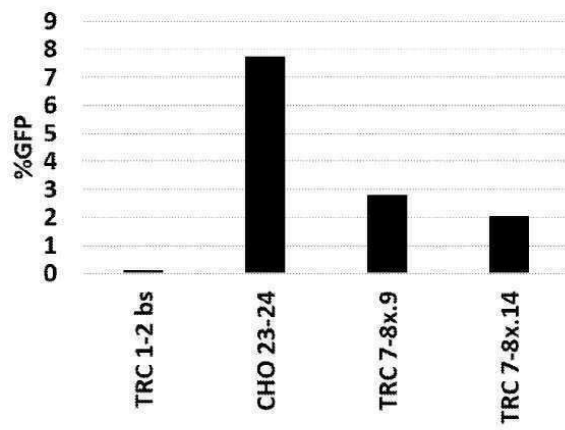


D.

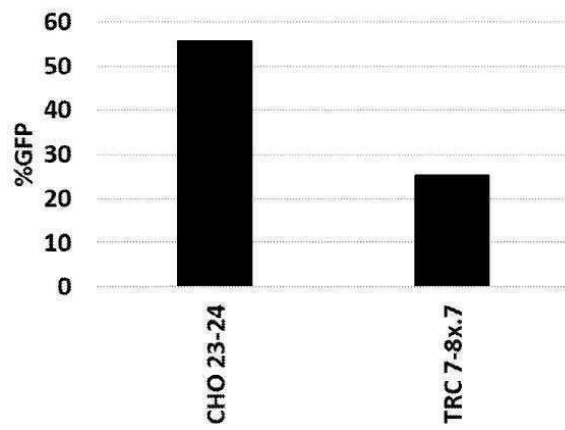


도면9ef

E.

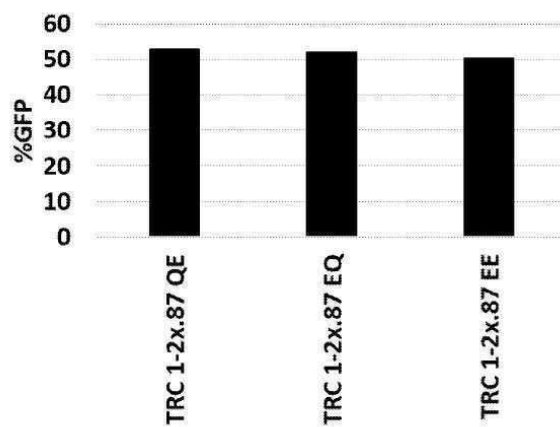


F.

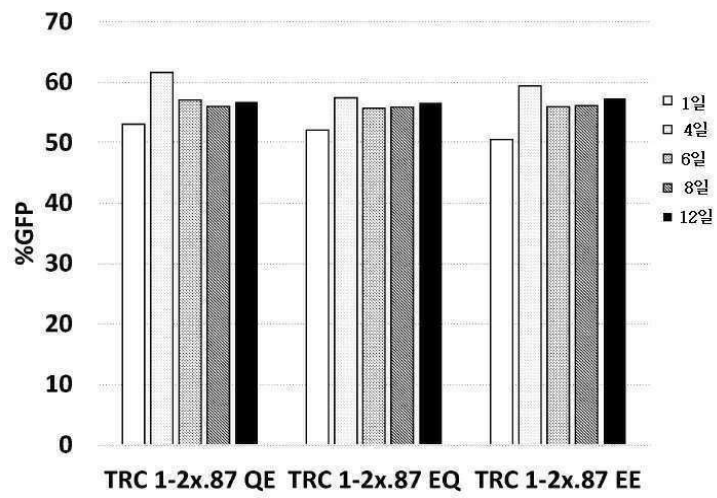


도면9g

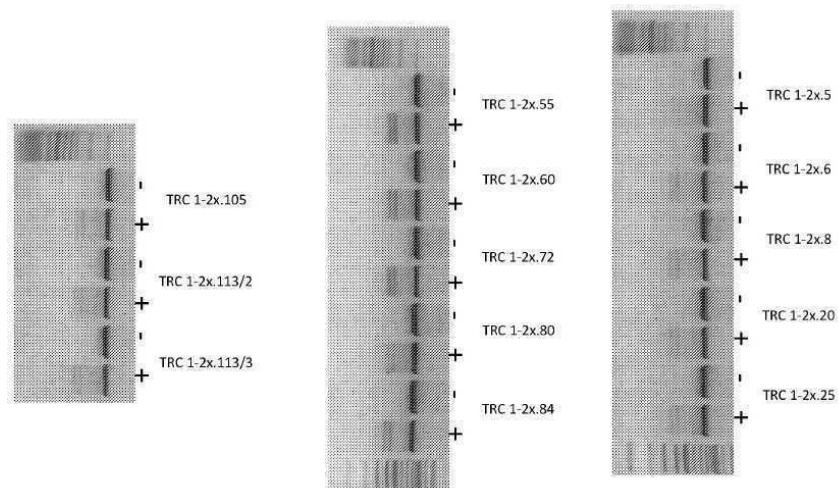
G.



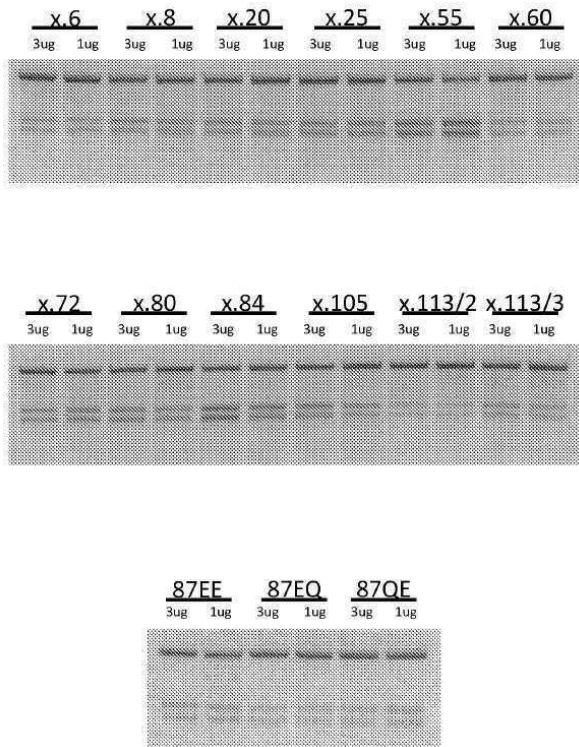
도면10



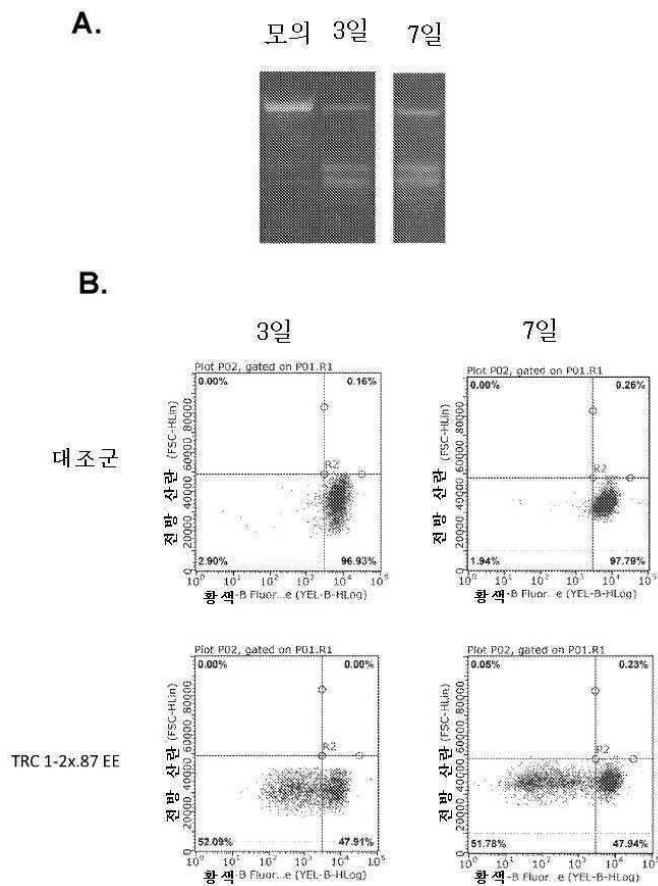
도면11



도면12



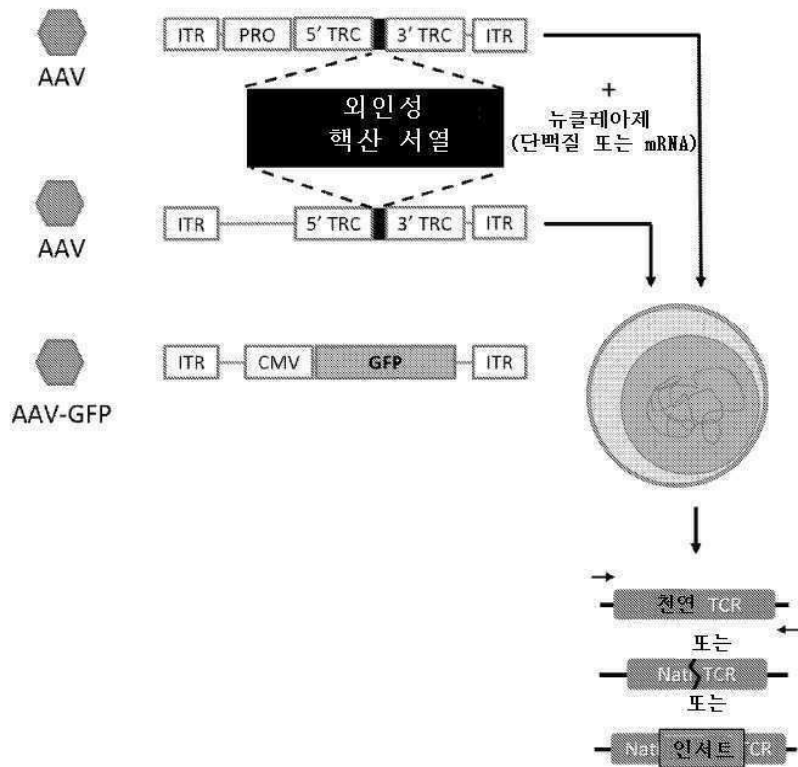
도면13



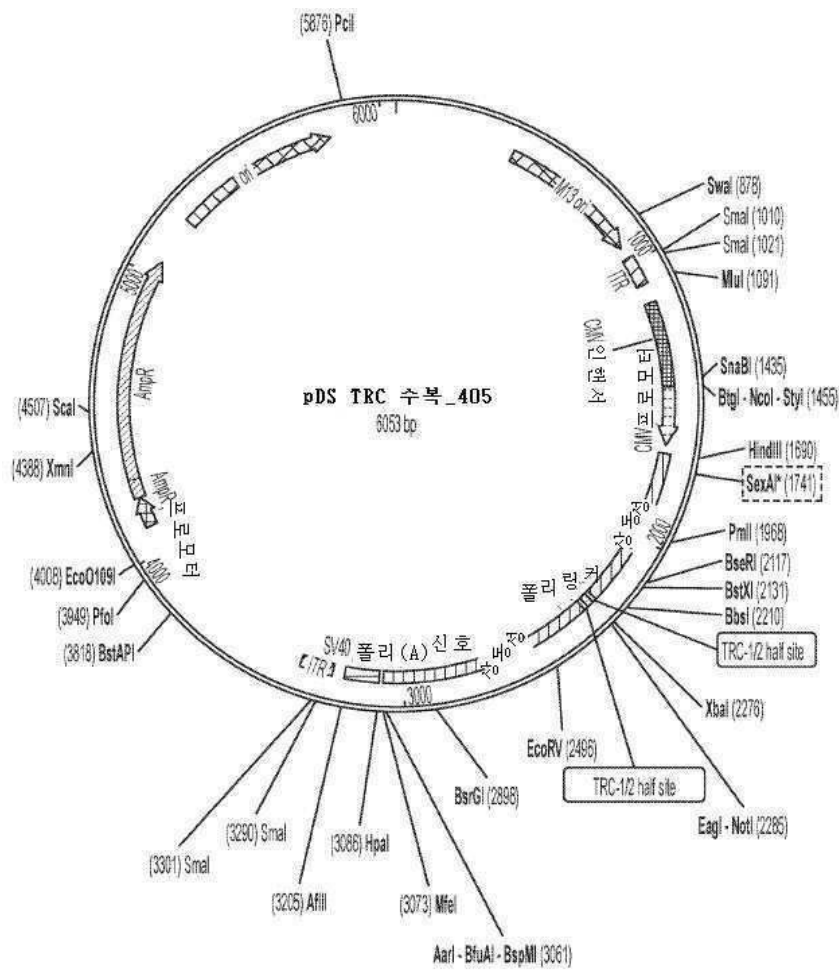
도면14

서열 번호		162	233
86 Wild-Type		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
87 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAG---CAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
88 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAG---AACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
89 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAG---AATCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
90 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAG---TCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
91 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAG---ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
92 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAG---ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
93 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAGCAAC---TCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
94 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAGCAACGACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	
95 Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCCTGGGCCTGGAGCAACGACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGGCCTCAAC	

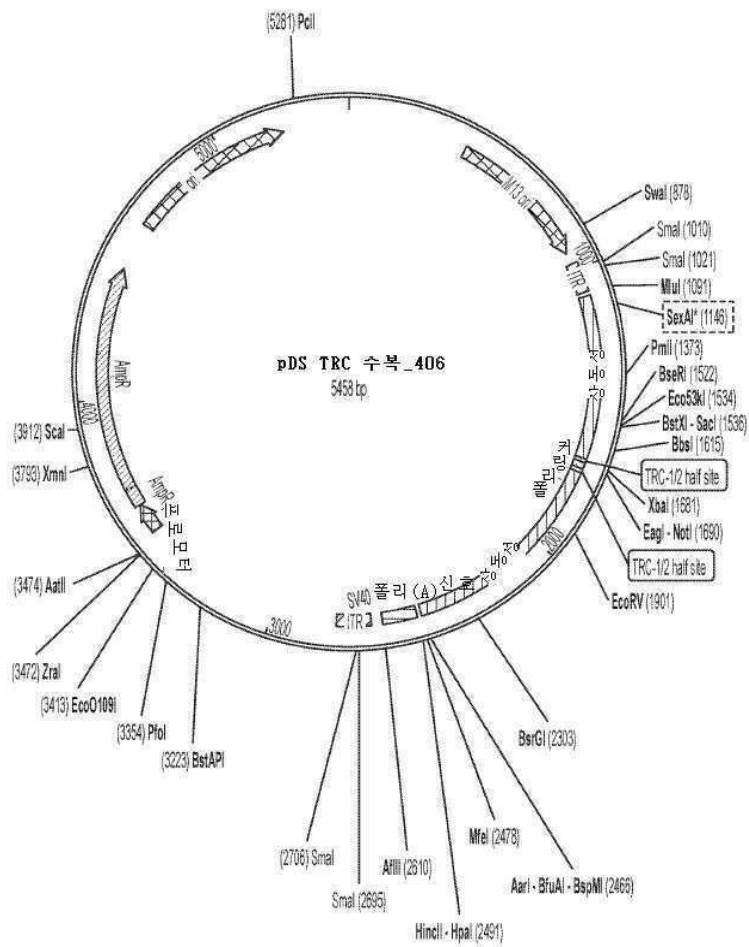
도면15



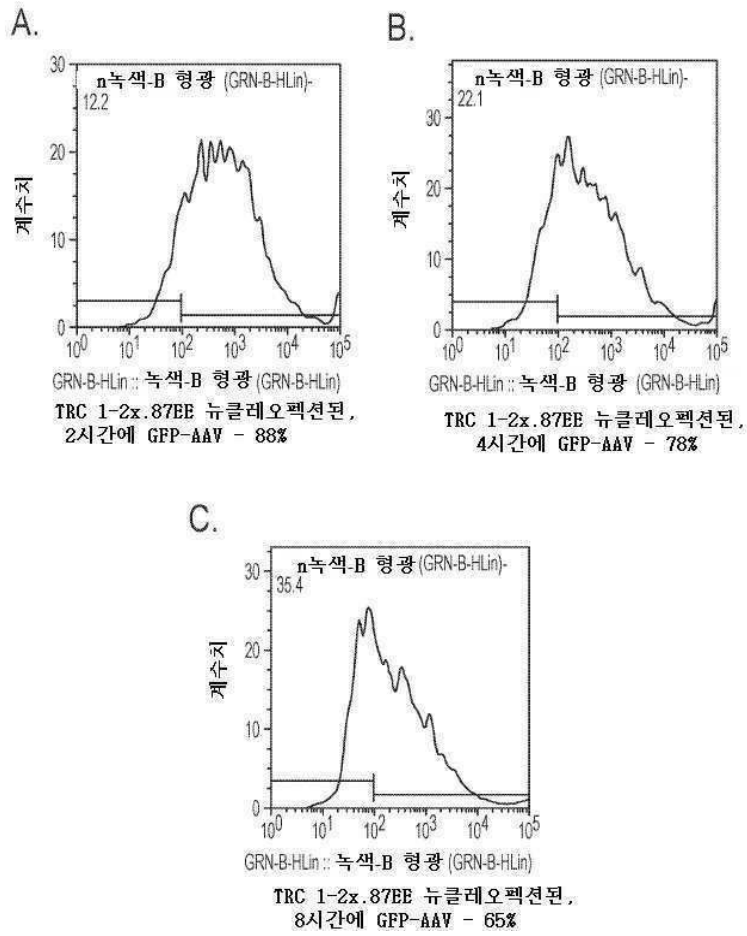
도면 16



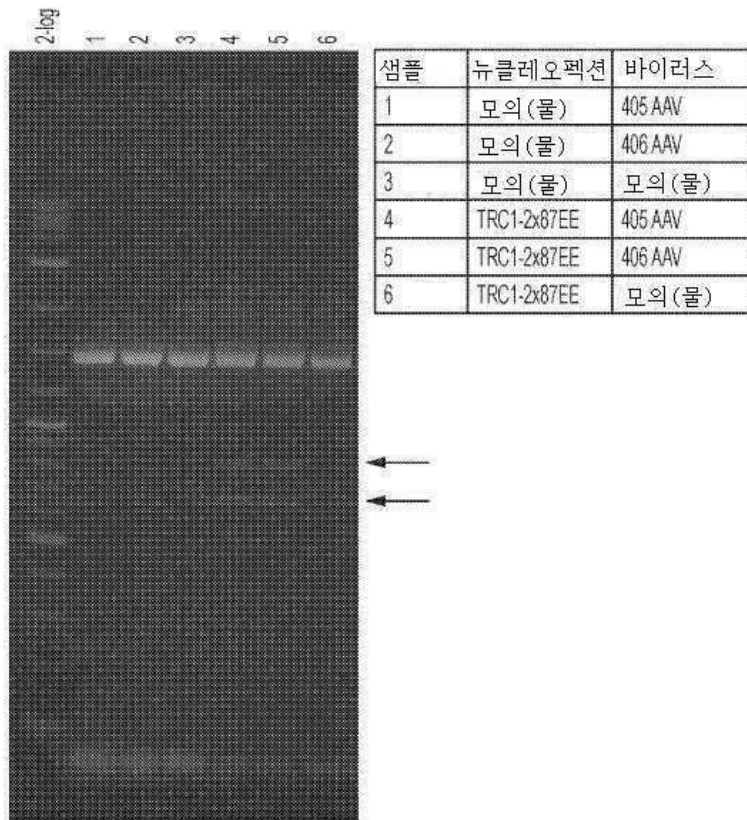
도면17



도면18

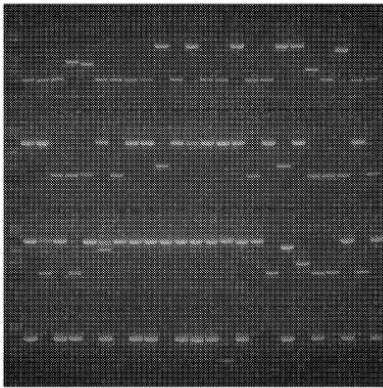


도면19

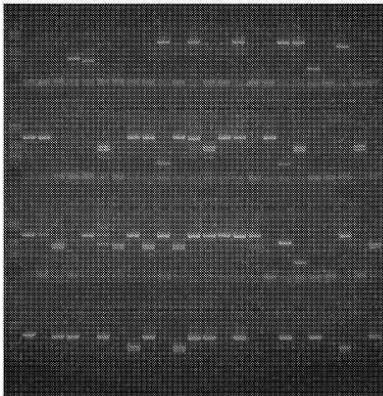


도면20

A.

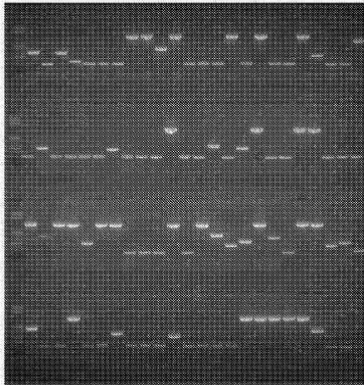


B.

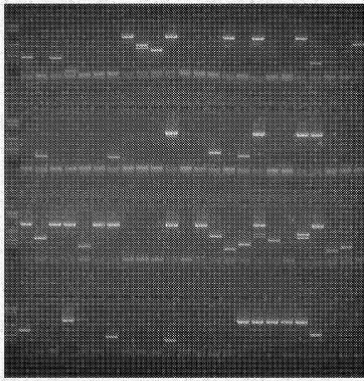


도면21

A.



B.



도면22

A.

서열
번호

96 야생형
96 인텔
97 인텔
98 인텔
99 인텔
100 인텔
101 인텔
102 인텔
103 인텔
104 인텔

162 233
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAAC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGCCTGG--CAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAAC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGC-----AAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAAC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGCCTGGA---CAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAAC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGCCTGGAGCAA--ATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAAC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGCCTGGAGCAA-----TGTCACAAACGCCCTTCAAC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGCCTGGA---CAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAAC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGCCTGGAGCA-CAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAAC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGGCCTGGAGCAA-----TGTCACAAACGCCCTTCAAC
AT-----CAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAAC

B.

