



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0138388
(43) 공개일자 2022년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7029292
(22) 출원일자(국제) 2021년02월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/016713
(87) 국제공개번호 WO 2021/158850
국제공개일자 2021년08월12일
(30) 우선권주장
62/970,401 2020년02월05일 미국(US)

(71) 출원인
메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275
(72) 발명자
다니안 앤서니
미국 뉴욕주 10022 뉴욕 이스트 60번 스트리트
303 아파트먼트 12C
브렌트젠스 레니어 제이.
미국 뉴저지주 07078 쇼트 힐즈 올드 쇼트 힐즈
로드 140
(74) 대리인
특허법인태평양

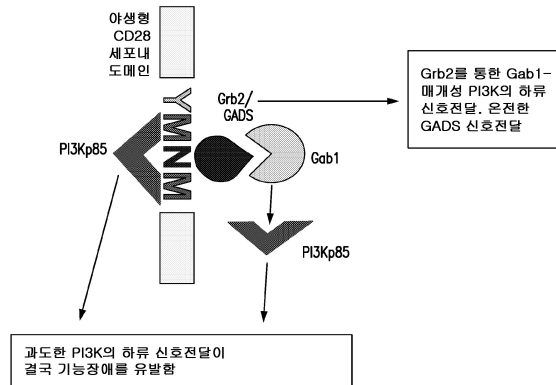
전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 CD28 돌연변이를 갖는 키메라 항원 수용체 및 그의 용도

(57) 요약

본 개시는 암 및 병원체를 향한 면역 반응을 향상시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 이것은 돌연변이된 CD28 세포내 모티프를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR), 및 이러한 CAR을 포함하는 세포에 관한 것이다. 또한, 본 개시된 주제는 질환을 치료하기 위한, 예컨대 암을 치료하기 위한 상기 세포의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/001112 (2018.08)

A61P 31/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

세포외 항원-결합 도메인, 막통과 도메인, 및 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 적어도 하나의 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 CD28 폴리펩티드는 자연형 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 분자와 비교할 때 포스포이노시타이드 3-키나아제(PI3K)의 p85 서브유닛의 모집이 감소된 것인 CAR.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

PI3K의 p85 서브유닛은 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합하지 않는 CAR.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YxNx(서열번호 21)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지고, 여기서 x는 메티오닌(M)이 아닌 CAR.

청구항 5

청구항 3 또는 청구항 4에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YENV(서열번호 22), YSNV(서열번호 23), YKNL(서열번호 24), YENQ(서열번호 25), YKNI(서열번호 26), YINQ(서열번호 27), YHNC(서열번호 28), YVNQ(서열번호 29), YLNP(서열번호 30), YLNT(서열번호 31), YDND(서열번호 66), YENI(서열번호 67), YENL(서열번호 68), YKNQ(서열번호 72), YKNV(서열번호 73), 또는 YANG(서열번호 87)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 6

청구항 3 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YSNV(서열번호 23), YENV(서열번호 22), 또는 YKNI(서열번호 26)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 7

청구항 3 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YSNV(서열번호 23)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 8

청구항 3 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 성장 인자 수용체 결합 수용체 2(Grb2) 및/또는 Shc 하류의 Grb2-관련 어댑터(GADS)에 결합하는 CAR.

청구항 9

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 Grb2 및/또는 GADS에 결합하지 않는 CAR.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMxM(서열번호 20)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지고, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아닌 CAR.

청구항 11

청구항 9 또는 청구항 10에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMDM(서열번호 32), YMPM(서열번호 79), YMRM(서열번호 37), 또는 YMSM(서열번호 80)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 12

청구항 9 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMDM(서열번호 32)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 13

청구항 9에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YbxM(서열번호 33)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아닌 CAR.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YTHM(서열번호 34), YVLM(서열번호 35), YIAM(서열번호 36), YVEM(서열번호 83), YVKM(서열번호 85), 또는 YVPM(서열번호 86)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 15

청구항 9에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMxb(서열번호 65)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아닌 CAR.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMAP(서열번호 77)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 17

청구항 9 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

PI3K 신호전달의 p85 서브유닛은 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합하는 CAR.

청구항 18

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 Grb2 및/또는 GADS 또는 PI3K의 p85 서브유닛에 결합하지 않는 CAR.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

상기 돌연변이된 YMNM 모티프는 Ybxb(서열번호 43)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아닌 CAR.

청구항 20

청구항 19에 있어서,

상기 돌연변이된 YMNM 모티프는 YGGG(서열번호 44), YAAA(서열번호 45), YFFF(서열번호 46), YETV(서열번호 69), YQQQ(서열번호 70), YHAE(서열번호 71), YLDL(서열번호 74), YLIP(서열번호 75), YLRV(서열번호 76), YTAV(서열번호 82), 또는 YVHV(서열번호 84)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 21

청구항 18 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이된 YMNM 모티프는 YGGG(서열번호 44)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 22

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 돌연변이된 YMNM 모티프는 PI3K의 p85 서브유닛에 결합할 수 있는 메티오닌 잔기의 수를 제한함으로써 PI3K 신호전달을 조절할 수 있는 CAR.

청구항 23

청구항 22에 있어서,

상기 돌연변이된 YMNM 모티프는 YMNx(서열번호 38) 또는 YxNM(서열번호 39)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지고, 여기서 x는 메티오닌(M)이 아닌 CAR.

청구항 24

청구항 22 또는 청구항 23에 있어서,

상기 돌연변이된 YMNM 모티프는 YMNv(서열번호 40), YENM(서열번호 41), 및 YMNQ(서열번호 42), YMNl(서열번호 78), 또는 YSNM(서열번호 81)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 25

청구항 1 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포의 항원-결합 도메인은 항원에 결합하는 CAR.

청구항 26

청구항 25에 있어서,

상기 항원은 종양 항원 또는 병원체 항원인 CAR.

청구항 27

청구항 25 또는 청구항 26에 있어서,

상기 항원은 종양 항원인 CAR.

청구항 28

청구항 27에 있어서,

상기 종양 항원은 CD19, 메소텔린, AXL, TIM3, HVEM, MUC16, MUC1, CA1X, CEA, CD8, CD7, CD10, CD20, CD22, CD30, CLL1, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD70, CD74, CD99, CD123, CD133, CD138, EGP-2,

EGP-40, EpCAM, Erb-B, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 폴레이트 수용체- α , GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R- α 2, κ -경쇄, KDR, LeY, L1 세포 부착 분자, MAGE-A1, MAGEA3, CT83(KK-LC-1로도 알려짐), p53, MART1, GP100, 프로티나아제3(PR1), 티로시나아제, 서비빈, hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 종양태아 항원(h5T4), PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2, WT-1, BCMA, CD44V6, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, ADGRE2, CCR1, LILRB2, PRAME, HPV E6 종양단백질, 및 HPV E7 종양단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 CAR.

청구항 29

청구항 28에 있어서,

상기 종양 항원은 CD19인 CAR.

청구항 30

청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMDM(서열번호 32)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 31

청구항 30에 있어서,

상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합하는 CAR.

청구항 32

청구항 31에 있어서,

상기 CAR은 서열번호 51에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

청구항 33

청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YKNI(서열번호 26)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 34

청구항 33에 있어서,

상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합하는 CAR.

청구항 35

청구항 34에 있어서,

상기 CAR은 서열번호 55에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

청구항 36

청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YENV(서열번호 22)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 37

청구항 36에 있어서,

상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합하는 CAR.

청구항 38

청구항 37에 있어서,

상기 CAR은 서열번호 53에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

청구항 39

청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,
상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YSNV(서열번호 64)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 40

청구항 39에 있어서,
상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합하는 CAR.

청구항 41

청구항 40에 있어서,
상기 CAR은 서열번호 57에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

청구항 42

청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,
상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YGGG(서열번호 63)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지는 CAR.

청구항 43

청구항 42에 있어서,
상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합하는 CAR.

청구항 44

청구항 43에 있어서,
상기 CAR은 서열번호 61에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 CAR.

청구항 45

청구항 1 내지 청구항 44 중 어느 한 항의 CAR을 포함하는 세포.

청구항 46

청구항 45에 있어서,
상기 세포는 면역반응성 세포인 세포.

청구항 47

청구항 45 또는 청구항 46에 있어서,
상기 세포는 림프 계통의 세포 또는 골수 계통의 세포인 세포.

청구항 48

청구항 45 내지 청구항 47 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 및 림프 세포로 분화될 수 있는 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포.

청구항 49

청구항 45 내지 청구항 48 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 T 세포인 세포.

청구항 50

청구항 48 또는 청구항 49에 있어서,

상기 T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), $\gamma \delta$ T 세포, 종양-반응성 림프구, 종양-침윤 림프구(TIL), 조절성 T 세포, 및 자연 살해 T(NKT) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포.

청구항 51

청구항 45 내지 청구항 50 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 조성물.

청구항 52

청구항 51에 있어서,

약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는 약학적 조성물인 조성물.

청구항 53

청구항 51 또는 청구항 52에 있어서,

신생물 또는 종양, 및/또는 병원체 감염을 치료 및/또는 예방하기 위한 것인 조성물.

청구항 54

대상체에게 청구항 45 내지 청구항 50 중 어느 한 항의 세포 또는 청구항 51 내지 청구항 53 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 종양 부담을 감소시키는 방법.

청구항 55

청구항 54에 있어서,

상기 방법은 대상체에서 종양 세포의 수를 감소시키거나, 종양의 크기를 감소시키거나, 및/또는 종양을 근절하는 것인 방법.

청구항 56

대상체에게 청구항 45 내지 청구항 50 중 어느 한 항의 세포 또는 청구항 51 내지 청구항 53 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 신생물 또는 종양을 치료 및/또는 예방하는 방법.

청구항 57

대상체에게 청구항 45 내지 청구항 50 중 어느 한 항의 세포 또는 청구항 51 내지 청구항 53 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 신생물 또는 종양을 갖는 대상체의 생존을 연장시키는 방법.

청구항 58

청구항 54 내지 청구항 57 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신생물 및/또는 종양은 B 세포 백혈병, B 세포 림프종, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 혼합-표현형 급성 백혈병(MPAL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 59

세포 내로 청구항 1 내지 청구항 44 중 어느 하나 항의 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 도입하는 단계를 포함하는, 항원-특이적 세포를 생산하기 위한 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서,

상기 핵산 분자는 벡터 상에 존재하는 방법.

청구항 61

청구항 60에 있어서,

상기 벡터는 레트로바이러스 벡터인 방법.

청구항 62

청구항 1 내지 청구항 44 중 어느 한 항의 CAR을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 63

청구항 62에 있어서,

상기 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56, 또는 서열번호 58로 나타내는 핵산 분자.

청구항 64

청구항 62 또는 청구항 63의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 65

청구항 64에 있어서,

상기 벡터는 γ -레트로바이러스 벡터인 벡터.

청구항 66

청구항 64 또는 청구항 65의 핵산 분자를 발현하는 숙주 세포.

청구항 67

청구항 66에 있어서,

상기 숙주 세포는 T 세포인 숙주 세포.

청구항 68

청구항 1 내지 청구항 44 중 어느 한 항의 CAR, 청구항 35 내지 청구항 40 중 어느 한 항의 세포, 청구항 51 내지 청구항 53 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 62 또는 63의 핵산 분자, 또는 청구항 64 또는 65의 벡터를 포함하는 키트.

청구항 69

청구항 68에 있어서,

상기 키트는 신생물, 종양, 및/또는 병원체 감염을 치료 및/또는 예방하기 위한 기록된 설명서를 추가로 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되고 이에 대한 우선권이 주장되는 2020년 2월 5일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/970,401에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출되었고 그 전체 내용이 인용에 의해 통합되는 서열 목록을 포함한다. 2021년 2월 4일에 생성된 상기 ASCII 사본은 072734.1189_ST25.txt"로 명명되며, 그 크기는 70,968 바이트이다.

[0005] **1. 기술분야**

[0006] 본 개시는 암 및 병원체를 향한 면역 반응을 향상시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 이것은 돌연변이된 CD28 세포내 모티프(motif), 즉 돌연변이된 YMMN 모티프를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다. 본 개시된 주제는 또한 상기 CAR을 포함하는 세포 및 상기 세포를 포함하는 조성물, 및 질환을 치료하기 위한, 예컨대 암을 치료하기 위한 상기 세포 및 조성물의 용도를 제공한다.

배경 기술

[0007] **2. 배경기술**

[0008] 세포-기반 면역치료법은 암의 치료에 대한 치유적 잠재력을 갖는 치료법이다. T 세포 및 다른 면역 세포는 선택된 항원에 특이적이고 키메라 항원 수용체(CAR)라 불리는 항원에 대한 자연형 또는 변형된 T 세포 수용체(TCR) 또는 합성 수용체를 코딩하는 유전 물질을 도입함으로써 중앙 항원을 표적화하기 위해 변형될 수 있다. 환자-조작된(engineered) CAR T 세포는 다양한 액형 및 고형 악성물에 대한 현저한 효능을 실증하였다.

[0009] 임상에서 사용되고 전임상 개발 중인 CAR은 CD28 또는 4-1BB와 같은 공동-자극성 신호전달 도메인(signaling domain)을 우세하게 이용한다. CD28은 공동자극성 분자로서의 그 역할을 통해 T 세포 활성화에 핵심적인 역할을 하는 막통과 단백질이며, CD28-기반 CAR 구조체(construct)의 일체화 부분이다. 상기 CAR의 지속성(persistence), 특히 기능적 지속성은 더 나은 결과와 연관된 것으로 나타났다. 기존의 CAR과 비교할 때 향상된 증식 및 지속성을 갖거나, 및/또는 개선된 효율 및 활성을 갖는 개선된 CAR에 대한 충족되지 않은 필요성이 있다.

발명의 내용

[0010] **3. 발명의 요약**

[0011] 본 개시된 주제는 돌연변이된 CD28 세포내 모티프, 즉 돌연변이된 YMMN 모티프를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다.

[0012] 본 개시는 세포의 항원-결합 도메인, 막통과 도메인, 및 돌연변이된 YMMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 적어도 하나의 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다.

[0013] 소정 구현예에서, 상기 CD28 폴리펩티드는 자연형 YMMN 모티프를 포함하는 CD28 분자와 비교할 때 포스포이노시타이드 3-키나아제(PI3K)의 p85 서브유닛의 모집(recruitment)이 감소하였다. 소정 구현예에서, PI3K의 p85 서브유닛은 상기 돌연변이된 YMMN 모티프에 결합하지 않는다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YxNx(서열번호 21)로 나타난 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YENV(서열번호 22), YSNV(서열번호 23), YKNL(서열번호 24), YENQ(서열번호 25), YKNI(서열번호 26), YINQ(서열번호 27), YHNK(서열번호 28), YVNQ(서열번호 29), YLNP(서열번호 30), YLNT(서열번호 31), YDND(서열번호 66), YENI(서열번호 67), YENL(서열번호 68), YKNQ(서열번호 72), YKNV(서열번호 73), 또는 YANG(서열번호 87)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YSNV(서열번호 23), YENV(서열번호 22), 또는 YKNI(서열번호 26)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YSNV(서열번호 23)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 성장 인자 수용체 결합 수용체 2(Grb2) 및/또는 Shc 하류의 Grb2-관련 어댑터(adaptor)(GADS)에 결합한다.

[0014] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 Grb2 및/또는 GADS에 결합하지 않는다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YmxM(서열번호 20)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YMDM(서열번호 32), YMPM(서열번호 79), YMRM(서열번호 37), 또는 YMSM(서열번호 80)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YMDM(서열번호 32)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YbxM(서열번호 33)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YTHM(서열번호 34), YVLM(서열번호 35), YIAM(서열번호 36), YVEM(서열번호 83), YVKM(서열번호 85), 또는 YVPM(서열번호 86)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YMMN 모티프는 YMxb(서열번호

65)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 cYMAP(서열번호 77)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, PI3K 신호전달의 p85 서브유닛은 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합한다.

[0015] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 Grb2 및/또는 GADS 또는 PI3K의 p85 서브유닛에 결합하지 않는다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 Ybxb(서열번호 43)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YGGG(서열번호 44), YAAA(서열번호 45), YFFF(서열번호 46), YETV(서열번호 69), YQQQ(서열번호 70), YHAE(서열번호 71), YLDL(서열번호 74), YLIP(서열번호 75), YLRV(서열번호 76), YTAV(서열번호 82), 또는 YVHV(서열번호 84)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YGGG(서열번호 44)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다.

[0016] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 PI3K의 p85 서브유닛에 결합할 수 있는 메티오닌 잔기의 수를 제한함으로써 PI3K 신호전달을 조절할 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMNx(서열번호 38) 또는 YxNM(서열번호 39)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMNV(서열번호 40), YENM(서열번호 41), 및 YMNQ(서열번호 42), YMNL(서열번호 78), 또는 YSNM(서열번호 81)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다.

[0017] 소정 구현예에서, 상기 세포의 항원-결합 도메인은 항원에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 항원은 종양 항원 또는 병원체 항원이다. 소정 구현예에서, 상기 항원은 종양 항원이다. 소정 구현예에서, 상기 종양 항원은 CD19, 메소텔린(mesothelin), AXL, TIM3, HVEM, MUC16, MUC1, CAIX, CEA, CD8, CD7, CD10, CD20, CD22, CD30, CLL1, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD70, CD74, CD99, CD123, CD133, CD138, EGP-2, EGP-40, EpCAM, Erb-B(예컨대, Eerb-B2, Erb-B3, Erb-B4), FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 플레이트 수용체- α , GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R- α 2, κ -경쇄, KDR, LeY, L1 세포 부착 분자, MAGE-A1, ERBB2, MAGEA3, CT83(KK-LC-1로도 알려짐), p53, MART1, GP100, 프로티나아제3(PR1), 티로시나아제, 서비빈(Survivin), hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 종양태아 항원(h5T4), PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2, WT-1, BCMA, CD44V6, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, ADGRE2, CCR1, LILRB2, PRAME, HPV E6 종양단백질, 및 HPV E7 종양단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 종양 항원은 CD19이다.

[0018] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMDM(서열번호 32)으로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 서열번호 51에 나타낸 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YKNI(서열번호 26)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 서열번호 55에 나타낸 아미노산 서열을 포함한다.

[0020] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YENV(서열번호 22)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 서열번호 53에 나타낸 아미노산 서열을 포함한다.

[0021] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YSNV(서열번호 64)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 서열번호 57에 나타낸 아미노산 서열을 포함한다.

[0022] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YGGG(서열번호 63)로 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 세포의 항원-결합 도메인은 CD19에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 서열번호 61에 나타낸 아미노산 서열을 포함한다.

[0023] 본 개시된 주제는 또한 본 명세서에 기술된 CAR을 포함하는 세포를 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 면역반응성 세포이다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 림프 계통(lymphoid lineage)의 세포 또는 골수 계통(myeloid lineage)의 세포이다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 및 림프 세포로 분화될 수 있는 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. 소정 구현예에서, 상기 T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), γ δ T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 조절성 T 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 및 종양-반응성 림프구로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0024] 아울러, 본 개시된 주제는 본 명세서에 기술된 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 조

성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는 약학적 조성물이다. 소정 구현예에서, 상기 조성물은 신생물(neoplasm), 및/또는 병원체 감염을 치료 및/또는 예방하기 위한 것이다.

- [0025] 본 개시된 주제는 대상체에서 종양 부담(burden)을 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 방법은 상기 대상체에게 본 명세서에 기술된 세포, 또는 본 명세서에 기술된 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 방법은 상기 대상체에서 종양 세포의 수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고, 및/또는 종양을 근절한다.
- [0026] 본 개시된 주제는 신생물을 치료 및/또는 예방하는 방법을 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 방법은 대상체에게 본 명세서에 기술된 세포, 또는 본 명세서에 기술된 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0027] 본 개시된 주제는 신생물을 갖는 대상체의 생존을 연장시키는 방법을 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 방법은 대상체에게 본 명세서에 기술된 세포, 또는 본 명세서에 기술된 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0028] 소정 구현예에서, 상기 신생물 및/또는 종양은 B 세포 림프종, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비-호지킨(Hodgkin) 림프종, 버킷(Burkitt) 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 혼합-표현형(Mixed-phenotype) 급성 백혈병(MPAL)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0029] 본 개시된 주제는 항원-특이적 세포를 생산하기 위한 방법을 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 방법은 세포 내로 본 명세서에 기술된 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 핵산 서열은 벡터(vector) 상에 존재한다. 소정 구현예에서, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0030] 게다가, 본 개시된 주제는 본 명세서에 기술된 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 핵산 분자는 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56, 또는 서열번호 58에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 개시된 주제는 본 명세서에 기술된 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 벡터는 γ -레트로바이러스 벡터이다.
- [0031] 본 개시된 주제는 본 명세서에 기술된 핵산 분자를 발현하는 숙주 세포를 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 숙주 세포는 T 세포이다.
- [0032] 아울러, 본 개시된 주제는 본 명세서에 기술된 CAR, 본 명세서에 기술된 세포, 본 명세서에 기술된 조성물, 본 명세서에 기술된 핵산 분자, 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 포함하는 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 키트는 신생물 및/또는 병원체 감염을 치료 및/또는 예방하기 위한 기록된 설명서를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0033] 4. 도면의 간단한 설명

도 1은 생리학적 CD28 신호전달을 보여주는 개략도이다.

도 2는 CD28에 대한 PI3Kp85 결합을 조절하기 위한 CD28 변형을 보여주는 개략도이다.

도 3a 내지 도 3d는 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포가 소정의 CAR T 세포에 필적하는 강력한 시험관내 살상 성능을 가졌음을 보여준다. 절단된 EGFR 도메인(Etah19)을 발현하는 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 상이한 이펙터(effector):종양 비에서 GFP-ffLuciferase(NALM6g)를 발현하는 CD19+ NALM6 세포와 공동배양하였다. 24시간 후 생물발광(bioluminescence)에 의해 (비-신호전달 CAR T 세포와 비교하여) 종양 세포 용해를 측정하였다. h28Z: CD28-기반 + CD3Z 신호전달 도메인; hBBZ: 4-1BB-기반 + CD3Z 신호전달 도메인; h28h1XX: CD28-기반 + 돌연변이된 ITAM 2 및 ITAM 3을 갖는 CD3Z 신호전달 도메인; hYKNIZ: 돌연변이된 CD28-기반(YMNM->YKNI) + CD3Z 신호전달 도메인. pStimx#은 사후-자극(post-stimulation)을 나타내며, 그 수치는 사전 자극(prior stimulation)의 수를 나타낸다. 도 3a는 사후 제조의 종양 세포 용해 결과를 보여준다. 도 3b는 사후 1회 자극의 종양 세포 용해 결과를 보여준다. 도 3c는 사후 2회 자극의 종양 세포 용해 결과를 보여준다. 도 3d는 사후 4회 자극의 종양 세포 용해 결과를 보여준다.

도 4a 내지 도 4n은 돌연변이체 CD28 CAR T 세포가 발산성(divergent) 전-염증성 사이토카인 분비 프로필을 실증함을 보여준다. 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 단독으로 배양하거나, 1:1의 이펙터:종양 비에서 CD19+ NALM6 세포와 공동배양하였다. 24시간 후, 상등액을 수집하였고, 비드-기반 멀티플렉스 에세이(assay)를 사용해 사이토카인을 측정하였다. 도 4a 내지 도 4g는 공여자(donor) V로부터의 사이토카인 프로필을 보여주고, 도 4h 내지 도 4n은 공여자 IV로부터의 사이토카인 프로필을 보여준다. (도 4a, 4h) GMCSF; (도 4b, 도 4i) IFN- γ ; (도 4c, 도 4j) IL-13; (도 4d 내지 도 4k) IL-17; (도 4e 내지 도 4l) IL-9; (도 4f 내지 도 4m) IL-2; (도 4g 내

지 도 4n) TNF- α .

도 5는 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포가 반복된 항원 노출에 대한 반응시 증식에 있어서 정량적 차이가 없음을 보여준다. 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 1:5의 E:T 비 및 50,000 CAR T 세포/ μ l의 농도에서 NALM6과 공동배양하였다. 대략 5일마다, CAR T 세포를 계수하였고, 유세포 분석에 의해 특징분석하였으며, 출발 수의 종양 세포를 배양물 내에 다시 첨가하였다(화살표로 표시함).

도 6은 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포가 CD28 및 CD28-1xx CAR T 세포와 비교하여 반복된 항원 만남의 맥락에서 메모리(memory) 표현형을 유지하였음을 보여준다. 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 1:5의 E:T 비 및 50,000 CAR T 세포/ μ l의 농도에서 NALM6과 공동배양하였다. 대략 5일마다, CAR T 세포를 계수하였고, 메모리 표현형(CD62L+)에 대해 유세포 분석에 의해 특징분석하였으며, 출발 수의 NALM6 종양 세포를 배양물 내에 다시 첨가하였다(화살표로 표시함).

도 7은 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포가 CD28 및 CD28-1xx CAR T 세포와 비교하여 반복된 항원 만남의 맥락에서 상대적으로 균형잡힌 CD8:CD4 비를 유지하였음을 보여준다. 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 1:5의 E:T 비 및 50,000 CAR T 세포/ μ l의 농도에서 NALM6과 공동배양하였다. 대략 5일마다, CAR T 세포를 계수하였고, CD4/CD8 분포에 대해 유세포 분석에 의해 특징분석하였으며, 출발 수의 NALM6 종양 세포를 배양물 내에 다시 첨가하였다(화살표로 표시함).

도 8은 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포가 단일 또는 다중 활성화 이후 더 낮은 림프구분화(blastogenesis)를 실증하였음을 보여준다. CAR T 세포를 1:5의 초기 E:T에서 NALM6gL과 공동배양하였다(1회 자극, 청색). 병행하여, CAR T 세포를 총 5회 자극(12시간마다 1회 자극; 적색) 동안 동일한 양의 종양으로 반복적으로 자극하였다. 공동배양 시작 대략 10일 후, 크기/림프구분화(전방 산란(forward scatter)에 의해 평가됨)를 유세포 분석에 의해 평가하였다.

도 9a 및 **도 9b**는 공여자 A 및 B에서 단일 또는 다중 자극 9일 후 CAR T 세포에서 측정된 대사 프로필을 보여준다. 산소 소비율(OCR)(도 9a) 및 세포외 산성화율(ECAR)(도 9b)을 자극된 CAR T 세포에서 측정하였다.

도 10a 및 **도 10b**는 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포가 단일 또는 다중 자극의 상황에서 공동-억제성 분자를 더 낮은 레벨로 발현하였음을 보여준다. LAG3 및 PD1(도 10a) 및 TIM-3 및 PD1(도 10b) 발현을 단일 또는 다중 자극 하에 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포(ah19hYKNIhZ) 및 야생형 CAR T 세포(ah19h28hZ)에서 측정하였다.

도 11은 CD28-YKNI 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포가 생체내에서 표준 CD28-기반 CAR T 세포를 능가하였음을 보여준다. NCG 마우스를 10^6 NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종하였고, 4일 후 CAR T 세포로 처리하였다. 생존율을 도표로 나타내었다. CAR T 세포는 2명의 상이한 건강한 공여자로부터 유래되었다.

도 12는 CD28에 대한 변형된 PI3Kp85 및 Grb2/GADS 결합 능력을 갖는 예시적 CD28 돌연변이체를 보여주는 개략도이다.

도 13은 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포가 24시간 살상 에세이에서 필적하는 살상 성능을 실증하였음을 보여준다. 절단된 EGFR 도메인(Etah19)을 발현하는 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 상이한 이펙터:종양 비에서 GFP-ffLuciferase(NALM6gL)를 발현하는 CD19+ NALM6 세포와 공동배양하였고, 24시간 후 생물발광에 의해 (비-신호 전달 CAR T 세포와 비교하여) 종양 세포 용해를 측정하였다.

도 14는 CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포(YKNI, YENV, 및 YMDM)가 시험관내에서 표준 CD28-기반 CAR T 세포를 능가하였음을 보여준다. 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 1:5의 E:T 비 및 25,000 CAR T 세포/ μ l의 초기 농도에서 NALM6과 공동배양하였다. CAR+ 및 NALM6의 농도를 매일 측정하였고, 6일에 걸쳐서 플롯팅하였다.

도 15는 CD28 돌연변이체가 유리한 고갈(exhaustion) 면역표현형을 실증하였음을 보여준다. CAR T 세포를 1:5의 초기 E:T에서 NALM6gL과 공동배양하였다(1회 자극). 병행하여, CAR T 세포를 총 5회 자극(12시간마다 1회 자극; 적색) 동안 동일한 양의 종양으로 반복적으로 자극하였다. 공동배양 시작 대략 10일 후, 고갈 마커(TIM3 및 PD1)를 유세포 분석에 의해 평가하였다.

도 16은 1×10^6 NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종되고 상이한 CAR T 세포로 처리된 NCG 마우스의 생존 곡선을 보여준다.

도 17은 1×10^6 NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종되고 상이한 CAR T 세포로 처리된 NCG 마우스의 생존 곡선을 보여준다.

도 18은 1×10^6 NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종되고 상이한 CAR T 세포로 처리된 NCG 마우스의 생물발광 이미지를 보여준다. 생물발광은 매주 측정하였다.

도 19는 CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포가 시험관내에서 강력한 장기간의 세포독성 성능을 실증하였음을 보여준다. 인간 CD19-표적화 CAR T 세포(다이아몬드 부호를 갖는 선)를 1:15의 E:T 비에서 NALM6gL(원형 부호를 갖는 선)과 공동배양하였다. CAR⁺ T 세포 및 NALM6의 농도를 매일 측정하였고, 세포/㎖로서 7일에 걸쳐서 플롯팅하였다.

도 20은 CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포가 유리한 고갈 면역표현형을 나타내었음을 보여준다. CAR T 세포를 1:15 또는 1:30의 E:T 비에서 NALM6gL과 공동배양하였다. 5일 후, CAR T 세포에서 LAG3, TIM3 및 PD1을 포함하는 고갈 마커의 발현을 유세포 분석에 의해 평가하였다.

도 21은 CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포를 받은 NCG 마우스의 생존 곡선을 보여준다. NCG 마우스를 1×10^6 NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종하였고, 4일 후 500,000 CAR T 세포로 처리하였다. CAR T 세포는 2명의 상이한 건강한 공여자로부터 유래되었다.

도 22는 CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포를 받은 NCG 마우스의 생존 곡선을 보여준다. NCG 마우스를 1×10^6 NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종하였고, 4일 후 200,000 CAR T 세포로 처리하였다. CAR T 세포는 1명의 건강한 공여자로부터 유래되었다.

도 23은 CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포가 항원-밀도와 무관하게 시험관내에서 향상된 증식을 나타내었음을 보여준다. 인간 CD19-표적화 CD28-Yxxx 돌연변이체 CAR T 세포를 1:1의 E:T 비에서 높거나 낮은 CD19 항원 밀도를 갖는 NALM6gL과 공동배양하였다. 6일마다, CAR⁺ T 세포를 계수하였고, 총 3회 자극 동안 NALM6gL로 재자극하였다.

도 24a 내지 도 24c는 CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포가 항원에 대한 노출시 특유의 사이토카인 분비 프로필을 실증하였음을 보여준다. 인간 CD19-표적화 CD28-Yxxx 돌연변이체 CAR T 세포를 NALM6gL과 공동배양하였다. 24시간 후, 상등액을 수집하였고, 인터루킨-2(도 24a), TNF- α (도 24a), GM-CSF(도 24b), 인터페론- γ (도 24b), IL-9(도 24c), 및 IL-17(도 24c)를 포함하는 사이토카인을 루미넥스(Luminex) 비드-기반 멀티플렉스 에세이에 의해 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

5. 상세한 설명

본 개시된 주제는 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 적어도 하나의 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. 상기 CD28 폴리펩티드는 자연형 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 분자와 비교할 때 포스포이노시타이드 3-키나아제(PI3K) 신호전달의 p85 서브유닛의 모집이 감소하였다. 소정 구현예에서, PI3K 신호전달의 p85 서브유닛은 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합하지 않는다. 소정 구현예에서, PI3K 신호전달의 p85 서브유닛은 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합하지 않고, 성장 인자 수용체 결합 수용체 2(Grb2) 및/또는 Shc 하류의 Grb2-관련 어댑터(GADS)는 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합한다. 소정 구현예에서, Grb2 및/또는 GADS는 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합하지 않는다. 소정 구현예에서, Grb2 및/또는 GADS는 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합하지 않고, 및 PI3K 신호전달의 p85 서브유닛은 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합한다.

본 개시된 주제는 또한 본 개시된 CAR을 포함하는 세포(예컨대, 면역반응성 세포, 예컨대 T 세포 또는 NK 세포)를 제공한다. 본 개시된 주제는 항원을 표적화하기 위한 면역 반응을 유도 및/또는 향상시키기 위해, 및/또는 신생물 또는 종양, 및/또는 병원체 감염을 치료 및/또는 예방하기 위해 본 개시된 세포를 이용하는 방법을 추가로 제공한다. 본 개시된 주제는, 적어도 부분적으로, 자연형 CD28 세포내 모티프(즉, 자연형 YNMN 모티프)를 포함하는 CAR을 포함하는 세포와 비교할 때 돌연변이된 CD28 세포내 모티프(즉, 돌연변이된 YNMN 모티프)를 포함하는 CAR을 포함하는 세포가 향상된 항-종양 효과를 나타낸다는 발견에 기반한다.

- [0037] 본 개시된 비제한적 구현예가 본 명세서 및 실시예에 의해 기술된다.
- [0038] 제한으로서가 아니라 개시의 명확성을 위한 목적으로, 상세한 설명은 다음의 하위섹션으로 나누어진다:
- [0039] 5.1. 정의;
- [0040] 5.2. 키메라 항원 수용체(CAR);
- [0041] 5.3. 세포;
- [0042] 5.4. 조성물 및 벡터;
- [0043] 5.5. 폴리펩티드;
- [0044] 5.6. 제형물 및 투여;
- [0045] 5.7. 처리 방법; 및
- [0046] 5.8. 키트.
- [0047] **5.1. 정의**
- [0048] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 기술분야의 기술자에 의해 보통 이해되는 의미를 갖는다. 다음의 참고문헌은 본 개시된 주제에서 사용된 많은 용어의 일반적 정의를 기술자에게 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991).
- [0049] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "약" 또는 "대략"은 본 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 때의 특정 값에 대한 허용가능한 오차 범위 내를 의미하며, 부분적으로 값이 어떻게 측정 또는 결정되는지, 즉 측정 시스템의 한계에 의존할 것이다. 예를 들면, "약"은 본 기술분야의 관례에 따라 3 또는 3 초과의 표준 편차 내임을 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 해당 값의 최대 20%, 예컨대, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1%까지의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여, 상기 용어는 크기의 차수(order) 내, 예컨대 값의 5배 내 또는 2배 내를 의미할 수 있다.
- [0050] "면역반응성 세포"란 면역 반응에서 기능하는 세포 또는 이의 선조체, 또는 자손을 의미한다. 소정 구현예에서, 상기 면역반응성 세포는 림프 계통의 세포이다. 림프 계통의 세포의 비제한적 예는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, B 세포, 및 림프 세포로 분화될 수 있는 줄기 세포를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 면역반응성 세포는 골수 계통의 세포이다.
- [0051] "면역반응성 세포를 활성화한다"란 면역 반응의 개시로 귀결되는, 세포에서의 신호 전달의 유도 또는 단백질 발현에서의 변화를 의미한다. 예를 들면, CD3 사슬이 리간드 결합 및 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프(ITAM)에 반응하여 클러스터링하는 경우, 신호 전달 캐스케이드(cascade)가 생성된다. 소정 구현예에서, 내인성 TCR 또는 외인성 CAR이 항원에 결합할 때, 결합된 수용체(예컨대, CD4 또는 CD8, CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 등) 근처에서 많은 분자의 클러스터링을 포함하는 면역학적 시냅스의 형성이 일어난다. 상기 막 결합된 신호전달 분자의 클러스터링은 CD3 사슬 내에 함유된 ITAM 모티프가 인산화되는 것을 허용한다. 상기 인산화는 다시 T 세포 활성화 경로를 개시하여 궁극적으로 전사 인자, 예컨대 NF- κ B 및 AP-1을 활성화시킨다. 상기 전사 인자는 T 세포 매개된 면역 반응을 개시하기 위해 증식 및 마스터 조절인자 T 세포 단백질을 위해 IL-2 생산을 증가시키는 T 세포의 전반적 유전자 발현을 유도한다.
- [0052] "면역반응성 세포를 자극한다"란 강력하고 지속된 면역 반응을 초래하는 신호를 의미한다. 다양한 구현예에서, 이것은 면역 세포(예컨대, T-세포) 활성화 후에 일어나거나, 비제한적으로 CD28, CD137(4-1BB), OX40, CD40 및 ICOS를 포함하는 수용체를 통해 동시에 매개된다. 다중 자극 신호의 수신은 강력한 장기 T 세포 매개된 면역 반응을 증가시키기 위해 중요할 수 있다. T 세포는 신속하게 억제되고 항원에 비반응성이 될 수 있다. 상기 공동-자극 신호의 효과는 다양할 수 있지만, 이것은 일반적으로 완전하고 지속된 근절을 위해 항원에 강력하게 반응하는 장기 생존, 증식성, 및 항-아포토시스성 T 세포를 생성하기 위해 증가된 유전자 발현을 초래한다.
- [0053] 용어 "항원-인식 수용체"는, 본 명세서에서 사용될 때, 항원에 대한 그 결합에 반응하여 면역반응성 세포(예컨대, T-세포)를 활성화시킬 수 있는 수용체를 나타낸다.

