(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0069961
(43) 공개일자 2023년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/4631 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7012283
(22) 출원일자(국제) 2021년09월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/050341
(87) 국제공개번호 WO 2022/056497
국제공개일자 2022년03월17일
(30) 우선권주장
63/078,134 2020년09월14일 미국(US)

(71) 출원인
보르 바이오파마 인크.
미국 02140 매사추세츠주 케임브리지 케임브리지 파크 드라이브 100 스위트 400
(72) 발명자
카심, 사디크
미국 02140 매사추세츠 케임브리지 케임브리지파크 드라이브 100 스위트 400
셰러, 줄리안
미국 02140 매사추세츠 케임브리지 케임브리지파크 드라이브 100 스위트 400
(74) 대리인
양영준, 이상남

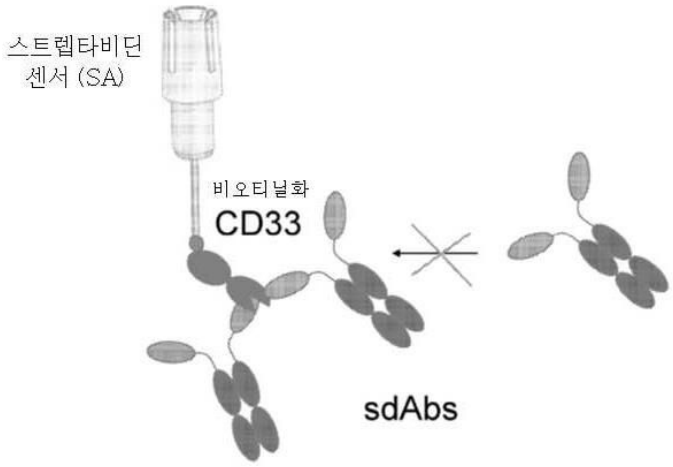
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **CD33에 대한 단일 도메인 항체**

(57) 요 약

본 개시내용은 특히 CD33에 대한 항체, 및 이러한 항체를 제조하고 사용하는 방법을 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/4633 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70578 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 88로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

서열번호 1 내지 88 중 어느 하나 내에 포함되는 CDR 서열을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 또는 81 중 어느 하나 내에 포함된 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 적어도 하나의 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 적어도 하나의 CDR을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

서열번호 1 내지 88로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

서열번호 1 내지 88 중 어느 하나 내에 포함되는 CDR 서열을 포함하는 VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 또는 81 중 어느 하나 내에 포함된 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 적어도 하나의 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)을 포함하는 VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 적어도 하나의 CDR을 포함하는 VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 모노클로날 항체 또는 이의 항원

-결합 단편인, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 CH2 불변 도메인 및 CH3 불변 도메인을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 15

제14항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 중쇄 항체인, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 낙타과 항체인, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나를 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 19

제18항의 키메라 항원 수용체를 발현하는, 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 세포가 면역 효과기 세포인, 세포.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 세포가 림프구인, 세포.

청구항 22

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 T-세포인, 세포.

청구항 23

제19항 또는 제20항에 있어서, 세포가 NK 세포인, 세포.

청구항 24

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제18항의 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

청구항 25

제24항의 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 26

제24항의 핵산 또는 제25항의 벡터를 포함하는, 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, 세포가 면역 세포인, 세포.

청구항 28

제27항에 있어서, 면역 세포가 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 및 조절 T 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포.

청구항 29

항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법으로서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현에 적합한 조건하에서 제19항 내지 제23항 또는 제26항 내지 제28항 중 어느 한 항의 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

CD33-관련 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제19항 내지 제23항 또는 제26항 내지 제28항 중 어느 한 항의 세포의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

CD33 발현과 연관된 혈액의 신생물 질환 또는 악성종양을 앓고 있거나 이에 걸릴 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제19항 내지 제23항 또는 제26항 내지 제28항 중 어느 한 항의 세포의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, CD33 발현과 연관된 혈액의 신생물 질환 또는 악성종양은 골수이형성 증후군(MDS, myelodysplastic syndrome), 급성 골수성 백혈병(AML, acute myeloid leukemia), 다발성 골수종(MM, multiple myeloma), 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 유효량의 화학요법제 또는 종양용해성(oncolytic) 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2020년 9월 14일에 출원된 미국 가출원 제63/078,134호의 35 U.S.C. 119(e) 하의 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배 경 기 술

[0003] 시글렉(Siglec, 시알산-결합 면역글로불린 유사 렉틴(Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin))으로도 알려진, CD33은 급성 골수성 백혈병(AML, acute myeloid leukemia) 세포에서 빈번하게 발현된다. AML은 혈액 종양학에서 주요한 치료 과제이자 충족되지 않은 요구로 남아 있다. AML은 골수 및 말초 혈액에서 미성숙 골

수 모세포(myeloid blast)의 조절되지 않는 축적을 초래하는 질환이며, 이러한 질환은 포괄적 표적화 요법을 개발하는데 어려움이 되는 다수의 아형(subtype)을 갖는다. 이러한 질환의 분자 유전학에 대한 이해도가 증가하고 있지만, AML에 대해 승인된 신규한 치료법은 상대적으로 거의 없다. 따라서, AML에 대한 신규한 치료법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0004] 본 개시내용은 CD33에 대한 신규한 항체를 제공한다. 본 개시내용은 또한 CD33 발현과 관련된, 신생물 질환 및 혈액의 악성종양, 조혈 악성종양(예를 들어, 급성 골수성 백혈병(AML, acute myeloid leukemia), 골수이형성 증후군(MDS, myelodysplastic syndrome), 다발성 골수종(MM, multiple myeloma))을 치료하기 위한 이러한 항체의 용도를 제공한다.

[0005] 일 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나 내에 포함된 상보적 결정 영역(CDR, complementarity determining region) 서열을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 또는 81 중 어느 하나 내에 포함된 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 적어도 하나의 CDR(예를 들어 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 적어도 하나의 CDR을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 중쇄 가변 도메인, *예를 들어*, 단일 도메인 항체 VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나 내에 포함된 CDR 서열을 포함하는 VH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 또는 81 중 어느 하나에 포함된 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 적어도 하나의 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)을 포함하는 VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 적어도 하나의 CDR을 포함하는 VHH를 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0006] 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 추가 영역, 예컨대 하나 이상의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 VHH로 지칭될 수 있는, 중쇄 가변 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체이다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 도메인으로 이루어진 단일 도메인 항체이다.

[0007] 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CH2 불변 도메인 및 CH3 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 항체이다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 낙타과(camelid) 항체이다.

[0008] 본 개시내용의 측면은 또한 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나를 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공한다. 본 개시내용의 측면은 또한 본원에 기술된 키메라 항원 수용체 중 어느 하나를 발현하는 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 세포는 면역 효과기 세포(immune effector cell)이다. 일부 실시예에서, 세포는 림프구이다. 일부 실시예에서, 세포는 T-세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 NK 세포이다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나, 또는 본원에 기술된 키메라 항원 수용체 중 어느 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산을 제공한다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 핵산 중 어느 하나를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 핵산 중 어느 하나 또는 본원에 기술된 벡터 중 어느 하나를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 T 세포, 자연 살해(NK, Natural Killer) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL, cytotoxic T lymphocyte), 및 조절 T 세포(regulatory T cell)로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역 세포이다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현에 적합한 조건 하에서 본원에 기술된 숙주 세포 중 어느 하나를 배양하는 단계를 포함한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 CD33-관련 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나, 또는 본원에 기술된 키메라 항원 수용체 중 어느 하나를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 CD33 발현과 연관된 혈액의 신생물 질환 또는 악성종양을 앓고 있거나 이에 걸릴 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 이러한 방법은 치료적 유효량의 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 질환 또는 악성종양은 조혈 악성종양이다. 일부 실시예에서, CD33 발현과 연관된 혈액의 신생물 질환 또는 악성 종양은 골수이형성 증후군(MDS, myelodysplastic syndrome), 급성 골수성 백혈병(AML, acute myeloid leukemia), 다발성 골수종(MM, multiple myeloma), 또는 이들의 조합이다.

[0014] 일부 실시예에서, 본 개시내용의 방법은 유효량의 화학요법제 또는 종양용해성(oncolytic) 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 이러한 방법은 조혈 세포의 집단을 투여하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 조혈 세포는 유전적으로 조작되어서 CD33을 암호화하는 유전자가 CD33의 발현을 감소시키거나 제거하도록 조작되도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0015] **도 1**은 예시적인 항-CD33 항체에 의해 결합된 에피토프를 평가하기 위한 Octet® 분석법의 예시를 도시한다. 비오티닐화된 CD33과 접촉하여 도시된 항체는 CD33 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것으로 여겨지는 반면, 비오티닐화된 CD33과 접촉하지 않는 제3의 항체는 다른 항체 중 하나와 동일한 에피토프에 결합하므로 CD33과 상호작용할 수 없는 것으로 여겨진다.

도 2는 제1 항-CD33 항체(포화 항체(mAb))와 제2 항-CD33 항체(경쟁 항체(mAb)) 간의 경쟁을 평가하는 Octet® 분석법으로부터의 결합 데이터의 그래프를 도시한다.

도 3은 제1 항-CD33 항체와 제2 항-CD33 항체 간의 경쟁을 평가하는 Octet® 분석법으로부터의 결합 데이터의 히트맵 표현을 도시한다.

도 4는 돌연변이에 대해 표적화된 CD33의 아미노산을 나타내는 3개의 상이한 구조적 표현을 보여주는 CD33의 리본 구조를 도시한다.

도 5는 돌연변이체 CD33-GFP 융합 단백질로 일시적으로 형질감염된 293FT 세포의 세포 게이팅(상단) 및 예시적인 CD33 돌연변이체 W22A에 대한 sdAb 348 또는 hu195 결합을 분석하는 FACS 데이터(하단)를 도시한다.

도 6은 10개의 sdAb를 갖는 돌연변이체 CD33-GFP 결합 실험으로부터의 형광-활성화 세포 분류(FACS, fluorescence-activated cell sorting) 분석 데이터의 히트맵 표현을 도시한다.

도 7은 CD33의 단백질 구조도를 도시하며, 이는 시험되고 도면 위에 표시된 각각의 표시된 항-CD33 sdAb의 결합에 중요한 것으로 결정된 아미노산을 도시한다.

도 8은 CD33의 단백질 구조도를 도시하며, 이는 시험되고 도면 위에 표시된 각각의 표시된 항-CD33 sdAb의 결합에 중요한 것으로 결정된 아미노산을 도시한다.