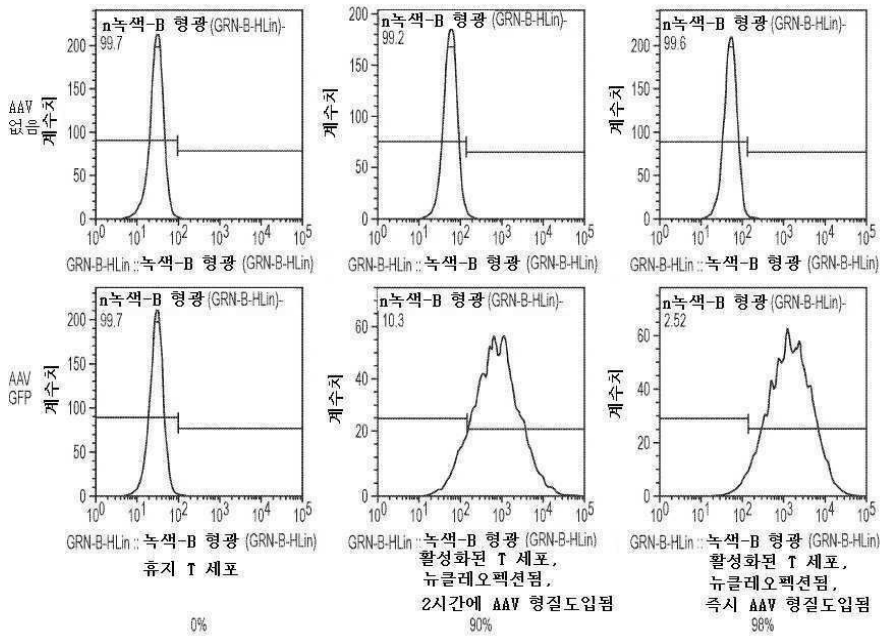
서열
번호

105 야생형
106 삽입

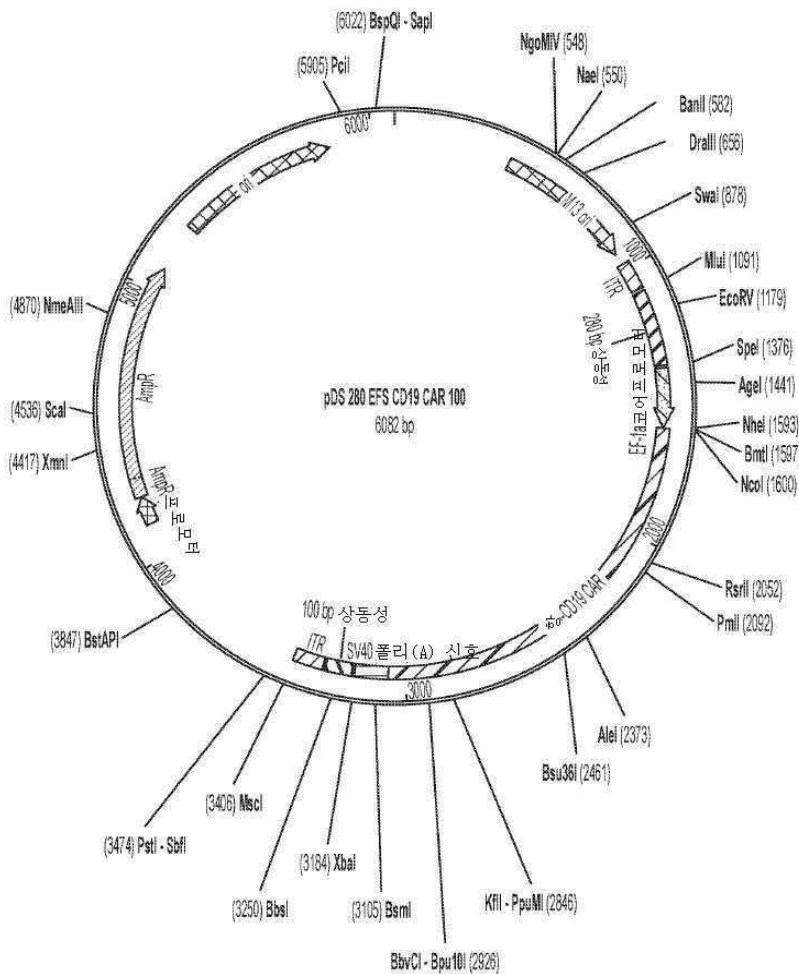
181 214
GTGCTGTGGCTTGGAGGCAA-----CAATCTGACTTTGC
GTGCTGTGGCTTGGAGGCAAAATCTGACTTTGCAGCAATCTGACTTTGC

Eag1 부위

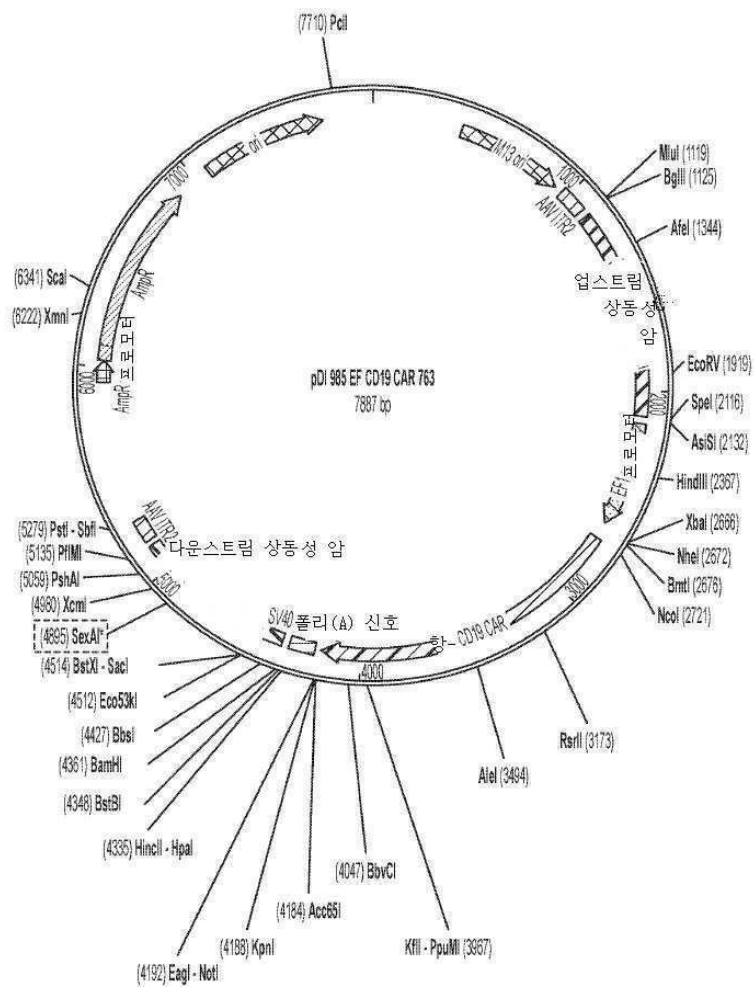
도면23



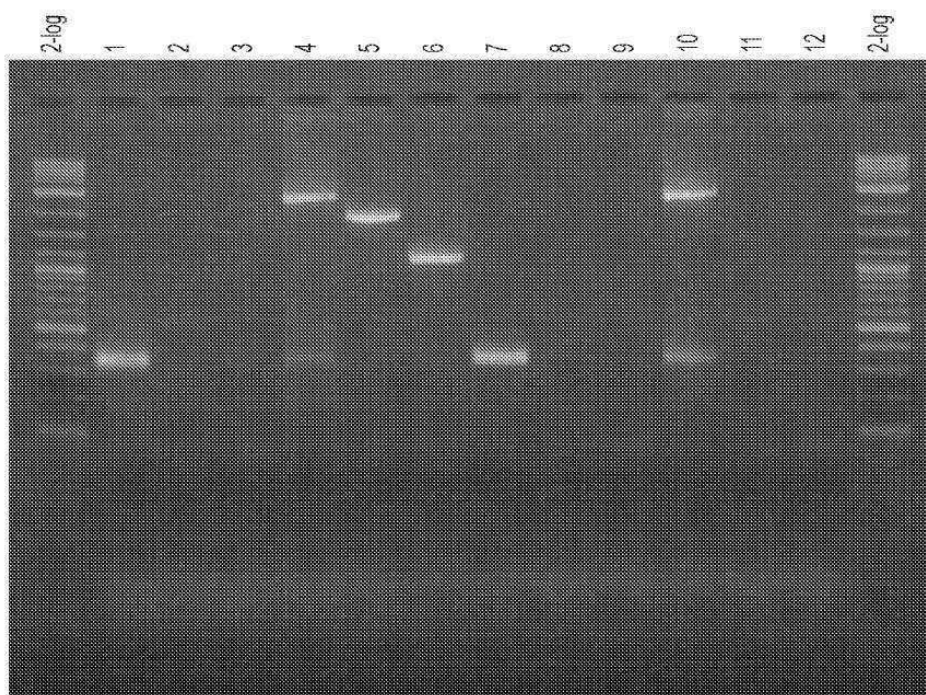
도면24



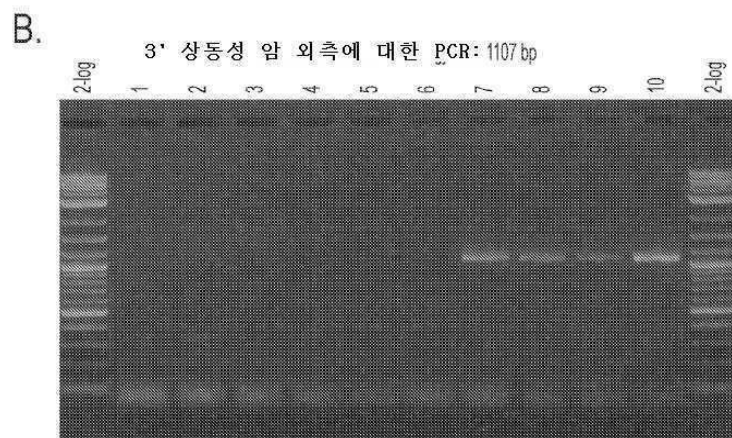
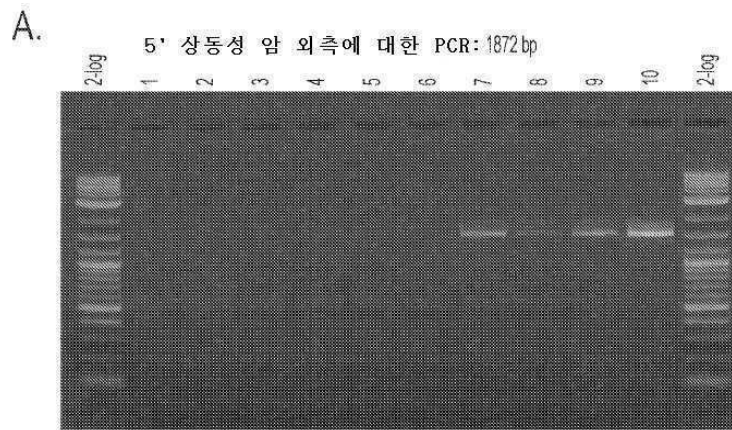
도면25