- [0054] 본 명세서에서 사용될 때, "CDR"은 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역인 항체의 상보성 결정 영역 아미노산 서열로서 정의된다. 예컨대, 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)]을 참조한다. 일반적으로, 항체는 가변 영역에 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR 또는 CDR 영역을 포함한다. CDR은 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합을 위한 대부분의 접촉 잔기를 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 CDR 영역은 Kabat 시스템을 이용하여 기술된다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services (1991); NIH Publication No. 91-3242). 소정 구현예에서, 상기 CDR은 IMGT 번호지정 시스템에 따라 확인된다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "단일쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 공유 연결되어 $V_H::V_L$ 헤테로다이머를 형성하는 면역글로불린의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L) 가변 영역의 융합 단백질이다. 상기 V_H 및 V_L 은 직접 연결되거나, V_H 의 N-말단을 V_L 의 C-말단과 연결하거나, V_H 의 C-말단을 V_L 의 N-말단과 연결하는 펩티드-암호화 링커(linker)(예컨대, 10개, 15개, 20개, 25개 아미노산)에 의해 연결된다. 상기 링커는 대개 가요성을 위해 글리신이, 뿐만 아니라 가용성을 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하다.
- [0055] "링커"는, 본 명세서에서 사용될 때, 이들이 서로 연결되도록 2개 이상의 폴리펩티드 또는 핵산을 공유 부착하는 작용기(예컨대, 화학물질 또는 폴리펩티드)를 나타낸다. 본 명세서에서 사용될 때, "펩티드 링커"는 2개의 단백질을 함께 커플링하기 위해(예컨대, V_H 및 V_L 도메인을 커플링하기 위해) 사용되는 하나 이상의 아미노산을 나타낸다.
- [0056] 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고, scFv 단백질은 원래 면역글로불린의 특이성을 유지한다. 단일쇄 Fv 폴리펩티드 항체는 문헌[Huston et al., *Proc Nat Acad Sci USA* (1988);85:5879-5883]; 미국 특허 번호 5,091,513, 5,132,405 및 4,956,778; 및 미국 특허 공개 번호 20050196754 및 20050196754;에 의해 기술된 것과 같은 V_H - 및 V_L -암호화 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현될 수 있다. 억제 활성을 갖는 길항성 scFv가 기술되어 있다(Zhao et al., *Hybridoma (Larchmt)* 2008; 27(6):455-51; Peter et al., *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2013); 4(1):79-86; Shieh et al., *J Immunol* (2009);183(4):2277-85; Giomarelli et al., *Thromb Haemost* (2007);97(6):955-63; Fife et al., *J C I* (2006);116(8):2252-61; Brocks et al., *Immunotechnology* (1997); 3(3):173-84; Moosmayer et al., *Ther Immunol* (1995); 2(10):31-40). 자극 활성을 갖는 작용성 scFv가 기술되어 있다(Peter et al., *J Biol Chem* (2003); 25278(38):36740-7; Xie et al., *Nat Biotech* (1997); 15(8):768-71; Ledbetter et al., *Crit Rev Immunol* (1997);17(5-6):427-55; Ho et al., *BioChem Biophys Acta* (2003); 1638(3):257-66).
- [0057] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "친화도"는 결합 강도의 척도를 의미한다. 친화도는 항체 조합 부위 및 항원 결정기 사이의 입체화학적 피팅의 근접도, 이들 사이의 접촉 면적의 크기, 및/또는 하전된 기 및 소수성 기의 분포에 의존할 수 있다. 다양한 항원-결합 실험, 예컨대, 기능적 에세이(예컨대, 유세포 분석 에세이)를 비제한적으로 포함하는, 항원에 대한 항체의 친화도를 계산하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있다.
- [0058] 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은, 본 명세서에서 사용될 때, 면역반응성 세포를 활성화시킬 수 있는 세포내 신호전달 도메인에 융합되는 세포외 항원-결합 도메인, 및 막통과 도메인을 포함하는 분자를 나타낸다. 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 scFv를 포함한다. 상기 scFv는 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 융합으로부터 유래될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 상기 scFv는 Fab로부터 유래될 수 있다(항체 유래 대신에, 예컨대 Fab 라이브러리로부터 수득됨). 소정 구현예에서, 상기 scFv는 막통과 도메인에, 이후 세포내 신호전달 도메인에 융합된다.
- [0059] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "핵산 분자"는 관심있는 폴리펩티드를 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 이러한 핵산 분자는 내인성 핵산 서열과 100% 상동성이거나 동일할 필요는 없지만, 실질적 동일성을 나타낼 수 있다.
- [0060] "실질적으로 동일한" 또는 "실질적으로 상동성인"이란 참조 아미노산 서열(예를 들면, 본 명세서에 기술된 어느 한 아미노산 서열) 또는 참조 핵산 서열(예를 들면, 본 명세서에 기술된 어느 한 핵산 서열)과 적어도 약 50% 동일하거나 상동성임을 나타내는 폴리펩티드 또는 핵산 분자를 의미한다. 소정 구현예에서, 이러한 서열은 비교를 위해 사용되는 아미노산 서열 또는 핵산 서열과 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또

는 적어도 약 100% 동일하거나 상동성이다.

- [0061] 두 서열 사이의 동일성 백분율은 상기 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수, 및 각각의 갭의 길이를 고려하여, 상기 서열들에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수(즉, 상동성 % = 동일한 위치의 #/ 위치의 총 # $\times$ 100)이다. 서열들의 비교 및 두 서열 사이의 동일성 백분율의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0062] 서열 동일성은 서열 분석 소프트웨어(예를 들면, [Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705]의 서열 분석 소프트웨어 패키지, BLAST, BESTFIT, GAP, 또는 PILEUP/PRETTYBOX 프로그램)를 이용해 측정될 수 있다. 이러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실, 및/또는 다른 변형에 상동성의 정도를 할당함으로써 동일하거나 유사한 서열을 매칭한다. 보존적 치환은 전형적으로 하기 그룹 내의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소루이신, 루이신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 동일성의 정도를 결정하는 것에 대한 예시적 접근법에서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있고, e^{-3} 내지 e^{-100} 의 확률 점수는 밀접하게 연관된 서열임을 시사한다.
- [0063] 두 아미노산 서열 사이의 상동성 또는 동일성 백분율은 PAM120 가중치 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 이용하여, ALIGN 프로그램(버전 2.0) 내에 통합된 E. Meyers 및 W. Miller(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))의 알고리즘을 이용해 결정될 수 있다. 게다가, 두 아미노산 서열 사이의 상동성 또는 동일성 백분율은 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 가중치, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 이용하여 GCG 소프트웨어 패키지(www.gcg.com에서 이용가능함) 내 GAP 프로그램 내에 통합된 Needleman 및 Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 이용해 결정될 수 있다.
- [0064] 부가적으로 또는 대안적으로, 본 개시된 주제의 아미노산 서열은, 예를 들면, 관련된 서열을 확인하기 위해, 공공 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "쿼리 서열"로서 추가로 이용될 수 있다. 이러한 검색은 문헌 [Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10]의 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 이용해 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 명세서에 개시된 특정된 서열(예컨대, scFv m903, m904, m905, m906, 및 m900의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열)과 상동성인 아미노산 서열을 수득하기 위해 XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 단어 길이 = 3으로 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭을 포함하는(gapped) 정렬을 수득하기 위하여, Gapped BLAST가 문헌 [Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402]에 기술된 것과 같이 사용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때, 해당 프로그램(예컨대, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 파라미터가 이용될 수 있다.
- [0065] "유효량"은 치료시 유익한 또는 원하는 임상 결과에 영향을 미치기에 충분한 양이다. 유효량은 하나 이상의 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 소정 구현예에서, 유효량은 질환의 진행을 억제하거나, 완화하거나, 안정화시키거나, 되돌리거나, 늦추거나, 달리 질환의 병리학적 결과를 감소시키기에 충분한 양일 수 있다. 상기 유효량은 사례별 기준으로 내과 의사에 의해 결정될 수 있고, 본 기술분야의 기술자의 역량 이내이다. 유효량을 달성하기 위한 적절한 복용량을 결정할 때 몇몇 인자가 전형적으로 고려된다. 이들 인자는 대상체의 연령, 성별 및 체중, 치료되는 증상, 증상의 중증도 및 투여되는 세포의 형태 및 유효 농도를 포함한다.
- [0066] "조절한다"란 긍정적으로 또는 부정적으로 변경함을 의미한다. 예시적인 조절은 약 1%, 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 50%, 약 75%, 또는 약 100% 변화를 포함한다.
- [0067] "증가시킨다"란 적어도 약 5%만큼 긍정적으로 변경하는 것을 의미한다. 변경은 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 100% 이상만큼일 수 있다.
- [0068] "감소시킨다"란 적어도 약 5%만큼 부정적으로 변경하는 것을 의미한다. 변경은 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75%, 또는 심지어 약 100%만큼일 수 있다.
- [0069] 용어 "단리된", "정제된", 또는 "생물학적으로 순수한"은 그 천연 상태에서 발견될 때 이에 정상적으로 수반되는 성분이 다양한 정도로 없는 물질을 나타낸다. "단리하다"는 원래의 공급원 또는 주변으로부터의 분리의 정도를 나타낸다. "정제한다"는 단리보다 더 높은 분리의 정도를 나타낸다. "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한" 단백질은 임의의 불순물이 단백질의 생물학적 특성에 물질적으로 영향을 미치거나 다른 유해 결과를 초래하지 않도록 다른 물질이 충분히 없다. 즉, 핵산 또는 펩티드는 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 때 이것에 세포성 물질, 바이러스 물질, 또는 배양 배지, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 잔구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로

로 없다면 정제된 것이다. 순도 및 동질성은 전형적으로 분석 화학 기술, 예를 들면, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용해 결정된다. 용어 "정제된"은 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 생성함을 나타낼 수 있다. 변형, 예를 들면, 인산화 또는 글리코실화를 거칠 수 있는 단백질의 경우, 상이한 변형은 상이한 단리된 단백질을 생성할 수 있고, 이는 별도로 정제될 수 있다.

[0070] "단리된 세포"란 세포에 자연적으로 수반되는 분자적 및/또는 세포성 성분으로부터 분리된 세포를 의미한다.

[0071] 용어 "항원-결합 도메인"은, 본 명세서에서 사용될 때, 세포 상에 존재하는 특정 항원 결정기 또는 항원 결정기의 세트에 특이적으로 결합할 수 있는 도메인을 나타낸다.

[0072] "신생물"이란 세포 또는 조직의 병리적 증식 및 다른 조직 또는 기관으로의 그 후속 이동 또는 침습에 의해 특징되는 질환을 의미한다. 신생물형성 성장은 전형적으로 제어되지 않고 진행성이며, 정상 세포의 증식을 일으키지 않을, 또는 그 종료를 유발할 조건 하에 일어난다. 신생물은 다양한 세포 타입, 조직, 또는 방광, 뼈, 뇌, 유방, 연골, 아교세포, 식도, 나팔관, 담낭, 심장, 내장, 신장, 간, 폐, 림프절, 신경 조직, 난소, 췌장, 전립선, 골격근, 피부, 척추, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 기관, 비뇨생식기도, 요관, 요도, 자궁, 및 질로 이루어진 군으로부터 선택되는 기관을 비제한적으로 포함하는 기관, 또는 이의 조직 또는 세포 타입에 영향을 미칠 수 있다. 신생물형성은 암, 예컨대 육종, 암종, 또는 형질세포종(형질 세포의 악성 종양)을 포함한다.

[0073] "신호 서열" 또는 "리더(leader) 서열"이란 분비 경로로의 진입을 지향하는 새롭게 합성된 단백질의 N-말단에 존재하는 펩티드 서열(예컨대, 5, 10, 15, 20, 25 또는 30개 아미노산)을 의미한다.

[0074] 용어 "포함한다", "포함하는"은 미국 특허법에서 이들에게 부여되는 넓은 의미를 갖는 것을 의도하며, "포함된다", "포함되는" 등을 의미할 수 있다.

[0075] 본 명세서에서 사용될 때, "치료"는 치료받는 개체 또는 세포의 질환 경과를 변경하려는 시도의 임상적 개입을 나타내며, 예방을 위해 또는 임상 병리의 경과 동안 수행될 수 있다. 치료의 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발의 예방, 징후의 경감, 질환의 임의의 직접적이거나 간접적인 병리적 결과의 축소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 완화 또는 억제, 및 진정 또는 개선된 예후를 비제한적으로 포함한다. 질환 또는 장애의 진행을 예방함으로써, 치료는 영향받거나 진단받은 대상체 또는 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체에서 장애로 인한 저하를 예방할 수 있지만, 또한 치료는 장애에 대한 위험이 있거나 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체에서의 장애 또는 장애의 징후의 개시를 예방할 수 있다.

[0076] 본 명세서에서 "개체" 또는 "대상체"는 척추동물, 예컨대 인간 또는 비-인간 동물, 예를 들면, 포유동물이다. 포유동물은 인간, 영장류, 농장 동물, 스포츠 동물, 설치류 및 반려동물을 비제한적으로 포함한다. 비-인간 동물 대상체의 비제한적 예는 마우스, 래트, 햄스터, 및 기니 피그와 같은 설치류; 토끼; 개; 고양이; 양; 돼지; 염소; 소; 말; 및 유인원 및 원숭이와 같은 비-인간 영장류를 포함한다. 용어 "면역손상된"은, 본 명세서에서 사용될 때, 면역결핍을 갖는 대상체를 나타낸다. 상기 대상체는 보통 건강한 면역 시스템을 갖는 인간에서는 질환을 유발하지 않지만, 불량하게 기능하거나 저해된 면역 시스템을 갖는 인간에게는 영향을 미칠 수 있는 유기체에 의해 유발되는 감염인 기회 감염에 매우 취약하다.

[0077] 본 개시된 주제의 다른 측면은 다음의 개시에서 기술되며 본 개시된 주제의 범위 이내이다.

[0078] 5.2. 키메라 항원 수용체(CAR)

[0079] 소정 구현예에서, 본 개시는 세포의 항원-결합 도메인, 막통과 도메인, 및 돌연변이된 CD28 세포내 모티프, 즉 돌연변이된 YMN motif를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 적어도 하나의 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다.

[0080] CAR은 조작된 수용체이며, 면역 이펙터 세포 상에 관심있는 특이성을 그래프트(graft)하거나 부여한다. CAR은 T 세포 상에 단일클론 항체의 특이성을 그래프트하기 위해 사용될 수 있다; 그 코딩 서열의 전달은 레트로바이러스 벡터에 의해 용이하게 된다.

[0081] 3개 세대의 CAR이 존재한다. "제1 세대" CAR은 전형적으로 세포의 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)으로 구성되고, 이것은 막통과 도메인에 융합되며, 이것은 세포질/세포내 신호전달 도메인에 융합된다. "제1 세대" CAR은 새로운 항원 인식을 제공하고 HLA-매개성 항원 제시와 무관하게, 단일 융합 분자 내에서 그 CD3ζ 사슬 신호전달 도메인을 통해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 모두의 활성화를 유발할 수 있다. "제2 세대" CAR은 다양한 공동-자극 분자(예컨대, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40) 유래의 세포내 신호전달 도메인을 CAR의 세포질 꼬리에 부가하여 T 세포

에 추가 신호를 제공한다. "제2 세대" CAR은 공동-자극(예컨대, CD28 또는 4-1BB) 및 활성화(CD3 ζ) 모두를 제공하는 것들을 포함한다. "제3 세대" CAR은 다중 공동-자극(예컨대, CD28 및 4-1BB) 및 활성화(CD3 ζ)를 제공하는 것들을 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 항원-인식 수용체는 제2 세대 CAR이다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 항원에 결합하는 세포의 항원-결합 도메인, 막통과 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 상기 세포내 신호전달 도메인은 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 힌지(hinge)/스페이스(spacer) 영역을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 항원-인식 수용체는 다중 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하는 제3 세대 CAR이다.

[0082] 소정 구현예에서, 상기 CAR은 세포의 항원-결합 도메인, 막통과 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 세포의 항원-결합 도메인은 종양 항원 또는 병원체 항원일 수 있는 항원에 특이적으로 결합한다.

[0083] 5.2.1. 항원

[0084] 소정 구현예에서, 상기 CAR은 종양 항원 또는 병원체 항원에 결합한다.

[0085] 소정 구현예에서, 상기 CAR은 종양 항원에 결합한다. 임의의 종양 항원(예컨대, 항원성 펩티드)이 본 명세서에 기술된 종양-관련 구현예에서 사용될 수 있다. 항원의 공급원은 암 단백질을 비제한적으로 포함한다. 상기 항원은 펩티드로서 또는 온전한 단백질 또는 그의 일부로서 발현될 수 있다. 상기 온전한 단백질 또는 그의 일부는 자연형이거나 돌연변이될 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 항원은 종양 조직에서 발현된다. 종양 항원의 비제한적 예는 메소텔린, AXL, TIM3, HVEM, CD19, MUC16, MUC1, CAIX, CEA, CD8, CD7, CD10, CD20, CD22, CD30, CLL1, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD70, CD74, CD99, CD123, CD133, CD138, EGP-2, EGP-40, EpCAM, Erb-B(예컨대, Erb-B2, Erb-B3, Erb-B4), FBP, 태아 아세틸콜린 수용체(AChR), 플레이트 수용체- α , GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R- α 2, κ -경쇄, KDR, LeY, L1 세포 부착 분자, MAGE-A1, MAGEA3, CT83(KK-LC-1로도 알려짐), p53, MART1, GP100, 프로티나아제3(PR1), 티로시나아제, 서비빈, hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 종양태아 항원(h5T4), PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2, WT-1, BCMA, CD44V6, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, ADGRE2, CCR1, LILRB2, PRAME, HPV E6 종양단백질, 및 HPV E7 종양단백질을 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 종양 항원은 CD19이다.

[0086] 소정 구현예에서, 상기 CAR은 CD19 폴리펩티드에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 인간 CD19 폴리펩티드에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 인간 CD19 폴리펩티드는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함한다. 서열번호 1은 아래에 제공된다.

[0087] PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQGPPESEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGLGCGLNRSSEGPSKGLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLSQDLTMAGSTLWLSGVPDPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMVWMETGLLLPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWK [서열번호 1]

[0088] 소정 구현예에서, 상기 CAR은 CD19(예컨대, 인간 CD19)의 세포외 도메인에 결합한다.

[0089] 소정 구현예에서, 상기 CAR은, 예컨대 병원체 감염 또는 다른 감염성 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위하여 병원체 항원에 결합한다. 병원체의 비제한적 예는 질환을 유발할 수 있는 바이러스, 박테리아, 진균, 기생충 및 원생동물을 포함한다.

[0090] 바이러스의 비제한적인 예는 레트로비리대(Retroviridae)(예컨대, 인간 면역결핍 바이러스, 예컨대 HIV-1(또한 HDTV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III으로도 나타냄; 및 다른 단리물, 예컨대 HIV-LP; 피코르나비리대(Picornaviridae)(예컨대, 소아마비 바이러스, A형 간염 바이러스; 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 에코바이러스); 칼시비리대(Calciviridae)(예컨대, 위장염을 유도하는 균주); 토가비리대(Togaviridae)(예컨대, 말 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비리대(Flaviridae)(예컨대, 뎅기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로노비리대(Coronaviridae)(예컨대, 코로나바이러스); 라브도비리대(예컨대, 소수포 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로비리대(Filoviridae)(예컨대, 에볼라 바이러스); 파라믹소비리대(Paramyxoviridae)(예컨대, 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 융합 바이러스); 오르소믹소비리대(Orthomyxoviridae)(예컨대, 인플루엔자 바이러스); 분가비리대(Bungaviridae)(예컨대, 한탄 바이러스, 분가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이라 바이러스); 아레나 비리대(Arena viridae)(출혈열 바이러스); 레오비리대(Reoviridae)(예컨대, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 버나비리대(Birnaviridae); 헤파드나비리대(Hepadnaviridae)(B형 간염 바이러스); 파르보비리다(Parvovirida)(파르보바이러스); 파포바비리대(Papovaviridae)(유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리대(Adenoviridae)(대부

분의 아테노바이러스); 헤르페스비리대(*Herpesviridae*)(헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV) 1 및 2, 바리셀라 조스터 바이러스, 사이토메갈로바이러스(CMV), 헤르페스 바이러스; 폭스비리대(*Poxviridae*)(바리올라 바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스 바이러스); 및 이리도비리대(*Iridoviridae*)(예컨대, 아프리카 돼지열 바이러스); 및 미분류 바이러스(예컨대, 델타 간염 제제(B형 간염 바이러스의 결합성 위성으로 여겨짐), 비-A, 비-B 간염 제제(클래스 1 = 내부 전파됨; 클래스 2 = 부모로부터 전파됨(즉, C형 간염); 노워크 및 관련된 바이러스, 및 아스트로바이러스), 인간 파필로마 바이러스(즉, HPV), JC 바이러스, 엡스테인 바 바이러스, 메르켈 세포 폴리오마 바이러스를 포함한다.

[0091] 박테리아의 비제한적 예는 파스퇴렐라(*Pasteurella*), 스타필로코사이(*Staphylococci*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas species*), 및 살모넬라 종(*Salmonella species*)을 포함한다. 감염성 박테리아의 구체에는 헬리코박터 필로리스(*Helicobacter pylori*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borelia burgdorferi*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*), 미코박테리아 종(예컨대, 미코박테리아 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 미코박테리아 아비움(*M. avium*), 미코박테리아 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 미코박테리아 칸사이이(*M. kansasii*), 미코박테리아 고르도나(*M. gordonae*)), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 나이세리아 고노로에애(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)(그룹 A 스트렙토코커스), 스트렙토코커스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*)(그룹 B 스트렙토코커스), 스트렙토코커스(비리단스(*viridans*) 그룹), 스트렙토코커스 패칼리스(*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코커스 보비스(*Streptococcus bovis*), 스트렙토코커스(혐기성 종), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 병원성 캄필로박터(*Campylobacter*) 종, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 종, 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 코리네박테리움 디프테리애(*corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움(*corynebacterium*) 종, 에리시펠로트릭스 류시오파티애(*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리듐 퍼프링거스(*Clostridium perfringers*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 파스퇴렐라 멀토시다(*Pasturella multocida*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 종, 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 스트렙토바실러스 모닐리포르미스(*Streptobacillus moniliformis*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 트레포네마 퍼테누에(*Treponema pertenu*), 랩토스피라(*Leptospira*), 리케차(*Rickettsia*), 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*), 및 액티노마이세스 이스라엘리(*Actinomyces israeli*)를 비제한적으로 포함한다.

[0092] 소정 구현예에서, 상기 병원체 항원은 사이토메갈로바이러스(CMV)에 존재하는 바이러스 항원, 엡스타인 바 바이러스(EBV)에 존재하는 바이러스 항원, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)에 존재하는 바이러스 항원, 또는 인플루엔자 바이러스에 존재하는 바이러스 항원이다.

[0093] 5.2.2. CAR의 세포외 항원-결합 도메인

[0094] 소정 구현예에서, 상기 세포외 항원-결합 도메인은 scFv를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 scFv는 인간 scFv이다. 소정 구현예에서, 상기 scFv는 인간화된 scFv이다. 소정 구현예에서, 상기 scFv는 뮤린(murine) scFv이다. 소정 구현예에서, 상기 scFv는 항원-Fc 융합 단백질을 이용해 scFv 파지 라이브러리(phage library)를 스크리닝함으로써 확인된다.

[0095] 소정 구현예에서, 상기 세포외 항원-결합 도메인은 Fab를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 Fab는 가교결합된다. 소정 구현예에서, 상기 세포외 항원-결합 도메인은 F(ab)₂를 포함한다. 임의의 전술한 분자는 이중성 서열을 갖는 융합 단백질에 포함되어 세포외 항원-결합 도메인을 형성할 수 있다.

[0096] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 약 1×10^{-6} M 이하의 해리 상수(K_d)로 항원에 결합한다. 소정 구현예에서, 상기 K_d는 약 1×10^{-6} M 이하, 약 1×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 또는 약 1×10^{-9} M 이하이다. 소정 비제한적 구현예에서, 상기 K_d는 약 1×10^{-8} M 이하이다. 소정 비제한적 구현예에서, 상기 K_d는 약 1×10^{-9} M 이하이다.

[0097] 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인의 결합은, 예를 들면, 효소-연관 면역흡착 에세이(ELISA), 방사선면역에세이(RIA), FACS 분석, 생체에세이(예컨대, 성장 억제), 또는 웨스턴 블롯 에세이에 의해 확인될 수 있다. 각각의

이들 에세이는 일반적으로 관심있는 복합체에 특이적인 표지된 시약(예컨대, 항체, 또는 scFv)을 채택함으로써 특별한 관심이 있는 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들면, 상기 scFv는 방사활성으로 표지되고 방사선면역에세이(RIA)에서 사용될 수 있다(예를 들면, 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 문헌[Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986] 참조). 방사활성 동위원소는 γ 카운터 또는 신틸레이션 카운터의 사용과 같은 수단에 의해 또는 자가방사선촬영에 의해 검출될 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 세포외 항원-결합 도메인은 형광 마커로 표지된다. 형광 마커의 비제한적 예는 녹색 형광 단백질(GFP), 청색 형광 단백질(예컨대, EBFP, EBFP2, 아주라이트(Azurite), 및 mKalamal), 시안색 형광 단백질(예컨대, ECFP, 세룰리안(Cerulean), 및 CyPet), 및 황색 형광 단백질(예컨대, YFP, 시트린(Citrine), 비너스(Venus), 및 YPet)을 포함한다. 한 구현예에서, 상기 인간 scFv는 GFP로 표지된다.

[0098] 소정 구현예에서, 상기 CDR은 IMGT 번호지정 시스템에 따라 확인된다.

[0099] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지며, CD19 폴리펩티드(예컨대, 인간 CD19 폴리펩티드, 예컨대 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 인간 CD19 폴리펩티드 또는 그의 일부)에 특이적으로 결합한다.

[0100] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열과 적어도 약 80%(예컨대, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%) 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하는 V_H 를 포함한다. 예를 들면, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열과 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하는 V_H 를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H 를 포함한다. 서열번호 3은 아래의 표 1에 제공된다.

[0101] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 4에 나타난 아미노산 서열과 적어도 약 80%(예컨대, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%) 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하는 V_L 를 포함한다. 예를 들면, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 4와 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하는 V_L 를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 4에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H 를 포함한다. 서열번호 4는 아래의 표 1에 제공된다.

[0102] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H , 및 서열번호 4에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L 를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 V_H 및 V_L 는 링커를 통해 연결된다. 소정 구현예에서, 상기 링커는 서열번호 5에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 서열번호 5는 아래에 제공된다.

[0103] GGGSGGGSGGGGS [서열번호 5]

[0104] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 6에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 7에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR2, 및 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR3을 포함한다. 서열번호 6 내지 서열번호 8은 표 1에 제공된다.

[0105] 소정 구현예에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 9에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L

CDR2, 및 서열번호 11에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR3을 포함한다. 서열번호 9 내지 서열번호 11은 표 1에 제공된다.

[0106] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 6에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 7에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR2, 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_H CDR3, 서열번호 9에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR2, 및 서열번호 11에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 포함하는 V_L CDR3을 포함한다.

[0107] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포외 항원-결합 도메인(예컨대, scFv)은 서열번호 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 7에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2, 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3, 서열번호 9에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2, 및 서열번호 11에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3을 포함한다.

표 1

항원	CD19		
	1	2	3
V_H	GYAFSS [서열번호 6]	YPGDGD [서열번호 7]	KTISSVDF [서열번호 8]
V_L	NVGTNVA [서열번호 9]	SATYRN [서열번호 10]	FCQQYNRY [서열번호 11]
온전한 V_H	EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDFYFDYWGQGTITVTVSS [서열번호 3]		
온전한 V_L	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPRDFTGSGSGTDFTLTIITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR [서열번호 4]		
scFv	EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDFYFDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPRDFTGSGSGTDFTLTIITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR [서열번호 2]		

[0109] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 포함하는 본 개시된 CAR(예컨대, CAR의 세포외 항원-결합 도메인)의 결합 특징에 유의미하게 영향을 미치지거나 이를 변경하지 않는 아미노산 변형을 나타낸다. 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함할 수 있다. 변형은 본 기술분야에 알려진 표준 기술, 예컨대 위치-지정 돌연변이화 및 PCR-매개성 돌연변이화에 의해 본 개시된 CAR의 인간 scFv 내로 도입될 수 있다. 아미노산은 전하 및 극성과 같은 그 물리화학적 특성에 따라 그룹으로 분류될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 동일한 그룹 내의 아미노산으로 교체되는 것이다. 예를 들면, 아미노산은 전하에 의해 분류될 수 있다: 양으로 하전된 아미노산은 리신, 아르기닌, 히스티딘을 포함하고, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산, 글루탐산을 포함하고, 중성 전하 아미노산은 알라닌, 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 이소류이신, 루이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린을 포함한다. 게다가, 아미노산은 극성에 의해 분류될 수 있다: 극성 아미노산은 아르기닌(염기성 극성), 아스파라긴, 아스파르트산(산성 극성), 글루탐산(산성 극성), 글루타민, 히스티딘(염기성 극성), 리신(염기성 극성), 세린, 트레오닌, 및 티로신을 포함하고; 비극성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 글리신, 이소류이신, 루이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 및 발린을 포함한다. 따라서, CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 그룹 유래의 다른 아미노산 잔기로 교체될 수 있고, 변경된 항체는 본 명세서에 기술된 기능적 에세이를 이용해 보유된 기능(즉, 상기 (c) 내지 (1)에 나타난 기능)에 대해 테스트될 수 있다. 소정 구현예에서, 특정된 서열 또는 CDR 영역 내의 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하의 잔기가 변경된다.

[0110] 특정 서열(예컨대, 서열번호 3 및 서열번호 4)과 적어도 약 80%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%(예컨대, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99%) 상동성 또는 동일성을 갖는 V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열은 특정된 서열(들)과 비교하여 치환(예컨대, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유할 수 있지만, 표적 항원(예컨대, CD19)에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 소정 구현예에서, 총 1개

내지 10개의 아미노산이 특정 서열(예컨대, 서열번호 3 및 서열번호 4)에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 소정 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 상기 세포외 항원-결합 도메인의 CDR 바깥의 영역에서(예컨대, FR에서) 일어난다. 소정 구현예에서, 상기 세포외 항원-결합 도메인은 그 서열(서열번호 3 및 서열번호 4)의 번역-후 변형을 포함하는, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 V_H 및/또는 V_L 서열을 포함한다.

[0111] 5.2.3. CAR의 막통과 도메인

[0112] 소정 비제한적 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 적어도 막의 일부에 걸치는 소수성 알파 나선을 포함한다. 상이한 막통과 도메인은 상이한 수용체 안정성을 귀결된다. 항원 인식 후, 수용체는 클러스터링하고, 신호는 세포로 전파된다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 CD8, CD28, CD3ζ, CD4, 4-1BB, OX40, ICOS, CD84, CD166, CD8a, CD8b, ICAM-1, CTLA-4, CD27, CD40, NKG2D의 자연형 또는 변형된 막통과 도메인, 또는 이의 조합을 포함한다.

[0113] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 CD28 폴리펩티드(예컨대, CD28의 막통과 도메인 또는 그의 일부)를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 인간 CD28의 막통과 도메인 또는 그의 일부를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CD28 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_006130를 갖는 아미노산 서열(서열번호 12), 또는 그의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 CD28 폴리펩티드는 길이가 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 220개 아미노산인, 서열번호 12의 연속적 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 CD28 폴리펩티드는 서열번호 12의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 153 내지 179, 또는 200 내지 220의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 서열번호 12의 아미노산 153 내지 179를 포함하거나 이로 이루어진 CD28 폴리펩티드를 포함한다. 서열번호 12는 아래에 제공된다:

[0114] 1 MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD

[0115] 61 SAVEVCVVG NYSQQLQVYS KTGFCNDGKL GNEVTFYQL NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP

[0116] 121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR

[0117] 181 SKRSRLHSD YMNMPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [서열번호 12]

[0118] 서열번호 12의 아미노산 153 내지 179를 암호화하는 예시적 뉴클레오티드 서열은 아래에 제공되는 서열번호 13에 나타나 있다.

[0119] TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG [서열번호 13]

[0120] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 마우스 CD28의 막통과 도메인 또는 그의 일부를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CD28 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_031668.3을 갖는 서열(서열번호 14), 또는 그의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100% 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 비제한적 소정 구현예에서, 상기 CD28 폴리펩티드는 길이가 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 218개 아미노산인, 서열번호 14의 연속적 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 CD28 폴리펩티드는 서열번호 14의 아미노산 1 내지 220, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 151 내지 177, 또는 200 내지 218의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 서열번호 14의 아미노산 151 내지 177를 포함하거나 이로 이루어진 CD28 폴리펩티드를 포함한다. 서열번호 14는 아래에 제공된다:

[0121] 1 MTLRLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSLS CRYSYNLLAK EFRASLYKGV

[0122] 61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FDNFTVTFRL WNLHVNHTDI YFCKIEFMYP

[0123] 121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWTSNR

[0124] 181 NRLLQSDYM NMTPRRPGLT RKPYPYAPA RDAAYRP [서열번호 14]

- [0125] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 CD8 폴리펩티드(예컨대, CD8의 막통과 도메인 또는 그의 일부)를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 인간 CD8의 막통과 도메인 또는 그의 일부를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CD8 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_001139345.1을 갖는 서열(서열번호 15), 또는 그의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 CD8 폴리펩티드는 길이가 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 235개 아미노산인, 서열번호 15의 연속적 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 CD8 폴리펩티드는 서열번호 15의 아미노산 1 내지 235, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 137 내지 209, 또는 200 내지 235의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 서열번호 15의 아미노산 137 내지 209를 포함하거나 이로 이루어진 CD8 폴리펩티드를 포함한다. 서열번호 15는 아래에 제공된다.
- [0126] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKQCQLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLTL SDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITL YCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV [서열번호 15]
- [0127] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 마우스 CD8의 막통과 도메인 또는 그의 일부를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CD8 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: AAA92533.1을 갖는 서열(서열번호 16), 또는 그의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 CD8 폴리펩티드는 길이가 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 30개, 또는 적어도 약 40개, 또는 적어도 약 50개, 또는 적어도 약 60개, 또는 적어도 약 70개, 또는 적어도 약 100개, 또는 적어도 약 200개, 및 최대 247개 아미노산인, 서열번호 16의 연속적 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 CD8 폴리펩티드는 서열번호 16의 아미노산 1 내지 247, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 151 내지 219, 또는 200 내지 247의 아미노산 서열을 포함하거나 갖는다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 막통과 도메인은 서열번호 16의 아미노산 151 내지 219를 포함하거나 이로 이루어진 CD8 폴리펩티드를 포함한다. 서열번호 16은 아래에 제공된다.
- [0128] 1 MASPLTRFLS LNLLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS
- [0129] 61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNI TWDEKLNSSK LFSAVRDTNN KYVLTINKFS
- [0130] 121 KENEGYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTKPVLRT PSPVHPTGTS QPQRPEDCRP
- [0131] 181 RGSVKGITGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYP RSRKRVCCKP RPLVRQEGKP
- [0132] 241 RPSEKIV [서열번호 16]
- [0133] 소정 구현예에서, 상기 CAR은 세포의 항원-결합 도메인을 막통과 도메인에 연결하는 스페이스 영역을 추가로 포함한다. 상기 스페이스 영역은 항원 결합 도메인이 그 CAR의 활성화 활성을 보존하면서 항원 인식을 용이하게 하도록 상이한 방향으로 배향하는 것을 허용하기에 충분히 가요성일 수 있다.
- [0134] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 힌지/스페이스 영역은 CD8, CD28, CD3 ζ , CD40, 4-1BB, OX40, CD84, CD166, CD8a, CD8b, ICOS, ICAM-1, CTLA-4, CD27, CD40, NKG2, (면역 반응과 연관된 단백질에 기반하지 않은) 합성 폴리펩티드의 자연형 또는 변형된 힌지 영역, 또는 그의 조합을 포함한다. 상기 힌지/스페이스 영역은 IgG1 유래의 힌지 영역, 또는 면역글로불린의 CH₂CH₃ 영역 및 CD3의 일부, CD28 폴리펩티드의 일부(예컨대, 서열번호 12 또는 서열번호 14의 일부), CD8 폴리펩티드의 일부(예컨대, 서열번호 15 또는 서열번호 16의 일부), 이와 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 100% 상동성 또는 동일성인 임의의 상기의 변이형, 또는 합성 스페이스 서열일 수 있다.
- [0135] 5.2.4. CAR의 세포내 신호전달 도메인
- [0136] 소정 구현예에서, 상기 CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 폴리펩티드를 포함한다. CD3 ζ 는 세포(예컨대, 림프 계통의 세포, 예컨대, T 세포)를 활성화 또는 자극할 수 있다. 야생형("자연형") CD3 ζ 는 3개의 기능적 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAMs), 3개의 기능적 염기성-풍부 스트레치(BRS) 영역(BRS1, BRS2 및 BRS3)을 포함한다. CD3 ζ 는 항원이 결합된 후 활성화 신호를 세포(예컨대, 림프 계통의 세포, 예컨대, T 세포)에 전파한다. 상기 CD3 ζ -사슬의 세포내 신호전달

도메인은 내인성 TCR로부터의 일차 신호 전파체이다.