도 9a 내지 9c는 본원에 기술된 바와 같은 예시적인 리포터 세포의 유세포 계측 분석 플롯을 도시한다. **도 9a**는 구성적으로 활성인 E1F알파 프로모터의 제어 하의 mOrange 리포터 분자 및 본원에 기술된 IL-2 리포터 시스템의 제어 하의 mTurquoise 리포터 분자(mTurq)를 함유하는 Jurkat 세포를 도시한다. 세포를 활성화시키지 않거나("-PMA/이온", 상단 행), 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA, phorbol myristate acetate) 및 이오노마이신

("+PMA/이온", 하단 행)을 사용하여 활성화시켰다. 플롯의 좌측 컬럼은 mOrange 리포터 분자를 발현하는 세포를 나타내고; 중간 컬럼은 mTurquoise 리포터 분자를 발현하는 세포를 나타내고; 우측 컬럼은 T 세포 활성화의 지표인 CD69를 발현하는 세포를 나타낸다. **도 9b**는 구성적으로 활성인 E1F알파 프로모터의 제어 하의 mOrange 리포터 분자 및 본원에 기술된 IL-2 리포터 시스템의 제어 하의 mTurquoise 리포터 분자(mTurq)를 함유하는 Jurkat 세포를 도시한다. 세포를 활성화시키지 않거나("-PMA/이온", 상단 행), 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA) 및 이오노마이신("+PMA/이온", 하단 행)을 사용하여 활성화시켰다. 플롯의 좌측 컬럼은 mTurquoise 리포터 분자를 발현하는 세포를 나타내고; 중간 컬럼은 mOrange 리포터 분자를 발현하는 세포를 나타내고; 우측 컬럼은 T 세포 활성화의 지표인 CD69를 발현하는 세포를 나타낸다. **도 9c**는 도 9a 및 도 9b의 정량화 유세포 계측 분석의 플롯을 도시한다. y-축은, 구성적으로 활성인 프로모터 EF1a의 제어 하에 있는, 제1 리포터 분자(FP1)를 발현하는 세포에 기초하여, 본원에 기술된 IL-2 리포터 시스템의 제어 하에 있는, 제2 리포터 분자(FP2)를 발현하는 세포의 백분율을 도시한다. 세포를 활성화시키지 않거나("-PMA/이온") 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA) 및 이오노마이신("+PMA/이온")을 사용하여 활성화시켰다. "EF1a_mOrange_IL-2_mTurq"는 구성적으로 활성인 E1F 알파 프로모터(FP1)의 제어 하의 mOrange 리포터 분자 및 본원에 기술된 IL-2 리포터 시스템(FP2)의 제어 하의 mTurqoise 리포터 분자(mTurq)를 함유하는 Jurkat 세포를 지칭한다. "EF1a_mTurq_IL-2_mOrange"는 구성적으로 활성인 E1F알파 프로모터(FP1)의 제어 하의 mTurqoise 리포터 분자 및 본원에 기술된 IL-2 리포터 시스템(FP2)의 제어 하에 있는 mOrange 리포터를 함유하는 Jurkat 세포를 지칭한다.

도 10은 Jurkat 세포가 MOLM13 CD33-발현 세포에 노출되었을 때 IL-2 유도성 형광 단백질의 배수 증가(FP2; 검은색의 mTurq 또는 밝은 회색의 mOrange)의 그래프를 도시하며, 여기서 Jurkat 세포는 표시된 CAR 또는 공동-자극 단백질을 발현한다.

도 11은 Jurkat 세포가 MOLM13 CD33-발현 세포에 노출되었을 때 IL-2 유도성 형광의 절대 변화(ΔFP2)(검은색의 mTurq 또는 밝은 회색의 mOrange)에 대한 그래프를 도시하며, 여기서 Jurkat 세포는 표시된 CAR 또는 공동 자극 단백질을 발현한다.

도 12a 및 **12b**는 구성적 활성화 EF-1a 프로모터의 제어 하에 리포터 분자를 함유하는 예시적인 유전자 작제물의 개략도를 도시하며**도 12a**는 구성적 활성화 EF-1a 프로모터의 제어 하의 mOrange를 도시한다. **도 12b**는 구성적 활성화 EF-1a 프로모터의 제어 하의 mTurquoise를 도시한다. 이들 작제물은 형질감염된 세포에서 관련 형광 단백질의 구성적인 발현을 제공한다.

도 13a 및 도 **13b**는 본원에 기술된 IL-2 리포터 시스템의 예시적인 유전자 작제물의 개략도를 도시한다. **도 13a**는 6개의 NFAT 결합 부위 및 최소 IL-2 프로모터("minP")를 함유하는 최소 NFAT-반응성 프로모터의 제어 하의 mOrange 리포터 분자 및 구성적으로 활성인 E1F알파 프로모터의 제어 하의 mTurquoise 리포터 분자(mTurq)를 도시한다. **도 13b**는 6개의 NFAT 결합 부위 및 최소 IL-2 프로모터("minP")를 함유하는 최소 NFAT-반응성 프로모터의 제어 하에 있는 mTurquoise 리포터 분자 및 구성적으로 활성인 E1F알파 프로모터의 제어 하의 mOrange 리포터 분자를 도시한다. 이들 작제물은 CAR 활성화 시 IL-2 리포터 시스템의 제어 하에 리포터 분자의 발현을 제공하며, 이는 구성적 프로모터의 제어 하에 리포터 분자의 발현에 대해 상대적으로 평가될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 개시내용은 CD33에 선택적으로 결합하는 신규한 항체의 발견에 부분적으로 기초한다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 단일-도메인 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 가변 도메인 및 하나 이상의 불변 도메인을 포함한다. 본 개시내용은 또한 상기 항체를 암호화하는 핵산, 상기 항체를 생산하는 방법, 및 암(예를 들어, 급성 골수성 백혈병(AML), 골수이형성 증후군(MDS))의 치료에서의 사용 방법에 관한 것이다.

[0017] ***항체***

[0018] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 및/또는 항체 단편(바람직하게는 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 단편)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 항체 구조를 포함한다. 본원에 기술된 항체는 면역글로불린, 중쇄 항체, 경쇄 항체, LRR-기반 항체, 또는 항체-유사 특성을 갖는 다른 단백질 스캐폴드, 및 예를 들어 Fab, Fab', Fab'2, Fab2, Fab3, F(ab')2, Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), 미니바디(minibody), Nanobody®(단일 도메인 항체), 맥시바디(maxibody), 탠다브(tandab), DVD, BiTe, TandAb, 등, 또는 이들의 임의의 조합을 비롯하여, 당 기술분야에 공지된 다른 면역학적 결합 모이어티일

수 있다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는 낙타과 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 불변 영역(예를 들어 CH2 및 CH3)을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 단일 도메인 항체 또는 "VHH"로도 지칭되는, Nanobody®이다. 상이한 부류의 항체의 서브유닛 구조 및 3차원 구성은 당 기술분야에 공지되어 있다.

[0019] "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 포함하는 개별 항체는 가능한 변이체 항체(예를 들어, 자연적으로 발생하는 돌연변이를 함유하거나 모노클로날 항체 제조의 생산 중에 발생하는 것)를 제외하고는 동일한 에피토프에 대해 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합하며, 이러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체를 일반적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제조와 대조적으로, 모노클로날 항체 제조의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 유도된다.

[0020] "항원-결합 단편"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 지칭한다. 항체의 항원-결합 단편은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연적으로 발생하는, 효소적으로 수득가능한, 합성 또는 유전적으로 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 예시적인 항체 단편은 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; 디아바디; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자(예를 들어 scFv 또는 VHH 또는 VH 또는 VL 도메인 단독); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체의 항원-결합 단편은 scFv이다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체의 항원-결합 단편은 VHH 도메인 단독이다. 전체(full) 항체 분자와 마찬가지로, 항원-결합 단편은 단일-특이적 또는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적)일 수 있다. 항체의 다중특이적 항원-결합 단편은 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별도의 항원 또는 동일한 항원의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0021] "다중특이적 항체"는 적어도 2개의 상이한 항원을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 적어도 2개의 상이한 항원 결합 도메인을 포함하는 항체를 지칭한다. "이중특이적 항체"는 다중특이적 항체의 일 유형이며, 적어도 2개의 상이한 항원을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 2개의 상이한 항원 결합 도메인을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0022] "상이한 항원"은 상이한 및/또는 구별되는 단백질, 폴리펩티드, 또는 분자; 및 상이한 및/또는 구별되는 에피토프를 지칭할 수 있으며, 이러한 에피토프는 하나의 단백질, 폴리펩티드, 또는 다른 분자 내에 포함될 수 있다.

[0023] 용어 "에피토프"는 파라토프로 알려진 항체 분자의 가변 영역에서 특이적 항원 결합 부위와 상호작용하는 항원 결정인자를 지칭한다. 단일 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 상이한 항체는 항원의 상이한 영역에 결합할 수 있고 상이한 생물학적 효과를 가질 수 있다. 용어 "에피토프"는 또한 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원의 부위를 지칭한다. 이는 또한 항체에 의해 결합된 항원의 영역을 지칭한다. 에피토프는 구조적 또는 기능적으로서 정의될 수 있다. 기능적 에피토프는 일반적으로 구조적 에피토프의 서브세트이며, 상호작용의 친화도에 직접적으로 기여하는 잔기를 갖는다. 에피토프는 또한 입체형태적(conformational)일 수 있으며, 즉 비-선형 아미노산으로 구성될 수 있다. 특정 실시예에서, 에피토프는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴기, 또는 설포닐기와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면기인 결정인자를 포함할 수 있고, 특정 실시예에서, 특이적인 3차원 구조적 특성 및/또는 특이적인 전하 특성을 가질 수 있다.

[0024] 본원에서 사용되는 바와 같이, 항원 결합 모이어티 및 항원 표적에 대하여, "선택적인 결합(selective binding)", "선택적으로 결합한다(selectively binds)", 또는 "특이적인 결합(specific binding)", 또는 "특이적으로 결합한다(specifically binds)"는 항원 표적에 대한 항원 결합 모이어티의 우선적인 연관성을 지칭하며, 항원 표적이 아닌 실재물에 대한 것은 아니다. 항원 결합 모이어티와 비-표적 사이에서 일정 정도의 비-특이적 결합이 발생할 수 있다. 일부 실시예에서, 항원 결합 모이어티는 항원 결합 모이어티와 항원 표적 사이의 결합이 항원 결합 모이어티와 비-표적의 결합과 비교하여 2배 초과, 5배 초과, 10배 초과, 또는 100배 초과인 경우 항원 표적에 선택적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 결합 친화도가 약 10^{-5} M 미만, 약 10^{-6} M 미만, 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-8} M 미만, 또는 약 10^{-9} M 미만인 경우 항원 결합 모이어티는 항원에 선택적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 항원 결합 모이어티와 항원 표적의 에피토프 사이의 결합이 항원 결합 모이어티와 비-표적 또는 항원 표적의 또 다른 에피토프와의 결합과 비교하여 2배 초과, 5배 초과, 10배 초과, 또는 100배를 초과하는 경우, 항원 결합 모이어티는 항원 표적의 에피토프에 선택적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 결합 친화도가 약 10^{-5} M 미만, 약 10^{-6} M 미만, 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-8} M 미만, 또는 약 10^{-9} M 미만인 경우 항원 결합 모이어티는 항원

표적의 에피토프에 선택적으로 결합한다.