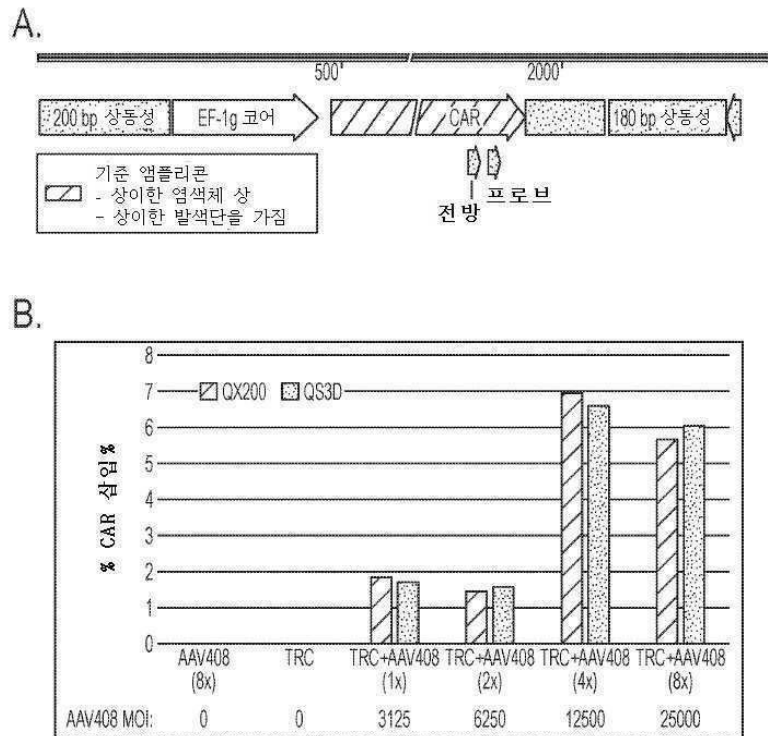
도면26



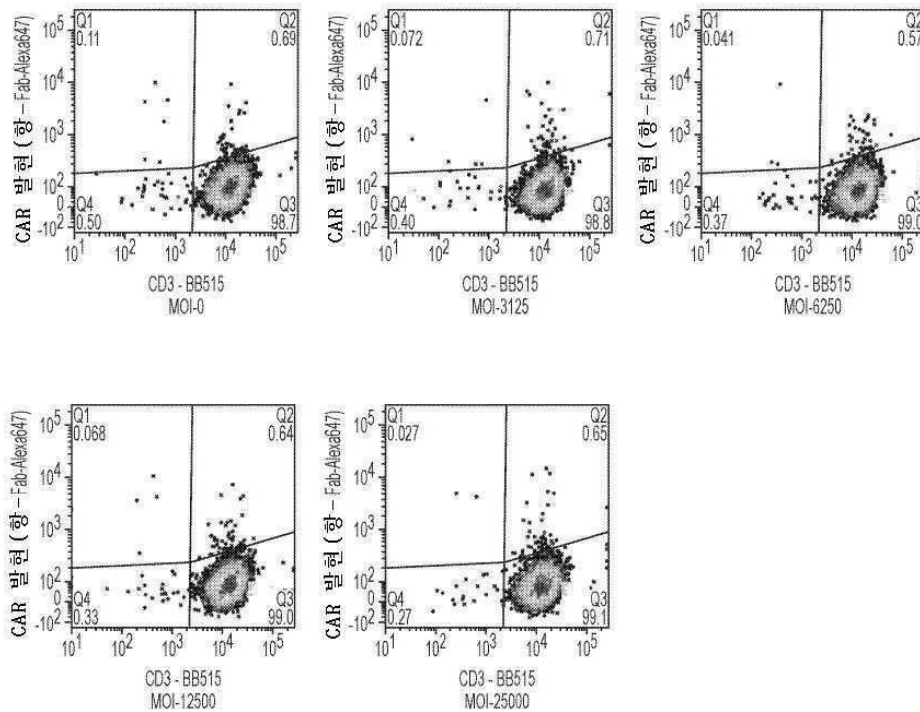
도면27



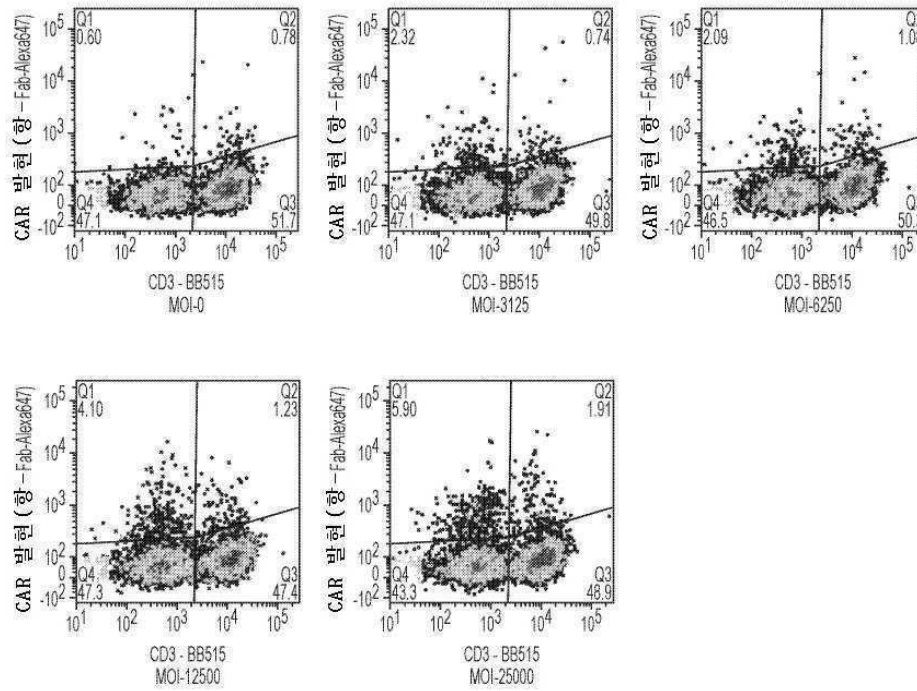
도면28



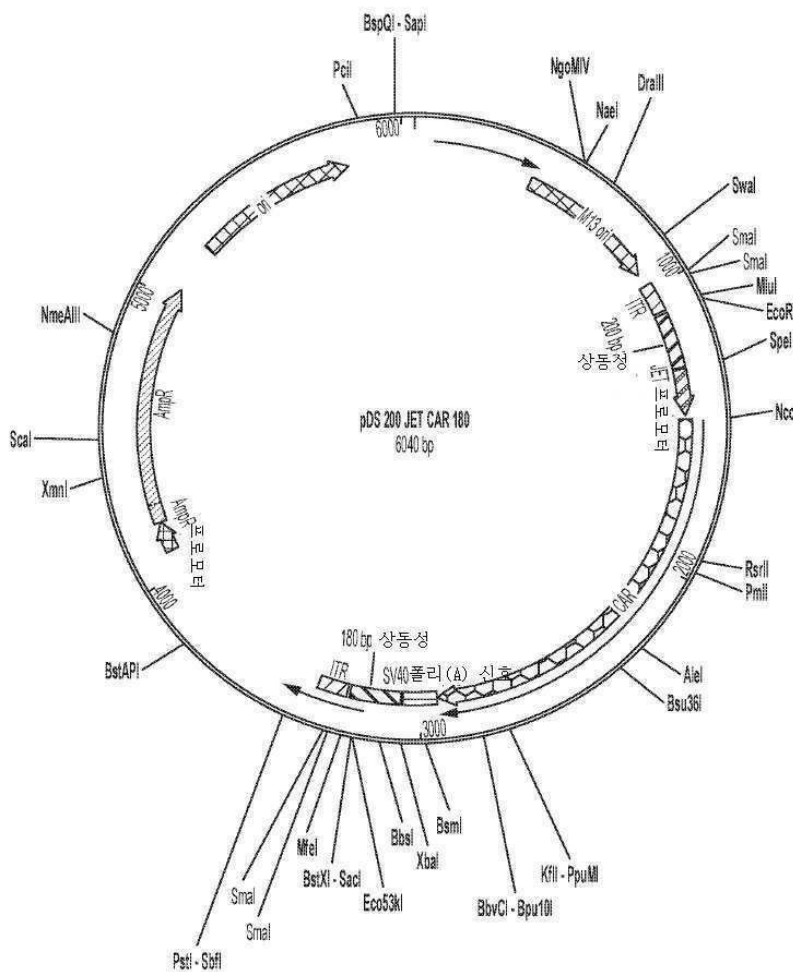
도면29a



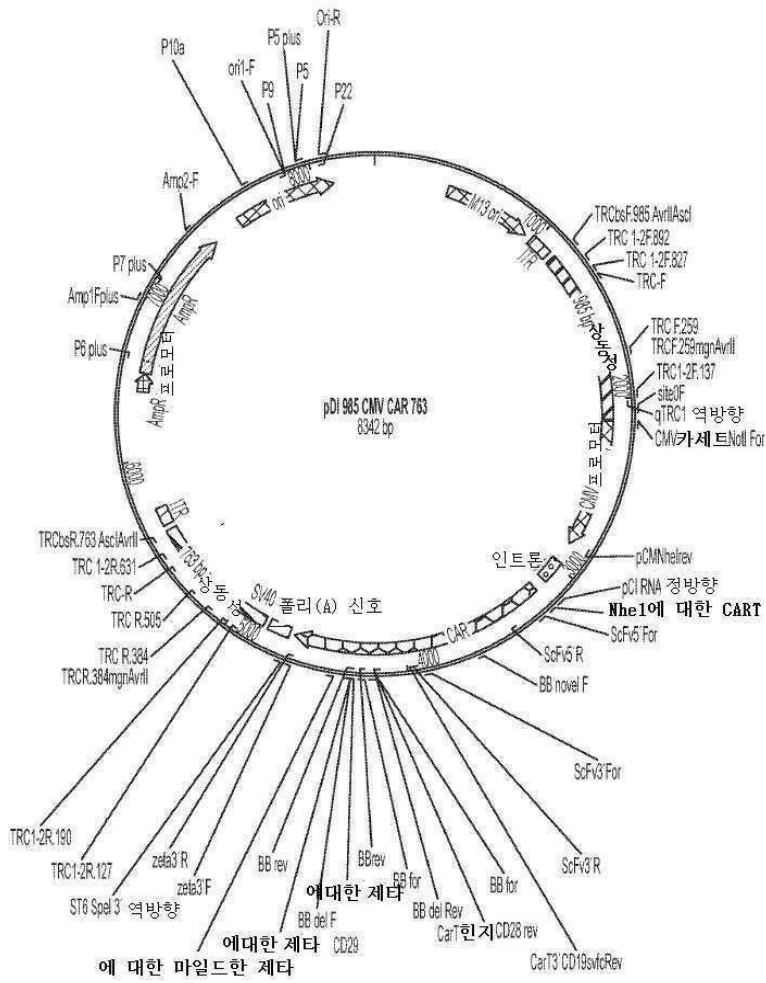
도면29b



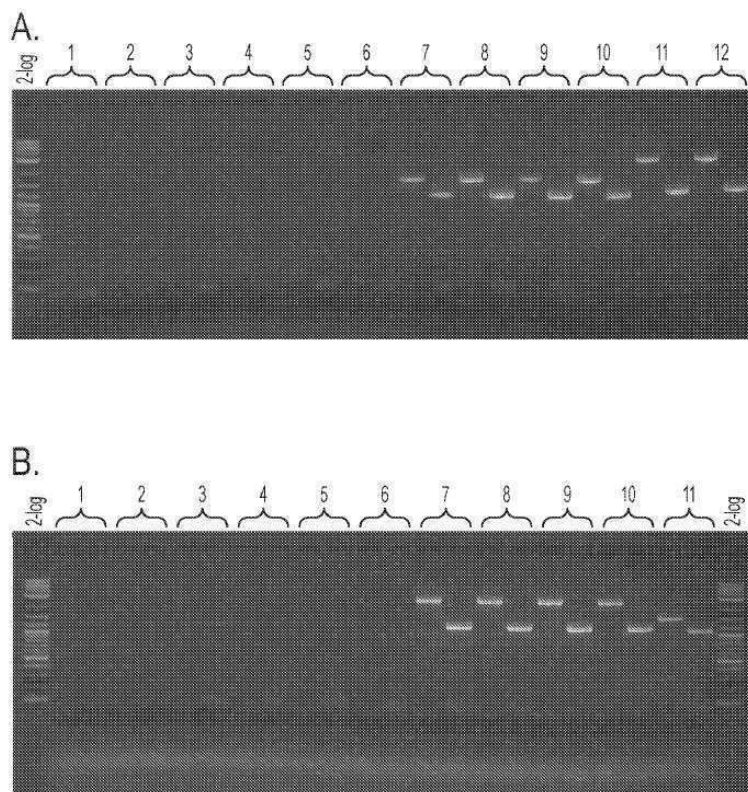
도면30



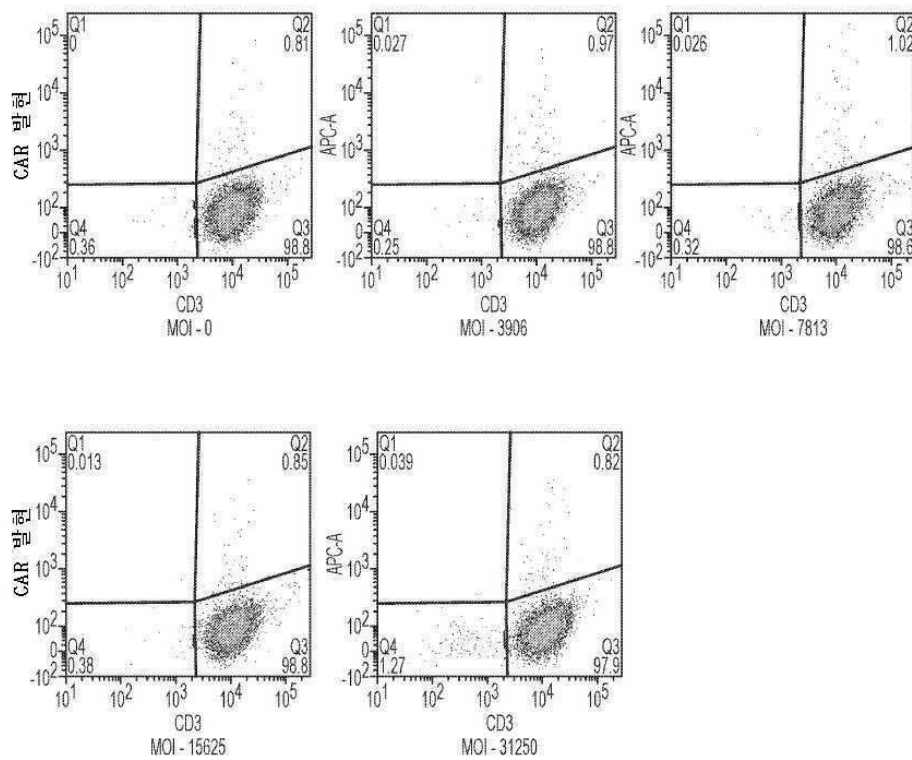
도면31



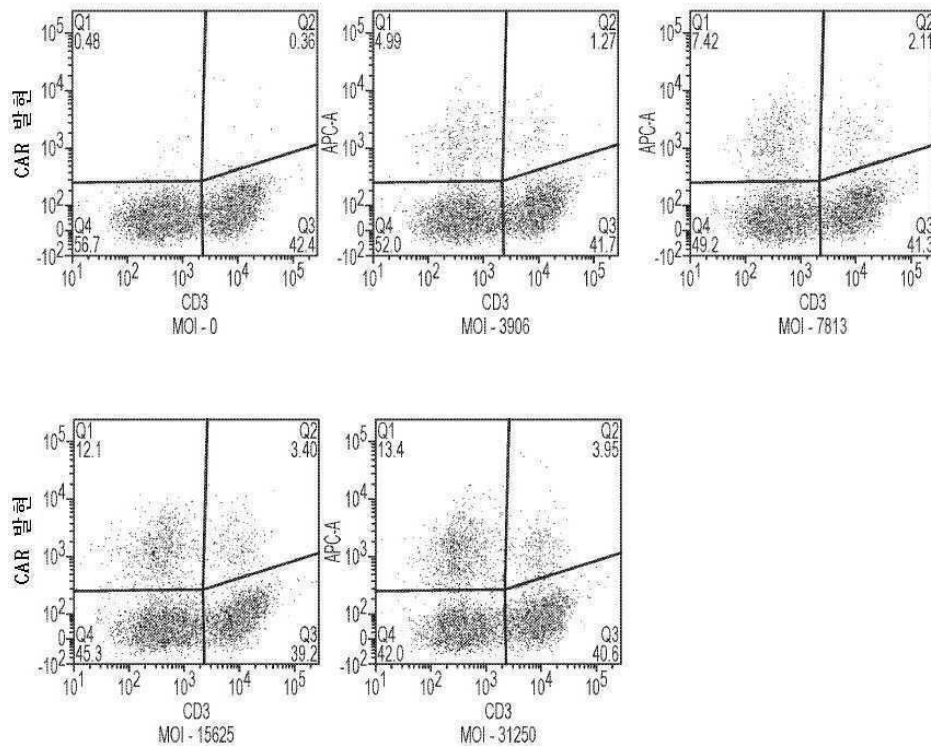
도면32



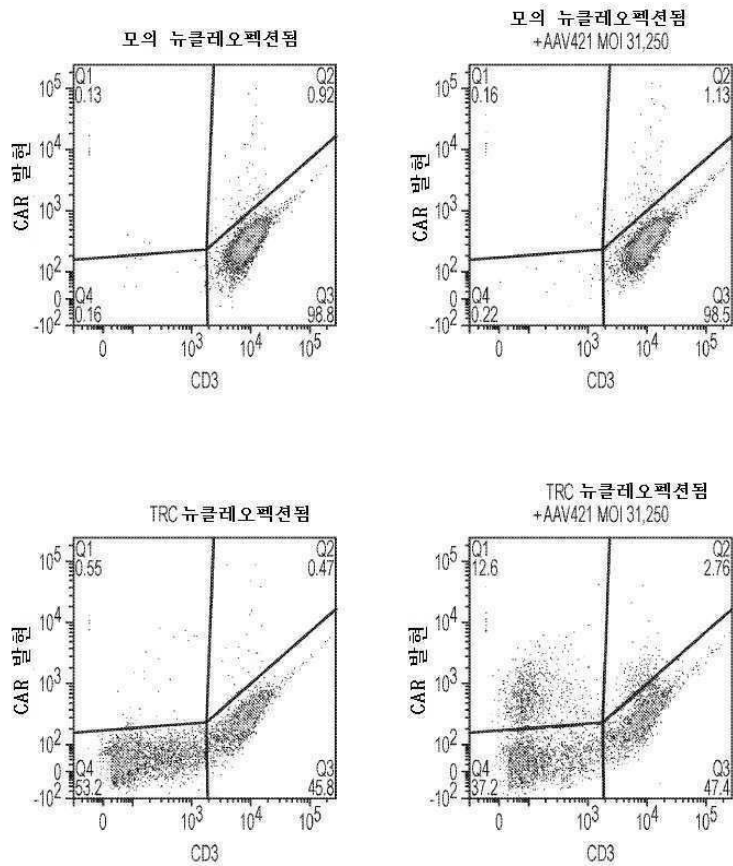
도면33a



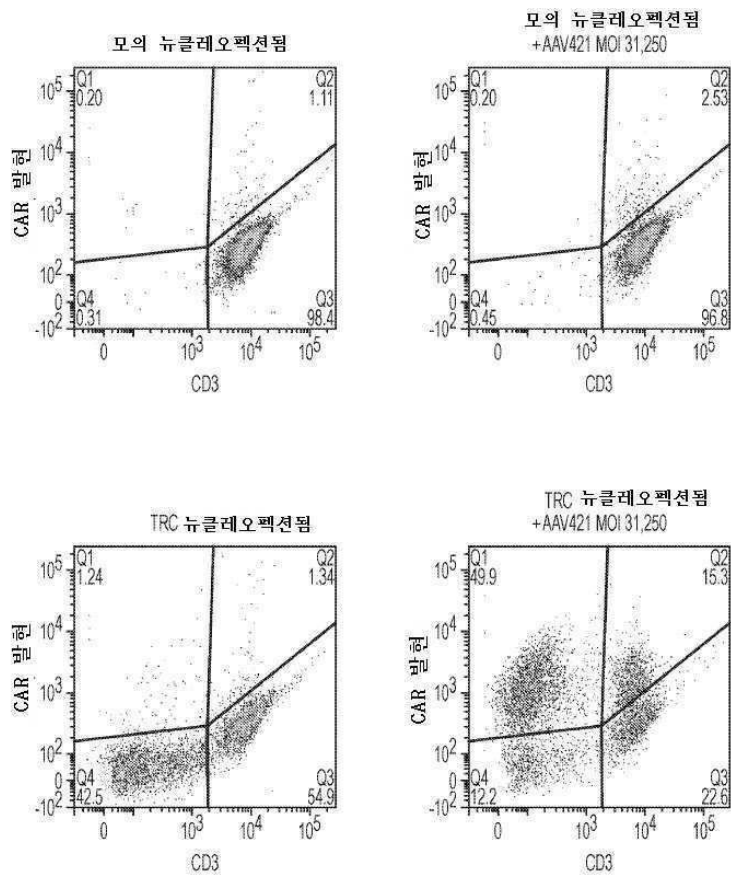
도면33b



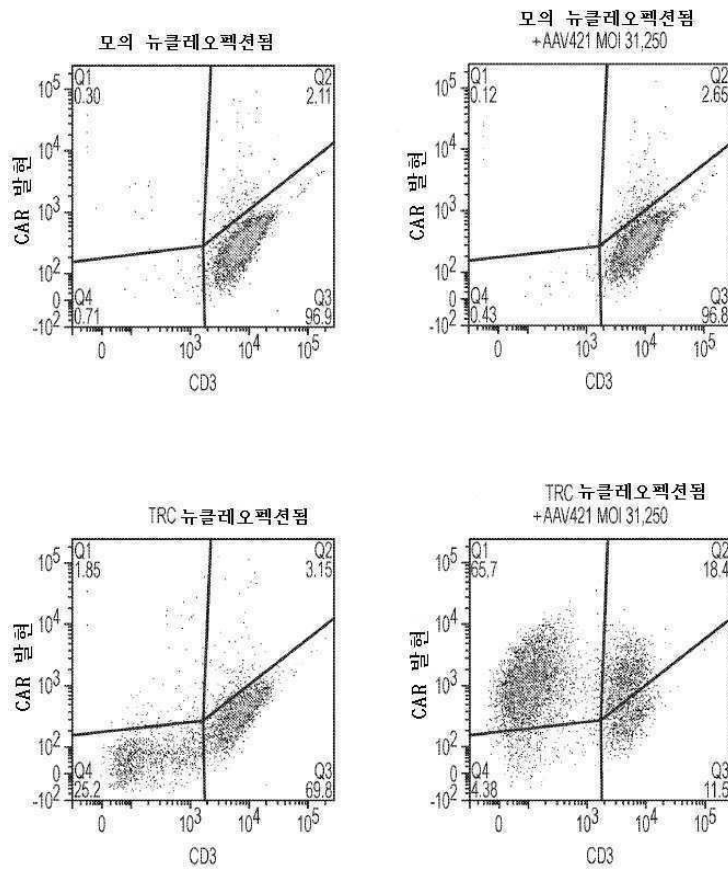
도면34a



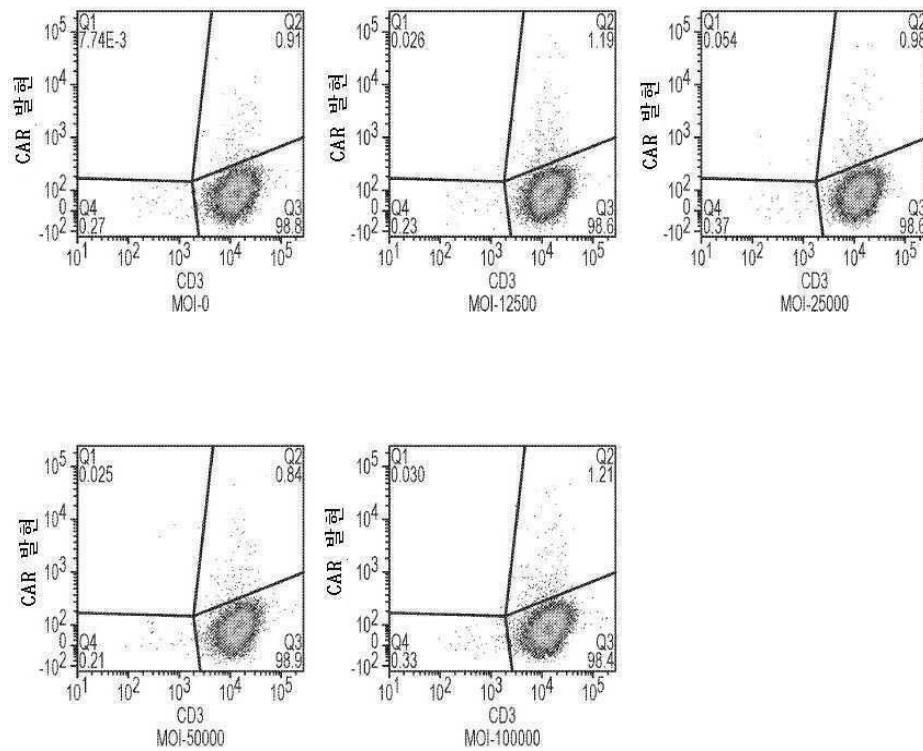
도면34b



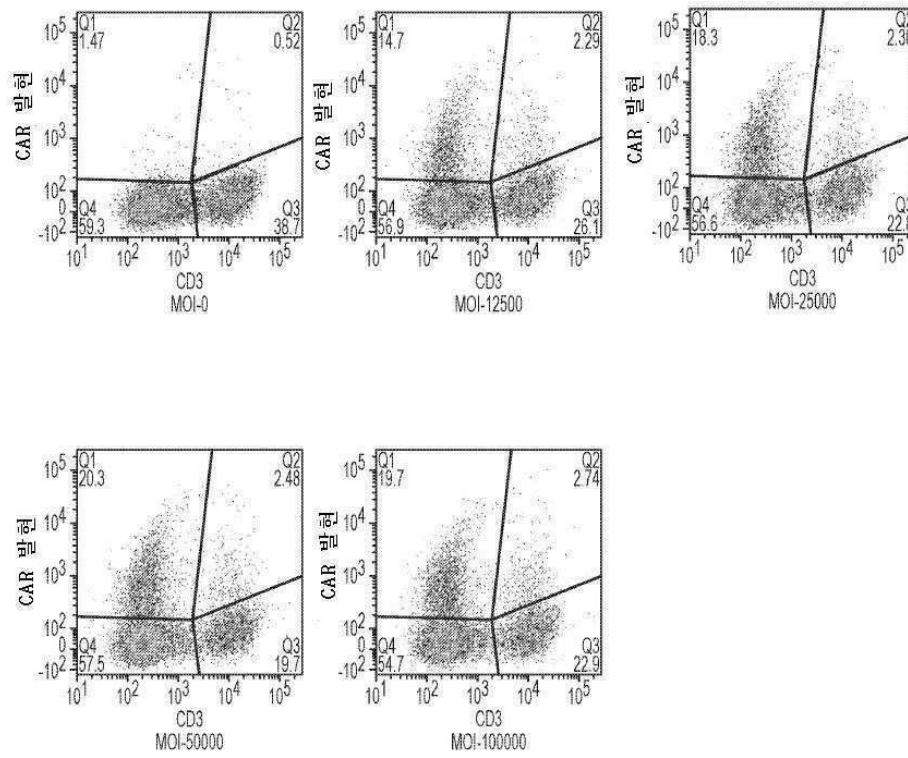
도면34c



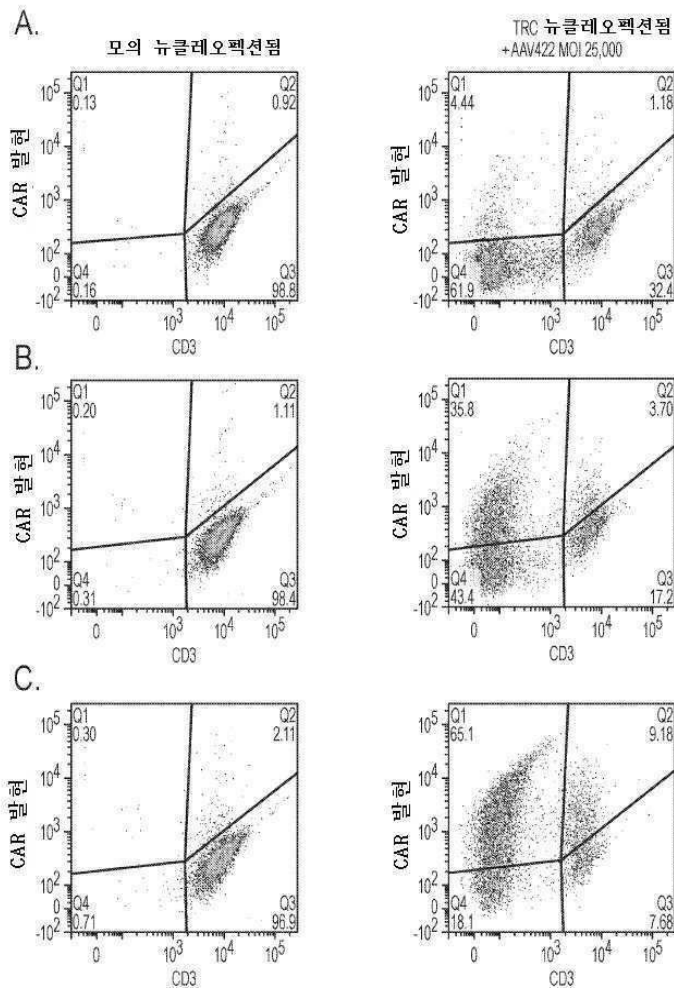
도면35a



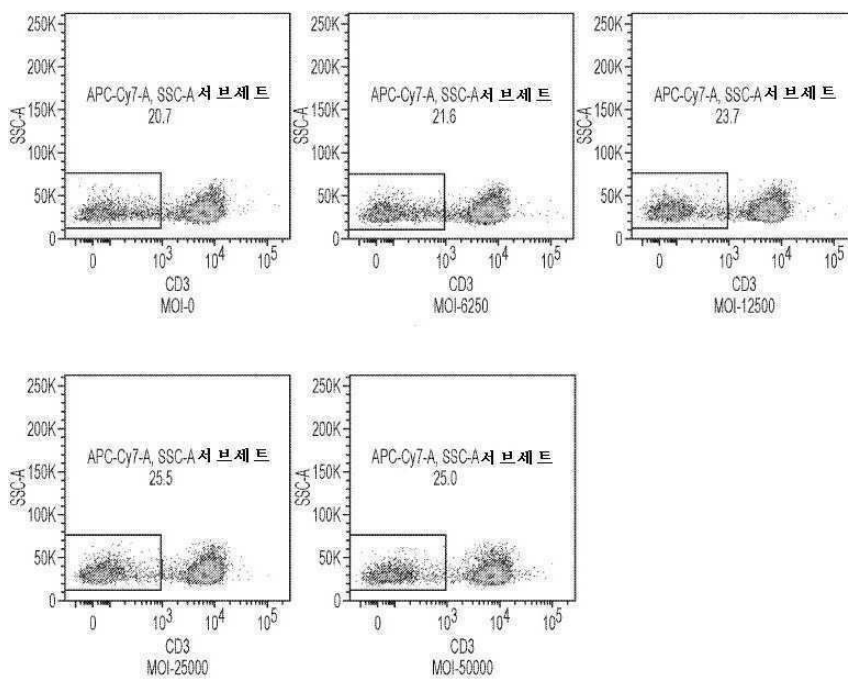
도면35b



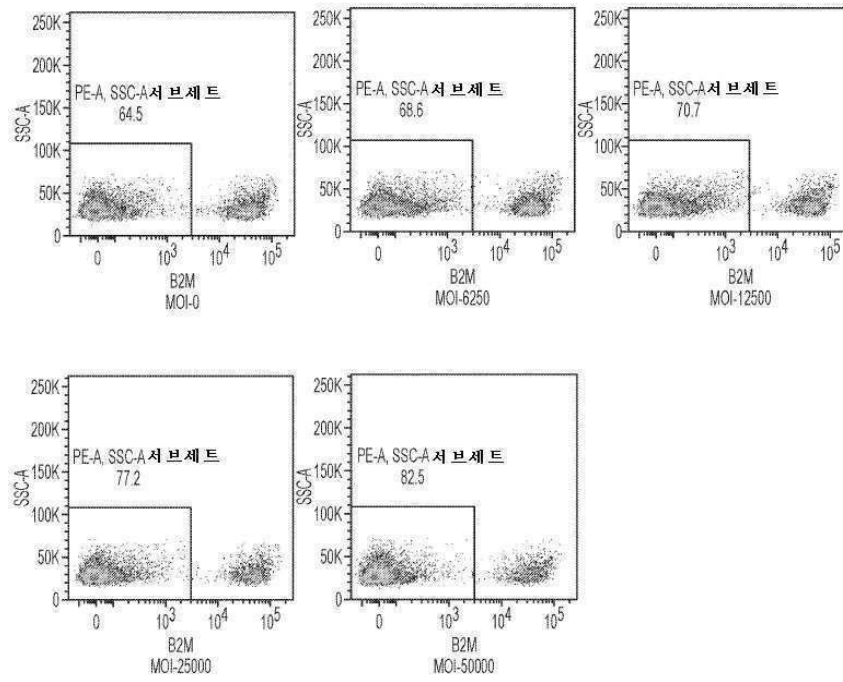
도면36



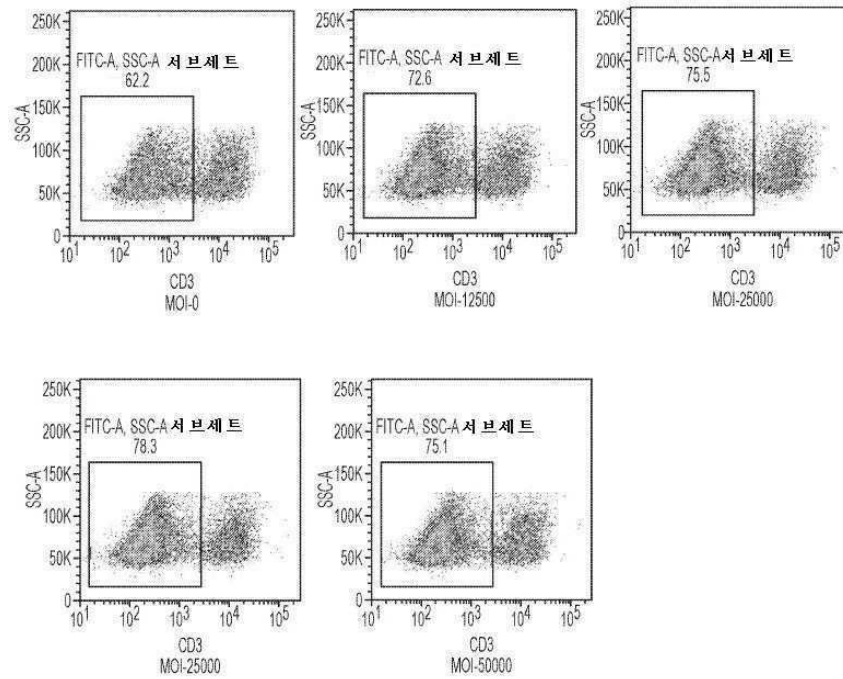
도면37a



도면37b

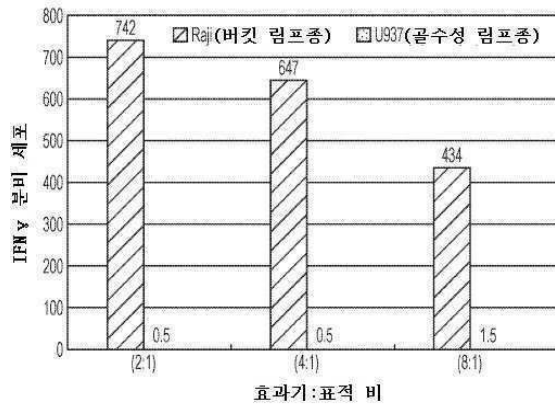


도면37c

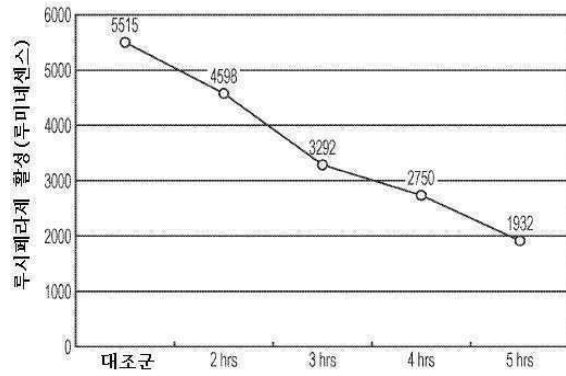


도면38

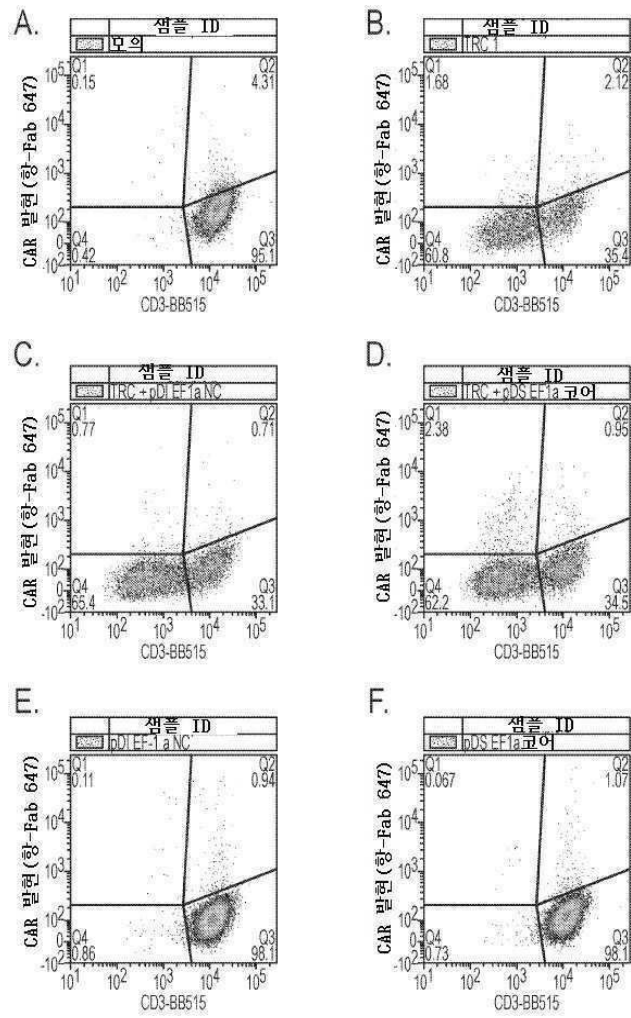
A.



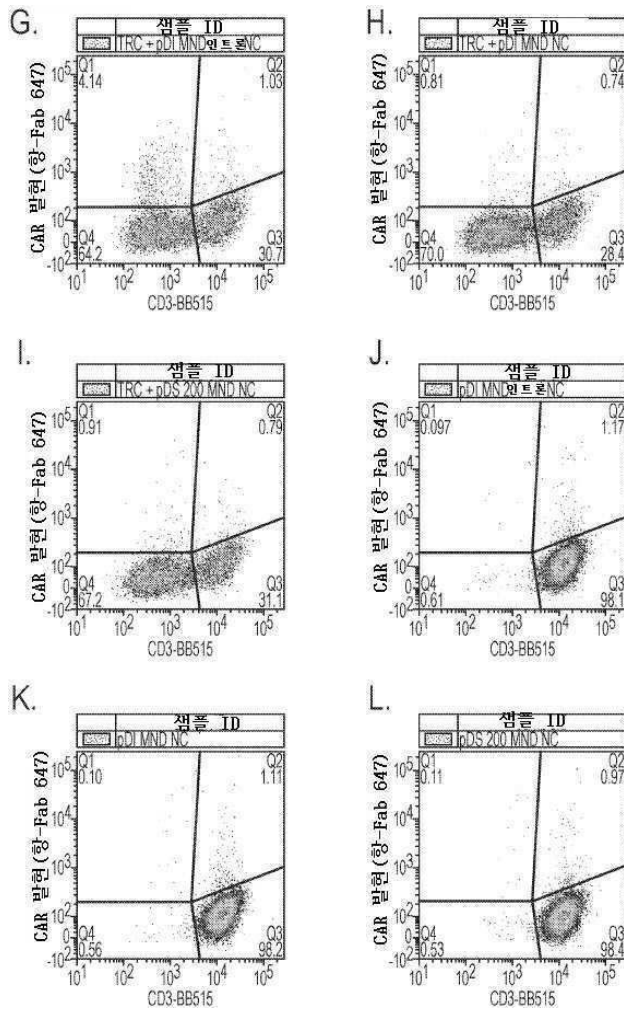
B.