- [0137] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 자연형 CD3 ζ 를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 CD3 ζ 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_932170을 갖는 서열(서열번호 17), 또는 그의 단편과 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 CD3 ζ 폴리펩티드는 길이가 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 50개, 및 최대 164개 아미노산인, 서열번호 17의 연속적 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 CD3 ζ 폴리펩티드는 서열번호 17의 아미노산 1 내지 164, 1 내지 50, 50 내지 100, 52 내지 164, 100 내지 150, 또는 150 내지 164의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 17의 아미노산 52 내지 164를 포함하거나 이로 이루어진 CD3 ζ 폴리펩티드를 포함한다. 서열번호 17은 아래에 제공된다:
- [0138] 1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLDDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
- [0139] 61 APAYQQGQNQ LYNELNLGR EEYDVLDRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGY YNELQKDKMA
- [0140] 121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [서열번호 17]
- [0141] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 18에 나타난 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CD3 ζ 폴리펩티드를 포함한다. 서열번호 18은 아래에 제공된다.
- [0142] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 18]
- [0143] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공동-자극성 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 적어도 하나의 공동-자극성 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공동-자극성 분자 또는 그의 일부를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 적어도 하나의 공동-자극성 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공동-자극성 분자의 세포내 도메인 또는 그의 일부를 포함한다.
- [0144] 본 명세서에서 사용될 때, "공동-자극성 분자"는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응을 제공할 수 있는 항원 수용체 또는 그의 리간드 이외의 세포 표면 분자를 나타낸다. 소정 구현예에서, 공동-자극성 분자는 최적의 림프구 활성화를 제공할 수 있다. 공동-자극성 분자의 비제한적 예는 CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP-10, CD27, CD40, NKGD2, CD2, FN14, HVEM, LTBR, CD28H, TNFR1, TNFR2, BAFF-R, BCMA, TACI, TROY, RANK, CD40, CD27, CD30, EDAR, XEDAR, GITR, DR6, 및 NGFR, 및 이의 조합을 포함한다. 상기 공동-자극성 분자는 그 수용체에 대한 결합시 공동-자극성 반응, 즉 CAR이 그 표적 항원에 결합할 때 제공되는 자극에 영향을 미치는 세포내 반응을 생성하는 세포 표면에 발현되는 단백질인 공동-자극성 리간드에 결합할 수 있다.
- [0145] 소정 구현예에서, 상기 적어도 하나의 공동-자극성 신호전달 도메인은 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함한다.
- [0146] CD28은 공동자극성 분자로서의 그 기능을 통해 T 세포 활성화에서 핵심적인 역할을 하는 막통과 단백질이다. CD28은 또한 분화 28, Tp44, 및 CD28 분자의 클러스터로 알려져 있다. CD28은 CD28의 효과적인 신호전달을 위해 핵심적인 세포내 모티프를 포함하는 세포내 도메인을 갖고 있다. 소정 구현예에서, 상기 CD28 세포내 도메인은 TCR-자극 후 신호전달 경로를 조절하는 세포내 서브도메인("세포내 모티프"로도 알려짐)을 포함한다.
- [0147] CD28은 3개의 세포내 모티프를 포함한다: YNMN 모티프, 및 2개의 프롤린-풍부 모티프: PRRP 모티프, 및 PYAP 모티프. 상기 CD28 세포내 모티프는 그 SH2 또는 SH3 도메인을 통해 상기 모티프와 상호작용하는 다수의 어댑터 분자에 대한 도킹 부위로서 작용할 수 있다. 이러한 상호작용은 유전자 발현을 조절하는 전사 인자에서 종결되는 하류 신호를 전달한다. 예를 들면, 자연형 YNMN 모티프는 포스포이노시타이드 3-키나아제(PI3K)의 p85 서브유닛에 결합한다. 자연형 YNMN 모티프는 또한 성장 인자 수용체-결합 단백질 2(Grb2) 및/또는 Grb2-관련 어댑터 단백질 2(GADS)에 결합한다. Grb2는 Gab1 및 Gab2에 결합하고, 이것은 다시 PI3K의 p85 서브유닛을 모집할 수 있다.
- [0148] 소정 구현예에서, 자연형 YNMN 모티프는 YNMN(서열번호 19)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 자연형 YNMN 모티프는 일치(consensus) 서열 YMxM(서열번호 20)를 통해 PI3K의 p85 서브유닛에 결합하며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니다. 소정 구현예에서, 자연형 YNMN 모티프는 일치 서열 YxNx(서열번호

21)를 통해 Grb2 및/또는 GAD에 결합하며, 여기서 x는 메티오닌(M)이 아니다.

- [0149] 소정 구현예에서, 본 개시된 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드는 자연형 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 분자와 비교할 때 PI3K의 p85 서브유닛의 모집이 감소한다.
- [0150] 소정 구현예에서, 상기 PI3K의 p85 서브유닛은 상기 돌연변이된 YNMN 모티프에 결합하지 않고, 이로 인해 CD28 폴리펩티드에 대한 PI3K의 p85 서브유닛의 모집이 감소한다. PI3K의 p85 서브유닛의 결합을 차단하는 돌연변이된 YNMN 모티프는 Grb2 및/또는 GADS에 대한 그 결합을 유지한다. 따라서, Grb2/GADS의 하류 신호전달은 온전하게 남아 있으며, 예컨대 IL-2 분비를 유도하는 하류 신호전달은 온전하게 남아 있다. 이러한 돌연변이된 YNMN 모티프는 "GADS/Grb2-허용 돌연변이체"로 나타낸다.
- [0151] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN은 PI3K의 p85 서브유닛에 결합하지만, Grb2 및/또는 GADS에는 결합하지 않는다. PI3K p85의 결합이 유지되기 때문에, PI3K의 하류 신호전달은 온전하게 유지된다. Grb2/GADS의 결합이 차단되기 때문에, Gab1 및 Gab2에 대한 Grb2의 결합에 의해 촉발되는 PI3K p85 서브유닛의 모집은 감소 또는 차단된다. 게다가, Grb2/GADS의 하류 신호전달도 차단된다. 이러한 돌연변이된 YNMN 모티프는 "PI3K-허용성 돌연변이체"로 나타낸다.
- [0152] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN은 PI3K의 p85 서브유닛에 결합하지 않고, Grb2 및/또는 GADS에 결합하지 않는다. 이러한 돌연변이된 YNMN 모티프는 "비-기능성 돌연변이체"로 나타낸다. 비-기능성 돌연변이체는 YNMN 모티프에서 CD28에 대한 PI3K, Grb2, 또는 GADS의 결합을 제공하지 않지만, 상기 신호전달 분자가 CD28 분자 내의 다른 곳에 결합하는 것을 배제하지는 않는다.
- [0153] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN은 YNMN 모티프, 즉 YMxx 또는 YxxM에 존재하는 2개의 메티오닌 잔기 중 1개의 메티오닌 잔기만을 유지한다. 상기 모티프는 잠재적으로 PI3K의 p85 서브유닛에 결합할 수 있는 메티오닌 잔기의 수를 제한함으로써 PI3K를 통한 신호전달을 조절한다. 이러한 돌연변이된 YNMN 모티프는 "하이브리드(hybrid) 'HEMI' 돌연변이체"로 나타낸다.
- [0154] 5.2.4.1. GADS/Grb-2 허용 돌연변이체
- [0155] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 GADS/Grb-2 허용 돌연변이체이다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YxNx(서열번호 21)로 나타난 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, x는 아미노산 A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YENV(서열번호 22), YSNV(서열번호 23), YKNL(서열번호 24), YENQ(서열번호 25), YKNI(서열번호 26), YINQ(서열번호 27), YHNC(서열번호 28), YVNC(서열번호 29), YLNP(서열번호 30), YLNT(서열번호 31), YDND(서열번호 66), YENI(서열번호 67), YENL(서열번호 68), YKNQ(서열번호 72), YKNV(서열번호 73), 또는 YANG(서열번호 87)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YSNV(서열번호 23)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YKNI(서열번호 26)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YENV(서열번호 22)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YKNL(서열번호 24)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0156] 5.2.4.2. PI3K-허용성 돌연변이체
- [0157] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 PI3K-허용성 돌연변이체이다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMxM(서열번호 20)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니다. 소정 구현예에서, x는 아미노산 A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMDM(서열번호 32), YMPM(서열번호 79), YMRM(서열번호 37), 또는 YMSM(서열번호 80)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMDM(서열번호 32)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0158] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YbxM(서열번호 33)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, x는 아미노산 A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, b는 아미노산 A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YTHM(서열번호 34) YVLM(서열번호 35), YIAM(서열번호 36), YVEM

(서열번호 83), YVKM(서열번호 85), 또는 YVPM(서열번호 86)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.

- [0159] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMxb(서열번호 65)로 나타난 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, x는 아미노산 A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, b는 아미노산 A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMAP(서열번호 77)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0160] 소정 돌연변이된 YNMN 모티프는 [Mol Cell Proteomics. 2010 Nov;9(11):2391-404]; [Virology. 2015 May; 0: 568-577]에 기술되어 있으며, 이들 모두는 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 통합된다.
- [0161] 5.2.4.3. 하이브리드 'HEMI' 돌연변이체
- [0162] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 하이브리드 'HEMI' 돌연변이체이다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMNx(서열번호 38) 또는 YxNM(서열번호 39)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 x는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, x는 아미노산 A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMNV(서열번호 40), YENM(서열번호 41), YMNQ(서열번호 42), YMNL(서열번호 78), 또는 YSNM(서열번호 81)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0163] 5.2.4.4. 비-기능성 돌연변이체
- [0164] 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 비-기능성 돌연변이체이다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 아미노산 서열 Ybxb(서열번호 43)로 이루어지며, 여기서 x는 아스파르트산(N)이 아니고, b는 메티오닌(M)이 아니다. 소정 구현예에서, x는 A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, b는 A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y, V, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YGGG(서열번호 44), YAAA(서열번호 45), YFFF(서열번호 46), YETV(서열번호 69), YQQQ(서열번호 70), YHAE(서열번호 71), YLDL(서열번호 74), YLIP(서열번호 75), YLRV(서열번호 76), YTAV(서열번호 82), 또는 YVHV(서열번호 84)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YGGG(서열번호 44)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0165] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 YENV(서열번호 22)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 상기 CD28 폴리펩티드는 서열번호 47에 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 서열번호 47은 아래에 제공된다.
- [0166] RSKRSRLHSDYENVTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [서열번호 47]
- [0167] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 YKNI(서열번호 26)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 상기 CD28 폴리펩티드는 서열번호 48에 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 서열번호 48은 아래에 제공된다.
- [0168] RSKRSRLHSDYKNITPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [서열번호 48]
- [0169] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 YMDM(서열번호 32)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 상기 CD28 폴리펩티드는 서열번호 49에 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 서열번호 49는 아래에 제공된다.
- [0170] RSKRSRLHSDYMDMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [서열번호 49]
- [0171] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 YGGG(서열번호 44)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 상기 CD28 폴리펩티드는 서열번호 63에 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 서열번호 63은 아래에 제공된다.
- [0172] RSKRSRLHSDYGGGTTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [서열번호 63]

- [0173] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 YSNV(서열번호 23)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하며, 여기서 상기 CD28 폴리펩티드는 서열번호 64에 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 서열번호 64는 아래에 제공된다.
- [0174] RSKRSRLHSDYSNVTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [서열번호 64]
- [0175] 소정 구현예에서, 상기 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 (본 명세서에 개시된 것과 같은) 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 제1 공동-자극성 신호전달 도메인, 및 공동-자극성 분자의 세포내 도메인을 포함하는 제2 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 공동-자극성 분자는 4-1BB, OX40, ICOS, DAP-10, CD30, CD271, BAFFR, BCMA, DR3, FN14, HVEM, LTBR, RANK, TACI, TNFR1, TNFR2, TROY, EPOR, IL1RAcP, IL18R1, IL18RAP, ST2, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0176] 소정 구현예에서, 상기 제2 공동-자극성 신호전달 도메인은 4-1BB 폴리펩티드(예컨대, 4-1BB의 세포내 도메인 또는 그의 일부)를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 4-1BB 폴리펩티드는 NCBI 참조 번호: NP_001552를 갖는 아미노산 서열(서열번호 50) 또는 그의 단편과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%, 적어도 약 100% 상동성 또는 동일성인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 및/또는 선택적으로 최대 1개 또는 최대 2개 또는 최대 3개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 4-1BB 폴리펩티드는 길이가 적어도 20개, 또는 적어도 30개, 또는 적어도 40개, 또는 적어도 100개, 또는 적어도 150개, 또는 적어도 150개, 및 최대 255개 아미노산인, 서열번호 50의 연속적 부분인 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 4-1BB 폴리펩티드는 서열번호 50의 아미노산 1 내지 255, 1 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 150, 150 내지 200, 214 내지 255, 또는 200 내지 255의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 서열번호 50은 아래에 제공된다.
- [0177] 1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
- [0178] 61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
- [0179] 121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
- [0180] 181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLT LRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
- [0181] 241 CSCRFPEEEE GGCEL [서열번호 50]
- [0182] 5.2.5. 예시적 CAR
- [0183] 소정 구현예에서, 상기 CAR은 CD19-표적화 CAR이다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 (a) 인간 CD19에 결합하고 서열번호 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1, 서열번호 7에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2, 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3, 서열번호 9에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1, 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2, 및 서열번호 11에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3을 포함하는 세포의 항원-결합 도메인; (b) CD28의 막통과 도메인 또는 그의 일부를 포함하는 막통과 도메인; 및 (c) (i) CD3 ζ 폴리펩티드, 및 (ii) 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함하는 CD28 폴리펩티드를 포함하는 공동-자극성 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인;을 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 돌연변이된 YNMN 모티프는 YMDM(서열번호 32), YKNI(서열번호 26), YENV(서열번호 22), YSNV(서열번호 23), YKNL(서열번호 24), 또는 YGGG(서열번호 44)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진다. 소정 구현예에서, 상기 V_H 및 V_L 은 서열번호 5에 나타난 아미노산 서열을 갖는 링커를 통해 연결된다.
- [0184] 소정 구현예에서, 예시적 CD19-표적화 CAR은 YMDM(서열번호 32)으로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 예시적 CD19-표적화 CAR은 아래에 제공되는 서열번호 51에 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0185] EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS SVVDFYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTINVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGS GTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVT VAFI IFWVRSKRSRLHSDYMDMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPMEGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 51]

- [0186] 서열번호 51의 아미노산 서열을 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 아래에 제공되는 서열번호 52에 나타나 있다.
- [0187] GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTACTGGATG AACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCC AACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGT TCGGTAGTAGATTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA TCTGACATTGAGCTCACCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTA GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGG ACCAAGCTGGAGATCAACAGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGG AAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCCTGGCTTGTCTATAGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGGATATGACTCCCCCGCGCCCGGGCCACCCGAAGCAT TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAG CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT GGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [서열번호 52]
- [0188] 소정 구현예에서, 예시적 CD19-표적화 CAR은 YENV(서열번호 22)로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 예시적 CD19-표적화 CAR은 아래에 제공되는 서열번호 53에 나타낸 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0189] EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS SVVDFYFDYWGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPRDFTGSGS GTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVT VAFI IFWVRSKRSLHSDYENVTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 53]
- [0190] 서열번호 53의 아미노산 서열을 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 아래에 제공되는 서열번호 54에 나타나 있다.
- [0191] GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTACTGGATG AACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCC AACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGT TCGGTAGTAGATTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA TCTGACATTGAGCTCACCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTA GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGG ACCAAGCTGGAGATCAACAGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGG AAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCCTGGCTTGTCTATAGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTATGAAAATGTGACTCCCCCGCGCCCGGGCCACCCGAAGCAT TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAG CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT GGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [서열번호 54]
- [0192] 소정 구현예에서, 예시적 CD19-표적화 CAR은 아미노산 서열 YKNI(서열번호 26)으로 이루어진 돌연변이된 YNMN 모티프를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 예시적 CD19-표적화 CAR은 아래에 제공되는 서열번호 55에 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0193] EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS SVVDFYFDYWGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPRDFTGSGS GTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVT VAFI IFWVRSKRSLHSDYKNI TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKN

PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR [서열번호 55]

[0194] 서열번호 55의 아미노산 서열을 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 아래에 제공되는 서열번호 56에 나타나 있다.

[0195] GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTGAGTAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCTCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA TCTGACATTGAGCTCACCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTA GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCTAAACCACTGATTTACTCGCAACCTACCGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGG ACCAAGCTGGAGATCAACAGGGCGGCCCAATTGAAGTTATGTATCCTCTCTTACCTAGACAATGAGAAGGCAATGGAACCATTTATCCATGTGAAAGGG AAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGTATAGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTATAAAAAATTACTCCCCCGCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCAT TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAG CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGAAGGGGCACGAT GGCCTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCTCGC [서열번호 56]

[0196] 소정 구현예에서, 예시적 CD19-표적화 CAR은 아미노산 서열 YSNV(서열번호 23)로 이루어진 돌연변이된 YNM 모 티프를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 예시적 CD19-표적화 CAR은 아래에 제공되는 서열번호 57에 나타난 아 미노산 서열로 이루어진다.

[0197] EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS SVVDFYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGS GTDFLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVT VAFIIFWVRSKRSRLHSDYSNVTPRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR [서열번호 57]

[0198] 서열번호 57의 아미노산 서열을 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 아래에 제공되는 서열번호 58에 나타나 있다.

[0199] GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTGAGTAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCTCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA TCTGACATTGAGCTCACCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTA GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGCAACCTACCGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGG ACCAAGCTGGAGATCAACAGGGCGGCCCAATTGAAGTTATGTATCCTCTCTTACCTAGACAATGAGAAGGCAATGGAACCATTTATCCATGTGAAAGGG AAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGTATAGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACTCAAATGTTACTCCCCCGCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCAT TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAG CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGAAGGGGCACGAT GGCCTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCTCGC [서열번호 58]

[0200] 소정 구현예에서, 예시적 CD19-표적화 CAR은 아미노산 서열 YKNL(서열번호 24)로 이루어진 돌연변이된 YNM 모 티프를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 예시적 CD19-표적화 CAR은 아래에 제공되는 서열번호 59에 나타난 아 미노산 서열로 이루어진다.

[0201] EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS SVVDFYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGS GTDFLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVT

VAFIIFWVRSKRSRLHSDYKNLTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 59]

[0202] 서열번호 59의 아미노산 서열을 암호화하는 예시적 뉴클레오티드 서열은 아래에 제공되는 서열번호 60에 나타나 있다.

[0203] GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTGATGATG
AACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCC
ACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGT
TCGGTAGTAGATTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA
TCTGACATTGAGCTACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTACAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTA
GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGG
ACCAAGCTGGAGATCAACAGGGGGCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTTATCCATGTGAAAGGG
AAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGTCTATAGCTTGCTAGTAACA
GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACAAAACCTTACTCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCAT
TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAG
CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT
GGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [서열번호 60]

[0204] 소정 구현예에서, 예시적 CD19-표적화 CAR은 아미노산 서열 YGGG(서열번호 44)로 이루어진 돌연변이된 YMMN 모티프를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 예시적 CD19-표적화 CAR은 아래에 제공되는 서열번호 61에 나타난 아미노산 서열로 이루어진다.

[0205] EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS
SVVDFYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGS
GTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLVT
VAFIIFWVRSKRSRLHSDYGGGTTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 61]

[0206] 서열번호 61의 아미노산 서열을 암호화하는 예시적 뉴클레오티드 서열은 아래에 제공되는 서열번호 62에 나타나 있다.

[0207] GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTGATGATG
AACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCC
ACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGT
TCGGTAGTAGATTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA
TCTGACATTGAGCTACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTACAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTA
GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGG
ACCAAGCTGGAGATCAACAGGGGGCGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTTATCCATGTGAAAGGG
AAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGTCTATAGCTTGCTAGTAACA
GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACGGTGGAGGGACTCCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCAT
TACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAG
CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT
GGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [서열번호 62]

[0208] 5.3. 세포

[0209] 본 개시된 주제는 본 개시된 CAR(예컨대, 섹션 5.2에 개시된 것)을 포함하는 세포를 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 림프 계통의 세포 및 골수 계통의 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 면역반응성 세포이다. 소정 구현예에서, 상기 면역반응성 세포는 림프 계통의 세포이다.

[0210] 소정 구현예에서, 상기 세포는 림프 계통의 세포이다. 림프 계통의 세포는 항체의 생산, 세포성 면역 시스템의

조절, 혈액에서 외래 제제의 검출, 숙주에 외래인 세포의 검출 등을 제공할 수 있다. 상기 림프 계통의 세포의 비제한적 예는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, B 세포, 수지상 세포, 림프 세포로 분화될 수 있는 줄기 세포를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 줄기 세포는 다능성 줄기 세포(예컨대, 배아 줄기 세포)이다.

[0211] 소정 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. T 세포는 흉선에서 성숙하고 주로 세포-매개성 면역력을 담당하는 림프구일 수 있다. T 세포는 적응성 면역 시스템에 관여된다. 본 개시된 주제의 T 세포는 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 메모리 T 세포(중추 메모리 T 세포, 줄기-세포-유사 메모리 T 세포(또는 줄기-유사 메모리 T 세포), 및 2가지 타입의 이펙터 메모리 T 세포: 예컨대 TEM 세포 및 TEMRA 세포, 조절성 T 세포(억제인자 T 세포로도 알려져 있음), 종양-반응성 림프구, 종양-침윤 림프구(TIL), 자연 살해 T 세포, 점막 연관 불변 T 세포, 및 $\gamma\delta$ T 세포를 비제한적으로 포함하는 임의의 타입의 T 세포일 수 있다. 세포독성 T 세포(CTL 또는 킬러 T 세포)는 감염된 체세포 또는 종양 세포의 죽음을 유도할 수 있는 T 림프구의 서브세트이다. 환자 자신의 T 세포는 CAR의 도입을 통해 특정 항원을 표적화하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 면역반응성 세포는 T 세포이다. 상기 T 세포는 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포일 수 있다. 소정 구현예에서, 상기 T 세포는 $CD4^+$ T 세포이다. 소정 구현예에서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다.

[0212] 소정 구현예에서, 상기 세포는 NK 세포이다. 자연 살해(NK) 세포는 세포-매개성 면역력의 일부이고 선천성 면역 반응 동안에 작용하는 림프구일 수 있다. NK 세포는 표적 세포 상에서 그 세포독성 효과를 수행하기 위해 사전 활성화를 필요로 하지 않는다.

[0213] 본 개시된 주제의 인간 림프구의 타입은 말초 공여자 림프구, 예컨대 문헌[Sadelain et al., *Nat Rev Cancer* (2003); 3:35-45(CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된 말초 공여자 림프구를 개시함), Morgan, R.A., et al. 2006 *Science* 314:126-129(α 및 β 헤테로다имер를 포함하는 전장 종양 항원-인식 T 세포 수용체 복합체를 발현하도록 유전적으로 변형된 말초 공여자 림프구를 개시함), Panelli et al., *J Immunol* (2000);164:495-504; Panelli et al., *J Immunol* (2000);164:4382-4392(종양 생검에서 종양 침윤 림프구(TIL)로부터 유래되는 림프구 배양을 개시함), 및 Dupont et al., *Cancer Res* (2005);65:5417-5427; Papanicolaou et al., *Blood* (2003);102:2498-2505(인공 항원-제시 세포(AAPC) 또는 펄스화된 수지상 세포를 채택하는 선택적으로 시험관내-증식된 항원-특이적 말초혈 백혈구를 개시함)]에 개시된 것들을 비제한적으로 포함한다.

[0214] 상기 세포(예컨대, T 세포)는 자가성, 비-자가성(예컨대, 동종이형)이거나, 조작된 선조체 또는 줄기 세포로부터 시험관내에서 유래될 수 있다.

[0215] 본 개시된 주제의 세포는 골수 계통의 세포일 수 있다. 상기 골수 계통의 세포의 비제한적 예는 단핵구, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 호염기구, 호중구, 호산구, 거핵세포, 비만 세포, 적혈구, 혈소판, 및 골수 세포로 분화될 수 있는 줄기 세포를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 줄기 세포는 다능성 줄기 세포(예컨대, 배아 줄기 세포 또는 유도 다능성 줄기 세포)이다.

[0216] 소정 구현예에서, 본 개시된 세포는 종양 미세환경을 조절할 수 있다. 종양은 면역 인식 및 제거로부터 그 자신을 보호하기 위한 악성 세포에 의한 일련의 메커니즘을 수반하는 숙주 면역 반응에 적대적인 미세환경을 갖는다. 상기 "적대적 종양 미세환경"은 침윤 조절성 $CD4^+$ T 세포(Treg), 골수 유래 억제인자 세포(MDSC), 종양 연관 대식세포(TAM), TGF- β 를 포함하는 면역 저해성 사이토카인, 및 활성화 T 세포(CTLA-4 및 PD-1)에 의해 발현되는 면역 저해성 수용체를 표적화하는 리간드의 발현을 포함하는 다양한 면역 저해성 인자를 포함한다. 상기 면역 저해의 메커니즘은 내성(tolerance)의 유지 및 부적절한 면역 반응의 저해에 있어서 역할을 하지만, 종양 미세환경 내에서 상기 메커니즘은 효과적인 항-종양 면역 반응을 방지한다. 종합적으로, 상기 면역 저해성 인자는 표적화된 종양 세포와 만날 시에 뚜렷한 아네르기(anergy) 또는 입양적으로 전달된 CAR 변형된 T 세포의 아포토시스를 유도할 수 있다.

[0217] 소정 구현예에서, 상기 세포는 본 개시된 CAR로 형질도입되어서 상기 세포가 상기 CAR을 발현할 수 있다.

[0218] 소정 구현예에서, 상기 세포는 면역억제 활성화 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 단일쇄 가변 단편(scFv)을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 면역억제 활성화는 면역 반응에서의 감소로 귀결되는 세포(예컨대, 활성화된 면역반응성 세포)에서의 신호 전달의 유도 또는 단백질 발현에서의 변화를 나타낸다. 그 결합을 통해 면역반응을 저해 또는 감소시키는 것으로 알려진 폴리펩티드는 CD47, PD-1, CTLA-4, 및 SIRPa, PD-L1, PD-L2, B7-1, 및 B7-2를 포함하는 그 대응하는 리간드를 포함한다. 이러한 폴리펩티드는 상기 종양 미세환경에 존재하며, 신생물 세포에 대한 면역 반응을 억제한다. 다양한 구현예에서, 면역억제성 폴리펩티드 및/또는

그 리간드의 상호작용을 억제, 차단, 또는 길항시키면 상기 면역반응성 세포의 면역 반응이 향상된다.

- [0219] 소정 구현예에서, 상기 면역자극 활성화는 면역 반응에서의 증가로 귀결되는 세포(예컨대, 활성화된 면역반응성 세포)에서의 신호 전달의 유도 또는 단백질 발현에서의 변화를 나타낸다. 면역자극 활성화는 전-염증성 활성을 포함할 수 있다. 그 결합을 통해 면역 반응을 자극 또는 증가시키는 것으로 알려진 폴리펩티드는 CD28, OX-40, 4-1BB, 및 B7-1, B7-2, OX-40L, 및 4-1BBL을 포함하는 그 대응하는 리간드를 포함한다. 이러한 폴리펩티드는 상기 종양 미세환경에 존재하며, 신생물 세포에 대한 면역 반응을 활성화시킨다. 다양한 구현예에서, 프로-염증성 폴리펩티드 및/또는 그 리간드를 촉진, 자극, 또는 항진시키면 상기 면역반응성 세포의 면역 반응이 향상된다.
- [0220] CAR 및 면역억제 활성화 또는 면역자극 활성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 가용성 scFv를 포함하는 세포는 그 전체가 인용에 의해 통합되는 국제 특허 공개 번호 WO 2014/134165에 개시되어 있다.
- [0221] 소정 구현예에서, 상기 세포는 외인성 CD40L을 추가로 포함한다. CAR 및 외인성 CD40L을 포함하는 세포는 국제 특허 공개 번호 WO 2014/134165에 개시되어 있다.
- [0222] 아울러, 소정 구현예에서, 상기 세포는 IL-18을 발현하도록 조작된다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 외인성 IL-18 폴리펩티드 또는 그의 단편을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 IL-18 유전자 좌위(locus)에 IL-18 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 변형된 프로모터(promoter)/인핸서(enhancer)를 추가로 포함하며, 예컨대 IL-18 유전자 발현을 구동하기 위해 구성적(constitutive) 또는 유도가능성(inducible) 프로모터가 위치된다. CAR을 포함하고 IL-18을 발현하도록 조작된, 예컨대 IL-18 유전자 좌위에 외인성 IL-18 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변형된 프로모터/인핸서를 포함하는 세포는 그 전체가 인용에 의해 통합되는 국제 특허 공개 번호 WO2018/027155에 개시되어 있다.
- [0223] 부가적으로 또는 대안적으로, 상기 세포는 IL-33을 발현하도록 조작된다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 외인성 IL-33 폴리펩티드 또는 그의 단편을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 IL-33 유전자 좌위에 IL-33 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 변형된 프로모터/인핸서, 예컨대, IL-33 유전자 발현을 구동하도록 위치된 구성적 또는 유도가능성 프로모터를 추가로 포함한다. CAR을 포함하고 IL-33을 발현하도록 조작된, 예컨대 IL-33 유전자 좌위에 외인성 IL-33 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변형된 프로모터/인핸서를 포함하는 세포는 그 전체가 인용에 의해 통합되는 국제 특허 공개 번호 WO2019/099479에 개시되어 있다.
- [0224] 부가적으로 또는 대안적으로, 상기 세포는 IL-36을 발현하도록 조작된다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 외인성 IL-36 폴리펩티드 또는 그의 단편을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 세포는 IL-36 유전자 좌위에 IL-36 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 변형된 프로모터/인핸서, 예컨대 IL-36 유전자 발현을 구동하도록 위치된 구성적 또는 유도가능성 프로모터를 추가로 포함한다. CAR을 포함하고 IL-36을 발현하도록 조작된, 예컨대 IL-36 유전자 좌위에 외인성 IL-36 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변형된 프로모터/인핸서를 포함하는 세포는 그 전체가 인용에 의해 통합되는 국제 특허 공개 번호 WO2019/099483에 개시되어 있다.
- [0225] **5.4. 조성물 및 벡터**
- [0226] 본 개시된 주제는 본 개시된 CAR(예컨대, 섹션 5.2에 개시된 것)을 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 조성물을 포함하는 세포가 또한 제공된다.
- [0227] 소정 구현예에서, 본 개시된 CAR은 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산 분자에 의해 암호화된다.
- [0228] 아울러, 본 개시된 주제는 본 개시된 CAR(예컨대, 섹션 5.2에 개시된 것)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 조성물을 제공한다. 이러한 핵산 조성물을 포함하는 세포가 또한 제공된다.
- [0229] 소정 구현예에서, 상기 핵산 조성물은 본 개시된 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함한다.
- [0230] 소정 구현예에서, 상기 프로모터는 내인성 또는 외인성이다. 소정 구현예에서, 상기 외인성 프로모터는 연장 인자(EF)-1 프로모터, 사이토메갈로바이러스 즉시-초기 프로모터(CMV) 프로모터, 원숭이 바이러스 40 초기 프로모터(SV40) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터, 및 메탈로티오닌 프로모터로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 프로모터는 유도가능성 프로모터이다. 소정 구현예에서, 상기 유도가능성 프로모터는 NFAT 전사 반응 요소(TRE) 프로모터, CD69 프로모터, CD25 프로모터, 및 IL-2 프로모터로부터 선택된다.
- [0231] 상기 조성물 및 핵산 조성물은 본 기술분야에 알려진 방법에 의해 또는 본 명세서에서 기술된 것과 같이 대상체에 투여되거나 및/또는 세포 내로 운반될 수 있다. 세포(예컨대, T 세포 또는 NK 세포)의 유전적 변형은 재조합

DNA 구조체를 이용해 실질적으로 동질한 세포 구성물을 형질도입함으로써 달성될 수 있다. 소정 구현예에서, 레트로바이러스 벡터(예컨대, 감마-레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터)는 DNA 구조체를 세포 내로 도입하기 위해 채택된다. 예를 들면, 항원-인식 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 레트로바이러스 벡터 내로 클로닝될 수 있고, 그 내인성 프로모터로부터, 레트로바이러스 장형 말단 반복으로부터, 또는 관심있는 표적 세포 타입에 특이적인 프로모터로부터 발현이 유도될 수 있다. 비-바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있다.

[0232] 본 개시된 CAR을 포함하는 세포의 최초 유전적 변형을 위하여, 레트로바이러스 벡터가 형질도입을 위해 채택될 수 있지만, 임의의 다른 적합한 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 운반 시스템이 사용될 수 있다. 상기 항원-인식 수용체는 단일, 다중시스템 발현 카세트에, 단일 벡터의 다중 발현 카세트에, 또는 다중 벡터에 구축될 수 있다. 폴리시스템 발현 카세트를 생성하는 요소의 예는 비제한적으로 다양한 바이러스 및 비-바이러스 내부 리보솜 진입 부위(IRES, 예컨대, FGF-1 IRES, FGF-2 IRES, VEGF IRES, IGF-II IRES, NF- κ B IRES, RUNX1 IRES, p53 IRES, A형 간염 IRES, C형 간염 IRES, 페스티바이러스 IRES, 아프토바이러스 IRES, 피코르나바이러스 IRES, 폴리오바이러스 IRES 및 뇌심근염 바이러스 IRES) 및 절단가능한 링커(예컨대, 2A 펩티드, 예컨대, P2A, T2A, E2A 및 F2A 펩티드)를 포함한다. 레트로바이러스 벡터 및 적절한 패키징 라인의 조합이 또한 적합하며, 여기서 캡시드 단백질은 인간 세포를 감염시키기 위해 기능적일 것이다. PA12(Miller *et al.*, (1985) *Mol Cell Biol* (1985);5:431-437); PA317(Miller, *et al.*, *Mol Cell Biol* (1986); 6:2895-2902); 및 CRIP(Danos *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1988);85:6460-6464)을 비제한적으로 포함하는 다양한 양생(amphotropic) 바이러스-생산 세포주가 알려져 있다. 비-양생 입자, 예컨대 VSVG, RD114 또는 GALV 외피로 위유형화된 입자 및 본 기술분야에 알려진 임의의 다른 것들이 또한 적합하다.

[0233] 가능한 형질도입 방법은 또한 세포를 생산체 세포와 직접 공동-배양하거나(Bregni *et al.*, *Blood* (1992);80:1418-1422), 바이러스 상등액을 단독으로 또는 적절한 성장 인자 및 다중양이온을 포함하거나 포함하지 않는 농축된 벡터 스톱의 배양하는 것을 포함한다(Xu *et al.*, *Exp Hemat* (1994); 22:223-230; 및 Hughes *et al.* *J Clin Invest* (1992); 89:1817).

[0234] 다른 형질도입 바이러스 벡터가 세포를 변형하기 위해 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, 선택된 벡터는 높은 감염 효율 및 안정한 통합과 발현을 나타낸다(예컨대, Cayouette *et al.*, *Human Gene Therapy* 8:423-430, 1997; Kido *et al.*, *Current Eye Research* 15:833-844, 1996; Bloomer *et al.*, *Journal of Virology* 71:6641-6649, 1997; Naldini *et al.*, *Science* 272:263-267, 1996; and Miyoshi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10319, 1997 참조). 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터는, 예를 들면, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 및 아데나-연관 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스, 소 유두종 바이러스, 또는 헤르페스 바이러스, 예컨대 엡스타인-바 바이러스를 포함한다(또한, 예를 들면, 문헌[Miller, *Human Gene Thera* (1990);15-14; Friedman, *Science* 244:1275-1281, 1989; Eglitis *et al.*, *BioTechniques* (1988);6:608-614; Tolstoshev *et al.*, *Cur Opin Biotechnol* (1990); 1:55-61; Sharp, *The Lancet* (1991);337:1277-78; Cornetta *et al.*, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-22, 1987; Anderson, *Science* (1984);226:401-409; Moen, *Blood Cells* 17:407-16, 1991; Miller *et al.*, *Biotechnol* (1989);7:980-90; LeGal La Salle *et al.*, *Science* (1993);259:988-90; and Johnson, *Chest* (1995)107:77S-83S]의 벡터 참조). 레트로바이러스 벡터는 특히 잘 개발되어 있으며, 임상 상황에서 사용되었다(Rosenberg *et al.*, *N Engl J Med* (1990);323:370, 1990; Anderson *et al.*, 미국 특허 번호 5,399,346).

[0235] 비-바이러스 접근법이 또한 세포의 유전적 변형을 위해 채택될 수 있다. 예를 들면, 핵산 분자는 리포펙션(Feigner *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1987);84:7413; Ono *et al.*, *Neurosci Lett* (1990);17:259; Brigham *et al.*, *Am J Med Sci* (1989);298:278; Staubinger *et al.*, *Methods in Enzymol* (1983);101:512, Wu *et al.*, *J Biol Chem* (1988);263:14621; Wu *et al.*, *J Biol Chem* (1989);264:16985)의 존재 하에, 또는 수술 조건 하의 마이크로-주사에 의해(Wolff *et al.*, *Science* (1990);247:1465) 핵산을 투여함으로써 세포 내로 도입될 수 있다. 유전자 전달을 위한 다른 비-바이러스 수단은 칼슘 포스페이트, DEAE 텍스트란, 전기천공, 및 원형질체 용해를 이용하는 시험관내 전달감염을 포함한다. 리포솜이 또한 세포 내로의 DNA의 운반을 위해 잠재적으로 유익할 수 있다. 대상체의 이환 조직 내로의 정상 유전자의 이식은 또한 정상 핵산을 생체의 배양 가능한 세포 타입(예컨대, 자가 또는 이종성 일차 세포 또는 그의 자손) 내로 전달하고, 이후 상기 세포(또는 그 후손)를 표적화된 조직 내로 주사하거나 전신 주사함으로써 달성될 수 있다. 재조합 수용체는 또한 전위효소(transposase) 또는 표적화된 뉴클레아제(예컨대, 아연 핑거 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 또는 TALE 뉴클레아제, CRISPR)를 사용하여 유도되거나 획득될 수 있다. 일시적 발현은 RNA 전기천공에 의해 획득될 수 있다.

[0236] 임의의 표적화된 게놈 편집 방법이 또한 세포 또는 대상체에 본 개시된 항원-인식 수용체를 운반하기 위해 사용

될 수 있다. 소정 구현예에서, CRISPR 시스템이 본 명세서에서 개시된 본 개시된 항원-인식 수용체를 운반하기 위해 사용된다. 소정 구현예에서, 아연-핑거 뉴클레아제가 상기 항원-인식 수용체를 운반하기 위해 사용된다. 소정 구현예에서, TALEN 시스템이 본 개시된 항원-인식 수용체를 운반하기 위해 사용된다.