[0025] 일부 실시예에서, 항체 또는 이의 단편은 항원에 대한 결합을 위해 종종 교차-경쟁할 동일한 에피토프 또는 중첩 에피토프에 선택적으로 결합한다. 따라서, 일부 실시예에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 바와 같은 예시적인 항체 또는 이의 단편과 교차-경쟁하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 일부 실시예에서, "교차-경쟁하다", "경쟁", "교차-경쟁하는", 또는 "경쟁"은 항체 또는 이의 단편이 표적 상의 동일한 에피토프 또는 결합 부위에 대해 경쟁하는 것을 의미한다. 이러한 경쟁은 기준 항체 또는 이의 단편이 시험 항체 또는 이의 단편의 특이적 결합을 방지하거나 억제하고 그 역도 가능한 분석법에 의해 결정될 수 있다. 다수의 유형의 경쟁 결합 분석법을 사용하여, 시험 분자가 결합을 위해 기준 분자와 경쟁하는지 여부를 결정할 수 있다. 사용될 수 있는 분석법의 예는 고상 직접 또는 간접 방사성면역분석법(RIA, radioimmunoassay), 고상 직접 또는 간접 효소 면역분석법(EIA, enzyme immunoassay), 샌드위치 경쟁 분석법(예를 들어, Stahli 외 *Methods in Enzymology* (1983) 9:242-253 참조), 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA(예를 들어, Kirkland 외, *J. Immunol.* (1986) 137:3614-9 참조), 고상 직접 표지된 분석법, 고상 직접 표지된 샌드위치 분석법, Luminex(Jia 외 "A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies" *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91-98) 및 표면 플라즈몬 공명(Song 외 "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-42)을 포함한다. 일부 실시예에서, 경쟁 항체 또는 이의 단편이 과량으로 존재할 때, 이는 공통 항원에 대한 기준 항체 또는 이의 단편의 결합을 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 또는 75%만큼 억제할 것이다. 일부 경우에, 결합은 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상만큼 억제된다.

[0026] 항체는 4개의 폴리펩티드 사슬, 예를 들어, 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)의 면역글로불린 분자일 수 있다. 일부 실시예에서, 경쇄는 람다 경쇄이다. 일부 실시예에서, 경쇄는 카파 경쇄이다. 중쇄는 중쇄 가변 도메인 및 중쇄 불변 도메인을 포함할 수 있다. 중쇄 불변 도메인은, CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 일부 경우에 CH4 영역 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 경쇄는 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함할 수 있다. 경쇄 불변 도메인은 CL을 포함할 수 있다.

[0027] 중쇄의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄의 경쇄 가변 도메인은 일반적으로 프레임워크 영역(FR, framework region)으로 지칭되는, 더 보존된 영역과 함께 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭되는 가변성 영역으로 더 세분화될 수 있다. 일부 실시예에서, 이러한 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인은 아미노-말단에서 카르복실-말단까지 다음의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 프레임워크 영역을 각각 포함할 수 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, 이들 중 하나 이상은 본원에 기술된 바와 같이 조작될 수 있다. 중쇄의 CDR은 "CDRH1", "CDRH2", 및 "CDRH3"으로 각각 지정되고, 경쇄의 CDR은 "CDRL1", "CDRL2", 및 "CDRL3"으로 지정된다.

[0028] 항체에는 5가지 주요 부류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 및 이들 중 몇몇은 하위부류(이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2로 추가로 나누어질 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 α, δ, ε, γ, 및 μ로 각각 지칭된다.

[0029] 예시적인 단일 도메인 항체

[0030] 단일 도메인 항체는 상보적 결정 영역이 단일 도메인 폴리펩티드의 일부인 항체이다. 예는 중쇄 항체, 경쇄가 자연적으로 없는 항체, 종래의 4-쇄 항체로부터 유래된 단일 도메인 항체, 조작된 항체 및 항체로부터 유래된 것들 이외의 단일 도메인 스캐폴드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 단일 도메인 항체는 당 기술분야에 공지된 임의의 항체, 또는 임의의 향후 단일 도메인 항체일 수 있다. 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 염소, 토끼 및 소를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 본 개시내용의 일 측면에 따르면, 본원에서 사용되는 단일 도메인 항체는 경쇄가 없는 중쇄 항체로 알려진 자연적으로 발생하는 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체는, 예를 들어, PCT 공개 번호 WO 94/04678호에 개시되어 있다. 경쇄가 자연적으로 없는 중쇄 항체로부터 유래된 이러한 가변 도메인은 본원에서 "VHH" 또는 "Nanobody®"로 지칭된다. 이러한 VHH는 낙타과 종, 예를 들어 낙타, 단봉낙타(dromedary), 라마, 비큐나, 알파카 및 구아나코에서 생산된 항체로부터 유래될 수 있다. 낙타과 이외의 다른 종은 경쇄가 자연적으로 없는 중쇄 항체를 생산할 수 있으며; 이러한 VHH는 본 개시내용의 범위 내에 있다. 일부 실시예에서, 항체는 nanobody® 또는 "VHH"이고 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 하나 이상의 중쇄 불변 영역을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 가변 영역을 포함하고 경쇄 영역(경쇄 가변 영역 또는 경쇄 불변 영역)을 포함하지 않는다.

[0031] 낙타과 유래의 VHH 도메인의 아미노산 잔기는 Kabat 외, "Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH (Bethesda, MD), Publication No 91-3242 (1991)에 의해 주어진 VH 도메인에 대한 일반적인 번호매김에 따라 번호가 매겨지며; 또한 Riechmann 외, *J. Immunol. Methods* (1999) 231:25-38을 참조한다. 이러한 번호매김에 따르면, FR1은 위치 1 내지 30에서 아미노산 잔기를 포함하고, CDR1은 위치 31 내지 35에서 아미노산 잔기를 포함하고, FR2는 위치 36 내지 49에서 아미노산을 포함하고, CDR2는 위치 50 내지 65에서 아미노산 잔기를 포함하고, FR3은 위치 66 내지 94에서 아미노산 잔기를 포함하고, CDR3은 위치 95 내지 102에서 아미노산 잔기를 포함하고, FR4는 위치 103 내지 113에서 아미노산 잔기를 포함한다.

[0032] 그러나, (본 기술분야에서 VH 도메인 및 VHH 도메인에 대해 잘 알려진 바와 같이) CDR 각각의 아미노산 잔기의 총 수는 다양할 수 있고 Kabat 번호매김에 의해 표시된 아미노산 잔기의 총 수에 상응하지 않을 수 있음을(즉, Kabat 번호매김에 따른 하나 이상의 위치는 실제 서열에서 점유되지 않을 수 있거나, 실제 서열은 Kabat 번호매김에 의해 허용되는 수보다 더 많은 아미노산 잔기를 포함할 수 있음을) 주목해야 한다. 이는, 일반적으로, Kabat에 따른 번호매김이 실제 서열에서 아미노산 잔기의 실제 번호매김에 상응할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있음을 의미한다.

[0033] VH 도메인의 아미노산 잔기의 번호매김의 대안적인 방법이 당 기술분야에 공지되어 있으며, 이러한 방법은 VHH 도메인과 유사한 방식으로 적용될 수도 있다. 그러나, 본 개시내용, 청구범위 및 도면에서, 달리 명시되지 않는 한, 전술한 바와 같이 Kabat에 따르고 VHH 도메인에 적용되는 번호매김을 따를 것이다.

[0034] 일부 실시예에서, 아미노산 잔기의 위치 번호매김은 기준 서열에서의 상응하는 아미노산 잔기에 기초하여 지칭될 수 있다.

[0035] 본 개시내용은 본원에 기술된 다양한 중쇄를 포함할 수 있는 항체를 제공한다. 일부 실시예에서, 항체는 2개의 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 (동일한 아미노산 서열을 갖는) 동일한 중쇄 또는 (상이한 아미노산 서열을 갖는) 상이한 중쇄 중 2개일 수 있는, 2개의 중쇄를 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 표적 항원의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있는, 2개의 중쇄를 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 상이한 표적 항원의 에피토프에 결합할 수 있는 2개의 중쇄를 포함한다. 일부 실시예에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 중쇄, 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 중쇄 프레임워크 도메인, 및/또는 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 중쇄 CDR 서열을 포함하는 항체를 포함한다.

[0036] 일부 실시예에서, 본원에 개시된 항체는 동종이량체(homodimeric) 모노클로날 항체이다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 항체는 이종이량체(heterodimeric) 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는, 예를 들어, 전형적인 항체 또는 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, Nanobody®(단일 도메인 항체), 맥시바디, 탠다브, DVD, BiTe, scFv, TandAb scFv, Fab, Fab2, Fab3, F(ab')2 등, 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는 낙타과 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는 라마 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 단일 도메인 항체 또는 "VHH"로도 지칭되는, Nanobody®이다. 일부 실시예에서, 항체는 1개, 2개, 또는 3개의 면역글로불린 불변 도메인(예를 들어, CH1, CH2, CH3, 및 CH4로부터 선택됨)을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 1개, 2개, 또는 3개의 IgG1 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 CH 융합체를 포함한다. 본 개시내용의 항체에 사용하기 위한 예시적인 IgG1 CH2 및 CH3 도메인이 아래에 제공된다:
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 89)

[0037] 본 개시내용은 무엇보다도 항-CD33 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1 내지 88로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나 내에 포함된 CDR 서열을 포함한다.

일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 또는 81 중 어느 하나 내에 포함된 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 적어도 하나의 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100%

동일한 적어도 하나의 CDR을 포함한다.

