



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월27일
(11) 등록번호 10-2595249
(24) 등록일자 2023년10월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/69 (2017.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) A61K 47/64 (2017.01)
A61K 47/65 (2017.01) A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01) A61K 51/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/6901 (2017.08)
A61K 35/17 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2019-7026818
- (22) 출원일자(국제) 2018년02월17일
심사청구일자 2021년02월16일
- (85) 번역문제출일자 2019년09월11일
- (65) 공개번호 10-2019-0118180
- (43) 공개일자 2019년10월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/018557
- (87) 국제공개번호 WO 2018/152451
국제공개일자 2018년08월23일
- (30) 우선권주장
62/460,118 2017년02월17일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02016098078 A2
US20070077197 A1

- (73) 특허권자
퍼듀 리서치 파운데이션
미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트 파운드리 드라이브 101
- (72) 발명자
로우, 필립 에스.
미국, 47906 인디애나주, 웨스트 라피엣, 펴머릿지 로드 5850
스리니바사라오, 맛두리
미국, 47907 인디애나주, 웨스트 라피엣, 오발 드라이브 560
장, 보닝
미국, 47907 인디애나주, 웨스트 라피엣, 오발 드라이브 560
- (74) 대리인
특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 4 항

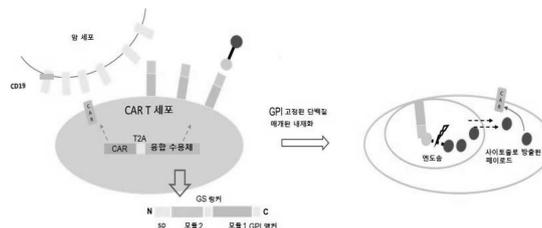
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 세포 치료를 위한 표적화된 리간드-페이로드 기반의 약물 전달

(57) 요약

세포 치료의 유연한 미세 조정을 제공하는 약물 전달 플랫폼이 본 명세서에 개시되어 있다. 특히, 조작된 융합 단백질은 이식된 세포 치료 효과를 관찰 또는 조절하기 위해, 이식된 세포에 의해 내재화될 약물의 적어도 하나의 페이로드를 운반하는 고친화도 리간드와 결합된다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

A61K 47/64 (2017.08)

A61K 47/65 (2017.08)

A61K 49/0041 (2013.01)

A61K 49/0043 (2013.01)

A61K 49/0056 (2013.01)

A61K 49/0069 (2013.01)

A61K 49/0097 (2013.01)

A61K 51/0482 (2013.01)

A61K 51/088 (2020.05)

명세서

청구범위

청구항 1

a. 이식용 표적 세포상의 조작된 단백질로서, 상기 조작된 단백질은 제1 성분 및 제2 성분으로 이루어지고, 상기 제1 성분 및 제2 성분은 펩타이드 링커에 의해 연결되고, 상기 제1 성분은 비-막 단백질이고, 상기 제2 성분은 막 고정된 펩타이드 또는 단백질인, 조작된 단백질;

b. 링커에 접합된 소형 리간드로서, 상기 소형 리간드는 조작된 단백질의 적어도 하나의 성분에 대해 고유의 결합 친화도를 가지는, 소형 리간드; 및

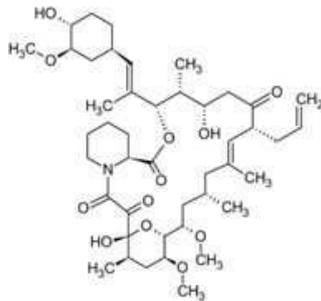
c. 링커에 접합된 약물의 페이로드(payload)로서, 상기 약물의 페이로드는 상기 소형 리간드가 상기 조작된 단백질의 적어도 하나의 성분에 결합할 때 표적 세포와 관련되는, 약물의 페이로드

를 포함하는, 세포 치료용(for cell therapy) 약물 전달 플랫폼으로서,

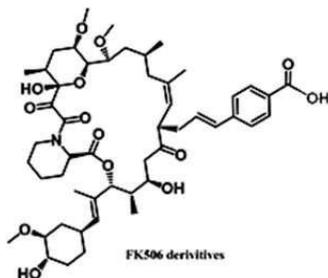
상기 제1 성분은 FK506 결합 단백질(FKBP)이고,

상기 제2 성분은 상기 제1 성분 상에 글리코실포스파티딜 이노시톨(GPI) 앵커를 부여하고, 염산 수용체 알파(FRa) 또는 염산 수용체 베타(FRb)로 이루어지는 펩타이드이고,

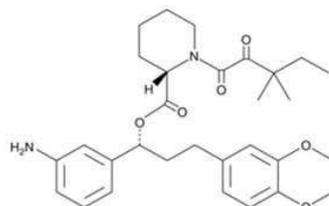
상기 소형 리간드는



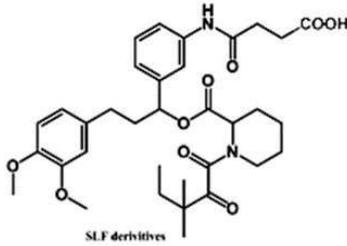
FK506



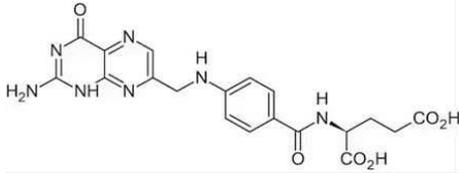
FK506 유도체



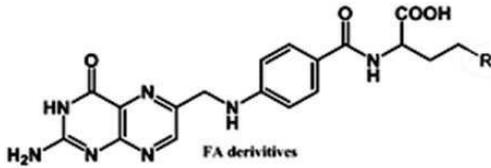
SLF (FKBP의 합성 리간드)



SLF 유도체



FA (염산) , 또는



FA 유도체

(R은 알킬기임)

이고,

상기 펩타이드 링커는 SGGGS의 적어도 하나의 세그먼트이고,

상기 링커는 알킬, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로린, 올리고-(4-피페리딘 카르복실산), 올리고피페리딘, 펩타이드, 사카로-펩타이드 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 것이고,

상기 약물의 페이로드는 로다민, 플루오레세인 이소티오시아네이트, S0456, EC20 킬레이트 헤드, NOTA(1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산), DOTA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), 투불리신, DM1, DM4, 아우리스타틴, 다사티닙, MEK1/2 억제제, PI3K 억제제, HDAC 억제제, 키나제 억제제, 대사 억제제, GSK3 베타 억제제, MAO-B 억제제, Cdk5 억제제, ROR γ t 작용제, SHP1/2 억제제, TC-PTP 억제제, 및 siRNA mi181a1으로 이루어지는 군으로부터 선택된 것인, 세포 치료용 약물 전달 플랫폼.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서, 이식용 표적 세포는 면역 세포, 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 또는 이들 모두인, 약물 전달 플랫폼.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항 또는 제10항에 있어서, 세포 치료 효과를 조절하는 방법에 사용하기 위한 것으로, 세포 치료 기능을 보유하는 확인된 이식용 표적 세포는 약물 전달 플랫폼과 접촉되고, 페이로드는 표적 세포 내에서 방출되어 표적 세포 치료 기능을 조절하는, 약물 전달 플랫폼.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 세포 치료 기능은 광학적으로 유도된 수술을 제공하거나, 표적 세포 증식을 제어하거나, 또는 표적 세포에 세포 독성을 실행하는 것인, 약물 전달 플랫폼.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제

- 청구항 40
- 삭제
- 청구항 41
- 삭제
- 청구항 42
- 삭제
- 청구항 43
- 삭제
- 청구항 44
- 삭제
- 청구항 45
- 삭제
- 청구항 46
- 삭제
- 청구항 47
- 삭제
- 청구항 48
- 삭제
- 청구항 49
- 삭제
- 청구항 50
- 삭제
- 청구항 51
- 삭제
- 청구항 52
- 삭제
- 청구항 53
- 삭제
- 청구항 54
- 삭제
- 청구항 55
- 삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2017년 2월 17일에 제출된, 35 U.S.C. § 119(e)에 따른 미국 가출원 62/460,118의 이점을 주장한다. 이의 내용은 본 명세서에 전문 포함된다.
- [0003] 발명의 분야
- [0004] 본 발명은 세포 치료를 위한 약물 전달 플랫폼을 제공한다. 특히, 조작된 단백질은 이식된 세포 치료 효과를 조절하기 위해, 조작된 단백질을 통해 이식된 세포에 의해 내재화될 적어도 하나의 약물의 페이로드를 운반하는 고친화도 리간드와 결합된다.

배경 기술

- [0005] 지난 수십년 동안, 세포 유형, 전달 방법 및 적합한 질병 모델에 관한 이 분야에서 큰 발전이 이루어졌다. 세포 유형 측면에서, 현재 세포 치료는 대략 키메라 항원 수용체(CAR), 종양 모델용 세포 및 줄기 세포 기반 재생 의학으로 분류될 수 있다. 관련 종래기술로는 세포 치료(cell therapy)를 위한 표적화된 리간드-페이로드 기반 약물 전달이라는 발명의 명칭으로 공개된 WO 2016/098078 (2016.06.23.)을 들 수 있다.
- [0006] 키메라 T 세포 수용체로도 알려진 CAR T, 키메라 면역수용체 또는 인공 T 세포 수용체는 면역 이펙터 세포(보통 T 세포 또는 NK 세포)가 상응하는 항원으로 표적 세포를 인식하고 그의 세포독성 활성을 발휘할 수 있게 한다. CAR-T 기술의 출현과 개발은 특정 유형의 암에 대한 약속을 제공하여, CAR-T를 생의학 연구 및 임상 연구 분야에서 슈퍼스타로 만든다.
- [0007] 재생 의학은 손상된 조직과 장기를 완전히 치유할 수 있는 능력을 갖는 업계관도를 바꿀 수 있는 의학 분야로, 오늘날 치료가 불가능한 상태에 있는 사람들에게 해결책과 희망을 제공한다. 발생 및 세포 생물학, 면역학 및 기타 분야의 발전으로 기존 재생 요법을 개선하고 새로운 요법을 개발할 수 있는 새로운 기회가 열렸다.
- [0008] 줄기 세포는 분화라고 불리는 과정을 통해 피부 세포, 뇌 세포, 폐 세포 등과 같은 여러 유형의 세포로 발전할 수 있는 능력을 갖고 있다. 줄기 세포는 새로운 임상 용도의 문을 열어주기 때문에 재생 의학의 핵심 구성요소이다.
- [0009] 성체 및 배아 줄기 세포를 포함한 다양한 줄기 세포가 재생 의학에 사용될 수 있다. 또한, 제대혈에서 발견되는 것과 같은 다양한 유형의 선조 세포, 및 유도 만능 줄기 세포라 불리는 생체공학적 세포가 재생 의학에 사용된다. 각 유형마다 고유한 특성이 있으며, 일부 유형은 다른 유형보다 더 다양하다.
- [0010] 개발중인 많은 재생 요법은 특정 환자 자신의 세포에서 시작된다. 예를 들어, 환자 자신의 피부 세포가 수집되어, 실험실에서 재프로그래밍되어 특정 특성을 제공하고 환자에게 다시 전달되어 그의 질병을 치료할 수 있다.

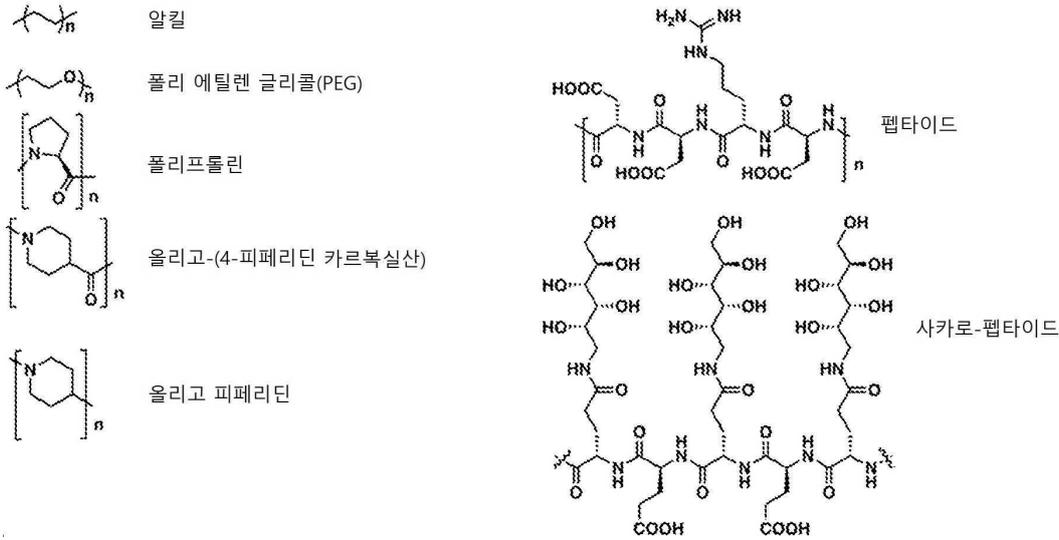
- [0011] 비록 항CD19 CAR T가 백혈병 치료를 위한 임상 적용에서 큰 성공을 거두었지만, 종양 세포의 빠른 용해로부터 생성된 사이토카인 스톰(storm)과 같은 치명적인 부작용뿐만 아니라 빠르게 증식하는 항-CD19 CAR T 세포에 의한 정상 CD19+ B 세포의 사멸이 CAR T 세포의 보다 미세한 제어를 필요로 한다. 줄기 세포 기반 재생 요법에서, 표적 조직에서 이식된 세포의 분화 과정 및 영양 역할을 보다 잘 이해하기 위한 노력이 이루어졌다. 한편, 이들 과정은 표적 조직의 재생에 추가로 기여하기 위해 줄기 세포에 특이적으로 전달되는 일부 소분자 약물에 의해 잠재적으로 변경될 수 있다.
- [0012] CAR T 세포 뿐만 아니라 다른 줄기 세포 기반 재생 요법에 대한 또 다른 오래 지속되는 우려는 상기 이식된 세포의 종양형성 가능성이다. 요약하면, CAR T 세포 또는 줄기 세포가 이식된 후 이식된 세포의 활동을 제어하기 위한 전용 출입구를 갖는 것이 이상적일 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0013] 발명의 요약
- [0014] 본 발명은 미세 조정 세포 치료를 위한 약물 전달 플랫폼을 제공한다. 약물 전달 시스템은 하기를 포함한다:
- [0015] a. 이식용 표적 세포 상의 조작된 단백질, 여기서 융합 단백질은 제1 성분 및 제2 성분을 포함하고, 상기 제1 성분 및 제2 성분은 펩타이드 링커에 의해 연결되고, 상기 제1 성분은 비-막 단백질이고, 상기 제2 성분은 막 고정된 펩타이드 또는 단백질이며;
- [0016] b. 링커에 접합된 적어도 하나의 소형 리간드, 여기서 상기 적어도 하나의 소형 리간드는 조작된 단백질의 적어도 하나의 성분에 대해 고유의 높은 친화도를 가지며; 및
- [0017] c. 링커에 접합된 약물의 적어도 하나의 페이로드(payload), 여기서 상기 약물의 페이로드는 상기 소형 리간드가 상기 조작된 단백질의 적어도 하나의 성분에 결합할 때 표적 세포와 관련된다.
- [0018] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 영상화제의 약물의 페이로드를 갖는다. 상기 영상화제는 형광 염료 로다민, 플루오레세인 및 S0456으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 대안적으로, 상기 영상화제는 방사성 동위원소 킬레이트 영상화 모이어티, EC 20 킬레이트 헤드, NOTA 및 DOTA로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0019] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 세포독성 약물의 약물의 페이로드를 갖는다. 상기 세포독성 약물은 투블리신, DM1, DM4 및 아우리스타틴으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0020] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 유전자 발현 조절제의 약물의 페이로드를 갖는다.
- [0021] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 세포 활성의 조절제 약물의 페이로드를 갖는다.
- [0022] 일부 구현예에서, 상기 언급된 조절제는 다사티닙(dasatinib), MEK1/2 억제제 및 PI3K 억제제의 군; HDAC 억제제, 키나제 억제제 및 대사 억제제의 군; GSK3 베타 억제제, MAO-B 억제제 및 Cdk5 억제제의 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0023] 일부 구현예에서, 상기 언급된 조절제는 포스파타제 억제제, ROR γ t 작용제 또는 siRNA mi181a1이다.
- [0024] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물의 페이로드는 SHP1/2, TC-PTP에 대한 억제제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 포스파타제 억제제이다.
- [0025] 일부 구현예에서, 약물 전달 플랫폼에서 상기 언급된 약물의 페이로드는 소형 리간드가 상기 조작된 단백질의 적어도 하나의 성분에 결합할 때 표적 세포에 의해 추가로 내재화된다.
- [0026] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 소형 리간드와 페이로드 약물을 연결하기 위한 방출가능한 링커를 갖는다. 상기 링커는 하기로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다:

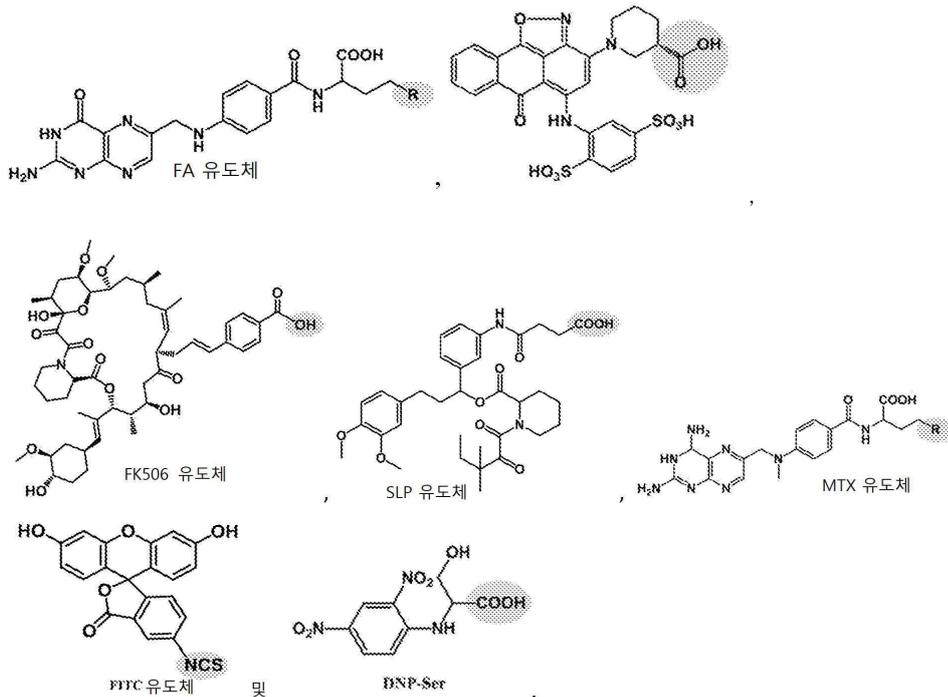


[0027]

[0028] 일부 구현예에서, 상기 언급된 조작된 단백질 성분은 염산 수용체 알파(FRa), 염산 수용체 베타(FRb), 우로키나제 수용체(uPAR), FK506 결합 단백질(FKBP), 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR), 플루오레세인 이소티오시아네이트에 대한 단일 사슬 단편 변이체(FITC에 대한 scFv) 및 디니트로페놀에 대한 단일 사슬 단편 변이체(DNP에 대한 scFv)로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0029] 일부 구현예에서, 상기 언급된 소형 리간드는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:

[0030]



[0031]

[0032] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 FKBP로서 제1 성분을 갖고, 제2 성분은 제1 성분 상에 글리코실포스파티딜 이노시톨(GPI) 앵커(anchor)를 부여하는 펩타이드이고, 소형 리간드는 FK506 또는 이의 유도체이다. 일부 구현예에서, FK506 유도체는 칼시뉴린 결합 부위를 폐지한다.

[0033] 일부 구현예에서, 상기 언급된 제2 성분은 전장 또는 절단된 염산 수용체(FR)이다.

[0034] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 조작된 단백질의 제1 성분 및 제2 성분을 연결하기 위한 가요성 펩타이드 링커 SGGGS의 적어도 하나의 세그먼트를 갖는다.

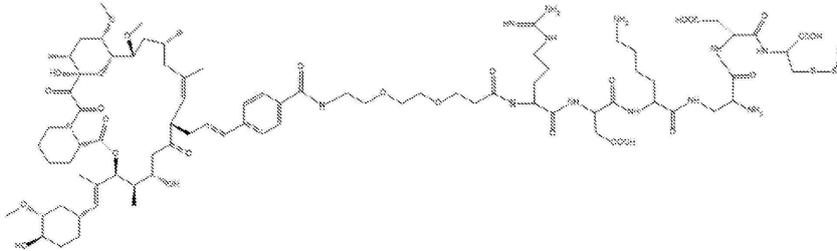
[0035] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 서열번호 1~2(각각, 마우스 FKBP-FRa에 대한 아미노산 서열 및 인간 FKBP-FRa에 대한 아미노산 서열)로 구성된 군으로부터 선택된 조작된 단백질을 포함한다.

[0036] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 서열번호 12~15로 구성된 군으로부터 선택된 조작된 단백질을 포함한다.

[0037] 일부 구현예에서, 상기 언급된 이식을 위한 표적 세포는 면역 세포이다. 예를 들어, 면역 세포는 NK 세포 또는 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포일 수 있다. 상기 CAR T 세포는 서열번호 3~4로부터 선택된 아미노산 서열을 발현할 수 있다.

[0038] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 화학식 I의 소형 리간드 접합체를 갖는다.

[0039] [화학식 I]



[0040]

[0041] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 서열번호 3(마우스 항CD19 CAR T 작제물에 대한 아미노산 서열) 또는 서열번호 4(인간 항CD19 CAR T 작제물에 대한 아미노산 서열)를 발현하는 CAR T 세포로서 이식을 위한 표적 세포를 갖는다.

[0042] 일부 구현예에서, 상기 언급된 소형 리간드는 약물 내재화를 추적하기 위해 형광 염료 또는 방사성 프로브에 추가로 접합된다.

[0043] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼은 형질도입된 트랜스진 발현의 조절인자의 내인성 유전자 발현의 조절인자에 추가로 접합된 소형 리간드를 포함한다.

[0044] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 전달 플랫폼에서, 이식을 위한 표적 세포는 환자에게 걸핍된 생화학물질을 합성하도록 설계된 줄기 세포, 전구 세포 또는 이식된 세포이다.

[0045] 본 발명은 서열번호 12~15로부터 선택된 아미노산 서열을 발현하는 작제물을 포함하는 CAR T 세포를 추가로 제공한다.

[0046] 본 발명은 서열번호 12~15로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 작제물을 추가로 제공한다.

[0047] 본 발명은 발현 벡터에서 EF1a 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호 1~2 중 어느 하나를 포함하는 FKBP-FRa 융합 수용체를 코딩하는 DNA 작제물을 추가로 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 발현 벡터는 서열번호 5를 갖는 pWPI이다.

[0048] 본 발명은 서열번호 6~8 중 어느 하나를 포함하는 DNA 작제물을 추가로 제공한다.

[0049] 본 발명은 삽입 유전자 hFKBP-FR(서열번호 7) 및 인간 항CD19 CAR(서열번호 9)을 포함하는 이식된 세포를 추가로 제공한다.

[0050] 본 발명은 삽입 유전자 mFKBP-FR(서열번호 8) 및 마우스 항CD19 CAR(서열번호 10)을 포함하는 이식 세포를 추가로 제공한다.

[0051] 본 발명은 세포 치료 효과를 조절하는 방법을 추가로 제공한다. 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0052] a. 이식을 위한 표적 세포를 확인하는 단계, 여기서 상기 이식된 표적 세포가 세포 치료 기능을 가지며;

[0053] b. 이식을 위한 표적 세포의 표면에 조작된 융합 단백질을 제공하는 단계, 상기 융합 단백질이 제1 성분 및 제2 성분을 포함하고, 상기 제1 성분 및 제2 성분이 가요성 펩타이드 링커에 의해 연결되고, 상기 제1 성분이 비-막 단백질이고, 상기 제2 성분이 글리코실포스파티딜 이노시톨(GPI) 고정 펩타이드 또는 단백질이며;

[0054] c. 표적 세포에 약물 접합체의 페이로드를 제공하는 단계, 여기서 상기 약물의 페이로드는 링커를 통해 소형 리간드에 접합되고, 선택적으로 형광 염료에 접합되며, 여기서 상기 소형 리간드는 높은 친화도를 갖는 조작된 용

합 단백질의 적어도 하나의 성분에 결합하고, 약물의 페이로드와 함께 표적 세포에 의해 내재화되며; 및

d. 표적 세포 치료 기능을 조절하기 위해 표적 세포 내에서 약물을 방출하는 단계.

일부 구현예에서, 상기 언급된 세포 치료 기능은 대상체에게 광학적으로 유도된 수술을 제공하는 것이다.

일부 구현예에서, 상기 언급된 세포 치료 기능은 표적 세포 증식을 제어하는 것이다.

일부 구현예에서, 상기 언급된 세포 치료 기능은 표적 세포 관여 암 세포에 대한 세포독성을 실행하는 것이다.

일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 면역 세포이다. 예를 들어, 표적 세포는 CAR T 세포이다.

일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 환자에 결핍된 생화학 물질을 합성하도록 설계된 줄기 세포, 전구 세포 또는 이식된 세포이다.

일부 구현예에서, 상기 언급된 약물의 페이로드는 로다민 및 FITC의 형광 염료로부터 선택된 영상화제, 또는 EC20 킬레이트 헤드, NOTA 및 DOTA로부터 선택된 방사선 동위원소 영상화제이다.

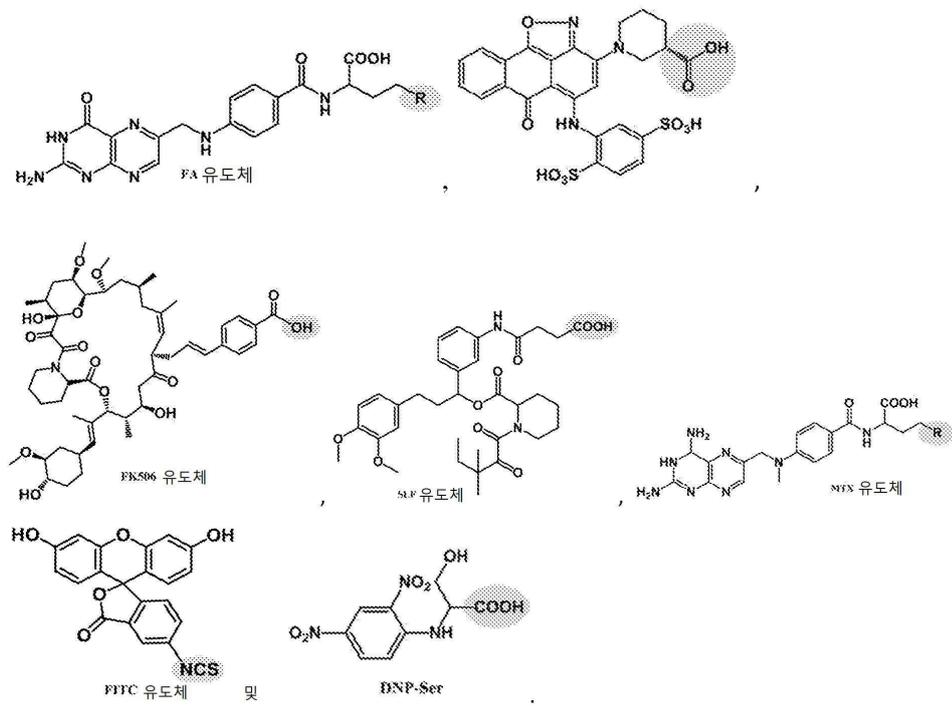
일부 구현예에서, 상기 언급된 약물의 페이로드는 투블리신, DM1, DM4 및 아우리스타틴으로 구성된 군으로부터 선택된 세포독성 약물이다.