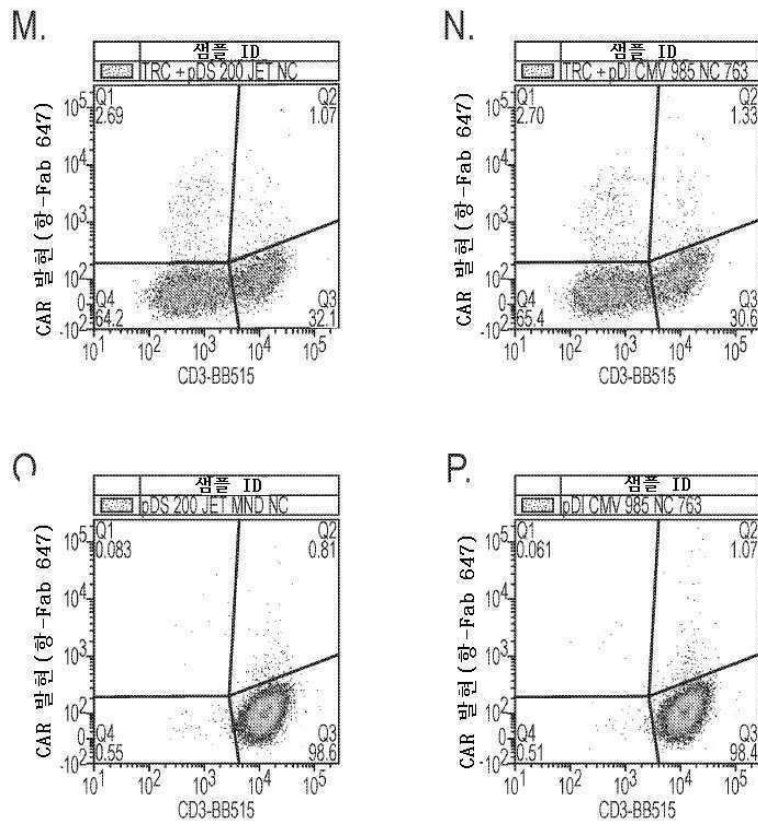
도면39af



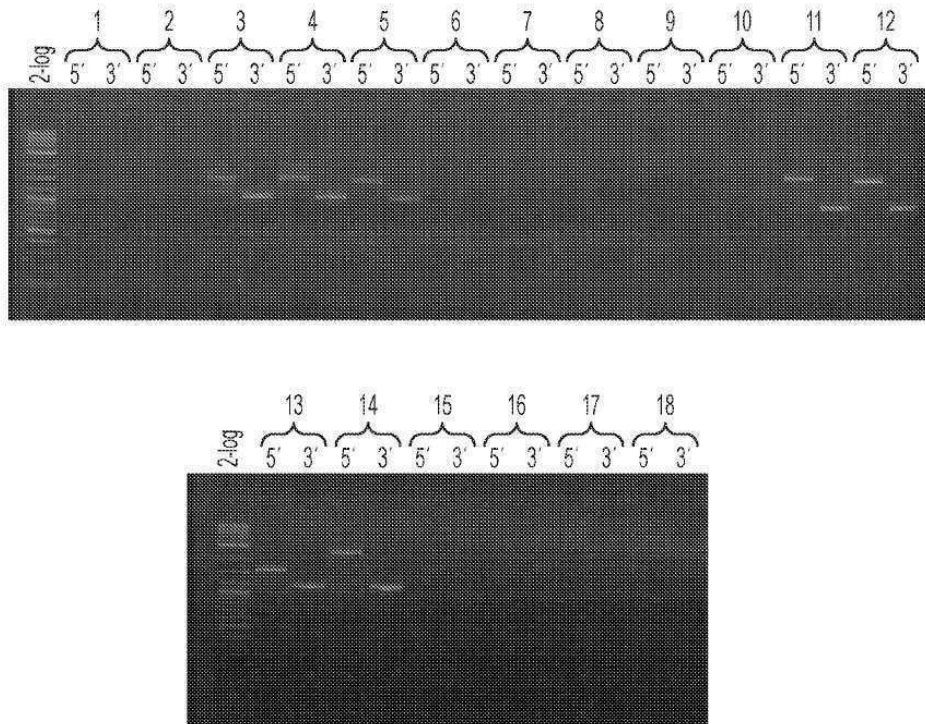
도면39g1



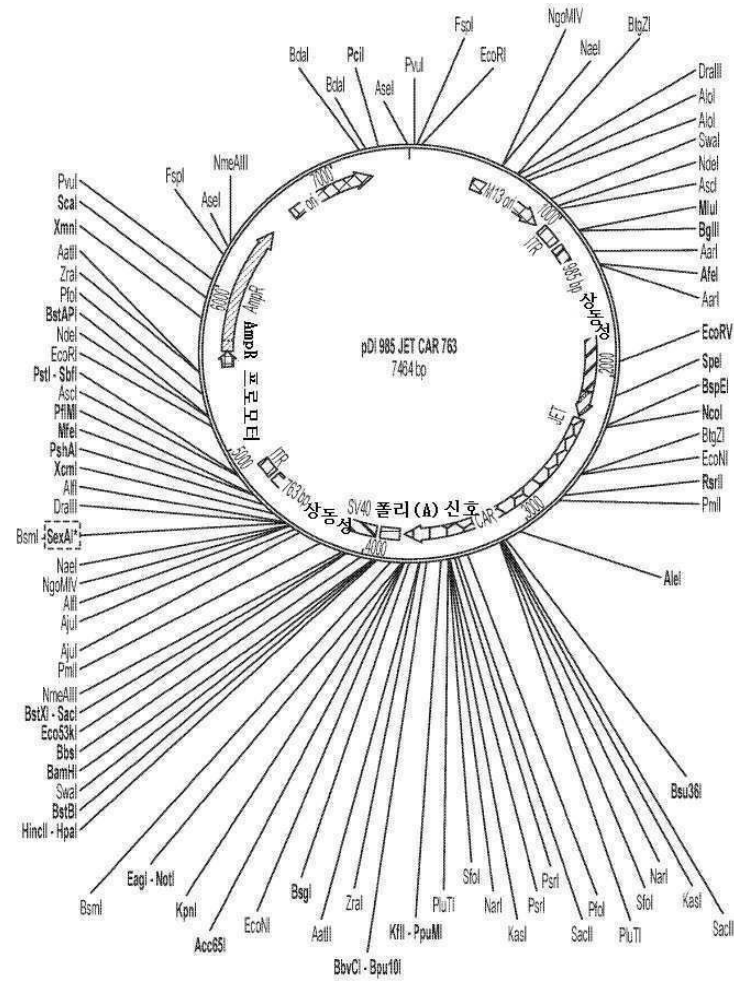
도면39mp



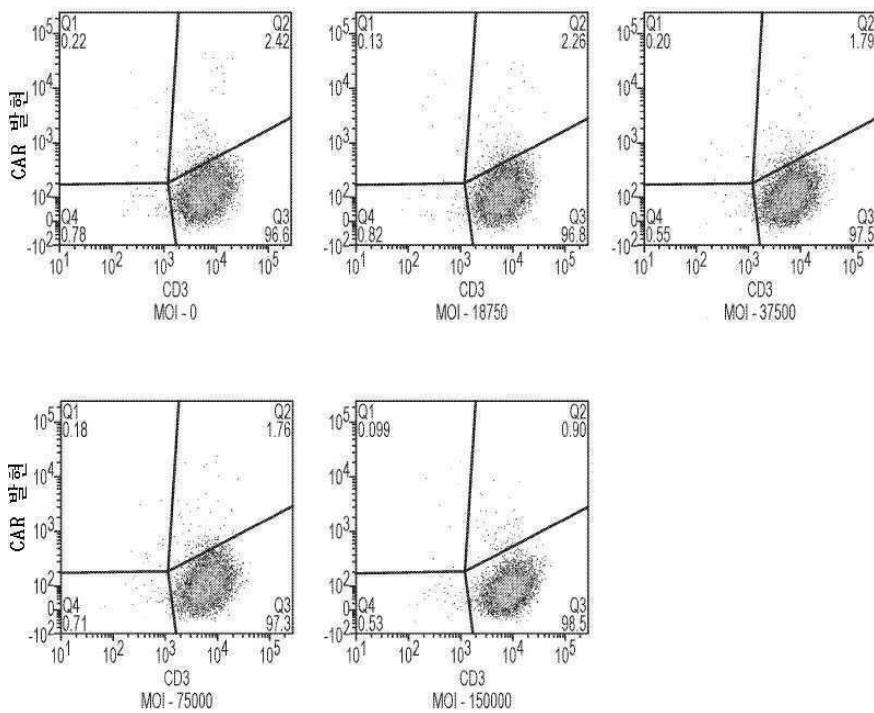
도면40



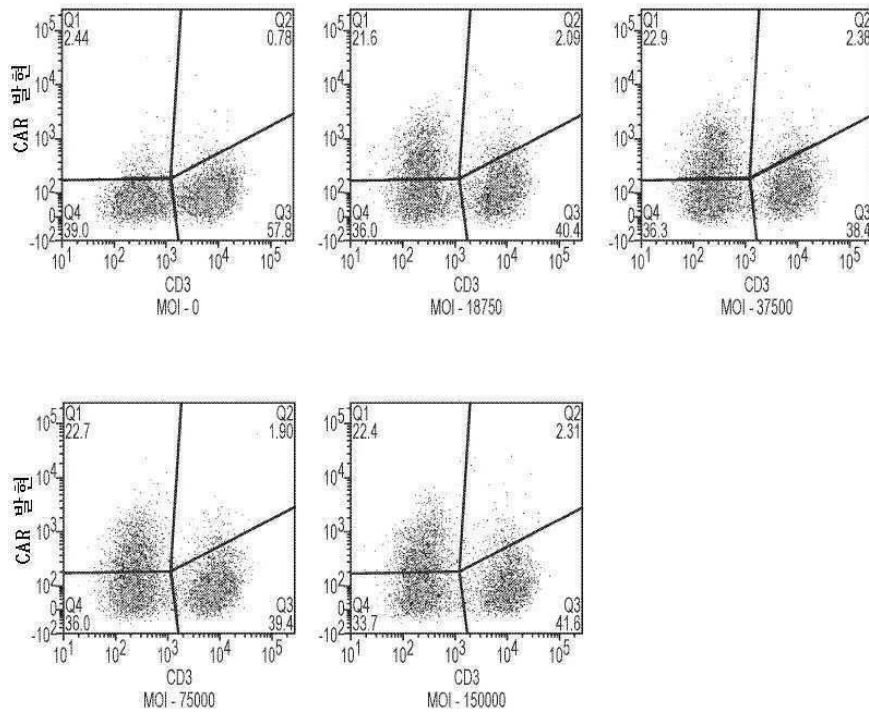
도면41



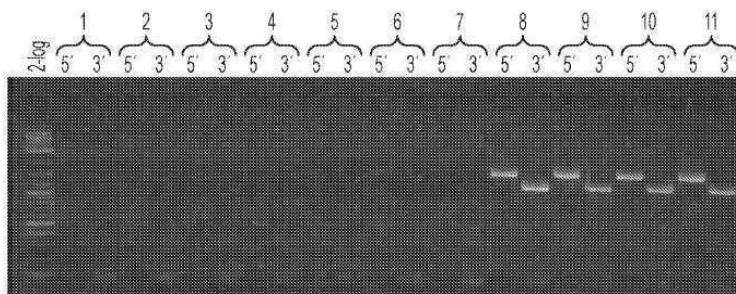
도면42a



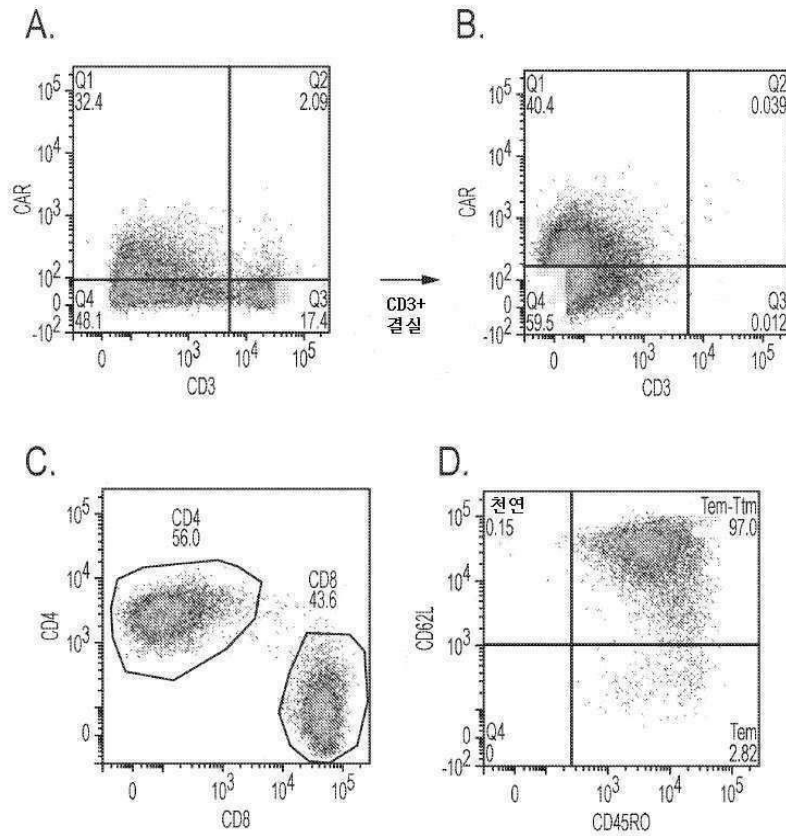
도면42b



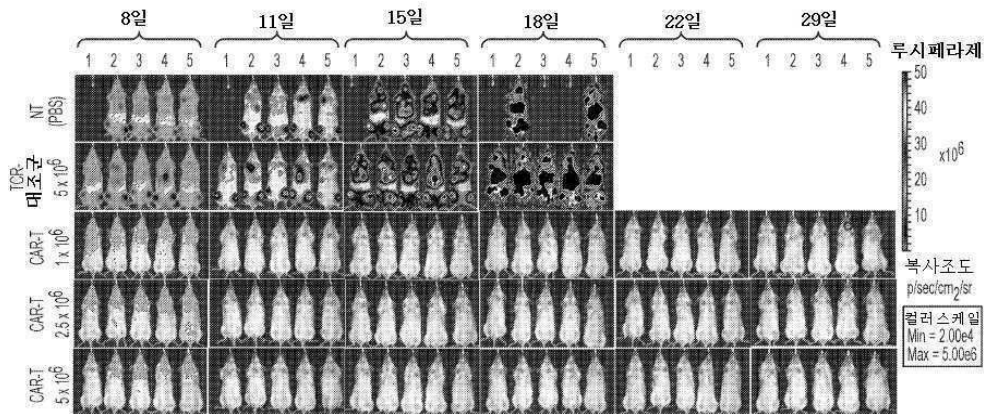
도면43



도면44



도면45



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> PRECISION BIOSCIENCES, INC.

<120> GENETICALLY-MODIFIED CELLS COMPRISING A MODIFIED HUMAN T CELL RECEPTOR ALPHA CONSTANT REGION GENE

<130> WO/2017/062451

<140> PCT/US2016/055492

<141> 2016-10-05

<150> US 62/237,394

<151> 2015-10-05

<150> US 62/297,426

<151> 2016-02-19

<160> 125

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atatccagaa ccctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt 60

ctgtctgcct attcaccgat ttgtattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg 120

atgtgtatat cacagacaaa actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca 180

gtgctgtggc ctggagcaac aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca 240

ttattccaga agacaccttc tccccagcc caggtaaggg cagcttttgt gccttcgcag 300

gctgtttcct tgcttcagga atggccaggt tctgccaga gctctggtca atgatgtcta 360

aaactcctct gatttgttgt cteggcctta tccattgcca ccaaaaccct ctttttacta 420

agaaacagtg agccttgttc tggcagtcca gagaatgaca cgggaaaaaa gcagatgaag 480

agaaggtggc aggagagggc acgtggccca gcctcagtct ctccaactga gttcctgcct 540

gcctgccttt gtcagactg ttgtccctt actgtcttc taggcctcat tctaagcccc 600

ttctccaagt tgctctcct tatttctccc tgtctgcaa aaaatcttc ccagtcact 660

aagtcagtct cagcagtc ctcattaacc caccaatcac tgattgtgcc ggcacatgaa 720

tgcaccaggt gttgaagtgg aggaattaaa aagtcagatg aggggtgtgc ccagaggaag 780

caccattcta gttgggggag cccatctgtc agctgggaaa agtccaaata acttcagatt 840

ggaatgtgtt ttaactcagg gttgagaaaa cagctacctt caggacaaaa gtcaggaag 900

ggctctctga agaaatgcta cttgaagata ccagccctac caagggcagg gagaggaccc 960

tatagaggcc tgggacagga gctcaatgag aaaggagaag agcagcaggc atgagttgaa 1020

tgaaggaggc agggccgggt cacagggcct tctaggccat gagagggtag acagtattct 1080

aaggacgcca gaaagctgtt gatcggttc aagcagggga gggacaccta atttgctttt 1140

cttttttttt tttttttttt tttttttttt tgagatggag ttttgccttt gttgccccagg 1200

ctggagtgc atggtgcatc ttggctcact gcaacctccg cctcccaggt tcaagtgatt	1260
ctcctgcctc agcctcccg gtagctgaga ttacaggcac ccgccacat gcctggctaa	1320
ttttttgtat ttttagtaga gacagggttt cactatgttg gccaggctgg tctcgaactc	1380
ctgacctcag gtgatccacc cgcttcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggcgtgagc	1440
caccacacc ggctgtcttt tcttaaagat caatctgagt gctgtacga gagtgggttg	1500
taagccaaga gtagaagcag aaaggagca gttgcagcag agagatgatg gaggcctggg	1560
cagggtgggt gcaggagggt aaccaacacc attcaggttt caaaggtaga accatgcagg	1620
gatgagaaag caaagagggg atcaaggaag gcagctggat tttggcctga gcagctgagt	1680
caatgatagt gccgtttact aagaagaaac caaggaaaaa atttggggtg cagggatcaa	1740
aacttttttg aacatatgaa agtacgtgtt tatactcttt atggcccttg tcactatgta	1800
tgctcgctg cctccattgg actctagaat gaagccaggc aagagcaggg tctatgtgtg	1860
atggcacatg tggccagggt catgcaacat gtactttgta caaacagtgt atattgagta	1920
aatagaaatg gtgtccagga gccgaggtat cggctctgcc agggccaggg gctctcccta	1980
gcagggtgctc atatgctgta agttccctcc agatctctcc acaaggaggc atggaaaggc	2040
tgtagtgtt cactgcccc agaactagga ggtctggggg gggagagtca gcctgctctg	2100
gatgctgaaa gaatgtctgt ttttcctttt agaaagtcc tgtgatgtca agctggctga	2160
gaaaagcttt gaaacaggtg agacagggtt ctagcctggg tttgcacagg attgcggaag	2220
tgatgaacc gcaataacc tgcttgatg agggagtggg aagaaattag tagatgtggg	2280
aatgaatgat gaggaatgga aacagcggtt caagacctgc ccagagctgg gtgggtctc	2340
tcctgaatcc ctctcaccat ctctgacttt ccattctaag cactttgagg atgagtttct	2400
agcttcaata gaccaaggac tctctcctag gcctctgtat tcctttcaac agctccactg	2460
tcaagagagc cagagagagc ttctgggtgg ccagctgtg aaatttctga gtcccttagg	2520
gatagcccta aacgaaccag atcatcctga ggacagccaa gaggttttgc cttctttcaa	2580
gacaagcaac agtactcaca taggtgtggt gcaatggtcc tgtctctcaa gaatccctg	2640
ccactcctca caccacccct gggcccatat tcatttccat ttgagttgtt cttattgagt	2700
catccttctt gtggtagcgg aactcactaa ggggcccatc tggacccgag gtatttgtat	2760
gataaattct gagcacctac cccatcccca gaagggtca gaaataaaat aagagccaag	2820
tctagtcggt gtttctgtc ttgaaacaca atactgttg ccttgaaga atgcacagaa	2880
tctgtttgta aggggatatg cacagaagct gcaagggaca ggaggtgcag gagctgcagg	2940

cctccccac ccagcctgct ctgccttggg gaaaaccgtg ggtgtgtcct gcaggccatg	3000
caggcctggg acatgcaagc ccataaccgc tgtggcctct tggttttaca gatacgaacc	3060
taaactttca aaacctgtca gtgattgggt tccgaatcct cctcctgaaa gtggccgggt	3120
ttaatctgct catgacgctg cggctgtggt ccagctgagg tgaggggcct tgaagctggg	3180
agtggggttt agggacgagg gtctctgggt gcatcctaag ctctgagagc aaacctccct	3240
gcagggtctt gcttttaagt ccaaagcctg agcccaccaa actctctac ttcttcctgt	3300
tacaaattcc tcttgtgcaa taataatggc ctgaaacgt gtaaaatata ctcatttcag	3360
ccgcctcagt tgcattctc ccctatgagg taggaagaac agttgttttag aaacgaagaa	3420
actgaggccc cacagctaat gagtggagga agagagacac ttgtgtacac cacatgcctt	3480
gtgttgtact tctctaccg tgtaacctcc tcatgtctc tctccccagt acggctctct	3540
tagctcagta gaaagaagac attacactca tattacaccc caatcctggc tagagtctcc	3600
gcacctcct cccccagggt cccagtcgt cttgtgaca actgcatcct gttccatcac	3660
catcaaaaa aaactccagg ctgggtgcgg gggtcacac ctgtaatccc agcactttgg	3720
gaggcagagg caggaggagc acaggagctg gagaccagcc tgggcaacac agggagaccc	3780
cgctctaca aaaagtgaac aaattaacca ggtgtggtgc tgcacacctg tagtcccagc	3840
tacttaagag gctgagatgg gaggatcgt tgagccctgg aatgttgagg ctacaatgag	3900
ctgtgattgc gtcactgcac tccagcctgg aagacaaagc aagatcctgt ctcaaataat	3960
aaaaaaaaata agaactccag ggtacatttg ctctagaac tctaccacat agccccaac	4020
agagccatca ccacacatc cctaacagtc ctgggtcttc ctgagtgtcc agcctgactt	4080
ctgttcttc tcattccaga tctgcaagat tgaagacag cctgtgtcc ctgctcctt	4140
cctctgcatt gccctcttc tcccttcca aacagaggga actctctac cccaaggag	4200
gtgaaagctg ctaccacctc tgtgcccccc eggcaatgcc accaactgga tctacccga	4260
atttatgatt aagattgctg aagagctgcc aaacactgct gccacccct ctgttcctt	4320
attgtgctt gtcactgct gacattcacg gcagaggcaa ggctgctgca gcctccctg	4380
gctgtgcaca ttccctctg ctcccagag actgcctccg ccatcccaca gatgatggat	4440
cttcagtggg ttctcttggg ctctaggtcc tgcagaatgt tgtgagggt ttatttttt	4500
ttaatagtgt tcataaagaa atacatagta ttcttctct caagacgtgg ggggaaatta	4560
tctcattatc gaggccctgc tatgtgtgt atctgggcgt gttgtatgtc ctgctgccga	4620
tgccttc	4627

<210> 2
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 20 25 30
 Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
 35 40 45
 Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
 50 55 60
 Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
 65 70 75 80
 Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
 85 90 95
 Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
 100 105 110
 Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val

115 120 125
 Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

tggcctggag caacaaatct ga

22

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4

acaaatgtgt cacaaagtaa gg

22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<

213> Homo sapiens

<400> 5

ctgatgtgta tatcacagac aa

22

<210> 6

<211> 163

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 6

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser

20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Trp Arg Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys

145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 7

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

<210> 8

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 8

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

<210> 9

<211> 354

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 9

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser

210 215 220
 Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr
 225 230 235 240
 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

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

 305 310 315 320
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 10

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 10

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

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

50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu

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

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

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

 260 265 270
 Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285
 Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 11

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 11

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg

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

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

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser

210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 12

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 12

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro His Gln Arg

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Leu Leu Lys Leu Val Phe Ala Val His Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser

210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 13

<211> 354

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 13

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro Asp Gln Arg

20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Gly Leu Arg Leu Asn Phe Ser Val Phe Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

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

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

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

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

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 14

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 14

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Tyr Leu Arg Leu Phe Phe Ser Val Phe Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

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

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

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

325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 15
 <211> 354
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 15

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Gln Ile Lys Pro Asp Gln Lys

20 25 30

Met Lys Phe Lys His Tyr Leu Ser Leu His Phe Ser Val Phe Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Gln Ile Lys Pro Gln Gln Arg Ala

210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Leu Leu Ala Phe Thr Val Ser Gln Lys Thr
 225 230 235 240
 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255
 Tyr Val Ile Asp Arg Gly Gly Val Ser Glu Tyr Ile Leu Ser Glu Ile
 260 265 270
 Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285
 Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300
 Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 16

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 16

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

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

305 310 315 320
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 17

<211> 354

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 17

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

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

115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160
 Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175
 Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

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

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

 305 310 315 320
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 18

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 18

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Asp Gln Arg

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Tyr Leu Arg Leu Gln Phe Ser Val Phe Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Phe Asp Ala Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser

210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 19

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 19

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly

20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

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

210 215 220

Lys Phe Lys His Ala Leu Lys Leu Ile Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Gly Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

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

325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350
Ser Pro

<210> 20

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 20

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Val Leu Gly Phe Glu Val Gly Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Gly Ser Val Ser Lys Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

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

210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Ile Phe Asn Val Cys Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

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

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 21

<211> 354

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 21

```

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

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

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

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

```

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

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

305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350
Ser Pro

<210> 22

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 22

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

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

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

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

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

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

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

325

330

335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340

345

350

Ser Pro

<210> 23

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 23

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1

5

10

15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly

20

25

30

Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys

35

40

45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50

55

60

Gly Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln

65

70

75

80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85

90

95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100

105

110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115

120

125

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

130

135

140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

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

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

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

 340 345 350
 Ser Pro

<210> 24

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 24

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Thr Val Gly Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly His Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala

210 215 220

Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255
Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350
Ser Pro

<210> 25

<211> 354

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 25

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

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

325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 26

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 26

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

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

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

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

165 170 175
 Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190
 Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

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

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

325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 27

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 27

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Gly Gln Gly

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

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

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

 210 215 220
 Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Gly Phe Ala Val His Gln Lys Thr
 225 230 235 240
 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350
Ser Pro

<210> 28

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 28

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Thr Ile Cys Pro Cys Gln Thr
20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Tyr Leu Thr Leu Ser Phe Ser Val Tyr Gln Lys

35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gln Gly Ser Val Ser Cys Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile His Ala Cys Ile Gln Pro Gln Gln Asp Val

210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu His Leu Arg Phe Thr Val His Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Ala Gly Ser Val Ser Thr Tyr Cys Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 29

<211> 354

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 29

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Thr Ile Cys Pro Asp Gln Ala

20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Tyr Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gln Gly Ser Val Ser Cys Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190
Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205
Asp Gly Asp Gly Ser Ile His Ala Cys Ile Gln Pro Met Gln Ser Met

210 215 220
Lys Phe Lys His Tyr Leu His Leu Arg Phe Thr Val His Gln Lys Thr
225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Thr Gly Val Gly

245 250 255
Tyr Val Tyr Asp Ala Gly Ser Val Ser Thr Tyr Cys Leu Ser Gln Ile

260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 30

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 30

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

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

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

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

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

Tyr Val Tyr Asp Leu Gly Gly Ala Ser Arg Tyr Val Leu Ser Gln Ile

260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350
Ser Pro

<210> 31

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 31

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro Asp Gln Ala

20 25 30
Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Leu Leu Glu Phe Thr Val Cys Gln Lys

35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60
Gly Tyr Val Val Asp Gln Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

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

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

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

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

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 32

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 32

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Trp Ala Ser Ile Arg Pro Thr Gln Leu

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Ala Leu Trp Leu Gly Phe Ala Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

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

 225 230 235 240
 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255
 Tyr Val Gln Asp Lys Gly Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile
 260 265 270
 Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285
 Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

 290 295 300
 Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro

<210> 33

<211> 147

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 33

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

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

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

 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp

145

<210> 34

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 34

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

 20 25 30
 Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg

50 55 60
 Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

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

145

<210> 35

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 35

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

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

100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 36

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 36

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30
Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg

50 55 60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 37

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 37

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 38

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 38

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 39

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 39

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Ala Pro Cys Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Thr Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly His Val Tyr Asp Arg

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

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 40

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 40

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Gln Ile Lys Pro Gln Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Arg

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

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85

90

95

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

100

105

110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115

120

125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130

135

140

Val Leu Asp

145

<210> 41

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 41

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1

5

10

15

Ile Tyr Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Lys

20

25

30

Leu Gly Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35

40

45

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

50

55

60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65

70

75

80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85

90

95

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

100

105

110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp
 145
 <210> 42
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 42
 Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30
 Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60
 Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110
 Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp
 145
 <210> 43

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 43

```

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

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

```

```

           115          120          125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
           130          135          140
Val Leu Asp

```

145

<210> 44

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 44

```

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

```

1 5 10 15
Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30
Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg

50 55 60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 45

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 45

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15
Ile Tyr Ala Thr Ile Arg Pro Ala Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Arg

20 25 30
Leu Val Leu Gly Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50

55

60

Gly Ser Val Ser Lys Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65

70

75

80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85

90

95

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

100

105

110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115

120

125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130

135

140

Val Leu Asp

145

<210> 46

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 46

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1

5

10

15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20

25

30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35

40

45

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

50

55

60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65

70

75

80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110
 Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp
 145
 <210> 47
 <211> 147

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 47

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

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

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 48

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 48

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 49

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 49

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Ala Pro Cys Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Thr Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly His Val Tyr Asp Arg

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 50

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 50

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

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

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

145

<210> 51

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 51

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

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

115	120	125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala		
130	135	140

Val Leu Asp

145

<210> 52

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 52

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Gly Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 53

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 53

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Cys Pro Cys Gln Thr Leu Lys Phe Lys His Tyr

20 25 30

Leu Thr Leu Ser Phe Ser Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gln

50 55 60

Gly Ser Val Ser Cys Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 54

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 54

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Cys Pro Asp Gln Ala Leu Lys Phe Lys His Tyr

20 25 30

Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gln

50 55 60

Gly Ser Val Ser Cys Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 55

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 55

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

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

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

 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp

145

<210> 56

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 56

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15
 Ile Tyr Ala Cys Ile Thr Pro Gln Gln Asp Met Lys Phe Lys His Arg

 20 25 30
 Leu Gln Leu Arg Phe Cys Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Gln Asp His

50 55 60
 Gly Gly Ala Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

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

145

<210> 57

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 57

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

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

100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 58

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 58

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30
Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser

50 55 60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 59

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 59

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 60

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 60

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 61

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 61

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser

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

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 62

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 62

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Leu

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

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 63

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 63

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Arg Leu Asn Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Phe Asp Ala

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp
 145
 <210> 64
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 64
 Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile Phe Ala Thr Ile His Pro Asp Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Tyr

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

 85 90 95
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110
 Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp
 145
 <210> 65

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 65

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Gln Ile Lys Pro Asp Gln Lys Met Lys Phe Lys His Tyr

20 25 30

Leu Ser Leu His Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 66

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 66

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15
Ile Phe Ala Ser Ile Asn Pro Asp Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Ser

20 25 30
Leu Lys Leu Thr Phe Ser Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Thr

50 55 60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 67

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 67

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15
Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30
Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 68

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 68

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Asp Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Tyr

20 25 30

Leu Arg Leu Gln Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Phe Asp Ala

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110
 Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp
 145
 <210> 69
 <211> 147

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 69
 Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile Tyr Ala Thr Ile Tyr Pro Asp Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Ala
 20 25 30
 Leu Lys Leu Ile Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gly

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

 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 70

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 70

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Ala Pro Asp Gln Arg Pro Lys Phe Lys His Gln

20 25 30

Leu Arg Leu Ile Phe Asn Val Cys Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 71

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 71

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 72

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 72

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Val Pro Glu Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Tyr

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

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

145

<210> 73

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 73

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

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

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

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 74

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 74

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 75

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 75

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met Lys Phe Lys His Gln

20 25 30

Leu Arg Leu His Phe Cys Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 76

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 76

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met Lys Phe Lys His Gln

20 25 30

Leu Arg Leu His Phe Cys Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 77

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 77

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

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

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

115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp

145

<210> 78

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 78

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile His Ala Cys Ile Gln Pro Gln Gln Asp Val Lys Phe Lys His Gln

20 25 30
 Leu His Leu Arg Phe Thr Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ala

50 55 60
Gly Ser Val Ser Thr Tyr Cys Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

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

145

<210> 79

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 79

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

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

100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 80

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 80

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Val Ala Ser Ile Lys Pro Gln Gln Val Ala Lys Phe Lys His Arg

20 25 30
Leu Met Leu Glu Phe Tyr Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 81

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 81

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro Asp Gln Ala Ala Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Leu Leu Glu Phe Thr Val Cys Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Val Asp Gln

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 82

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 82

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Trp Ala Ser Ile Arg Pro Thr Gln Leu Ala Lys Phe Lys His Ala

20 25 30

Leu Trp Leu Gly Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Lys Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 83

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

accggacctc gttgtttaga ct

22

<210> 84

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

tgtttacaca gtgtttcatt cc	22
<210> 85	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 85	
gactacacat atagtgtctg tt	22
<210> 86	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 86	
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaca aatctgactt tgcattgtgca	60
aacgccttca ac	72
<210> 87	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthesized	
<400> 87	
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaat ctgactttgc atgtgcaaac	60
gccttcaac	69
<210> 88	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthesized	
<400> 88	
atggacttca agagcaacaa acaaatctga ctttgcattg gcaaacgcct tcaac	55
<210> 89	
<211> 67	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthesized

<400> 89

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagaatct gactttgcat gtgcaaacgc 60

cttcaac 67

<210> 90

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 90

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagtctga ctttgcattgt gcaaacgcct 60

tcaac 65

<210> 91

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 91

atggacttca agagcaaaca aatctgactt tgcattgtgca aacgccttca ac 52

<210> 92

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 92

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagacaaa tctgactttg catgtgcaaa 60

cgcttcaac 70

<210> 93

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthesized

<400> 93

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaatc tgactttgca tgtgcaaacg 60
ccttcaac 68
<210> 94
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 94
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaacg caacaaatct gactttgcat 60
gtgcaaacgc ctcaac 77
<210> 95
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><
223> Synthesized
<400> 95
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaag aacaaatctg actttgcatg 60
tgcaaacgcc ttcaac 76
<210> 96
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 96
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggcaacaaa tctgactttg catgtgcaaa 60
cgccttcaac 70
<210> 97
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
><223> Synthesized
<400> 97
atggacttca agagcaacag tgctgtggca aatctgactt tgcattgtga aacgccttca 60

ac	62
<210> 98	
<211> 68	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthesized	
<400> 98	
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggacaaatc tgactttgca tgtgcaaacg	60
ccttcaac	68
<210> 99	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<	
220><223> Synthesized	
<400> 99	
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaat ctgactttgc atgtgcaaac	60
gccttcaac	69
<210> 100	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthesized	
<400> 100	
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaatg tgcaaacgcc ttcaac	56
<210> 101	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthesized	
<400> 101	
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggaaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac	60
gccttcaac	69
<210> 102	

<211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 102
 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcacia atctgacttt gcatgtgcaa 60
 acgccttcaa c 71
 <210> 103
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 103
 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaatg tgcaaacgcc ttcaac 56

 <210> 104
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 104
 atcaaactctg actttgcatg tgcaaacgcc ttcaac 36
 <210> 105
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 105
 gtgctgtggc ctggagcaac aaatctgact ttgc 34
 <210> 106
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 106

gtgctgtggc ctggagcaag aattcatgcg gccgcaatct agagcaacaa atctgacttt 60

gc 62

<210> 107

<211> 6053

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 107

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 60

cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gacggtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120

gtttttctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180

agtttgagtt ctctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240

acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300

acttctcagg attctggcgt accgttctctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360

agctcccgtc ctgattctaa cgaggaaagc acgttatatc tgctcgtcaa agcaaccata 420

gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggccgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480

cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcttttcgct ttcttccctt cctttctcgc 540

cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccttttag ggttccgatt 600

tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660

gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttagcgttg gattccacgt tctttaatag 720

tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780

ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840

taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900

cctgtttttg gggtttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtatt 960

acgattaccg ttcatcgccc tgcgcgctcg ctgcgtcact gaggccgccc gggcaaagcc 1020

cgggcgtcgg gcgaccttg gtcgcccggc ctacgtgagc gagcgagcgc gcagagaggg 1080

agtggaattc acgcgtggat cttaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 1140

atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 1200

cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 1260

tttcattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaaact gccacttgg cagtacatca 1320

agtgtatcat atgccaagtc cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggccccctg 1380

gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttctact tggcagtaca tctacgtatt	1440
agtcacgcgt attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac accaatgggc gtggatagcg	1500
gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccatggac gtcaatggga gtttgttttg	1560
gcacaaaaat caacgggact ttcaaaaatg tcgtaataac cccgccccgt tgacgcaaat	1620
gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctcgttttag tgaaccgtca	1680
gatcactaga agctttctgg gcacacccct catctgactt tttaatctct ccacttcaac	1740
acctggtgca ttcatgtgcc ggcacaaatca gtgattggtg ggttaatgag tgactgcgtg	1800
agactgactt agtgagctgg gaaagatttt ttggcagaca gggagaaaata aggagaggca	1860
acttgagaa ggggcttaga atgaggccia gaagagcagt aaggggcaaa cagtctgagc	1920
aaaggcaggc aggcaggaac tcagttggag agactgaggc tgggccacgt gccctctcct	1980
gccacettct cttcatctgc tttttcccg tgcattctc tggactgcca gaacaaggt	2040
cactgtttct tagtaaaaag agggtttttg tggcaatgga taaggccgag accaccaatc	2100
agaggagttt tagacatcat tgaccagagc tctgggcaga acctggccat tcctgaagca	2160
aggaaacagc ctgcgaaggc accaaaactg cccttacctg ggctggggaa gaaggtgtct	2220
tctggaataa tgctgttgtt gaaggcggtt gcacatgcaa agtcagattt gttgctctag	2280
attgcggccg catgaattct tgctccaggc cacagcactg ttgctcttga agtccataga	2340
cctcatgtct agcacagttt tgtctgtgat atacacatca gaatccttac tttgtgacac	2400
atttgtttga gaatcaaaat cggatgaatag gcagacagac ttgtcactgg atttagagtc	2460
tctcagctgg tacacggcag ggtcagggtt ctggatatct gtgggacaag aggatcaggg	2520
ttaggacatg atctcatttc cctctttgcc ccaaccagg ctggagtcca gatgccagtg	2580
atggacaagg gcggggctct ttggggctgg caagtcacgg tctcatgctt tatacgggaa	2640
atagcatctt agaaaccagc tgctcgtgat ggactgggac tcagggacag gcacaagcta	2700
tcaatcttgg ccaagaggcc atgatttcag tgaacgttca cggccaggcc tggcctgcca	2760
ctcaaggaaa cctgaaatgc agggctactt aataatactg cttattcttt tatttaatag	2820
gatcttcttc aaaaccccag caatataact ctggcagagt aaaggcaggc atgggaaaaa	2880
ggcccagcaa agcaaacigt acatcttga atctggagtg gtctcccaa cttagctgg	2940
gcattagcag aatgggaggt ttatggtatg ttggcattaa gttgggaaat ctatcacatt	3000
accaggagat tgctctctca ttgatagagg ttttgaacta taaatcagaa cacctgcgtc	3060
taagccccag cgcaattgtt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat	3120
aaagcaatag catcacaaat ttacaaaata aagcattttt ttcactgcat tctagtgtg	3180

gtttgtccaa acicacatcaat gtatcttaag gcgggaattg atctaggaac ccctagtgat	3240
ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggccgccc gggcaaagcc	3300
cgggcgtcgg gcgacctttg gtgcgccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg	3360
agtggccaac ccccccccc cccccccggc gattctcttg tttgtccag actctcaggc	3420
aatgacctga tagcctttgt agagacctct caaaaatagc taccctctcc ggcataaatt	3480
tatcagctag aacggttgaa tatcatattg atgggtgattt gactgtctcc ggcctttctc	3540
acccgtttga atctttacct acacattact caggcattgc atttaaaata tatgagggtt	3600
ctaaaaattt ttatccttgc gttgaaataa aggccttctcc cgcaaaagta ttacagggtc	3660
ataatgtttt tggatcaaac gatttagctt tatgctctga ggctttattg cttaattttg	3720
ctaattcttt gccttgccctg tatgatttat tggatgttgg aattcctgat gcggtatttt	3780
ctccttacgc atctgtcggg tatttcacac cgcataatgg gcaactctcag tacaatctgc	3840
tctgatgccg catagttaag ccagccccga caccgcga caccgcgtga cgcgccctga	3900
cgggcttgtc tgcctccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc	3960
atgtgtcaga ggttttcacc gtcatacccg aaacgcgcga gacgaaaggg cctcgtgata	4020
cgctattttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact	4080
tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg	4140
tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt	4200
atgagtattc aacatttccg tgcgcctt atccctttt ttgcggcatt ttgccttct	4260
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca	4320
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc	4380
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctc tatgtggcgc ggtattatcc	4440
cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg	4500
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta	4560
tgcagtgtct ccataaccat gagtataac actgcggcca acttacttct gacaacgac	4620
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt	4680
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg	4740
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct	4800
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc	4860
tcggcccttc cggttggtct gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct	4920

cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 4980
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga gataggtgcc 5040
tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat 5100
ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg 5160
accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc 5220
aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa 5280
ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag 5340

gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtga gccgtagtta 5400
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta 5460
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag 5520
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg 5580
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg 5640
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccgctaagcg gcagggtcgg aacaggagag 5700
cgcacgaggg agcttcagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 5760

cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 5820
aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg 5880
ttcttttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct 5940
gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa 6000
gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atg 6053

<210> 108
<211> 5458
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 108

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 60

cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttgagtt ctctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgacaca 240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac 300
acttctcagg attctggcgt accgttctctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
agctcccgtc ctgattctaa cgaggaaagc acgttatagc tgctcgtcaa agcaaccata 420

gtacgcgccc tgiacggcg cattaagcgc ggcggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480

cgctacactt gccagcgcgc tagcgccgc tcctttcgtt ttcttcctt cttttctgc 540

cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcgggg ctccttttag ggttcgatt 600

tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660

gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttg gattccacgt tctttaatag 720

tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caacctatc tcggtctatt cttttgattt 780

ataagggatt ttcccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt acaaaaaatt 840

taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900

ctgtttttt gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960

acgattaccg ttcacgcgcc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggccgccc gggcaaagcc 1020

cgggcgtcgg gcgaccttg tgcgccggc ctcagttagc gagcgagcgc gcagagaggg 1080

agtggaaatt acgcgtgctt tctgggcaca cccctcatct gactttttaa ttcctccact 1140

tcaacacctg gtgcattcat gtgccggcac aatcagtgat tggagggtta atgagtact 1200

gcgtgagact gacttagtga gctgggaaag attttttggc agacaggag aaataaggag 1260

aggcaacttg gagaaggggc ttagaatgag gcctagaaga gcagtaagg gcaaacagtc 1320

tgagcaaagg caggcaggca ggaactcagt tgagagact gaggtgggc cacgtgccct 1380

ctcctgccac ctctcttca tctgttttt tcccggtgca ttctctggac tgccagaaca 1440

aggctcactg tttcttagta aaaagagggt ttgggtggca atggataagg ccgagaccac 1500

caatcagagg agtttttagc atcattgacc agagctctgg gcagaacctg gccattcctg 1560

aagcaaggaa acagcctgcg aaggcaccaa agctgccctt acctgggctg gggaagaagg 1620

tgtcttctgg aataatgctg ttgttgaagg cgtttgcaca tgcaaagtca gatttgttgc 1680

tctagattgc ggccgatga attcttgctc caggccacag cactgttctt ctgaagtec 1740

atagacctca tgcttagcac agttttgtct gtgatataca catcagaatc ctactttgt 1800

gacacatttg ttgagaatc aaaatcggtg aataggcaga cagacttgct actggattta 1860

gagtctctca gctggtagac ggcagggtca gggttctgga tatctgtggg acaagaggat 1920

cagggttagg acatgatctc atttcctct ttccccaac ccaggctgga gtccagatgc 1980

cagtgatgga caagggcggg gctctgtggg gctggcaagt cacggtctca tgctttatac 2040

gggaaatagc atcttagaaa ccagctgctc gtgatggact gggactcagg gacaggcaca 2100

agctatcaat ctggccaag aggccatgat ttcagtgaac gttcacggcc aggcctggcc 2160

tgccactcaa ggaaacctga aatgcagggc tacttaataa tactgcttat tcttttattt	2220
aataggatct tcttcaaac cccagcaata taactctggc agagtaaagg caggcatggg	2280
aaaaaggccc agcaaagcaa actgtacatc ttggaatctg gagtggctct cccaacttag	2340
gctgggcatt agcagaatgg gaggtttatg gtatgttggc attaagttgg gaaatctatc	2400
acattaccag gagattgctc tctcattgat agaggttttg aactataaat cagaacacct	2460
gcgtctaagc cccagcgcaa ttgttgttgt taacttgttt attgcagctt ataatggtta	2520
caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag	2580
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttaaggcggg aattgatcta ggaacccta	2640
gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcaactgaggc cgcccgggca	2700
aagcccgggc gtcgggcgac ctttggctgc ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgcaga	2760
gagggagtgg ccaaccccc ccccccccc ccggcgattc tcttgtttgc tccagactct	2820
caggcaatga cctgatagcc ttgttagaga cctctcaaaa atagctaccc tctccggcat	2880
gaatttatca gctagaacgg ttgaatatca tattgatggg gatttgactg tctccggcct	2940
ttctcacccg ttgaatctt tacctacaca ttactcaggc attgcattta aaatatatga	3000
gggttctaaa aatttttctc cttgcgttga aataaaggct tctcccgcaa aagtattaca	3060
gggtcataat gtttttggtg caaccgattt agctttatgc tctgaggctt tattgcttaa	3120
ttttgctaat tctttgcctt gcctgtatga ttatttggat gttggaattc ctgatcggt	3180
atcttctct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgat atggctgact ctcaagtaca	3240
tctgctctga tgcgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc	3300
cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga	3360
gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg	3420
tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat gggttcttag acgtcaggtg	3480
gcacttttgc gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa	3540
atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga	3600
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttatcc cttttttgcg gcattttgcc	3660
ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg	3720
gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc	3780
gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat	3840
tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggctcgcc catacactat tctcagaatg	3900
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag	3960
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa	4020

cgatcggagg accgaaggag ctaaccgcit ttttgcacaa catgggggat catgtaactc 4080
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 4140
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc 4200
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttagca ggaccacttc 4260

tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 4320
ggctctcgcg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta 4380
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 4440
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 4500
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc 4560
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 4620
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaaa 4680

aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc 4740
cgaaggtaac tggttccagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 4800
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatec 4860
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 4920
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 4980
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg 5040
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 5100

gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 5160
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tggatgctc gtcagggggg cggagcctat 5220
ggaaaaacgc cagcaacgag gcctttttac ggttcttggc cttttgctgg ccttttgctc 5280
acatgttctt tctgcgtta tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 5340
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcgaggaag 5400
cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatg 5458