[0237] 클러스터된 정규-산재 단형 앞뒤상동 반복(CRISPR) 시스템은 원핵 세포에서 발견된 게놈 편집 도구이다. 게놈 편집을 위해 사용될 때, 상기 시스템은 Cas9(그 가이드로 crRNA를 사용하여 DNA를 변형시킬 수 있는 단백질), CRISPR RNA(crRNA, Cas9와 활성 복합체를 형성하는 tracrRNA(일반적으로 헤어핀 루프 형태)에 결합하는 영역을 따라 숙주 DNA의 정확한 섹션으로 이를 가이드하기 위해 Cas9에 의해 사용되는 RNA를 함유함), 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA, crRNA에 결합하고 Cas9와 활성 복합체를 형성함), 및 DNA 복구 주형의 선택적 섹션(특정 DNA 서열의 삽입을 허용하는 세포성 복구 공정을 가이드하는 DNA)을 포함한다. CRISPR/Cas9는 종종 표적 세포를 전달감염시키기 위한 플라스미드를 채택한다. 상기 crRNA는 이것이 세포에서 표적 DNA를 확인하고 이에 직접 결합하기 위해 Cas9가 사용하는 서열이기 때문에 각각의 적용을 위해 디자인될 필요가 있다. 또한, CAR 발현 카세트 를 운반하는 복구 주형도 이것이 절단쪽 상의 서열과 중첩하고 삽입 서열을 코딩해야 하기 때문에 각각의 적용 을 위해 디자인될 필요가 있다. 다중 crRNA 및 tracrRNA가 함께 패키징되어 단일-가이드 RNA(sgRNA)를 형성할 수 있다. 상기 sgRNA는 세포 내로 전달감염되기 위해 Cas9 유전자와 함께 연결되어 플라스미드로 제조될 수 있다.

[0238] 아연-핑거 뉴클레아제(ZFN)는 인공 제한 효소이며, 이것은 아연 핑거 DNA-결합 도메인을 DNA-절단 도메인과 조합함으로써 생성된다. 아연 핑거 도메인은 아연-핑거 뉴클레아제가 게놈 내의 원하는 서열을 표적화하는 것을 허용하는 특정 DNA 서열을 표적화하도록 조작될 수 있다. 개별 ZFN의 DNA-결합 도메인은 전형적으로 복수의 개별 아연 핑거 반복부를 함유하며, 각각 복수의 염기쌍을 인식할 수 있다. 새로운 아연-핑거 도메인을 생성하는 가장 일반적인 방법은 알려진 특이성을 갖는 더 작은 아연-핑거 "모듈"을 조합하는 것이다. ZFN에서 가장 흔한 절단 도메인은 타입 II 제한 엔도뉴클레아제 FokI 유래의 비-특이적 절단 도메인이다. 내인성 상동성 재조합 (HR) 기구 및 CAR 발현 카세트를 운반하는 상동성 DNA 주형을 이용하여, ZFN은 CAR 발현 카세트를 게놈 내로 삽입하기 위해 사용될 수 있다. 표적화된 서열이 ZFN에 의해 절단될 때, 상기 HR 기구는 손상된 염색체 및 상동성 DNA 주형 사이의 상동성에 대해 검색한 후, 염색체의 2개의 절단된 말단 사이의 주형의 서열을 복사하고, 이로 인해 상기 상동성 DNA 주형이 게놈 내로 통합된다.

[0239] 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)는 DNA의 특정 서열을 절단하도록 조작될 수 있는 제한 효소이다. TALEN 시스템은 ZFN과 거의 동일한 원리로 작동한다. 이것은 전사 활성화제-유사 이펙터 DNA-결합 도메인을 DNA 절단 도메인과 조합함으로써 생성된다. 전사 활성화제-유사 이펙터(TALE)는 특정 뉴클레오티드에 대해 강한 인식을 갖는 2개의 가변 위치를 갖는 33개~34개 아미노산 반복 모티프로 구성된다. 이들 TALE의 어레이를 조합함으로써, TALE DNA-결합 도메인은 원하는 DNA 서열에 결합하도록 조작되고, 이로 인해 상기 뉴클레아제가 게놈 내 특정 자리를 절단하도록 가이드할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 치료법의 방법에서 사용하기 위한 cDNA 발현은 임의의 적합한 프로모터(예컨대, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV), 원숭이 바이러스 40(SV40), 또는 메탈로티오나인 프로모터)로부터 지향되고, 임의의 적절한 포유동물 조절 요소 또는 인트론(예컨대, 연장 인자 1a 인핸서/프로모터/인트론 구조)에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, 원한다면, 특정 세포 타입에서의 유전자 발현을 우선적으로 지향하는 것으로 알려진 인핸서는 핵산의 발현을 지향하기 위해 사용될 수 있다. 사용되는 인핸서는 조직- 또는 세포-특이적 인핸서로 특징되는 것들을 비제한적으로 포함할 수 있다. 대안적으로, 게놈 클론이 치료 구조체로 사용된다면, 조절은 인지체 조절 서열에 의해, 또는 원한다면, 상기 기술된 임의의 프로모터 또는 조절 요소를 포함하는 이중성 공급원으로부터 유래되는 조절 서열에 의해 매개될 수 있다.

[0240] 상기 게놈 편집 제제/시스템을 운반하기 위한 방법은 필요에 따라 변할 수 있다. 소정 구현예에서, 선택된 게놈 편집 방법의 성분은 하나 이상의 플라스미드에서 DNA 구조체로서 운반된다. 소정 구현예에서, 상기 성분은 바이러스 벡터를 통해 운반된다. 일반적인 운반 방법은 전기천공, 마이크로주사, 유전자 총, 임페일렉션 (impalefection), 정수압, 연속 주입, 음파처리, 자기감염, 아데노-연관 바이러스, 바이러스 벡터의 외피 단백질 위유형화, 복제-적격 벡터 시스템 및 트랜스-작용 요소, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 화학적 비히클 (vehicle)(예컨대, 올리고뉴클레오티드, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스, 덴드리머, 무기 나노입자, 및 세포-침투 펩티드)을 비제한적으로 포함한다.

[0241] 5.5. 폴리펩티드

[0242] 본 개시된 주제는 서열 내 변경을 생성함으로써 아미노산 서열 또는 핵산 서열을 최적화하기 위한 방법을 제공한다. 이러한 변경은 소정 돌연변이, 결실, 삽입, 또는 번역-후 변경을 포함할 수 있다. 본 개시된 주제는

(CD19, CD8, CD28, 4-1BB, 및 CD3 ζ를 비제한적으로 포함하는) 본 명세서에 개시된 임의의 자연-발생형 폴리펩티드의 유사체를 추가로 포함한다. 유사체는 아미노산 서열 차이에 의해, 번역-후 변형에 의해, 또는 이들 모두에 의해 본 명세서에 개시된 자연-발생형 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 유사체는 본 개시된 주제의 자연-발생형 아미노산 서열의 전부 또는 일부와 적어도 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상의 상동성을 나타낼 수 있다. 서열 비교의 길이는 적어도 5개, 10개, 15개 또는 20개 아미노산 잔기, 예컨대 적어도 25개, 50개, 또는 75개 아미노산 잔기, 또는 100개 초과 아미노산 잔기이다. 또한, 동일성 정도를 결정하는 예시적 접근법에서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있으며, e^{-3} 내지 e^{-100} 의 확률 점수는 밀접하게 관련된 서열을 시사한다. 변형은 폴리펩티드의 생체내 및 시험관내 화학적 유도체화, 예컨대 아세틸화, 카르복실화, 인산화, 또는 글리코실화를 포함한다; 이러한 변형은 폴리펩티드 합성 또는 가공 동안 또는 단리된 변형 효소를 이용한 처리 후에 일어날 수 있다. 유사체는 또한 일차 서열에서의 변경에 의해 자연-발생형 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 이것은 자연적인 및 유도된 것들 모두의, 유전적 변이체를 포함한다(예를 들면, 조사 또는 에탄메틸설페이트에 대한 노출에 의해 무작위 돌연변이화로부터 기인하거나, 문헌[Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), CSH Press, 1989, or Ausubel et al., supra]에 기술된 것과 같은 위치-특이적 돌연변이화에 의한). L-아미노산 이외의 잔기, 예컨대 D-아미노산 또는 비-자연 발생형 또는 합성 아미노산, 예컨대 β 또는 γ 아미노산을 함유하는 고리화된 펩티드, 분자, 및 유사체가 또한 포함된다.

[0243] 전장 폴리펩티드에 더하여, 본 개시된 주제는 또한 본 명세서에 개시된 임의의 폴리펩티드의 단편을 제공한다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "단편"은 적어도 5개, 10개, 13개, 또는 15개 아미노산을 의미한다. 소정 구현예에서, 단편은 적어도 20개의 연속 아미노산, 적어도 30개의 연속 아미노산, 또는 적어도 50개의 연속 아미노산을 포함한다. 소정 구현예에서, 단편은 적어도 60개 내지 80개, 100개, 200개, 300개 이상의 연속 아미노산을 포함한다. 단편은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 방법에 의해 생성될 수 있거나, 정상적인 단백질 가공으로부터 기인할 수 있다(예컨대, 생물학적 활성을 위해 필요하지 않는 신생 폴리펩티드로부터의 아미노산 제거 또는 대안적 mRNA 스플라이싱 또는 대안적 단백질 가공 사건에 의한 아미노산의 제거).

[0244] 5.6. 제형물 및 투여

[0245] 본 개시된 주제는 또한 본 개시된 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 개시된 세포를 포함하는 조성물은 멸균 액체 제조물, 예컨대 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액, 또는 점성 조성물로서 편리하게 제공될 수 있으며, 이것은 선택된 pH로 버퍼화될 수 있다. 액체 제조물은 보통 겔, 다른 점성 조성물, 및 고체 조성물보다 제조하기 더 용이하다. 부가적으로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해, 다소 투여하기가 더 편리하다. 반면, 점성 조성물은 특정 조직과 더 긴 접촉 기간을 제공하기 위하여 적절한 점도 범위 내에서 제형화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은, 예를 들면, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

[0246] 멸균 주사용 용액은 원하는 바에 따라 다양한 양의 다른 성분과 함께 원하는 양의 적절한 용매 내의 유전적으로 변형된 면역반응성 세포를 포함시켜 제조될 수 있다. 이러한 조성물은 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리 식염수, 글루코오스, 텍스트로오스 등과의 혼합물일 수 있다. 상기 조성물은 또한 동결건조될 수 있다. 상기 조성물은 원하는 투여 및 제조 경로에 따라, 보조 성분, 예컨대 습윤제, 분산제, 또는 에멀전화제(예컨대, 메틸셀룰로스), pH 버퍼화제, 겔화제 또는 점도 향상 첨가제, 보존제, 향미제, 착색제 등을 함유할 수 있다. 표준 교재, 예컨대 인용에 의해 본 명세서에 포함되는 문헌["REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985]이 과도한 실험 없이 적합한 제조물을 제조하기 위해 참조될 수 있다.

[0247] 항균 보존제, 항산화제, 킬레이트화제, 및 버퍼를 포함하는, 조성물의 안정성 및 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등에 의해 보장될 수 있다. 주사용 약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 제제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 일으킬 수 있다. 그러나, 본 개시된 주제에 따르면, 사용되는 임의의 비히클, 희석제, 또는 첨가제는 유전적으로 변형된 세포와 호환성을 가져야 할 것이다.

[0248] 상기 조성물은 등장성일 수 있으며, 즉 이것은 혈액 및 누액과 동일한 삼투압을 가질 수 있다. 상기 조성물의 원하는 등장은 염화나트륨, 또는 다른 약학적으로 허용가능한 제제, 예컨대 텍스트로오스, 붕산, 나트륨 타르테이트, 프로필렌 글리콜 또는 다른 무기 또는 유기 용질을 이용해 달성될 수 있다. 염화나트륨은 특히 나트

를 이온을 함유하는 완충액을 위한 것일 수 있다.

[0249] 조성물의 점도는, 원한다면, 약학적으로 허용가능한 증점제를 이용하여 선택된 레벨로 유지될 수 있다. 예를 들면, 메틸셀룰로스는 용이하게 그리고 경제적으로 이용가능하며, 함께 작업하기가 쉽다. 다른 적합한 증점제는, 예를 들면, 잔탄 검, 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 카르보머 등을 포함한다. 상기 증점제의 농도는 선택되는 제제에 의존할 수 있다. 중요한 점은 선택된 점도를 달성할 양을 사용하는 것이다. 명백하게, 적합한 담체 및 다른 첨가제의 선택은 정확한 투여 경로 및 특정 투여형, 예컨대 액체 투여형의 본성(예컨대, 상기 조성물이 용액, 현탁액, 겔 또는 다른 액체 형태, 예컨대 경시 방출 형태 또는 액체-충진 형태로 제형화될 것인지 여부)에 의존할 것이다.

[0250] 본 개시된 세포를 포함하는 조성물은 항원에 대한 면역 반응을 유도 및/또는 향상시키거나 및/또는 신생물형성을 치료 및/또는 예방하기 위해 대상체에 전신으로 또는 직접 제공될 수 있다. 소정 구현예에서, 본 개시된 세포 또는 이를 포함하는 조성물은 관심있는 기관(예컨대, 신생물형성에 의해 영향을 받는 기관) 내로 직접 주사된다. 대안적으로, 본 개시된 세포 또는 이를 포함하는 조성물은, 예를 들면, 순환 시스템(예컨대, 중앙 혈관구조) 내로 투여함으로써 관심있는 기관에 간접적으로 제공된다. 확장 및 분화 제제는 시험관내 또는 생체내에서 세포(예컨대, T 세포 또는 NK 세포)의 생산을 증가시키기 위하여 상기 세포 또는 조성물을 투여하기 이전, 동안 또는 이후에 제공될 수 있다.

[0251] 본 개시된 세포는 보통 혈관내로 임의의 생리학적으로 허용가능한 비히클에서 투여될 수 있지만, 상기 세포가 재생 및 분화하기 위해 적절한 부위를 발견할 수 있다면 뼈 또는 다른 편리한 부위(예컨대, 흉선) 내로 도입될 수도 있다.

[0252] 투여되는 세포의 함량은 치료되는 대상체에 대해 변할 수 있다. 소정 구현예에서, 약 10^4 내지 약 10^{10} , 약 10^4 내지 약 10^7 , 약 10^5 내지 약 10^7 , 약 10^5 내지 약 10^9 , 약 10^5 내지 약 10^{10} , 또는 약 10^6 내지 약 10^8 의 본 개시된 세포가 대상체에게 투여된다. 보다 효과적인 세포는 훨씬 더 적은 수로 투여될 수 있다. 대개, 적어도 약 1×10^5 세포가 투여되고, 결국 약 1×10^{10} 이상에 도달할 것이다. 소정 구현예에서, 적어도 약 1×10^5 , 약 2×10^5 , 약 5×10^5 , 약 1×10^6 , 약 5×10^6 , 약 1×10^7 , 약 5×10^7 , 약 1×10^8 , 약 5×10^8 , 약 1×10^9 , 또는 약 5×10^9 의 본 개시된 세포가 대상체에게 투여된다. 소정 구현예에서, 약 10^5 내지 약 10^6 의 본 개시된 세포가 대상체에게 투여된다. 소정 구현예에서, 약 1×10^5 의 본 개시된 세포가 대상체에게 투여된다. 소정 구현예에서, 약 2×10^5 의 본 개시된 세포가 대상체에게 투여된다. 소정 구현예에서, 약 5×10^5 의 본 개시된 세포가 대상체에게 투여된다. 소정 구현예에서, 약 1×10^6 의 본 개시된 세포가 대상체에게 투여된다. 유효 용량으로 간주될 양의 정확한 결정은 그 크기, 연령, 성별, 체중, 및 특정 대상체의 증상을 포함하는, 각각의 대상체에 대한 개별 인자에 기반할 수 있다. 복용량은 본 개시 및 본 기술분야의 지식으로부터 본 기술분야의 기술자에 의해 용이하게 확인될 수 있다.

[0253] 본 개시된 세포는 세포의 정제된 개체군(population)을 포함할 수 있다. 본 기술분야의 기술자는 다양한 잘 알려진 방법, 예컨대 형광 활성화 세포 분류법(FACS)을 이용하여 개체군 내에서 본 개시된 세포의 백분율을 용이하게 결정할 수 있다. 본 개시된 면역반응성 세포를 포함하는 개체군에서 순도의 적합한 범위는 약 50% 내지 약 55%, 약 5% 내지 약 60%, 및 약 65% 내지 약 70%이다. 소정 구현예에서, 상기 순도는 약 70% 내지 약 75%, 약 75% 내지 약 80%, 또는 약 80% 내지 약 85%이다. 소정 구현예에서, 상기 순도는 약 85% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 95%, 및 약 95% 내지 약 100%이다. 복용량은 본 기술분야의 기술자에 의해 용이하게 조정될 수 있다(예컨대, 순도에서의 감소는 복용량에서의 증가를 필요로 할 수 있음). 상기 세포는 주사, 카테터(catheter) 등에 의해 도입될 수 있다.

[0254] 통상의 기술자는 방법에서 투여되는 조성물 내의 세포 및 선택적인 첨가제, 비히클, 및/또는 담체의 양을 용이하게 결정할 수 있다. 전형적으로, (활성 세포(들) 및/또는 제제(들)에 부가하여) 임의의 첨가제는 인산염 완충 식염수 내에 0.001 내지 50%(중량) 용액의 양으로 존재하며, 상기 활성 성분은 마이크로그램 내지 밀리그램 수준, 예컨대 약 0.0001 내지 약 5 중량%, 약 0.0001 내지 약 1 중량%, 약 0.0001 내지 약 0.05 중량% 또는 약 0.001 내지 약 20 중량%, 약 0.01 내지 약 10 중량%, 또는 약 0.05 내지 약 5 중량%로 존재한다. 동물 또는 인간에게 투여되는 임의의 조성물의 경우, 하기가 결정될 수 있다: 적합한 동물 모델, 예컨대 마우스와 같은 설치류에서 치사 용량(LD) 및 LD50을 결정하는 것에 의한 독성; 조성물(들)의 복용량, 여기서의 성분들의 농도 및

적합한 반응을 유발할 조성물(들)의 투여 시점. 이러한 결정은 통상의 기술자의 지식, 본 개시 및 본 명세서에 인용된 문헌으로부터 과도한 실험을 필요로 하지 않는다. 그리고, 순차적 투여를 위한 시간은 과도한 실험 없이 확인될 수 있다.

[0255] 소정 구현예에서, 상기 조성물은 본 개시된 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물이다.

[0256] 상기 조성물의 투여는 자가성 또는 이종성일 수 있다. 예를 들면, 세포는 한 대상체로부터 획득되고, 동일한 대상체 또는 상이한 호환성 대상체에게 투여될 수 있다. 말초 혈액 유래 세포 또는 (예컨대, 생체내, 생체외 또는 시험관내 유래의) 그의 자손이 투여될 수 있다. 본 개시된 조성물(예컨대, 본 개시된 세포를 포함하는 약학적 조성물)을 투여할 때, 이것은 주사가 가능한 단위 투여형(용액, 현탁액, 에멀전)으로 제형화될 수 있다.

[0257] 본 개시된 세포 및 조성물은 경구 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 결절내 투여, 종양내 투여, 척추강내 투여, 흉막내 투여, 골내 투여, 복강내 투여, 흉막 투여, 및 대상체에게 직접 투여를 비제한적으로 포함하는 본 기술 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0258] 5.7. 치료 방법

[0259] 본 개시된 주제는 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 유도 및/또는 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본 개시된 세포 및 이를 포함하는 조성물은 치료법 또는 약제에 사용될 수 있다. 본 개시된 주제는 상기 세포 (예컨대, T 세포, 예컨대, $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포) 또는 이를 포함하는 조성물을 이용하는 다양한 방법을 제공한다. 예를 들면, 본 개시된 세포 및 이를 포함하는 조성물은 대상체에서 종양 부담을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 본 개시된 세포는 대상체에서 종양 세포의 수를 감소시키거나, 종양의 크기를 감소시키거나, 및/또는 종양을 근절할 수 있다. 본 개시된 세포 및 이를 포함하는 조성물은 대상체에서 신생물 또는 종양을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 본 개시된 세포 및 이를 포함하는 조성물은 신생물 또는 종양을 앓고 있는 대상체의 생존을 연장시키기 위해 사용될 수 있다. 본 개시된 세포 및 이를 포함하는 조성물은 대상체에서 병원체 감염을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 원하는 효과, 예컨대 기존의 증상의 억제 또는 재발의 예방을 달성하기 위해 본 개시된 세포 또는 이를 포함하는 조성물(예컨대, 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함한다. 치료의 경우, 투여되는 양은 원하는 효과를 생성하는데 효과적인 양이다. 유효량은 1회 또는 일련의 투여로 제공될 수 있다. 유효량은 볼루스(bolus)로 또는 연속 관류에 의해 제공될 수 있다.

[0260] 본 개시된 주제는 상기 세포(예컨대, T 세포) 또는 이를 포함하는 조성물을 이용하는 다양한 방법을 제공한다. 예를 들면, 본 개시된 주제는 대상체에서 종양 부담을 감소시키는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 종양 부담을 감소시키는 방법은 본 개시된 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시된 세포는 대상체에서 종양 세포의 수를 감소시키거나, 종양의 크기를 감소시키거나, 및/또는 종양을 근절할 수 있다.

[0261] 상기 종양은 고형 종양일 수 있다. 고형 종양의 비제한적 예는 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장직장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위선암, 활막 육종, 흉선 암종, 자궁내막 암종, 위암, 흑색종, 간암종, 신장 세포 암종, 연조직 육종, 및 담관암종을 포함한다.

[0262] 본 개시된 주제는 또한 신생물을 갖는 대상체의 생존을 증가 또는 연장시키는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 신생물을 갖는 대상체의 생존을 증가 또는 연장시키는 방법은 본 개시된 면역반응성 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 대상체에서 종양 부담을 감소 또는 근절할 수 있다. 부가적으로, 본 개시된 주제는 본 개시된 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본 개시된 주제는 본 개시된 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 신생물을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법을 추가로 제공한다.

[0263] 신생물 또는 종양의 비제한적 예는 B 세포 백혈병, B 세포 림프종, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병(AML), 다발성 골수종, 림프종(호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종), 교모세포종, 골수이형성 증후군(MDS), 및 만성 골수성 백혈병(CML), 뼈암, 장암, 간암, 피부암, 두경부의 암, 흑색종(피부 또는 안구내 악성 흑색종), 신장암(예컨대, 투명 세포 암종), 인후암, 전립선암(예컨대, 호르몬 난치성 전립선 선암종), 혈액암(예컨대, 백혈병, 림프종, 및 골수종), 자궁암, 직장암, 항문 영역의 암, 방광암, 외암, 위암, 고환암, 나팔관의 암종, 자궁내막의 암종, 경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 백혈병(예컨대, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수아구성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 단

핵구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 진성 다혈구증), 소장의 암, 내분비 시스템의 암, 갑상선의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 음경의 암, 어린이의 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광의 암, 신장 또는 요관의 암, 신우의 암종, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관형성, 척추 종양, 뇌간 교종, 뇌하수체 선종, 카포시(Kaposi) 육종, 표피모양 암, 편평 세포 암, T-세포 림프종, 석면에 의해 유도되는 것을 포함하는 환경적으로 유도된 암, 발덴스트롬(Waldenstrom) 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 및 고형 종양, 예컨대 육종 및 암종(예컨대, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉(Ewing) 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지성 암종, 간암, 담관 암종, 용모암종, 정상피종, 배아성 암종, 윌름(Wilm) 종양, 경부암, 침샘암, 자궁암, 고환암, 방광 암종, 상피 암종, 교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 뱀지신경교종, 신경초종, 뇌수막종, 흑색종, 신경모세포종, 및 망막모세포종)을 포함한다.

[0264] 소정 구현예에서, 상기 종양 또는 신생물은 B 세포 백혈병, B 세포 림프종, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML), 및 혼합-표현형 급성 백혈병(MPAL)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 상기 CAR은 CD19에 결합한다.

[0265] 본 개시된 주제는 또한 병원체 감염을 갖는 대상체의 생존을 증가 또는 연장시키는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 방법은 본 개시된 면역반응성 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 비제한적 병원체 감염은 HIV 및 진균 감염을 포함한다.

[0266] 상기 대상체는 진행된 형태의 질환을 가질 수 있고, 이 경우 치료 목표는 질환 진행의 경감 또는 역전, 및/또는 부작용의 완화를 포함할 수 있다. 상기 대상체는 증상의 이력을 가질 수 있고, 이에 대해 이미 치료받았으며, 이 경우 치료 목표는 전형적으로 재발 위험의 감소 또는 지연을 포함할 것이다.

[0267] 면역학적 합병증("악성 T-세포 암화(transformation)"로 알려짐), 예컨대, 이식편-대-숙주 질환(GvHD)의 위험을 회피하거나 최소화하기 위하여, 또는 건강한 조직이 종양 세포와 동일한 표적 항원을 발현하여 GvHD와 유사한 결과를 야기할 때, 본 개시된 세포(예컨대, T 세포)에 추가 변형이 도입될 수 있다. 상기 문제에 대한 잠재적 해결책은 자살 유전자를 본 개시된 세포 내로 조작하는 것이다. 적합한 자살 유전자는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(hsv-tk), 유도가능한 카스파제 9 자살 유전자(iCasp-9), 및 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체(EGFRt) 폴리펩티드를 비제한적으로 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 자살 유전자는 EGFRt 폴리펩티드이다. 상기 EGFRt 폴리펩티드는 항-EGFR 단일클론 항체(예컨대, 세툽시맵)를 투여함으로써 T 세포 제거를 가능하게 할 수 있다. EGFRt는 상기 CAR의 상류에 공유 연결될 수 있다. 상기 자살 유전자는 본 개시된 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터 내에 포함될 수 있다. 이러한 방식으로, 악성 T-세포 암화(예컨대, GVHD) 동안에 상기 자살 유전자를 활성화하도록 디자인된 전구약물(예컨대, 전구약물, 예컨대 iCasp-9를 활성화시킬 수 있는 AP1903)을 투여하면 상기 CAR을 발현하는 자살 유전자-활성화된 세포에서 아포토시스를 촉발한다. 자살 유전자를 본 개시된, 예컨대 CAR 내로 통합하면 매우 짧은 기간 내에 대부분의 수용체-발현 세포를 제거하는 능력과 함께 추가된 레벨의 안전성을 제공한다. 자살 유전자와 함께 통합된 본 개시된 세포(예컨대, T 세포)는 세포 주입 후 주어진 시점에서 선제적으로 제거되거나, 최초의 독성 징후 시 근절될 수 있다.

[0268] 5.8. 키트

[0269] 본 개시된 주제는 대상체에서 면역 반응을 유도 및/또는 향상시키거나, 대상체에서 신생물 또는 종양을 치료 및/또는 예방하거나, 대상체에서 종양 부담을 감소시키거나, 대상체에서 신생물을 갖는 대상체의 생존을 증가 또는 연장시키거나, 및/또는 병원체 감염을 치료 및/또는 예방하기 위한 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 상기 키트는 본 개시된 세포, 또는 이를 포함하는 본 개시된 조성물을 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 키트는 멸균 용기를 포함한다; 이러한 용기는 상자, 앰플, 병, 바이알, 튜브, 백, 파우치, 블리스터-팩, 또는 본 기술분야에 알려진 다른 적합한 용기 형태일 수 있다. 이러한 용기는 플라스틱, 유리, 라미네이트지, 금속 호일, 또는 약제를 보유하기 위해 적합한 다른 물질로 제조될 수 있다. 소정 비제한적 구현예에서, 상기 키트는 본 개시된 CAR을 암호화하는 핵산 분자를 포함한다.

[0270] 원한다면, 상기 세포 및/또는 핵산 분자는 신생물형성이 발생할 위험을 갖는 대상체에 상기 세포 또는 핵산 분자를 투여하기 위한 설명서와 함께 제공된다. 상기 설명서는 일반적으로 신생물형성을 치료 및/또는 예방하기 위해 상기 조성물을 상요하는 것에 대한 정보를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 설명서는 다음 중 적어도 하나를 포함한다: 치료제의 설명; 신생물형성을 치료 또는 예방하기 위한 복용 일정 및 투여; 주의사항; 경고; 적

응증; 역-적응증; 과-복용 정보; 유해 반응; 동물 약리학; 임상 연구; 및/또는 참고문헌. 상기 설명서는 용기 상에 직접 인쇄되거나(존재하는 경우), 라벨로서 용기에 적용되거나, 별도의 종이, 팜플렛, 카드, 또는 폴더로서 용기 내에 또는 이와 함께 공급될 수 있다.

[0271] 6. 실시예

[0272] 본 개시된 주제는 본 개시된 주제의 예시로서 제공되며 이를 제한하는 것은 아닌 다음의 실시예를 참조함으로써 보다 잘 이해될 것이다.

[0273] 실시예 1: CD28 돌연변이체 CAR T 세포의 시험관내 및 생체내 특징분석

[0274] PI3K 신호전달은 과잉인(redundant) 것으로 보이는데, 그 이유는 (YMN에서 YMxM 일치의 존재를 통해) CD28이 PI3K p85 서브유닛에 직접 결합할 뿐만 아니라, (YxNx 일치 모티프에 결합하는) Grb2이 Gab1 및 Gab2에 결합하고, 이것은 다시 상기 PI3K p85 서브유닛을 모집하여 하류 신호전달을 시작할 수 있기 때문이다.

[0275] 상기 CD28 분자에 유착할 수 있는 다양한 수의 어댑터 분자를 고려할 때, T 세포의 기능적 결과(즉, 이펙터 세포 독성, 사이토카인 분비, 활성화, 생존, 메모리 형성 및 고갈)는 CD28에 대한 상기 어댑터 분자의 결합으로부터 기원하는 하류 신호전달 캐스케이드의 결과일 가능성이 크다. 따라서, 상기 CD28 모티프의 변형은 신호전달을 변경하게 되는 다양한 어댑터 분자의 결합을 허용 또는 제한하여, 이펙터 기능의 강화 및/또는 기능장애의 완화로 귀결될 수 있다. T 세포의 최종 분화에서의 PI3K 신호전달의 영향을 고려할 때, 상기 신호전달 경로의 과잉은 이펙터 기능을 위해 해로울 수 있고, 이것을 조절하는 것은 유익할 수 있다(도 1).

[0276] 결합 파트너(어댑터 분자)를 결정하기 위한 CD28에서의 YMN 모티프, 및 PI3K, Grb2, 및 GADS로부터 기원하는 다수의 신호전달 캐스케이드를 통한 T 세포 운명을 결정하기 위한 상기 파트너의 능력을 고려하여, CD28에 대한 상기 어댑터 분자의 결합을 허용하거나 배제하는 다수의 CD28 돌연변이를 생성하였다(도 2, 도 12).

[0277] CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포의 특징분석

[0278] CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포를 생성하였다. 절단된 EGFR 도메인(Etah19)을 발현하는 상이한 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 상이한 이펙터:종양 비에서 GFP-ffLuciferase(NALM6gL)를 발현하는 CD19+ NALM6 세포와 공동배양하였다. 24시간 후 생물발광에 의해 (비-신호전달 CAR T 세포와 비교하여) 종양 세포 용해를 측정하였다. CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 시험관내에서 강력한 살상 성능을 갖는 것으로 나타났다(도 3a 내지 도 3d).

[0279] 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 단독으로 배양하거나, 1:1의 이펙터:종양 비에서 CD19+ NALM6 세포와 공동배양하였다. 24시간 후, 상등액을 수집하였고, 비드-기반 멀티플렉스 에세이를 사용하여 사이토카인을 측정하였다. CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 특유의 사이토카인 분비 프로필을 가졌다(도 4a 내지 도 4n).

[0280] 상이한 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 1:5의 E:T 비 및 50,000 CAR T 세포/㎖의 농도에서 NALM6와 공동배양하였다. 대략 5일마다, CAR T 세포를 계수하였고, 유세포 분석, 메모리 표현형(CD62L+), 및 CD4/CD8 분포에 의해 특징분석하였다. 출발 수의 종양 세포를 상이한 시점에서 배양물 내로 다시 첨가하였다. CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 또한 시험관내에서 강력한 살상 증식 성능을 가졌다(도 5). CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 CD28 및 CD28-1xx CAR T 세포와 비교하여 반복된 항원 만남의 맥락에서 메모리 표현형을 유지하였다(도 6). CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 CD28 및 CD28-1xx CAR T 세포와 비교하여 반복된 항원 만남의 맥락에서 상대적으로 균형잡힌 CD8:CD4 비를 유지하였다(도 7).

[0281] CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 단일 및 다중 자극 후에 제약된 활성화 프로필을 실증하였다. CAR T 세포를 1:5의 초기 E:T(1회 자극)에서 NALM6gL과 공동배양하였다. 병행하여, CAR T 세포를 총 5회 자극(12시간마다 1회 자극) 동안 동일한 양의 종양으로 반복적으로 자극하였다. 공동배양 시작 대략 10일 후, 크기/림프구분화(전방 산란에 의해 평가됨)를 유세포 분석에 의해 평가하였다. CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 단일 또는 다중 활성화 후에 더 낮은 림프구분화를 실증하였다(도 8).

[0282] 단일 또는 다중 자극 9일 후 CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포의 대사 프로필을 측정하였다. CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 단일 또는 다중 자극 후에 현저하게 더 낮은 기저 호흡을 실증하였다(도 9a). 백혈병 항원으로 5x 자극한 후 Etah19h28Z 및 Etah19h28Zp33에서 현저하게 더 높은 기저 산소 소비율(OCR)이 측정되었지만, 1x 자극만 한 후에는 상기 차이는 존재하지 않았다. 세포의 기저 산소 소비가 증가된 것은 향상된 CAR T 세포 증식을 위해 필요한 대사적 수요를 설명하기 위한 우세한 에너지 생성 메커니즘으로서 산화적 인산화를 우선적으로 의존함을 제시하였다. 이것은 종양 항원을 이용한 부가적인 자극(예컨대, 1x 자극과 비교하여 5x 자극)이

후에 기저 OCR에서의 증가로 추가로 확인되었다.

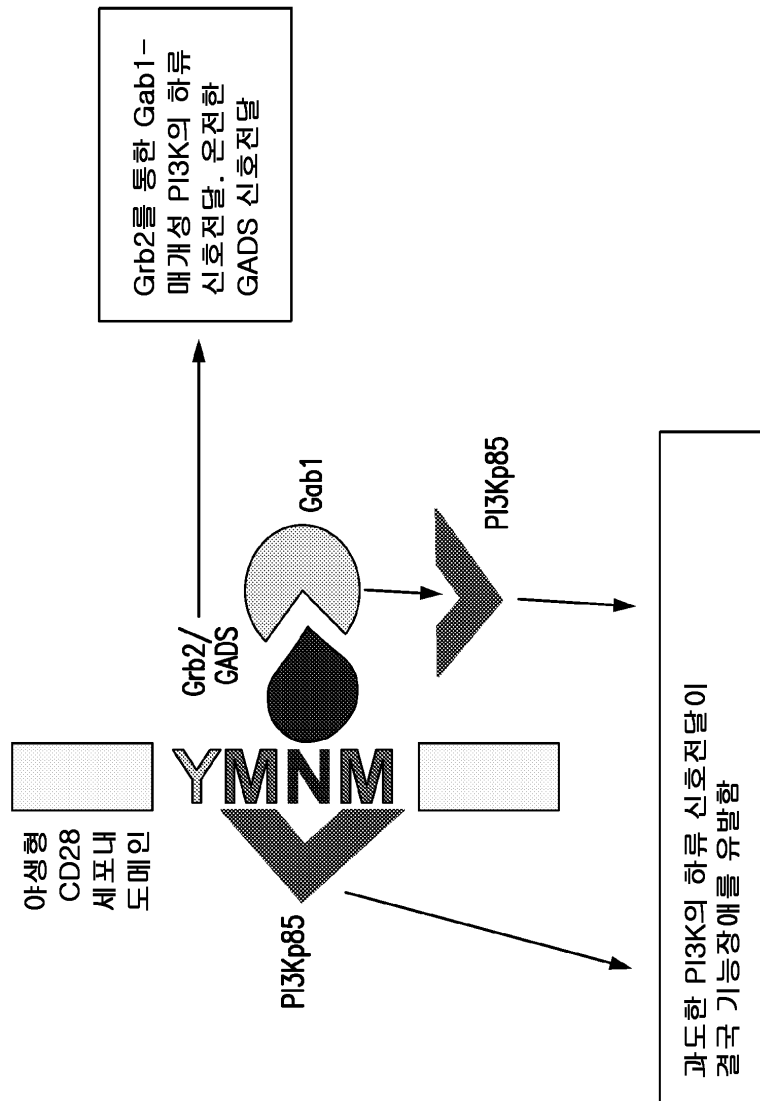
- [0283] CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 또한 단일 또는 다중 자극 후에 현저하게 더 낮은 젖산 생산을 실증하였다(도 9b). 세포의 산성화율(ECAR)은 해당과정 동안의 젖산 생산에 대한 측정가능한 대용품(surrogate)이다. 자극된 CAR T 세포에서 기저 ECAR에서의 증가는 증가된 해당과정 활성을 제시하고, 이것은 전형적으로 항원으로 활성화된 T 세포에서 측정된다. Etah19hMUTHz에서 ECAR에서의 증가가 관찰되었지만, 최소였는데, 이는 상기 변형을 갖는 T 세포가 현저한 자극을 경험하지 않았음을 제시한다.
- [0284] CAR T 세포를 1:5의 초기 E:T(1회 자극)에서 NALM6gL과 공동배양하였다. 병행하여, CAR T 세포를 총 5회 자극(12시간마다 1회 자극) 동안 동일한 양의 종양으로 반복적으로 자극하였다. 공동배양 시작 대략 10일 후, 유세포 분석에 의해 고갈 마커(LAG3 및 PD1)를 평가하였다. CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 단일 또는 다중 자극 상황에서 공동-억제성 분자(LAG3 및 PD1, TIM-3 및 PD1)를 더 낮은 레벨로 발현한다(도 10a 및 도 10b).
- [0285] 돌연변이체-기반 CAR T 세포의 생체내 항-종양 효과를 측정하였다. NCG 마우스를 10^6 NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종하였고, 4일 후 CAR T 세포로 처리하였다. CAR T 세포는 2명의 상이한 건강한 공여자로부터 유래되었다. CD28-YKNI 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포는 생체내에서 표준 CD28-기반 CAR T 세포를 능가하였다(도 11).
- [0286] 다른 CD28 돌연변이체 CAR T 세포의 특징분석
- [0287] 절단된 EGFR 도메인(Etah19)을 발현하는 상이한 인간 CD19-표적화 CD28 돌연변이체 CAR T 세포(CD28-YKNI, CD28-YMDM, CD28-YGGG, CD28-YENV, CD28-YKNL, 및 CD28-YSNV)를 상이한 이펙터:종양 비에서 GFP-ffLuciferase(NALM6gL)를 발현하는 CD19+ NALM6 세포와 공동배양하였고, 24시간 후 생물발광에 의해 (비-신호 전달 CAR T 세포와 비교하여) 종양 세포 용해를 측정하였다. CD28-YKNI 돌연변이체 CAR T 세포는 24시간 살상에세이에서 필적하는 살상 성능을 보였다(도 13).
- [0288] 상이한 인간 CD19-표적화 CAR T 세포를 1:5의 E:T 비 및 25,000 CAR T 세포 /ml의 초기 농도에서 NALM6과 공동배양하였다. CAR+ 및 NALM6의 농도를 매일 측정하였고, 6일에 걸쳐서 플롯팅하였다. CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포(YKNI, YENV, 및 YMDM)는 시험관내에서 표준 CD28-기반 CAR T 세포를 능가한다(도 14). CD28 돌연변이체는 시험관내에서 강력한 장기간의 세포독성 성능을 나타내었다.
- [0289] CAR T 세포를 1:5의 초기 E:T(1회 자극)에서 NALM6gL과 공동배양하였다. 병행하여, CAR T 세포를 총 5회 자극(12시간마다 1회 자극) 동안 동일한 양의 종양으로 반복적으로 자극하였다. 공동배양 시작 대략 10일 후, 유세포 분석에 의해 고갈 마커(TIM3 및 PD1)를 평가하였다. CD28 돌연변이체는 유리한 고갈 면역표현형을 실증하였다(도 15).
- [0290] CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포(YKNI, YENV, 및 YMDM)는 생체내에서 표준 CD28-기반 CAR T 세포를 능가하였다(도 16 내지 도 18). NCG 마우스를 $1e6$ NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종하였고, 4일 후 CAR T 세포로 처리하였다. 생존율을 도표로 나타내었다. 생물발광을 매주 측정하였다. CAR T 세포는 단일 건강한 공여자로부터 유래되었다.
- [0291] **실시예 2: CD28 돌연변이체 CAR T 세포의 특징분석**
- [0292] YENV, YKNI, YGGG, YMDM 및 YSNV CD19-표적화 CAR T 세포를 포함하는 CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포를 생성하였다. 상기 CD28 돌연변이체 CAR T 세포의 시험관내 및 생체내 특성을 특징분석하였다.
- [0293] CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포를 1:15의 E:T 비에서 NALM6gL과 공동배양하였다. NALM6의 농도를 매일 측정하였고, 7일에 걸쳐서 플롯팅하였으며, 세포/ml로서 플롯팅하였다. CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포(CD28-YENV, CD28-YKNI, CD28-YGGG, CD28-YMDM 및 CD28-YSNV)는 표준 CD28-기반 CAR T 세포를 능가한 것이 관찰되었고, 시험관내에서 강력한 장기간의 세포독성 성능을 실증하였다(도 19).
- [0294] CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포를 1:15 및 1:30의 E:T에서 NALM6gL과 공동배양하였다. 5일 후, 상기 CAR T 세포의 고갈 마커(LAG3, TIM3 및 PD1) 발현을 유세포 분석에 의해 평가하였다. CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포는 유리한 고갈 면역표현형을 가졌다(도 20).
- [0295] CD28 돌연변이체 CAR T 세포의 생체내 항-종양 효과를 보이기 위하여, NCG 마우스를 1×10^6 NALM6gfp⁺ffLUC⁺ 종양 세포로 접종하였고, 4일 후 500,000 또는 200,000 CAR T 세포로 처리하였다. CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포는 생체내에서 향상된 종양 제어를 실증하였고, 표준 CD28-기반 CAR T 세포를 능가하였다(도 21).