일부 구현예에서, 상기 언급된 약물의 페이로드는 다사티닙, MEK1/2 억제제 및 PI3 키나제 억제제로 이루어진 키나제 억제제, 또는 mi181a1의 siRNA로부터 선택된 유전자 발현의 조절제이다.

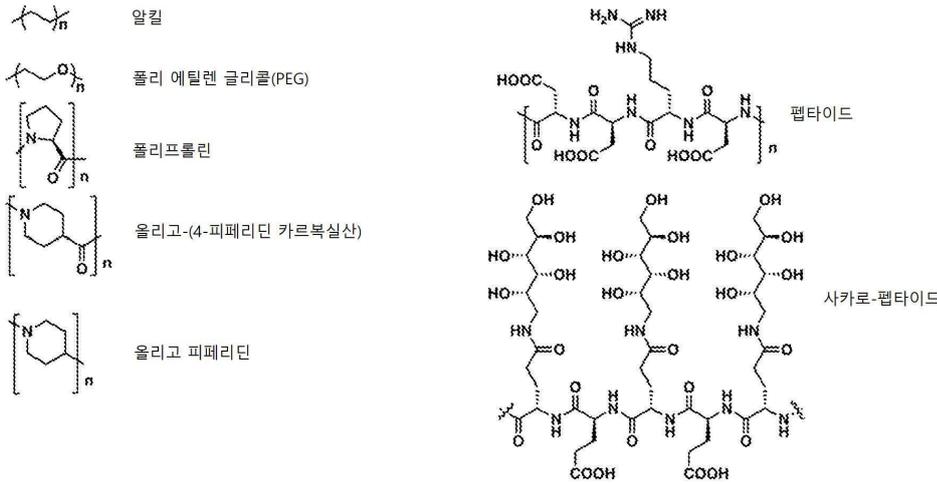
일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 서열번호 12~15로 구성된 군으로부터 선택된 융합 단백질을 포함한다.

일부 구현예에서, 상기 언급된 조작된 단백질 성분은 FRa, FRb, uPAR, FKBP, DHFR, FITC에 대한 scFv 및 DNP에 대한 scFv로 구성된 군으로부터 선택된다.

일부 구현예에서, 상기 언급된 소형 리간드는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



일부 구현예에서, 소형 리간드와 페이로드 약물을 연결하기 위한 상기 언급된 링커는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



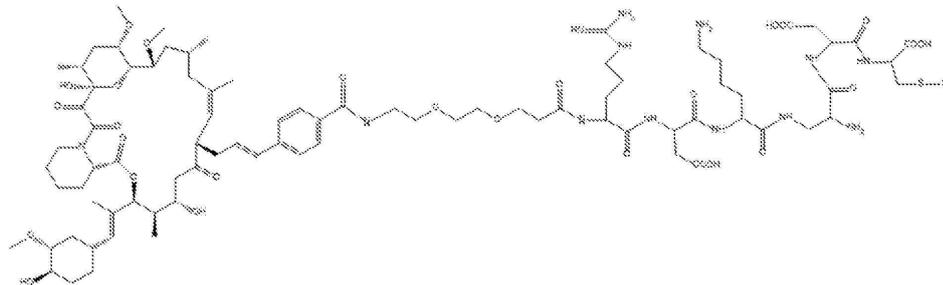
[0070]

[0071] 일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 서열번호 1 및 서열번호 2로 구성된 군으로부터 선택된 조작된 FKBP-LINKER-FRa 융합 단백질을 포함한다.

[0072] 일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 서열번호 3 및 서열번호 4로 구성된 군으로부터 선택된 조작된 항CD19 CAR T 작제물을 포함하는 CAR T 세포이다.

[0073] 일부 구현예에서, 상기 언급된 약물 접합체는 화학식 I을 포함하는 FK506-방출성 링커이며, 여기서 상기 FK506의 결합 도메인은 약 4 pM 내지 약 100 pM의 FKBP에 대한 친화도를 갖는다.

[0074] (화학식 I)



[0075]

[0076] 일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 CAR T 세포이고, 상기 약물 접합체는 이식된 CAR T 세포의 과도한 사이토카인 스톱을 제어하기 위한, GSK3b 억제제, MAPK 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0077] 일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 CAR T 세포이고, 상기 약물 접합체는 원치 않는 T 세포 증식을 제어하도록 설계된 조절제이다.

[0078] 일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 줄기 세포 또는 전구 세포이고, 상기 약물 접합체는 골절 복구를 촉진하기 위한 GSK3b 억제제이다.

[0079] 일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 환자에 결핍된 생화학 물질을 합성하도록 설계된 줄기 세포, 전구 세포 또는 이식된 세포이고; 상기 약물 접합체는 파킨슨 병 또는 다른 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한, MAO-B 억제제 및 cdk5 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0080] 일부 구현예에서, 상기 언급된 이식된 표적 세포는 NK 세포이고, 상기 약물 접합체는 Th17 세포 매개 면역을 제어하기 위한 ROR γ t 작용제이다.

[0081] 본 발명의 이들 및 다른 특징, 양태 및 장점은 하기 도면, 관련 설명 및 청구범위를 참조하여 더 잘 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1: A. 세포 치료를 위한 FKBP-FRa 및 FK506-페이로드 기반 약물 전달 플랫폼의 개요; B. 페이로드의 CAR T 세포 전달을 위한 비밀 경로 플랫폼의 그래픽 예시.

도 2a. 왼쪽: FKBP 결합 부위(황색) 및 강조표시된 유도체화된 부위(적색)를 갖는 FK506의 화학 구조. 오른쪽: 칼시뉴린 A 단편(녹색), 칼시뉴린 B(청록색), FKBP12(보라색) 및 FK506(황색)의 삼원 복합체의 공-결정 구조, PDB: 1TCO

도 2b. 조작된 융합 단백질에서 2개의 모듈의 다양한 조합 옵션 및 각각의 리간드 선택, 잠재적 유도체화 부위가 강조되어 있음.

도 3: 왼쪽: *CAR T 세포의 시공간 제어를 위한 탐구*, Sun J. 등 2015에서 적용된, CAR T 세포 활성의 음성 및 양성 조절. 오른쪽: *적응 세포 치료를 위한 안전 스위치로서 유도성 세포자멸사*, Malcolm K.B. 등 2011로부터 적용된, AP1903(FK506 이량체) 유도된 FKBP-카스파제9 매개된 세포자멸사의 메커니즘 및 AP1903의 구조

도 4: **a.** FKBP-FRa 삽입물을 갖는 pWPI 발현 벡터 맵(hFRa 1-24: 적색, FKBP: 황색, hFRa 25-258: 적색) **b.** FKBP-FRa 형질도입된 K562 세포는 FRa 양성 KB 세포 및 형질도입되지 않은 K562 세포와 비교하여 약 50 kDa(FRa의 경우 37kDa + FKBP의 경우 12 kDa)의 더 높은 밴드를 나타낸다. **c.** 페이로드 캐리어 작제물 및 CAR T 작제물 설계 **d.** FKBPFR3GS의 작제물 설계(FF3으로 표시). N 말단에서 C 말단까지, 신호 펩타이드로서 1-24 aa의 인간 FRa, 인간 FKBP 단백질, 3개의 Gly-Ser 링커 및 이어서 25-258 aa의 인간 FRa를 갖는다. FKBPFR1GS(FF1로 표시)에서 FF3의 3개의 Gly-Ser 라이너는 다른 부분을 변경하지 않고 하나의 Gly-Ser 링커로 치환된다. **e.** 4m5.3FR의 작제물 설계. N 말단에서 C 말단으로, 이는 hCD8 신호 펩타이드, FITC에 대한 4M5.3 항체의 scFv, GS 링커, 25-258 aa의 인간 FRa를 갖는다.

도 5. FKBPFR1GS 융합 수용체에서 FR과 FKBP 사이의 간섭. FKBPFR1GS 융합 단백질에서 염산의 결합은 0.01 nM 만큼 낮은 FK506-로다민의 결합을 차단하고, 50 nM에서 FK506-로다민 결합을 완전히 과기한다.

도 6. FKBPFR1GS jurkat 세포는 OTL38에 결합한 후 감소된 FK506-로다민 강도를 보여준다. 융합 수용체 내의 FK506-로다민(공여체)으로부터 OTL38(FA-S0456, 수용체, ex/em: 774/794 nm)까지의 FRET은 FR과 FKBP 사이의 상호작용을 나타낸다.

도 7. FKBP와 FR 사이의 링커 길이를 증가시키면, 두 부분 간의 간섭이 크게 낮아진다. FF1(FKBP와 FR 사이의 1GS)과 비교하여, FF3(FKBP와 FR 사이의 3GS)은 10 nM FA의 존재 하에 FK506-로다민의 결합을 유지하는데, 이는 인체내 FA의 생리학적 농도와 비슷하다.

도 8. PI-PLC 처리는 GPI 고정된 융합 수용체 FF3을 방출한다. FF3 융합 수용체를 갖는 jurkat T 세포는 20 nM FA-FITC(EC17)와의 포화 결합을 나타내는 반면, 5 μM PI-PLC 또는 50 μM PI-PLC 처리 후 FA-FITC는 세포에 대한 결합을 잃어, GPI 고정된 FF3 융합 수용체의 방출을 나타낸다.

도 9. FKBPFR3GS 융합 수용체에서의 FA-로다민 결합 곡선. 인간 T 세포상에서 안정적으로 발현된 FKBPFR3GS 융합 수용체는 FR+ KB 세포에서 FA-로다민의 친화도와 비슷한 높은 친화도(Kd = 0.95 nM)로 염산 유도체(FA-로다민)에 결합할 수 있다(Kd 약 1 nM). 따라서, 융합 수용체내 FR의 결합 특성이 유지된다.

도 10. FKBPFR3GS 융합 수용체에서의 FK506-로다민 결합 곡선. 인간 T 세포 상에서 안정적으로 발현된 FKBPFR3GS 융합 수용체는 높은 친화도(Kd = 3.93 nM)로 FK506 유도체(FK506-로다민)에 결합할 수 있으며, 이는 융합 수용체내 FKBP의 결합 특성이 보존됨을 의미한다.

도 11. SLF-FITC는 비교적 높은 결합 친화도(Kd = 62 nM)를 갖는 FKBPFR3GS 융합 수용체에 결합하는 반면, 유리 SLF(100x, 사전배양)와의 경쟁은 이러한 결합을 차단한다. FK506의 모방인 SLF는 이전의 보고와 일치하는 모체 리간드 FK506과 비교하여 FKBPFR 융합 수용체에 대한 10배 낮은 결합 친화도를 나타낸다.

도 12. 4M5.3FR 융합 수용체에서의 FA-로다민 결합 곡선. FA-로다민은 FR+ KB 세포(Kd 약 1nM)에서 FA-로다민의 친화도와 비슷한 높은 친화도(Kd = 2.25nM)로 인간 T 세포에서 안정적으로 발현되는 4M5.3FR 융합 수용체에 결합할 수 있다. 따라서, FR 결합 특성은 4M5.3FR 융합 수용체에서 보존된다.

도 13. 4M5.3FR 융합 수용체에서의 FITC-AF647 결합 곡선. FITC-AF647은 높은 친화도(Kd = 8.03 nM)로 인간 T 세포에서 안정적으로 발현되는 4M5.3FR 융합 수용체에 결합할 수 있다. 100x comp는 유리 FITC 나트륨을 나타낸다. FITC와 scFv 4M5.3의 결합 특성은 4M5.3FR 융합 수용체에서 보존된다.

도 14. FA-투블리신은 FF3+ 인간 T 세포에 대한 수용체 특이적 사멸 효과를 매개할 수 있다. FA를 사용한 보상(FA를 사용한 100x 사전배양)은 그 효과를 차단한다. 이는 FF3 융합 수용체 시스템을 통한 유리 약물 투블리신의 성공적인 내재화 및 방출을 의미한다.

도 15. FA-투블리신은 혼합된 인간 T 세포 배양에서 hFF3+ 집단을 특이적으로 사멸시킨다. FA-Tub 농도가 증가함에 따라 hFF3+ 세포의 절대 수는 감소하는 반면, hFF3-세포는 방출된 약물 및 고농도에서의 방관자 효과를 통해 사멸된다.

도 16. SLF-Tub는 $IC_{50} = 138$ nM으로 hFF3+ Jurkat 세포를 특이적으로 사멸시킨다. 이는 FKBPFR3GS 융합 수용체에 의한 SLF-Tub의 성공적인 내재화 및 세포내 투블리신의 방출을 나타낸다.

도 17. FITC-DM4와 FITC-Tub는 모두 4M5.3FR+ 인간 T 세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있는 반면, FITC-Tub는 더 높은 IC_{50} 을 갖는다. 유리 FITC 나트륨(100x 사전배양)의 보상은 수용체 매개된 사멸 효과를 차단한다. 이는 4M5.3FR 융합 수용체를 통해 FITC-세포독성 약물의 T 세포내로의 성공적인 내재화 및 방출을 의미한다.

도 18 FITC-투블리신은 혼합 인간 T 세포 배양에서 4M5.3FR+ 집단을 특이적으로 사멸시킨다. FITC-Tub 농도가 증가함에 따라 4M5.3FR+ 세포의 절대 수는 감소하는 반면, 4M5.3FR- 세포는 방출된 약물 및 고농도에서 방관자 효과를 통해 사멸된다.

도 19 FITC-DM4는 혼합된 인간 T 세포 배양에서 4M5.3FR+ 집단을 특이적으로 사멸시킨다. FITC-DM4 농도가 증가함에 따라 4M5.3FR+ 세포의 절대 수는 감소하는 반면, 4M5.3FR- 세포는 방출된 약물 및 고농도에서 방관자 효과를 통해 사멸된다.

도 20. 10 nM 농도에서 다사티닙(Lck 억제제) 및 이브루티닙(ITK 억제제)은 CD19+ Raji 종양 세포(표적)에 대한 항CD19 CAR T 세포(FMC63 CAR T, 이펙터)의 용해 효과를 감소시킨다. 2개의 이펙터:표적 비율(E:T)이 테스트되었다. 정상 T 세포 및, CD19- K562 세포를 갖는 항CD19 CAR T를 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 21. FITC-다사티닙은 Raji 세포에 대한 FMC63+4M5.3FR+hT 세포의 용해 효과를 감소시킬 수 있다. 이는 4M5.3FR 융합 수용체를 통해 FITC-다사티닙의 T 세포로의 성공적인 내재화 및 방출 및 T 세포로의 다사티닙의 방출을 의미한다.

도 22. 100 nM 농도에서의 TC-PTP 억제제는 소진된 항CD19 CAR T 세포에서 공-억제제 분자 집단을 감소시킨다 (CD19+ Raji 세포로 7회 자극하여 생성됨, 하기 상세한 과정 참조). PD-1, LAG3 및 이중 양성 집단이 치료시 감소한다. 이는 TC-PTP 억제제와 같은 포스파타제 억제제가 소진된 CAR T 세포를 재생시키기 위한 비밀 게이트웨이 플랫폼에 대한 페이로드로서 사용될 수 있음을 의미한다.

[표 1]

FKBP-FRa 세포 치료 플랫폼 및 해당 페이로드의 잠재적 응용.

서열 목록

서열번호 1: 마우스 FKBP-FRa에 대한 아미노산 서열

서열번호 2: 인간 FKBP-FRa에 대한 아미노산 서열

서열번호 3: 마우스 항CD19 CAR T 작제물에 대한 아미노산 서열

서열번호 4: 인간 항CD19 CAR T 작제물에 대한 아미노산 서열

서열번호 5: 인간 T 세포 형질도입에 대한 벡터 pWPI

서열번호 6: 마우스 T 세포 형질도입을 위한 pMP71 gb NotIEcoRI 마우스

서열번호 7: pWPI-FRa 1-24 FKBP FRa

서열번호 8: pWPI mFKBP-mFRa SGGGS

서열번호 9: pHR EcorI hAnti cd19 1D3 myc 힌지 cd28 cd3zeta

서열번호 10: pWPI pmei mAnti cd19 1D3 myc 힌지 cd28 cd3zeta

서열번호 11: GPI 고정된 아미노산 서열을 갖는 FKBP-1SG-FR

서열번호 12: GPI 고정된 아미노산 서열을 갖는 FKBP-3SG-FR

서열번호 13: GPI 고정된 아미노산 서열을 갖는 4M5.3-FR

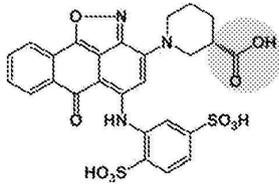
- 서열번호 14: FMC63-T2A-FKBP3SGFR
- 서열번호 15: FMC63-T2A-4M5.3SGFR
- 서열번호 16: 신호 펩타이드를 갖는 FRb
- 서열번호 17: 신호 펩타이드를 갖는 uPAR
- 서열번호 18: DHFR
- 서열번호 19: FITC에 대한 scFv: 4M5.3(Kd = 200 pM)
- 서열번호 20: FITC 4D5F1u에 대한 scFv(Kd = 10 nM)
- 서열번호 21: DNP SPE7에 대한 scFv

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0083] 본 발명의 개념이 도면 및 본원의 상세한 설명에서 예시되고 상세하게 설명되지만, 도면 및 그 설명의 결과는 예시적인 것으로 간주되며, 특성상 제한적이지 않다; 단지 예시적인 구현예들만이 도시되고 설명되며, 본 발명의 사상 내에 있는 모든 변경 및 변형은 보호되는 것이 바람직하다는 것을 이해한다.
- [0084] 달리 정의되지 않는 한, 과학적 및 기술 명명법은 본 발명에 관한 당업자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0085] 본 발명은 이식된 세포 표면 상에 융합 수용체를 유전적으로 도입함으로써 이식된 세포 활성을 제어하기 위한 신규한 플랫폼을 제공한다. 이어서, 상기 이식된 세포는 소분자 리간드와 이식된 세포 표면상의 융합 수용체 사이의 고유한 높은 친화도를 사용하여 소분자 리간드 접합된 약물 페이로드에 의해 특이적으로 표적화될 것이다. 융합 수용체의 한 부분은 접합체를 내재화하는 역할을 하며, 상기 페이로드는 이식된 세포 내부에 놓이면 방출 가능한 링커를 통해 방출될 것이다. 이식된 세포 유형 및 이식된 세포에 부과되는 원하는 조절에 따라, 약물 페이로드는 다양한 기능일 수 있다. 접합체에서 페이로드를, 예를 들어 세포독성 약물 또는 키나제 억제제로서 변경함으로써, 약물 페이로드는 이식된 세포의 다중 측면, 예컨대 증식, 분화 또는 사이토카인 방출 프로파일을 제어하는데 사용될 수 있다.
- [0086] 펩티딜-프롤린 이성질화 효소(PP1ases) 패밀리는 FK506-결합 단백질(FKBP), 사이클로필린 및 파르볼린으로 구성된다. 인간에는 18개의 FKBP, 24개의 사이클로 필린 및 3개의 파르볼린이 있다. 이들 중에서, FKBP51 및 FKBP52는 FKBP12(KD^{FK506} ≈ 0.2 nM)와 비교하여, FK506, KD^{FK506} ≈ 104 nM 및 KD^{FK506} ≈ 23 nM 각각의 높은 내지 중간 정도의 결합 친화도를 공유한다. 또한, 이들 2개의 FKBP 중 어느 것도 세포막에서 발현되지 않아, 본 시스템에서 거의 교차 결합 활성이 발생하지 않는다. 야생형 단백질의 전체 구조를 보존하는 FKBP51^{F67V}뿐만 아니라 FKBP^{WT}보다 FKBP12^{F36V}에 대한 더 높은 친화도를 갖는 합성 리간드를 설계하기 위한 노력이 또한 이루어졌다. 상기 언급된 리간드와 함께 모든 상동체 및 돌연변이된 단백질이 본 발명에 적합할 수 있다.
- [0087] 특히, 일 구현예에서, 예시된 소분자 리간드 및 융합 수용체의 쌍은 FK506-FKBP로 선택된다. 전체 과정은 도 1a에 일반화될 수 있으며, 여기서 FK-506-페이로드는 FKBP-FRa 조각된 세포에 먼저 결합하고; 이러한 결합에 따라, 막횡단 융합 단백질은 페이로드-링커-FK506을 내재화할 것이다. 다음으로, 내재화된 FK506-페이로드가 링커에서 쪼개지고, 페이로드가 세포내에 방출되었다. 세포 유형 및 페이로드 유형에 따라, 방출된 페이로드 약물은 그의 원하는 기능을 발휘할 수 있다.
- [0088] 도 1b에서, 특정 키메라 항원 수용체 T 세포 매개된 세포 치료가 도시되어있다. 이 모델에서, 적합한 신호 펩타이드를 포함하는 N 말단에서 C 말단까지의 구조를 갖는 융합 단백질을 발현하는 CAR T 세포, GPI 앵커의 단백질 모듈 1에 연결된 단백질 모듈 2가 암 세포에 제공된다. 일부 구현예에서, 암 세포는 표적 리간드가 융합 수용체의 적어도 하나의 모듈에 결합할 때 CAR T 세포에 의해 인식되고 CAR T 세포와 관련된 페이로드와 결합될 CD19 표면 단백질을 갖는다. 전형적으로, 이들 모듈 중 어느 하나에 대한 표적화 리간드의 높은 친화도로, 리간드와 관련된 페이로드는 표적 세포 내로 내재화되어, 키메라 항원 수용체를 통해 암 세포와 결합하도록 방출될 수 있다.
- [0089] 모듈 1 및 2의 리간드로 표시되는 GPI 고정된 단백질과 도 2b에 도시된 모듈 2 표적 세포 표면 단백질 및 각각 리간드의 많은 상이한 조합들이 있을 수 있다. 모듈 1 단백질 또는 모듈 2 단백질, 또는 둘다 리간드 접합

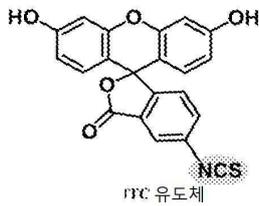
된 페이로드 전달을 용이하게 하기 위해 고친화도 표적 리간드와 결합될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, FRa-링커-FKBP 구조를 포함하는 융합 단백질을 갖는 것이 가능하며, 여기서 FA 유도체와 결합하는 FRa, 동시에 FK506 유도체, FA 유도체 또는 FK 506 유도체 중 어느 하나 또는 둘다와 결합된 FKBP가 세포독성 약물, 영상화제 또는 조절제와 같은 페이로드에 연결될 수 있다. 동일하거나 상이한 페이로드를 운반하는 것의 상기 가요성으로, 상이한 또는 동일한 페이로드의 예상치 못한 상승작용 또는 조절 효과를 달성하거나, 페이로드가 영상화제인 경우 표적 세포를 관찰할 수 있다. 이 시스템의 페이로드 전달의 가요성과 다양성의 장점은 더 많은 예를 통해 이해될 것이다.

[0090] 유사하게, GPI 고정된 단백질과 쌍을 이룬 리간드의 또 다른 구현에는 uPAR과 쌍을 이룬



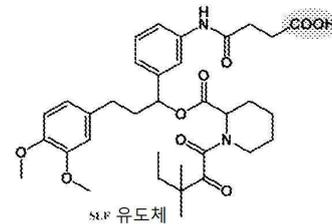
일 수 있다.

[0091] FITC 또는 이의 유도체는 FITC에 대한 항체의 단일 사슬 단편 변이체(scFv), 예를 들어,



FITC 유도체

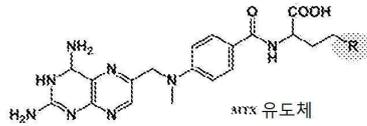
의 리간드 구조, 또는 FKBP와 쌍을 이루는



scFv 유도체

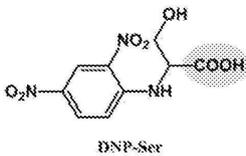
의 구조, 또는

DHFR과 쌍을 이루는



MTX 유도체

, 또는 DNP에 대한 scFv와 쌍을 이루는



DNP-Ser

에 결합할 수 있는 것으로 고려된다.

[0092] 이 전달 시스템에서 예시적인 리간드-단백질 쌍으로서 FK506-FKBP를 선택하는 것의 몇 가지 장점을 언급할 가치가 있다. 1. FKBP는 포유동물 세포막에 자연적으로 존재하는 막 단백질이 아니므로, FK506-페이로드 접합체가 표적 세포에 특이적으로 결합할 것이다; 2. FKBP 단백질은 분자량이 12 kDa인 비교적 작은 단백질로, 수용체의 구조 및 내재화 특성에 최소한의 변동을 가해 다른 수용체와 쉽게 융합될 수 있게 한다. 3. FK506은 인간 내부에 자연적으로 존재하지 않기 때문에 융합 수용체가 차단되지 않을 것이다; 4. 페이로드 약물이 높은 친화도로 전달될 수 있도록 FK506-FKBP 사이의 결합 친화도는 약 4 pM이다; 5. FK506-FKBP의 공-결정 구조가 이용가능하고, FK506의 잘 확립된 유도체 부위는 FK506-FKBP의 결합을 유지하면서 FK506과 칼시뉴린 사이의 원치않는 결합을 제거한다(도 2a 참조).

[0093] FKBP의 서열이 변형될 수 있고, 상응하는 FK506 리간드는 FKBP의 변형된 버전 및 FK506의 변형된 버전이 본원에 예시된 바와 같이 또는 본 개시내용보다 양호한 바람직한 친화도를 갖는 정도에 따라 변형될 수 있는 것으로 고려된다.

[0094] 융합 단백질의 다른 부분에 대해, 단량체로서 잘 이해된 내재화 공정을 위해 엽산 수용체(FR)가 선택된다. 선행 연구에 따르면 ‘매직 카보네이트’ 연결된 엽산 접합체는 FR을 통해 내재화되고 세포 내부의 환원성 환경에 의해 분열될 수 있음을 알 수 있다. 이 메커니즘을 사용하여 FK506-FKBP 접합체 약물 페이로드는 FR에 의해 내재화되고, 세포질로 방출될 것이다.

[0095] CAR T 치료의 큰 잠재력 및 심각한 부작용으로 인해, 여러 개의 제어된 CAR T 세포 디자인이 보고되었다. 이들 중 대부분은 T 세포 활성화를 위해 불린 게이트(boolean gate) 또는 캐스케이드 경로를 통합하여 ON/OFF 스위치에 집중했다(도 3 참조, 왼쪽, CAR T 세포 활성의 음성 및 양성 조절을 나타냄, CAR T 세포의 시공간 제어에 대

한 탐구, Sun J. 등. 2015로부터 적응됨). 말콤(Malcolm) K.B. 그룹은 FKBP-카스파제9 융합 단백질을 설계하고, FK506 이량체를 사용하여 표적 세포의 세포자멸사를 유도한다(도 3 참조, 오른쪽, AP1903(FK506 이량체) 유도된 FKBP-카스파제9 매개 세포자멸사 및 AP1903의 구조를 도시함, 채택한 세포 치료에 대한 안전 스위치로서 유도성 세포자멸사, Malcolm K.B. 등 2011로부터 적응됨).

[0096] 본 발명은 상기 보고된 방법에 비해 여러개의 장점이 있다: 1. 바이너리 ON/OFF 스위치 대신, 본 플랫폼은 여러 종류의 조절 페이로드를 전달하여 표적 세포의 여러 측면을 변경하여 바이너리 ON/OFF 스위치에 비해 큰 가요성을 제공할 수 있다; 2. 제어 모이어티, FK506-페이로드의 소분자이므로, 사전-조작된 세포와 비교하여 선행 제어 및 용량 최적화가 가능하게 한다. 3. 플랫폼은 CAR T 세포뿐만 아니라 많은 다른 줄기 세포 기반 재생 요법에 이용될 수 있다.