[0038] 본 개시내용은 무엇보다도 VHH를 포함하는 항-CD33 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1 내지 88로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VHH를 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나 내에 포함된 CDR 서열을 포함하는 VHH를 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 또는 81 중 어느 하나 내에 포함된 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 VHH를 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 적어도 하나의 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)을 포함하는 VHH를 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1 내지 88 중 어느 하나에 도시된 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)과 적어도 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일한 적어도 하나의 CDR을 포함하는 VHH를 포함한다.

[0039] 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 낙타과 항체이거나, 낙타과 항체로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 본 개시내용은 서열번호 1 내지 88로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁하는 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0040] 일부 실시예에서, 본 개시내용은 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 비해 1 내지 24개(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 10 또는 그 이상)의 부가, 결실, 또는 치환을 포함하는, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항-CD33는 서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 및 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 예를 들어 항체 또는 단편은 CD33에 선택적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 본 개시내용은 서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 및 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 항-CD33 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하고, 예를 들어, 항체 또는 단편은 CD33에 선택적으로 결합한다.

[0041] 본 개시내용은 무엇보다도 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조 방법을 제공한다. 항체의 제조 방법은 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256: 495에 의해 기술된 표준 체세포 혼성화 기술과 같은, 다양한 공지된 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다른 기술은 또한, 예를 들어, 인간 항체 유전자의 라이브러리를 사용하는 B 림프구 또는 파지 디스플레이 기술의 바이러스 또는 종양발생성 형질전환이 사용될 수 있다.

[0042] 일부 실시예에서, 인간 항체는 인간 대상체로부터 수득된 인간 B 세포로부터 중쇄 및 경쇄 유전자를 직접 클로닝함으로써 수득된다. B 세포를 말초 혈액으로부터 분리하고(예를 들어, 유세포 계측법, 예를 들어, FACS에 의해), B 세포 마커에 대해 염색하고, 항원 결합에 대해 평가한다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역(또는 전체(entire) 중쇄 및 경쇄)을 암호화하는 RNA가 추출되고, DNA로 역전사되어, 항체 유전자가 (예를 들어, PCR에 의해) 증폭되고 서열분석된다. 그런 다음, 공지된 항체 서열을 사용하여 공지된 표적 항원에 대한 재조합 인간 항체를 발현할 수 있다. 일부 경우에, 인간 항체는 항원 도전에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 온전한 인간 항체 또는 온전한 항체를 생산하도록 변형된 유전자이식(transgenic) 동물에 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 이러한 동물은 내인성 면역글로불린 유전자좌를 치환하거나, 동물의 염색체에 무작위로 염색체 외로 존재하거나 통합된 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 일반적으로 함유한다. 이러한 유전자이식 마우스에서, 내인성 면역글로불린 유전자좌는 일반적으로 불활성화되었다. 이러한 동물에 의해 생성된 온전한 항체로부터의 인간 가변 영역은, 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합됨으로써 추가로 변형될 수 있다.

[0043] 일부 경우에, 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시예에서, 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위한 동물 시스템은 뮤린 시스템이다. 면역화 프로토콜 및 면역화된 비장 세포를 단리하고 융합하기 위한 기술을 포함하여, 마우스에서의 하이브리도마 생산이 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기술되었다.

[0044] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다. 그런 다음, 이러한 가변 도메인 서열은 원하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다.

[0045] 일부 실시예에서, 본 개시내용은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 본원에 기술된 항-CD33 항체 중 어느 하나를 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 이러한 방법은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현에 적합한 조건 하에서 서열번호 1 내지 88로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 이러한 방법은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 수집, 단리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함한다.

[0046] ***융합 단백질 및 접합체***

[0047] 일부 실시예에서, 본 개시내용은 (i) 본원에 기술된(예를 들어, 본원에 기술된 하나 이상의 CDR을 포함하는) 하나 이상의 단일 도메인 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 (ii) 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 일부 실시예에서, 본 개시내용은 (i) 본원에 기술된(예를 들어, 본원에 기술된 하나 이상의 CDR을 포함하는) 하나 이상의 단일 도메인 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 (ii) 하나 이상의 추가 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 예를 들어, 융합 단백질은 본원에 기술된 하나 이상의 단일 도메인 항체 및 하나 이상의 (*예를 들어*, 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의) 불변 영역 또는 Fc 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 하나 이상의 단일 도메인 항체, 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들어, 본원에 기술된 하나 이상의 CDR)은, 예를 들어, PCT 출원 WO2017/075537호, WO2017/075533호, WO2018156802호, 및 WO2018156791호에 기술된 바와 같은 항원(예를 들어, 세포 치료제, 예를 들어, CAR-T 세포 또는 항원 약물 접합체에 대한 항원 표적)에 비-공유적으로 또는 공유적으로 접합, 예를 들어 융합될 수 있다.

[0048] 일부 실시예에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 VHH 및 하나 이상의 추가 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 일부 실시예에서, 추가 폴리펩티드는 추가 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 추가 항체는, 예를 들어, 온전한 IgG, IgE 및 IgM, 이중특이적 또는 다중특이적 항체(예를 들어, Zybodies®, 등), 단일 사슬 Fv, 폴리펩티드-Fc 융합체, Fab, 낙타과 항체, 마스킹된 항체(예를 들어, Probodies®), 작은 조절 면역약물(Small Modular ImmunoPharmaceuticals)("SMIPsTM"), 단일 사슬 또는 탠덤 디아바디(TandAb®), VHH(본 개시내용에 포함된 것들을 비제한적으로 포함함), Anticalins®, Nanobodies®, 미니바디, BiTE®, 안키린 반복 단백질 또는 DARPINs®, Avimers®, DART, TCR-유사 항체, Adnectins®, Affilins®, 트랜스-bodies®, Affibodies®, TrimerX®, MicroProteins, Fynomers®, 및 Centyrins®를 포함한다.

[0049] 일부 실시예에서, 하나 이상의 추가 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인은 제2 항원 결합-도메인, 예를 들어, 동일한 표적 항원(즉, CD33)에 결합하는 제2 항원-결합 도메인, 예를 들어 본원에 기술된 항-CD33 항체, 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 추가 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인은 제2 항원-결합 도메인, 예를 들어 상이한 표적 항원(*예를 들어*, CD33의 에피토프가 아님)에 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 포함한다.

[0050] 일부 실시예에서, 본 개시의 항체는 항체 약물 접합체(ADC, antibody drug conjugate)로서 약물(*예를 들어*, 독소와 같은 세포독성제)에 (예를 들어, 이황화 또는 비-절단성 티오에테르 링커에 의해) 공유적으로 부착될수 있다. 항체가 공유적으로 결합되는 약물은 항체에 접합되지 않을 때 세포독성 또는 세포증식억제 효과를 가질 수 있다. ADC는 유효 용량의 세포독성제를 세포(예를 들어, 종양 조직)에 선택적으로 전달하는데 사용될 수 있다. ADC는 약물 및/또는 항체가 이의 비접합 형태로 투여되는 경우에 비해 약물 및/또는 항체의 생체이용률을 개선할 수 있다.

[0051] 다양한 링커 유형 및 전략이 당 기술분야에 공지되어 있고, 이들 중 임의의 것 또는 모두가 본 개시내용의 항체 또는 ADC와 함께 사용하기 위해 고려된다. 일부 실시예에서, 링커는 생분해성이고, 예를 들어, 내인성 프로테아제에 의해 절단될 수 있다(예를 들어, 표적 조직 및/또는 세포에 존재함). 일부 실시예에서, 링커는 프로테아제 절단가능한 부위를 포함한다. 일부 실시예에서, 링커는 pH 민감성 부위, 예를 들어, 산성 pH에 민감한 부위, 예를 들어, 산성 조건 하에서 가수분해되는 부위를 포함한다. 일부 실시예에서, 링커는 생리학적 조건 하에서 안정하며, 예를 들어, 약물이 방출되기 전에 항체가 표적 조직에 약물을 표적화하도록 충분히 안정하다. 일부 실시예에서, 링커는 이황화 결합, 예를 들어, 글루타티온-민감성 이황화 결합을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체에 접합된 약물은 링커의 절단 후에만 활성이다. 일부 실시예에서, 항체에 접합된 약물은 항체의 단백질분해성 소화 후에만 (예를 들어, 표적 세포의 리소좀에서) 활성이다. 일부 실시예에서, 링커는 비-절단가능한 이종이기능성(heterobifunctional) 티오오에터 링커, 예를 들어 N-히드록시숙신이미드 에스테르(숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트 또는 SMCC를 포함하는, 예를 들어 말레이미드 링커이다.

[0052] 본 개시내용의 ADC와 상용성인 다양한 약물이 당 기술분야에 공지되어 있고, 이들 중 임의의 것 또는 모두가 본

개시내용의 항체와 함께 사용하기 위해 고려된다.

[0053] 또한, 본 개시내용의 범주 내에는 본원에 기술된 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 임의의 것을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. CAR은 T-세포신호 전달 도메인에 연결된 하나 이상의 항체(예를 들어, 단일 사슬 가변 단편(scFv, single chain variable fragment))의 항원-결합 도메인을 함유하는 인공적으로 작제된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩티드이다. CAR의 특성은 모노클로날 항체의 항원-결합 특성을 악용하여, T-세포 특이성 및 반응성을 비-MHC-제한 방식으로 선택된 표적에 대해 재유도하는 능력을 포함한다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR을 발현하는 T 세포에 항원 처리와 무관한 항원을 인식하는 능력을 부여하여, 종양 탈출의 주요 메커니즘을 우회한다. 또한, T-세포에서 발현될 때, CAR은 내인성 T 세포 수용체(TCR, T 세포 수용체) 알파 및 베타 사슬과 이량체화되지 않는다. 본원에 사용된 "항원(성) 특이성" 및 "항원-특이적 반응 유도"라는 구절은 CAR이 항원에 특이적으로 결합할 수 있고 면역학적으로 항원을 인식하여, CAR이 항원에 결합함으로써 면역 반응을 유도할 수 있음을 의미한다.

[0054] 항체의 항원-결합 도메인을 함유하는 종래의 CAR 중에서, 3세대의 CAR이 있다. "1세대" CAR은 일반적으로 세포질/세포 내 신호전달 도메인에 융합되는, 막관통 도메인에 융합되는, 세포외 항원-결합 도메인(예를 들어 scFv)으로 구성된다. 1세대 CAR은 새로운 항원 인식을 제공할 수 있고, HLA-매개 항원 제시와는 무관하게, 단일 융합 분자에서 CD3ζ 사슬 신호전달 도메인을 통해 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다의 활성화를 야기할 수 있다. "2세대" CAR은 다양한 공동 자극 신호전달 분자(예를 들어, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD27, CD40/My88 및 NKGD2)로부터의 세포 내 신호전달 도메인을 CAR의 세포질 꼬리에 첨가하여 T 세포에 추가 신호를 제공한다. 2세대 CAR은 공동-자극(예를 들어, CD28 또는 4-1BB) 및 활성화(CD3ζ) 둘 다를 제공하는 것들을 포함한다. "3세대" CAR은 다수의 공동-자극 도메인(예를 들어, CD28 및 4-1BB) 및 활성화를 제공하는 신호전달 도메인(*예를 들어*, CD3ζ)을 제공하는 것들을 포함한다.