및 도 22).

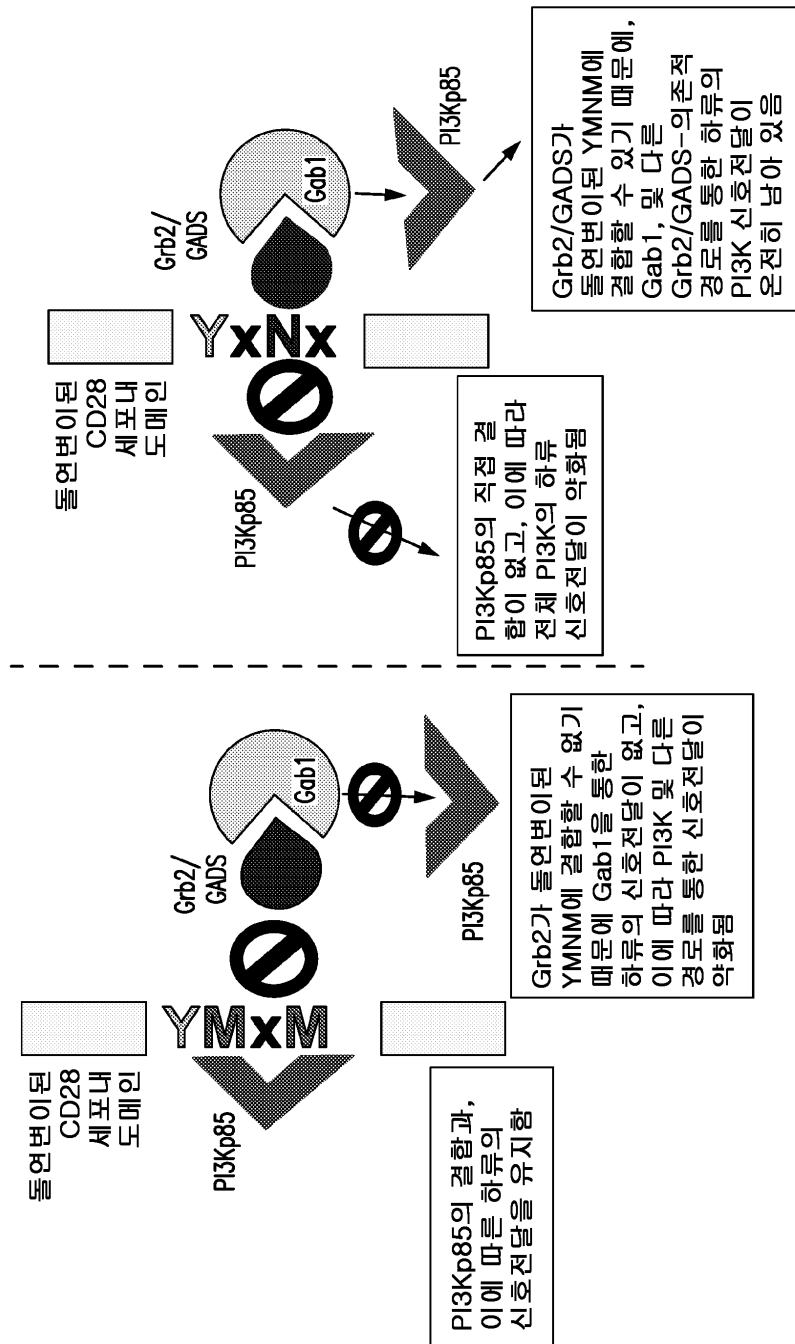
- [0296] CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포는 항원-밀도와 무관하게 시험관내에서 향상된 증식을 나타내었다. 인간 CD19-표적화 CD28-Yxxx 돌연변이체 CAR T 세포를 1:1의 E:T 비에서 높거나 낮은 CD19 항원 밀도로 NALM6gL과 공동배양하였다. 6일마다, CAR+ T 세포를 계수하였고, 총 3회 자극 동안 NALM6gL로 재자극하였다. CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포는 높고 낮은 항원 밀도의 CD19 종양 세포의 맥락 모두에서 시험관내에서 표준 CD28-기반 CAR T 세포에 비해 향상된 증식을 보였다(도 23).
- [0297] CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포의 사이토카인 분비 프로필을 측정하였다. 인간 CD19-표적화 CD28-Yxxx 돌연변이체 CAR T 세포를 NALM6gL과 공동배양하였다. 24시간 후, 상등액을 수집하였고, 인터루킨-2, TNF- α , GM-CSF, 인터페론- γ , IL-9, 및 IL-17을 포함하는 사이토카인을 루미넥스 비드-기반 멀티플렉스 에세이에 의해 측정하였다. CD28-Yxxx 돌연변이체 CD19-표적화 CAR T 세포는 항원에 대한 노출시 특유의 사이토카인 분비 프로필을 실증하였다(도 24a 내지 도 24c).
- [0298] 본 개시된 주제 및 소정의 그 이점들이 상세히 기술되었지만, 본 개시의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변화, 치환 및 변경이 본 명세서에 행해질 수 있음이 이해되어야 한다. 더욱이, 본 출원의 범위는 본 명세서에 기술된 공정, 장치, 제조법, 및 물질의 조성물, 및 방법의 특정 구현예로 한정하기 위한 의도는 아니다. 본 기술분야의 통상의 기술자가 본 개시된 주제의 개시로부터 용이하게 인식하는 것과 같이, 현재 존재하거나 본 명세서에 기술된 대응하는 구현예와 실질적으로 동일한 기능을 수행하거나 실질적으로 동일한 결과를 달성하는 향후에 개발될 공정, 장치, 제조법, 물질의 조성물, 또는 방법이 본 개시된 주제에 따라 사용될 수 있다. 따라서, 첨부된 청구항은 그 범위 내에 이러한 공정, 장치, 제조법, 물질의 조성물, 또는 방법을 포함하기 위한 의도이다.
- [0299] 다양한 특허, 특허 출원, 공개문헌, 제품 설명서, 프로토콜, 및 서열 식별 번호가 본 출원 전반에 걸쳐 인용되어 있으며, 그 개시된 내용은 모든 목적을 위하여 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 통합된다.

도면

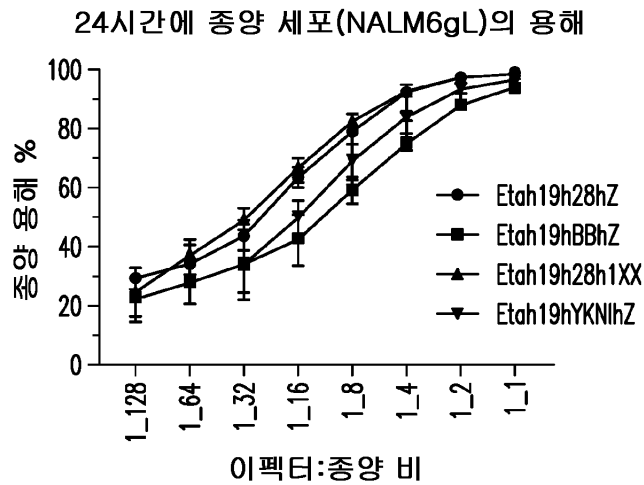
도면1



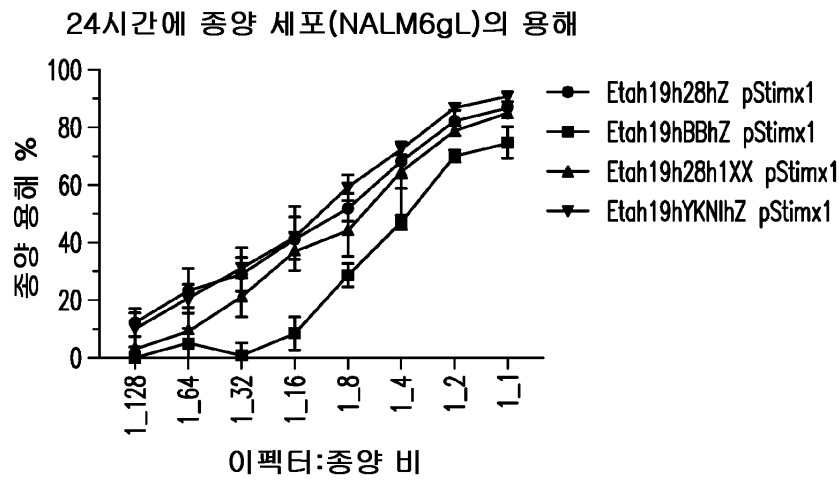
도면2



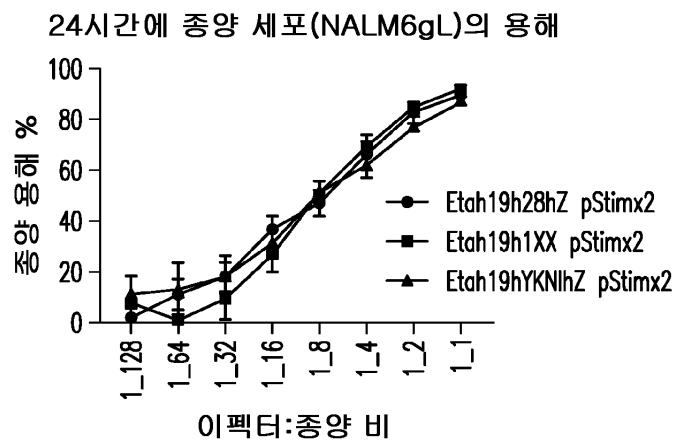
도면3a



도면3b

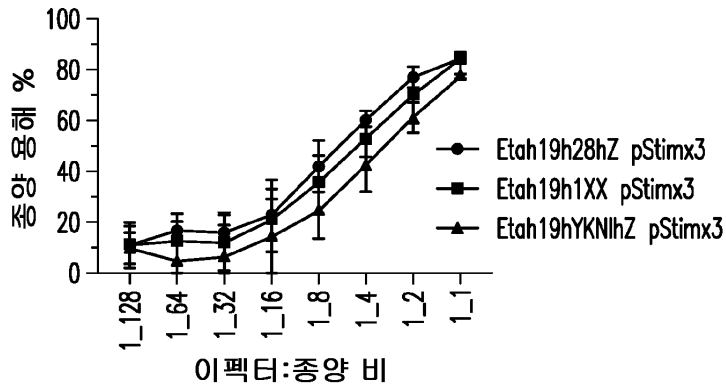


도면3c



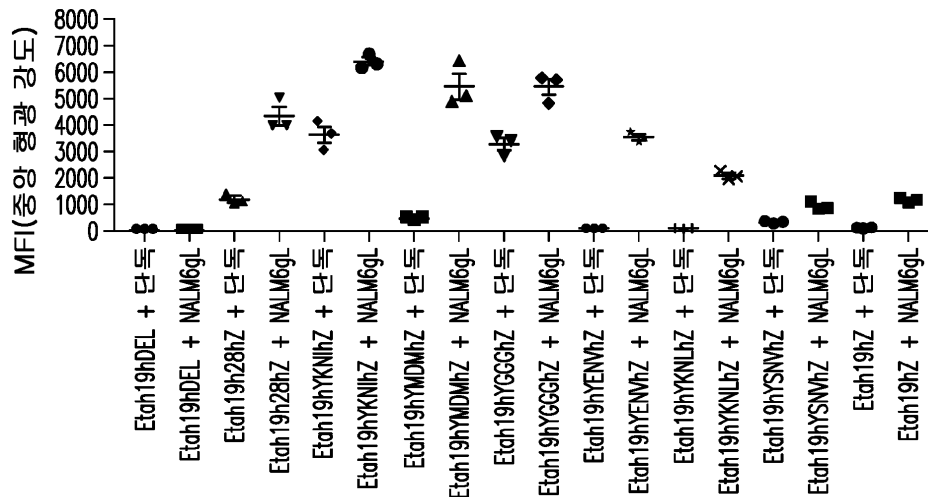
도면3d

24시간에 종양 세포(NALM6g/L)의 용해



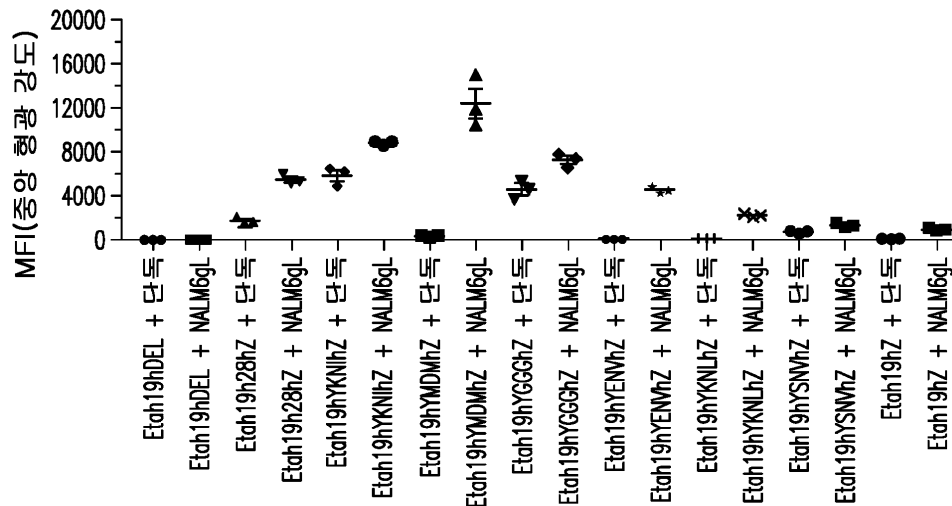
도면4a

공여자 V (24시간 GM-CSF 분비)

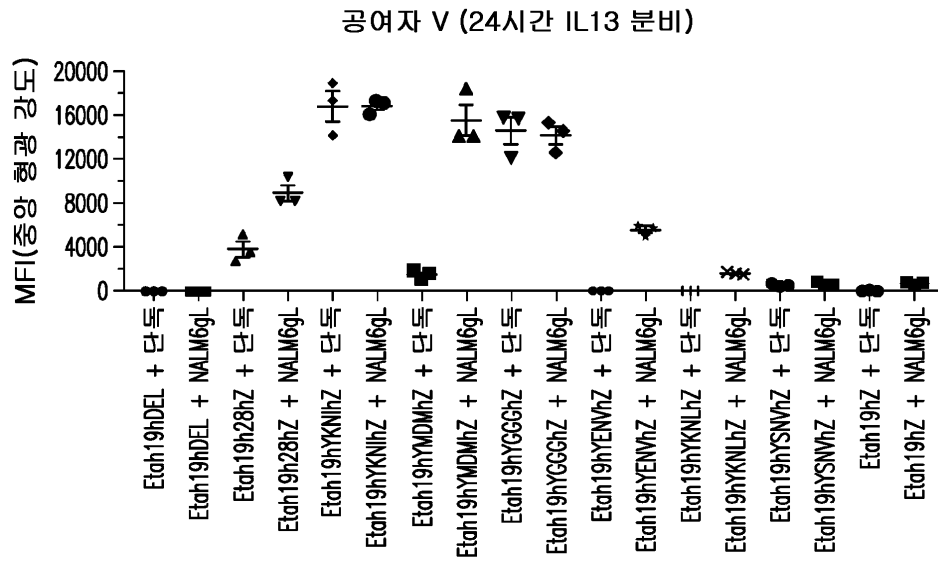


도면4b

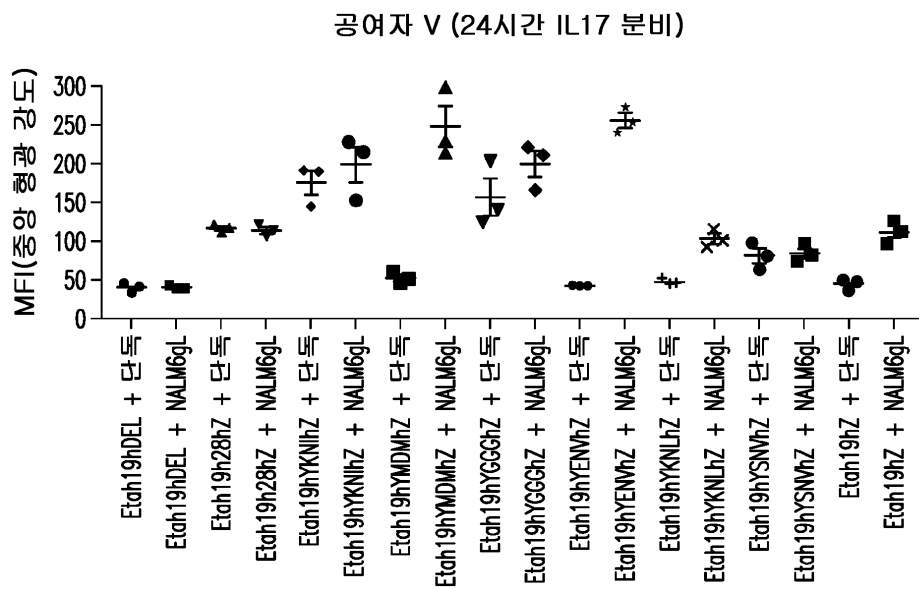
공여자 V (24시간 IFN-감마 분비)