[0097] 이 플랫폼의 가장 참신하고 가장 중요한 부분은 다기능 페이로드이며, 이는 잠재적 부작용을 해결하거나 세포 치료의 효율성을 개선시키기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 세포독성 약물은 하기와 같은 경우에 이식된 세포로 전달될 수 있다: 1. 세포가 과다-증식하여 항CD19 CAR T 세포와 같은 정상 기관 또는 시스템에 영향을 미친다. 2. 세포는 렌티바이러스 기반 유전자 변형 및 줄기 세포의 고유 특성에 있는 종양원성이 된다.

[0098] 반면에, 일부 세포 치료는 표적 조직의 억제성 미세환경으로 인해 성공률이 낮다. 예를 들어, 고품 종양에 대한 CAR T 세포 치료에서, 낮은 침투 속도 외에, CAR T의 증식 및 활성화는 MDSC 및 종양 세포에 의해 크게 억제된다. 이는 CAR T 세포에서 RORrt 작용제 또는 MAP 키나제 억제제 유도된 T 세포 활성화뿐만 아니라 TLR8 작용제 유도된 그랜자임 B의 발현에 의해 잠재적으로 완화될 수 있다. RORrt와 같은 세포내 표적이 본 발명의 페이로드에 더 적합할 수 있지만, TLR8과 같은 막 수용체는 또한 세포막에 근접하여 접근할 수 있다.

[0099] 줄기 세포 재생 요법에서, 페이로드는 질병 모델에 따라 더 다양하다. 줄기 세포를 유전자 전달 플랫폼으로 사용하여 개발된 사전-고정된 유전자를 전달하는 대신에, 본 발명은 이식된 세포 및 이들의 미세환경에 미세한 조절을 제공하고, 다양한 소분자 페이로드를 통해 원하는 표현형을 얻는다. 소분자는 FKBP-FRa 과발현된 이식 세포를 특이적으로 표적화하는, FK506에 접합되기 때문에, 소분자의 정상 조직의 비-특이적 표적화 또한 회피된다.

[0100] 많은 예 중 하나는 골격 재생 요법에서 골절 복구를 위해 중간엽 줄기 세포(MSC)에서 BMP2의 과발현을 유도하는 것이다. 한편, 이 약물 페이로드 전달 시스템을 통해, 이식된 세포에 GSK3 베타 억제제를 도입함으로써 BMP2 및 /또는 VEGF의 발현 수준이 증가될 수 있다. GSK3 베타 억제제는 골절 복구에 바람직한 약물이다. 따라서, GSK3 베타 억제제는 이식된 MSC의 기능 및 골절 부위 내의 미세환경을 추가로 조절하기 위한 잠재적인 페이로드로서 이상적이다.

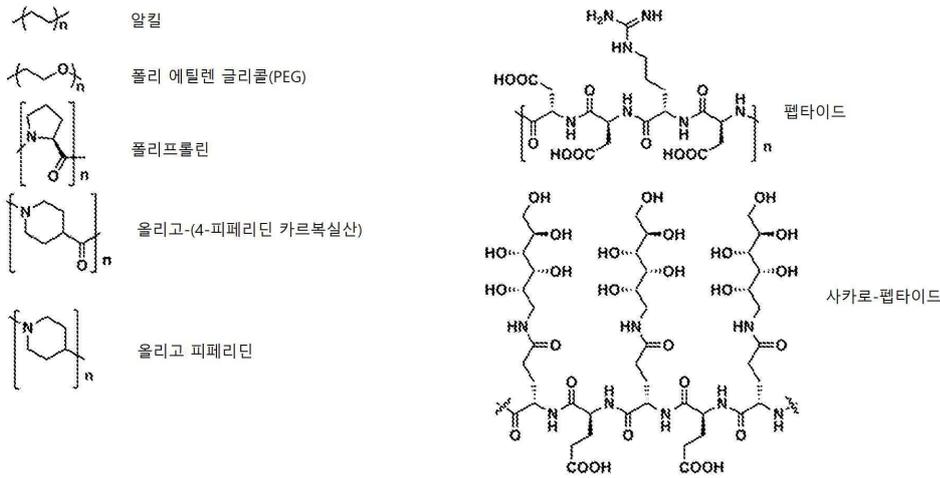
[0101] 이 약물 페이로드 전달 시스템의 다른 예는 알츠하이머, 파킨슨 병 등을 포함하는 신경퇴행성 질환으로 적용되며, 여기서 MSC 기반 치료는 유망한 미래를 보유하고 있다. MSC는 신경 재생을 촉진하기 위해 GDNF, VEGF 및 많은 다른 사이토카인을 과발현하도록 변형되었다. 한편, MAO-B 억제제와 같은 소분자는 정상세포에서 GDNF, NGF 및 BDNF의 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다. PI3K 억제제(BEZ235), Cdk5 억제제(로스코비틴) 및 GSK3b 억제제(NP-12)와 같은 알츠하이머 병의 치료를 위한 여러 키나제 억제제도 제안되어 있다. 신경퇴행성 모델에서 이들 소분자의 MSC로의 특이적 전달을 목표로 하는 FK506-FKBP 쌍을 사용하면, 다른 비-표적 조직에서 이들 강력한 억제제 및 작용제의 부작용을 피하면서 재생 효능을 향상시킬 것이다.

[0102] 재료 및 방법:

[0103] **화합물 및 합성 과정:**

[0104] 표적 리간드는 링커를 통해 페이로드와 연결된다. 링커 최적화 옵션이 하기에 열거되어 있다. 페이로드는 3가지 종류로 분류된다: I 이미징, II 세포독성 약물, III 조절 소분자 약물.

[0105] **링커 최적화:**



[0106]

[0107]

화합물 분류:

분류	기능	예
I	영상화	형광 염료: 로다민, FITC 방사성 동위원소 영상화: EC20 킬레이트 헤드, NOTA, DOTA
II	세포독성 약물	항-미세관 약물: 투볼리신, DM1, DM4
III	조절제	키나제 억제제: 다사티닙, MEK1/2i, PI3Ki siRNA: mi181a1

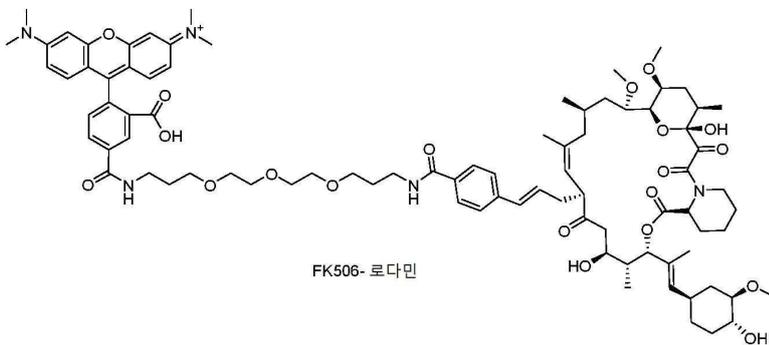
[0108]

[0109]

상세한 화합물 구조 및 합성 경로

[0110]

FK506-로다민:



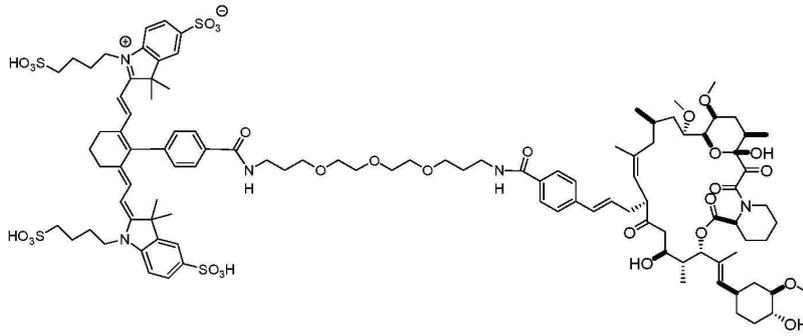
[0111]

[0112]

과정: 디메틸포름아미드 중의 로다민-NHS 에스테르(1.0 당량)를 실온에서 2시간 동안 Boc-NH-PEG₃-NH₂(1.2 당량) 및 디이소프로필에틸아민(3.0 당량)과 반응시켰다. 생성물을 UV 검출기를 사용하여 분취용 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 정제된 로다민-PEG₃-NH-Boc 접합체(1.0 당량)를 1:10 TFA-디클로로메탄 시스템에서 2시간 동안 교반함으로써 Boc 탈보호를 실시하였다. 이어서, 미정제 유리 아민 생성물을 디메틸포름아미드에 용해시키고, 디이소프로필에틸아민(3.0 당량)의 존재하에 EDC(2.0 당량), HOBT(2.0 당량)로 활성화시켰다. 15분 후, FK506-CO₂H(1.2 당량, 참고 문헌: Bioorg. Med. Chem., 17(2009) 5763-5768의 과정을 사용하여 합성됨)를 첨가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 최종 FK506-로다민 접합체를 UV 검출기(파장 280 nm에서 모니터링함)를 사용하여 분취용 역상 HPLC 상에서 정제한 후 단리하였다. 미정제 생성물을 Xterra RP18 분취용 HPLC 컬럼(Waters)에 로딩하고, 95% 5 mM 인산 나트륨(이동상 A, pH7.4) 및 5% 아세토니트릴(이동상 B)로 시작하여 12mL/분의 유속으로 35분에 0% A 및 50% B에 도달하는 구배 조건으로 용리시켰다. 7분 분석용 HPLC-MS 분석에서 구배(0-50% B) 동안 생성물 피크의 체류시간 = 2.5분. ESI m/z = 1539.6. 약어: PEG = 폴리에틸렌 글리콜; EDC = 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보다이미드; HOBT = 하이드록시벤조트리아졸; HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피.

[0113]

FK506-NIR 염료:

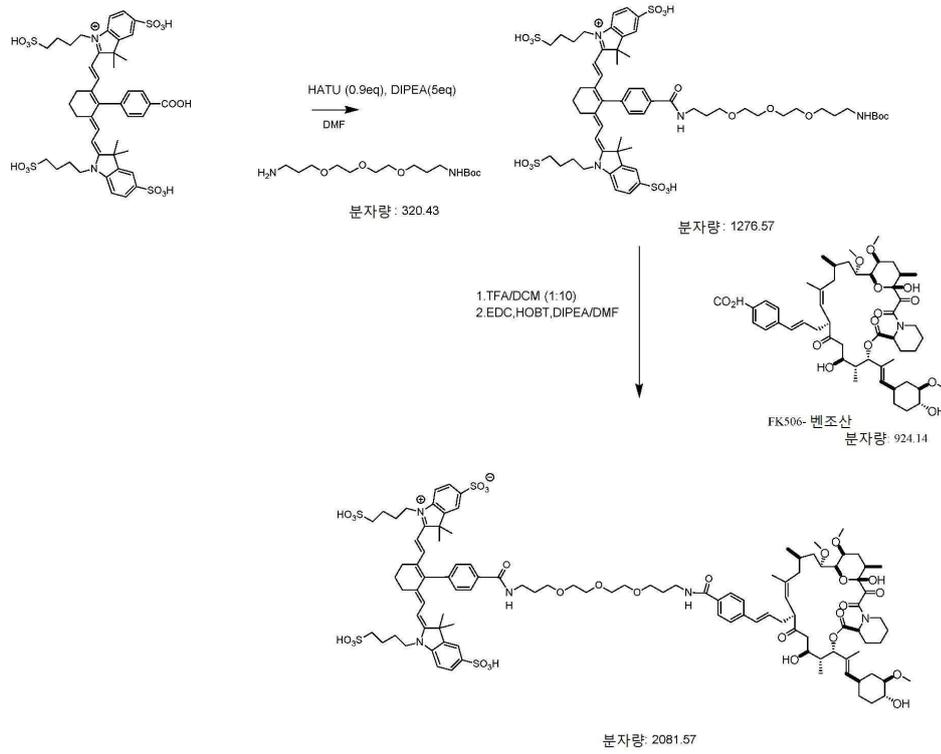


분자량: 2081.57

[0114]

[0115]

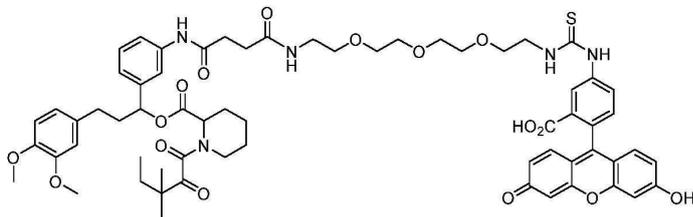
합성 과정:



[0116]

[0117]

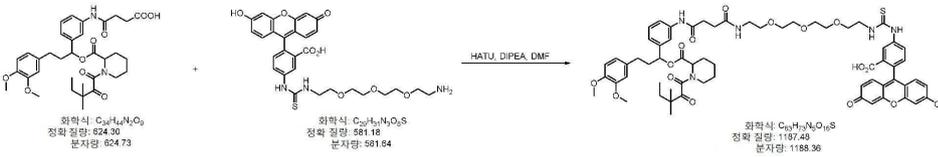
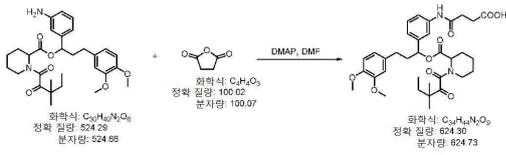
SLF-FITC:



화학식: $C_{63}H_{73}N_5O_{16}S$
 정확 질량: 1187.48
 분자량: 1188.36

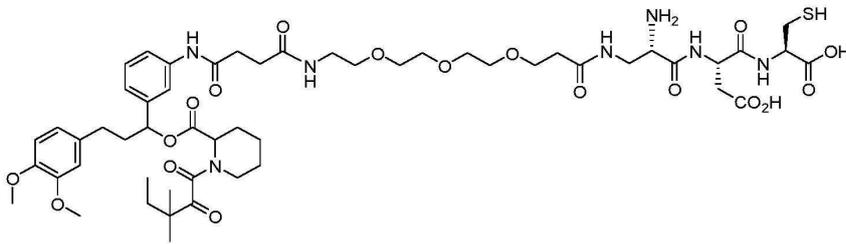
[0118]

[0119] 합성 과정:



[0120]

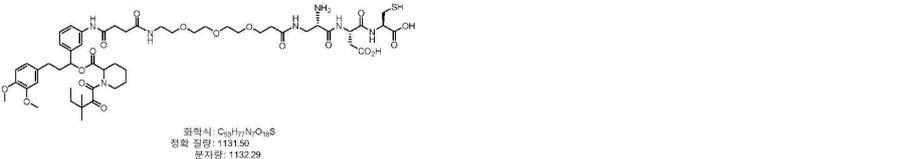
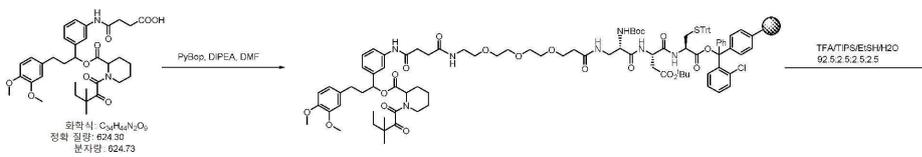
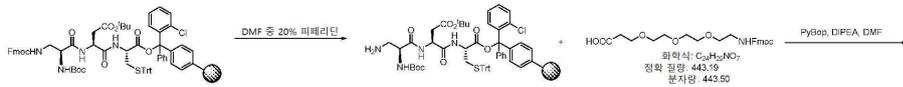
[0121] SLF-EC20:



화학식: $C_{53}H_{77}N_7O_{18}S$
 정화 질량: 1131.50
 분자량: 1132.29

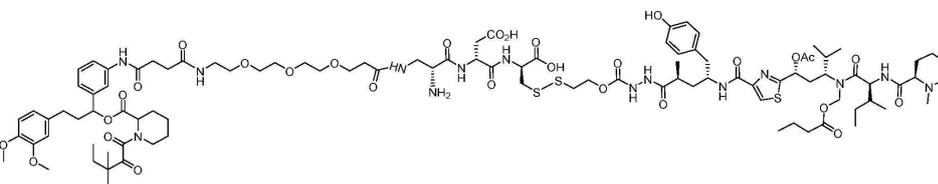
[0122]

[0123] 합성 과정:



[0124]

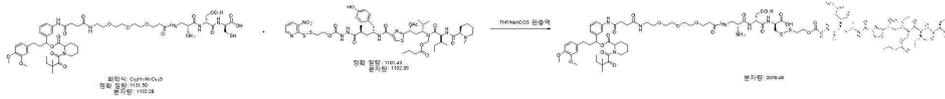
[0125] SLF-투블리신:



분자량: 2078.48

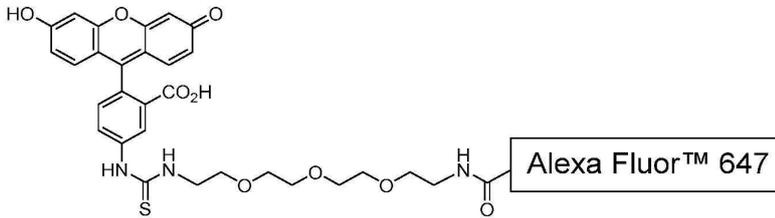
[0126]

[0127] 합성 과정:



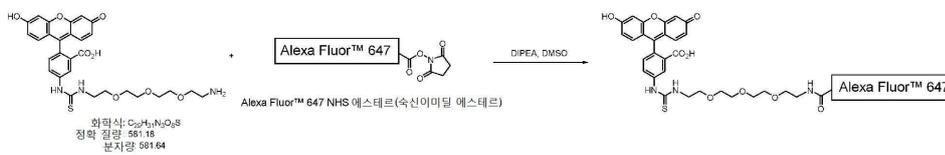
[0128]

[0129] FITC-AF647:



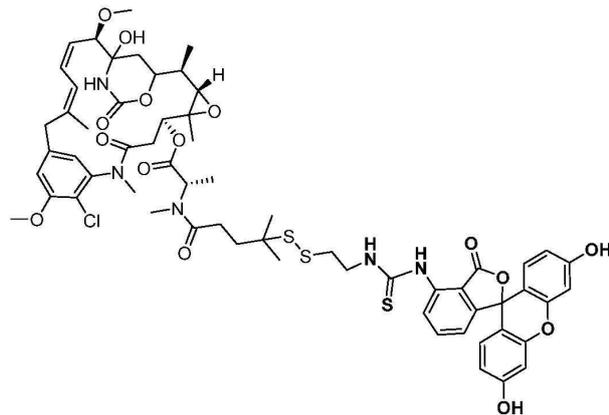
[0130]

[0131] 합성 과정:



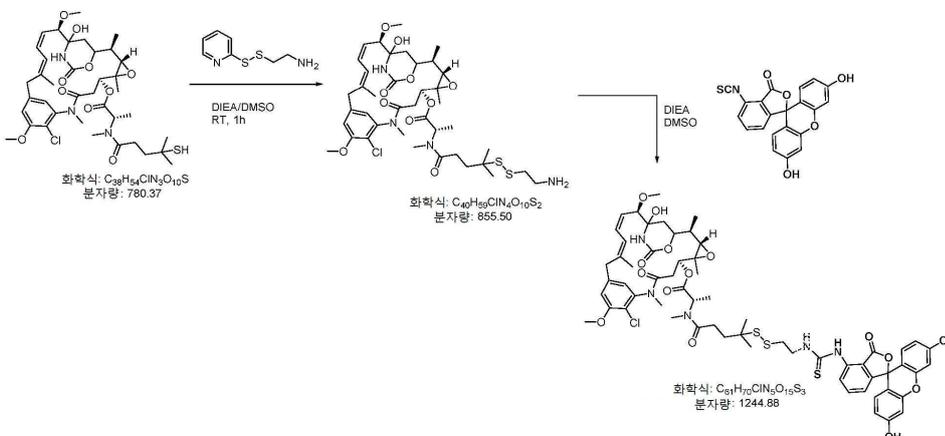
[0132]

[0133] FITC-DM4:



[0134]

[0135] 합성 과정:

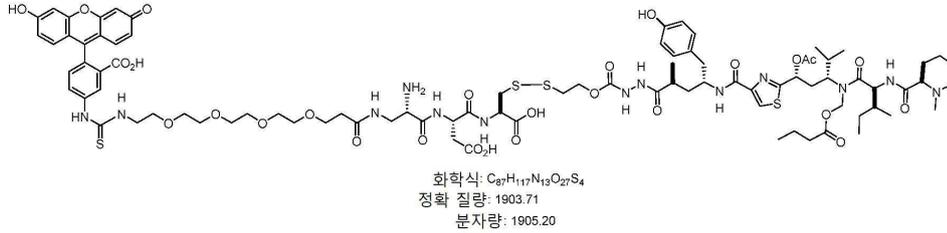


[0136]

[0137] 과정: 디메틸술폭사이드 중의 DM4(1.0 당량)를 실온에서 1시간 동안 2-(피리딘-2-일디설파닐)에탄-1-아민(1.0 당량) 및 디이소프로필에틸아민(3.0 당량)과 반응시켰다. 이어서, 생성된 미정제 생성물을 FITC(1.0 당량)와 반응시키고, 반응 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 최종 FITC-DM4 접합체를 UV 검출기(파장 280 nm에서 모니터링

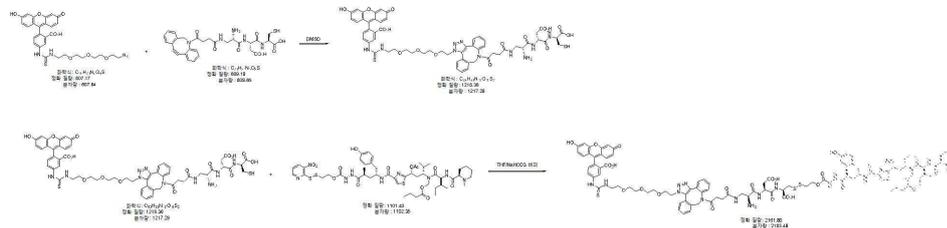
함)를 사용하여 분취용 역상 HPLC 상에서 정제한 후 단리하였다. 미정제 생성물을 Xterra RP18 분취용 HPLC 컬럼(Waters)에 로딩하고, 95% 5 mM 인산 나트륨(이동상 A, pH7.4) 및 5% 아세토니트릴(이동상 B)로 시작하여 12mL/분의 유속으로 10분에 0% A 및 100% B에 도달하는 구배 조건으로 용리시켰다. 7분 분석용 HPLC-MS 분석에서 구배(0~100% B) 동안 생성물 피크의 체류 시간 = 4.23분. ESI m/z = 1244.8. 약어: FITC = 플루오레세인 이소티오시아네이트; HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피.

[0138] FITC-Tub



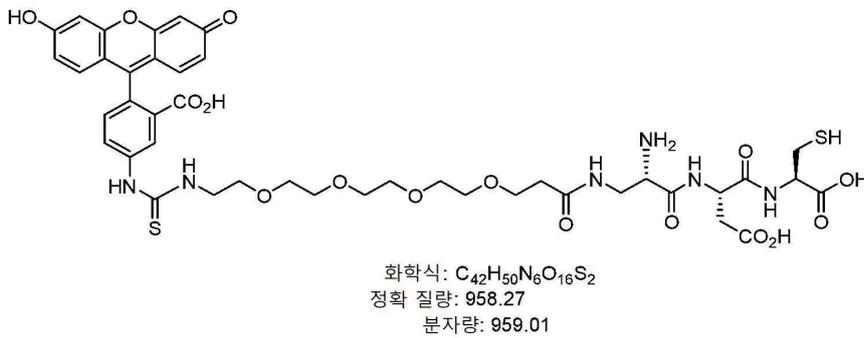
[0139]

[0140] 합성 과정:



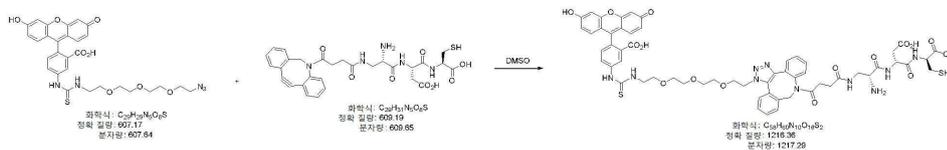
[0141]

[0142] FITC-EC20



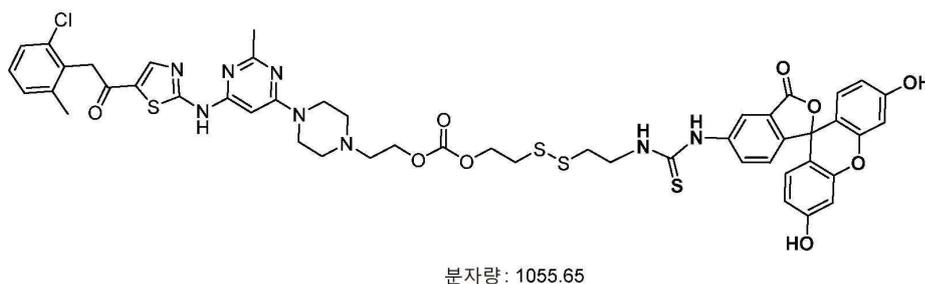
[0143]

[0144] 합성 과정:



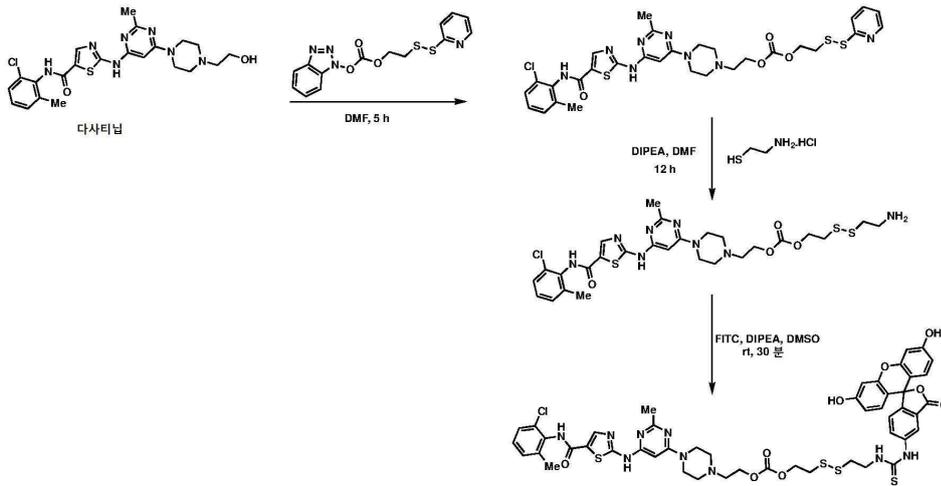
[0145]

[0146] FITC-다사티닙



[0147]

[0148] 합성 과정:



[0149]

[0150] 실험 과정:

[0151] 세포 배양

[0152] 293TN 세포를 렌티바이러스 패키징을 위한 항생제가 없는 10% FBS와 함께 DMEM에서 배양하였다. Raji 및 Jurkat 세포를 10% FBS, 10% 페니실린/스트렙토마이신과 함께 RPMI-1640에서 배양하였다. ficoll을 사용하여 1차 인간 T 세포를 hPBMC에서 분리하고, EasySep™ 인간 T 세포 강화 키트(19051, Stemcell Tech)에 의한 음성 선택으로 강화시키고, 1일 동안 Dynabeads CD3/CD28(11161D, Thermo Fisher)에 의해 활성화시키고, 30IU hIL2(130-097-745, Miltenyi Biotec Inc.)가 보충된 TexMACS 배지로 배양하였다. T 세포를 20% 인간 AB 혈청(HP1022, Valley Biomedical) 및 10% DMSO와 함께 RPMI-1640에서 동결보존하였다.