[0055] 본원에 기술된 CAR은 항-CD33 결합 단편, 막관통 도메인, 및 신호전달 도메인을 함유하는 CAR의 세포외 부분을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 링커 영역, 힌지 영역, 및 공동-자극 신호전달 도메인 중 하나 이상을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 신호 펩티드/신호 서열을 추가로 포함한다.

[0056] CAR은 본원에 기술된 특정 아미노산 서열 또는 서열들로 이루어지거나 이로 필수적으로 이루어질 수 있어서, 다른 성분, 예를 들어, 다른 아미노산은 기능적 변이체의 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않는다.

[0057] 본 개시내용의 CAR(기능성 부분 및 기능성 변이체 포함)은 임의의 길이일 수 있으며, 즉, CAR(또는 이의 기능성 부분 또는 기능성 변이체)이 이들의 생물학적 활성, 예를 들어, 표적 항원(*예를 들어*, CD33)에 특이적으로 결합하는 능력, 포유류에서 질환에 걸린 세포를 검출하거나, 포유류에서 질환을 치료하거나 예방하는 능력 등을 보유하는 한, 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR은 약 50 내지 약 5000개 아미노산 길이, 예컨대 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 이상의 아미노산 길이일 수 있다.

[0058] 일부 실시예에서, CAR 작제물(본 발명의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 하나 이상의 자연 발생 아미노산을 대신하여 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 당 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 아미노사이클로헥산 카르복실산, 노르류신, a-아미노 n-데카노산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-히드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4- 니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카르복시페닐알라닌, b-페닐세린 b-히드록시페닐알라닌, 페닐글리신, a-나프틸알라닌, 사이클로헥실알라닌, 사이클로헥실글리신, 인돌린-2-카르복실산, 1,2, 3, 4-테트라히드로이소퀴놀린-3 -카르복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N' -벤질-N' -메틸-리신, N',N'-디벤질-리신, 6-히드록시리신, 오르니틴, a-아미노사이클로펜탄 카르복실산, a-아미노사이클로헥산 카르복실산, a-아미노사이클로펩탄 카르복실산, a-(2-아미노-2-노르보르난)-카르복실산, a,g-디아미노부티르산, a,b-디아미노프로피온산, 호모페닐알라닌, 및 a-tert-부틸글리신을 포함한다.

[0059] 일부 실시예에서, CAR 작제물(기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 당화되거나, 아미드화되거나, 카르복실화되거나, 인산화되거나, 에스테르화되거나, N-아실화되거나, 예를 들어, 이황화 브릿지를 통해 환화되거나, 산부가 염으로 전환되고/되거나, 선택적으로 이량체화되거나, 중합되거나, 접합될 수 있다.

[0060] 일부 실시예에서, CAR 작제물(기능적 부분 및 이의 기능적 변이체 포함)은 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 실시예에서, CAR 작제물은 신규한 합성을 포함하여, 폴리펩티드 또는 단백질을 제조하는 임의의 적절한 방법에 의해 제조될 수 있다. CAR 작제물은 표준 재조합 방법을 사용하여 본원에 기술된 핵산을

사용하여 재조합적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, Green 외, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2012을 참조한다. 또한, 본원에 기술된 CAR 작제물 중 일부의 부분(기능적 부분 및 이의 기능적 변이체를 포함)은 식물, 박테리아, 곤충, 포유류, 예를 들어, 랫트, 인간 등과 같은 공급원으로부터 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 단리 및 정제 방법은 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 대안적으로, 본원에 기술된 CAR 작제물(기능적 부분 및 이의 기능적 변이체 포함)은 Synpep(캘리포니아주 더블린 소재), Peptide Technologies Corp.(메릴랜드주 게이더스버그 소재), 및 Multiple Peptide Systems(캘리포니아주 샌디에고 소재)와 같은 회사에 의해 상업적으로 합성될 수 있다. 이와 관련하여, CAR 작제물은 합성, 재조합, 단리 및/또는 정제될 수 있다.

[0061] 본원에 기술된 CAR 작제물 중 어느 하나를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산이 본원에 추가로 제공된다(기능적 부분 및 이의 기능적 변이체 포함). 본원에 기술된 핵산은 리더 서열(*예를 들어*, 신호 펩티드), 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 링커 영역, 공동자극 신호전달 도메인, 및/또는 본원에 기술된 세포 내 T 세포 신호전달 도메인 중 임의의 것을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0062] 일부 측면에서, 본원에 기술된 임의의 항원-결합 도메인은 세포에서의 발현을 위해 CAR의 다른 도메인, 예컨대 막관통 도메인 또는 세포 내 도메인에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시예에서, 항원-결합 도메인을 암호화하는 핵산은 막관통 도메인을 암호화하는 핵산 및 세포 내 도메인을 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결된다.

[0063] 일부 실시예에서, 항-CD33 항원 결합 도메인을 암호화하는 핵산은 링커 영역을 암호화하는 핵산, 막관통 도메인을 암호화하는 핵산, 및/또는 세포 내 도메인(*예를 들어*, 공동자극 신호전달 도메인, 신호전달 도메인)을 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, CAR은 본원에 기술된(예를 들어, 본원에 기술된 하나 이상의 CDR을 포함하는) 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 임의의 것을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 서열번호 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81 중 어느 하나에 제공된, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 임의의 것을 포함한다.

[0064] 일부 실시예에서, CAR은 링커 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 항원-결합 도메인의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은 링커에 의해 서로 결합될 수 있다. 일부 실시예에서, 항원-결합 도메인은 링커 영역과 함께 막관통 도메인, 힌지 및/또는 세포 내 도메인과 같은 다른 도메인에 결합될 수 있다. 링커는 임의의 적절한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 링커는 약 1 내지 약 100개, 약 3 내지 약 20개, 약 5 내지 약 30개, 약 5 내지 약 18개, 또는 약 3 내지 약 8개의 아미노산 길이이고, 서열에서 글리신 및/또는 세린 잔기로 이루어져 있다. 따라서, Gly/Ser 링커는 글리신 및/또는 세린 잔기로 이루어질 수 있다. 바람직하게는, Gly/Ser 링커는 GGGGS(서열번호 100)의 아미노산 서열을 포함하고, 다수의 서열번호 100이 링커 내에 존재할 수 있다. 임의의 링커 서열은 항원-결합 도메인과 CAR의 임의의 다른 도메인, 예컨대 막관통 도메인 사이의 스페이서로서 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 영역 링커는 ([G]x[S]y)z (서열번호 111)이고, 예를 들어, 여기서 x는 1 내지 10일 수 있고, y는 1 내지 3일 수 있고, z는 1 내지 5일 수 있다. 일부 실시예에서, 링커 영역은 아미노산 서열 GGGGSGGGGS(서열번호 101)를 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 영역은 아미노산 서열 아미노산 서열 GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 102)를 포함한다.

[0065] 일부 실시예에서, 항원-결합 도메인은 본원에 기술된 것과 같은 하나 이상의 리더 서열(신호 펩티드, 신호 서열)을 포함한다. 일부 실시예에서, 리더 서열은 CAR 작제물 내의 CAR의 아미노 말단에 위치될 수 있다. 리더 서열은 임의의 적절한 리더 서열을 포함할 수 있고, 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 CAR은 본원에 기술된 것과 같은 임의의 리더 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 리더 서열은 세포의 표면에서 방출된 CAR의 발현을 용이하게 할 수 있지만, 발현된 CAR에서의 리더 서열의 존재는 CAR이 기능하기 위해 필요하지 않다. 일부 실시예에서, 세포 표면에서 CAR이 발현될 때, 리더 서열은 절단될 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, 방출된 CAR(*예를 들어*, 표면 발현됨)은 리더 서열이 결여되어 있다. 일부 실시예에서, CAR 작제물 내의 CAR은 리더 서열이 결여되어 있다.

[0066] *힌지*

[0067] 일부 실시예에서, CAR은 세포 외 항원-결합 도메인을 막관통 도메인과 같은 다른 도메인에 연결하는 힌지/스페이서 영역을 포함한다. 힌지/스페이서 영역은 항원-결합 도메인이 표적 항원 인식을 용이하게 하기 위해 상이한 방향으로 배향될 수 있도록 충분히 가요성일 수 있다. 일부 실시예에서, 힌지 도메인은 CD8α 또는 CD28의 힌지 도메인의 일부, 예를 들어, CD8α 또는 CD28의 힌지 도메인의 적어도 15개(예를 들어, 20, 25, 30, 35, 또는 40개)의 연속 아미노산을 함유하는 단편이다.

[0068] 일부 실시예에서, CAR은 CD8, CD28, 또는 IgG4로부터의 힌지 도메인과 같은 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 힌지 도메인은 CD8(예를 들어, CD8a) 힌지 도메인이다. 일부 실시예에서, CD8 힌지 도메인은 인간이다(*예를 들어*, 인간 단백질 서열로부터 수득/유래됨). 일부 실시예에서, CD8 힌지 도메인은 서열번호 103을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 필수적으로 이루어진다.

[0069] CD8 힌지 영역

[0070] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD [서열번호 103]

[0071] 일부 실시예에서, 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인이다. 일부 실시예에서, CD28 힌지 도메인은 인간이다(*예를 들어*, 인간 단백질 서열로부터 수득/유래됨). 일부 실시예에서, CD28 힌지 도메인은 서열번호 104를 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 필수적으로 이루어진다.

[0072] CD28 힌지 영역

[0073] AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP [서열번호 104]

[0074] IgG, IgA, IgM, IgE, 또는 IgD 항체와 같은 항체의 힌지 도메인은 또한 본원에 기술된 키메라 수용체에 사용하기에 적합하다. 일부 실시예에서, 힌지 도메인은 항체의 불변 도메인 CH1 및 CH2와 결합하는 힌지 도메인이다. 일부 실시예에서, 힌지 도메인은 항체이고, 항체의 힌지 도메인 및 항체의 하나 이상의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인 및 항체의 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인 및 항체의 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE, 또는 IgD 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시예에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체이다. 일부 실시예에서, 힌지 영역은 IgG1 항체의 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 힌지 영역은 IgG1 항체의 힌지 영역 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인이다.