<210> 109
<211> 6082
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized
<400> 109
cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 60

cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggat ttccatgagc 120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac 300
acttctcagg attctggcgt accgttctctg tctaaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
agctcccgt ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420

glacgcgcc tglagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
cgctacactt gccagcgccc tagcggccgc tcctttcgtt ttcttccctt cttttctcgc 540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccttttag ggttccgatt 600
tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttg gattccacgt tctttaatag 720
tggaactctt ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
ataagggtt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840

taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
acgattaccg ttcatcgccc tgcgcgctcg ctgcgtcact gaggccgccc gggcaaagcc 1020
cgggcgtcgg ggcacctttg gtgcggcgcc ctcaagtgcg gagcgagcgc gcagagaggg 1080
agtggaaatt acgcgtactg gcatctggac tccagcctgg gttggggcaa agagggaatt 1140
gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata tccagaaccc tgacctgcc 1200
gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 1260

gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatac agacaaaact 1320
gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaactag 1380
tgggcagagc gcacatcgcc cacagtcccc gagaagtgg ggggaggggt cggcaattga 1440
accggtgcct agagaaggtg gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc 1500
cgctttttc ccgagggtgg gggagaaccg tatataagtg cagtagtcgc cgtgaacgtt 1560
ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca cagctagcac catggcgctc ccagtgcag 1620
ccttactttt acctctggcg ttattattgc acgcggctcg tctgacata cagatgactc 1680

agactacctc ttccctatct gcttcttttag gcgaccgagt aacaatatct tgccgggcca 1740
gccaggacat ctcaaaatc ttaactggt atcagcagaa gccggacgga acagttaagt 1800
tgctcattta ccacagctg agattacact caggcgttcc tagccgattt tcgggttccg 1860
gttccggtac ggactacagc ctgacaatca gtaacctga gcaggaggac atcgccacct 1920

acttctgtca gcagggcaac acgctcccg acacattcgg tgggggaact aagctggaga	1980
ttaccggagg cggtaggcgc ggtggcggcg gcagcggggg tggcggtcg gaggtcaagt	2040
tacaggagag cggaccgggc ttggtcgac ctagccagag cctctcagtc acgtgcactg	2100
tgtctggagt cagtctcca gactacgggg tatcatggat acgacagccg ctagaaagg	2160
gcttagagt gctgggggtt atctggggaa gtgaaaccac atactacaac tcagctctca	2220
agagccgctt caccatcatt aaggacaaca gtaagtcgca ggttttctta aagatgaact	2280
ctctccagac tgacgacacc gctatttact actgcgcgaa gcactactac tacggcggga	2340
gttacgaat ggactactgg ggtcagggca cttctgtgac cgtatccagc actactacc	2400
cagccccacg tccccacg ccagctcaa cgatagcaag tcagccctta tctcttcgcc	2460
ctgaggcttg caggcccg gcggcggcg ccgttcacac gcgaggacta gacttcgcct	2520
gcgacatcta catctgggca ccactagccg ggacttcgg agtgtgttg ttgagcttg	2580
taataacgct ctactgcaag cgtgggagaa agaagctctt gtacattttc aagcagccat	2640
tcatgcgtcc cgttcagacg actcaggagg aggacggctg ctcgtgccga ttcccggagg	2700
aggaggagg cggttgcgaa ctcagagtga agttctctcg ctcgcggac gcacccgctt	2760
accagcaggg tcagaaccag ctatacaacg agttaaacct gggcgccgg gaggagtagc	2820
acgtgttaga caagcgtaga ggtagggacc cggagatggg aggcaagcct cggagaaaga	2880
acccccagga gggcctgtac aacgaactcc agaaggacaa gatggctgag gcgtactcgg	2940
agattggtat gaagggcgag agacgtcgcg gaaagggaca cgacggctta taccaggggc	3000
tttccaccgc gaccaaggac acatacgacg cgtgcacat gcaagcctta ccacctgat	3060
gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt	3120
tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttctaacc attataagct gcaataaaca	3180
agttctagag caacaaatct gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc	3240
cagaagacac cttcttcccc agcccaggta agggcagctt tggcgcttc aattgcctct	3300
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccggcgctcg ggcgaccttt	3360
ggtcgcccg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ccccgcgat	3420
tctcttgttt gctccagact ctcaggcaat gacctgatag cctttgtacc tgcaggtctc	3480
aaaaatagct accctctccg gcatgaattt atcagctaga acggttgaat atcatattga	3540
tggtagtttg acgtctccg gcctttctca cccgtttgaa tctttaccta cacattactc	3600
aggcattgca tttaaaatat atgagggttc taaaaatttt tacccttgcg ttgaaataaa	3660
ggcttctccc gcaaaagtat tacagggtca taatgttttt ggtacaaccg atttagcttt	3720

atgctctgag gcittattgc ttaatittgc taattctttg cttgcctgt atgatttatt	3780
ggatgttga attcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtcgggt atttcacacc	3840
gcataatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac	3900
acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca	3960
gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttaccg tcatcaccga	4020
aacgcgcgag acgaaagggc ctctgatac gcctatittt ataggttaat gtcataataa	4080
taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt	4140
gtttatittt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa cctgataaa	4200
tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta	4260
ttcccttttt tgcggcattt tgccttctg tttttgctca cccagaaaac ctggtgaaag	4320
taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca	4380
gcggttaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta	4440
aagtctctgt atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc	4500
gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc	4560
ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctg cataaccatg agtgataaca	4620
ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc	4680
acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca	4740
taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac	4800
tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg	4860
cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg	4920
ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg	4980
gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac	5040
gaaatagaca gatcgtgag ataggtcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc	5100
aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct	5160
aggtgaagat ctttttggat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc	5220
actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc	5280
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgtacc agcgttggtt tgtttgccgg	5340
atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa	5400
atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc	5460

ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt 5520
gtcttaccgg gttggactca agacgatagi taccggataa ggcgagcagg tcgggctgaa 5580
cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 5640
tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 5700
cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct 5760
ggatatctta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat 5820
gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc 5880

tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatccct gattctgtgg 5940
ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc 6000
gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgccaat acgcaaaccg cctctccccg 6060
cgcgttggcc gattcattaa tg 6082

<210> 110
<211> 7887
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 110

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccc caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 60
cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120

gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttgagtt ctctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300
acttctcagg attctggcgt accgttccctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
agctcccgtc ctgattctaa cgaggaaagc acgttatatc tgctcgtcaa agcaaccata 420
gtacgcgcc tgtagcggcg cattaagcgc ggcggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
cgctacactt gccagcgccc tagcgccccg tcctttcgtc ttcttccctt cttttctcgc 540

cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccttttag ggttccgatt 600
tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttagcgttg gagtccacgt tctttaatag 720
tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
taacgcgaat ttaacaaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900

cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt	960
acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg	1020
accaaaggtc gcccgcgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgcgcg agcgagcgcg	1080
cagagaggga gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg	1140
cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggtaactta cagtttatta aatagatggt	1200
tatatggaga agctctcatt tctttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca	1260
ccatattcat ttgacagggt aaattcctga gatgtaagga gctgctgtga cttgctcaag	1320
gccttatatc aagtaaacgg tagcgctggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt	1380
caaaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaactaat	1440
gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgccagc ctaagttggg gagaccactc	1500
cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct	1560
gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta	1620
ttattaagta gccctgcatt tcaggtttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac	1680
gttactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgtgcctgtc cctgagtccc	1740
agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg	1800
acttgccagc cccacagagc cccgcccttg tccatcactg gcactctggac tccagcctgg	1860
gttggggcaa agagggaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata	1920
tccagaacce tgacctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg	1980
tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg	2040
tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggctctat ggacttcaag agcaacagtg	2100
ctgtggcctg gagcaactag tggatctgcg atcgtccgg tgcctgtcag tgggcagagc	2160
gcacatgcc cacagtcccc gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga acgggtgcct	2220
agagaagggt gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgccttttc	2280
ccgaggggtg gggagaaccg tatataagt cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca	2340
acgggtttgc cgccagaaca cagctgaagc ttcgaggggc tcgcatctct ccttcacgcg	2400
cccgcgcgcc tacctgagge cgccatccac gccggttgag tcgcgttctg ccgcctccc	2460
cctgtggtgc ctctgaact gcgtccgccg tctaggttaag tttaaagctc aggtcgagac	2520
cgggcctttg tccggcgctc ccttgagacc tacctagact cagccggctc tccacgcttt	2580
gcctgacct gcttgctcaa ctctacgtct ttgtttcgtt ttctgttctg cgccgttaca	2640

gatccaagct gtgaccggcg cctactctag agctagcgca gtcagtgttt ctgacacaac	2700
agtctcgaac ttaactagca ccatggcgct cccagtgaca gccttacttt tacctctggc	2760
gttattattg cagcggctc gtctgacat acagatgact cagactacct cttccctatc	2820
tgctttctta ggcgaccgag taacaataac ttgccgggcc agccaggaca tctcaaaata	2880
cttaactgg tatcagcaga agccggacgg aacagttaag ttgctcattt accacacgtc	2940
gagattacac tcaggcgctc ctagccgatt ttcgggttcc ggttccggta cggactacag	3000
cctgacaatc agtaacctg agcaggagga catcgccacc tacttctgtc agcagggcaa	3060
cacgtctccg tacacattcg gtgggggaac taagctggag attaccggag gcggtggcag	3120
cgggtggcggc ggagcgggg gtggcggtc ggaggtcaag ttacaggaga gcggaccggg	3180
cttggtcgca cctagccaga gcctctcagt cacgtgcact gtgtctggag tcagtctccc	3240
agactacggg gtatcatgga tacgacagcc gcctagaaag ggcttagagt ggctgggggt	3300
tatctgggga agtgaacaca catactacaa ctcagctctc aagagccgcc tcaccatcat	3360
taaggacaac agtaagtcgc aggttttctt aaagatgaac tctctccaga ctgacgacac	3420
cgctatttac tactgcgcga agcactacta ctacggcggg agttacgcaa tggactactg	3480
gggtcagggc acttctgtga ccgtatccag cactactacc ccagccccac gtccccccac	3540
gccagctcca acgatagcaa gtcagccctt atctcttcgc cctgaggctt gcagggccgc	3600
ggcggcgccg gccgttcaca cgcgaggact agacttcgcc tgcgacatct acatctgggc	3660
accactagcc gggacttcgc gagtgttgtt gttgagcttg gtaataacgc tctactgcaa	3720
gcgtgggaga aagaagctct tgtacatttt caagcagcca ttcattgcgtc ccgttcagac	3780
gactcaggag gaggacggct gctcgtgccg attcccggag gaggaggagg gcggttcga	3840
actcagagtg aagtctctc gctccgcgga cgcacccgct taccagcagg gtcagaacca	3900
gctatacaac gagttaaacc tggggcgccg ggaggagtac gacgtgttag acaagcgtag	3960
aggtagggac ccggagatgg gaggcaagcc tcggagaaag aacccccagg agggcctgta	4020
caacgaactc cagaaggaca agatggctga ggcgtactcg gagatttgta tgaaggcgca	4080
gagacgtgc ggaaaggac acgacggctt ataccagggg ctttccaccg cgaccaagga	4140
cacatacgac gcgctgcaca tgcaagcctt accacctga tgaggtacca gcggccgctt	4200
cgagcagaca tgataagata cattgatgag ttgggacaaa ccacaactag aatgcagtga	4260
aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc	4320
tgcaataaac aagttaacaa caacaattcg aatttaaac ggatccgcaa caaatctgac	4380
tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc	4440
ccaggtaagg gcagctttgg tgccttcgca ggctgtttcc ttgcttcagg aatggccagg	4500

ttctgcccag agctctggtc aatgatgtct aaaactcttc tgattggtgg tctcggcctt	4560
atccattgcc accaaaaacc tctttttact aagaaacagt gaccttggtt ctggcagtc	4620
agagaatgac acgggaaaaa agcagatgaa gagaaggtgg caggagaggg cacgtggccc	4680
agcctcagtc tctccaactg agttcctgcc tgcctgcctt tgctcagact gtttggccct	4740
tactgtcttt ctaggcctca ttctaagccc cttctccaag ttgcctctcc ttatttctcc	4800
ctgtctgcc aaaaatcttt ccagctcac taagtcagtc tcacgcagtc actcattaac	4860
ccaccaatca ctgattgtgc cggcacatga atgcaccagg tgttgaagtg gaggaattaa	4920
aaagtcagat gaggggtgtg ccagaggaa gcaccattct agttggggga gcccatctgt	4980
cagctgggaa aagtccaaat aacttcagat tggaatgtgt ttttaactcag ggttgagaaa	5040
acagccacct tcaggacaaa agtcaggga gggctctctg aagaaatgct acttgaagat	5100
accagcccta ccaagggcag ggagaggacc aattgatgga gttggccact ccctctctgc	5160
gcgctcgctc gtcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg acctttggtc	5220
gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagaggaggt ggccaacggc gcgcctgcag	5280
gtctcaaaaa tagctaccct ctccggcatg aatttatcag ctagaacggt tgaatatcat	5340
attgatgggtg atttgactgt ctccggcctt tctcacccgt ttgaatcttt acctacacat	5400
tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag ggttctaaaa atttttatcc ttgcgttgaa	5460
ataaaggctt ctcccgcaaa agtattacag ggtcataatg tttttgttac aaccgatita	5520
gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat ttgctaatt ctttgccttg cctgtatgat	5580
ttattggatg ttggaattcc tgatcgggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc	5640
acaccgata tgggtgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc	5700
ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc	5760
ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc	5820
accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacccta tttttatagg ttaatgtcat	5880
gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc	5940
tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg	6000
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc	6060
ccttattecc ttttttggg cattttgctt tctgttttt gctcaccag aaacgttggt	6120
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggtiacatcg aactggatct	6180
caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttcaa tgatgagcac	6240
ttttaagggt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact	6300
cggtcgccgc atacactatt ctcaaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa	6360

gcacatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 6420

taaacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 6480

tttgcacaac atgggggagc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 6540

agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg 6600

caaaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 6660

ggaggcggat aaagtgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat 6720

tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc 6780

agatggtaag ccttcccgtg tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 6840

tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 6900

agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 6960

gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac gtgagttttc 7020

gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 7080

tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggttttgtt 7140

gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 7200

accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 7260

accgcctaca tacctcgtc tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 7320

gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 7380

ctgaacgggg gggttcgtca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 7440

atactacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag 7500

glatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 7560

gccttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 7620

gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg 7680

gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc 7740

tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac 7800

cgagcgcagc gattcagtg gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct 7860

ccccgcgcgt tggccgattc attaatg 7887

<210> 111

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 111

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 Gln 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> 112

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 112

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

<210> 113

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 113

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> 114

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 114

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> 115

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 115

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> 116

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 116

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> 117

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 117

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> 118

<211> 493

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 118

gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa 60

cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 120

gcctttttcc cgaggggtgg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 180

tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac agctgaagct tcgaggggct cgcattcttc 240

cttcacgcgc ccgccccct acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc 300

cgctcccgcc ctgtgggtgcc tctgaactg cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca 360

ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc cttggagcct acctagactc agccggctct 420

ccacgctttg cctgacctg cttgtcaac tctacgtctt tgtttcggtt tctgttctgc 480

gccgttacag atc 493

<210> 119

<211> 2184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 119

gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa 60

cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 120

gcctttttcc cgaggggtgg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 180

tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac agctgaagct tcgaggggct cgcattcttc 240

cttcacgcgc ccgccccct acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc 300

cgctccccgc ctgtgggtgcc tcctgaactg cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca 360
 ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc ctggagcct acctagactc agccggctct 420
 ccacgctttg cctgaccctg cttgtctaac tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc 480
 gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc ctactctaga gctagcgcag tcagtgcctc 540

tgacacaaca gtctcgaact taactagcac catggcgctc ccagtgcag ccttactttt 600
 acctctggcg ttattattgc acggcgctcg tctgacata cagatgactc agactacctc 660
 ttccctatct gcttctttag gcgaccgagt aacaatatct tgccgggcca gccaggacat 720
 ctcaaaatac ttaaactggt atcagcagaa gccggacgga acagttaagt tgctcattta 780
 ccacacgtcg agattacact caggcgttcc tagccgattt tcgggttccg gttccggtac 840
 ggactacagc ctgacaatca gtaaccttga gcaggaggac atcgccacct acttctgtca 900
 gcagggaac acgtcccggt acacattcgg tgggggaact aagctggaga ttaccggagg 960

cggtggcagc ggtggcgcg gcagcggggg tggcggtcg gaggtcaagt tacaggagag 1020
 cggaccgggc ttggtcgac ctagccagag cctctcagtc acgtgcactg tgtctggagt 1080
 cagtctccca gactacgggg tatcatggat acgacacccg cctagaaagg gcttagagtg 1140
 gctgggggtt atctggggaa gtgaaaccac atactacaac tcagctctca agagccgctt 1200
 caccatcatt aaggacaaca gtaagtcga ggttttctta aagatgaact ctctccagac 1260
 tgacgacacc gctatttact actgcgcgaa gcactactac tacggcggga gttacgcaat 1320
 ggactactgg ggtcaggga cttctgtgac cgtatccagc actactacc cagccccacg 1380

tccccccacg ccagctccaa cgatagcaag tcagccctta tctcttcgcc ctgaggtttg 1440
 caggccccgc gcggcgcgcg ccgttcacac gcgaggacta gacttcgcct gcgacatcta 1500
 catctgggca ccactagccg ggacttgcgg agtgttgttg ttgagcttgg taataacgct 1560
 ctactgcaag cgtgggagaa agaagctctt gtacattttc aagcagccat tcatgcgtcc 1620
 cgttcagacg actcaggagg aggacggctg ctctgtccga ttcccgagg aggaggagg 1680
 cggttgcgaa ctgagagtga agttctctcg ctcccgggac gcaccgctt accagcagg 1740
 tcagaaccag ctatacaacg agttaaacct ggggcgccgg gaggagtacg acgtgttaga 1800

caagcgtaga ggtagggacc cggagatggg aggcaagcct cggagaaaga acccccagga 1860
 gggcctgtac aacgaactcc agaaggacaa gatggctgag gcgtactcgg agattggtat 1920
 gaaggcgag agacgtcgcg gaaagggaca cgacggctta taccaggggc ttccaccgc 1980
 gaccaaggac acatacgacg cgctgcacat gcaagcctta ccacctgat gaggtaccag 2040
 cgcccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga 2100
 atgcagttaa aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc 2160

attataagct gcaataaaca agtt 2184

<210> 120

<211> 6811

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 120

atatccagaa cctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaatcc agtgacaagt 60
ctgtctgcct attcaccgat ttgtattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg 120
atgtgtatat cacagacaaa actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca 180
gtgctgtggc ctggagcaag ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 240
ggaggggtcg gcaattgaac ggggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 300
gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtga 360

gtagtgcgcg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca gtgaagctt 420
cgaggggctc gcatctctcc ttcacgcgcc cgccgcccta cctgaggccg ccatccacgc 480
cggttgagtc gcgttctgcc gcctccgcc tgtggtgcct cctgaactgc gtccgccgtc 540
taggtaagtt taaagctcag gtcgagaccg ggcctttgtc cggcgctccc ttggagccta 600
cctagactca gccggctctc cacgctttgc ctgacctgc ttgctcaact ctactcttt 660
gtttcgtttt ctgttctgcg ccgttacaga tccaagctgt gaccggcgcc tactctagag 720
ctagcgcagt cagtgttct gacacaacag tctcgaactt aactagcacc atggcgctcc 780

cagtgcagc cttactttta cctctggcgt tattattgca cgcggtcgt cctgacatac 840
agatgactca gactacctct tccctatctg cttctttagg cgaccgagta acaatatctt 900
gccgggccag ccaggacatc tcaaaatact taaactggta tcagcagaag ccggacggaa 960
cagttaagtt gctcatttac cacacgtcga gattacactc aggcgttcct agccgatttt 1020
cgggttccgg ttccggtagc gactacagcc tgacaatcag taaccttgag caggaggaca 1080
tcgccaccta ctctgtcag cagggaaca cgctcccga cacattcggg gggggaacta 1140
agctggagat taccggagcg ggtggcagcg gtggcgcgcg cagcgggggt ggcggctcgg 1200

aggtcaagtt acaggagagc ggaccgggct tggtcgcacc tagccagagc ctctcagtca 1260
cgtgcactgt gtctggagtc agtctcccag actacggggt atcatggata cgacagccgc 1320
ctagaaaggc cttagagtgg ctgggggtta tctggggaag tgaaaccaca tactacaact 1380
cagctctcaa gagccgcctc accatcatta aggacaacag taagtcgcag gttttcttaa 1440

agatgaactc tctccagact gacgacaccg ctatttacta ctgcgcgaag cactactact	1500
acggcgggag ttacgcaatg gactactggg gtcagggcac ttctgtgacc gtatccagca	1560
ctactacccc agccccacgt cccccacgc cagctccaac gatagcaagt cagcccttat	1620
ctcttcgccc tgaggcttgc aggcccgcgg cggcggcgcc cgttcacacg cgaggactag	1680
acttcgcctg cgacatctac atctgggcac cactagccgg gacttgcgga gtgttgttgt	1740
tgagcttggg aataacgctc tactgcaagc gtgggagaaa gaagctcttg tacattttca	1800
agcagccatt catgcgtccc gttcagacga ctcaggagga ggacggctgc tcgtgccgat	1860
tcccggagga ggaggagggc ggttgcgaac tcagagtga gttctctcgc tccgcggacg	1920
caccgcctta ccagcagggt cagaaccagc tataaacga gttaaacctg gggcgccggg	1980
aggagtacga cgtgttagac aagcgtagag gtagggaccc ggagatggga ggcaagcctc	2040
ggagaaagaa cccccaggag ggcctgtaca acgaactcca gaaggacaag atggctgagg	2100
cgtactcgga gattggatg aaggcgaga gacgtcgcgg aaaggacac gacggcttat	2160
accaggggct ttccaccgcg accaaggaca catacgacgc gctgcacatg caagccttac	2220
cacctgatg aggtaccagc ggccgcttcg agcagacatg ataagataca ttgatgagtt	2280
tggacaaacc acaactagaa tgcagtga aaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc	2340
tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca gttcaaactc gactttgcat	2400
gtgcaaacgc cttaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc agcccaggta	2460
agggcagctt tggcgccttc gcagctgtt tccttgcttc aggaatggcc aggttctgcc	2520
cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctcgcgc cttatccatt	2580
gccacaaaa cctctttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag tccagagaat	2640
gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg cccagcctca	2700
gtctctccaa ctgagttcct gcctgcctgc ctttgctcag actgtttgcc cttactgct	2760
cttctaggcc tcattctaag ccccttctcc aagttgcctc tccttatttc tcctgtctg	2820
ccaaaaaatc tttcccagct cactaagtca gtctcagca gtcactcatt aaccaccaa	2880
tcactgattg tgccggcaca tgaatgcacc aggtgttgaa gtggaggaat taaaaagtca	2940
gatgaggggt gtgccagag gaagcacat tctagtggg ggagcccatc tgtcagctgg	3000
gaaaagtcca aataacttca gattggaatg tgttttaact cagggttag aaaacagcta	3060
ccttcaggac aaaagttagg gaagggtctc ctgaagaaat gctacttgaa gataccagcc	3120
ctaccaaggg caggagagg accctataga ggctgggac aggagctcaa tgagaaagga	3180
gaagagcagc aggcattgagt tgaatgaagg aggcagggcc gggtcacagg gccttctagg	3240

ccatgagagg gtagacagta ttctaaggac gccagaaaagc tgttgatcgg cttaagcag 3300

gggagggaca cctaatttgc ttttcttttt tttttttttt tttttttttt tttttgagat 3360

ggagttttgc tcttgttgcc caggtcggag tgcaatggtg catcttggt cactgcaacc 3420

tccgcctccc aggttcaagt gattctcctg cctcagcctc ccgagtagct gagattacag 3480

gcaccgccca ccatgcctgg ctaatttttt gtatttttag tagagacagg gtttcactat 3540

gttggccagg ctggtctcga actcctgacc tcaggtgate caccgcttc agcctcccaa 3600

agtgcctgga ttacaggcgt gagccaccac acccggcctg cttttcttaa agatcaatct 3660

gagtgcctga cggagagtgg gttgtaagcc aagagtagaa gcagaaaggg agcagttgca 3720

gcagagagat gatggaggcc tgggcagggt ggtggcaggg aggtaaccaa caccattcag 3780

gtttcaaagg tagaaccatg cagggatgag aaagcaaaga ggggatcaag gaaggcagct 3840

ggattttggc ctgagcagct gagtcaatga tagtgccgtt tactaagaag aaaccaagga 3900

aaaaatttgg ggtgcaggga tcaaaacttt ttggaacata tgaaagtacg tgtttatact 3960

ctttatggcc ctgttacta tgtatgcctc gctgcctcca ttggactcta gaatgaagcc 4020

aggcaagagc agggctctatg tgtgatggca catgtggcca gggcatgca acatgtactt 4080

tgtacaaaca gtgtatatg agtaaataga aatggtgtcc aggagccgag gtatcggtcc 4140

tgccagggcc aggggctctc cctagcaggt gctcatatgc tgtaagttcc ctccagatct 4200

ctccacaagg aggcattgga aggctgtagt tgttcacctg cccaagaact aggaggtctg 4260

gggtgggaga gtcagcctgc tctggatgct gaaagaatgt ctgtttttcc ttttagaaag 4320

ttcctgtgat gtcaagctgg tcgagaaaaag ctttgaaaca ggtaagacag gggcttagcc 4380

tgggtttgca caggattgcg gaagtgatga acccgcaata accctgcctg gatgaggag 4440

tgggaagaaa ttagtagatg tgggaatgaa tgataggaa tggaacagc ggttcaagac 4500

ctgccagag ctgggtgggg tctctcctga atccctctca ccatctctga ctttccattc 4560

taagcacttt gaggatgagt ttctagcttc aatagaccaa ggactctctc ctaggcctct 4620

gtattccttt caacagctcc actgtcaaga gagccagaga gagcttctgg gtggcccagc 4680

tgtgaaattt ctgagtcctt tagggatagc cctaaacgaa ccagatcatc ctgaggacag 4740

ccaagaggtt ttgccttctt tcaagacaag caacagtact cacataggct gtgggcaatg 4800

gtcctgtctc tcaagaatcc cctgccactc ctcacacca cctgggccc atattcattt 4860

ccatttgagt tgttcttatt gagtcatcct tcctgtggtg gcggaactca ctaaggggcc 4920

catctggacc cgaggtattg tgatgataaa ttctgagcac ctaccccatc cccagaaggg 4980

ctcagaaata aaataagagc caagtctagt cgggtgttcc tgtcttgaaa cacaatactg 5040
 ttggccctgg aagaatgcac agaattctgt tgtaagggga tatgcacaga agctgcaagg 5100
 gacaggaggt gcaggagctg caggcctccc ccaccagcc tgcctgcct tggggaaaac 5160
 cgtgggtgtg tctgcaggc catgcaggcc tgggacatgc aagcccataa ccgctgtggc 5220
 ctcttggttt tacagatacg aacctaaact ttcaaacct gtcagtatt gggttccgaa 5280
 tcctcctcct gaaagtggcc gggtttaac tgcctatgac gctgcgctg tggccagct 5340
 gaggtgaggg gccttgaagc tgggagtggg gtttagggac gcgggtctct gggtgcatcc 5400