[0153] 렌티바이러스 패키징

[0154] 리포펙타민(Lipofectamine) 2000을 사용하여 트랜스진 발현 벡터 및 패키징 플라스미드 믹스(CPCP-K2A, Collecta)에 의한 293TN 세포의 형질감염을 통해 Pantropic VSV-G 유사형 렌티바이러스가 생산되었다. 24시간에, 바이러스 상청액을 수확하고, 농축한 다음, 특정 세포주, 또는 같은 날 해동된 1차 T 세포에 첨가하였다. T 세포 형질도입을 위해, 바이러스 상청액 및 8 ug/ml 폴리브렌을 첨가한 후 37도에서 2500 rpm에서 90분 동안 세포를 원심분리하였다.

[0155] 결합 분석

[0156] 결합 분석을 위해, 세포를 4도에서 30분 동안 리간드-염료 단독 또는 리간드-염료 및 유리 리간드(100x, 30분 동안 사전배양된)와 함께 배양하였다. 배양 후 세포를 3회 세척하고, 2% FBS PBS에 재-현탁시키고, 7-AAD를 첨가하여 죽은 세포를 게이트 아웃시켰다. FK506-로다민 및 FA-S0456의 FRET 영상화: 융합 수용체의 점유를 이해하기 위해, FKBP-FRa+ jurkat 세포는 지시된 서열 및 농도에서 FA/FA-S0456, FK506/FK506-로다민과 함께 배양한다. FRET는 BD Fortessa 유세포 분석기에 의해 검출되는, 동일하거나 근처의 수용체에서 FA-OTL38로 그의 에너지가 전달될 때 FA-로다민의 강도 손실에 의해 시각화된다. FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석했다.

[0157] GPI 고정된 단백질을 방출하기 위한 PI-PLC 처리

[0158] 1×10^5 세포를 30분 동안 37도에서 소화 완충액(2% BSA)에서 5 mU 또는 50 mU PI-PLC(P5542-5UN, Sigma)와 함께 배양하고; 배양 후, 세포를 PBS로 3회 세척한 다음, 리간드-염료와 함께 얼음 위에서 30분 동안 배양하였다.

[0159] 세포 생존력 분석

[0160] 세포를 96 웰 플레이트에 시딩하고, 유리 리간드 경쟁의 100x 사전배양과 함께 또는 없이, 2시간 동안 상이한 농도의 특정 리간드-세포독성 약물과 함께 배양하였다. 2시간 배양 후, 세포를 따뜻한 배지로 3회 세척하고, 새로운 배지로 보충하였다. 72시간 후, CellTiter-Glo® 분석(G7570, Promega)에 의해 세포 수를 시험하거나, 수용체 양성 세포의 리간드-염료 염색에 의해 정량화하였다.

- [0161] **CAR T 세포 용해 효과**
- [0162] 1×10^5 CAR T 및 특정 수의 Raji 세포를 처리 약물의 존재 또는 부재하에 E:T 비에 따라 96 웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 24시간 후, LDH 분석을 위해 100 ul 상청액을 꺼내었다. 용해 백분율은 (치료군 - CAR T 단독)/(최대 용해-CAR T 단독)%로 계산되었다.
- [0163] **CAR T 세포의 소진**
- [0164] 1×10^6 Raji 세포를 배지 교체 없이 12시간마다 24 웰 플레이트에서 1×10^6 CAR T 세포에 반복적으로 첨가하였다. 소진 상태는 공-억제 분자: PD-1, LAG-3 및 Tim-3의 보다 낮은 용해 효과 및 보다 높은 발현을 특징으로 하였다.
- [0165] **리간드-세포독성 약물에 의한 융합 수용체 양성 CAR T의 생체내 절제**
- [0166] 4×10^5 luc+ Raji 세포를 NSG 마우스에 정맥내 주사하였다. 6일 후, 1×10^7 융합 수용체 양성 CAR T 세포를 정맥내 주사하였다. 8일에, 리간드-세포독성 약물(0.5 umole/kg, 1 umole/kg)을 1회 정맥내 주사하였다. CAR T 주사 후 3일마다 채취한 혈청 샘플을 사용하여 ELISA에 의해 IL2, INF γ 를 측정하였다. 말초 혈액내 CAR T 세포를 유세포 분석에 의해 계수하였다.
- [0167] **리간드-약물에 의한 융합 수용체 양성 CAR T의 생체내 조절**
- [0168] 4×10^5 luc+ Raji 세포를 NSG 마우스에 정맥내 주사하였다. 6일 후, 1×10^7 융합 수용체 양성 CAR T 세포를 정맥내 주사하였다. 7일에, 리간드-약물 약물(0.5 umole/kg, 1 umole/kg)을 1회 정맥내 주사하였다. CAR T 소진 모델의 경우, 6일에 1×10^5 CAR T를 정맥내 주사하고, CAR T 집단이 말초 혈액에 나타나고 종양 부담이 안정화되지 않고 계속 증가하면, 리간드-약물(0.5 umole/kg, 1 umole/kg)을 정맥내 주사하였다.
- [0169] **융합 수용체 양성 CAR T의 생체내 영상화 및 추적**
- [0170] 2×10^6 Raji를 NSG 마우스의 오른쪽에 피하 주사하였다. 14일 후, 1×10^7 융합 수용체 양성 CAR T를 정맥내 주사하였다. 16일에, 동물에게 정맥내 주사에 의해 ^{99m}Tc -결합 접합체(10 nmol, 150 μCi)를 투여하고, SPECT 영상화 기계에 의해 영상화하였다.
- [0171] 실시예
- [0172] **1. 융합 단백질 설계 및 그의 발현**
- [0173] **1.1 FKBP-FR 융합 수용체(서열번호 2)의 설계**
- [0174] **FK506 유도체의 합성: FK506-로다민 및 FK506-투블리신** 합성은 재료 및 방법 섹션에 기재되어 있다.
- [0175] hFRa는 신호 펩타이드로서 N 말단에 24개의 아미노산을 갖는 GPI 고정된 막 단백질이다. 막 제시 및 내재화 특성을 보존하기 위해, FRa의 전장을 사용하기 위해 선택하고, hFKBP 서열과, hFRa의 T24와 R25 사이의 가요성 펩타이드 링커(SGGGS)를 통합한다(도 4a). 가요성 링커는 인체에서 일반적인 효소 소화내 내성이 있도록 선택된다. 이어서, 전체 서열을 pWPI 렌티바이러스 발현 벡터에 삽입하고, 형질도입된 T 세포에서 단백질 발현을 위한 바람직한 프로모터로서 EF1a를 사용한다.
- [0176] **1.2 형질도입된 세포에서 FKBP-FR 융합 수용체의 발현**
- [0177] FKBP-FRa의 발현은 렌티바이러스 형질도입된 K562에서 웨스턴 블롯에 의해 확인된다. 형질도입된 K562 세포 용해는 hFRa 항체에 대한 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 약 50 kDa의 특이적 밴드를 보여준다(도 4b).
- [0178] **1.3 FKBPFR3GS의 융합 단백질 작제(FF3으로 표시됨)**
- [0179] 도 4d(서열번호 12)를 참조한다. N 말단에서 C 말단까지는 신호 펩타이드로서 1~24 aa의 인간 FRa, 인간 FKBP 단백질, 3개의 Gly-Ser 링커 및 이어서 2~258 aa의 인간 FRa를 갖는다. FKBPFR1GS(FF1로 표시됨)의 작제물 설계에서, FF3의 3개의 Gly-Ser 링커는 다른 부분이 변경되지 않은 하나의 Gly-Ser 링커로 치환된다. 결합 분석법에 나타난 바와 같이, 링커 길이를 증가시키면 융합 단백질에서 두 성분 사이의 간섭이 감소된다.
- [0180] **1.4 GS 링커를 이용한 FITC-svFv-FR의 융합 단백질의 작제.**

- [0181] 도 4e를 참조한다. 작제물은 또한 4M5.3 FR(서열번호 13)로 명명된다. N-말단에서 C-말단으로, hCD8 신호 펩타이드, (FITC에 대한) 4M5.3의 svFv, GS 링커, 25~258 aa의 인간 FRa를 갖는다.
- [0182] **1.5. FK506-99mTc PET 영상화에 의한 FKBP-FRa/FKBPtFRa 양성 세포의 생체내 비침습적 추적**
- [0183] CAR T 세포 모델의 경우, 1×10^6 KB 세포를 NSG(잭슨(Jackson) 연구소)에 피하 이식한다. 종양이 100 mm^3 에 도달한 후, 1500만 항-FITC CAR+ FKBP-FRa+ 또는 항-FITC CAR+ FKBP-FRa-인간 T 세포를 마우스에 정맥내 주사하였다. FITC-FA는 CAR T의 증식을 유도하기 위해 지시된 날에 주사한다. 마우스를 CAR T 이식 후 2일마다 다음 과정에 의해 영상화한다. 영상화 당일, 이전 보고서에 따라 99mTc로 FK506-EC20 헤드를 제조하였다. 100 μl 용액 중 200uCi 99mTc를 각 마우스에 정맥내 주사하고, 전신 이미지를 MiLab PET/CT에 의해 촬영하여, 종양 영역, 비장 및 림프절에 초점을 맞춘다. PMOD 소프트웨어로 3D 이미지를 재구성한다. CAR T 이식 후 약 10일째에 마지막 영상화 후, 마우스를 안락사시키고, 각 장기내 99mTc 분포를 감마 카운터에 의해 계수한다.
- [0184] 조혈 줄기 세포 이식 모델의 경우, 인간화된 NSG 마우스가 이전에 보고된 바와 같이 생성된다. 1천만개의 CD34+ FKBP-FRa+ hHSC를 인간화된 NSG 마우스에 정맥내 주입한다. 4개월 후, 골수 및 척추에 초점을 맞추면서, 상기 언급된 바와 같이 FK506-99mTc를 사용하여 전신 이미지를 촬영한다.
- [0185] **2. FKBP-FRa 융합 수용체는 FK506-페이트드에 특이적으로 결합 및 내재화한다**
- [0186] **2.1 FKBP-FRa 융합 수용체는 FK506-로다민에 특이적으로 결합한다**
- [0187] 결합 분석을 위해, 세포를 4도에서 30분 동안 리간드-염료 단독 또는 리간드-염료 및 유리 리간드(100x, 30분 동안 사전배양된)와 함께 배양하였다. 배양 후 세포를 3회 세척하고, 2% FBS PBS에 재현탁시키고, 7-AAD를 첨가하여 죽은 세포를 게이트 아웃시켰다. BD Fortessa 유세포 분석기를 사용하였다. FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석했다.
- [0188] **2.2. FKBP-FRa 융합 수용체에 의한 FK506-로다민의 결합(FK506-로다민 및 FA-S0456의 FRET 영상화)**
- [0189] 융합 수용체의 점유를 이해하기 위해, FKBP-FRa+ jurkat 세포를 지시된 서열 및 농도에서 FA/FA-S0456, FK506/FK506-로다민과 함께 배양한다. FRET는 BD Fortessa 유세포 분석기에 의해 검출되는, 동일하거나 근처의 수용체에서 FA-OTL38로 그의 에너지가 전달될 때 FA-로다민의 강도 손실에 의해 시각화된다.
- [0190] 도 5는 FKBPFR1GS 융합 단백질에서 염산의 결합이 0.01 nM만큼 낮은 FK506-로다민의 결합을 차단하고, 50 nM에서 FK506 로다민 결합을 완전히 폐지함을 보여준다.
- [0191] 도 6은 FKBPFR1GS jurkat 세포가 염산 수용체 표적 염료인 OTL38에 결합한 후 FK506-로다민 강도가 감소되었음을 보여준다. FK506-로다민(공여체)에서 OTL38(FA-S0456, 수용체(acceptor), ex/em:774/794nm)로의 FRET는 융합 수용체내에서 FR과 FKBP 사이의 상호작용을 나타낸다.
- [0192] 도 7은 FKBP와 FR 사이의 링커 길이를 증가시키는 것이 융합 단백질의 두 성분 사이의 간섭을 상당히 낮춘다는 것을 보여준다. FF1(FKBP와 FR 사이의 1GS)과 비교하면, FF3(FKBP와 FR 사이의 3GS)은 10 nM FA의 존재 하에 FK506-로다민의 결합을 유지하는데, 이는 인체내 FA의 생리학적 농도와 비슷하다.
- [0193] **2.3. GPI 고정된 FF3 융합 수용체의 방출**
- [0194] FF3 융합 단백질을 갖는 PI-PLC 처리 T 세포를 사용하여 GPI 고정된 수용체 FF3의 방출을 초래하였다. FF3 융합 수용체를 갖는 Jurkat T 세포는 20 nM FA-FITC(EC17)와의 포화된 결합을 나타내는 반면, 5 μM PI-PLC 또는 50 μM PI-PLC 처리 후 FA-FITC는 세포에 대한 결합을 잃어 GPI 고정된 FF3 융합 수용체의 방출을 나타낸다. 도 8을 참조한다.
- [0195] **2.4 인간 T 세포에서 융합 단백질 FKBPFR3GS는 FR 결합 특성을 유지한다**
- [0196] FA-로다민 결합 곡선은 FKBPFR3GS 융합 수용체에 제시되어 있다. 인간 T 세포상에서 안정적으로 발현된 FKBPFR3GS 융합 수용체는 FR+ KB 세포내 FA-로다민의 친화도(K_d 약 1 nM)와 비슷한, 높은 친화도($K_d = 0.95 \text{ nM}$)로 염산 유도체(FA-로다민)에 결합할 수 있다. 따라서, 융합 수용체에서 FR의 결합 특성이 유지된다. 도 9를 참조한다.
- [0197] **2.5 인간 T 세포내 융합 단백질 FKBPFR3GS는 FKBP 결합 특성을 유지한다**
- [0198] FKBPFR3GS 융합 수용체에서의 FK506-로다민 결합 곡선. 인간 T 세포 상에서 안정적으로 발현된 FKBPFR3GS 융합

수용체는 높은 친화도($K_d = 3.93 \text{ nM}$)로 FK506 유도체(FK506-로다민)에 결합할 수 있으며, 이는 융합 수용체에서 FKBP의 결합 특성이 보존됨을 의미한다. 도 10을 참조한다.

- [0199] **2.6 SLF-FITC는 상대적으로 높은 결합 친화도($K_d = 62 \text{ nM}$)로 FKBPF3R3GS 융합 수용체에 결합한다**
- [0200] 유리 SLF(100, 사전배양)의 경쟁은 SLF-FITC 결합을 차단한다. FK506의 모방인 SLF는 모체 리간드 FK506과 비교하여, FKBPF3R 융합 수용체에 대한 10배 더 낮은 결합 친화도를 나타낸다. 도 11을 참조하고, 도 10과 비교한다.
- [0201] **2.7 4M5.3FR 융합 수용체에서 FA-로다민의 결합 곡선.**
- [0202] FA-로다민은 FR+ KB 세포(K_d 약 1 nM)내 FA-로다민의 친화도와 비슷한, 높은 친화도($K_d = 2.25 \text{ nM}$)로 인간 T 세포에서 안정적으로 발현된 4M5.3FR 융합 수용체에 결합할 수 있다. 따라서, FR 결합 특성은 4M5.3FR 융합 수용체에서 보존된다. 도 12를 참조한다.
- [0203] **2.8 4M5.3FR 융합 수용체에서의 FITC-AF647 결합 곡선.**
- [0204] FITC-AF647은 높은 친화도($K_d = 8.03 \text{ nM}$)로 인간 T 세포에서 안정적으로 발현되는 4M5.3FR 융합 수용체에 결합할 수 있다. $100\times$ comp는 유리 FITC 나트륨을 나타낸다. FITC와 scFv 4M5.3의 결합 특성은 4M5.3FR 융합 수용체에서 보존된다. 도 13을 참조한다.
- [0205] **3.1. FF3+ 인간 T 세포에 대한 FA-투블리신 사멸 효과**
- [0206] FA-투블리신은 FF3+ 인간 T 세포에 대한 수용체 특이적 사멸 효과를 매개할 수 있다. FA를 통한 보상(FA를 사용한 $100\times$ 사전배양)은 효과를 차단한다. 이는 FF3 융합 수용체 시스템을 통한 유리 약물 투블리신의 성공적인 내재화 및 방출을 의미한다. 도 14를 참조한다.
- [0207] **3.2 혼합된 인간 T 세포 배양액에서 hFF3+ 집단에 대한 FA-투블리신 사멸 효과.**
- [0208] FA-투블리신은 혼합된 인간 T 세포 배양액에서 hFF3+ 집단을 특이적으로 사멸시킨다. FA-Tub 농도가 증가함에 따라 hFF3+ 세포의 백분율이 감소한다. 도 15를 참조한다.
- [0209] **3.3 SLF-Tub는 $IC_{50} = 138 \text{ nM}$ 으로 hFF3+ Jurkat 세포를 특이적으로 사멸시킨다.**
- [0210] hFF3 Jurkat 세포와 SLF-Tub의 2시간 배양은 수용체 양성 세포를 사멸시킬 수 있다. 이는 FKBPF3R3GS 융합 수용체에 의한 SLF-Tub의 성공적인 내재화와 세포 내부의 투블리신의 방출을 나타낸다. 도 16을 참조한다.
- [0211] **3.4. 4M5.3FR+ 인간 T 세포에 대한 FITC-DM4 및 FITC-Tub 사멸 효과**
- [0212] FITC-DM4 및 FITC-Tub는 모두 4M5.3FR+ 인간 T 세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있는 반면, FITC-Tub는 IC_{50} 이 더 높다. 유리 FITC 나트륨($100\times$ 사전배양)의 보상은 수용체 매개된 사멸 효과를 차단한다. 이는 4M5.3FR 융합 수용체를 통해 FITC-세포독성 약물의 T 세포 내로의 성공적인 내재화 및 방출을 의미한다. 도 17을 참조한다.
- [0213] **3.5. FITC-투블리신은 혼합된 인간 T 세포 배양액에서 4M5.3FR+ 집단을 특이적으로 사멸시킨다.**
- [0214] FITC-Tub 농도가 증가함에 따라 4M5.3FR+ 세포의 절대 수는 감소하는 반면, 4M5.3FR- 세포는 방출된 약물 및 고농도에서 방관자 효과를 통해 사멸된다. 도 18을 참조한다.
- [0215] **3.6. FITC-DM4는 혼합된 인간 T 세포 배양액에서 4M5.3FR+ 집단을 특이적으로 사멸시킨다.**
- [0216] FITC-DM4 농도가 증가함에 따라 4M5.3FR+ 세포의 절대 수는 감소하는 반면, 4M5.3FR- 세포는 방출된 약물 및 고농도에서 방관자 효과를 통해 사멸된다. 도 19를 참조한다.
- [0217] **3.7 CD19+ Raji에 대한 항CD19 CAR T 세포에 미치는 키나제 억제제 조절 효과**
- [0218] 10 nM 농도의 다사티닙(Lck 억제제) 및 이브루티닙(ITK 억제제)은 CD19+ Raji 종양 세포(표적)에 대한 항CD19 CAR T 세포(FMC63 CAR T, 이펙터)의 용해 효과를 감소시킨다. 2개의 이펙터:표적 비율(E:T)을 시험하였다. 정상 T 세포, 및 CD19-K562 세포를 갖는 항CD19 CAR T를 음성 대조군으로 사용하였다. 도 20을 참조한다.
- [0219] **3.8. FITC-다사티닙은 FMC63+4MFR+hT 세포의 Raji 세포로의 용해 효과를 감소시킬 수 있다.**
- [0220] 이는 4M5.3FR 융합 수용체를 통해 FITC-다사티닙의 T 세포로의 성공적인 내재화 및 방출 및 T 세포로의 다사티닙의 방출을 의미한다. 도 21을 참조한다.

[0221] 3.9 100 nM 농도에서의 TC-PTP 억제제는 소진된 항CD19 CAR T 세포에서 공동-억제제 분자 집단을 감소시킨다

[0222] 소진된 항CD19 CAR T 세포는 CD19+ Raji 세포로 7회 자극함으로써 생성된다(재료 및 방법 섹션의 상세한 과정 참조). 치료시 PD-1 양성, LAG3 양성 및 이종 양성 집단이 감소한다. 도 22를 참조한다.

[0223] 4. 세포 치료의 활성을 제어하기 위한 기타 FK506-페이로드

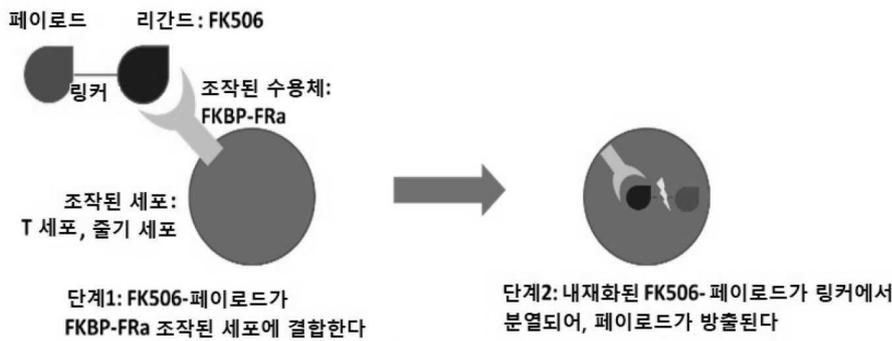
[0224] 이 약물 페이로드 전달 시스템의 기술적인 유리한 특징은 다-기능성을 갖는 것이다. 잠재적인 페이로드 및 해당 효과는 하기와 같다(표 1). 소분자 페이로드는 하기 파라미터에 기초하여 선택된다: 1. 시험관내 및 생체내 모두에서 유리 약물의 기능 분석은 공개된 문헌 또는 연구실에서 확인되었다. 2. 약물의 화학 구조는 유도체화를 위해 비교적 더 접근가능한 유리 아민을 갖는다. 3. 임의의 하기가 바람직할 것이다: FDA 인가된 약물; 합리적인 가격으로 시판. FK506-페이로드는 시험관내 실험을 위해 먼저 시험될 것이고, T 세포 활성화 및 줄기 세포 사이토카인 방출은 다중 면역분석에 의해 모니터링될 것이다. 생체내 질환 모델의 경우, 본 연구실에서 CAR T 치료 및 골절 마우스 모델을 잘 확립하고, 신경퇴행성 마우스 모델을 위한 여러 잠재적 협력자를 확립하였다.

[0225]

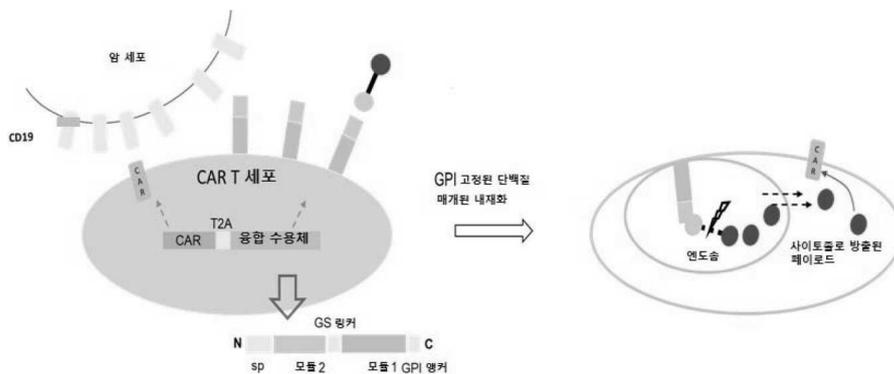
질병 모델	하위유형	세포유형	세포 공급원	페이로드 유형
줄기 세포 치료	HSC 이식	BMSC	유된 BM	GSK3b 억제제
중양	중양 미세환경	CAR T	hPBMC T 세포	GSK3b 억제제, HDAC 억제제, MAPK 억제제

도면

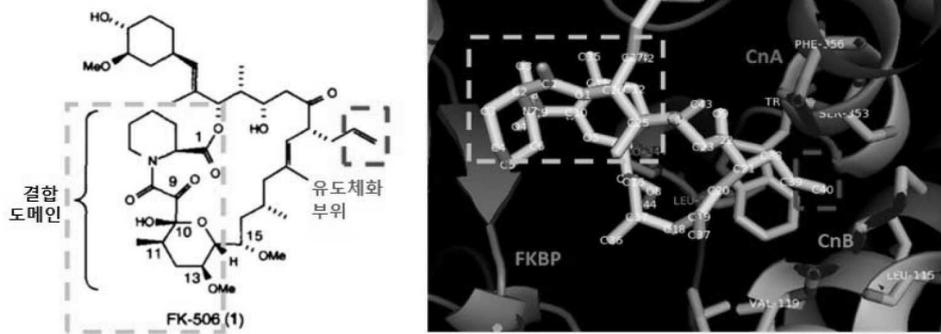
도면1a



도면1b



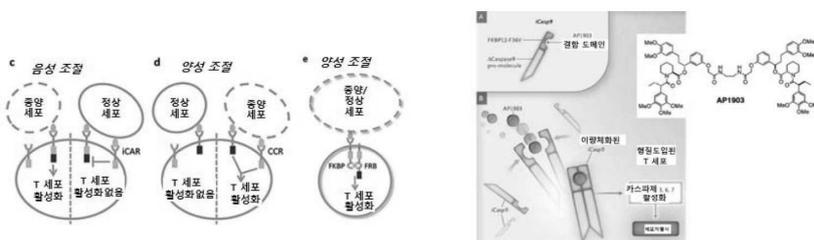
도면2a



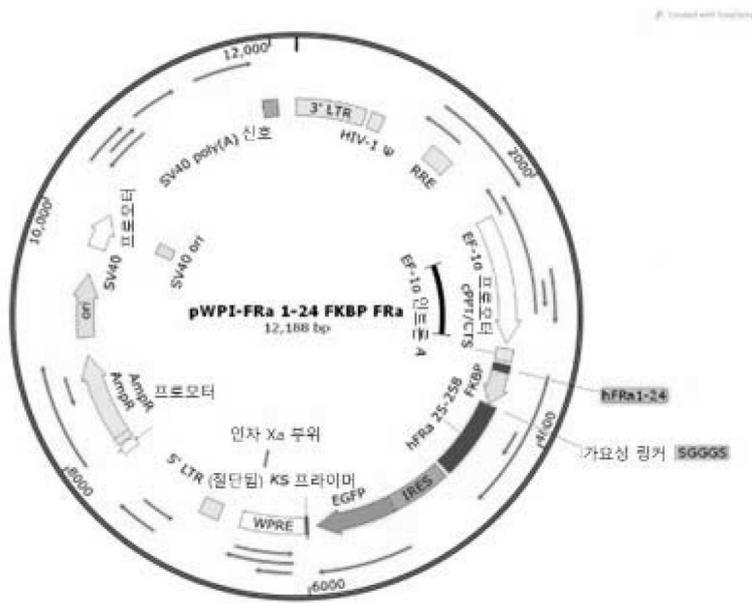
도면2b

모듈 1: GPI 고정된 단백질		모듈 2	
단백질	리간드	단백질	리간드
FRa	 FRa 유도체	FKBP	 FK506 유도체
			 SLF 유도체
FRb	 FRb 유도체	DHFR	 DHFR 유도체
uPAR	 uPAR 유도체	FITC에 대한 scFv	 FITC 유도체
		DNP에 대한 scFv	 DNP 유도체