[0075] 또한, 본 개시내용의 범주 내에는 비-자연 발생 펩티드인 힌지 도메인을 포함하는 CAR이 있다. 일부 실시예에서, Fc 수용체의 세포 외 리간드-결합 도메인의 C-말단과 막관통 도메인의 N-말단 사이의 힌지 도메인은 펩티드 링커, 예컨대 (GlyxSer)n (서열번호 105) 링커이며, 여기서 x와 n은 독립적으로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 그 이상을 포함하는 3 내지 12의 정수일 수 있다.

[0076] 본원에 기술된 키메라 수용체의 힌지 도메인에 사용될 수 있는 추가 펩티드 링커는 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Wriggers 외 *Current Trends in Peptide Science* (2005) 80(6): 736-74 및 PCT 공개 WO 2012/088461호를 참조한다.

[0077] 일부 실시예에서, 현재 개시된 CAR의 힌지/스페이서 영역은 본원에 기술된 CD28 폴리펩티드의 천연 또는 변형된 힌지 영역을 포함한다. 소정의 실시예에서, 현재 개시된 CAR 작제물의 힌지/스페이서 영역은 본원에 기술된 CD8 α 폴리펩티드의 천연 또는 변형된 힌지 영역을 포함한다. 소정의 실시예에서, 현재 개시된 CAR 작제물의 힌지/스페이서 영역은 본원에 기술된 IgG4 폴리펩티드의 천연 또는 변형된 힌지 영역을 포함한다.

[0078] *막관통 도메인*

[0079] 막관통 도메인과 관련하여, CAR은 CAR의 항원 결합 도메인을 CAR의 세포 내 영역에 연결하는 막관통 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 일부 실시예에서, 막관통 도메인은 CAR 내의 도메인 중 하나 이상과 자연적으로 결합된다. 일부 경우에, 막관통 도메인은, 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 이러한 도메인의 결합을 피하기 위해 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형될 수 있다.

[0080] 막관통 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 특이적으로 사용되는 막관통 영역은 T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD8a, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, Toll-유사 수용체 1(TLR1, Toll-like 수용체 1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, 및 TLR9의 알파, 베타 또는 제타 사슬의 막관통 영역으로부터 적어도 유도될 수 있다(즉, 포함할 수 있다).

[0081] 일부 실시예에서, 막관통 도메인은 합성 도메인일 수 있으며, 이 경우, 이는 주로 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함할 것이다. 바람직하게는, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체는 합성 막관통 도메인의 각 말단

에서 발견될 것이다.

[0082] 일부 실시예에서, 막관통 도메인은 CD8(예를 들어, CD8a) 막관통 도메인이다. 일부 실시예에서, CD8 막관통 도메인은 인간이다(예를 들어, 인간 단백질 서열로부터 수득/유래됨). 일부 실시예에서, CD8 막관통 도메인은 서열번호 106을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 필수적으로 이루어진다.

[0083] CD8 막관통 영역

[0084] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC [서열번호 106]

[0085] 일부 실시예에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이다. 일부 실시예에서, CD28 막관통 도메인은 인간이다(예를 들어, 인간 단백질 서열로부터 수득/유래됨). 일부 실시예에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 107을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 필수적으로 이루어진다.

[0086] CD28 막관통 도메인

[0087] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [서열번호 107]

[0088] *세포 내 신호전달 영역*

[0089] 일부 실시예에서, CAR 작제물은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하며, 이는 하나 이상의 신호전달 도메인 및 공동자극 도메인으로 구성될 수 있다. CAR의 세포 내 신호전달 도메인은 CAR이 발현되는 세포의 활성화에 관여한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 CAR 작제물의 세포 내 신호전달 도메인은 T 림프구 또는 NK 세포의 활성화에 관여한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 CAR 작제물의 신호전달 도메인은 신호 활성화 및/또는 형질도입에 관여하는 도메인을 포함한다.

[0090] 본원에 기술된 CAR 작제물에 사용하기 위한 세포 내 신호전달 도메인의 예는, 표면 수용체의 세포질 부분, 공동-자극 분자, 및 세포(*예를 들어*, 면역 세포(예를 들어, T 림프구), NK 세포)에서 신호 전달을 개시하기 위해 함께 작용하는 임의의 분자, 및, 이들 요소의 임의의 유도체 또는 변이체, 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0091] 본원에 기술된 CAR의 세포 내 신호전달 도메인에 사용될 수 있는 신호전달 도메인의 예는, 비제한적으로, TCR, CD3 제타(CD3ζ), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD86, 공통 FcR 감마, FcR 베타(Fc 엡실론 Rib), CD79a, CD79b, Fc감마 RIIa, DAP10, DAP 12, T 세포 수용체(TCR), CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83에 특이적으로 결합하는 리간드, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM(LIGHTR), SLAMF7, NKp80(KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD 1 id, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 톨-유사 수용체 1(TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 본원에 기술된 기타 공동-자극 분자, 이의 임의의 유도체, 변이체, 또는 단편, 동일한 기능적 능력을 갖는 공동-자극 분자의 임의의 합성 서열, 및 이들의 임의의 조합을 포함하여, 비제한적으로 하나 이상의 분자 또는 수용체로부터의 단편 또는 도메인을 포함한다.

[0092] 임의의 세포질 신호전달 도메인은 본원에 기술된 CAR에 사용될 수 있다. 일반적으로, 세포질 신호전달 도메인은 세포 외 리간드-결합 도메인과 이의 리간드와의 상호작용과 같은 신호를 전달하여 세포의 효과기 기능(예를 들어, 세포독성)을 유도하는 것과 같은 세포 반응을 자극한다.

[0093] 당 기술분야의 숙련자에게 명백한 바와 같이, T 세포 활성화에 관여하는 인자는 세포질 신호전달 도메인의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif)의 인산화이다. 당 기술분야에 공지된 임의의 ITAM-함유 도메인이 본원에 기술된 키메라 수용체를 구성하기 위해 사용될 수 있고, 세포질 신호전달 도메인의 일부로서 포함될 수 있다. 일반적으로, ITAM 모티프는 6 내지 8개의 아미노산에 의해 분리된 아미노산 서열 YxxL/I의 2개의 반복을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 x는 독립적으로 임의의 아미노산이며, 보존된 모티프 YxxL/Ix(6-8)YxxL/I를 생성한다. 일부 실시예에서, 세포질 신호전달 도메인은 CD3ζ로부터 유래한다.

[0094] CD3ζ는 TCR과 결합하여 신호를 생성하고 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. 일부 실시예에서, CD3ζ 세포 내 T 세포 신호전달 서열은 인간이다(*예를 들어*, 인간 단백질로부터 수득되거나 유래됨). 일부 실시예에서, CD3ζ 세포 내 T 세포 신호전달 서열은 서열번호 108 또는 109의 아미노산 서열, 또는 서열번호 108 또는 109의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 필수적으로 이루어진다. 일부 실시예에서, 세포 내 T 세포 신호전달 도메인은 하나 이상의 돌연변이되고/되거나 결실된 ITAM을 함유하는 CD3ζ을 포함한다.

[0095] CD3 ζ 신호전달 도메인(변이체 A)

[0096] RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR[서열번호 108]

[0097] CD3 ζ 신호전달 도메인(변이체 B)

[0098] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR [서열번호 109]

[0099] 특정 비제한적인 실시예에서, CAR의 세포 내 신호전달 도메인은 적어도 하나의(*예를 들어*, 1, 2, 3 또는 그 이상)의 공동-자극 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 공동-자극 신호전달 도메인은 최적의 림프구 활성화를 제공할 수 있는 적어도 하나의 공동-자극 분자를 포함한다. 일반적으로, 많은 면역 세포는, 항원-특이적 신호의 자극에 더하여, 세포 증식, 분화 및 생존을 촉진하고, 세포의 효과기 기능을 활성화하기 위해, 공동-자극을 필요로 한다. 숙주 세포(예를 들어, 면역 세포)에서 공동-자극 신호전달 도메인의 활성화는 사이토카인, 식세포 특성, 증식, 분화, 생존 및/또는 세포독성의 생산 및 분비를 증가시키거나 감소시키도록 세포를 유도할 수 있다. 임의의 공동-자극 단백질의 공동-자극 신호전달 도메인은 본원에 기술된 키메라 수용체에 사용하기에 적합할 수 있다. 공동-자극 신호전달 도메인의 유형은 CAR이 발현될 세포의 유형(예를 들어, 일차 T 세포, T 세포주, NK 세포주) 및 원하는 면역 효과기 기능(예를 들어, 세포독성)과 같은 인자에 기초하여 선택될 수 있다.

[0100] 이러한 공동-자극 신호전달 도메인의 예는, 임의의 조합으로 상기 단락에 열거된 임의의 신호전달 도메인과 함께, 비제한적으로 to 4-1BB, CD28, ICOS, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, CD116 수용체 베타 사슬, CSF1-R, LRP1/CD91, SR-A1, SR-A2, MARCO, SR-CL1, SR-CL2, SR-C, SR-E, CR1, CR3, CR4, 덱틴 1, DEC-205, DC- SIGN, CD14, CD36, LOX-1, CD11b를 포함하여, 하나 이상의 분자 또는 수용체로부터의 단편 또는 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR의 세포 내 신호전달 도메인은 하나 이상의 공동-자극 신호전달 분자의 임의의 부분, 예를 들어 동일한 기능적 능력을 갖는 이의 임의의 합성 서열, 및 이들의 임의의 조합을 비롯하여, CD3, Fc 엡실론 RI 감마 사슬, 이들의 임의의 유도체 또는 변이체로부터의 적어도 하나의 신호전달 도메인을 포함한다.

[0101] 일부 실시예에서, 하나 이상의 공동-자극 신호 전달 도메인(*예를 들어*, 1, 2, 3 또는 그 이상)은 CD3ζ 세포 내 T 세포 신호전달 서열과 함께 CAR 작제물에 포함된다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 공동-자극 신호 전달 도메인은 CD137(4-1BB) 및 CD28, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, CAR은 4-1BB(CD137) 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 CD28 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인 및 CD28 공동자극 신호전달 도메인 둘 다를 포함한다.

[0102] CD137로도 알려진 4-1BB는 T 세포에 강력한 공동자극 신호를 전달하여 T 림프구의 분화를 촉진하고 장기 생존을 강화한다. 일부 실시예에서, 4-1BB 세포 내 신호전달 서열은 인간이다(예를 들어, 인간 단백질 서열로부터 수득/유래됨). 일부 실시예에서, 4-1BB 세포 내 T 세포 신호전달 서열은 서열번호 110의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 필수적으로 이루어진다. 일부 실시예에서, 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인은 서열번호 110의 아미노산 서열, 또는 서열번호 110의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 필수적으로 이루어진다.