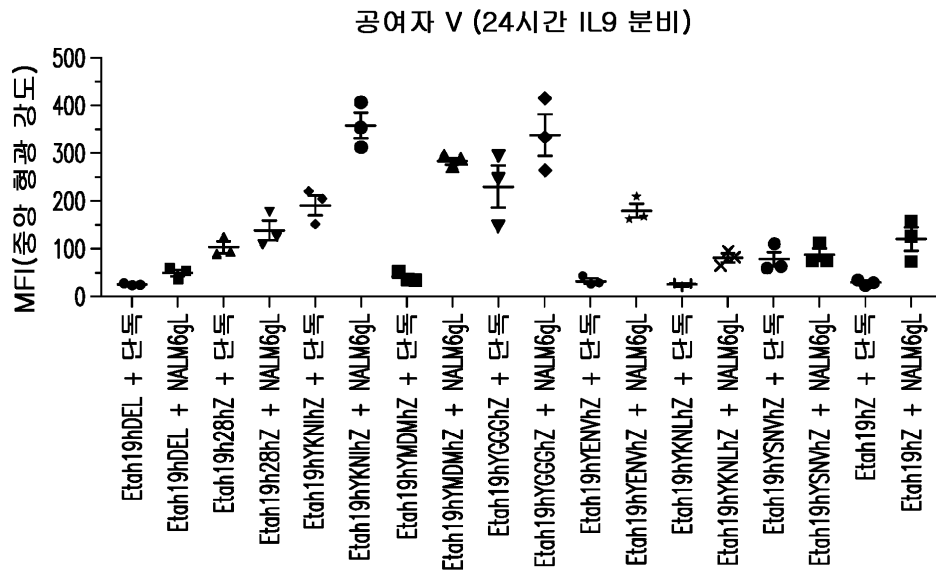
도면4c



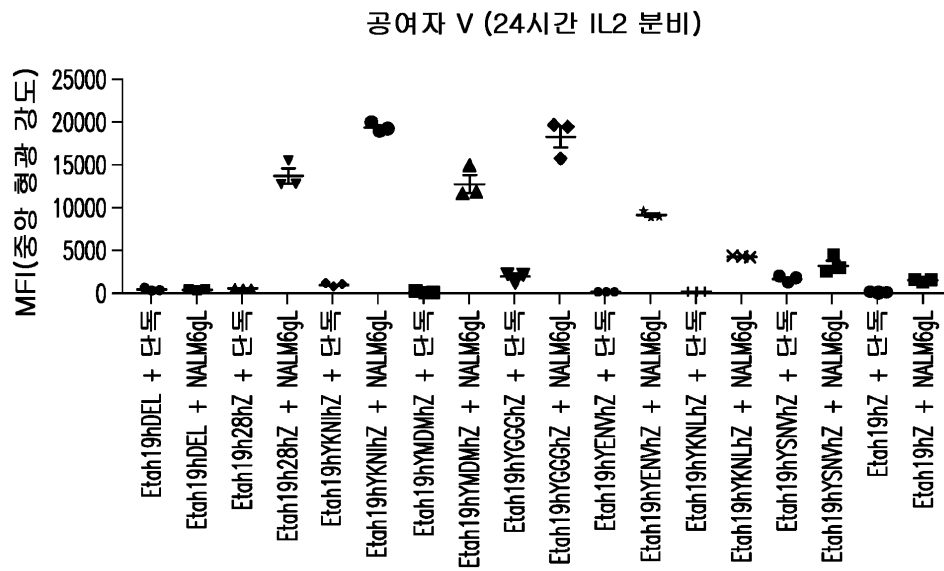
도면4d



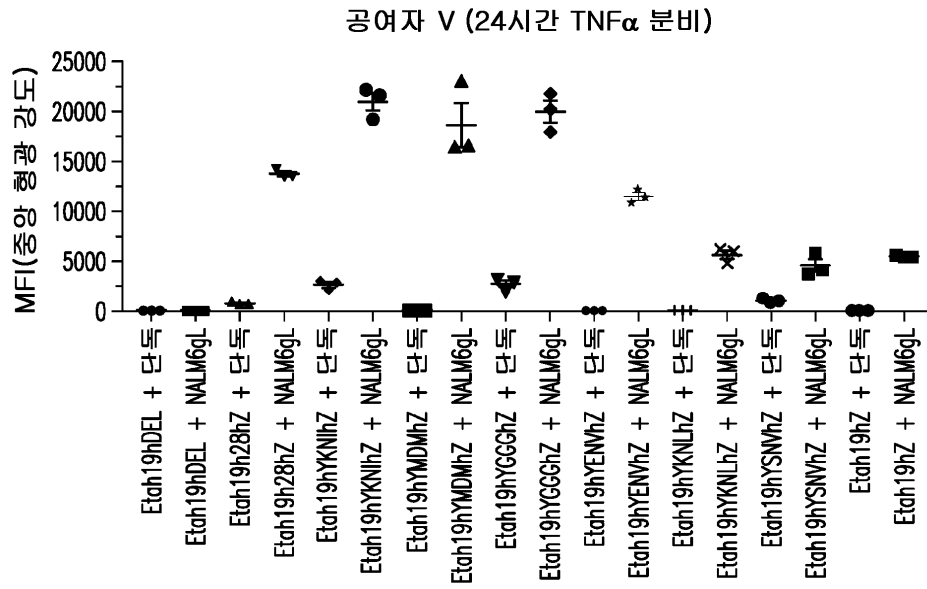
도면4e



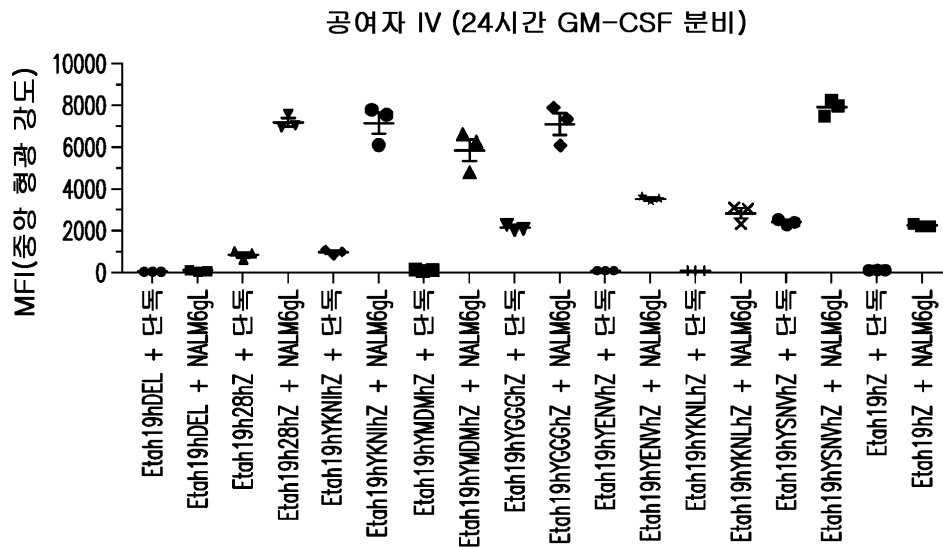
도면4f



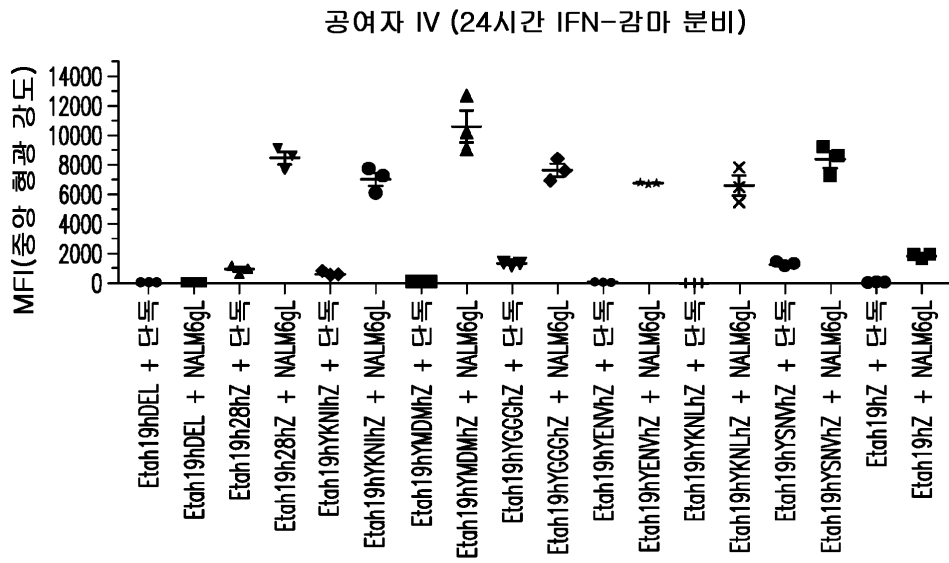
도면4g



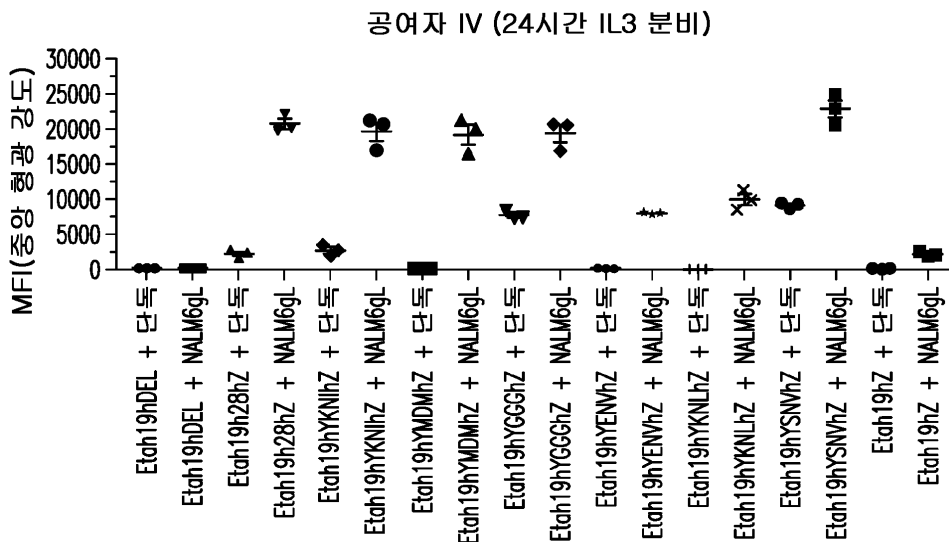
도면4h



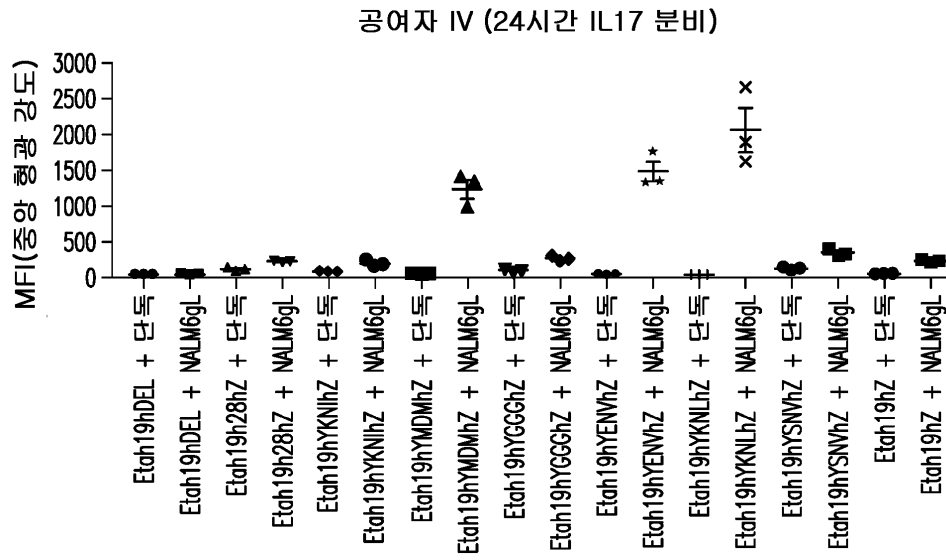
도면4i



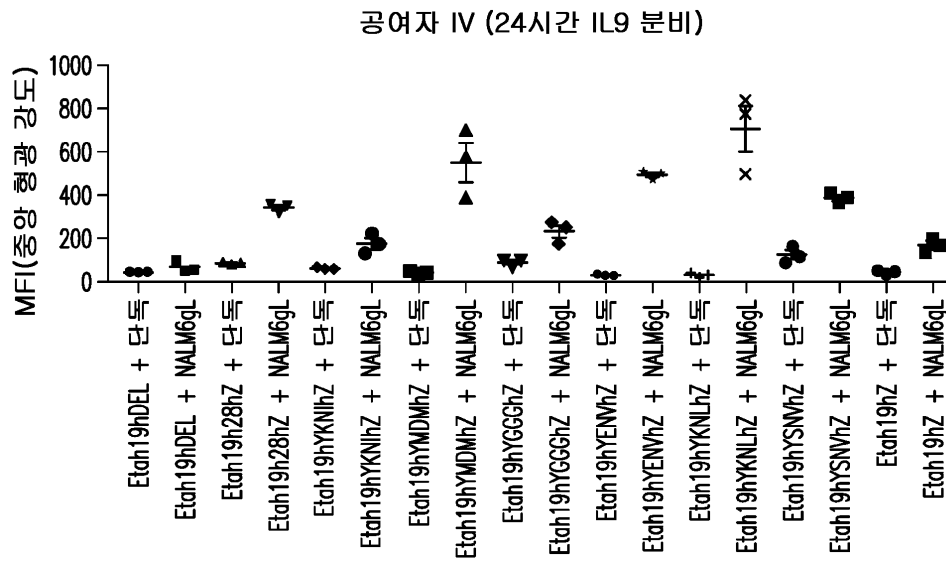
도면4j



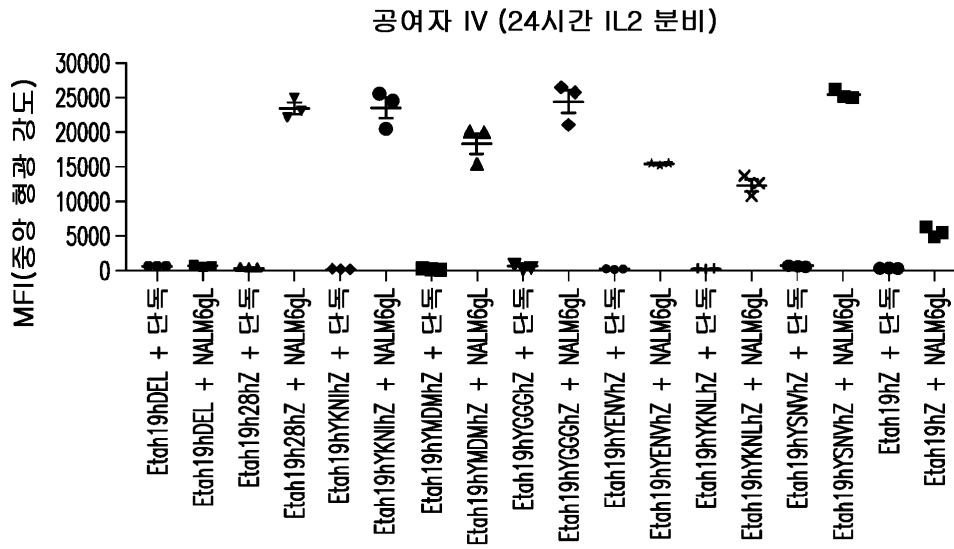
도면4k



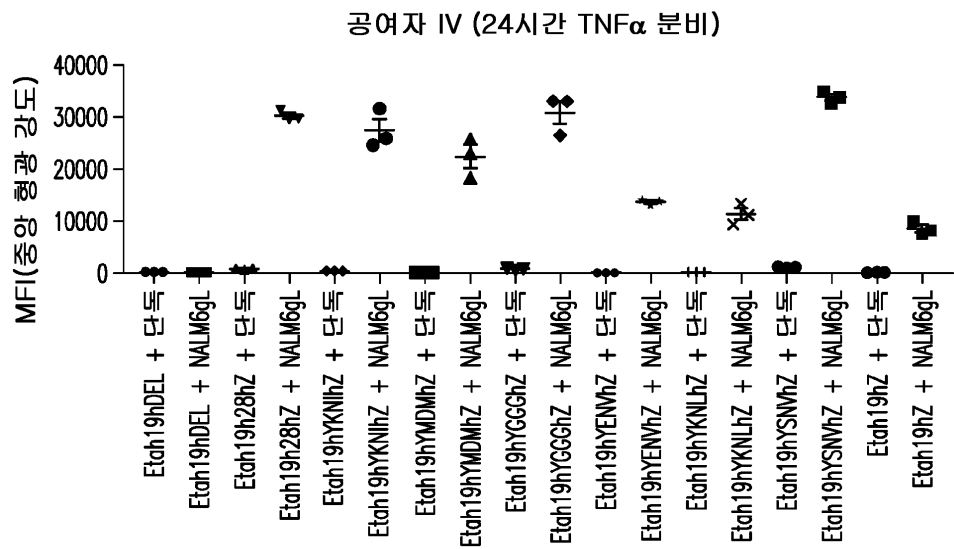
도면4l



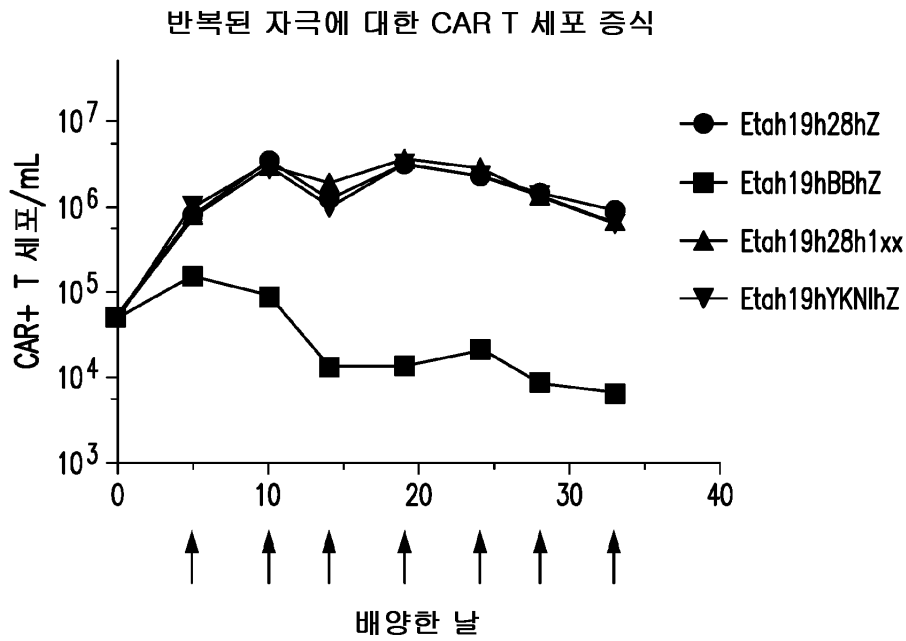
도면 4m



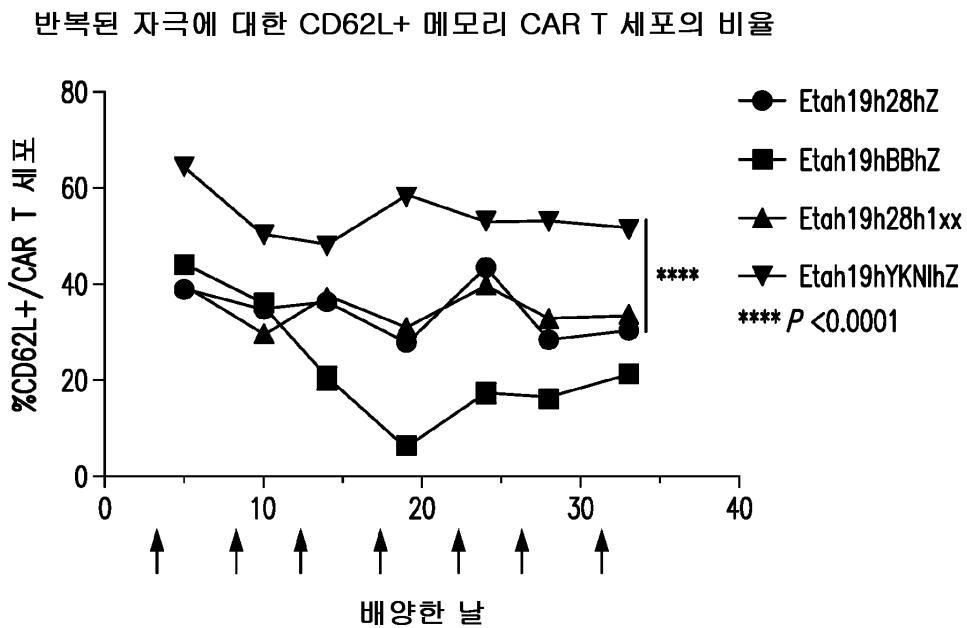
도면 4n



도면5

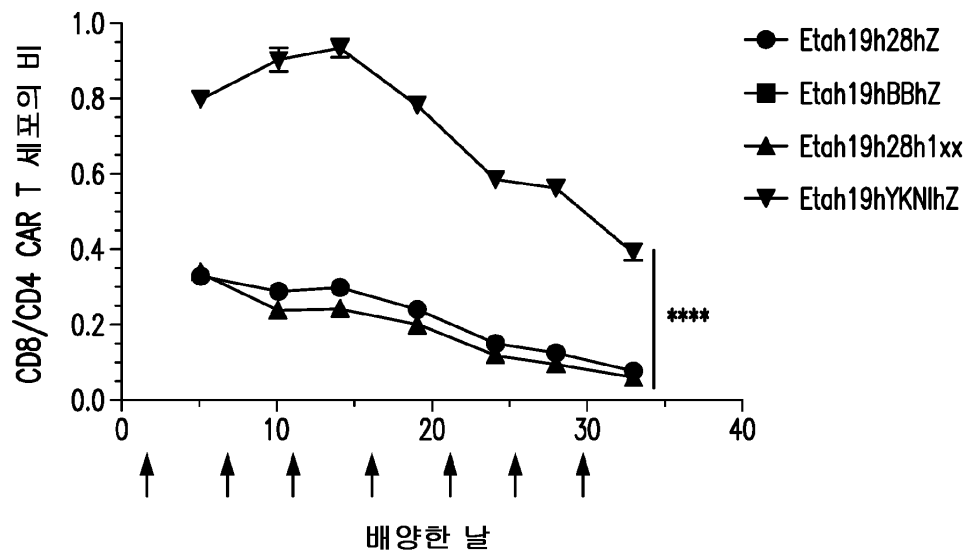


도면6

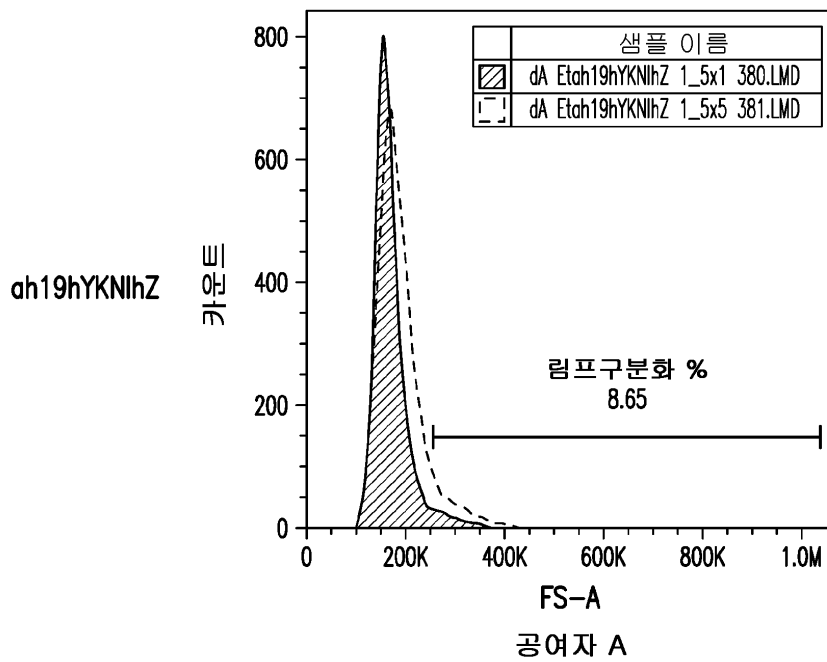
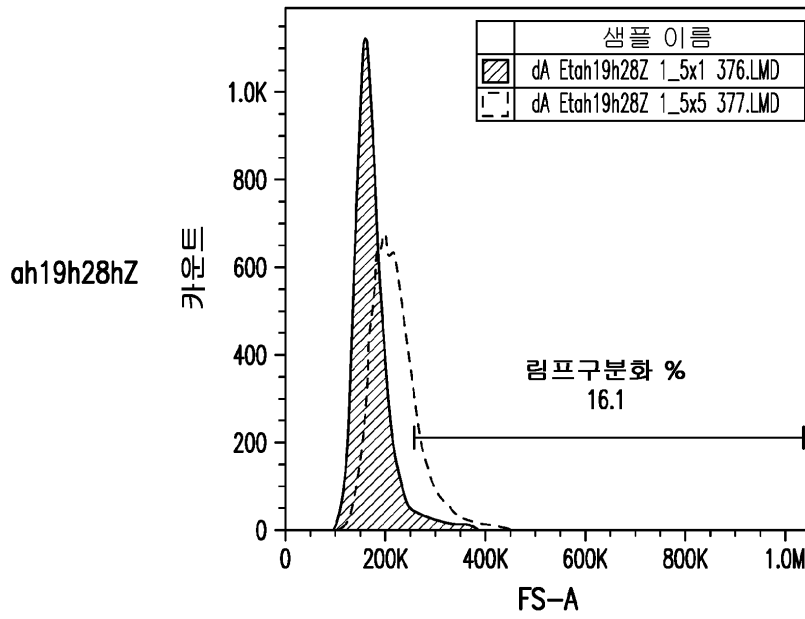


도면7

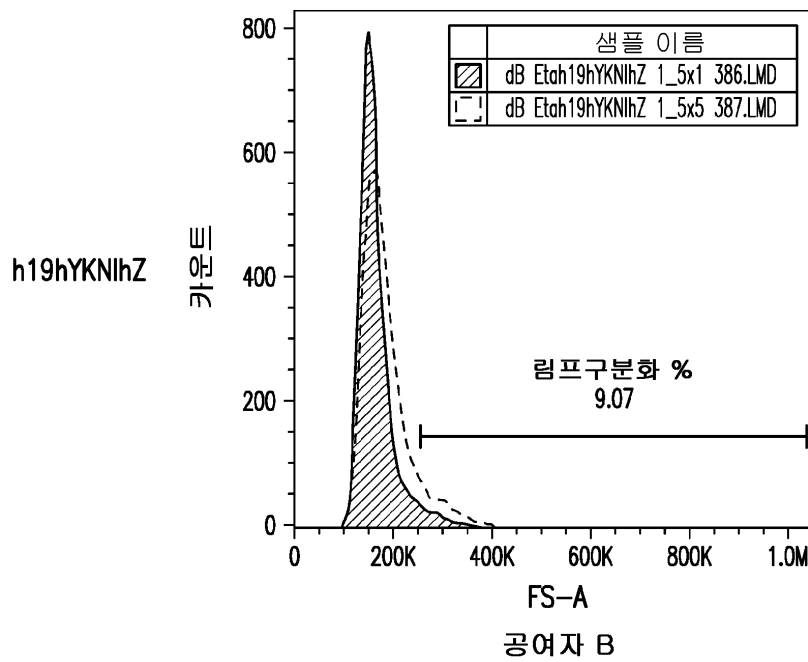
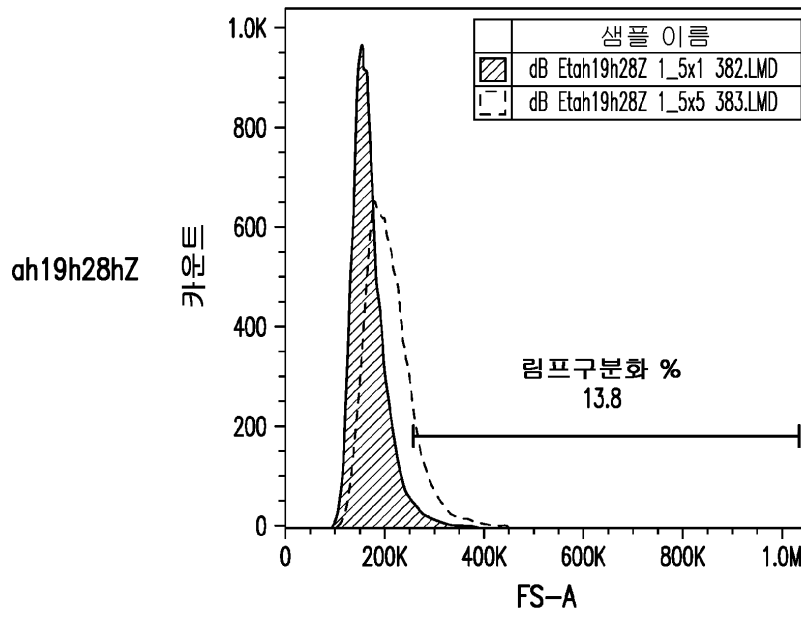
반복적 자극을 통한 CD8+CD4+ CAR T 세포의 비



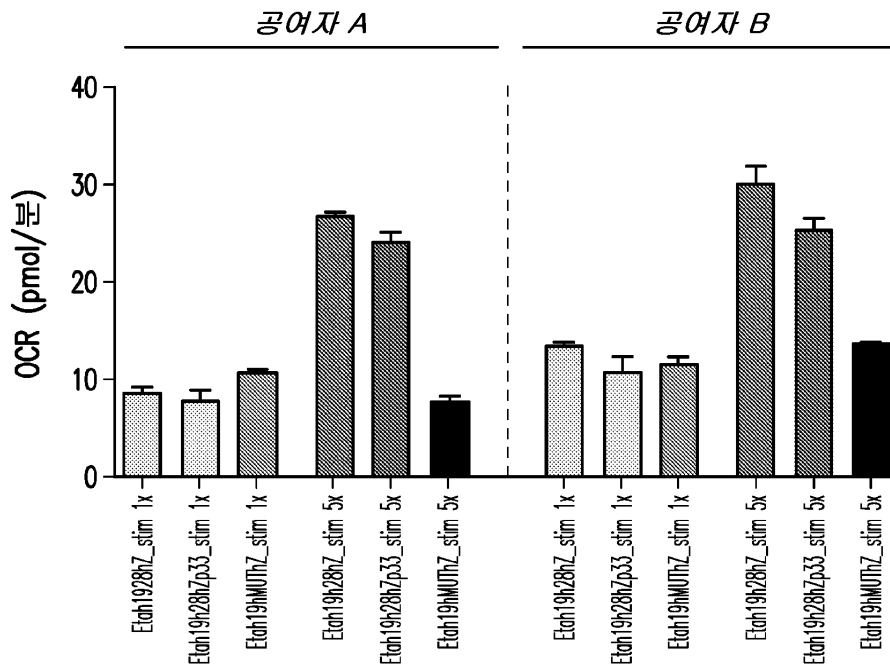
도면 8a



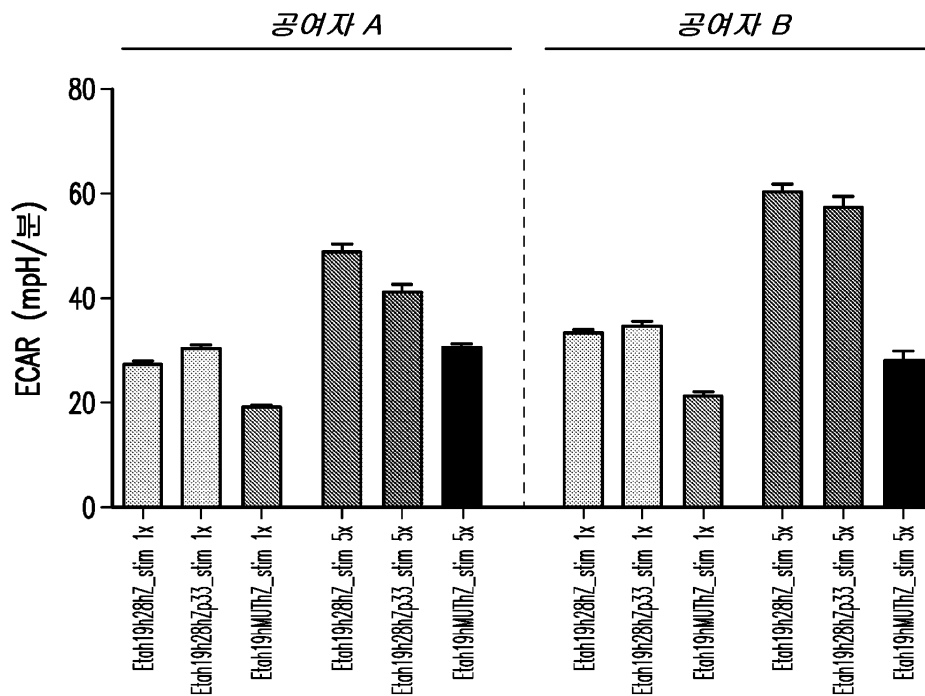
도면 8b



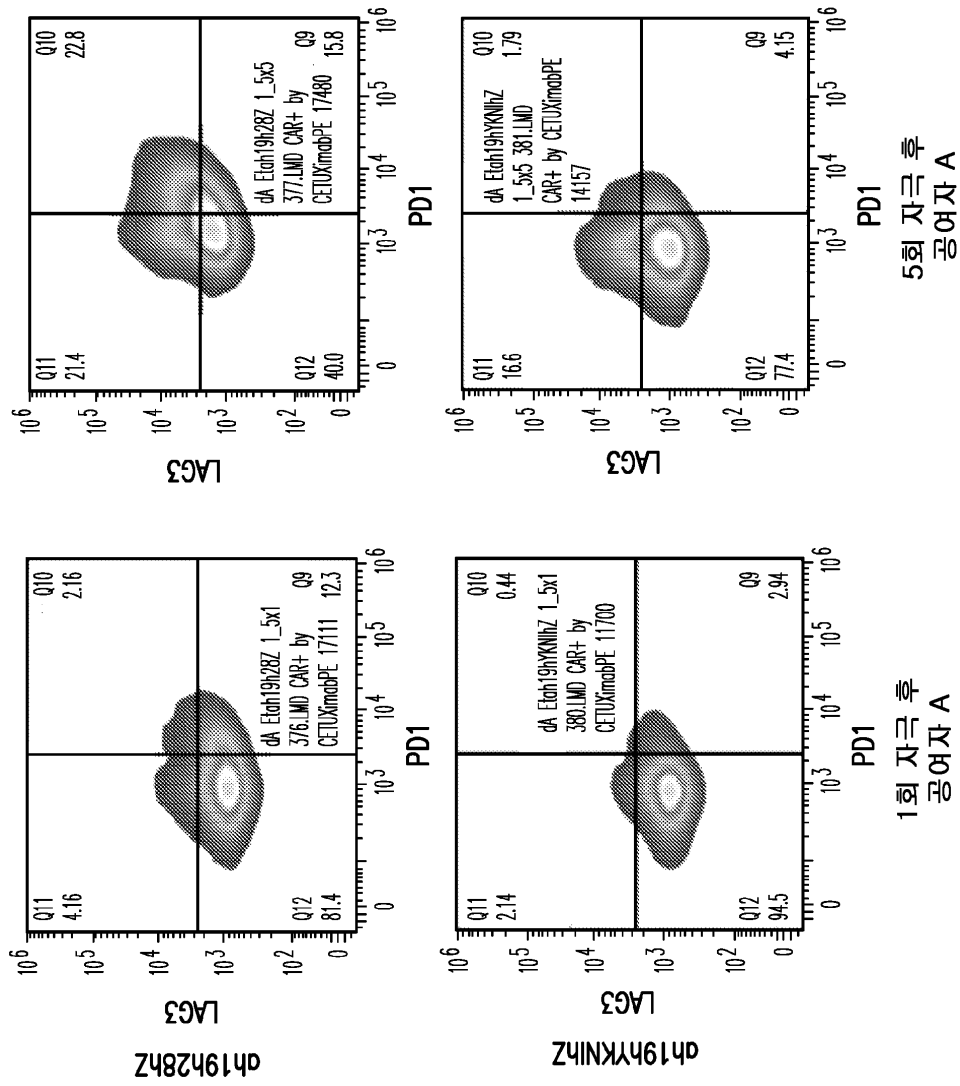
도면9a



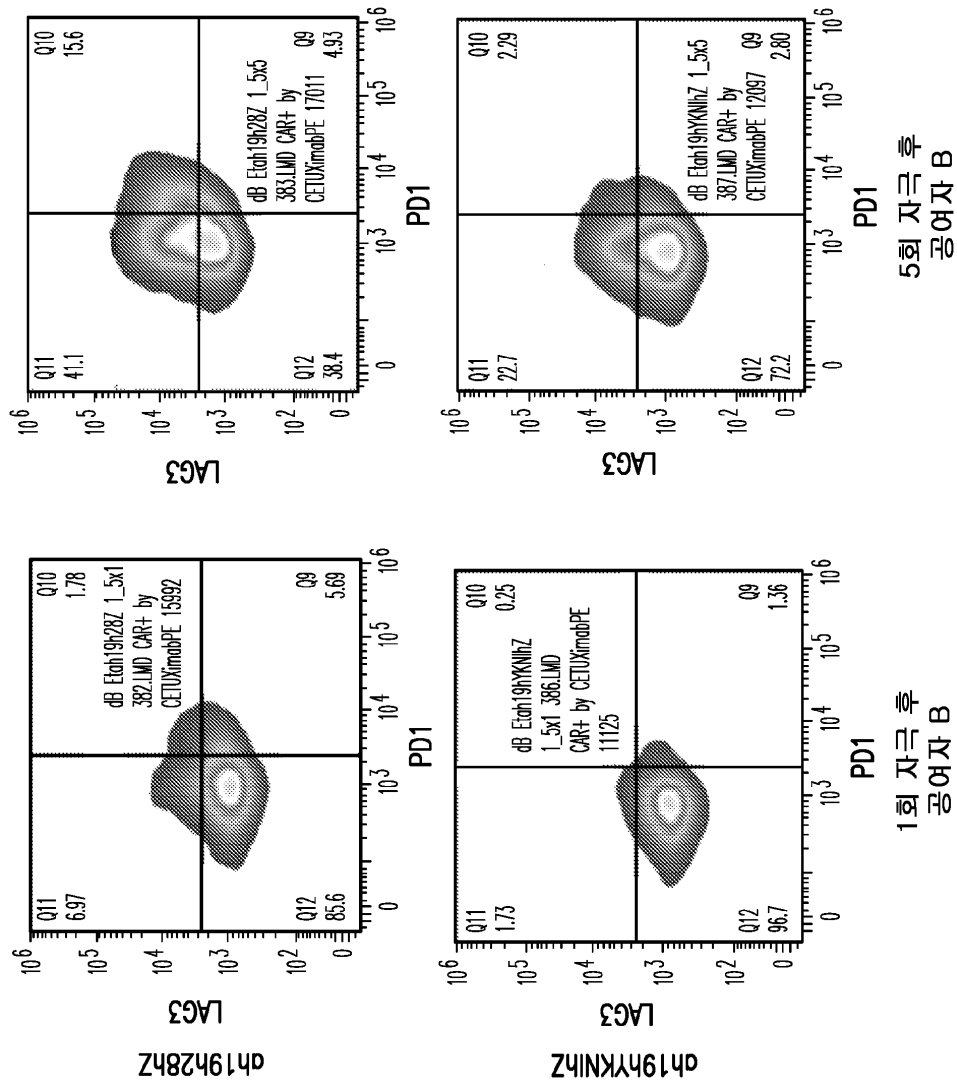
도면9b



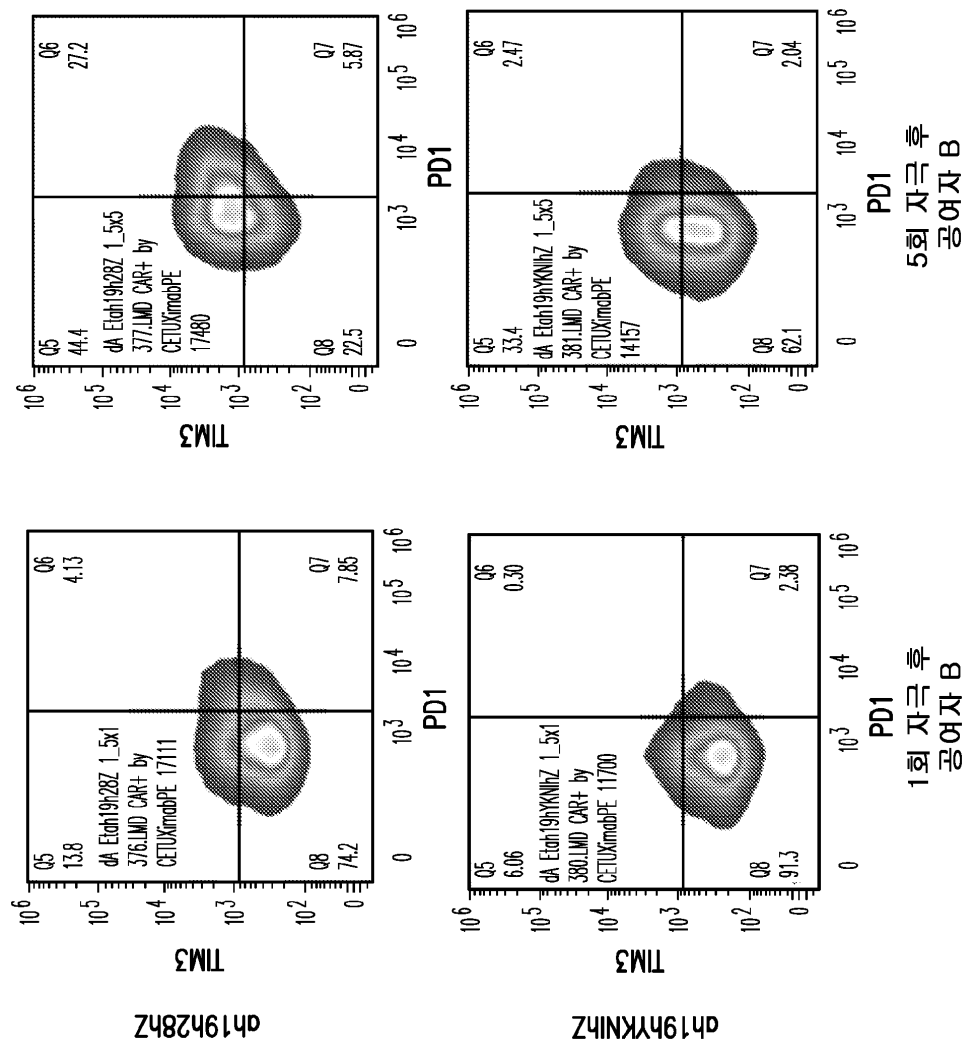
도면10aa



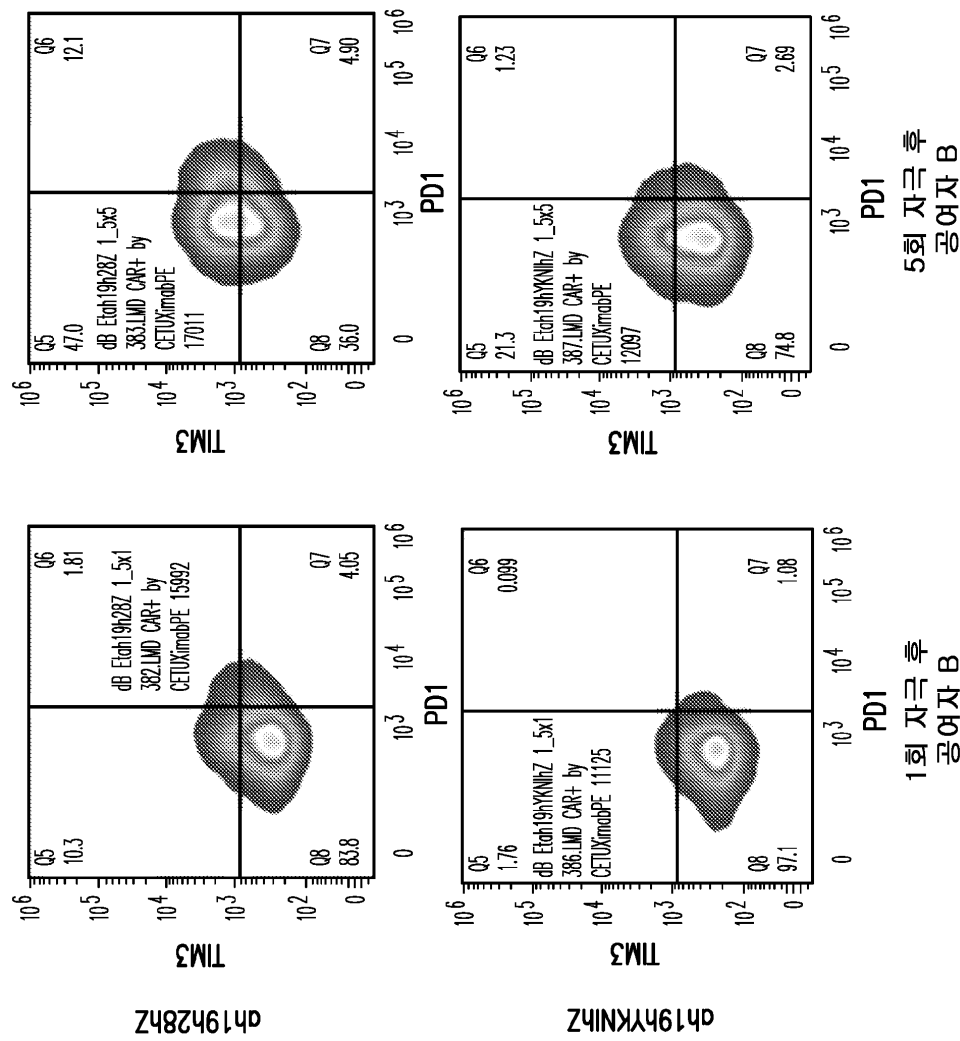
도면10ab



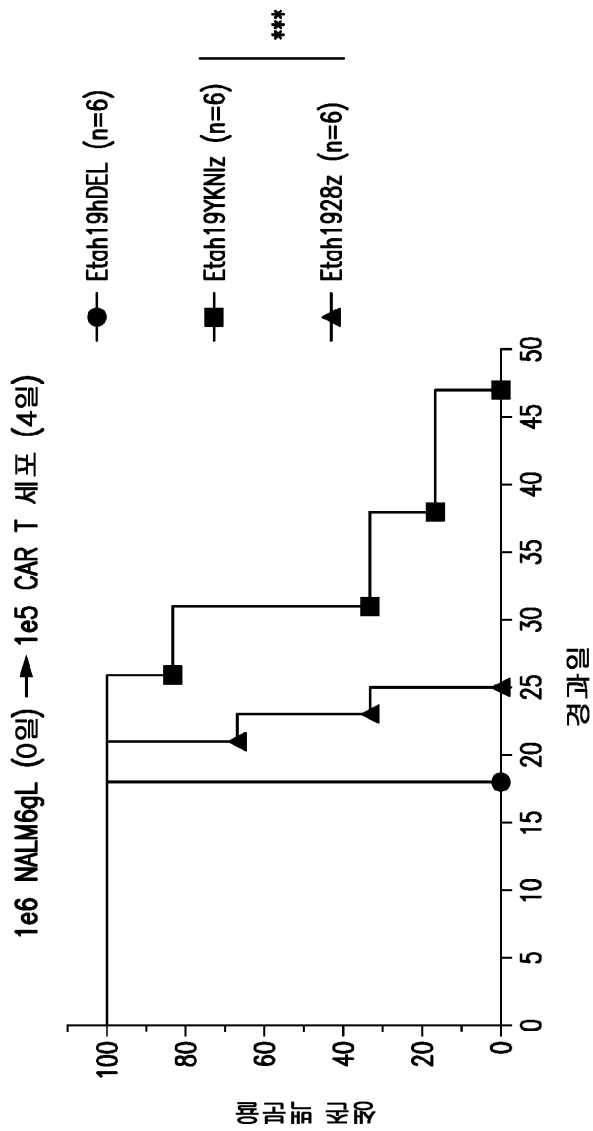
도면10ba



도면10bb



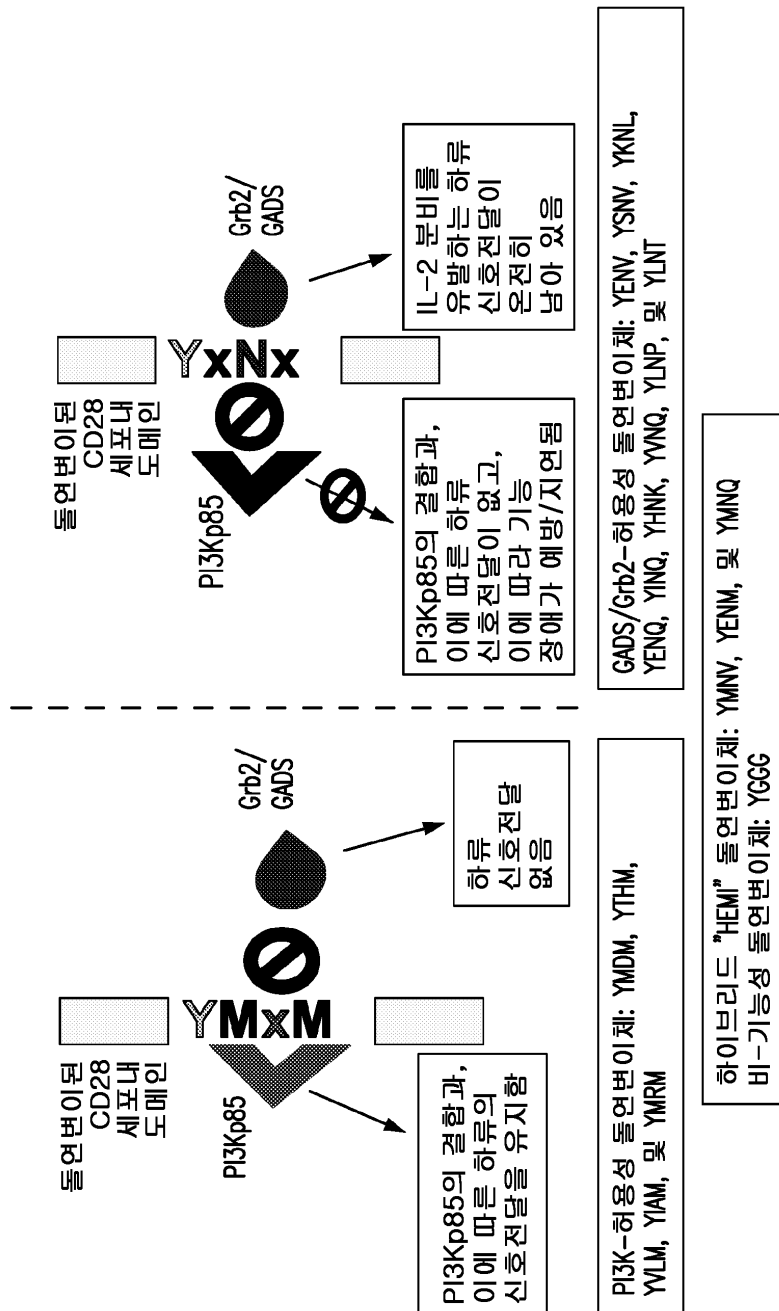
도면11



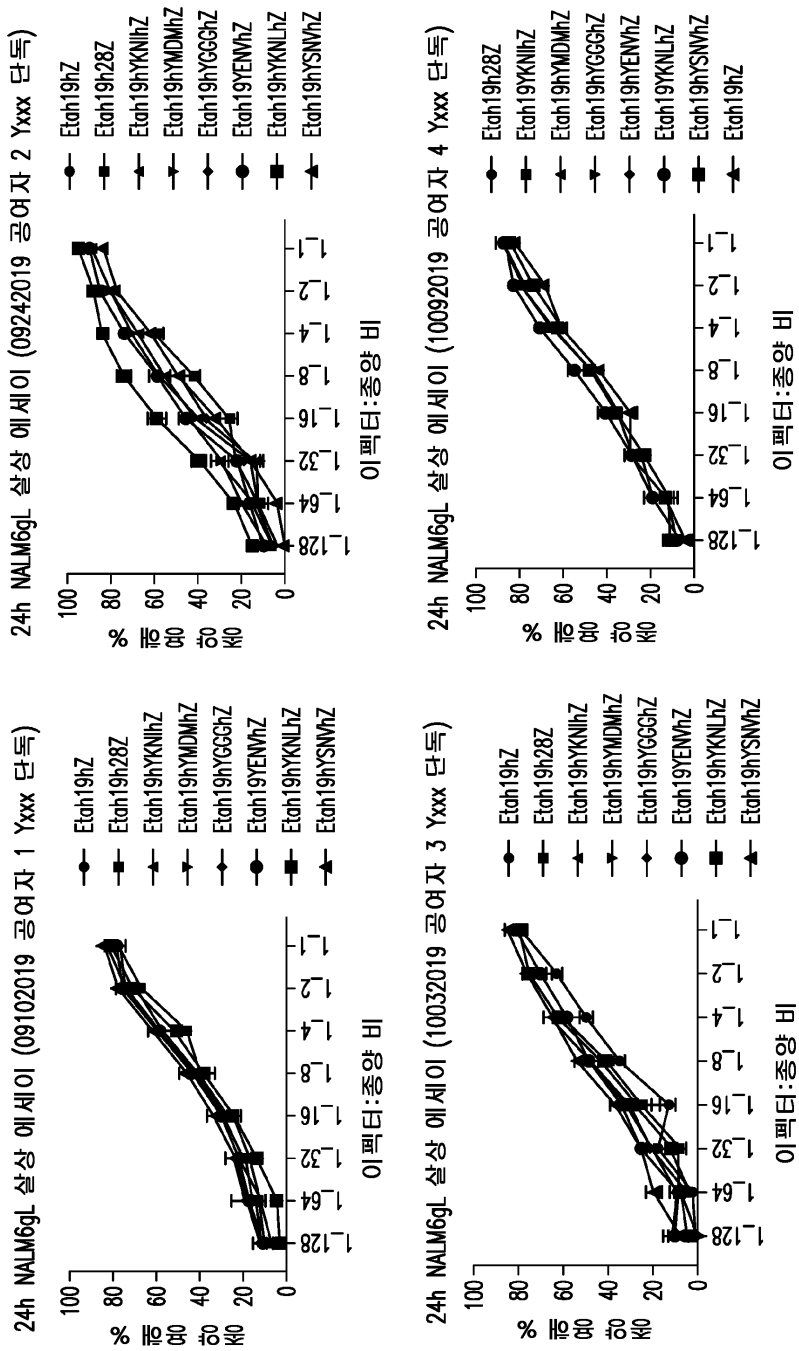
	Etah19YKNLz (n=6)	Etah1928z (n=6)	Etah19hDEL (n=6)
중앙 생존	31	23	18