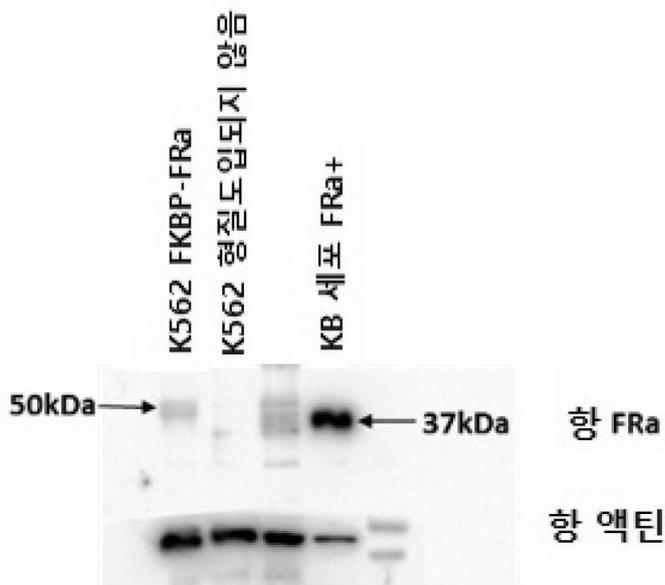
도면3



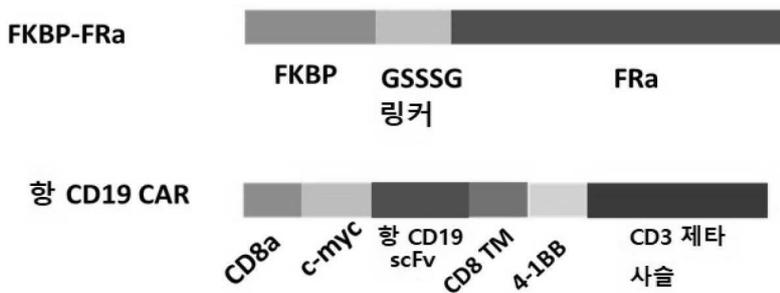
도면4a



도면4b



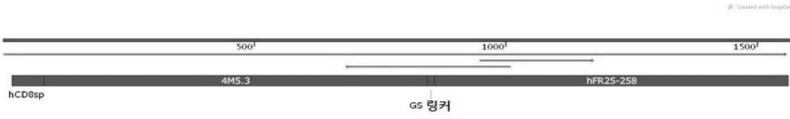
도면4c



도면4d

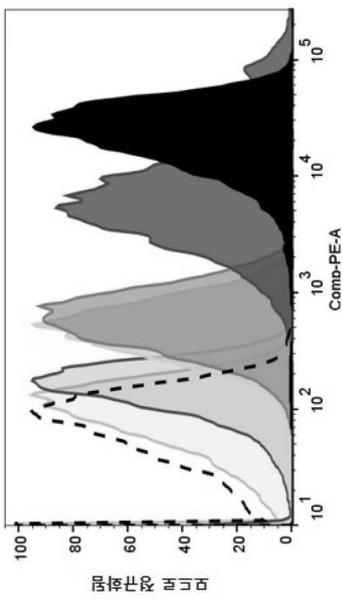


도면4e



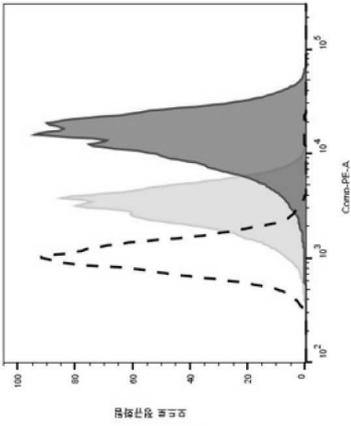
도면5

TUBE 명칭	
<input type="checkbox"/>	Jurkat 비염색
<input type="checkbox"/>	Jurkat 001nM FA 10nM Fk506-포도민
<input type="checkbox"/>	Jurkat 01nM FA 10nM Fk506-포도민
<input type="checkbox"/>	Jurkat 1nM FA 10nM Fk506-포도민
<input type="checkbox"/>	Jurkat 10nM FA 10nM Fk506-포도민
<input type="checkbox"/>	Jurkat 50nM FA 10nM Fk506-포도민

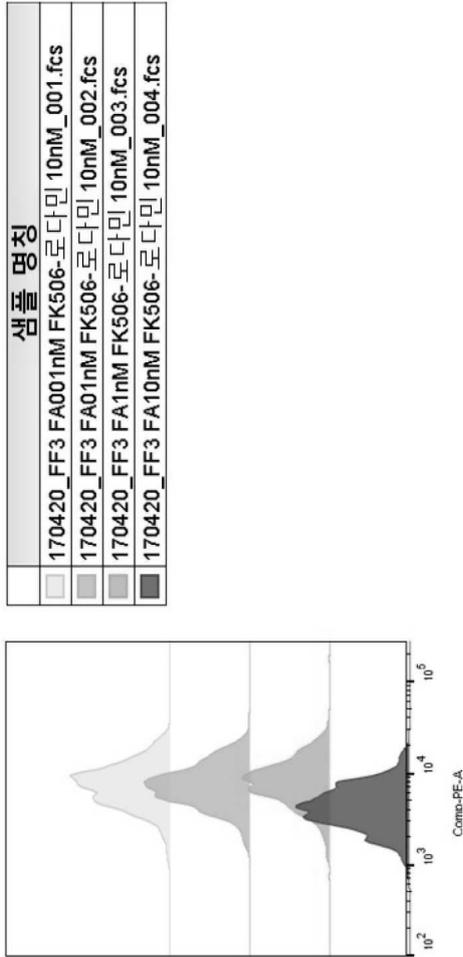


도면6

샘플 명칭	
	jurkat pWPI IFKBP-FRa_jurkat gfp 비염색_001.fcs
	jurkat pWPI IFKBP-FRa_jurkat tk506-로다민_002.fcs
	jurkat pWPI IFKBP-FRa_jurkat tk506-로다민 이후_003.fcs
	jurkat pWPI IFKBP-FRa_jurkat tk506-로다민 이후_004.fcs

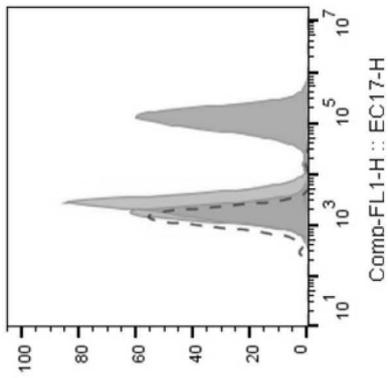


도면7



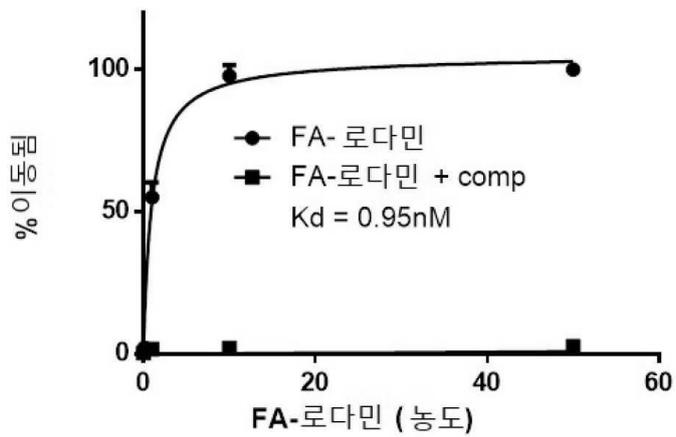
도면8

샘플 명칭	
□	G06 JhFF3 비염색.fcs
■	G01 JhFF3 EC17 20nM.fcs
■	G02 JhFF3 5mUPI-PLC 4C EC17.fcs
■	G03 JhFF3 50mUPI-PLC 4C EC17.fcs

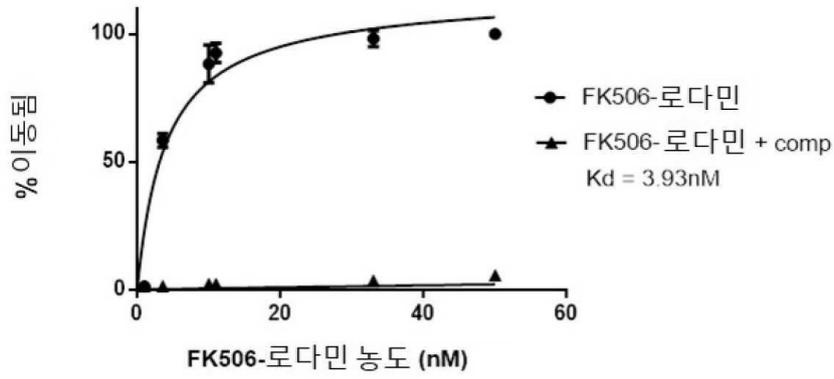


세포내용 플루오로

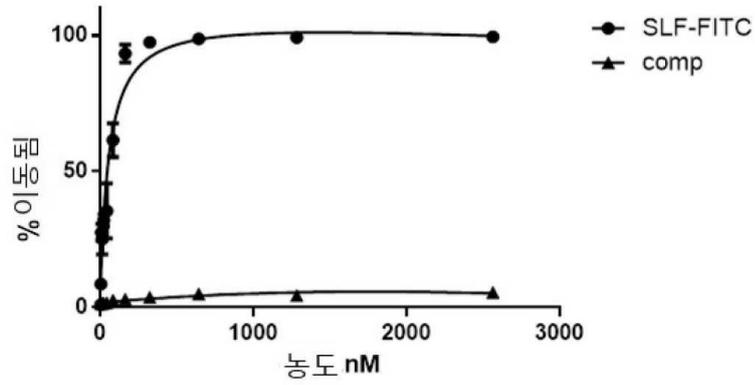
도면9



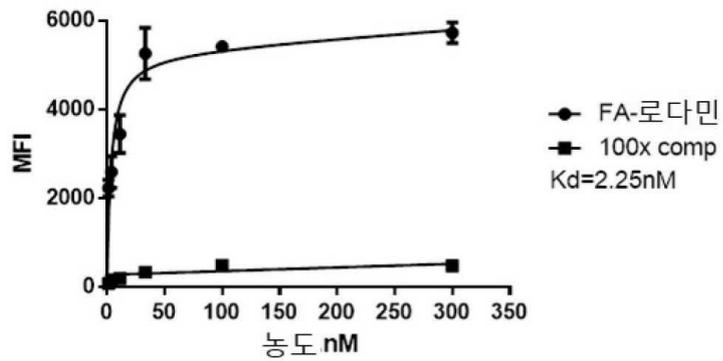
도면10



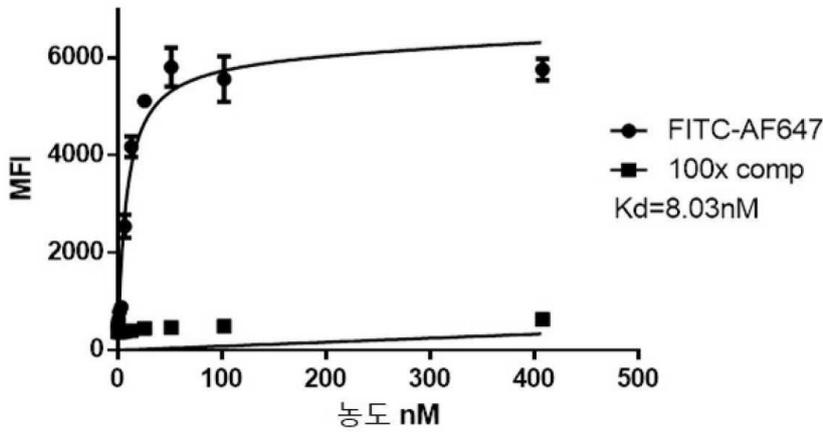
도면11



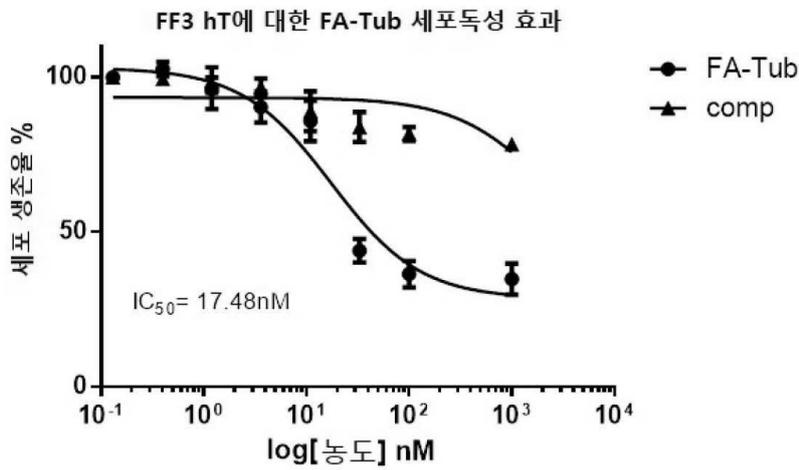
도면12



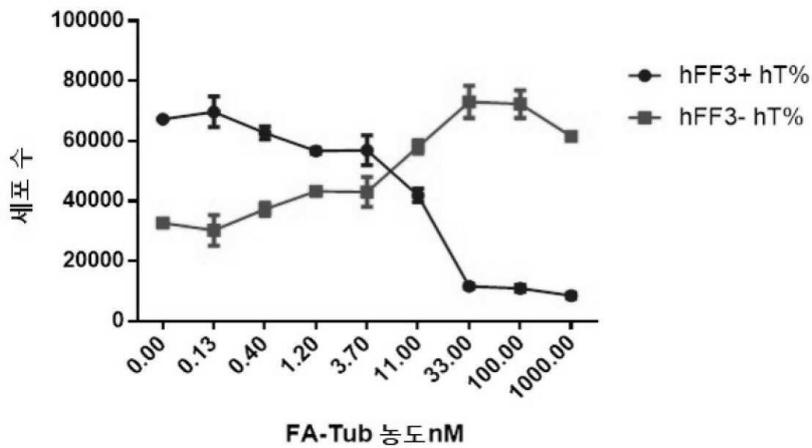
도면13



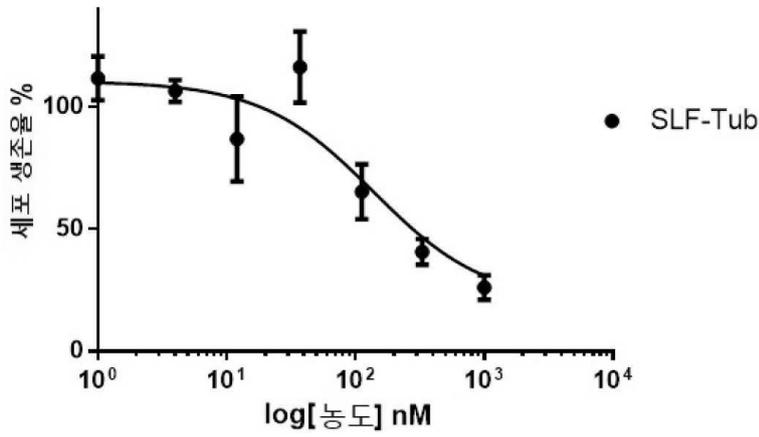
도면14



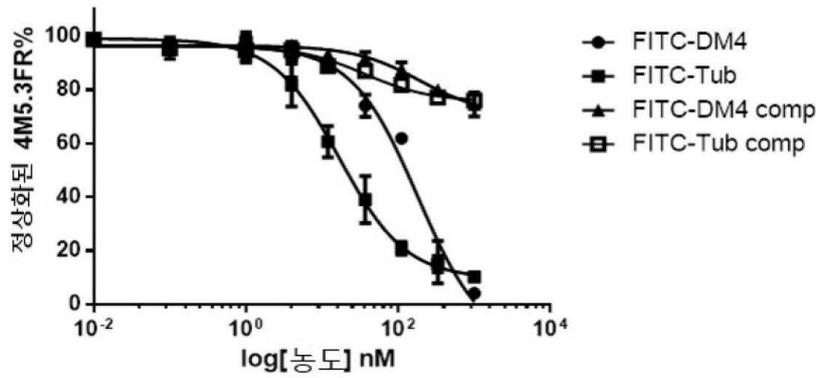
도면15



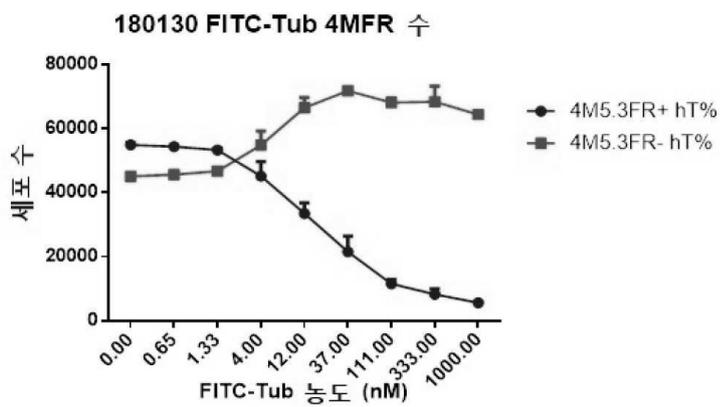
도면16



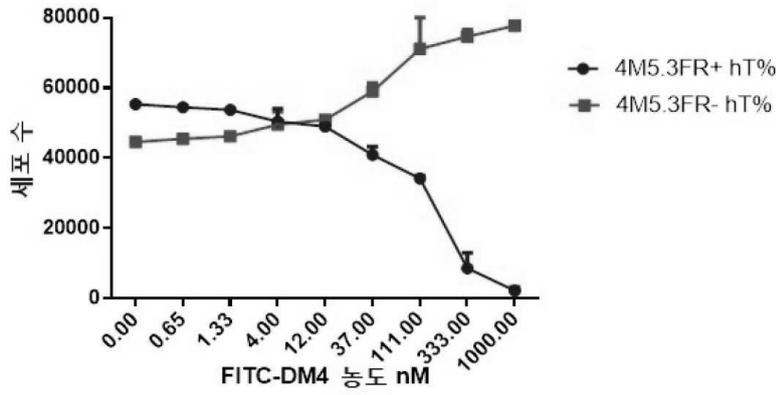
도면17



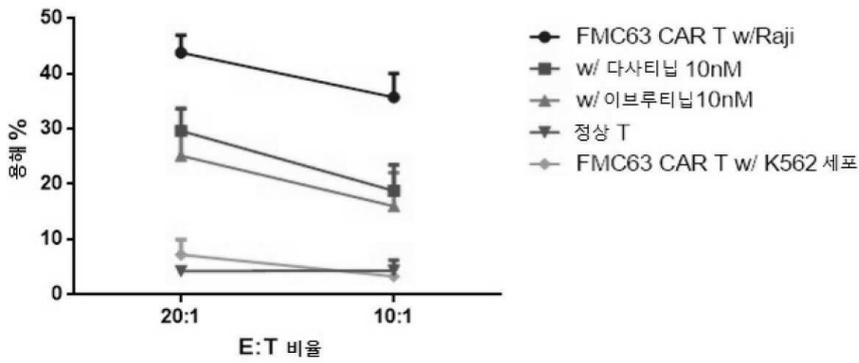
도면18



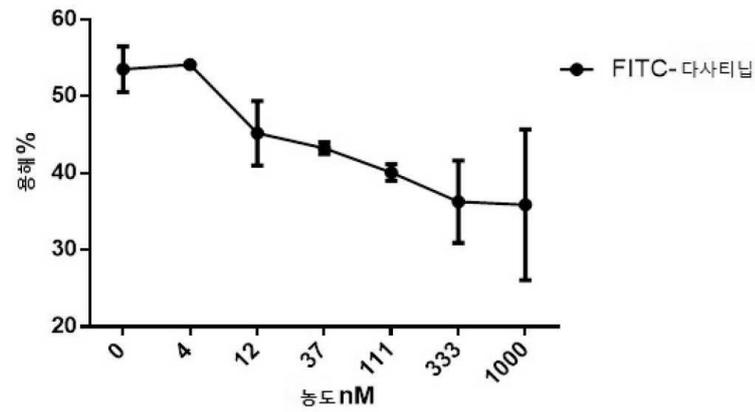
도면19



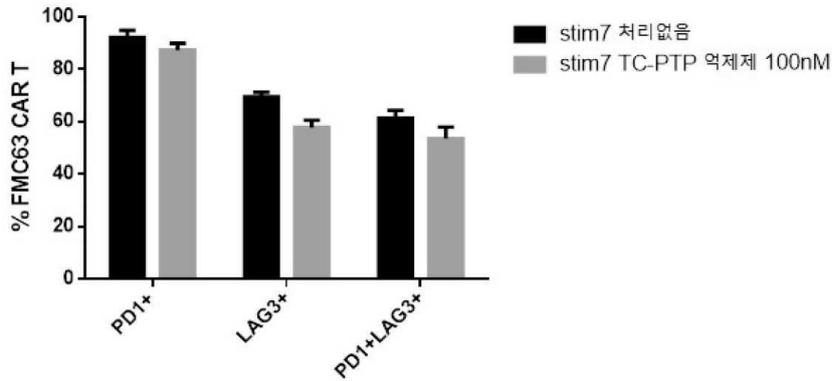
도면20



도면21



도면22



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Purdue Research Foundation

<120> FUSION PROTEIN AND LIGAND-PAYLOAD BASED DRUG DELIVERY FOR CELL THERAPY

<130> 67762-02

<150> 62/460,118

<151> 2017-02-17

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 367

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Amino acid sequence for mouse FKBP-FRa with linker peptide

<400> 1

Met Ala His Leu Met Thr Val Gln Leu Leu Leu Leu Val Met Trp Met

1 5 10 15

Ala Glu Cys Ala Gln Ser Arg Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser

20 25 30

Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val

35 40 45

His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg

50 55 60
 Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Thr Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile
 65 70 75 80

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

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

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

 Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe
 275 280 285
 Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser
 290 295 300

His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
 305 310 315 320

Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
 325 330 335

Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Ser Gly Ala Gly Phe His Gly Thr Trp
 340 345 350

Pro Leu Leu Cys Ser Leu Ser Leu Val Leu Leu Trp Val Ile Ser
 355 360 365

<210> 2

<211> 369

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Amino acid sequence for human FKBP-FRa with linker peptide

<400> 2

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
 1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser
 20 25 30

Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val
 35 40 45

His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg
 50 55 60

Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile
 65 70 75 80

Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala
 85 90 95

Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro
 100 105 110

Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu
 115 120 125

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

<210> 3

<211> 485

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Amino acid sequence for mouse antiCD19 CAR T construct

<400> 3

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Thr

1 5 10 15

Asp Ala Ile Cys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Ser Asp Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly

85 90 95

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

100 105 110

Glu Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Leu Thr Tyr Pro Arg Thr Phe

115 120 125

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gly Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Tyr Met His Phe Val Lys Gln Arg

180 185 190

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Glu

Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 450 455 460

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu Ala Pro Arg
 485

<210> 4

<211> 496

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Amino acid sequence for human antiCD19 CAR T construct

<400> 4

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

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

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

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

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

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

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 420 425 430

Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 435 440 445

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 450 455 460

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 465 470 475 480

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495

<210> 5

<211> 12182

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Vector sequence for pWPI for human T cell transduction

<400> 5

ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac 60
 acacaaggct acttccctga ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca 120
 ctgacctttg gatgggtgcta caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc 180
 aataaaggag agaacaccag cttgttacac cctgtgagcc tgcattggat ggatgacccg 240

 gagagagaag tgtagagtg gaggtttgac agccgcctag catttcatca cgtggcccga 300
 gagctgcate cggagtactt caagaactgc tgatatcgag cttgtctaaa gggactttcc 360
 gctggggact ttccaggag gcgtagcctg ggcgggactg gggagtggcg agccctcaga 420
 tcctgcatat aagcagctgc tttttgctg tactgggtct ctctggtag accagatctg 480
 agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 540
 ttgagtgctt caagtagtgt gtgccctctt gttgtgtgac tctggtaact agagatccct 600
 cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttgaaa 660

 gcgaaagggg aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg 720
 gcaagaggcg agggcgcgcg actggtgagt acgcaaaaa tttgactag cggaggctag 780

aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg 840
gaaaaaatc ggtaagcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaaca tatagtatgg 900
gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgttagaaac atcagaaggc 960
ttagacaaa tactgggaca gctacaacca tccttcaga caggatcaga agaacttaga 1020
tcattatata atacagtagc aacctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac 1080

accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag 1140
caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt ggagaagtga 1200
attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 1260
gagaagagtg gtcagagag aaaaaagac agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 1320
cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 1380
acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 1440
acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 1500

tgtgaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 1560
catttgacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggacagat 1620
ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagctaat 1680
acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga 1740
attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat 1800
aaaattattc ataattagat taggaggctt ggtaggttta agaatagttt ttgctgtact 1860
ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga cccacctccc 1920

aaccgaggg ggaccgcaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag 1980
agacagatcc attcagtag tgaacggatc tcgacggtat cgatgtcgac gataagcttt 2040
gcaaagatgg ataaagtttt aaacagagag gaatctttgc agctaatgga cettctaggt 2100
cttgaagga gtgggaattg gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca catcgccac 2160
agtccccgag aagttagggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg 2220
cggggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc ctttttccc aggggtggggg 2280
agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc 2340

cagaacacag gtaagtgcg tgtgtggttc ccgcgggcct ggctcttta cgggttatgg 2400
cccttgctg ccttgaatta cttccactgg ctgcagtacg tgattcttga tcccagctt 2460
cgggttggaa gtgggtggga gagttcgagg ccttgcgctt aaggagcccc ttcgctcgt 2520
gcttgagttg aggcctggcc tgggcgctgg ggccgccgcg tgcgaatctg gtggcacctt 2580
cgcgctgtc tcgctgcttt cgataagtct ctagccattt aaaatTTTTg atgacctgct 2640

gcgacgcttt ttttctggca agatagtctt gtaaatacgg gccaagatct gcacactggt 2700
 atttcggttt ttggggccgc gggcggcgac ggggccctg cgtcccagcg cacatgttcg 2760

gcgaggcggg gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac ggggtagtc tcaagetggc 2820
 cggcctgctc tggcgcctgg cctcgcgccg ccgtgtatcg ccccgccctg ggcggcaagg 2880
 ctggcccggc cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgttcccgg cctgctgca 2940
 gggagctcaa aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc acccacacaa 3000
 aggaaaaggg ctttccgtc ctcagccgtc gcttcatgtg actccacgga gtaccggcg 3060
 ccgtccagcg acctcgatta gttctcgagc ttttgagta cgtcgtcttt aggttggggg 3120
 gaggggtttt atgcgatgga gtttccccac actgagtggg tggagactga agttaggcca 3180

gcttggcact tgatgtaatt ctccctggaa ttgcccctt ttgagtttgg atcttggttc 3240
 atttcaage ctcagacagt ggttcaaagt tttttcttc catttcaggt gtcgtgagga 3300
 atttcgacat ttaaatttaa ttaatctcga cgtatcggg taacttttaa aagaaaaggg 3360
 gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac agacatacaa 3420
 actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttatcgatca cgagactagc 3480
 ctcgaggttt atggctcacc tgatgactgt gcagttgttg ctccctggtga tgtggatggc 3540
 cgaatgtgct cagtccagag ctggagtgca ggtggagacc atctctctg gagacggcg 3600

caccttccca aagcgcggcc agacctgctt ggtgactac acggggatgc ttgaagatgg 3660
 aaagaaattt gattcctctc gggacagaaa caagcctttt aagtttacac taggcaagca 3720
 ggaggatgac cgaggctggg aggaaggggt agcccagatg agtgtgggtc agagagccaa 3780
 actgataatc tcctcagact atgcctatgg agccaccggg caccagcagca tcatcccacc 3840
 acatgccact ctgtttttg atgtggagct tctaaaactg gaaagcggcg gcggcagcac 3900
 tcgggccagg actgaacttc tcaatgtctg catggatgcc aaacaccaca aagaaaaacc 3960
 gggccctgag gacaatttac acgaccagtg cagcccctgg aagacgaatt cctgctgttc 4020

cacgaacaca agccaggaag cacataagga catttctac ctgtaccggt tcaactggaa 4080
 ccaactcggga aciatgacat cggaatgcaa acggcacttt atccaagaca cctgcctcta 4140
 tgagtgttcc ccgaacttgg gaccctggat ccagcaggtg gaccagagct ggcgcaaaga 4200
 gcggatcctt gatgttcccc tgtgcaaaga ggactgtcag cagtgggtggg aggactgcca 4260
 gagctctttt acctgcaaga gcaattggca caagggatgg aactggctct cggggcataa 4320
 cgagtgtcct gtgggagcct cctgccatcc cttcaccttc tacttccca catctgctgc 4380