[0103] 4-1BB 공동자극 신호전달 도메인

[0104] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL [서열번호 110]

[0105] 일부 적절한 공동자극 도메인이 본원에 제공되며, 다른 적절한 공동자극 도메인 및 공동자극 도메인 서열은 당

기술분야의 지식을 고려하여 본 개시내용에 기초하여 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 적절한 공동자극 도메인은, 예를 들어, Weinkove 외, Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations, Clin Transl Immunology. 2019; 8(5): e1049에 기술된 것들을 포함하며, 이의 전체 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0106] CAR의 항원-결합 도메인과 막관통 도메인 사이, 또는 세포 내 신호전달 도메인과 CAR의 막관통 도메인 사이에서, 스페이서 도메인이 통합될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "스페이서 도메인"은 일반적으로 막관통 도메인을 항원 결합 도메인 또는 폴리펩티드 사슬 내의 세포 내 도메인에 연결시키는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩티드를 의미한다. 일부 실시예에서, 스페이서 도메인은 최대 300개 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100개 아미노산, 가장 바람직하게는 25 내지 50개 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2개 내지 10개의 아미노산의 길이는 막관통 도메인과 CAR의 세포 내 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다. 링커의 예는 글리신-세린 이중선을 포함한다.

[0107] *신호 펩티드*

[0108] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 임의의 CAR은 신호 펩티드(신호 서열)를 추가로 포함할 수 있다. 일반적으로, 신호 펩티드는 폴리펩티드를 세포 내 부위로 표적화하는 짧은 아미노산 서열이다. 일부 실시예에서, 신호 펩티드는 CAR을 세포의 분비 경로로 유도하고, CAR을 세포 표면에서 지질 이중층 내로 통합하고 고정시킬 수 있게 한다. 본원에 기술된 키메라 수용체에 사용하기에 적합한, 자연 발생 단백질 또는 합성, 비-자연 발생 신호 서열의 신호 서열을 포함하는 신호 서열은 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다.

[0109] 본원에 기술된 CAR은, 예를 들어, 자가-절단 펩티드를 갖는 작제물로 제조될 수 있으므로, 항-CD33 CAR 성분을 함유하는 CAR 작제물은 비시스트론, 트리시스트론 등이다.

[0110] 다양한 CAR 작제물 및 CAR 작제물의 수많은 요소(예를 들어, 다양한 CD33 결합 도메인, 신호 펩티드, 링커, 힌지 서열, 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 신호전달 도메인)가 본원에 개시되며, 당 기술분야의 숙련자는 당 기술분야에서의 지식을 고려하여 본 개시내용에 기초하여 이들 요소 및 당 기술분야에 알려진 추가의 적절한 요소의 서열을 확인할 수 있다. 예를 들어, CD33 결합 도메인, 신호 펩티드, 링커, 힌지 서열, 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 및 신호전달 도메인에 대한 예시적인 CAR 요소 서열은, 국제특허공개 WO/2019/178382호로 공개된 국제특허출원 PCT/US2019/022309호에, 예를 들어, 명세서 전반 및 표 1 내지 6에 개시되어 있으며, 이의 전체 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0111] CAR5

[0112] 본원에 기술된 하나 이상의 단일 도메인 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 예시적인 CAR 작제물은 서열번호 25에 포함된 CD33 결합 도메인, CD8a 막관통 도메인, CD8a 힌지 도메인, CD137(4-1BB) 공동-자극 도메인, 및 CD3ζ 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0113] 일부 실시예에서, CAR은 서열번호 90에 도시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 90에 도시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0114] MELGLSWVVLAALLQGVQAQVKLEESGGGSVQAGESLRLSCTASGITFRDYDIDWYRQAPGKEREWLATITPSGTTHYPDSVKGRATISRDSAKNTVYLQMNSLKPEDTARYECNTLAYWGSGTQVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 90]

[0115] CAR 6

[0116] 본원에 기술된 하나 이상의 단일 도메인 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 예시적인 CAR 작제물은 서열번호 73에 포함된 CD33 결합 도메인, CD8a 막관통 도메인, CD8a 힌지 도메인, CD137(4-1BB) 공동-자극 도메인, 및 CD3ζ 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0117] 일부 실시예에서, CAR은 서열번호 91에 도시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 91에 도시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0118] MELGLSWVVLAALLQGVQAQVQLVETGGGLVRAGGSLRLSCAASGRTADIYNIGWFRQAPGKEREFVAAITWIGRTPYYADAVKGRFAFSTDSAKNTVSLQM

DNLKPEDTGVYYCNAAHYLEGNTDYYWGQGTQVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS
LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 91]

[0119] CAR 7

[0120] 본원에 기술된 하나 이상의 단일 도메인 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 예시적인 CAR 작제물은 서열번호 9에 포함된 CD33 결합 도메인, CD8a 막관통 도메인, CD8a 힌지 도메인, CD137(4-1BB) 공동-자극 도메인, 및 CD3ζ 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0121] 일부 실시예에서, CAR은 서열번호 92에 도시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 92에 도시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0122] MELGLSWVVLAALLQGVQAQVQLVQPGGSLRLFCVASEEFFSIYAMGWYRQAPGKQHEMVARFTRDGKITYADSAKGRFTITRDAKNTLNLQMNGLIPEDTA
VYYCNINHYWGQGTQVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 92]

[0123] CAR 8

[0124] 본원에 기술된 하나 이상의 단일 도메인 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 예시적인 CAR 작제물은 서열번호 17에 포함된 CD33 결합 도메인, CD8a 막관통 도메인, CD8a 힌지 도메인, CD137(4-1BB) 공동-자극 도메인, 및 CD3ζ 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0125] 일부 실시예에서, CAR은 서열번호 93에 도시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 93에 도시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0126] MELGLSWVVLAALLQGVQADVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGNIDRFYAMGWYRQAPGKQRELVAQLTNNEITTYGDSVEGQFSISGDFDANTVYLQMD
SLKPEDTAVYYCHAHVTTTRWSQDYYWGQGTRVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS
LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [서열번호 93]

[0127] 본원에 기술된 임의의 CAR과 같은 임의의 융합 단백질은 세포에서 발현되어 세포의 표면 상에 제시될 수 있다. 일부 실시예에서, 세포는 T 세포(즉, T 림프구) 또는 NK 세포와 같은 면역 세포일 수 있다. T 세포 림프구는 임의의 T 세포, 예컨대 배양된 T 세포, 예를 들어, 일차 T 세포, 또는 배양된 T 세포주로부터의 T 세포, 예를 들어, TIB-153TM, Jurkat, SupT1 등, 또는 포유류로부터 수득된 T 세포일 수 있다.

[0128] ***뉴클레오티드 서열 및 발현***

[0129] 본 개시내용은 본원에 기술된 어느 하나 이상의 항-CD33 항체(예를 들어, 본원에 기술된 VHH), 또는 이의 일부(예를 들어, 본원에 기술된 하나 이상의 CDR), 및/또는 본원에 기술된 하나 이상의 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다양한 경우에, 이러한 뉴클레오티드 서열은 발현 벡터와 같은 벡터 내에 존재할 수 있다. 다양한 경우에, 이러한 뉴클레오티드는 세포의 게놈, 예를 들어, 치료를 필요로 하는 대상체의 세포 또는 항체의 생산을 위한 세포, 예를 들어, 항체의 생산을 위한 포유류 세포에 존재할 수 있다.

[0130] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 임의의 항체는 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된다. 선택적으로, 본원에 기술된 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 발현 또는 안정성을 향상시키기 위해 코돈-최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 당 기술분야에 공지된 임의의 표준 방법에 따라 수행될 수 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드의 발현은 구성적으로 발현된 프로모터 또는 유도적으로 발현된 프로모터에 의해 유도될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체는 신호 펩티드를 포함한다. 신호 펩티드는 세포 외 도메인을 가지거나 분비되는 임의의 단백질로부터 유래될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 항체는 당 기술분야에 공지된 임의의 신호 펩티드를 포함할 수 있다.

[0131] 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스는 관심 유전자 또는 키메라 유전자를 암호화하는 핵산 서열을 전달하기 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 핵산 서열은 벡터 내에 삽입되고 당 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 레트로바이러스 입자로 포장될 수 있다. 그런 다음, 재조합 바이러스를 단리하여 세포, 예를 들어 시험관 내 또

는 생체 외로 전달할 수 있다. 레트로바이러스 시스템은 당 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 제5,219,740호; Kurth and Bannert (2010) "Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis" Calster Academic Press (ISBN:978-1-90455-55-4); 및 Hu and Pathak Pharmacological Reviews 2000 52:493-512에 기술되어 있으며; 이는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체는 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터의 형질감염 또는 전기천공을 통해 포유류 세포에서 발현된다. 형질감염 또는 전기천공 방법은 당 기술분야에 공지되어 있다.

[0132] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 항체 중 임의의 것; 또는 본원에 기술된 임의의 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포, 예를 들어, 포유류 세포에 관한 것이다. 일 실시예에서, 세포는 본원에 기술된 항체, 또는 본원에 기술된 이러한 항체를 암호화하는 핵산을 포함한다. 세포 또는 조직, 예를 들어, 포유류 세포 또는 조직은 인간, 영장류, 햄스터, 토끼, 설치류, 소, 돼지, 양, 말, 염소, 개 또는 고양이 기원일 수 있다. 일부 실시예에서, 임의의 다른 포유류 세포가 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 포유류 세포는 인간이다.

[0133] 본원에 기술된 항체의 효율적인 발현은, RT-PCR, FACS, 노던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 또는 면역조직화학과 같은, 항체를 암호화하는 핵산의 mRNA, DNA, 또는 유전자 산물을 검출하는 표준 분석법을 사용하여 평가될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체는 재조합 핵산 서열에 의해 암호화된다.