P 값	<0.0001
P 값 요약	****
생존 곡선이 현저하게 상이한가?	예

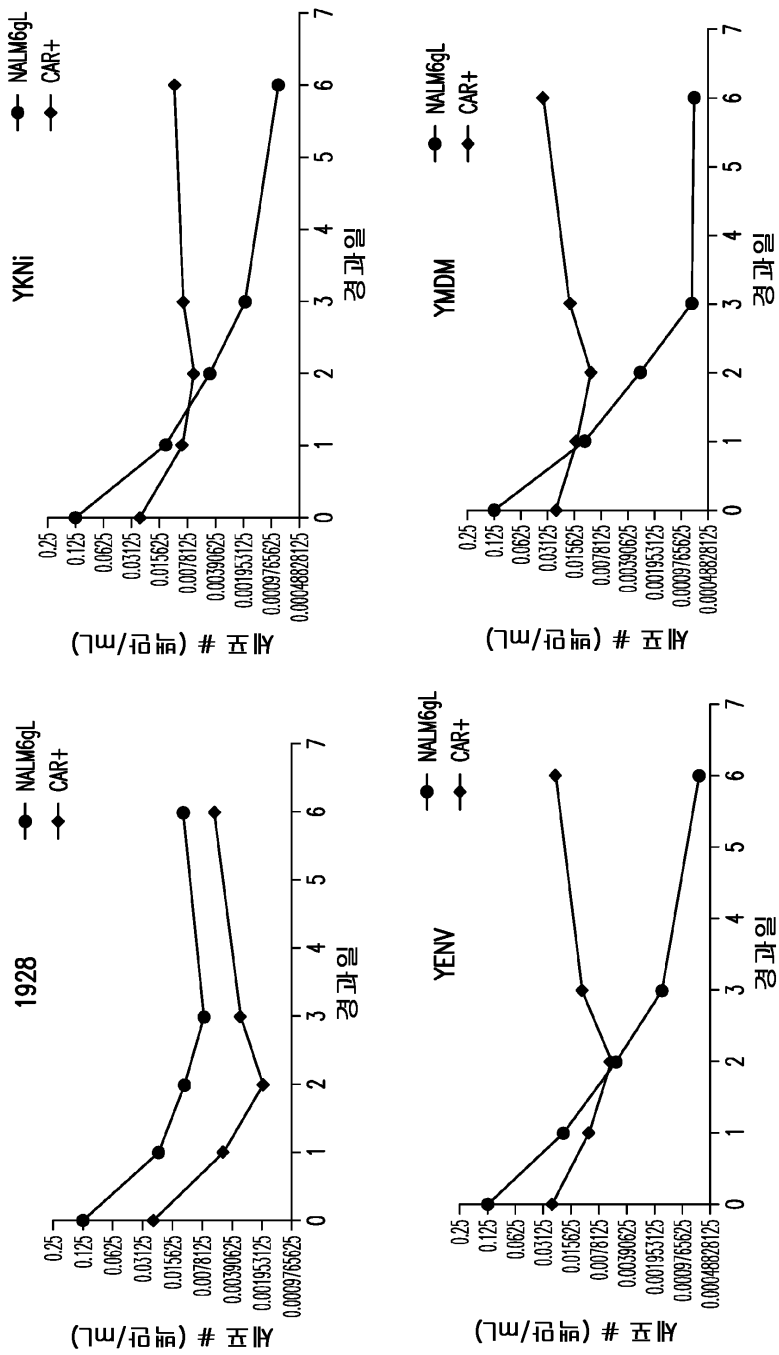
도면12



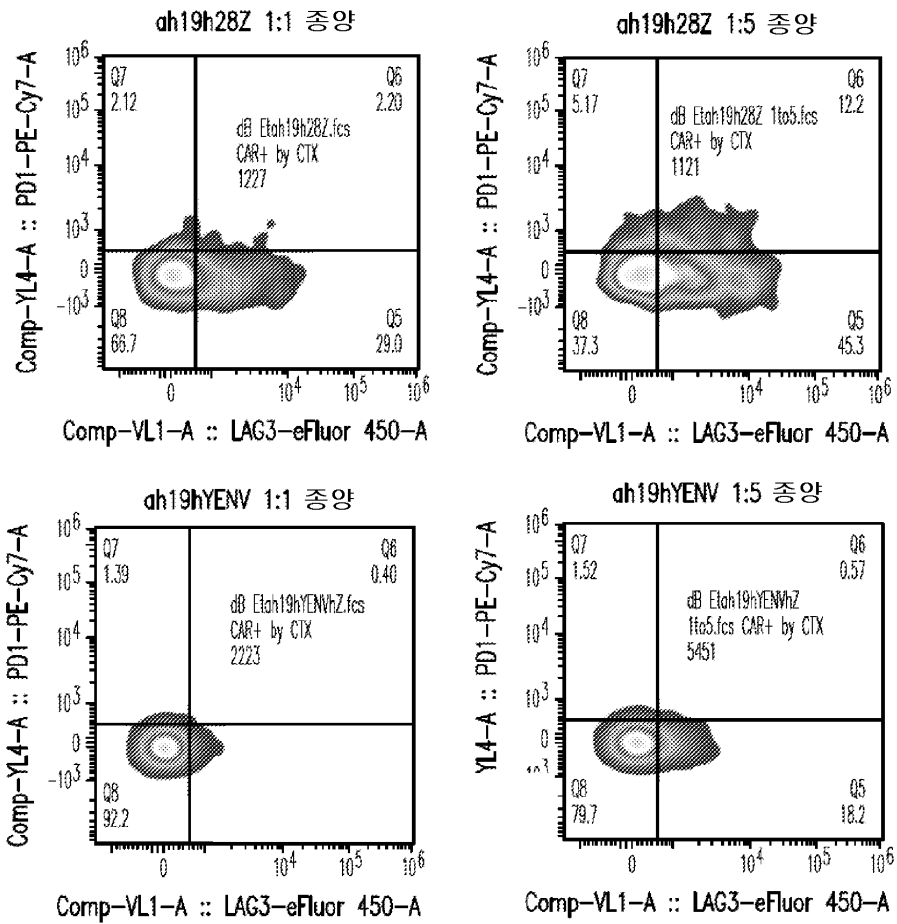
도면13



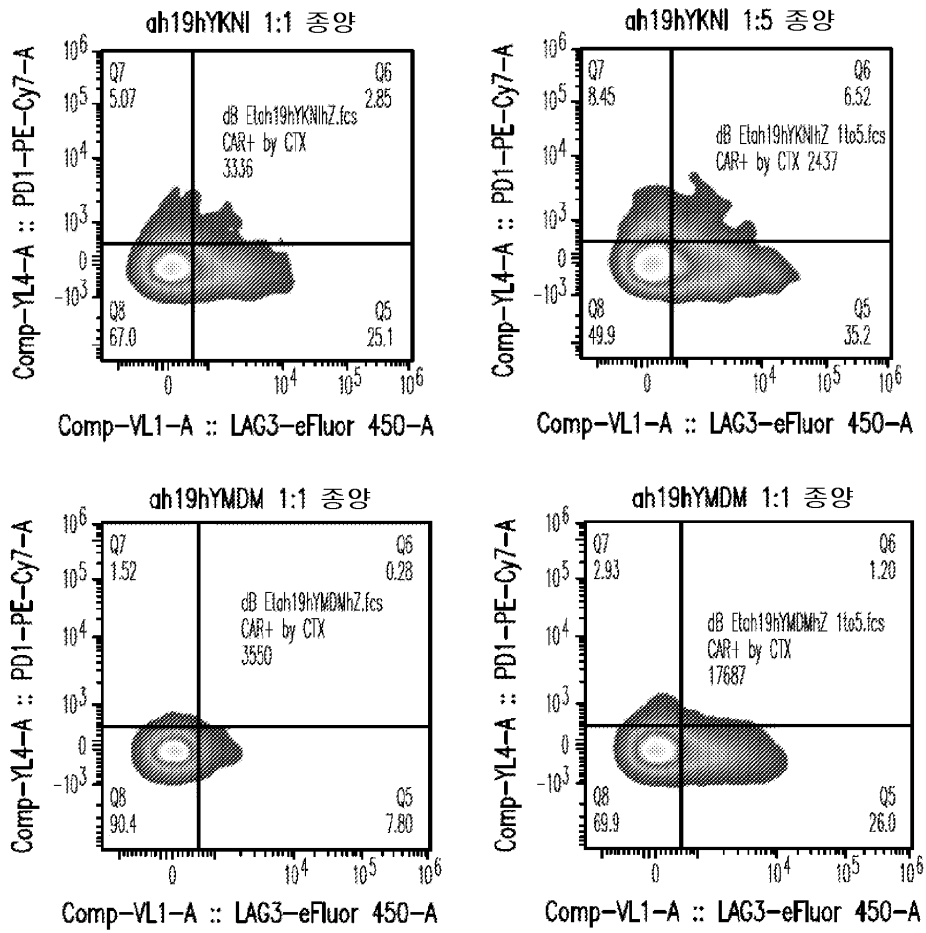
도면14



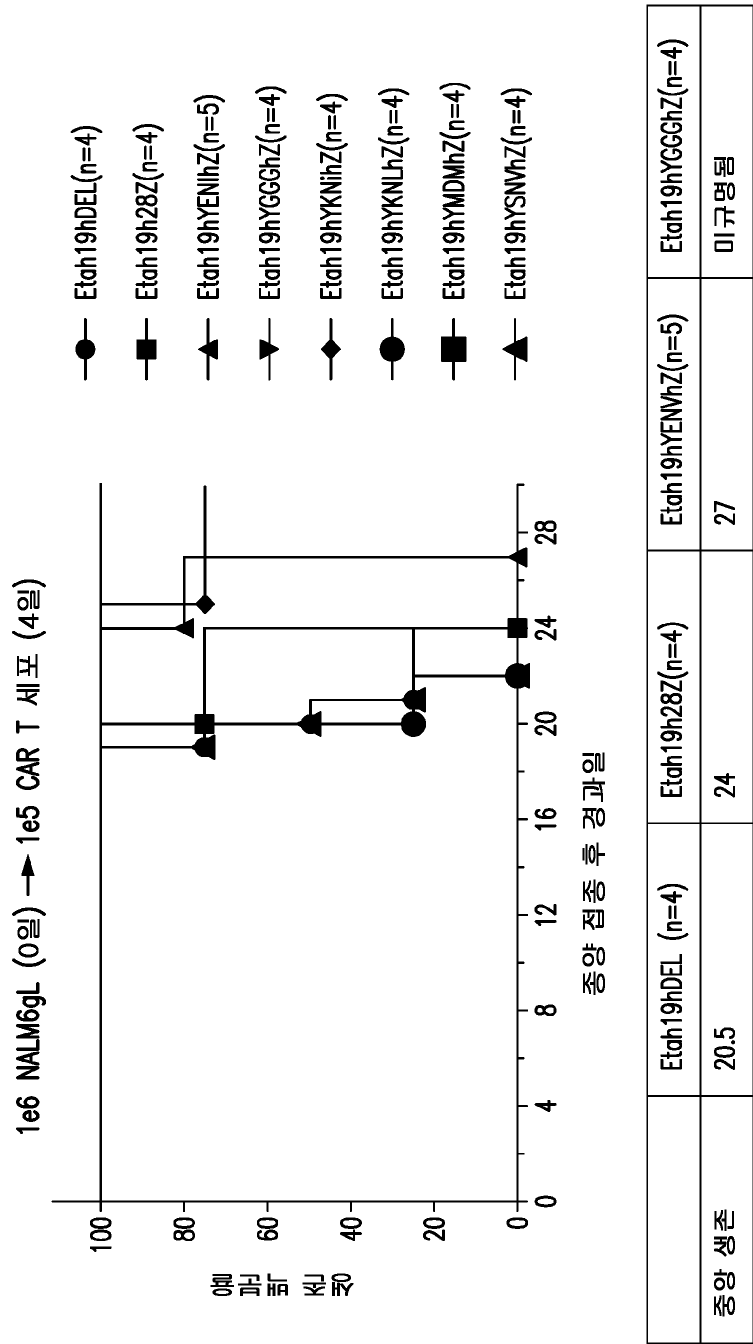
도면15a



도면15b



도면16

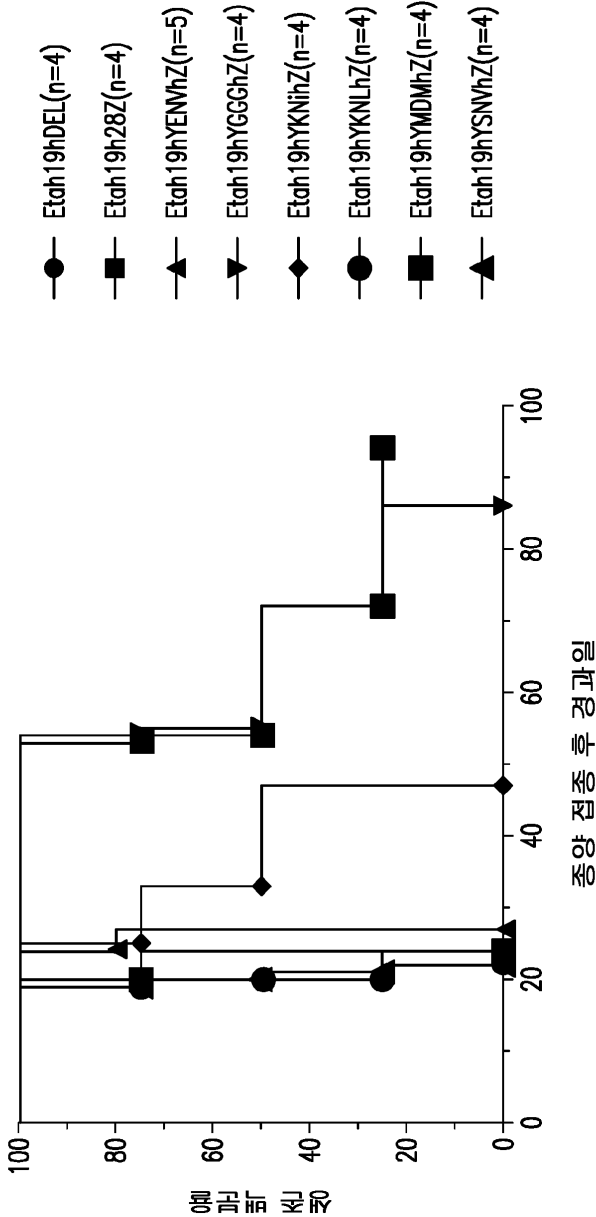


	Etah19hDEL (n=4)	Etah19h28Z (n=4)	Etah19hYENhZ (n=5)	Etah19hYGGChZ (n=4)
중앙 생존	20.5	24	27	미규명됨

Etah19hYKNihZ (n=4)	Etah19hYKNLhZ (n=4)	Etah19hYMDMhZ (n=4)	Etah19hYSNVhZ (n=4)
미규명됨	20	미규명됨	20.5

도면17

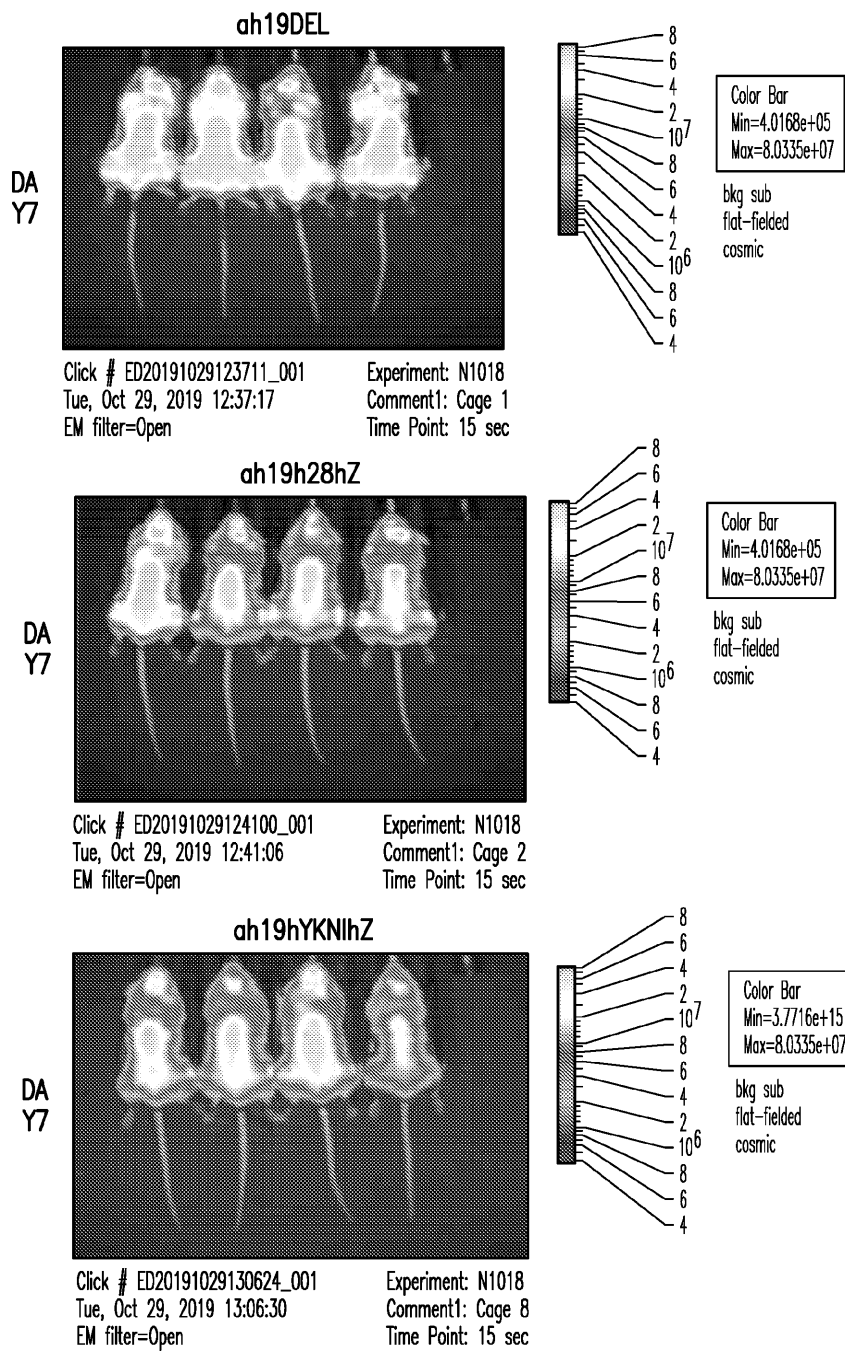
생존 비율: 20191018 NALM6gL Yxxx 단독 UTD 의 생존



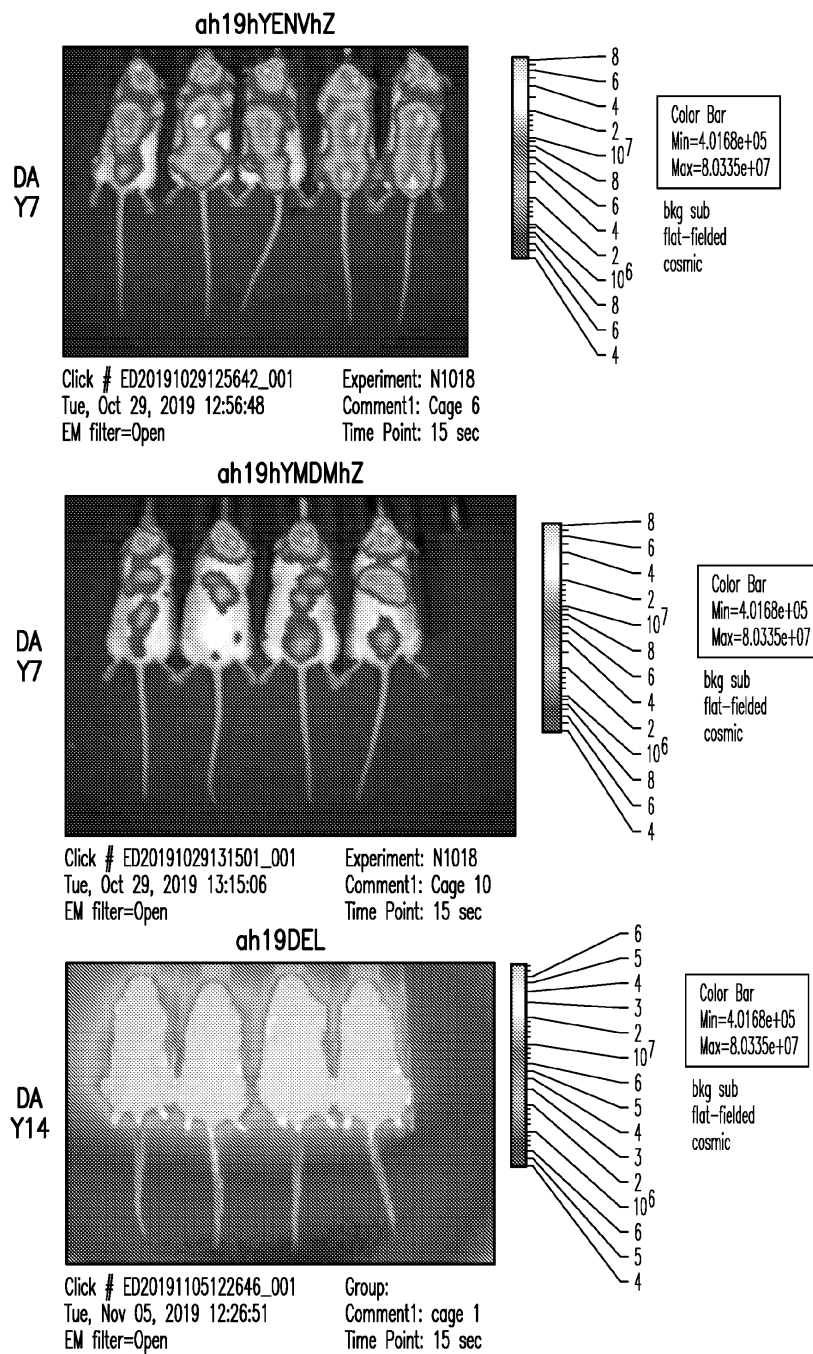
	Etah19hDEL (n=4)	Etah19h28Z(n=4)	Etah19hYENVhZ(n=5)	Etah19hYGGGhZ(n=4)
중앙 생존	20.5	24	27	63.5

Etah19hYKNLhZ(n=4)	Etah19hYKNLhZ(n=4)	Etah19hYMDMhZ(n=4)	Etah19hYSNVhZ(n=4)
40	20	63	20.5

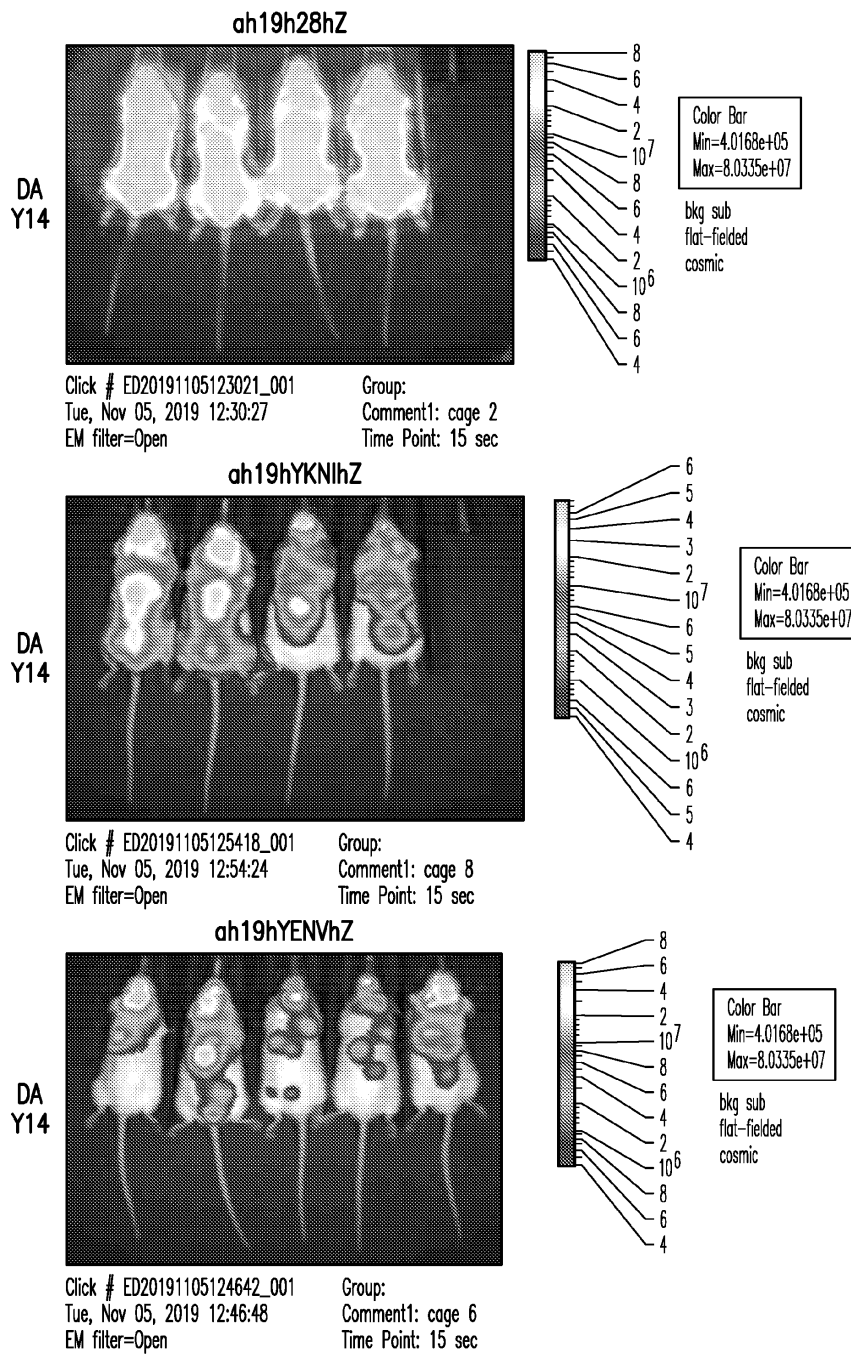
도면18a



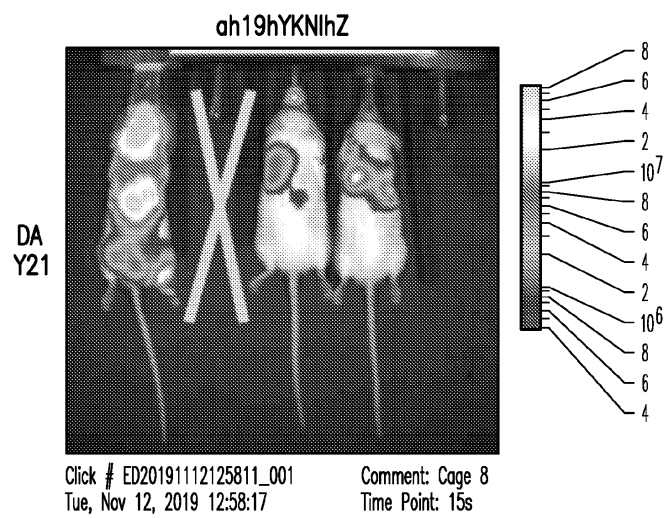
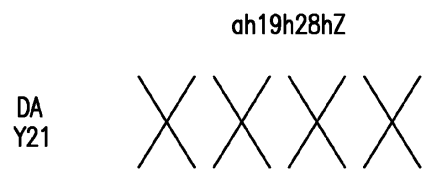
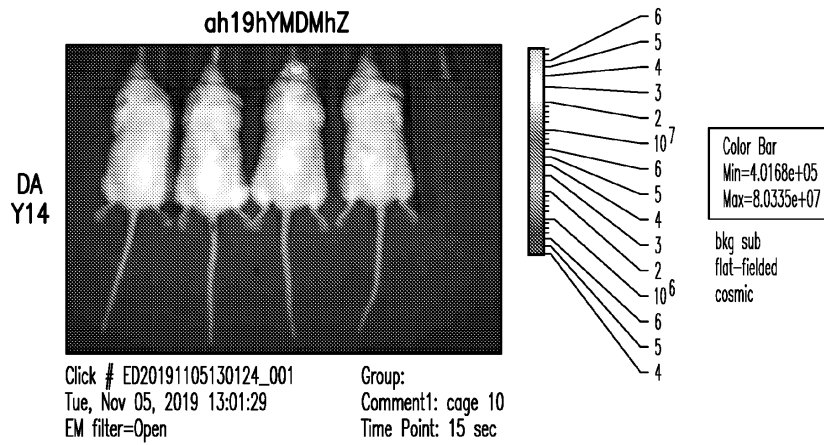
도면18b



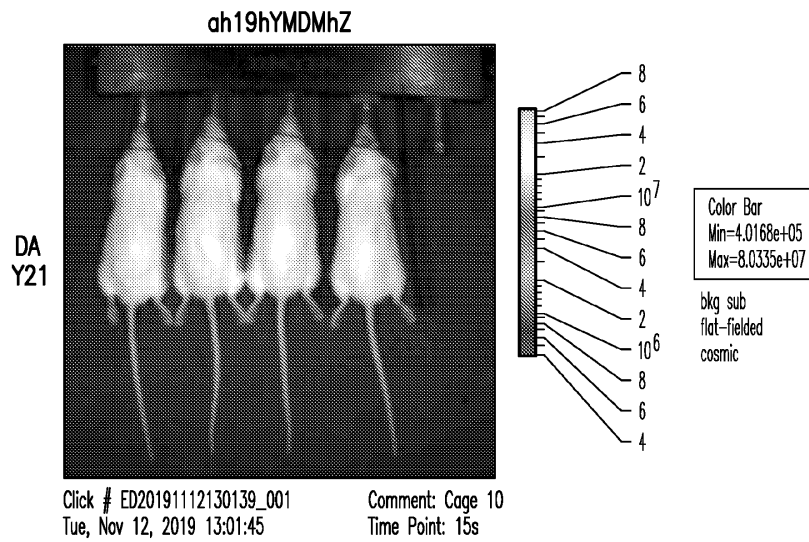
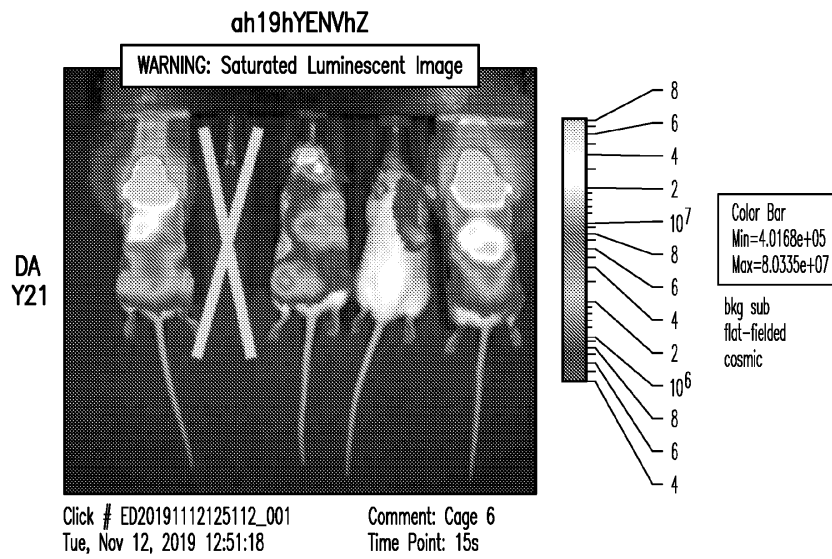
도면18c



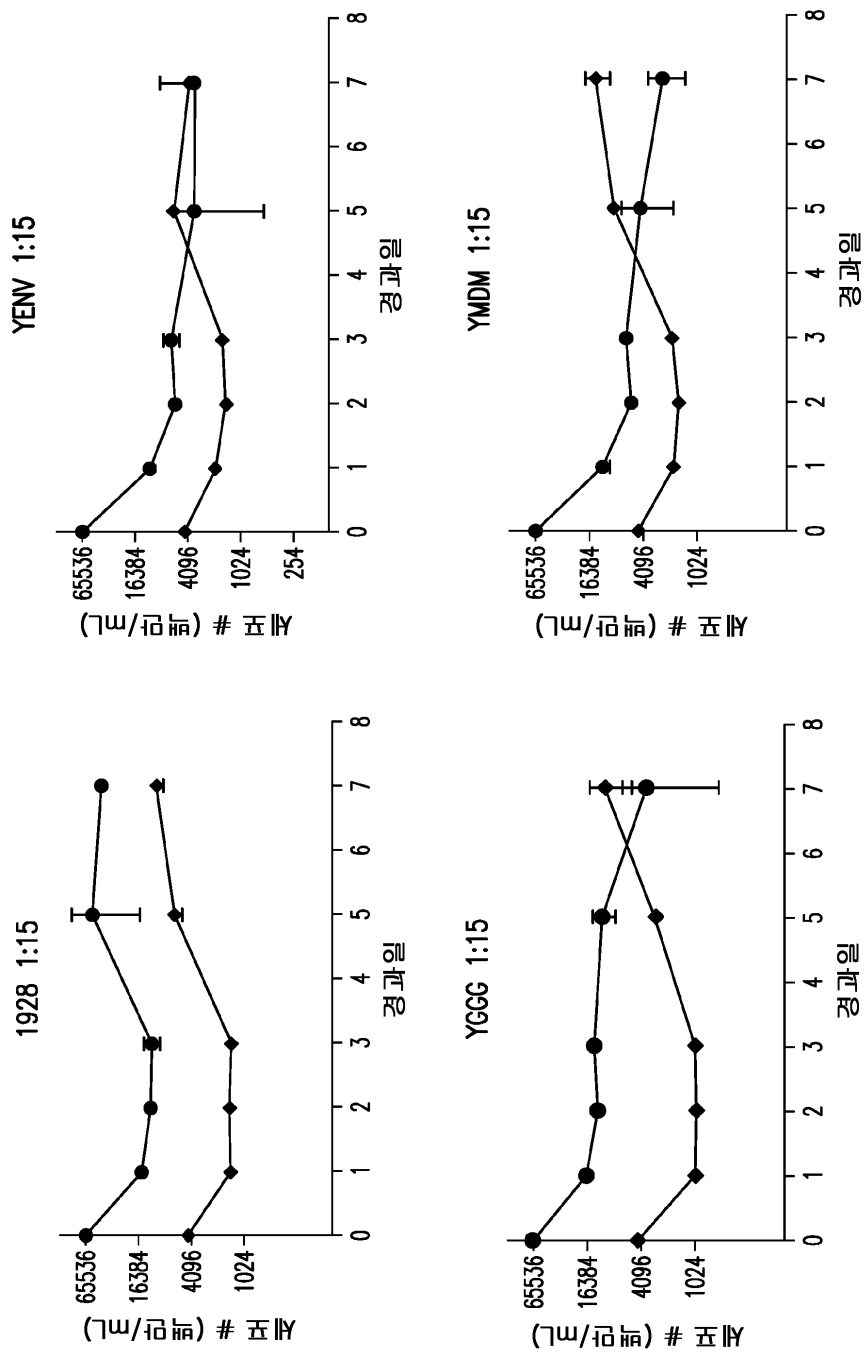
도면18d



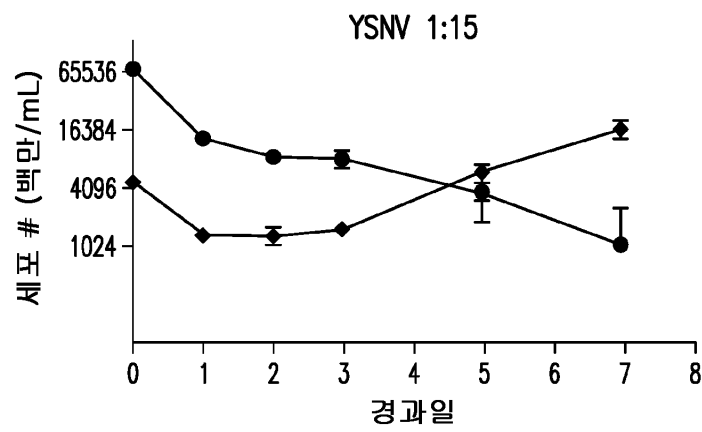
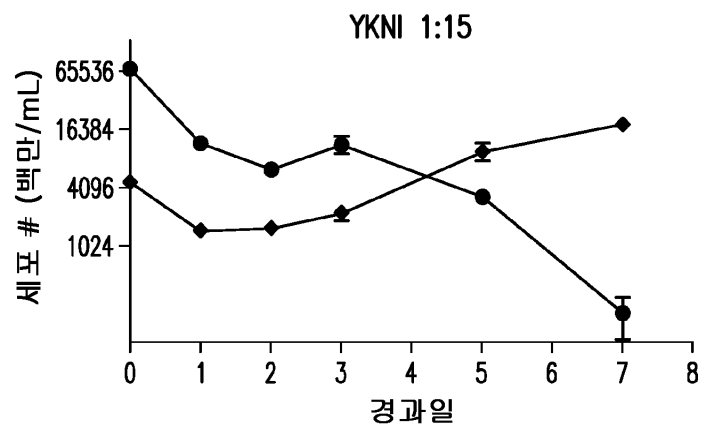
도면18e