tctgtgtgag gaaatctgga gtcactccta caagctcagc aactacagtc gagggagcgg 4440

ccgctgcatt cagatgtggt tgcaccagc ccagggcaac cccaacgagg aagtggcgag 4500

gttctatgcc gaggccatga gtggagctgg gtttcatggg acctggccac tcttgtgcag 4560

cctgtcctta gtgctgctct gggatgatcag ctgaaaacta cgggctgcag gaattccgcc 4620

ccccccccc taacgttact ggccgaagcc gcttgaata aggccggtgt gcgtttgtct 4680

atatgttatt ttccaccata ttgcccgtct tggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc 4740

ctgtcttctt gacgagcatt cctaggggtc tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc 4800

tgttgaatgt cgtgaaggaa gcagttcttc tggaaagctt ttgaagacaa acaacgtctg 4860

tagcgacct ttgcaggcag cggaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa 4920

agccacgtgt ataagataca cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt 4980

ggatagtgtt ggaagagtc aaatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg 5040

atgccagaa ggiaccccat tgtatgggat ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta 5100

catgtgttta gtcgaggtta aaaaacgtct agccccccg aaccacgggg acgtggtttt 5160

cctttgaaaa acacgatgat aataccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg 5220

tggtgccat cctggctgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg 5280

gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgacct gaagtcatc tgcaccaccg 5340

gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacct gacctacgc gtgcagtgt 5400

tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtcgcc atgcccgaag 5460

gtacgtcca ggagcgacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg 5520

aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca 5580

aggagacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct 5640

atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc cgccacaaca 5700

tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcccgacc actaccagca gaacacccc atcggcgacg 5760

gccccgtgct gctgcccagc aacctacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc 5820

ccaacgagaa gcgcatcac atggctctgc tggagtctgt gaccgccgc gggatcactc 5880

tcggcatgga cgagctgtac aagtccggac tcagatctcg actagctagt agctagctag 5940

ctagtgcagc tcaagcttgc aattcgatat caagcttate gcgataccgt cgacctcgag 6000

ggaattccga taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta 6060

actatgttgc tccttttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta 6120

ttgcttcccg taigcctttc attttctcct ccttgtataa atcctggttg ctgtctcttt 6180
 atgaggagt gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgactgtg tttgctgacg 6240
 caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttcgctt 6300
 tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgcctg ccttgcccgc tgctggacag 6360
 gggctcggct gttgggcaact gacaattccg tgggtgtgtc ggggaagctg acgtcctttc 6420
 catggctgct cgctgtgtt gccacctgga ttctgcgagg gacgtccttc tgctacgtcc 6480
 ctteggccct caatccagcg gaccttctt cccgcggcct gctgccggct ctgcggcctc 6540

 ttccgctct tcgcttccg cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc 6600
 atcgggaatt cgagctcggc accttaaga ccaatgactt acaaggcagc tgtagatctt 6660
 agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa ttcactcca acgaagacia 6720
 gatgggatca attcaccatg ggaataactt cgtatagcat acattatacg aagttatgct 6780
 gctttttgct tgiactgggt ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg 6840
 ctaactaggg aaccctcgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt 6900
 gtgtgccct ctgttgtgtg actctggtaa ctgagatcc ctcagacct tttagtctgt 6960

 gtggaaaatc tctagcagca tctagaatta attccgtgta ttctatagtg tcacctaat 7020
 cgtatgtgta tgatacataa ggttatgtat taattgtagc cgcgttctaa cgacaatatg 7080
 tacaagccta attgtgtagc atctggctta ctgaagcaga ccctatcctc tctctcgtaa 7140
 actgccgtca gagtcggttt ggttggacga accttctgag tttctggtaa cgcctccccg 7200
 caccggaaa tggctcagca accaatcagc agggctcctg ctagccagat cctctacgcc 7260
 ggacgcctc tggccggcat caccggcgc acaggtgagg ttgctggcgc ctatatcgcc 7320
 gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc 7380

 gtgggatagg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg gcgccatctc cttgcatgca 7440
 ccattccttg cggcggcggc gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg cttcctaatg 7500
 caggagtgcg ataagggaga gcgtcgaatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc 7560
 cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgcct gacgggcttg 7620
 tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca 7680
 gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt 7740
 tttatagggt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcagggtgca cttttcgggg 7800

 aaatgtgcgc ggaaccctta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct 7860
 catgagacia taacctgat aaatgcttca ataataatga aaaaggaaga gtatgagtat 7920
 tcaacatttc cgtgtcgcct ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 7980

tcaccagaa acgctgggta aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg 8040
 ttacatcgaa ctggatctca acacgggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 8100
 ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 8160
 cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat aactattct cagaatgact tggttgagta 8220

 ctaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 8280
 tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 8340
 gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 8400
 ggaaccggag ctgaatgaag ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc 8460
 aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca 8520
 acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct 8580
 tccgctggc tggtttatg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat 8640

 cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg 8700
 gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat 8760
 taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 8820
 tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat 8880
 cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 8940
 ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 9000
 accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg 9060

 cttcagcaga ggcagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca 9120
 cttcaagaac tcigtacac gcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc 9180
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 9240
 taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttctgtcaca cagcccagct tggagcgaac 9300
 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga 9360
 agggagaaaag gcggacaggt atccgtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 9420
 ggagcttcca ggggaaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg 9480

 acttgagcgt cgatttttgt gatgctctgc agggggcgcg agcctatgga aaaacgccag 9540
 caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 9600
 tgcgttatcc ccgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 9660
 tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc 9720
 aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcttg gccgattcat taatgcagct gtggaatgtg 9780
 tgtcagttag ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg 9840

catctcaatt agtcagcaac cagggtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 9900

 atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccate 9960
 ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccac tctccgeccc atggtctgact aatTTTTTTT 10020
 atttatgcag aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc 10080
 ttttttggag gcctaggctt ttgcaaaaag ctggacaca agacaggctt gcgagatatg 10140
 tttgagaata ccactttatc ccgctcagg gagaggcagt gcgtaaaaag acgaggactc 10200
 atgtgaaata ctggTTTTTt gtgcgccaga tctctataat ctcgcgcaac ctattttccc 10260
 ctgaaacact ttttaagccg tagataaaca ggctgggaca cttcacatga gcgaaaata 10320

 catcgtcacc tgggacatgt tgcagatcca tgcacgtaaa ctcgcaagcc gactgatgcc 10380
 ttctgaacaa tggaaaggca ttattgccgt aagccgtggc ggtctgtacc ggggtcgtta 10440
 ctggcgcgtg aactgggtat tctgtatgtc gataccgttt gtatttccag ctacgatcac 10500
 gacaaccagc gcgagcttaa agtgtgaaa cgcgcagaag gcgatggcga aggcttcac 10560
 gttattgatg acctgggtga taccgggtgt actgcggttgc cgattcgtga aatgtatcca 10620
 aaagcgcact ttgtcacat cttcgcaaaa ccggctggtc gtcgctggtg tgatgactat 10680
 gttgttgata tcccgaaga tacctggatt gaacagccgt gggatatggg cgtcgtattc 10740

 gtcccccaa tctccggtcg ctaatctttt caacgcctgg cactgccggg cgttgttctt 10800
 ttttaactta ggccgggttac aatagtttcc agtaagtatt ctggaggctg catccatgac 10860
 acaggcaaac ctgagcgaac ccctgttcaa accccgcttt aaacatctg aaacctcgac 10920
 gctagtcgcg cgttttaac acggcgcaaca accgcctgtg cagtccgccc ttgatggtaa 10980
 aacctccct cactggatc gcattgataa ccgtctgatg tggatctggc gcggcattga 11040
 cccacgcgaa atcctcgacg tccaggcagc tattgtgatg agcgatgccg aacgtaccga 11100
 cgatgattta tacgatacgg tgattggcta ccgtggcggc aactggattt atgagtgggc 11160

 cccggatctt tggaaggaa ctttacttct gtggtgtgac ataattggac aaactaccta 11220
 cagagattta aagctctaag gtaaatataa aatTTTTaag tgtataatgt gttaaactac 11280
 tgattctaata tgtttgtgta ttttagattc caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt 11340
 ggtggaatgc ctttaatgag gaaaacctgt tttgctcaga agaaatgcca tctagtgatg 11400
 atgaggctac tctgactct caacattcta ctcctccaaa aaagaagaga aaggtagaag 11460
 accccaagga ctttcttca gaattgctaa gttttttgag tcatgctgtg tttagtaata 11520
 gaactcttgc ttgctttgct atttacacca caaaggaaaa agctgcactg ctatacaaga 11580

aaattatgga aaaatattct gtaaccttta taagtaggca taacagttat aatcataaca 11640
 tactgttttt tcttactcca cacaggcata gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa 11700
 aattgtgtac ctttagcttt ttaatttgta aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata 11760
 gtgccttgac tagagatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta 11820
 aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt 11880
 aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 11940
 aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 12000

tatcatgtct ggatcaactg gataactcaa gctaaccaaa atcatcccaa acttcccacc 12060
 ccatacccta ttaccactgc caattacctta gtggtttcat ttactctaaa cctgtgattc 12120
 ctctgaatta ttttcatttt aaagaaattg tatttgtaa atatgtacta caaacttagt 12180
 ag 12182

<210> 6

<211> 6939

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> pMP71 gb NotIEcoRI mouse antiCD19 for mouse T cell transduction

<400> 6

tcaaggttag gaacagagag acaggagaat atgggcaaaa caggatatct gtggttaagca 60

 gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga 120
 tatctgtggt aagcagtccc tgccccggct cagggcccaag aacagatggt cccagatgc 180
 ggtcccgcc tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc 240
 tgaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc 300
 gcgcttctgc tccccagct caataaaaga gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc 360
 ctccgattga ctgcgtgcc cgggtaccg tattccaat aaagcctctt gctgtttgca 420
 tccgaatcgt ggactcgtg atccttggga ggtctctctc agattgattg actgcccacc 480

 tcgggggtct tcatttggga ggttcaccg agatttggag acccctgccc agggaccacc 540
 gaccccccg cggggagga agctggccag cggctgttgc gtgtctgtct ctgtctttgg 600
 gcgtgtttgt gccggcatct aatgtttgcg cctgcgtctg tactagtgg ctaactagat 660
 ctgtatctgg cggccccgcg gaagaactga cgagttcgta ttcccggccg cagcccctgg 720
 gagacgtccc agcggcctcg ggggcccgtt ttgtggccca ttctgtatca gttaacctac 780
 ccgagtcgga ctttttggag ctccgccact gtccgagggg tacgtggctt tgttggggga 840

cgagagacag agacacttcc cgccccgtc tgaatTTTTG ctttcggttt tacgccgaaa 900

 ccgccccgc cgtcttctct gctgcagcat cgttctgtgt tgtctctgtc tgactgtgtt 960
 tctgtatTTG tctgaaaatt agctcgacaa agttaagtaa tagtccctct ctccaagctc 1020
 acttacaggc atgggggttc ccaccagct gttggggttg ctgctcctct ggatcactga 1080
 tgccatctgc gaacagaagc tcatTTctga agaagatctg gacatacaga tgaccagag 1140
 tcctgccage ttgtccacat ccctcggaga gaccgtgaca attcaatgcc aggcctctga 1200
 ggacatatat tctggattgg cttggtacca gcaaaagcca ggtaaaagtc ctcagtTgtt 1260
 gatatacggc gcttctgatt tgcaagacgg ggtgccctca cgatTTtagcg ggtctggaag 1320

 tggcactcag tacagtctga agattacttc aatgcaaaca gaagacgagg gtgtgtatTT 1380
 ttgccaacag gggtctgacct acccaaggac attcgggggc ggtacaaaagc ttgaacttaa 1440
 gggcggcggT gggctctggag gtgggtggatc tggcggaggg ggaagtgagg tacagctgca 1500
 acagtccggc gccgaactcg ttcgccctgg aacctcagtc aaatgtcat gcaaggtgag 1560
 tggcgacaca ataacctTTT actatatgca cttcgtTaaa cagaggccag gtcaaggtct 1620
 ggaatggata ggcagaattg atccagaaga tgagtccacc aaatactcag aaaagtTcaa 1680
 aaacaaagcc actcttactg ccgacacctc aagcaacaca gcatatctta agctcagttc 1740

 acttaccagc gaagacaccg ccacctatTT ttgtatTTat ggtggctatt actTTgacta 1800
 ctgggggcaa ggigttatgg taacagtTtc ttccattgaa ttcatgtatc cacccecta 1860
 tttggataat gaacgatcta atgggactat aatacatatc aaggaaaagc atctgtgtca 1920
 taccxaaagt tcccctaagc ttttctgggc cctcgtcgtt gtggcaggag tgctTTTTtg 1980
 ctatggattg ttggttactg tggctctctg cgtcattTgg acaaatagta ggaggaatcg 2040
 ggggggacaa tctgattaca tgaacatgac accacggagg ccaggcctta ccagaaagcc 2100
 ctaccaacct tatgcaccag cacgagactt cgccgcatac aggccaaggg ctaagTTTTc 2160

 ccgcagcgc gaaaccgcag ccaacctcca agatcctaag cagctctata acgaattgaa 2220
 tcttgccgc agagaggagt acgacgtact tgagaaaaag agagctaggg accctgaaat 2280
 gggTgggaag caacagcga gaaggaacc acaggaaggg gtgtataatg ccctTcaaaa 2340
 ggataaaatg gcagaggcat acagtgaaat cggaaaccaag ggggagagac gcagagggaa 2400
 aggccatgac ggcctttatc agggTTgtc aactgctact aaagacactt atgatgcctt 2460
 gcatatgcaa actctgcac ccagatgacg agcatcttac cgccatttat tcccatatTT 2520
 gttctgtTTT tcttgattg ggtatacatt taaatgttaa taaaacaaaa tggTggggca 2580

atcatttaca ttttatggga tatgtaatta ctagtccagg tgtattgcca caagacaaac 2640
 atgttaagaa acittcccg tatttacgct ctgttcctgt taatcaacct ctggattaca 2700
 aaatttgtga aagattgact gatattctta actatgttgc tccttttacg ctgtgtggat 2760
 atgctgcttt aatgcctctg tatcatgctt ttgcttcccg tacggcttcc gttttctcct 2820
 ccttgataaa atcctgggtg ctgtctcttt atgaggagtt gtggcccggt gtccgtcaac 2880
 gtggcgtggg gtgctctgtg ttgtctgacg caacccccac tggetggggc attgccacca 2940
 cctgtcaact cttttctggg actttcgtt tccccctccc gatgccacg gcagaactca 3000

 tcgcccgctg ctttggccgc tgctggacag gggctaggtt gctgggcaact gataattccg 3060
 tgggtgtgtc ggggaagctg acgtcctttc catggctgct cgcctgtgtt gccaaactgga 3120
 tcctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc ctccggctct caatccagcg gacctcctt 3180
 cccgaggcct tctgccggtt ctgcggcctc tcccgcgtct tcgctttcgg cctccgacga 3240
 gtcggatctc ctttgggcc gcctccccgc ctgtttcgcc tcggcgtccg gtccgtgttg 3300
 cttggtctc acctgtgcag aattgcgaac catggattcc accgtgaact ttgtctcctg 3360
 gcatgcaaat cgtcaacttg gcatgccaag aattaattcg gatccaagct taggcctgct 3420

 cgctttcttg ctgtccatt tctattaaag gttcctttgt tccctaagtc caactactaa 3480
 actgggggat attatgaagg gccttgagca tctggattct gcctagcgt aagcttcta 3540
 acacgagcca tagatagaat aaaagatttt atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa 3600
 agacccccacc tgiaggtttg gcaagctagc ttaagtaagc cattttgcaa ggcatggaaa 3660
 aatacataac tgagaataga gaagttcaga tcaaggttag gaacagagag acaggagaat 3720
 atgggcaaaa caggatatct gtgtaagca gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag 3780
 ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc tgccccgct 3840

 caggccaag aacagatggt cccagatgc ggtccccccc tcagcagttt ctagagaacc 3900
 atcagatggt tcagggtgc cccaaggacc tgaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa 3960
 ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga 4020
 gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtgcc cggggtacc 4080
 gtattccaa taaagcctct tgctgtttgc atccgaatcg tggactcgt gatccttggg 4140
 aggtctcct cagattgatt gactgccac ctccggggtc tttcattctc gagagctttg 4200
 gcgtaatcat ggicatagct gtttctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac 4260

 aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaatgagt gagctaactc 4320
 acattaattg cgttgcctc actgccctt tccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg 4380
 cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattggcg ctcttccgct 4440

tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac 4500
 tcaaagcggc taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 4560
 gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 4620
 aggctccgcc ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac 4680

 ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gtcacctcgt gcgctctcct 4740
 gtccgacce tgcgcttac cggatacttg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg 4800
 ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg 4860
 ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 4920
 cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 4980
 attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagtctc tgaagtgggt gcctaactac 5040
 ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 5100

 aaaagagtgt gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt 5160
 gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc ttgatcttt 5220
 tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga 5280
 ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc 5340
 taaagtatat atgagtaaac ttggctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct 5400
 atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata 5460
 actacgatac gggagggtctt accatctggc cccagtctg caatgatacc gcgagacca 5520

 cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga 5580
 agtggctcctg caactttatc gcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga 5640
 gtaagtatgt cgccagttaa tagtttgccg aacgttgttg ccattgctgc tggcatcgtg 5700
 gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga 5760
 gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt 5820
 gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct 5880
 ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtea 5940

 ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat 6000
 accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga 6060
 aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc 6120
 aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 6180
 caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 6240
 ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 6300

gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc 6360

 cctgacgtct aagaacatcatt tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg 6420
 aggcccttgc gtcttcaagc tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac 6480
 acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gctctgaagc ggatgccggg agcagacaag 6540
 cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg acccagtcac 6600
 gtagcgatag ttactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt 6660
 gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgatc caggcgccat tcgccattca 6720
 ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggctc ttcgctatta cgccagctgg 6780

 cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac 6840
 gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattag tactctagct taagtaagcc attttgcaag 6900
 gcatggaaaa atacataact gagaatagag aagttcaga 6939

 <210> 7
 <211> 12188
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> pWPI-FRa 1-24 FKBP FRa
 <400> 7

 ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac 60
 acacaaggct acttccctga ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca 120
 ctgacctttg gatggtgcta caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc 180

 aataaaggag agaacaccag cttgttacac cctgtgagcc tgcatgggat ggatgacccg 240
 gagagagaag tgtagagtg gaggtttgac agccgcctag catttcatca cgtggcccga 300
 gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatatcgag cttgctaaa gggactttcc 360
 gctggggact ttccagggag gcgtggcctg ggcgggactg gggagtggcg agccctcaga 420
 tcttgcataa aagcagctgc tttttgcctg tactgggtct ctctggttag accagatctg 480
 agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 540
 ttgagtctt caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct 600

 cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc gcccaaacag ggacttga 660
 gcgaaagga aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg 720
 gcaagaggcg agggcgcg actggtgagt acgcaaaaa ttttgactag cggaggctag 780
 aaggagagag atgggtgca gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcatgg 840

gaaaaaatc ggtaagcc agggggaaaag aaaaaatata aattaaaaca tatagtatgg 900
 gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgttagaac atcagaagcc 960
 tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga 1020

 tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac 1080
 accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag 1140
 caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatag agggacaatt ggagaagtga 1200
 attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 1260
 gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 1320
 ctggggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 1380
 acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 1440

 acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 1500
 tgtggaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 1560
 catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 1620
 ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat 1680
 acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga 1740
 attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat 1800
 aaaattatc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt ttgctgtact 1860

 ttctatagt aatagagtta ggcagggata ttaccatta tcgtttcaga cccacctccc 1920
 aaccccgagg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag 1980
 agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtat cgatgtcgac gataagcttt 2040
 gcaaagatgg ataaagtttt aaacagagag gaatctttgc agctaattga ccttctaggt 2100
 ctgaaagga gtgggaattg gctccgggtc cgtcagtggt gcagagcgca catcgccac 2160
 agtccccgag aagtggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg 2220
 cgggtaaac tgggaaagt atgtcgtgta ctggctccgc ctttttccg aggggtgggg 2280

 agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc 2340
 cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcccgcct gccctctta cgggttatgg 2400
 ccttgcgtg ccttgaatta ctccactgg ctgcagfacg tgattcttga tcccagctt 2460
 cgggttgaa gtgggtggga gagttcgagg ccttgcgctt aaggagcccc ttcgcctcgt 2520
 gcttagttg aggcctggcc tgggcgctgg ggcccgcg tgcaatctg gtggcacctt 2580
 cgcgcctgtc tcgctgctt cgataagtct ctagccatit aaaaattttg atgacctgct 2640

gcgagccttt ttttctggca agatagtctt gtaaatacgg gccaaatct gcacactggt 2700

atctcggttt ttggggccgc gggcggcgac ggggccctg cgtcccagcg cacatgttcg 2760

gcgaggcggg gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac ggggtagtc tcaagctggc 2820

cggcctgctc tggcgcctgg cctcgcgccg ccgtgtatcg ccccgccctg ggcggcaagg 2880

ctggcccggg cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgcttcccgg ccctgctgca 2940

gggagctcaa aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc acccacacaa 3000

aggaaaaggg ctttccgtc ctcagccgtc gcttcatgtg actccacgga gtaccgggcg 3060

ccgtccagge acctcgatta gttctcgagc ttttgagta cgtcgtcttt aggttggggg 3120

gaggggtttt atgcgatgga gtttccccac actgagtggg tggagactga agttaggcca 3180

gcttggcact tgatgtaatt ctccctggaa ttgcccctt ttgagtttgg atcttggttc 3240

attctcaage ctcagacagt ggttcaaagt tttttcttc catttcaggt gtcgtgagga 3300

atctcgcac ttaaatttaa ttaatctcga cggatcggg taacttttaa aagaaaaggg 3360

gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac agacatacaa 3420

actaaagaat taaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttatcgatca cgagactagc 3480

ctcgaggttt atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctccctctag tgtgggtggc 3540

tgtagtaggg gaggtcaga caggagtgca ggtggagact atctcccag gagacgggcg 3600

caccttcccc aagcgcggcc agacctgctg ggtgactac accgggatgc ttgaagatgg 3660

aaagaaattt gattcctccc gggacagaaa caagccctt aagtttatgc taggcaagca 3720

ggaggtgatc cgaggctggg aagaaggggt tgcccagatg agtgtgggtc agagagccaa 3780

actgactata tctccagatt atgcctatgg tgccactggg caccagcagca tcatcccacc 3840

acatgccact ctctcttcg atgtggagct tctaaaactg gaatctggcg gtggatccag 3900

gattgcatgg gccaggactg agcttctcaa tgtctgcatg aacgccaagc accacaagga 3960

aaagccaggc cccgaggaca agttgcatga gcagtgtcga ccctggagga agaatgcctg 4020

ctgttctacc aacaccagcc aggaagccca taaggatgtt tctacctat atagattcaa 4080

ctggaaccac tgggagaga tggcacctgc ctgcaaacgg catttcatcc aggacacctg 4140

cctctacgag tgctccccca acttggggcc ctggatccag caggiggatc agagctggcg 4200

caaagagcgg gtactgaacg tgcccctgtg caaagaggac tgtgagcaat ggtgggaaga 4260

ttgtcgcacc tctacacct gcaagagcaa ctggcacaag ggctggaact ggacttcagg 4320

gtttaacaag tgcgcagtgg gagctgcctg ccaaccttc catttctact tccccacacc 4380

cactgttctg tgcaatgaaa tctggactca ctctacaag gtcagcaact acagccgagg 4440
 gagtggccgc tgcattcaga tgtggttcga cccagcccag ggcaaccca atgaggaggt 4500
 ggcgaggttc tatgctgcag ccatgagtgg ggctgggccc tgggcagcct gccctttcct 4560
 gcttagcctg gccctaagc tgctgtggct gctcagctga aaactacggg ctgcaggaat 4620
 tccgcccccc cccccctaac gttactggcc gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtcgt 4680
 ttgtctatat gttattttcc accatattgc cgtcttttgg caatgtgagg gcccgaaac 4740
 ctggccctgt ctcttgacg agcattccta ggggtctttc ccctctcgcc aaaggaatgc 4800

 aaggctctgt gaatgtcgtg aaggaagcag ttctctgga agcttcttga agacaaacia 4860
 cgtctgtagc gaccctttgc aggcagcggg accccccacc tggcgacagg tgcctctgcg 4920
 gccaaaagcc acgtgtataa gatacacctg caaaggcggc acaaccccag tgccacgttg 4980
 tgagtggat agttgtggaa agagtcaaat ggctctctc aagcgtattc aacaaggggc 5040
 tgaaggatgc ccagaagta ccccatgtia tgggatctga tctggggcct cgggtcacat 5100
 gctttacatg tgtttagtcg aggttaaaaa acgtctaggc cccccgaacc acggggacgt 5160
 ggttttcctt tgaaaaaac gatgataata ccatgggtgag caagggcgag gagctgttca 5220

 ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg 5280
 tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcattctgca 5340
 ccaccggcaa gctgccctg ccctggccca cctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc 5400
 agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgcatgc 5460
 ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc 5520
 gcgccagggt gaagtctgag ggcgacaccc tggtaaccg catcgagctg aagggcacg 5580
 acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca 5640

 acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc 5700
 acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg 5760
 gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagctcc gccctgagca 5820
 aagaccccaa cgagaagcgc gatccatgg tctgctgga gttcgtgacc gccgccggga 5880
 tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt ccggactcag atctcgacta gctagtagct 5940
 agctagctag tcgagctcaa gcttcgaatt cgatatcaag cttatcgca taccgtcgac 6000
 ctcgagggaa ttcgataat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggtg 6060

 ttcttaacta tgttgcctct ttacgctat gtggatcgc tgccttaatg cctttgtatc 6120
 atgctattgc ttcccgatg gctttcattt tctctctctt gtataaatcc tggttgctgt 6180
 ctctttatga ggagtgtggt cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg 6240

ctgacgcaac ccccaactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt 6300
 tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgtgct 6360
 ggacaggggc tcggctgttg ggcaactgaca attccgtggt gttgtcgggg aagctgacgt 6420
 cctttccatg gcigctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct 6480

 acgtcccttc ggcctcaat ccageggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggtctgc 6540
 ggctcttcc gegtcttcgc ctteccctc agacgagtcg gatctccctt tgggcccct 6600
 ccccgcacg ggaattcgag ctcggtacct ttaagaccaa tgacttaaa ggcaactgta 6660
 gatcttagcc actttttaa agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctccaacga 6720
 agacaagatg ggatcaattc accatgggaa taacttcgta tagcatacat tatacgaagt 6780
 tatgctgctt ttgcttga ctgggtctct ctggtagac cagatctgag cctgggagct 6840
 ctctggctaa ctaggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgcctt gagtgttca 6900

 agtagtgtg gccctctgt tgtgtgactc tgtaactag agatccctca gacccttta 6960
 gtcagtgtg aaaatctcta gcagcatcta gaattaattc cgtgtattct atagtgtcac 7020
 ctaaactgta tgtgatgat acataagggt atgtattaat ttagccgcg ttctaacgac 7080
 aatatgtaca agcctaattg ttagcatct ggcttactga agcagaccct atcatctctc 7140
 tcgtaaacg ccgtcagat cggtttgggt ggacgaacct tctgagttc tgtaacgcc 7200
 gtcccgcacc cgaaatggt cagcgaacca atcagcaggg tcatcgtag ccagatctc 7260
 tacgccggac gcatcgtggc cggcatcacc ggcgccacag gtgcggttgc tggcgctat 7320

 atcgccgaca tcaccgatg ggaagatcg gctcgccact tcgggctcat gagccttgt 7380
 ttcggcgtg gtatggtggc aggccccgtg gccgggggac tgttgggagc catctccttg 7440
 catgacatc tccttggcgc ggcggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc 7500
 ctaatgcagg agtcgataa gggagagcgt cgaatggtgc actctcagta caatctgctc 7560
 tgatgccga tagttaagcc agccccgaca cccccaaca cccgctgacg gccctgacg 7620
 ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgat 7680
 gtgtcagagg tttcacctg catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatac 7740

 cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt 7800
 tcggggaat gtgccggaa cccctatttg tttattttc taaatacatt caaatatgta 7860
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaa ggaagagtat 7920
 gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tcctttttt gcggcatttt gccttctgt 7980
 ttttctcac ccagaaacgc tggtagaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 8040
 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 8100

agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 8160

 tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggc 8220
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 8280
 cagtgtctgc ataaccatga gtgataaac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 8340
 aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 8400
 tcgttgggaa cgggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 8460
 tntagcaatg gcaacaactg tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 8520
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 8580

 ggcccttccg gctggctggc ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggctcgc 8640
 cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 8700
 gacgggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtctgaga taggtgcctc 8760
 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tataacttt agattgattt 8820
 aaaacttcat ttttaattta aaagatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 8880
 caaaatccct taacgtgagt tttcttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 8940
 aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaactctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 9000

 accgctacca gcggtggttt gtttccgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt 9060
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 9120
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc 9180
 agtggctgct gccagtggcg ataagtctg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 9240
 accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga 9300
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgt 9360
 tcccgaaggg agaaagcggc acaggtatcc ggtaaagcgc agggtcggaa caggagagcg 9420

 cacgagggag ctccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcgc ggtttcgcca 9480
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 9540
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccttttgc tggccttttg ctccatggt 9600
 ctttctgctg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 9660
 taccgtctgc cgcagccgaa cgaccgagc cagcagtcga gtgagcagg aagcgggaaga 9720
 gcgccaata cgaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg attcattaat gcagctgtgg 9780
 aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa 9840

agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 9900
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg 9960
 cccatcccgc ccctaactcc gcccagtcc gcccatctc cgccccatgg ctgactaatt 10020
 ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga 10080
 ggaggctttt ttggaggcct aggccttttc aaaaagcttg gacacaagac aggccttgcga 10140
 gatatgtttg agaataccac tttatcccgc gtcagggaga ggagtgctg aaaaagacgc 10200
 ggactcatgt gaaatactgg ttttiagtgc gccagatctc tataatctcg cgcaacctat 10260

 tttcccctcg aacacttttt aagccgtaga taaacaggct gggacacttc acatgagcga 10320
 aaaatacatc gtcacctggg acatgttgca gatccatgca cgtaaacctc caagccgact 10380
 gatgccttct gaacaatgga aaggcattat tgcgtaagc cgtggcggtc tgtaccgggt 10440
 gcgttactgg cgcgtgaact gggatttcgt catgtcgata ccgtttgtat ttccagctac 10500
 gatcacgaca accagcgcga gcttaaaagt ctgaaacgcg cagaaggcga tggcgaaggc 10560
 ttcatcgta ttgatgacct ggtggatacc ggtggactg cggttgcgat tcgtgaaatg 10620
 tatccaaaag cgcactttgt caccatcttc gcaaaaccgg ctggtcgtcc gctggttgat 10680

 gactatgttg ttgatatccc gcaagatacc tggattgaac agccgtggga tatgggcgctc 10740
 gtattcgtcc cgccaatctc cggtcgctaa tcttttcaac gcctggcact gccggcgctt 10800
 gttcttttta acttcagcgg ggttacaata gtttccagta agtattctgg aggcctgcatc 10860
 catgacacag gcaaacctga gcgaaacct gttcaaaccc cgctttaaac atcctgaaac 10920
 ctgcagccta gtccgccgt ttaatcacgg cgcacaaccg cctgtgcagt cggcccttga 10980
 tggtaaaacc atccctcact ggtatcgcat gattaaccgt ctgatgtgga tctggcgcgg 11040
 cattgacca cgcgaaatcc tcgactcca ggcacgtatt gtgatgagcg atgccgaacg 11100

 taccgacgat gatttatacg atacggtgat tggctaccgt ggccgcaact ggatttatga 11160
 gtgggccccg gatctttgtg aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa ttggacaaac 11220
 tacttacaga gatttaaagc tctaaggtaa atataaaatt ttaagtgtg taatgtgtta 11280
 aactactgat tcaattggt tgtgtatttt agattccaac ctatggaact gatgaatggg 11340
 agcagtggtg gaatgccttt aatgaggaaa acctgttttg ctcagaagaa atgcatcta 11400
 gtgatgatga ggctactgct gactctcaac attctactcc tccaaaaaag aagagaaagg 11460
 tagaagacce caaggacttt ccttcagaat tgctaagttt tttgagtcac gctgtgttta 11520

 gtaatagaac tcttgcttgc tttgctattt acaccacaaa ggaaaaagct gcaactgctat 11580
 acaagaaaat tatggaaaaa tattctgtaa cttttataag taggcataac agttataatc 11640
 ataacatact gtttttctt actccacaca ggcatagagt gctctgctatt aataactatg 11700

ctcaaaaatt gtgtaccttt agcttttttaa tttgtaaagg ggtaataag gaatatttga 11760
 tgtatagtgc ctgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt 11820
 gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt 11880
 gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat 11940

ttcacaata aagcattttt ttcactgcat tctagtgtg gtttgcctaa actcatcaat 12000
 gtatcttate atgtctggat caactggata actcaagcta accaaaatca tcccactt 12060
 cccacccat acctattac cactgccaat tacctagtgg tttcatttac tctaacctg 12120
 tgattcctct gaattatttt cattttaaag aaattgtatt tgttaatat gtactacaaa 12180
 cttagtag 12188

<210> 8
 <211> 12182
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> pWPI mFKBP-mFRa SGGGS
 <400> 8

ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac 60

acacaaggct acttccctga ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca 120
 ctgacctttg gatgggtgcta caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc 180
 aataaaggag agaacaccag cttgttacac cctgtgagcc tgcattggat ggatgacccg 240
 gagagagaag tgtagagtg gaggtttgac agccgcctag catttcatca cgtggcccga 300
 gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatatcgag cttgtctaaa gggactttcc 360
 gctggggact ttccaggag gcgtggcctg ggcgggactg gggagtggcg agccctcaga 420
 tctgcatat aagcagctgc ttttgcctg tactgggtct ctctggttag accagatctg 480

agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 540
 ttgagtgctt caagtagtgt gtgccctct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct 600
 cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttgaaa 660
 gcgaaagga aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg 720
 gcaagaggcg agggcgccg actggtgagt acgcaaaaa tttgactag cggaggctag 780
 aaggagagag atgggtgca gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg 840
 gaaaaaatc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaaca tatagtatgg 900

gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaac atcagaaggc 960

thtagacaaa tactgggaca gctacaacca tccttcaga caggatcaga agaacttaga 1020
 tcattatata atacagtagc aacctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac 1080
 accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag 1140
 caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatag agggacaatt ggagaagtga 1200
 attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcacca ccaaggcaaa 1260
 gagaagagtg gtcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 1320

 cttgggagca gcaggaagca ctatgggagc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 1380
 acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 1440
 acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 1500
 tgtgaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 1560
 catttgacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 1620
 ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat 1680
 acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga 1740

 attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat 1800
 aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt ttgctgtact 1860
 ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttaccatta tcgtttcaga cccacctccc 1920
 aaccccaggg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaagtgagg agagagacag 1980
 agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtat cgatgtcgac gataagcttt 2040
 gcaaagatgg ataaagtttt aaacagagag gaatctttgc agctaatgga ctttctaggt 2100
 cttgaaagga gtgggaattg gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca catcgccac 2160

 agtccccgag aagtggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg 2220
 cgggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctcgc cttttcccg aggggtggggg 2280
 agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttccgc 2340
 cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcggcct ggcctcttta cgggttatgg 2400
 cccttgctg cttgaaita ctteactgg ctgcagtacg tgattcttga tcccagctt 2460
 cgggttggaa gtgggtggga gagttcgagg cttgctgtt aaggagcccc ttcgctcgt 2520
 gcttgagttg aggccctggc tgggcgctgg ggcccgcg tgcaaatctg gtggcacctt 2580

 cgcgctgtc tcgtgcttt cgataagtct ctaccattt aaaatTTTTg atgacctgct 2640
 gcgacgttt tttctggca agatagctt gtaaatgcgg gccaagatct gcacactggt 2700
 atttcggttt ttggggccgc gggcgccgac ggggcccgtg cgtcccagcg cacatgttcg 2760
 gcgaggcggg gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac ggggtagtc tcaagctggc 2820

cgccctgctc tggtagcctgg cctcgcgccg ccgtgtatcg ccccgcctg gccggcaagg 2880
 ctggcccgtt cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgcttcccgg cctgtctgca 2940
 gggagctcaa aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc acccacacaa 3000

 aggaaaaggg cctttccgtc ctcagccgtc gcttcatgtg actccacgga gtaccgggcg 3060
 ccgtccagcg acctcgatta gttctcgagc ttttgagta cgtcgtcttt aggttggggg 3120
 gagggttttt atgcgatgga gtttcccac actgagtggg tggagactga agttaggcca 3180
 gcttggcact tgatgtaatt ctccittgaa tttgcccttt ttgagtttgg atcttggttc 3240
 atttcaage ctcagacagt ggttcaaagt tttttcttc catttcaggt gtcgtgagga 3300
 atttcgacat ttaaatttaa ttaatctcga cggtatcggg taacttttaa aagaaaaggg 3360
 gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac agacatacaa 3420

 actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttatcgatca cgagactagc 3480
 ctcgaggttt atggctcacc tgatgactgt gcagttgttg ctccctggtga tgtggatggc 3540
 cgaatgtgct cagtcagag ctggagtgca ggtggagacc atctctctg gagacgggcg 3600
 caccttccca aagcgcggcc agacctgcgt ggtgcactac acggggatgc ttgaagatgg 3660
 aaagaaattt gatcctctc gggacagaaa caagcctttt aagtttacac taggcaagca 3720
 ggaggtgac cagggctggg aggaaggggt agcccagatg agtgtgggtc agagagccaa 3780
 actgataate tctcagact atgcctatgg agccaccggg caccagga tcateccacc 3840

 acatgccact ctgtttttg atgtggagct tctaaaactg gaaagcggcg gcggcagcac 3900
 tcgggccagg actgaaactc tcaatgtctg catggatgcc aaacaccaca aagaaaaacc 3960
 gggccctgag gacaatttac acgaccagt gaccccctgg aagacgaatt cctgctgttc 4020
 cacgaacaca agccaggaag cacataagga catttctac ctgtaccggt tcaactggaa 4080
 ccaactcggga actatgacat cggaatgcaa acggcacttt atccaagaca cctgcctcta 4140
 tgagtgttcc ccgaacttgg gaccctggat ccagcaggtg gaccagagct ggcgcaaaga 4200
 gcggatcctt gatgttcccc tgtgcaaaga ggactgtcag cagtgggtggg aggactgcca 4260

 gagctctttt acctgcaaga gcaattggca caagggatgg aactggtcct cggggcataa 4320
 cgagtgtcct gtgggagcct cctgccatcc cttcacctc tacttccca catctgctgc 4380
 tctgtgtgag gaaatctgga gtcactcta caagctcagc aactacagtc gaggagcgg 4440
 ccgctgatt cagatgtggt tcgaccagc ccagggcaac cccaacgagg aagtggcgag 4500
 gttctatgcc gaggcaatga gtggagctgg gtttcatggg acctggccac tcttgtgcag 4560
 cctgtcctta gtgtgctct gggatgatcag ctgaaaacta cgggctgcag gaattccgcc 4620

ccccccccc taacgttact ggccgaagcc gcttgggaata aggccggtgt gcgtttgtct 4680

atatgttatt ttccaccata ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccg aaacctggcc 4740
ctgtcttctt gacgagcatt cctaggggtc tttccctct cgccaaagga atgcaaggtc 4800
tgttgaatgt cgigaaggaa gcagttctc tggagcttc ttgaagaaa acaacgtctg 4860
tagcgacct ttgcaggcag cggaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa 4920
agccacgtgt ataagataca cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt 4980
ggatagtgtt ggaaagagtc aatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg 5040
atgccagaa ggtaccccat tgtatgggat ctgatctggg gcctcgggtc acatgcttta 5100

catgtgttta gtcgaggta aaaaacgtct aggcccccg aaccacgggg acgtggtttt 5160
cctttgaaaa acacgatgat aataccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg 5220
tggtgcccat cctggctcag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg 5280
gcgagggcga gggcgtgcc acctacggca agctgacct gaagttcctc tgcaccaccg 5340
gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacct gacctacgc gtgcagtgt 5400
tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgccgaag 5460
gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcccg 5520

aggtgaagt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca 5580
aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaactctt 5640
atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca 5700
tcgaggacgg cagcgtgcag ctcccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg 5760
gccccgtgct gctgccccgac aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc 5820
ccaacgagaa gcgcgatcac atggctctgc tggagtctgt gaccgccgc gggatcactc 5880
tcggcatgga cgagctgtac aagtcggac tcagatctcg actagctagt agctagctag 5940

ctagtcgagc tcaagcttcg aattcgatat caagcttctc gcgataccgt cgacctcgag 6000
ggaattccga taatcaacct ctggattaca aaatttga aagattgact ggtattctta 6060
actatgttc tccttttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta 6120
ttgcttccc tatggcttc atttctcct ccttgataa atcctggttg ctgtctcttt 6180
atgaggagtt gtggccggt gtcaggcaac gtggcgtggg gtgcactgt tttgctgacg 6240
caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct ccttccggg actttcgctt 6300
tccccctcc tattgccag gcggaactca tcgccctg ccttggccgc tgctggacag 6360

gggctcggct gttgggcaact gacaattccg tgggtgtgtc ggggaagctg acgtcctttc 6420
 catggctgct cgctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc 6480
 cttcggccct caatccagcg gaccttctt cccgcggcct gctgccggct ctgcccctc 6540
 ttccgcgtct tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc 6600
 atcgggaatt cgagctcggc accttaaga ccaatgactt acaaggcagc ttagatctt 6660
 agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa ttcactccca acgaagacaa 6720
 gatgggatca attcacatg ggaataaactt cgtatagcat acattatacg aagttatgct 6780

 gctttttgct tgtactgggt ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg 6840
 ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt 6900
 gtgtgccctg ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctgagaccct ttagtcagt 6960
 gtggaaaatc tctagcagca tctagaatta attccgtgta ttctatagtg tcacctaaat 7020
 cgtatgtgta tgatacataa ggttatgtat taattgtagc cgcgttctaa cgacaatatg 7080
 tacaagccta attgtgtagc atctggctta ctgaagcaga ccctatcctc tctctcgtaa 7140
 actgccgtea gagtccggtt gggtggacga acctctgag tttctggtaa cgccgtcccg 7200

 caccggaaa tggtcagcga accaatcagc aggtcatcg ctagccagat cctctacgcc 7260
 ggacgcacg tggccggcat caccgggcc acaggtcggg ttgctggcgc ctatatcgcc 7320
 gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc 7380
 gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg gcgccatctc cttgcatgca 7440
 ccattccttg cggcggcggc gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg ctctctaatg 7500
 caggagtgcg ataagggaga gcgtcgaatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc 7560
 cgcatagtta agccagcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgcctt gacgggcttg 7620

 tctgctcccg gcacccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtea 7680
 gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt 7740
 tttataggtt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg 7800
 aaatgtgcgc ggaaccctta tttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct 7860
 catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataataatga aaaaggaaga gtagatgat 7920
 tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 7980
 tcaccagaa acgtctgtga aagtaaaaga tgctgaagat cagtgggtg cacgagtggg 8040

 ttacatcga ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 8100
 ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 8160
 cgccgggcaa gagcaactcg gtcgcgcgat aactattct cagaatgact tggttgagta 8220

ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 8280
 tgccataacc atgagtata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 8340
 gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 8400
 ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc 8460

aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca 8520
 acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct 8580
 tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggg gagcgtgggt ctgcggtat 8640
 cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagtatct acacgacggg 8700
 gagtcaggca aciatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat 8760
 taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 8820
 tcatttttaa tttaaaagga tctagtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat 8880

cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 8940
 ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgct 9000
 accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg 9060
 cttcagcaga gcgagatag caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca 9120
 cttcaagaac tctgtagcac cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 9180
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 9240
 taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 9300

gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga 9360
 agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 9420
 ggagcttcca ggggaaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg 9480
 acttgagcgt cgatttttgt gatgctctc agggggcgag agcctatgga aaaaccccag 9540
 caacgcggcc tttttacggt tcttgccctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 9600
 tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 9660
 tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgc 9720

aatacgcaaa ccgctctcc ccgcgcttg gccgattcat taatgcagct gtggaatgtg 9780
 tgtcagttag ggtgtggaat gtecccagc tcccagcag gcagaagtat gcaaagcatg 9840
 catctcaatt agtcagcaac cagggtgga aagtcccag gctcccagc aggcagaagt 9900
 atgcaaagca tgcattcaa ttagtcagca accatagtc ccccctaac tcccccate 9960
 ccgcccctaa ctccgccag tccgccat tctccgccc atggtgact aattttttt 10020
 atttatgcag aggccgagc gcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggagc 10080

ttttttggag gcctaggctt ttgcaaaaag cttggacaca agacaggctt gcgagatatg 10140

 ttgagaata ccactttatc ccgctcagg gagaggcagt gcgtaaaaag acgcgactc 10200
 atgtgaata ctggttttta gtgcgccaga tctctataat ctcgcgcaac ctattttccc 10260
 ctgaaacct ttttaagccg tagataaaca ggctgggaca cttcacatga gcgaaaaata 10320
 catcgtcacc tgggacatgt tgcagatcca tgcacgtaaa ctcgcaagcc gactgatgcc 10380
 ttctgaacaa tggaaaggca ttattgccgt aagccgtggc ggtctgtacc ggggtgcgta 10440
 ctggcgcgtg aactgggtat tcgtcatgtc gataccgttt gtatttcag ctacgatcac 10500
 gacaaccagc gcgagcttaa agtgtctgaaa cgcgcagaag gcgatggcga aggcttcac 10560

 gttattgatg acctggigga taccggtggt actgcggttg cgattcgtga aatgtatcca 10620
 aaagcgcact ttgtaccat cttcgcaaaa ccggctggtc gtccgctggt tgatgactat 10680
 gttgtgata tcccgaaga tacctggatt gaacagccgt gggatatggg cgtcgtattc 10740
 gtcccgcaa tctccggtcg ctaatctttt caacgcctgg cactgccggg cgttgttctt 10800
 ttttaactca ggcgggttac aatagtttcc agtaagtatt ctggaggctg catccatgac 10860
 acaggcaaac ctgagcgaaa ccctgttcaa accccgtttt aaacatcctg aaacctcgac 10920
 gctagtcgcg cgctttaatc acggcgcaca accgcctgtg cagtcggccc ttgatggtaa 10980

 aacctccct cactggtatc gcatgattaa ccgtctgatg tggatctggc gcggcattga 11040
 cccacgcgaa atcctcgacg tccaggcacg tattgtgatg agcgatgccg aacgtaccga 11100
 cgatgattta tacgatacgg tgattggcta ccgtggcggc aactggattt atgagtgggc 11160
 cccggatctt tglgaaggaa ccttacttct gtgggtgtgac ataattggac aaactaccta 11220
 cagagattta aagctctaag gtaaatataa aatttttaag tgtataatgt gttaaactac 11280
 tgattctaat tgtttgtga ttttagattc caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt 11340
 ggtggaatgc ctttaatgag gaaaacctgt tttgctcaga agaaatgcca tctagtgatg 11400

 atgaggctac tgctgactct caacattcta ctctccaaa aaagaagaga aaggtagaag 11460
 accccaagga ctttcttca gaattgctaa gttttttgag tcatgctgtg tttagtaata 11520
 gaactcttgc ttgctttgct atttacacca caaaggaaaa agctgcactg ctatacaaga 11580
 aaattatgga aaaatattct gtaaccttta taagtaggca taacagttat aatcataaca 11640
 tactgttttt tcttactcca cacaggcata gagtgtctgc tattaataac tatgctcaa 11700
 aattgtgtac ctttagcttt ttaatttgta aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata 11760
 gtccttgac tagagalcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta 11820

aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt 11880
 aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 11940
 aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 12000
 tatcatgtct ggatcaactg gataactcaa gctaaccaaa atcatcccaa acttcccacc 12060
 ccataccta ttaccactgc caattacctg gtggtttcat ttactctaaa cctgtgattc 12120
 ctctgaatta ttttcatttt aaagaattg tatttgttaa atatgtacta caaacttagt 12180
 ag 12182

<210> 9

<211> 10447

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> pHR EcorI hAnti cd19 1D3 myc hinge cd28 cd3zeta

<400> 9

cgataccgtc gaccaaggca gctgtagatc ttagccactt tttaaaagaa aaggggggac 60
 tggaaaggct aattcactcc caacgaagac aagatctgct ttttgcttgt actgggtctc 120
 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actaggaac ccaactgctta 180
 agcctcaata aagcttgctc tgagtgcttc aagtagtggt tgcccgtctg ttgtgtgact 240
 ctggttaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagcatct 300

 agaattaatt ccgtgtattc tatagtgtca cctaaatcgt atgtgtatga tacataaggt 360
 tatgtattaa tttagccgcg gttctaacga caatatgtac aagcctaatt gtgtagcatc 420
 tggcttactg aagcagacc tatcatctct ctcgtaaact gccgtcagag tcggtttggt 480
 tggacgaacc ttctgagttt ctggtaacgc cgtcccgcac ccggaatgg tcagcgaacc 540
 aatcagcagg gtcatcgcta gccagatcct ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac 600
 cggcgccaca ggtgcggttg ctgggccta tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg 660
 ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt 720

 ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt gcatgcacca ttccttgcgg cggcgggtgct 780
 caacggcctc aaactactac tgggctgctt cctaatgcag gagtgcata agggagagcg 840
 tcgaatggtg cactctcagt acaatctagc tctgatgccg catagttaag ccagccccga 900
 caccgccaa caccgctga cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac 960
 agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcacaccg 1020
 aaacgcgca gacgaaaggg cctcgtgata cgctatttt tataggttaa tgtcatgata 1080

ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgagg aaccctatt 1140

 tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa 1200
 atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttcg tgtcgcctt 1260
 attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa 1320
 gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac 1380
 agcggtaaga tecttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt 1440
 aaagtcttgc taigtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcgg 1500
 cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat 1560

 cttacggatg gcatgacagt aagagaattia tgcagtctg ccataacat gagtgataac 1620
 actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg 1680
 cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc 1740
 ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa 1800
 ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag 1860
 gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggetggctg gtttattgct 1920
 gataaatctg gagccggatg gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat 1980

 ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa 2040
 cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac 2100
 caagtttact catatafact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc 2160
 taggtgaaga tectttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 2220
 cactgagcgt cagaccccgat agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg 2280
 cgcgtaatct gctgcttga aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg 2340
 gatcaagagc taccaactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 2400

 aatactgtcc ttctagtga gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg 2460
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc 2520
 tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 2580
 acggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 2640
 ctacagcgtg agctatgaga aagcggcagc ctccccgaag ggagaaagcc ggacaggtat 2700
 ccggtaaagc gcagggctcg aacaggagag cgcacagagg agcttccagg gggaaacgcc 2760
 tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 2820

tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacccagca acgcggcctt ttacggttc 2880
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttctg cgttatcccc tgattctgtg 2940
 gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 3000
 cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 3060
 gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtgaaagt 3120
 ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca 3180
 ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 3240

 agtcagcaac catagtcccg ccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgccagtt 3300
 ccgccattc tccgcccat ggctgactaa tttttttat ttatgcagag gccgaggccg 3360
 cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttggagc ctaggctttt 3420
 gcaaaaagct tggacacaag acaggcttgc gagatatgtt tgagaatacc actttatccc 3480
 gcgtcaggga gaggcagtgc gtaaaaagac gcggactcat gtgaaatact ggtttttagt 3540
 gcgccagatc tctataatct cgcgcaacct atttccctc cgaacacttt ttaagccgta 3600
 gataaacagg ctgggacact tcaatgagc gaaaaataca tcgtcacctg ggacatgttg 3660

 cagatccatg cacgtaact cgcaagccga ctgatgcctt ctgaacaatg gaaaggcatt 3720
 attgccgtaa gccgtggcgg tctgtaccgg gtgcgttact ggcgcgtgaa ctgggtattc 3780
 gtcattgca taccgtttgt atttcagct acgatcacga caaccagcgc gagcttaaag 3840
 tgctgaaacg cgcagaaggc gatggcgaag gcttcatcgt tattgatgac ctggtggata 3900
 ccggtggtag tgcggttgcg attcgtgaaa tgtatccaaa agcgcacttt gtcaccatct 3960
 tcgcaaaacc ggctggctgt ccgctggttg atgactatgt tgttgatac ccgaagata 4020
 cctggattga acagccgtgg gatatggcg tcgtattcgt cccgccaatc tccggtcgt 4080

 aatctttca acgctggca ctgcccggcg ttgtctttt taacttcagg cgggttacia 4140
 tagtttcag taagtattct ggaggctgca tccatgacac aggcaaact gagcgaacc 4200
 ctgttcaaac cccgctttaa acatctgaa acctcgacgc tagtccgccc cttaatcac 4260
 ggcgcaaac cgctgtgca gtcggccctt gatggtaaaa ccatccctca ctggtatcgc 4320
 atgattaacc gtctgatgtg gatctggcgc ggcatgacc cacgcgaaat cctcgacgtc 4380
 caggcacgta ttgtgatgag cgatgccgaa cgtaccgacg atgatttata cgatacggtg 4440
 attggctacc gtggcgcaa ctggatttat gagtgggccc cggatctttg tgaaggaacc 4500

 ttacttctgt ggtgtgacat aattggacia actacctaca gagattttaa gctctaaggt 4560
 aaatataaaa tttttaagt tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt 4620
 ttagattcca acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtg tggaatgcct ttaatgagga 4680

aaacctgttt tgctcagaag aaatgccatc tagtgatgat gaggtactg ctgactctca 4740
 acattctact cctccaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga 4800
 attgctaagt tttttgagtc atgctgtgtt tagtaataga actcttgctt gctttgctat 4860
 ttacaccaca aaggaaaaag ctgcactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt 4920

 aacctttata agtaggcata acagtataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca 4980
 caggcataga gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt 5040
 aatttgtaaa ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa 5100
 tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctecca cacctcccc 5160
 tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgtttgtaa cttgtttatt gcagcttata 5220
 atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc 5280
 attctagttg tggtttgc cc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcaactgga 5340

 taactcaagc taacaaaaat catcccaaac tccccacccc atacctatt accactgcca 5400
 attacctagt ggtttcattt actctaaacc tgtgattcct ctgaattatt ttcattttaa 5460
 agaaattgta tttgttaaat atgtactaca aacttagtag ttggaagggc taattcactc 5520
 ccaaagaaga caagataacc ttgatctgtg gatctaccac acacaaggct acttcctga 5580
 ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca ctgaccttg gatggtgcta 5640
 caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc aataaaggag agaacaccag 5700
 cttgttacac cctgtgagcc tgcattggat ggatgaccg gagagagaag tgttagagtg 5760