taagctctga gagcaaact cctgcaggg tcttgctttt aagtccaaag cctgagccca 5460
 ccaaactctc ctacttctc ctgttataaa ttctcttgt gcaataataa tggcctgaaa 5520
 cgctgtaaaa tatcctcatt tcagccgct cagttgcact tctccctat gaggtaggaa 5580
 gaacagtgtg ttagaaacga agaaactgag gccccacagc taatgagtgg aggaagagag 5640
 acacttgtgt acaccacatg ctttgtgtg tacttctct accgtgtaac ctctcatgt 5700
 cctctctccc cagtaggct ctcttagctc agtagaaaga agacattaca ctcatattac 5760
 accccaatcc tggctagagt ctccgcacc tcctcccca gggccccag tcgtcttgc 5820

gacaactgca tctgttcca tcaccatcaa aaaaaaactc caggctgggt gcgggggctc 5880
 acacctgtaa tcccagcact ttgggaggca gaggcaggag gagcacagga gctggagacc 5940
 agcctgggca acacaggag accccgctc tacaaaaagt gaaaaatta accaggtgtg 6000
 gtgctgcaca cctgtatcc cagctactta agaggctgag atgggaggat cgcttgagcc 6060
 ctggaatgtt gaggtacaa tgagctgtga ttgcgtcact gcactccagc ctggaagaca 6120
 aagcaagatc ctgtctcaa taataaaaaa aataagaact ccagggtaca ttgtctcta 6180
 gaactctacc acatagcccc aaacagagcc atcaccatca catccctaac agtcctgggt 6240

cttctcagt gtccagcctg acttctgtt ttctctatc cagatctgca agattgtaag 6300
 acagcctgtg ctccctcgt cttctcttg cattgccct cttctccct tccaaacaga 6360
 gggaactctc ctaccccaa ggagtgaaa gctgtacca cctctgtgc cccccggcaa 6420
 tgccaccaac tggatctac ccgaatttat gattaagatt gctgaagagc tgccaaacac 6480
 tgctgccacc cctctgtt cttattgt gctgtcact gcctgacatt cacggcagag 6540
 gcaaggctgc tgcagctcc cctggctgtg cacattccct cctgtcccc agagactgcc 6600
 tccgcatcc cacagatgat ggatctcag tgggttctct tgggtctag gtcctgcaga 6660

atgttgtgag gggtttattt tttttaata gtgttcataa agaaatacat agtattctt 6720
 ttctcaagac gtggggggaa attatctcat tatcaggcc ctgctatgct gtgtatctg 6780
 gcgtgttgta tgcctgctg ccgatgcctt c 6811

<210> 121

<211> 6811

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 121

atatccagaa cctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt	60
ctgtctgcct attcaccgat ttgtattctc aaacaaatgt gtcacgggca gagcgacat	120
cgcccacagt ccccgagaag ttggggggag gggtcggcaa ttgaacgggt gcctagagaa	180
ggtaggcgcgg ggtaaacctgg gaaagtgatg tcgtgtactg gtcgccctt tttcccgagg	240
gtgggggaga accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt	300
ttgccccag aacacagctg aagcttcgag gggtcgcgt ctctccttca cgcgcccgcc	360
gccctacctg aggccgcat ccacgccgt tgagtcgcgt tctgccct cccgcctgtg	420
gtgcctcctg aactgcgtcc gccgtctagg taagttttaa gctcaggtcg agaccgggcc	480
tttgtccggc gtcctcttg agcctacctt gactcagccg gctctccag ctttgctga	540
ccctgcttgc tcaactctac gtctttgttt cgttttctgt tctgcgccgt tacagatcca	600
agctgtgacc ggccctact ctagagctag cgcagtcagt gcttctgaca caacagtctc	660
gaacttaact agcacatgg cgctcccagt gacagcctta cttttacctc tggcgttatt	720
attgcacgcg gctcgtcctg acatacagat gactcagact acctcttccc tatctgcttc	780
tttaggcgac cgagtaacaa tatcttgccg ggccagccag gacatctcaa aatacttaaa	840
ctggtatcag cagaagccgg acggaacagt taagttgctc attaccaca cgtcgagatt	900
acactcaggc gttcctagcc gattttcggg ttccggttcc ggtacggact acagcctgac	960
aatcagtaac cttagcagg aggacatcgc cacctacttc tgtcagcagg gcaacacgct	1020
cccgtacaca ttcggtgggg gaactaagct ggagattacc ggaggcgggt gcagcgggtg	1080
cggcggcagc ggggggtggc gctcggaggt caagttacag gagagcggac cgggcttgg	1140
cgcacctagc cagagcctct cagtcacgtg cactgtgtct ggagtcagtc tcccagacta	1200
cggggtatca tggatacgac agccgcctag aaagggtta gagtggctgg gggttatctg	1260
gggaagtgaa accacatact acaactcagc tctcaagagc cgcctacca tcattaagga	1320
caacagtaag tcgcaggttt tcttaagat gaactctctc cagactgacg acaccgctat	1380
ttactactgc gcgaagcact actactacgg cgggagttac gcaatggact actgggggtca	1440
gggcacttct gtgaccgtat ccagcactac taccagcc ccacgtcccc ccagccagc	1500

tccaacgata gcaagtcagc ctttatctct tcgccctgag gcttgcaggc ccgcggcggg	1560
cggcgccgtt cacacgcgag gactagactt cgcttgcgac atctacatct gggcaccact	1620
agccgggact tgcggagtggt tgttgttgag cttggtaata acgctctact gcaagcgtgg	1680
gagaaagaag ctcttgtaca ttttcaagca gccattcatg cgtcccgttc agacgactca	1740
ggaggaggac ggctgctcgt gccgattccc ggaggaggag gagggcgtt gcgaactcag	1800
agtgaagtgc tctcgctccg cggacgcacc cgcttaccag cagggtcaga accagctata	1860
caacgagtta aacctggggc gccgggagga gtacgacgtg ttagacaagc gtagaggtag	1920
ggaccggag atgggaggca agcctcgag aaagaacccc caggagggcc tgtacaacga	1980
actccagaag gacaagatgg ctgaggcgta ctcggagatt ggtatgaagg gcgagagacg	2040
tcgcggaaag ggacacgacg gcttatacca ggggctttcc accgcgacca aggacacata	2100
cgacgcgctg cacatgcaag ccttaccacc tcgatgaggt accagcgcc gcttcgagca	2160
gacatgataa gatacattga tgagtgtgga caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa	2220
tgctttatgt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatgtg taaccattat aagctgcaat	2280
aaacaagtta aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg ctagacatga	2340
ggtctatgga cttaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct gactttgcat	2400
gtgcaaacgc cttaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc agcccaggta	2460
agggcagctt tgggtgcctc gcagctgtt tccttgcctc aggaatggcc aggttctgcc	2520
cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ccttgattgg tggctcggc cttatccatt	2580
gccacaaaa cctctttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag tccagagaat	2640
gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg cccagcctca	2700
gtctctccaa ctgagttcct gcctgcctgc ctttgctcag actgtttgcc cttactgct	2760
cttctaggcc tcattctaag ccccttctcc aagttgctc tccttatttc tcctgtctg	2820
ccaaaaaatc ttcccgagc cactaagtca gtctcacgca gtactcatt aaccaccaa	2880
tcactgattg tgccgcgaca tgaatgcacc aggtgttgaa gtggaggaat taaaaagtca	2940
gatgaggggt gtcccagag gaagcaccat tctagtggg ggagccatc tgtcagctgg	3000
gaaaagtcca aataacttca gattggaatg tgttttaact cagggttgag aaaacagcta	3060
ccttcaggac aaaagtcagg gaagggtctc ctgaagaaat gctacttgaa gataccagcc	3120
ctaccaaggg caggagagg accctataga ggctgggac aggagctcaa tgagaaagga	3180
gaagagcagc aggcattgag tgaatgaagg aggcagggcc gggtcacagg gccttctagg	3240
ccatgagagg gtagacagta ttctaaggac gccagaaagc tgttgatcgg cttcaagcag	3300
gggagggaca cctaatttgc ttttcttttt tttttttttt tttttttttt tttttgagat	3360

ggagttttgc tcttgttgcc caggctggag tgcaatgggtg catcttggct cactgcaacc	3420
tccgcctccc aggttcaagt gattctcctg cctcagcctc ccgagtagct gagattacag	3480
gcacccgccca ccatgcctgg ctaatTTTTT gtatTTTTtag tagagacagg gtttcactat	3540
gttggccagg ctggtctcga actcctgacc tcaggtagtc caccgccttc agcctcccaa	3600
agtgtctggga ttacaggcgt gagccaccac acccggcctg cttttcttaa agatcaatct	3660
gagtgtctgta cggagagtgg gttgtaagcc aagagtagaa gcagaaaggg agcagttgca	3720
gcagagagat gatggaggcc tgggcagggt ggtggcaggg aggtaaccaa caccattcag	3780
gtttcaaagg tagaaccatg cagggatgag aaagcaaaga ggggatcaag gaaggcagct	3840
ggattttggc ctgagcagct gagtcaatga tagtgccgtt tactaagaag aaaccaagga	3900
aaaaatttgg ggtgcaggga tcaaaacttt ttggaacata tgaaagtacg tgtttatact	3960
ctttatggcc cttgtcacta tgtatgcctc gctgcctcca ttggactcta gaatgaagcc	4020
aggcaagagc agggctctatg tgtgatggca catgtggcca gggcatgca acatgtactt	4080
tgtacaaaca gtgtatatg agtaaataga aatggtgtcc aggagccgag gtatcggctc	4140
tgccagggcc aggggctctc cctagcaggt gctcatatgc tgtaagttcc ctccagatct	4200
ctccacaagg aggcattgaa aggcgttagt tgttcacctg cccaagaact aggaggtctg	4260
gggtgggaga gtcagcctgc tctggatgct gaaagaatgt ctgtttttcc ttttagaaag	4320
ttcctgtgat gtcaagctgg tcgagaaaag ctttgaaaca ggtaagacag gggcttagcc	4380
tgggtttgca caggattgcg gaagtgatga acccgcaata accctgcctg gatgaggag	4440
tgggaagaaa ttagtagatg tgggaatgaa tgatgaggaa tggaaacagc ggttcaagac	4500
ctgccagag ctgggtgggg tctctcctga atccctctca ccatctctga ctttccattc	4560
taagcacttt gaggatgagt ttctagcttc aatagaccaa ggactctctc ctaggcctct	4620
gtattccttt caacagctcc actgtcaaga gagccagaga gagcttctgg gtggcccagc	4680
tgtgaaattt ctgagtcctt tagggatagc cctaaacgaa ccagatcatc ctgaggacag	4740
ccaagagggt ttgccttctt tcaagacaag caacagtact cacataggct gtgggcaatg	4800
gtcctgtctc tcaagaatcc cctgccactc ctcacacca cctgggccc atattcattt	4860
ccatttgagt tgttcttatt gagtcacct tctgttggtg gcggaactca ctaaggggcc	4920
catctggacc cgaggtattg tgatgataaa ttctgagcac ctaccccatc cccagaaggg	4980
ctcagaaata aaataagagc caagtctagt cgggtgtttcc tgtcttgaaa cacaatactg	5040
ttggccctgg aagaatgcac agaactgttt tgtaagggga tatgcacaga agctgcaagg	5100
gacaggaggt gcaggagctg caggcctccc ccaccagcc tgctctgcct tggggaaaac	5160

cgtgggtgtg tctgcaggc catgcaggcc tgggacatgc aagcccataa ccgctgtggc 5220

 ctcttggttt tacagatacg aacctaaact ttcaaaacct gtcagtatt gggttccgaa 5280
 tcctctctct gaaagtggcc gggtttaatc tgcctatgac gctgcggctg tggteccagct 5340
 gaggtgaggg gccttgaagc tgggagtggg gtttagggac gcgggtctct gggtgcatcc 5400
 taagctctga gagcaaacct cctgcaggg tcttgctttt aagtccaaag cctgagccca 5460
 ccaaactctc ctacttcttc ctgttataaa ttctcttgt gcaataataa tggcctgaaa 5520
 cgctgtaaaa tatctcatt tcagccgcct cagttgcact tctccctat gaggtaggaa 5580
 gaacagttgt ttagaaacga agaaactgag gccccacagc taatgagtgg aggaagagag 5640

 acacttgtgt acaccacatg ccttgtgttg tacttctctc accgtgtaac ctctcatgt 5700
 cctctctccc cagtacggct ctcttagctc agtagaaaga agacattaca ctcatattac 5760
 accccaatcc tggctagagt ctccgcaccc tctccccca gggccccag tcgtcttgc 5820
 gacaactgca tctgttcca tcaccatcaa aaaaaaactc caggctgggt gcgggggctc 5880
 acacctgtaa tcccagcact ttgggaggca gaggcaggag gagcacagga gctggagacc 5940
 agcctgggca acacaggag accccgcctc tacaaaaagt gaaaaaatta accaggtgtg 6000
 gtgctgcaca cctgtatgcc cagctactta agaggctgag atgggaggat cgcttgagcc 6060

 ctggaatgtt gaggtacaa tgagctgtga ttgcgtcact gcactccagc ctggaagaca 6120
 aagcaagatc ctgtctcaa taataaaaaa aataagaact ccagggtaca ttgtctcta 6180
 gaactctacc acatagcccc aaacagagcc atcaccatca catcctaac agtcctgggt 6240
 ctctctcagt gtccagcctg acttctgttc ttctcattc cagatctgca agattgtaag 6300
 acagcctgtg ctccctcgt ctttctctg cattgccct cttctccctc tccaaacaga 6360
 gggaactctc ctacccccaa ggaggtgaaa gctgctacca cctctgtgcc cccccggcaa 6420
 tgccaccaac tggatctac ccgaatttat gattaagatt gctgaagagc tgccaaacac 6480

 tgctgccacc cctctgttc cttattgtc gcttgtcact gcctgacatt cacggcagag 6540
 gcaaggctgc tgcagctcc cctggctgtg cacattccct cctgtcctcc agagactgcc 6600
 tccgcatcc cacagatgat ggatcttcag tgggttctct tgggtcttag gtcctgcaga 6660
 atgttgtgag gggtttattt tttttaata gtgttcataa agaaatacat agtattcttc 6720
 ttctcaagac gtggggggaa attatctcat tatcgaggcc ctgctatgct gtgtatctgg 6780
 gcgtgttgta tgcctgctg ccgatgcctt c 6811

<210> 122

<211> 6811

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 122

atatccagaa ccctgacct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt	60
ctgtctgcct attcaccgat ttgtattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg	120
atgtgtatat gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc	180
ggcaattgaa cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg	240
tactggtccc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc	300
gtgaacgttc tttttcgaa cgggtttgcc gccagaacac agctgaagct tcgaggggct	360
cgcattcttc cttcacgcgc ccgccgccct acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt	420

cggtttctgc cgctcccgcc ctgtggtgcc tctgaactg cgtccgccgt ctaggtaagt	480
ttaaagctca ggicgagacc gggcctttgt ccggcgctcc cttggagcct acctagactc	540
agccggctct ccacgtttg cctgacctg cttgtcaac tctacgtctt tgtttcgttt	600
tctgtttctgc gccgttacag atccaagtgc tgaccggcgc ctactctaga gctagcgcag	660
tcagtgttcc tgacacaaca gtctcgaact taactagcac catggcgctc ccagtgcag	720
ccttactttt acctctggcg ttattattgc acgcggtcgc tctgacata cagatgactc	780
agactacctc ttccctatct gcttttttag gcgaccgagt aacaatatct tgccggggcca	840

gccaggacat ctcaaaatcc ttaactggt atcagcagaa gccggacgga acagttaagt	900
tgctcattta ccacacgtcg agattacact caggcgctcc tagccgattt tcgggttccg	960
gttccggtac ggactacagc ctgacaatca gtaacctga gcaggaggac atcgccacct	1020
actttctgca gcagggaac acgctcccg acacattcgg tgggggaact aagctggaga	1080
ttaccggagg cgggtggcagc ggtggcgcg gcagcggggg tggcggtcgc gaggtcaagt	1140
tacaggagag cggaccgggc ttggtcgcac ctaccagag cctctcagtc acgtgcactg	1200
tgtctggagt cagtctccca gactacgggg tatcatggat acgacagccg cctagaaagg	1260

gcttagagtg gctgggggtt atctggggaa gtgaaaccac atactacaac tcagctctca	1320
agagccgctt caccatcatt aaggacaaca gtaagtcgca ggttttctta aagatgaact	1380
ctctccagac tgacgacacc gctatttact actgcgcgaa gcactactac tacggcggga	1440
gttacgcaat ggactactgg ggtcagggca cttctgtgac cgtatccagc actactacc	1500
cagccccacg tccccacg ccagctccaa cgatagcaag tcagccctta tctcttcgcc	1560
ctgaggcttg caggcccgcg gcggcgcgcg ccgttcacac gcgaggacta gacttcgcct	1620

gcgacatcta catctgggca ccactagccg ggacttgccg agtgtgttg ttgagcttgg 1680

taataacgct ctactgcaag cgtgggagaa agaagctctt gtacattttc aagcagccat 1740

tcatgcgtcc cgttcagacg actcaggagg aggacggctg ctctgtccga ttcccggagg 1800

aggaggaggg cggttgcgaa ctacagagtga agttctctcg ctccgcggac gcacccgctt 1860

accagcaggg tcagaaccag ctatacaacg agttaaacct ggggcgccgg gaggagtacg 1920

acgtgttaga caagcgtaga ggtagggacc cggagatggg aggcaagcct cggagaaaga 1980

acccccagga gggcctgtac aacgaactcc agaaggacaa gatggctgag gcgtactcgg 2040

agattggtat gaagggcgag agacgtcgcg gaaagggaca cgacggctta taccaggggc 2100

tttccaccgc gaccaaggac acatacgacg cgctgcacat gcaagcctta ccacctgat 2160

gaggtaccag cggccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac 2220

cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt 2280

atttgaacc attataagct gcaataaaca agttcacaga caaaactgtg ctagacatga 2340

ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct gactttgcat 2400

gtgcaaacgc cttcaaacac agcattattc cagaagacac cttcttcccc agcccaggtg 2460

agggcagctt tggcgccttc gcaggtgtt tccttgcttc aggaatggcc aggttctgcc 2520

cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctctggc cttatccatt 2580

gccacaaaaa ccctcttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag tccagagaat 2640

gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg cccagcctca 2700

gtctctccaa ctgagttcct gcctgcctgc ctttgctcag actgtttgcc cttactgct 2760

cttctaggcc tcattctaag ccccttctcc aagttgcctc tccttatttc tccctgtctg 2820

ccaaaaaate tttccagct cactaagtca gtctcagca gtcactcatt aaccaccaa 2880

tcactgattg tgccggcaca tgaatgcacc agtgtgtgaa gtggaggaat taaaaagtca 2940

gatgaggggt gtgcccagag gaagcacat tctagtggg ggagcccatc tgtcagctgg 3000

gaaaagtcca aataacttca gattggaatg tgttttaact cagggttgag aaaacagcta 3060

ccctcaggac aaaagttagg gaagggtctt ctgaagaaat gctacttgaa gataccagcc 3120

ctaccaaggg caggagagg accctataga ggcttgggac aggagctcaa tgagaaagga 3180

gaagagcagc aggcattgagt tgaatgaagg aggcagggcc gggtcacagg gccttctagg 3240

ccatgagagg gtagacagta ttctaaggac gccagaaagc tgttgatcgg cttcaagcag 3300

gggagggaca cctaatttgc ttttcttttt tttttttttt tttttttttt tttttgagat 3360

ggagttttgc tcttgttgcc caggctggag tgcaatgggtg catcttggct cactgcaacc	3420
tccgcctccc aggttcaagt gattctcctg cctcagcctc ccgagtagct gagattacag	3480
gcaccgcgca ccatgcctgg ctaatttttt gtattttttag tagagacagg gtttcactat	3540
gttggccagg ctggctctga actcctgacc tcaggtgac caccgccttc agcctcccaa	3600
agtgcctggga ttacaggcgt gagccaccac acccggcctg cttttcttaa agatcaatct	3660
gagtgcctgta cggagagtgg gttgtaagcc aagagtagaa gcagaaagg agcagttgca	3720
gcagagagat gatggaggcc tgggcagggt ggtggcaggg aggtaacca caccattcag	3780
gtttcaaagg tagaaccatg cagggatgag aaagcaaaga ggggatcaag gaaggcagct	3840
ggattttggc ctgagcagct gagtcaatga tagtgccgtt tactaagaag aaaccaagga	3900
aaaaatttgg ggtgcaggga tcaaaacttt ttggaacata tgaaagtacg tgtttatact	3960
ctttatggcc cttgtcacta tgtatgcctc gctgcctcca ttggactcta gaatgaagcc	4020
aggcaagagc agggctctatg tgtgatggca catgtggcca gggctcatgca acatgtactt	4080
tgtacaaaca gtgtatattg agtaaataga aatggtgtcc aggagccgag gtatcggtcc	4140
tgccagggcc aggggctctc cctagcaggt gctcatatgc tgtaagttcc ctccagatct	4200
ctccacaagg aggcattgaa aggcctgtatg tgttcacctg cccaagaact aggaggtctg	4260
gggtgggaga gtcagcctgc tctggatgct gaaagaatgt ctgtttttcc ttttagaaag	4320
ttcctgtgat gtcaagctgg tcgagaaaag ctttgaaaca ggtaagacag gggctctagcc	4380
tgggtttgca caggattcgc gaagtatga acccgcaata accctgcctg gatgaggag	4440
tgggaagaaa ttagtagatg tgggaatgaa tgataggaa tggaaacagc ggttcaagac	4500
ctgccagag ctgggtgggg tctctcctga atccctctca ccatctctga ctttccattc	4560
taagcacttt gaggatgagt ttctagcttc aatagaccaa ggactctctc ctaggcctct	4620
gtattccttt caacagctcc actgtcaaga gagccagaga gagcttctgg gtggcccagc	4680
tgtgaaattt ctgagtcct tagggatagc cctaaacgaa ccagatcatc ctgaggacag	4740
ccaagagggt ttgccttctt tcaagacaag caacagtact cacataggct gtgggcaatg	4800
gtcctgtctc tcaagaatcc cctgccactc ctcacacca cctgggccc atattcattt	4860
ccatttgagt tgttcttatt gagtcatcct tctgtggta gcggaactca ctaaggggcc	4920
catctggacc cgaggtattg tgatgataaa ttctgagcac ctaccccatc cccagaagg	4980
ctcagaaata aaataagagc caagtctagt cgggtgttcc tgtcttgaaa cacaatactg	5040
ttggccctgg aagaatgcac agaactgtt tgtaaggga tatgcacaga agctgcaagg	5100
gacaggaggt gcaggagctg caggcctccc ccaccagcc tgctctgcct tggggaaaac	5160
cgtgggtgtg tctgcagcc catgcaggcc tgggacatgc aagcccataa ccgtgtggc	5220

ctcttggttt tacagatacg aacctaaact ttcaaaacct gtcagtatt gggttccgaa 5280
 tcctcctcct gaaagtggcc gggtttaatc tgctcatgac gctgcggctg tggccagct 5340
 gaggtgaggg gccttgaagc tgggagtggg gtttagggac gcgggtctct gggtgcatcc 5400
 taagctctga gagcaaacct ccctgcaggg tcttgctttt aagtccaaag cctgagccca 5460

ccaaactctc ctacttcttc ctgttacaaa ttctcttgt gcaataataa tggcctgaaa 5520
 cgctgtaaaa tatectcatt tcagccgect cagttgcact tctcccctat gaggtaggaa 5580
 gaacagttgt ttagaaacga agaaactgag gccccacagc taatgagtgg aggaagagag 5640
 acacttgtgt acaccacatg ccttgtgttg tacttctctc accgtgtaac ctctcatgt 5700
 cctctctccc cagtacggct ctcttagctc agtagaaaga agacattaca ctcatattac 5760
 accccaatcc tggctagagt ctccgcacc tcctcccca gggtcccccag tcgtcttgc 5820
 gacaactgca tctgtttcca tcaccatcaa aaaaaaactc caggctgggt gcgggggctc 5880

acacctgtaa tcccagcact ttgggaggca gaggcaggag gagcacagga gctggagacc 5940
 agcctgggca acacaggag accccgcctc tacaaaaagt gaaaaaatta accaggtgtg 6000
 gtgctgcaca cctgtatgcc cagctactta agaggctgag atgggaggat cgcttgagcc 6060
 ctggaatgtt gaggtacaaa tgagctgtga ttgcgtcact gcactccagc ctggaagaca 6120
 aagcaagatc ctgtctcaaa taataaaaaa aataagaact ccagggtaca ttgtctccta 6180
 gaactctacc acatagcccc aaacagagcc atcaccatca catccctaac agtcctgggt 6240
 ctctcctagt gtccagcctg acttctgttc ttctcattc cagatctgca agattgtaag 6300

acagcctgtg ctccctcgct ctttctctg catgcccct cttctccctc tccaaacaga 6360
 gggaactctc ctaccccaa ggaggtgaaa gctgctacca cctctgtgcc cccccggcaa 6420
 tgccaccaac tggatcctac ccgaatttat gattaagatt gctgaagagc tgccaaacac 6480
 tgctgccacc cctctgttc ctttatgtc gcttgctact gcctgacatt cacggcagag 6540
 gcaaggctgc tgcagcctcc cctggctgtg cacattccct cctgctcccc agagactgcc 6600
 tccgcatcc cacagatgat ggatcttcag tgggttctct tgggctctag gtctgcaga 6660
 atgttgtgag gggtttatit tttttaata gtgttcataa agaaatacat agtattcttc 6720

ttctcaagac gtggggggaa attatctcat tatcaggcc ctgctatgct gtgtatctgg 6780
 gcgtgttgta tgtcctgctg ccgatgcctt c 6811