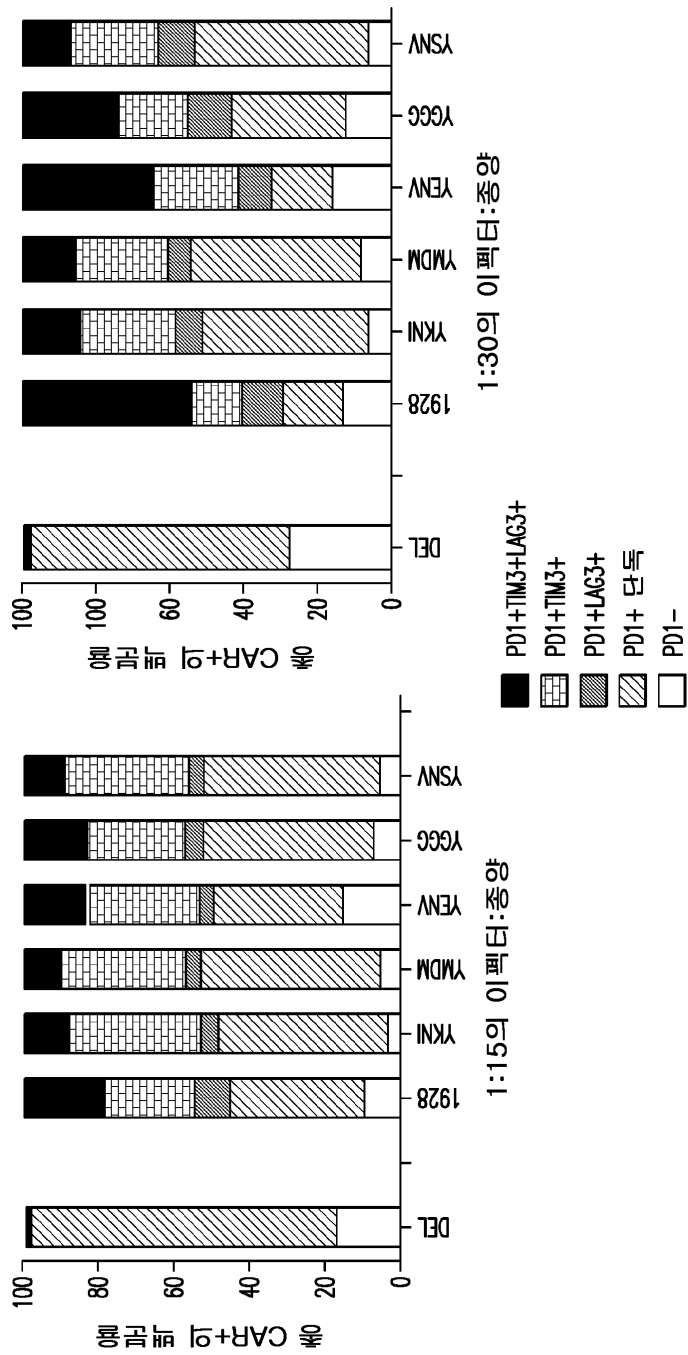
도면19a



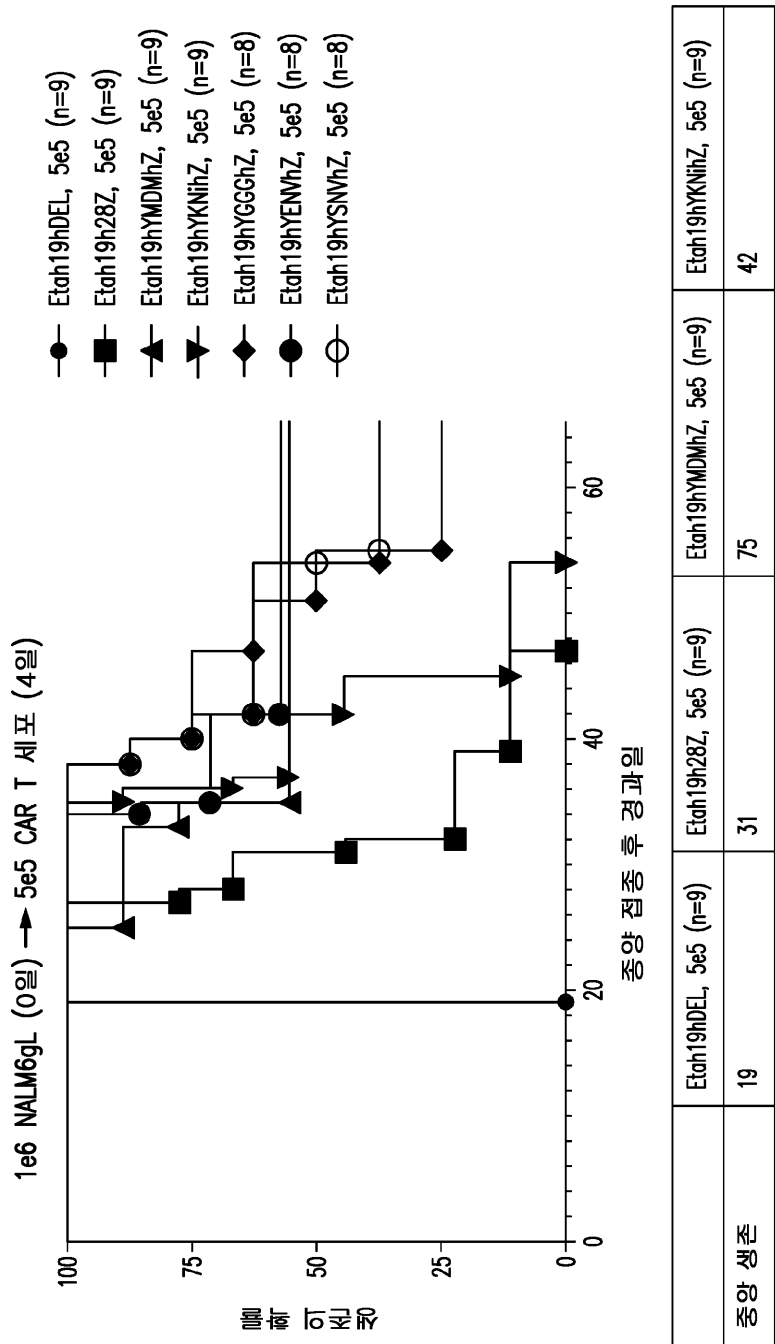
도면19b



도면20



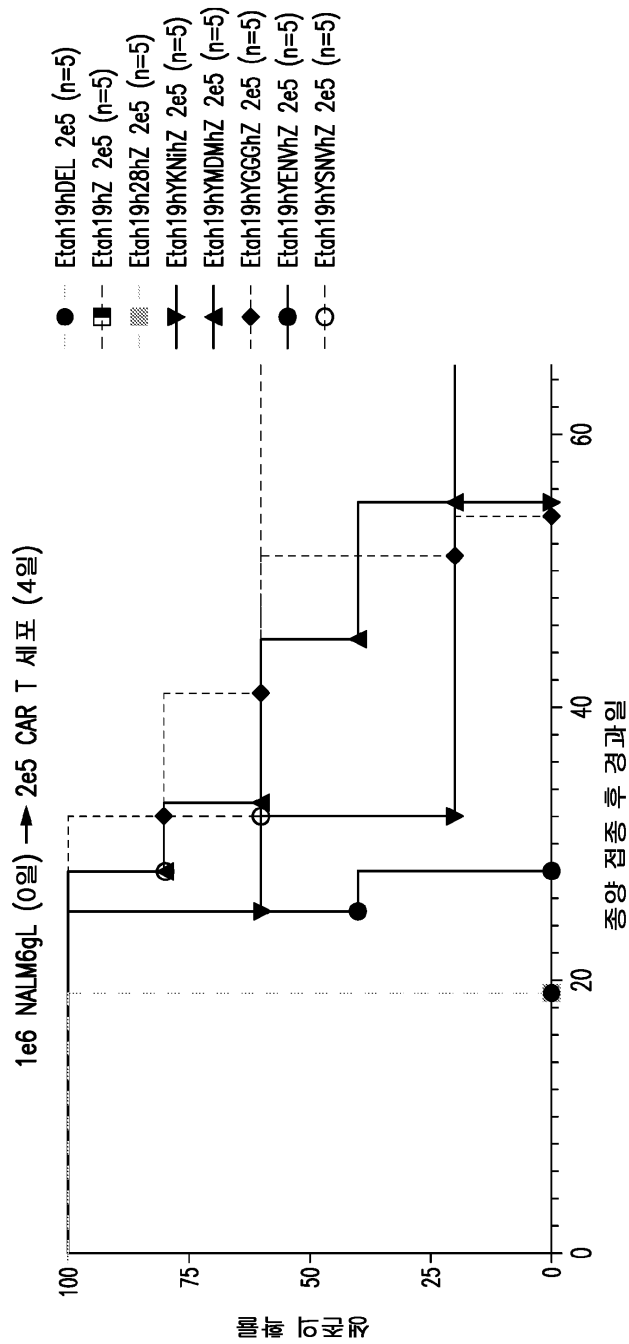
도면21



종양 생존	Etah19hDEL, 5e5 (n=9)	Etah19h28Z, 5e5 (n=9)	Etah19hYMDMhZ, 5e5 (n=9)	Etah19hYKNIhZ, 5e5 (n=9)
	19	31	75	42

Etah19hYGGGhZ, 5e5 (n=8)	Etah19hYENWhZ, 5e5 (n=8)	Etah19hYSNVhZ, 5e5 (n=8)
52.5	미규명됨	54.5

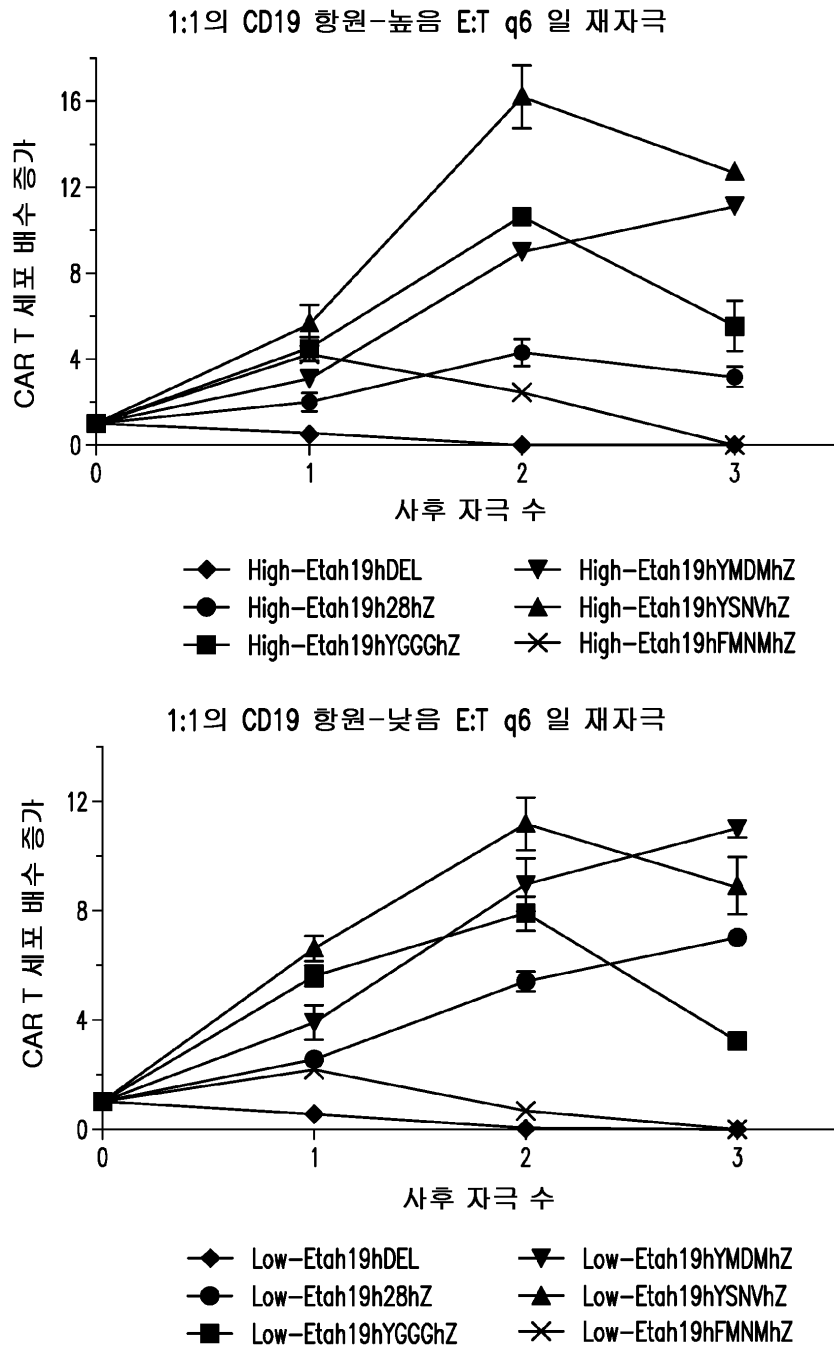
도면22



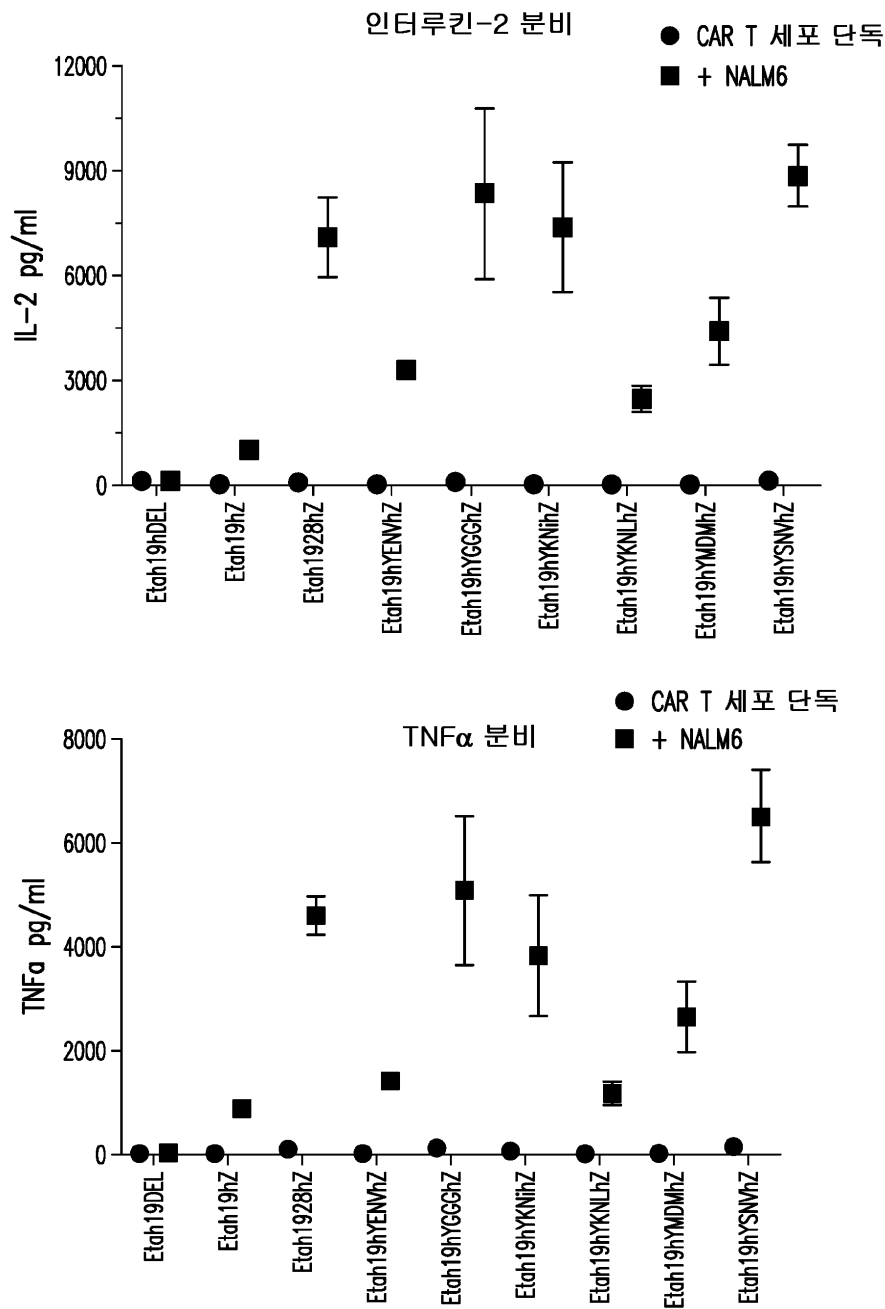
	Etah19hDEL 2e5 (n=5)	Etah19hZ 2e5 (n=5)	Etah19h28hZ 2e5 (n=5)	Etah19hYKNihZ 2e5 (n=5)
중앙 생존	19	19	19	32

Etah19hYMDMhZ 2e5 (n=5)	Etah19hYGGGhZ 2e5 (n=5)	Etah19hYENWhZ 2e5 (n=5)	Etah19hYSNWhZ 2e5 (n=5)
45	51	25	67

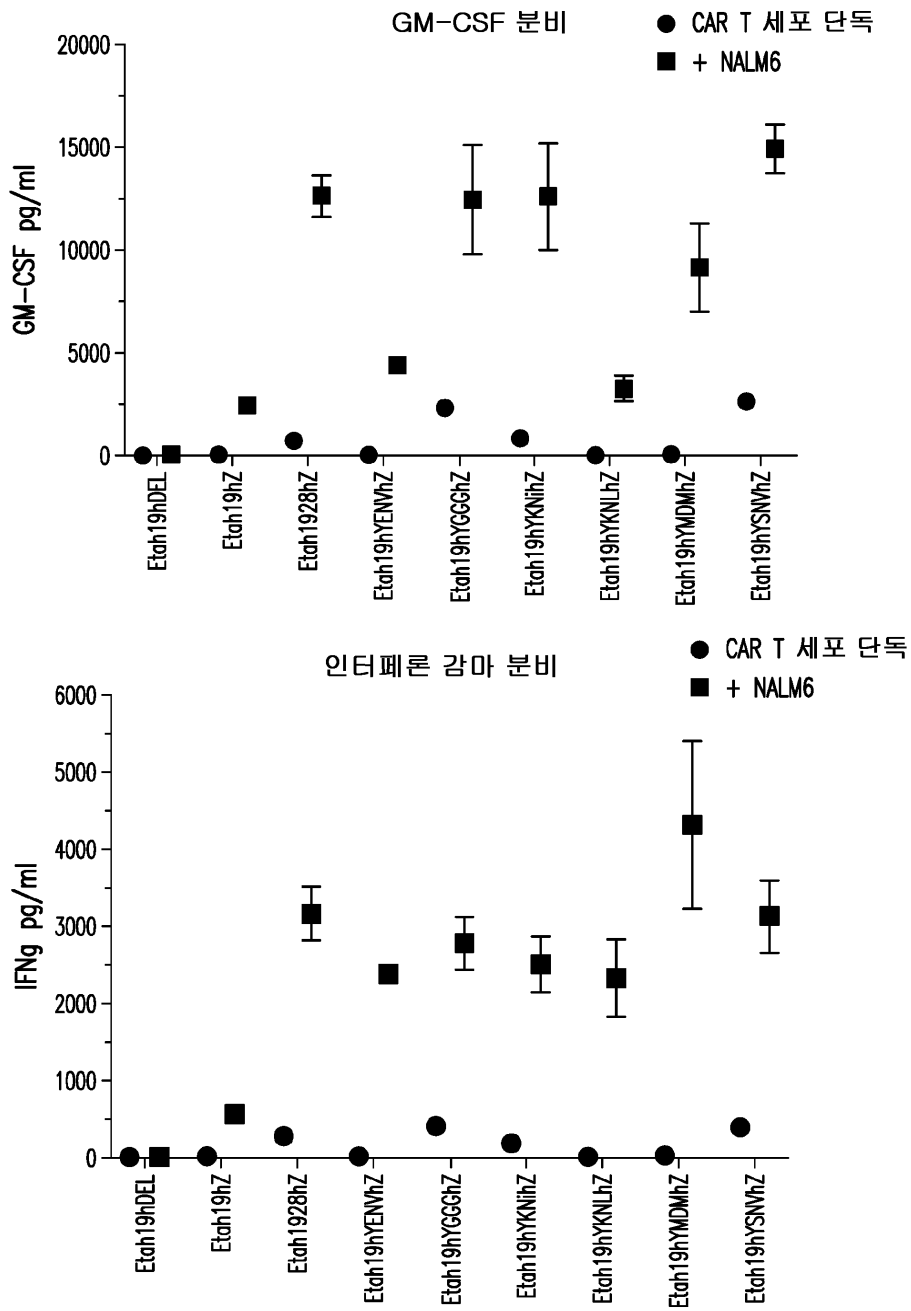
도면23



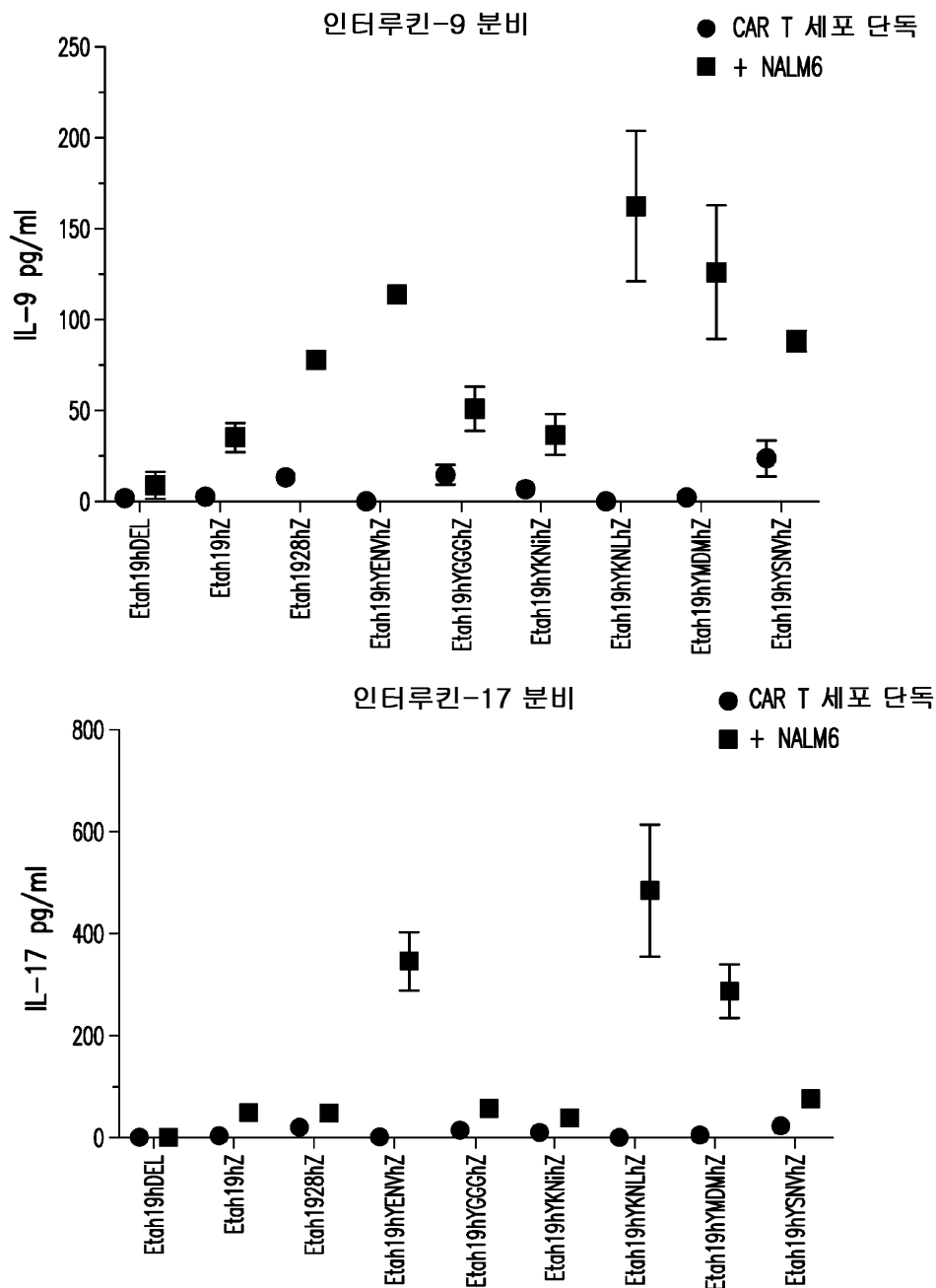
도면24a



도면24b



도면24c



서열목록

- <110> MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER
- <120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS WITH CD28 MUTATIONS AND USE THEREOF
- <130> 2022-FPA-1644
- <150> US 62/970,401
- <151> 2020-02-05
- <160> 87
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 272
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
 20 25 30
 Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
 35 40 45
 Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
 50 55 60
 Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
 65 70 75 80
 Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
 85 90 95
 Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110
 Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125
 Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140
 Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160
 Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175
 Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190
 Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
 195 200 205
 Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
 210 215 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
260 265 270

<210> 2

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
145 150 155 160

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

	165		170		175										
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Thr	Tyr	Arg	Asn
	180		185		190										
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
	195		200		205										
Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Val	Gln	Ser	Lys	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe
	210		215		220										
Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
225			230		235		240								

Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

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

1 5 10 15

<210> 6

<211> 6

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Gly Tyr Ala Phe Ser Ser

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Tyr Pro Gly Asp Gly Asp

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr

1 5

<210> 12

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr

20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser

35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu

50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser

65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr

85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys

100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
 115 120 125
 Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
 130 135 140
 Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 145 150 155 160
 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 180 185 190
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 195 200 205
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 210 215 220

<210> 13
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 13

Thr Thr Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Thr
 20 25 30
 Gly Gly Cys Thr Thr Gly Cys Thr Ala Thr Ala Gly Cys Thr Thr Gly
 35 40 45
 Cys Thr Ala Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Thr
 50 55 60
 Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Thr
 65 70 75 80

Gly

<210> 14
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Met Thr Leu Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Asn Phe Phe Ser Val Gln
 1 5 10 15

Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Val Val
 20 25 30

Asp Ser Asn Glu Val Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn Leu Leu
 35 40 45

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

50 55 60
 Glu Val Cys Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro Gln Phe Arg
 65 70 75 80

Ser Asn Ala Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr Val
 85 90 95

Thr Phe Arg Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr Phe
 100 105 110

Cys Lys Ile Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Arg
 115 120 125

Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr
 130 135 140

Gln Ser Ser Pro Lys Leu Phe Trp Ala Leu Val Val Val Ala Gly Val
 145 150 155 160

Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Leu Val Thr Val Ala Leu Cys Val Ile Trp
 165 170 175

Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met
 180 185 190

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Leu Thr Arg Lys Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala

195 200 205

Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Pro

210

215

<210> 15

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

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 Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr

20

25

30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser

35

40

45

Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala

50

55

60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala

65

70

75

80

Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp

85

90

95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr

100

105

110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe

115

120

125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

130

135

140

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

145

150

155

160

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

165

170

175

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

180

185

190

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
 195 200 205
 Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
 210 215 220
 Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
 225 230 235
 <210> 16
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 16
 Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Met

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

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

 145 150 155 160

Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu
165 170 175

Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala
180 185 190

Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Pro
195 200 205

Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys
210 215 220

Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro
225 230 235 240

Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
245

<210> 17
<211> 164
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 17

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160
Leu Pro Pro Arg

<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18
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> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 19

Tyr Met Asn Met

1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but not an aspartic acid (N); In certain embodiments, x is selected from the group consisting of amino acids A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<400> 20

Tyr Met Xaa Met

1

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but is not a methionine (M). In certain embodiments, x is selected from the group consisting of amino acids A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but is not a methionine (M). In certain embodiments, x is selected from the group

consisting of amino acids A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P,
S, T, W, Y, V, and L.

<400> 21

Tyr Xaa Asn Xaa

1

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

Tyr Glu Asn Val

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

Tyr Ser Asn Val

1

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Tyr Lys Asn Leu

1

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

Tyr Glu Asn Gln

1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

Tyr Lys Asn Ile

1

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

Tyr Ile Asn Gln

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

Tyr His Asn Lys

1

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

Tyr Val Asn Gln

1
 <210> 30
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 30

Tyr Leu Asn Pro

1
 <210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
 <400> 31

Tyr Leu Asn Thr

1
 <210> 32
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 32

Tyr Met Asp Met

1
 <210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but not a methionine (M). In certain embodiments, x is selected from the group

consisting of amino acids A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P,

S, T, W, Y, V, and L.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but not an aspartic acid (N). In certain embodiments, x is selected from the group consisting of amino acids A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<400> 33

Tyr Xaa Xaa Met

1

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

Tyr Thr His Met

1

<210> 35

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

Tyr Val Leu Met

1

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

Tyr Ile Ala Met

1

<210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

Tyr Met Arg Met

1

<210> 38

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but not a methionine (M); In certain embodiments, x is selected from the group consisting of amino acids A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<400> 38

Tyr Met Asn Xaa

1

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but not a methionine (M); In certain embodiments, x is selected from the group

consisting of amino acids A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P,
S, T, W, Y, V, and L.

<400> 39

Tyr Xaa Asn Met

1

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

Tyr Met Asn Val

1

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

Tyr Glu Asn Met

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

Tyr Met Asn Gln

1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but not a methionine (M). In certain embodiments, x is selected from the group consisting of A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but is not an aspartic acid (N). In certain embodiments, x is selected from the group consisting of A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but not a methionine (M). In certain embodiments, x is selected from the group consisting of A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<400> 43

Tyr Xaa Xaa Xaa

1

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

Tyr Gly Gly Gly

1

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

Tyr Ala Ala Ala

1

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

Tyr Phe Phe Phe

1

<210> 47

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Glu Asn Val Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 48

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Lys Asn Ile Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 49
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 49
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asp Met Thr

1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 50
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 50
 Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

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

	85	90	95
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu			
	100	105	110
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln			
	115	120	125
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys			
	130	135	140
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro			
145	150	155	160
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala			
	165	170	175
Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu			
	180	185	190
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu			
	195	200	205
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
	210	215	220
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
225	230	235	240
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
	245	250	255
<210>	51		
<211>	467		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic		
<400>	51		
Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30

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

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

195 200 205

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

210 215 220

Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro

245 250 255

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

260 265 270

Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe

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

 325 330 335
 Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala
 340 345 350
 Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 355 360 365
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 370 375 380
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 385 390 395 400

 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 405 410 415
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 420 425 430
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 435 440 445
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 450 455 460
 Pro Pro Arg
 465

<210> 52

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt

60

tcctgcaagg ctcttggtta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcttg gagatggtga tactaactac 180
aatggaaagt tcaagggta agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300
attagtccgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360

tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420
ctcaccagtg ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
aaggccagtc agaattgtgg tactaatgta gcctggtatc aacagaaacc aggacaatct 540
cctaaaccac tgattttact ggcaacctac cggaacagtg ggtccctga tcgcttcaca 600
ggcagtggtg ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660
gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720
ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctcctta cctagacaat 780

gagaagagca atggaacat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtcacctc 840
tttcccgagc ctcttaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 900
tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960
ctctgcaca gtgactacat ggatatgact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1020
taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080
aggagcgcag acgccccgcg gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200

gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260
aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcggccggag gggcaagggg 1320
cacgatggcc ttaccagggt tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380
atgcaggccc tgccccctcg c 1401

<210> 53

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro
 245 250 255
 Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly
 260 265 270

Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe
 275 280 285
 Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
 290 295 300

 Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg
 305 310 315 320
 Leu Leu His Ser Asp Tyr Glu Asn Val Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro
 325 330 335
 Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala
 340 345 350
 Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 355 360 365
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

 370 375 380
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 385 390 395 400
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 405 410 415
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 420 425 430
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 435 440 445

 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 450 455 460
 Pro Pro Arg
 465
 <210> 54
 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 54

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg ctcttggtta tgcattcagc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatggtga tactaactac 180
aatggaaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300
attagtccgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggc ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420
ctcaccagtc ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
aaggccagtc agaattgtgg tactaatgta gcctggatc aacagaaacc aggacaatct 540
cctaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgcttcaca 600
ggcagtggtt ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660

gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720
ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctctctta cctagacaat 780
gagaagacga atggaacat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtcacctc 840
tttcccgac ctcttaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 900
tatagcttgc tagtaacagt ggctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960
ctctgcaca gtgactatga aaatgtgact ccccgccgce ccgggcccac ccgcaagcat 1020
taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080

aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200
gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260
aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg 1320
cacgatggcc ttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380
atgcaggccc tgccccctcg ctag 1404

<210> 55
<211> 467
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

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

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

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

 130 135 140
 Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205

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

260 265 270
Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe

275 280 285
Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu

290 295 300
Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg

305 310 315 320
Leu Leu His Ser Asp Tyr Lys Asn Ile Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro

325 330 335
Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Pro Pro Arg

465

<210> 56

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60

tcctgcaagg ctcttggeta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatggtga tactaactac 180

aatggaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gggcctaac atctgaggac tctgcgtctt atttctgtgc aagaaagacc 300

attagtctgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360

tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420

ctcaccagct ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480

aaggccagtc agaattgtgg tactaatgta gcctggtatc aacagaaacc aggacaatct 540

cctaaaccac tgattttact ggcaacctac cggaacagtg gattccctga tcgcttcaca 600

ggcagtggtt ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660

gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720

ctggagatca aacggggcgc cgcaattgaa gttatgtatc ctctctctta cctagacaat 780

gagaagagca atggaacctat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtcacctta 840

tttcccgac cttctaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 900

tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960

ctcctgcaca gtgactataa aaacattact ccccgccgcc ccggggccac ccgaagcat 1020

taccagcctt atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080

aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140

ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200

gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260

aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320

cacgatggcc ttaccagggt tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380

atgcaggccc tgccccctcg c 1401

<210> 57

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 57

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro

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

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

385 390 395 400
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
405 410 415
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
420 425 430
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
435 440 445
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
450 455 460

Pro Pro Arg

465

<210> 58

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 58

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg ctcttggtta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttattcctg gagatggtga tactaactac 180
aatggaaagt tcaagggta agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300

attagtctgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420
ctcacccagt ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
aaggccagtc agaattgtgg tactaatgta gcctggatc aacagaaacc aggacaatct 540
cctaaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgcttcaca 600
ggcagtggat ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660
gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720

ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctctctta cctagacaat 780
gagaagagca atggaacctat tatccatgtg aaagggaac acccttgtcc aagtcacctc 840
tttcccgac ctcttaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 900
tatagcttgc tagtaacagt ggcccttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960
ctctgcaca gtgactactc aaatgttact ccccgccgcc ccggggccac ccgcaagcat 1020
taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080
aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140

ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200
gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260
aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcggcgag gggcaagggg 1320
cacgatggcc ttaccagggt tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380
atgcaggccc tgccccctcg c 1401

<210> 59

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 59

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

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

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

145 150 155 160
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
180 185 190
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
210 215 220

Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro
 245 250 255
 Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly
 260 265 270
 Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe
 275 280 285
 Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
 290 295 300
 Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg
 305 310 315 320
 Leu Leu His Ser Asp Tyr Lys Asn Leu Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro
 325 330 335
 Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala
 340 345 350
 Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 355 360 365
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 370 375 380
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 385 390 395 400
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 405 410 415
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 420 425 430
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 435 440 445
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 450 455 460
 Pro Pro Arg
 465
 <210> 60
 <211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 60

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt	60
tcttgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg	120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatggtga tactaactac	180
aatggaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac	240
atgcagctca gcgccctaac atctgaggac tctgcgtctt atttctgtgc aagaaagacc	300
attagtctgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc	360
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag	420
ctcaccagct ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc	480
aaggccagtc agaattgtgg tactaatgta gcctggatc aacagaaacc aggacaatct	540
cctaaaccac tgattttact ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgcttcaca	600
ggcagtggat ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg	660
gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag	720
ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctctctta ctagacaat	780
gagaagagca atggaacctat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtcacctt	840
tttcccgac cttctaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc	900
tatatcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg	960
ctcctgcaca gtgactacaa aaacttgact ccccgccgcc ccgggcccac ccgaagcat	1020
taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc	1080
aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat	1140
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg	1200
gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat	1260
aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcggccgag gggcaagggg	1320
cacgatggcc ttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac	1380
atgcaggccc tgccccctcg c	1401

<210> 61

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 61

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

195 200 205

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

210 215 220

Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys

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

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

 340 345 350
 Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 355 360 365
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 370 375 380
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 385 390 395 400
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 405 410 415

 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 420 425 430
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 435 440 445
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 450 455 460
 Pro Pro Arg
 465
 <210> 62

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 62

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60

tctctgaagg ctcttggtta tgcattcagc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatggtga tactaactac 180

aatggaaagt tcaagggcca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300

attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360

tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420

ctcaccagtc ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480

aaggccagtc agaattgtgg tactaatgta gcctgggtatc aacagaaacc aggacaatct 540

cctaaaccac tgattttact ggcaacctac cggaacagtg ggtccctga tcgcttcaca 600

ggcagtggtt ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660

gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720

ctggagatca aacggggcgc cgcaattgaa gttatgtatc ctctctctta cctagacaat 780

gagaagagca atggaacat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtcacctc 840

tttcccgagc ctcttaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 900

tatagcttgc tagtaacagt ggcttttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960

ctctgcaca gtgactacgg tggagggact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1020

taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080

aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140

ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga cctgagatg 1200

gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260

aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320

cacgatggcc ttiaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380

atgcaggccc tgccccctcg c 1401

<210> 63

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 63

Tyr Gly Gly Gly

1

<210> 64

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 64

Tyr Ser Asn Val

1

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but is not an aspartic acid (N). In certain embodiments, x is selected from the group consisting of amino acids A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is any naturally occurring amino acid, but is not a methionine (M). In certain embodiments, x is selected from the group

consisting of amino acids A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V, and L.

<400> 65

Tyr Met Xaa Xaa

1
 <210> 66
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 66
 Tyr Asp Asn Asp

1
 <210> 67
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 67
 Tyr Glu Asn Ile

1
 <210> 68
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
 <400> 68
 Tyr Glu Asn Leu

1
 <210> 69
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 69
 Tyr Glu Thr Val

1
 <210> 70

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 70

Tyr Gln Gln Gln

1

<210> 71
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 71

Tyr His Ala Glu

1

<210> 72
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 72

Tyr Lys Asn Gln

1

<210> 73
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 73

Tyr Lys Asn Val

1

<210> 74
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 74

Tyr Leu Asp Leu

1

<210> 75

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 75

Tyr Leu Ile Pro

1

<210> 76

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 76

Tyr Leu Arg Val

1

<210> 77

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 77

Tyr Met Ala Pro

1

<210> 78

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 78

Tyr Met Asn Leu

1

<210> 79

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 79

Tyr Met Pro Met

1

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 80

Tyr Met Ser Met

1

<210> 81

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 81

Tyr Ser Asn Met

1

<210> 82

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 82

Tyr Thr Ala Val

1

<210> 83

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 83

Tyr Val Glu Met

1

<210> 84

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 84

Tyr Val His Val

1

<210> 85

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 85

Tyr Val Lys Met

1

<210> 86

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 86

Tyr Val Pro Met

1

<210> 87
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 87
Tyr Ala Asn Gly
1