 gaggtttgac agccgcctag catttcatca cgtggcccga gagctgcatc cggagtactt 5820
 caagaactgc tgatctcagc cttgctacia gggactttcc gctggggact ttcaggagg 5880
 gcgtggcctg ggcgggactg gggagtggcg agccctcaga tcctgcatat aagcagctgc 5940
 tttttgcctg tactgggtct ctctggttag accagatctg agcctgggag ctctctgget 6000
 aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgc ttgagtgctt caagtagtgt 6060
 gtgccgtct gttgtgtgac tctgtaact agagatccct cagaccttt tagtcagtgt 6120
 ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttgaaa gcgaaaggga aaccagagga 6180

 gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg gcaagaggcg agggcgggcg 6240
 actggtgagt acgccccaaa ttttgactag cggaggctag aaggagagag atgggtgcca 6300
 gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcatgg gaaaaaatc ggttaaggcc 6360
 aggggaaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg gcaagcaggg agctagaacg 6420
 attcgcagtt aatcctggcc tgttagaaac atcagaaggc ttagacaaa tactgggaca 6480
 gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga tcattatata atacagtagc 6540

aaccctctat tigtgtcatc aaaggataga gataaaagac accaaggaag ctttagacaa 6600

gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag caagcggccg gtgatcttca 6660
gacctggacg atatatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt 6720
aaaaattgaa ccattaggag tagcacccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga 6780
aaaaagacga gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 6840
tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctggtatagt 6900
gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 6960
agtctggggc atcaagcagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7020

tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgacca ctgctgtgcc 7080
ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaatcaca cgacctggat 7140
ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 7200
gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 7260
gtggaattgg ttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 7320
aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tctgtactt tctatagtga atagagttag 7380
gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca accccgaggg gacccgacag 7440

gcccgaagga atagaagaag aagggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 7500
gaacggatct cgacggtcgc caaatggcag tattcatcca caattttaa agaaaagggg 7560
ggattggggg gtacagtgca ggggaagaa tagtagacat aatagcaaca gacatacaaa 7620
ctaaagaatt acaaaaaaca attacaaaaa ttcaaaattt tccggtttat tacagggaca 7680
gcagagatcc agtttgatc gataagcttg atatcgaatt gggtagggga ggcgcttttc 7740
ccaaggcagt ctggagcatg cgctttagca gccccgctgg gcacttggcg ctacacaagt 7800
ggcctctgge ctgcacaca ttccacatcc accggtagge gccaaccgce tccgttcttt 7860

ggtggccctc tcgcgccacc ttctactcct ccctagtca ggaagttccc ccccgccccg 7920
cagctcgcgt cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac gtctcactag tctcgtgcag 7980
atggacagca ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt ggggcagcgg ccaatagcag 8040
ctttgtcctc tcgctttctg ggctcagagg ctgggaaggg gtgggtccgg gggcgggctc 8100
aggggcgggg tcaggggcgg ggcgggcgcc cgaaggctct ccggaggccc ggcattctgc 8160
acgcttcaaa agcgcacgtc tgccgcgctg ttctcctctt cctcatctcc gggcctttcg 8220
atggctcttc cagtgactgc tcttctctc ccgcttgcgc tgctgttgca tgcggtcgg 8280

ccggagcaaa agctgatttc agaagaggac ttggatatcc agatgacaca gaccacttca 8340
 tctctttctg ctacgctggg ggatcgggtc acaataagct gtcgcgcatc ccaagacata 8400
 agcaaatatc tgaattggta tcaacagaaa cccgatggaa ctgtgaaact tctcatctac 8460
 catacagca gactgcattc tggggttcct agccgctttt cagggtctgg atctggaacg 8520
 gactattcac ttacatatac taatttggaa caagaagaca tcgcgaccta tttctgtcag 8580
 caaggcaata cgtccctta tacttttggg gggggaacga agttggagat cacaggtgga 8640
 ggccggcagtg gcgggggagg atctggtgga ggtggttctg aggtcaagct gcaggagagt 8700

 ggtcccgggc tggtagcccc gagccagagt ctgtctgtta cttgcaactgt gtcaggcgtg 8760
 agtctcccag actatggtgt atcatggatt cgacagccgc cccggaaagg acttgagtgg 8820
 ctccggagtga tctggggatc cgaaacgacg tactacaata gcgcgctcaa aagccggctg 8880
 accatcatta aggataactc taaaagccag gtgttcttga aatgaattc cttgcagaca 8940
 gatgatacgg cgatctatta ctgtccaag cactactact atggaggcag ctatgcatg 9000
 gattattggg gtcaaggcac ttctgtgaca gtgagcagtg ccgagctat tgaagtgatg 9060
 taccgcctc cgtatcttga taatgagaaa tctaaccgaa ccataataca cgtgaaaggc 9120

 aaacatttgt gtcgctctcc tctgttccc gggcctagta aaccgttttg ggtactggtg 9180
 gtggtaggcg gactacttgc atgttactca ctctctgtta ccgtcgatt cattatcttc 9240
 tgggtacgga gcaagagatc tcggetgctt catagcgatt atatgaatat gacaccaga 9300
 cgcccagtc ctactaggaa acattaccag ccgtatgcmc cgccgaggga cttcgcgca 9360
 tacagatctc gcgtgaagtt ctcaagatct gccgatgcac cggcttatca gcagggacaa 9420
 aaccaactgt ataatgagct gaacctgggg cggaggagg agtatgatgt cctggacaag 9480
 cgaagagggc gagacccga aatgggaggc aagcctcaac ggcggaagaa cccacaagag 9540

 ggctgtata acgagcttca aaaggacaaa atggcggaag cgtatagcga gatcggaatg 9600
 aaggcgcaac gaaggagagg gaaaggtcac gatgggctct accaggggct cagcacggca 9660
 acaaaagaca catatgacg attgcatatg caggcgtgac caccgagatg actcacgct 9720
 caagtggagc aaggcaggtg gacagtggat ccttgacttg cggccgcaac tcccactgc 9780
 aacatgcgtg actgactgag gccgcgactc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttga 9840
 tatcaagctt atcgataatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat 9900
 tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg tggatacgt gctttaatgc ctttgtatca 9960

 tgctattgct tcccgtatgg ctttcatttt ctctccttg tataaatcct ggttgctgtc 10020
 tctttatgag gagtgtggc ccgttgcag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc 10080
 tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc caccactgt cagctccttt ccgggacttt 10140

cgctttcccc ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg cccgctgctg 10200
gacaggggct cggctgttgg gcactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga aatcatcgtc 10260
ctttccttgg ctgctcgct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt ctttctgcta 10320
cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttcccgc ggctgctgc cggctctgcg 10380

gcctcttcg cgtcttcgcc ttgcctca gacgagtcgg atctccctt gggccgctc 10440
cccgcatt 10447

<210> 10
<211> 12536
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> pWPI pmei mAnti cd19 1D3 myc hinge cd28 cd3zeta
<400> 10

ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac 60
acacaaggct acttccctga ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca 120
ctgaccttgg gatgggtgcta caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc 180

aataaaggag agaacaccag cttgttacac cctgtgagcc tgcattggat ggatgacccg 240
gagagagaag tgtagagtg gaggtttgac agccgcctag catttcatca cgtggcccga 300
gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatctgag cttgtctaca gggactttcc 360
gctggggact ttccagggag gcgtggcctg ggcgggactg gggagtggcg agccctcaga 420
tcctgcatat aagcagctgc tttttgcctg tactgggtct ctctggttag accagatctg 480
agcctgggag ctctctgctt aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 540
ttgagtgctt caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct 600

cagacccttt tagtcagtg ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttgaaa 660
gcgaaagggg aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg 720
gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgcaaaaaa tttgactag cggaggctag 780
aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaacggg ggagaattag atcgcgatgg 840
gaaaaaatc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg 900
gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaac atcagaaggc 960
tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tccttcaga caggatcaga agaactaga 1020

tcattatata atacagtagc aacctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac 1080
accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag 1140

caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatag agggacaatt ggagaagtga 1200
 attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 1260
 gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 1320
 cttgggagca gcaggaagca ctatgggagc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 1380
 acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 1440

 acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 1500
 tgtgaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 1560
 catttgacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 1620
 ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat 1680
 acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga 1740
 attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat 1800
 aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt ttgctgtact 1860

 ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttaccatta tcgtttcaga cccacctccc 1920
 aaccccgagg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag 1980
 agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtat cgatgtcgac gataagcttt 2040
 gcaaagatgg ataaagtttt aaacagagag gaatctttgc agctaatgga ctttctaggt 2100
 cttgaaagga gtgggaattg gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca catcgcccac 2160
 agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg 2220
 cgggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc ctttttccg aggggtggggg 2280

 agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc 2340
 cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcccggcct ggctcttta cgggttatgg 2400
 cccttgctg ccttgaatta ctccactgg ctgcagtacg tgattcttga tcccagctt 2460
 cgggttggaa gtgggtggga gagttcgagg ccttgcgctt aaggagcccc ttcgcctcgt 2520
 gcttgagttg aggcctggcc tgggcgctgg ggcccccgcg tgcgaatctg gtggcacctt 2580
 cgcgctgtc tcgtgcttt cgataagtct ctagccattt aaaatTTTTg atgacctgct 2640
 gcgacgcttt ttttctggca agatagctt gtaaatgagg gccaagatct gcacactggt 2700

 atttcggttt ttggggccgc gggcggcgac ggggcccgtg cgtcccagcg cacatgttcg 2760
 gcgaggcggg gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac ggggtagtc tcaagctggc 2820
 cggcctgctc tggtgctgg cctcgcgccc ccgtgtatcg ccccgcctg ggcggcaagg 2880
 ctggcccgtt cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgcttcccgg cctgctgca 2940
 gggagctcaa aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc acccacaaa 3000

aggaaaaggg cctttccgtc ctcagccgtc gcttcatgtg actccacgga gtaccgggcg 3060
 ccgtccaggc acctcgatta gttctcgagc ttttgagta cgtcgtcttt aggttggggg 3120

gaggggtttt atgcgatgga gtttcccac actgagtggg tggagactga agttaggcca 3180
 gcttggcact tgatgtaatt ctccittgaa tttgcccttt ttgagtttgg atcttggttc 3240
 atttcaage ctcagacagt ggttcaaagt ttttttcttc catttcaggt gtcgtgagga 3300
 atttcgacat ttaaatttaa ttaatctega cggatcgggt taacttttaa aagaaaaggg 3360
 gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac agacatacaa 3420
 actaaagaat taaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttatcgatca cgagactagc 3480
 ctcgaggttt atgggggttc ccaccagct gttggggttg ctgctcctct ggatcactga 3540

tgccatctgc gaacagaagc tcatttctga agaagatctg gacatacaga tgaccagag 3600
 tcctgccage ttgtccacat ccctcggaga gaccgtgaca attcaatgcc aggcctctga 3660
 ggacatata tctggattgg cttggtacca gcaaaagcca ggtaaaagtc ctcagtgtgt 3720
 gatatacggc gcttctgatt tgcaagacgg ggtgccctca cgatttagcg ggtctggaag 3780
 tggcactcag tacagtctga agattacttc aatgcaaaca gaagacgagg gtgtgtattt 3840
 ttgccaacag gggctgacct acctcaaggc attcgggggc ggtacaaagc ttgaacttaa 3900
 gggcggcggg ggtctggag gtggtggatc tggcggaggg ggaagtgagg tacagctgca 3960

acagtccggc gccgaactcg ttcgccctgg aacctcagtc aaattgtcat gcaaggtgag 4020
 tggcgacaca ataacctttt actatatgca ctctgttaa cagaggccag gtcaaggtct 4080
 ggaatggata ggcagaattg atccagaaga tgagtcacc aaatactcag aaaagttcaa 4140
 aaacaaagcc actcttactg ccgacacctc aagcaacaca gcatatctta agctcagttc 4200
 acttaccage gaagacaccg ccacctatft ttgtatftat ggtggctatt actttgacta 4260
 ctgggggcaa ggtgttatgg taacagtttc ttccattgaa ttcattgtat cacccccta 4320
 tttggataat gaacgatcta atgggactat aatacatatc aaggaaaagc atctgtgtca 4380

taccxaaagt tcccctaagc ttttctgggc cctcgtcgtt gtggcaggag tgcttttttg 4440
 ctatggattg ttggttactg tggctctctg cgtcatttgg acaaatagta ggaggaatcg 4500
 ggggggacaa tctgattaca tgaacatgac accacggagg ccaggcctta ccagaaagcc 4560
 ctaccaacct tatgaccag cagcagactt cgcgcatac aggccaaggg ctaagttttc 4620
 ccgcagcgcc gaaaccgag ccaacctcca agatccta at cagctctata acgaattgaa 4680
 tcttggccgc agagaggagt acgacgtact tgagaaaaag agagctaggg acctgaaat 4740

ggggtgggaag caacagcgaa gaaggaaccc acaggaaggg gtgtataatg cccttcaaaa 4800

 ggataaaatg gcagaggcat acagtgaat cggaaccaag ggggagagac gcagagggaa 4860
 aggccatgac ggccctttatc agggttttgtc aactgctact aaagacactt atgatgcctt 4920
 gcatatgcaa acctctgcac ccagatgaaa actacgggct gcaggaattc cgcccccccc 4980
 ccctaactg tactggccga agccgcttgg aataaggccg gtgtgcgttt gtctatatgt 5040
 tattttccac catattgccg tcttttggca atgtgagggc ccggaacct ggccctgtct 5100
 tcttgacgag cattcctagg ggtctttccc ctctcgcaa aggaatgcaa ggtctgttga 5160
 atgtcgtgaa ggaagcagtt cctctggaag ctcttgaag acaacaacg tctgtagcga 5220

 ccctttgcag gcagcggaac cccccactg gcgacagggtg cctctgcggc caaaagccac 5280
 gigtataaga tacacctgca aaggcggcac aacccagtg ccacgtttgtg agttggatag 5340
 ttgtggaag agtcaaatgg ctctctcaa gcgtattcaa caaggggtg aaggatgccc 5400
 agaaggtacc ccattgtatg ggatctgatc tggggcctcg gtgcacatgc tttacatgtg 5460
 tttagtcgag gttaaaaaac gtctaggccc ccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg 5520
 aaaaacacga tgataatacc atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc 5580
 ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg 5640

 gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc 5700
 tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgacca cctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc 5760
 gctacccga ccacatgaag cagcagcact tctcaagtc cgccatgcc gaaggctacg 5820
 tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga 5880
 agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg 5940
 acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactaaa cagccacaac gtctatatca 6000
 tggccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg tgaacttaa gatccgccac aacatcgagg 6060

 acggcagcgt gcagctgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg 6120
 tgctgtgcc cgacaaccac tactgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg 6180
 agaagcgca tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgca 6240
 tggacgagct gtacaagtc ggactcagat ctcgactagc tagtagctag ctagctagtc 6300
 gagctcaagc ttcgaattcg atatcaagct tatcgcgata ccgtcgacct cgaggggaatt 6360
 ccgataatca acctctggat taaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttaaactatg 6420
 ttgctccttt tacgctatgt ggatacgtg ctttaatgcc tttgtatcat gctattgctt 6480

cccgtatggc ttcattttc tcctccttgt ataaatcctg gttgctgtct ctttatgagg 6540
 agttgtggcc cgttgtcagg caacgtggcg tgggtgtcac tgtgtttgct gacgcaacce 6600
 ccaactggtt gggcattgcc accacctgtc agctcctttc cgggactttc gctttccccc 6660
 tccttattgc cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg acaggggctc 6720
 ggctgttggg cactgacaat tccgtggtgt tgcggggaa gctgacgtcc tttccatggc 6780
 tgctgcctg tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc ettctgtac gtcccttcgg 6840
 ccctcaatcc agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgcgg cctcttccgc 6900

 gtcttcgctt tcgccctcag acgagtcgga tctccctttg ggccgctcc ccgcatcggg 6960
 aattcgagct cggtagcttt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac 7020
 tttttaaag aaaagggggg actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatggg 7080
 atcaattcac catgggaata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta tgctgctttt 7140
 tgcttgactt gggctctctt ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact 7200
 agggaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc 7260
 ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa 7320

 aatctctagc agcatctaga attaattccg tgtattctat agtgtcacct aatcgtatg 7380
 tgtatgatac ataaggttat gtattaattg tagcccggtt ctaacgaca tatgtacaag 7440
 cctaattgtg tagcatctgg cttaactgaag cagacctat catctcttc gtaaactgcc 7500
 gtcagagtcg gtttggttgg acgaaccttc tgagtttctg gtaacgccgt cccgcacccg 7560
 gaaatggtea gcgaaccaat cagcagggtc atcgctagcc agatcctcta cgccggacgc 7620
 atcgtggccg gcacaccggg cgccacaggt gcggttgctg gcgcctatat cgccgacatc 7680
 accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga gcgcttgttt cggcgtgggt 7740

 atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgcca tctccttgca tgcaccattc 7800
 cttgcggcgg cggtgctcaa cggcctcaac ctactactgg gctgcttctt aatgcaggag 7860
 tcgcataagg gagagcgtcg aatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata 7920
 gtaagccag ccccacacc cgccaacacc cgtgacgcg ccctgacggg cttgtctgct 7980
 cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt 8040
 ttaccgtca tcaccgaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgc tatttttata 8100
 ggtaaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt 8160

 gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aataigtatc cgctcatgag 8220
 acaataacce tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca 8280
 tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttctgtttt ttgctcacc 8340

agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 8400
 cgaactggat ctcaacgcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc 8460
 aatgatgagc acttttaag tttctgctatg tggcgcggtta ttatcccgtat ttgacgccgg 8520
 gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacactia ttctcagaat gacttggttg agtactcacc 8580

 agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat 8640
 aacctgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga 8700
 gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc 8760
 ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc 8820
 aacaacgttg cgaaaactat taactggcga actacttact cttagcttccc ggcaacaatt 8880
 aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgctcctgg cccttccggc 8940
 tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgc gtatcattgc 9000

 agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca 9060
 ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgtgagata ggtgcctcac tgattaagca 9120
 ttgtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt 9180
 ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta 9240
 acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 9300
 agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg ctgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 9360
 ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag 9420

 cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 9480
 gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatac ctgttaccag tggctgctgc 9540
 cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 9600
 gcagcggctg ggetgaacgg ggggttctg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 9660
 caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag 9720
 aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct 9780
 tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tetgacttga 9840

 gcgtcgattt ttgigatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 9900
 ggctttttta cggttcctgg ccttttctg gccttttct cacatgttct ttctgcgtt 9960
 atcccctgat tctgtggata accgtattac gcctttgag tgagctgata ccgctcggc 10020
 cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcaggaa gcggaagagc gcccaatag 10080
 caaacgcct ctccccgcg gttggccgat tcattaatgc agctgtggaa tgtgtgtcag 10140
 ttaggtgtg gaaagtcccc aggctcccc gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc 10200

aattagtcag caaccagggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa 10260

agcatgcate tcaattagtc agcaaccata gtcccccccc taactccgcc catccccccc 10320
ctaactccgc ccagttccgc ccattctecg ccccatggct gactaatttt ttttatttat 10380
gcagaggccg aggccgcctc ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt 10440
ggaggcctag gcttttgcaa aaagcttggg cacaagacag gcttgcgaga tatgtttgag 10500
aataccactt tatccccgct cagggagagg cagtgcgtaa aaagacgcgg actcatgtga 10560
aatactgggt tttagtgcgc cagatctcta taatctcgcg caacctatft tcccctcgaa 10620
cactttttaa gccgtagata aacaggctgg gacacttcac atgagcgaaa aatacatcgt 10680

cacctgggac atgttcgaga tccatgcacg taaactcgca agccgactga tgccttctga 10740
acaatggaaa ggcattattg ccgtaagccg tggcggctcg taccgggtgc gttactggcg 10800
cgtgaactgg gtattcgtca tgtcgatacc gtttgtatft ccagctacga tcacgacaac 10860
cagcgcgagc ttaaagtctt gaaacgcgca gaaggcgatg gcgaaggctt catcgttatt 10920
gatgacctgg tggataccgg tggactgctg gttgcgattc gtgaaatgta tccaaaagcg 10980
cactttgtca ccactctcgc aaaaccgctt ggtcgtccgc tggttgatga ctatgttgtt 11040
gatatccgc aagatacctg gattgaacag ccgtgggata tggcgcgtct attcgtcccg 11100

ccaatctccg gtcgctaate ttttcaacgc ctggcactgc cgggcgttgt tctttttaac 11160
ttcaggcggg ttacaatagt ttccagtaag tattctggag gctgcatcca tgacacaggc 11220
aaactgagc gaaacctctt tcaaaccccg ctttaaacat cctgaaacct cgacgctagt 11280
ccgccgcttt aatcacggcg cacaaccgcc tgtgcagtcg gcccttgatg gtaaaacat 11340
ccctcactgg tatcgcatga ttaaccgtct gatgtggatc tggcgcggca ttgaccacg 11400
cgaaatcctc gacgtccagg cacgtattgt gatgagcgat gccgaacgta ccgacgatga 11460
tttatacgat acggtgattg gctaccgtgg cggcaactgg atttatgagt gggccccgga 11520

tctttgtgaa ggaaccttac ttctgtggtg tgacataatt ggacaaacta cctacagaga 11580
tttaaagctc taaggtaaat ataaaatttt taagtgtata atgtgttaaa ctactgattc 11640
taattgtttg tgiattttag attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtgggtgga 11700
atgcctttaa tgaggaaaac ctgttttgct cagaagaaat gccatctagt gatgatgagg 11760
ctactctgta ctctcaacat tctactctc caaaaaagaa gagaaaggta gaagacccca 11820
aggactttcc ttcagaattg ctaagttttt tgagtcatgc tgtgtttagt aatagaactc 11880
ttgcttgctt tgctatttac accacaaagg aaaaagctgc actgctatc aagaaaatta 11940

tggaaaaata ttctgtaacc tttataagta ggcataacag ttataatcat aacatactgt 12000
 tttttcttac tccacacagg catagagtgt ctgctattaa taactatgct caaaaattgt 12060
 gtacctttag ctttttaatt tgtaaagggg ttaataagga atatttgatg tatagtgcct 12120
 tgactagaga tcataatcag ccataccaca ttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac 12180
 ctccacacc tcccctgaa cctgaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg 12240
 tttattgcag cttataatgg ttacaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa 12300
 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat 12360

gtctggatca actggataac tcaagctaac caaatcadc ccaaacttcc cacccatac 12420
 cctattacca ctgccaatta cctagtggtt tcatttactc taaacctgtg attcctctga 12480
 attattttca ttttaaagaa attgtatttg ttaaatatgt actacaaact tagtag 12536

<210> 11

<211> 365

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> FKBP-1SG-FR with GPI anchor amino acid sequence

<400> 11

Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val Ala Val Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly

35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro

100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val
 130 135 140
 Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr
 165 170 175
 Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe
 180 185 190
 Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe
 195 200 205
 Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp
 210 215 220
 Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val
 225 230 235 240
 Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr
 245 250 255
 Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser
 260 265 270
 Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe
 275 280 285
 Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser
 290 295 300
 Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met
 305 310 315 320
 Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe
 325 330 335
 Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala Ala Trp Pro Phe
 340 345 350
 Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser
 355 360 365

<210> 12

<211> 375

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> FKBP-3SG-FR with GPI anchor amino acid sequence:

<400> 12

Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val Ala Val Val Gly
1 5 10 15

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

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
 35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
 50 55 60

Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
65 70 75 80

Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
 100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ile
 130 135 140

Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His
145 150 155 160

His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg
 165 170 175

Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala
 180 185 190

His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly
 195 200 205

Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu

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

<211> 895

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> FMC63-T2A-FKBP3SGFR

<400> 14

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

1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp

 20 25 30
Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp

 35 40 45
Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu

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

65 70 75 80
His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

 85 90 95
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu

 100 105 110
Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

 115 120 125
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly

 130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser

145 150 155 160
Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr

 165 170 175
Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln

 180 185 190
Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu

 195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 210 215 220
 Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 225 230 235 240
 Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 245 250 255
 Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 260 265 270
 Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn
 275 280 285
 Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys
 290 295 300
 Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val
 305 310 315 320
 Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
 325 330 335
 Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser
 340 345 350
 Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His
 355 360 365
 Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg
 370 375 380
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 385 390 395 400
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 405 410 415
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 420 425 430
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 435 440 445
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg

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

 515 520 525
 Leu Val Trp Val Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Gly Val Gln Val
 530 535 540
 Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln
 545 550 555 560
 Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe
 565 570 575
 Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys

 580 585 590
 Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val
 595 600 605
 Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala
 610 615 620
 Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp
 625 630 635 640
 Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

 645 650 655
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu
 660 665 670
 Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu
 675 680 685
 Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys
 690 695 700

Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr

705 710 715 720

Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg

725 730 735

His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly

740 745 750

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

755 760 765

Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys

770 775 780

Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp

785 790 795 800

Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe

805 810 815

His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr

820 825 830

His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile

835 840 845

Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala

850 855 860

Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala Ala Trp

865 870 875 880

Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser

885 890 895

<210> 15

<211> 1029

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> FMC63-T2A-4M5.3SGFR

<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 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30
 Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

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

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

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

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 260 265 270

Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn
 275 280 285

Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys
 290 295 300

Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val
 305 310 315 320

Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
 325 330 335

Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser
 340 345 350

Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His
 355 360 365

Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg
 370 375 380

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

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 450 455 460

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 465 470 475 480

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly
 485 490 495

Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu

Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly
 755 760 765

 Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln
 770 775 780
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ile Ala Trp
 785 790 795 800
 Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys
 805 810 815
 Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp
 820 825 830

 Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys
 835 840 845
 Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met
 850 855 860
 Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu
 865 870 875 880
 Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp
 885 890 895

 Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu
 900 905 910
 Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp
 915 920 925
 His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly
 930 935 940
 Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu
 945 950 955 960

 Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg
 965 970 975
 Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn
 980 985 990
 Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala

Arg Tyr Leu Glu Cys Ile Ser Cys Gly Ser Ser Asp Met Ser Cys Glu
 115 120 125
 Arg Gly Arg His Gln Ser Leu Gln Cys Arg Ser Pro Glu Glu Gln Cys
 130 135 140
 Leu Asp Val Val Thr His Trp Ile Gln Glu Gly Glu Glu Gly Arg Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Asp Arg His Leu Arg Gly Cys Gly Tyr Leu Pro Gly Cys Pro
 165 170 175
 Gly Ser Asn Gly Phe His Asn Asn Asp Thr Phe His Phe Leu Lys Cys
 180 185 190
 Cys Asn Thr Thr Lys Cys Asn Glu Gly Pro Ile Leu Glu Leu Glu Asn
 195 200 205
 Leu Pro Gln Asn Gly Arg Gln Cys Tyr Ser Cys Lys Gly Asn Ser Thr
 210 215 220
 His Gly Cys Ser Ser Glu Glu Thr Phe Leu Ile Asp Cys Arg Gly Pro
 225 230 235 240
 Met Asn Gln Cys Leu Val Ala Thr Gly Thr His Glu Pro Lys Asn Gln
 245 250 255
 Ser Tyr Met Val Arg Gly Cys Ala Thr Ala Ser Met Cys Gln His Ala
 260 265 270
 His Leu Gly Asp Ala Phe Ser Met Asn His Ile Asp Val Ser Cys Cys
 275 280 285
 Thr Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp Val Gln Tyr Arg Ser
 290 295 300
 Gly Ala Ala Pro Gln Pro Gly Pro Ala His Leu Ser Leu Thr Ile Thr
 305 310 315 320
 Leu Leu Met Thr Ala Arg Leu Trp Gly Gly Thr Leu Leu Trp Thr
 325 330 335
 <210> 18
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> artificial

<220><223> DHFR

<400> 18

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 19

<211> 255

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> scFv against FITC: 4M5.3(Kd = 200pM)

<400> 19

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

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

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

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

245 250 255

<210> 20

<211> 244

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> scFv against FITC 4D5Flu (Kd=10nM)

<400> 20

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

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

<210> 21

<211> 244

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> scFv against DNP SPE7

<400> 21

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
 130 135 140