<210> 123

<211> 6040

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 123

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgag	60
cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc	120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat	180
agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca	240
acggttaatt tgctgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac	300
acttctcagg attctggcgt accgttctctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt	360
agctcccgtc ctgattctaa cgaggaaagc acgttatatcg tgctcgtcaa agcaaccata	420
gtacgcgccc tgiagcggcg cattaagcgc ggccgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac	480
cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgtc ttcttccctt cttttctcgc	540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttttag ggttccgatt	600
tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgatttag ggtgatggtt cacgtagtgg	660
gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttg gagtcacgt tctttaatag	720
tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt	780
ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt	840
taacgcgaat ttaacaaaaa tattaacgct tacaatttaa atatttgctt atacaatctt	900
cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt	960
acgattaccg ttcatcgccc tgcgcgtcgc ctgcgtcact gaggccgccc gggcaaagcc	1020
cgggcgtcgg gcgaccttg gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg	1080
agtggaattc acgcgtgata tccagaacct tgaccctgcc gtgtaccagc tgagagactc	1140
taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc	1200
acaaagtaag gattctgatg tgcatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggctctat	1260
ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag	1320
ccaatcagcg tgcgcgcttc cgaaagtgtc cttttatggc tgggcggaga atgggcgggtg	1380
aacgccgatg attatataag gacgcgccgg gtgtggcaca gctagtccg tcgcagccgg	1440
gatttgggtc gcggttcttg tttgttccgg aaagccacca tggcgtctcc agtgacagcc	1500
ttacttttac ctctggcgtt attattgcac gcggctcgtc ctgacataca gatgactcag	1560
actacctctt ccctatctgc ttcttttaggc gaccgagtaa caatatcttg ccgggccagc	1620
caggacatct caaaatactt aaactgggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagtgtg	1680
ctcatttacc acacgtcgag attactacta ggcggttccta gccgattttc gggttccggt	1740

tccggtacgg actacagcct gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cgccacctac	1800
ttctgtcagc agggcaacac gctcccgtac acattcggtg ggggaactaa gctggagatt	1860
accggaggcg gtggcagcgg tggcggcggc agcgggggtg gcggctcgga ggtcaagtta	1920
caggagagcg gaccgggctt ggtcgcacct agccagagcc tctcagtcac gtgcactgtg	1980
tctggagtca gtctcccaga ctacggggta tcatggatac gacagccgcc tagaaagggc	2040
ttagagtggc tgggggttat ctggggaagt gaaaccacat actacaactc agctctcaag	2100
agccgcctca ccatcattaa ggacaacagt aagtcgcagg ttttcttaa gatgaactct	2160
ctccagactg acgacaccgc tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggcgggagt	2220
tacgcaatgg actactgggg tcagggcact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca	2280
gccccacgtc cccccacgcc agctccaacg atagcaagtc agcccttata tcttcgcct	2340
gaggcttgca ggccgcggc gggcggcgcc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc	2400
gacatctaca tctgggcacc actagccggg acttgccgag tgttgttgtt gagcttggt	2460
ataacgtct actgcaagcg tgggagaaaag aagctcttgt acattttcaa gcagccattc	2520
atgctcccc ttacagacac tcaggaggag gacggctgct cgtgccgatt cccggaggag	2580
gaggaggcg gtigcgaact cagagtgaag ttctctcgct ccgcggacgc acccgcttac	2640
cagcagggtc agaaccagct atacaacgag ttaaacctgg ggcccgggga ggagtacgac	2700
gtgttagaca agcgtagagg tagggaccgc gagatgggag gcaagcctcg gagaaagaac	2760
ccccaggagg gcctgtacaa cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcggag	2820
attgggtatga agggcgagag acgtcgcgga aaggacacg acggcttata ccaggggctt	2880
tccaccgca ccaaggacac atacgacgcg ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga	2940
taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaata aaatgcttta	3000
tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacct tataagctgc aataaacaag	3060
ttctagagca acaaatctga ctttgcatgt gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca	3120
gaagacacct tcttccccag ccaggtgaag ggcagctttg gtgccttcgc aggctgtttc	3180
cttgcttcag gaatggccag gttctgcca gagctctggt caatgatgtc taaaactcct	3240
ctgattgcaa ttgcctctct gcgcgtcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc	3300
gggcgtcggg cgaccttttg tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga	3360
gtggccaacc ccggcgattc tcttgtttgc tccagactct caggcaatga cctgatagcc	3420
tttgtacctg caggctctca aaatagctac cctctccggc atgaatttat cagctagaac	3480
ggttgaatat catattgatg gtgatttgac tgtctccggc ctttctcacc cgtttgaatc	3540

tttacctaca cattactcag gcattgcatt taaaatatat gagggttcta aaaattttta	3600
tccttgcgtt gaaataaagg cttctccgcg aaaagtatta cagggtcata atgtttttgg	3660
tacaaccgat ttagctttat gctctgaggc ttatttgctt aattttgcta attctttgcc	3720
ttgcctgtat gatatttgg atgttggaa tcttgatgcg gtattttctc cttacgcac	3780
tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat	3840
agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc	3900
tcccgccatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt	3960
tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat	4020
aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg	4080
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga	4140
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac	4200
atttccgtgt cgccttatt cctttttttg cggcattttg ccttctgtt ttgtctcacc	4260
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca	4320
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc	4380
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg	4440
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac	4500
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc	4560
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg	4620
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac	4680
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg	4740
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat	4800
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg	4860
ctggctggtt tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg	4920
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacag acggggagtc	4980
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc	5040
attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt	5100
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt	5160
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt	5220
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag	5280

cggtggtttg ttgcccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5340
gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca 5400
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5460
ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta cgggataagg 5520
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5580
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5640
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5700

ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5760
agcgtcgatt ttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5820
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5880
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcttttga gtgagctgat accgctcgcc 5940
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac 6000
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg 6040

<210> 124

<211> 8342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 124

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ctttcccaac agttgcgcag 60
cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttgagtt ctctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggt gcctcactga ttataaaaac 300
acttctcagg attctggcgt accgttctctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
agctccccgt ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420

gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
cgctacactt gccagcgcgc tagcggccgc tcctttcgct ttcttccctt cttttctcgc 540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttttag ggttccgatt 600
tagtgcctta cggcacctcg acccaaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 720
tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780

ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt	840
taacgcgaat ttttaacaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt	900
cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt	960
acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg	1020
accaaaggtc gcccgcgcgc cgggctttgc cgggcgccgc tcagtgcgcg agcgagcgcg	1080
cagagaggga gtggcctaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg	1140
cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggtaactta cagtttatta aatagatgtt	1200
tatatggaga agctctcatt tctttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca	1260
ccatattcat ttgacaggtg aaattcctga gatgtaagga gctgctgtga cttgctcaag	1320
gccttatatc gagtaaacgg tagcgctggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt	1380
caaaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat	1440
gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgcccgac ctaagtggg gagaccactc	1500
cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct	1560
gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta	1620
ttattaagta gccctgcatt tcaggtttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac	1680
gttcaactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgtgcctgtc cctgagtcce	1740
agtcacatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg	1800
acttgccagc cccacagagc cccgccttg tccatcactg gcactctggac tccagcctgg	1860
gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata	1920
tccagaacct tgacctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg	1980
tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgc acaaagtaag gattctgatg	2040
tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggctctat ggacttcaag agcaacagtg	2100
ctgtggcctg gagcaactag tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata	2160
gcataaatca atattggcta ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac	2220
atttatattg gctcatgtcc aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gaccagttat	2280
taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca	2340
taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca	2400
ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg	2460
gagtatttac ggtaaacctgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcataa tccaagtcg	2520

cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc 2580
 ttacgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgatg 2640
 atgcggtttt ggcagtagac caatgggagc ggatagcggc ttgactcacg gggatttcca 2700
 agtctccacc ccattgacgt caatgggagc ttgttttggc accaaaatca acgggacttt 2760
 ccaaaatgac gtaataaccc cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg 2820
 gaggtctata taagcagagc tcgttttagt aaccgtcaga tctactagaag ctttattgag 2880
 gtagtttatc acagttaaat tgctaacgca gtcagtgtct ctgacacaa agtctcgaac 2940

 ttaagctgca gaagttggc gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag 3000
 gttaaggag accaataaga actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga 3060
 taggcaccta ttggtcttac tgacatccac ttgtccttc tctccacagg tgtccactcc 3120
 cagttcaatt acagctctta aggctagagt acttaatacg actcactata ggccaccatg 3180
 gcgtcccgag tgacagcctt acttttacct ctggcggtat tattgcacgc ggctcgtcct 3240
 gacatacaga tgactcagac tacctcttcc ctatctgctt ctttaggcga ccgagtaaca 3300
 atatcttgcc gggccagcca ggacatctca aaatacttaa actggtatca gcagaagccg 3360

 gacggaacag ttaagttgct catttaccac acgtcgagat tacactcagg cgttcctagc 3420
 cgattttcgg gttccggctc cggtagcgac tacagcctga caatcagtaa ccttgagcag 3480
 gaggacatcg ccactactt ctgtcagcag ggcaacacgc tcccgtacac attcggtggg 3540
 ggaactaagc tggagattac cggaggcggc ggtagcggc gcggcggcag cgggggtggc 3600
 ggctcggagg tcaagttaca ggagagcgga ccgggcttgg tcgcacctag ccagagcctc 3660
 tcagtcacgt gcactgtgtc tggagtcagt ctcccagact acgggggtatc atggatacga 3720
 cagccgccta gaaaggcctt agagtggctg ggggttatct ggggaagtga aaccacatac 3780

 tacaactcag ctctcaagag ccgcctcacc atcattaagg acaacagtaa gtcgcaggtt 3840
 ttcttaaga tgaactctct ccagactgac gacaccgcta ttactactg cgcaagcac 3900
 tactactacg gggggagtta cgcaatggac tactggggc agggcacttc tgtgaccgta 3960
 tccagcacta ctacccagc ccacgtccc ccacgccag ctccaacgat agcaagttag 4020
 cccttatctc ttgcctga ggcttgcagg cccgcggcgg gcggcgccgt tcacacgca 4080
 ggactagact tcgctgcga catctacatc tgggcaccac tagccgggac ttgcggagtg 4140
 ttgttttga gcttggtaat aacgtctac tgcaagcgtg ggagaaagaa gctctgtac 4200

 attttaage agccattcat gcgtcccgtt cagacgactc aggaggagga cggctgctcg 4260
 tgccgattcc cggaggagga ggaggcggc tgcgaactca gagtgaagtt ctctcgtcc 4320
 gcggagcac ccgcttacc gcagggtcag aaccagctat acaacagatt aaacctgggg 4380

cgccgggagg agtacgacgt gttagacaag cgtagaggta gggacccgga gatgggaggc 4440

aagcctcgga gaaagaaccc ccaggagggc ctgtacaacg aactccagaa ggacaagatg 4500

gctgaggcgt actcggagat tggatatgaag ggcgagagac gtcgcggaaa gggacacgac 4560

ggcttatacc aggggctttc caccgcgacc aaggacacat acgacgcgct gcacatgcaa 4620

gccttaccac ctcgatgagg taccagcggc cgcttcgagc agacatgata agatacattg 4680

atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaa atgctttatt tgtgaaattt 4740

gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca 4800

attcgaattt aaatcggatc cgcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca 4860

acagcattat tccagaagac accttcttcc ccagcccagg taagggcagc tttgggtcct 4920

tcgcaggctg tttccttgct tcaggaatgg ccaggttctg cccagagctc tggatcaatga 4980

tgtctaaaac tctctgatt ggtggtctcg gccttatcca ttgccaccaa aacctctttt 5040

ttactaagaa acagtgagcc ttgttctggc agtccagaga atgacacggg aaaaaagcag 5100

atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct cagtctctcc aactgagttc 5160

ctgcctgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg ctcttctagg cctcattcta 5220

agccccctct ccaagttgcc tctccttatt tctccctgct tgccaaaaa tctttcccag 5280

ctcactaagt cagtctcagc cagtcactca ttaaccacc aatcactgat tgtgccggca 5340

catgaatgca ccagggtgtg aagtggagga attaaaaagt cagatgaggg gtgtgccag 5400

aggaagcacc attctagttg ggggagccca tctgtcagct gggaaaagtc caataactt 5460

cagattggaa tgtgttttaa ctcagggttg agaaaacagc caccttcagg acaaaagtca 5520

gggaagggtc ctctgaagaa atgctacttg aagataccag ccctaccaag ggcagggaga 5580

ggaccaattg atggagtgg ccactccctc tctgcgcgct cgctcgctca ctgagccgc 5640

ccgggcaaag cccgggcgctc gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc 5700

gcgcagagag ggagtggcca acggcgcgcc tgcaggtctc aaaaatagct accctctccg 5760

gcatgaattt atcagctaga acggttgaat atcatattga tggatgattg actgtctccg 5820

gcctttctca cccgtttgaa tctttacctc cacattactc aggcatgca tttaaaatat 5880

atgagggttc taaaaattt tacccttgcg ttgaaataaa ggcttctccc gcaaaagtat 5940

tacagggtca taatgtttt ggtacaaccg atttagcttt atgctctgag gctttattgc 6000

ttaattttgc taattctttg ccttgccctg atgatttatt ggatgttgga attcctgatg 6060

cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatgggt cactctcagt 6120

acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgtgac 6180

gcgccctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc 6240

gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc 6300

ctcgtgatac gcctatTTTT ataggttaat gtcataataa taatggtttc ttagacgtca 6360

ggtaggcactt ttccggggaaa tgtgcgcgga acccctatTT gtttattttt ctaaatacat 6420

tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccttgataaa tgcttcaata atattgaaaa 6480

aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt 6540

tgctttcctg tttttgctca cccagaaacg ctgggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag 6600

ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtlaagat ccttgagagt 6660

tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagtctctgt atgtggcgcg 6720

gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag 6780

aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta 6840

agagaattat gcagtgtgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa ctacttctg 6900

acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta 6960

actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac 7020

accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 7080

actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 7140

cttctgcgtc cggcccttcc ggctggctgg ttatttctg ataaatctgg agccggtgag 7200

cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 7260

gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag 7320

ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt 7380

tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 7440

aatctcatga ccaaataccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 7500

gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 7560

acaaaaaac caccgtacc agcgtgtggt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 7620

tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 7680

ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 7740

atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 7800

agacgatagt taccggataa ggccgagcgg tcgggctgaa cgggggggtt gtgcacacag 7860

cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 7920

agcggccacg tttccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 7980

acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 8040
gggttttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcgggagc 8100
ctatggaaaa acgccagcaa cgcgcccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 8160
gtcacatgt tctttctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 8220
gagttagctg ataccgtcgc ccgagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 8280
gaagcggag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 8340
tg 8342

<210> 125

<211> 7464

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 125

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 60
cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggat tccatgagc 120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttagatt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300
acttctcagg attctggcgt accgttcttg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360

agctccccgt ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
cgctacactt gccagcgcgc tagcggccgc tcctttcgt tcttccctt cttttctgc 540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 600
tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
gccatgcgcc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttg gaggccacgt tctttaatag 720
tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780

ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 1020
accaaaggtc gcccagcgc cggtctttgc ccgggcggcc tcagttagcg agcgagcgcg 1080
cagagaggga gtggccaact ccatcactag ggttctctac gcgtagatct catattctgg 1140

cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggtagctta cagtttatta aatagatgtt	1200
tatatggaga agctctcatt tctttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca	1260
ccatattcat ttgcagggtg aaattcctga gatgtaagga gctgctgtga ctgtctcaag	1320
gccttatatc gagtaaacgg tagcgctggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt	1380
caaaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat	1440
gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgcccgag ctaagtggg gagaccactc	1500
cagattccaa gatgtacagt ttgccttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct	1560
gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta	1620
ttattaagta gccctgcatt tcaggtttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac	1680
gttactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgtgcctgtc cctgagtcct	1740
agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg	1800
acttgccagc cccacagagc cccgccttg tccatcactg gcactctggac tccagcctgg	1860
gttggggcaa agagggaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata	1920
tccagaacct tgacctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg	1980
tctgcctatt caccgatitg gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg	2040
tgtatatac agacaaaact gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg	2100
ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgccgttc	2160
cgaagtgtgc cttttatggc tgggcggaga atgggcgggtg aacgccgatg attatataag	2220
gacgcgccgg gtgtggcaca gctagtccg tcgcagccgg gatttgggtc gcggttcttg	2280
tttgttccgg aaagccacca tggcgtctcc agtgacagcc ttacttttac ctctggcggt	2340
attattgcac gcggtctgtc ctgacataca gatgactcag actacctctt ccctatctgc	2400
ttcttttaggc gaccgagtaa caatatcttg ccgggccagc caggacatct caaaatactt	2460
aaactggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagttg ctcatctacc acacgtcgag	2520
attacactca ggcgttccta gccgattttc gggttccggt tccggtacgg actacagcct	2580
gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cgccacctac ttctgtcagc agggcaacac	2640
gtcccgtagc acattcggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg	2700
tggcggcgcc agcgggggtg gcggctcgga ggtcaagtta caggagagcg gaccgggctt	2760
ggtcgcacct agccagagcc tctcagtcac gtgcactgtg tctggagtca gtctccaga	2820
ctacggggta tcatggatag gacagccgcc tagaaagggc ttagagtggc tgggggttat	2880

ctggggaagt gaaaccacat actacaactc agctctcaag agccgcctca ccatcattaa	2940
ggacaacagt aagtcgcagg ttttcttaaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc	3000
tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggcgggagt tacgcaatgg actactgggg	3060
tcagggcact tcigtgaccg tatccagcac tactacccca gccccacgtc cccccacgcc	3120
agctccaacg atagcaagtc agcccttatt tcttcgcctt gaggcttgca gggccgcggc	3180
gggcggcgcc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc	3240
actagccggg acttgcggag tgttgttgtt gagcttggta ataacgtctt actgcaagcg	3300
tgggagaaaag aagctcttgt acattttcaa gcagccattc atgcgtcccg ttcagacgac	3360
tcaggaggag gacggctgct cgtgccgatt cccggaggag gaggaggcg gttgcgaact	3420
cagagtgaag ttctctcgtt ccgcggacgc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct	3480
atacaacgag ttaaacctgg ggccggcgga ggagtacgac gtgttagaca agcgtagagg	3540
tagggacccg gagatgggag gcaagcctcg gagaaagaac ccccaggagg gcctgtacaa	3600
cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcggag attggtatga agggcgagag	3660
acgtcgcgga aagggacacg acggcttata ccaggggctt tccaccgcga ccaaggacac	3720
atagcagcgc ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga ggtaccagcg gccgcttcga	3780
gcagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa	3840
aatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacat tataagctgc	3900
aataaacaag ttaacaaca caattcgaat ttaaatcgga tccgcaaca atctgacttt	3960
gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt ccccagccca	4020
ggtaagggca gccttgggtc cttcgcaggc tgtttccttg cttcaggaat ggccaggttc	4080
tgccagagc tctggatcat gatgtctaaa actcctctga ttggtggtct cggccttatt	4140
cattgccacc aaaacctctt ttttactaag aaacagtgag ccttgttctg gcagtccaga	4200
gaatgacacg ggaaaaaagc agatgaagag aaggtggcag gagagggcac gtggcccagc	4260
ctcagtctct ccaactgagt tctgcctgc ctgcctttgc tcagactgtt tgccccttac	4320
tgctcttcta ggcctcattc taagccctt ctccaagttg cctctcctta tttctccctg	4380
tctgcaaaaa aatctttccc agctcactaa gtcagtctca cgcagtcact cattaacca	4440
ccaatcactg attgtgccgg cacatgaatg caccaggtgt tgaagtggag gaattaaaaa	4500
gtcagatgag ggggtgtgcc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag	4560
ctgggaaaag tccaaataac ttcagattgg aatgtgtttt aactcagggt tgagaaaaca	4620
gccacttca ggacaaaagt cagggaaggg ctctctgaag aatgctact tgaagatacc	4680
agccctacca agggcaggga gaggaccaat tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg	4740

ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc ttgggtcgcc	4800
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caacggcgcg cctgcaggtc	4860
tcaaaaatag ctacctctc cggcataaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt	4920
gatggtgatt tgactgtctc cggcctttct caccgtttg aatctttacc tacacattac	4980
tcaggcattg catttaaat atatgagggt tctaaaaatt ttatccttg cgttgaata	5040
aaggcttctc ccgcaaaagt attacagggt cataatgttt ttggtacaac cgatttagct	5100
ttatgtctcg aggcctttatt gcttaatttt gctaattctt tgccttgctt gtagtattta	5160
ttggatgttg gaattctga tgcggtatct tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca	5220
ccgcataatg tgactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccc	5280
acaccgcca acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccg catccgctta	5340
cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc	5400
gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatct ttataggcta atgtcatgat	5460
aataatggtt tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat	5520
ttgtttatct ttctaaatc attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata	5580
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct	5640
tattcccttt ttgcgcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgtgtgtgaa	5700
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa	5760
cagcggtaa atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt	5820
taaagtctg ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg	5880
tcgccgata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca	5940
tcttacggat ggcatacag taagagaatt atgcagtgtt gccataacca tgagtataa	6000
cactcgggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt	6060
gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc	6120
cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgttagc atggcaacaa cgttgcgcaa	6180
actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga	6240
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt ccggttggtt ggtttattgc	6300
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga	6360
tggtaaagccc tcccgatcg tagttatctc cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga	6420
acgaaataga cagatcgctg agatagggtc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga	6480
ccaagttaac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat	6540
ctaggtgaag atcctttttg ataactcat gacaaaaac ccttaacgtg agttttcgtt	6600

ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct	6660
gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc	6720
ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc	6780
aaatactgtc ctcttagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc	6840
gcctacatac ctgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc	6900
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg	6960
aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata	7020
cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta	7080
tccggtaacg ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc	7140
ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg	7200
atgctcgta gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt	7260
cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gtcttttct gcgttatccc ctgattctgt	7320
ggataaccgt attaccgct ttgagtgagc tgataccgt cgccgcagcc gaacgaccga	7380
gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc	7440
cgcgcgttgg ccgattcatt aatg	7464