[0134] *CD33*

[0135] Siglec(시알산-결합 면역글로불린-유사 렉틴)으로도 알려진, CD33은 세포-세포 상호작용을 매개하고 휴지 상태에서 면역 세포를 유지하는 역할을 한다. CD33은 알파-2,3- 및 보다 확실하게는 알파-2,6-연결된 시알산-함유 글리칸을 우선적으로 인식하고 결합하며, C1q 또는 시알릴화된 당단백질과 같은 리간드의 결합 시, CD33의 세포질 꼬리에 위치한 2개의 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프(ITIM)는 LCK와 같은 Src-유사 키나제에 의해 인산화된다. 이러한 인산화는 단백질-티로신 포스파타제 PTPN6/SHP-1 및 PTPN11/SHP-2의 동원 및 활성화를 위한 도킹 부위를 제공한다. 결국, 이들 포스파타제는 신호전달 분자의 탈인산화를 통해 하류 경로를 조절하는 것으로 여겨진다. 단핵구 활성화에 대한 CD33의 억제 효과 중 하나는 포스포이노시티드 3-키나제/PI3K를 필요로 한다.

[0136] CD33은 골수 줄기 세포(CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, 및 E-BFU), 골수아세포 및 단아세포, 단핵구/대식세포, 과립구 전구체(성숙에 따라 발현이 감소함), 및 비만 세포에 의해 발현된다. 성숙한 과립구는 매우 낮은 수준의 CD33 발현을 나타낼 수 있다. CD33은 일부 혈장-세포 골수종 사례에서 비정상적으로 발현될 수 있다. CD33은 적혈구, 혈소판, B 세포, T 세포 또는 NK 세포에서 발현되지 않는다. CD33은 우수한 골수 마커이며, 급성 골수성 백혈병(AML)의 진단에 흔히 사용된다. 그러나, B-림프모구성 또는 T-림프모구성 백혈병/림프종의 약 10 내지 20%는 CD33을 비정상적으로 발현할 수 있다(Naeim 외, Atlas of Hematopathology (Second Edition), 2018 참조).

[0137] *CD33-관련 장애*

[0138] 본 개시내용의 임의의 항체 및/또는 융합 단백질은, 예를 들어, CD33-관련 장애, 즉 표준 대조군(예를 들어, 정상, 비-질환, 비-암 세포)에서의 CD33 발현과 비교하여 CD33의 세포 표면 발현의 상승 또는 감소와 상관된 질환을 검출 및/또는 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, CD33-관련 장애는 혈액 악성종양 또는 신생물을 포함한다. 일부 실시예에서, 혈액 악성종양 또는 신생물은 골수이형성 증후군(MDS), 급성 골수성 백혈병(AML), 또는 다발성 골수종(MM)을 포함한다. 일부 실시예에서, CD33-관련 장애는 AML을 포함한다.

[0139] 급성 골수성 백혈병(AML)은 보다 효과적인 요법이 필요한 골수암이다. 미국 국립암연구소(National Cancer Institute)에 따르면, 미국에서 60,000명 이상의 사람들이 AML을 앓고 있으며, 환자들의 30% 미만이 진단 후 5년 동안 생존한다. AML 세포는 세포 표면 마커 발현을 검출함으로써 특성화되고 다른 세포와 구별될 수 있다. AML 세포는 CD33+(일부는 CD33-이지만), CLL-1+, CD45+, 및 CDw52+일 수 있다. AML은 주요 분화 및 성장-조절 경로를 파괴하는 점진적으로 획득된 중요한 유전적 변화를 갖는 형질전환된 세포에서 유래된 이종성, 클론성, 신생물성 질환을 특징으로 한다. (Dohner 외, *NEJM*, (2015) 373:1136).

[0140] CD33은 또한 골수이형성 증후군 및 아세포 수가 증가한 만성 골수단핵구성 백혈병의 사례에서도 빈번하게 발현되며(Sanford 외 *Leuk Lymphoma* (2016) 57(8): 1965-1968 참조), 또한 상당한 수의 골수종 환자의 혈장 세포에서도 발현되어, 다발성 골수종에 대한 치료적 표적을 나타낼 수 있음을 나타낸다(Robillard 외 *Leukemia* (2005) 19(11):2021-2 참조).

[0141] 일부 실시예에서, CD123과 관련된 조혈 악성종양 또는 혈액학적 장애는 전암성 병태, 예컨대 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병이다. 골수이형성 증후군(MDS)은 장애학적으로 또는 비효율적인 혈액형성

(hematopoiesis), 또는 혈액 생성을 특징으로 하는 혈액학적 의학적 병태이다. 따라서, 혈액-형성 세포의 수와 질은 비가역적으로 감소한다. MDS를 앓고 있는 일부 환자에게는 중증 빈혈이 발생할 수 있는 반면, 무증상인 환자도 있다. MDS에 대한 분류 체계는 특정 혈액 세포 유형, 예를 들어, 골수아세포, 단핵구, 및 적혈구 전구체의 비율 또는 빈도를 지정하는 기준으로 당 기술분야에 공지되어 있다. MDS는 불응성 빈혈, 고리 철적모구(ring sideroblast)가 있는 불응성 빈혈, 과다 모세포가 있는 불응성 빈혈, 형질전환 시 과다 모세포가 있는 불응성 빈혈, 만성 골수단핵구성 백혈병(CML)을 포함한다. 일부 실시예에서, MDS는 급성 골수성 백혈병(AML)으로 진행할 수 있다.

[0142] 다양한 경우에, 본원에 기술된 임의의 전술된 것을 발현하는 항체 및/또는 융합 단백질 및/또는 세포는 CD33-관련 장애(예를 들어, AML, MDS, MM)의 하나 이상의 증상 또는 바이오마커의 유병률을 치료, 완화, 감소키거나, 이의빈도를 감소시키거나, 이의 수준 또는 양을 감소시킨다. 특정 증상 및 증상의 진행은 대상체 마다 상이하다. 따라서, 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체 및/또는 융합 단백질은 이를 필요로 하는 대상체, 예를 들어, CD33-관련 장애(예를 들어, AML, MDS, MM)를 갖는 대상체에게 투여된다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 임의의 항체 및/또는 융합 단백질의 투여는 하나 이상의 증상을 감소시키고/시키거나 질환의 진행을 지연시키는 것을 포함하여, 암 또는 조혈 악성종양 또는 전(pre)-악성종양을 예방한다.

[0143] 다양한 경우에, 본원에 기술된 항체 및/또는 융합 단백질의 투여는 CD33-관련 장애의 하나 이상의 증상 또는 바이오마커의 유병률, 빈도, 수준, 및/또는 양의 감소, 예를 들어, 대상체에서의 이전 측정과 비교하여 또는 참조 값과 비교하여 적어도 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 하나 이상의 증상 또는 바이오마커의 감소를 초래한다.

[0144] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 및/또는 융합 단백질의 유효 용량은, 예를 들어, 1,000 mg/용량 미만, 예를 들어, 900 mg/용량 미만, 800 mg/용량 미만, 700 mg/용량, 600 mg/용량, 500 mg/용량, 550 mg/용량, 400 mg/용량, 350 mg/용량, 300 mg/용량, 200 mg/용량, 100 mg/용량, 또는 50 mg/용량, 25 mg/용량 미만일 수 있다. 대안적으로 또는 본원에 개시된 바와 같은 투여량과 조합하여, 본원에 기술된 바와 같은 항체 및/또는 융합 단백질은 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 또는 1년에 1회 미만의 빈도로 효과적으로 또는 통상적으로 투여될 수 있다.

[0145] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 CAR과 같은 융합 단백질을 발현하는 세포(*예를 들어*, 면역 세포)의 유효 용량은 예를 들어, 100만 내지 1,000억 세포의 범위일 수 있지만; 이러한 예시적인 범위 미만 또는 초과의 양이 또한 본 개시의 범위 내에 있다. 예를 들어, 세포의 일일 용량은 약 100만 내지 약 500억 세포(예를 들어, 약 5백만 개의 세포, 약 2,500만 개의 세포, 약 5억 개의 세포, 약 10억 개의 세포, 약 50억 개의 세포, 약 200억 개의 세포, 약 300억 개의 세포, 약 400억 개의 세포, 또는 전술한 값들 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위), 바람직하게는 약 1,000만 내지 약 1,000억 세포(예를 들어, 약 2,000만 개의 세포, 약 3,000만 개의 세포, 약 4,000만 개의 세포, 약 6,000만 개의 세포, 약 7,000만 개의 세포, 약 8,000만 개의 세포, 약 9,000만 개의 세포, 약 100억 개의 세포, 약 250억 개의 세포, 약 500억 개의 세포, 약 750억 개의 세포, 약 900억 개의 세포, 또는 전술한 값들 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위), 보다 바람직하게는 약 1억 세포 내지 약 500억 세포(예를 들어, 약 1억 2천만 개의 세포, 약 3억 5천만 개의 세포, 약 3억 5천만 개의 세포, 약 4억 5천만 개의 세포, 약 6억 6천만 개의 세포, 약 8억 개의 세포, 약 9억 개의 세포, 약 30억 개의 세포, 약 300억 개의 세포, 약 450억 개의 세포, 또는 전술한 값들 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위)일 수 있다.

[0146] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체 및/또는 융합 단백질은 다수의 진단 및/또는 치료 적용에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 검출가능하게 표지된 버전의 항체는 샘플(예를 들어, 생물학적 샘플)에서 CD33의 존재 또는 양을 검출하기 위한 분석에 사용될 수 있다. 본원에 기술된 항체 및/또는 융합 단백질은 CD33 활성의 억제를 연구하기 위한 시험관 내 분석에 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체 및/또는 융합 단백질은 CD33을 억제하거나 달리 CD33-관련 장애를 치료하는데 유용한 추가의 신규 화합물을 식별하도록 설계된 분석법에서 양성 대조군으로서 사용될 수 있다.

[0147] 본원에 기술된 항체 및/또는 융합 단백질은 대상체, 예를 들어, 하나 이상의 CD33-관련 장애를 앓고 있거나, 앓고 있는 것으로 의심되거나, 발병 위험이 있거나, 치료 중인 대상체를 모니터링하는데 사용될 수 있다. 모니터링은 대상체에서, 예를 들어, 대상체의 혈청에서 CD33의 양 또는 활성을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 평가는 본원에 기술된 바와 같은 항체 및/또는 융합 단백질의 투여 후, 적어도 한(1)시간, 예를 들어, 적어도 2, 4, 6, 8, 12, 24, 또는 48시간, 또는 적어도 1일, 2일, 4일, 10일, 13일, 20일 이상, 또는 적어

도 1주, 2주, 4주, 10주, 13주, 20주 이상 후에 수행된다. 대상체는 다음 기간 중 하나 이상에서 평가될 수 있다: 치료 시작 전; 치료 중; 또는 치료의 하나 이상의 요소가 투여된 후. 평가는 추가 치료에 대한 필요성을 평가하는 것, 예를 들어, 투여량, 투여 빈도, 또는 치료 지속기간이 변경되어야 하는지 여부를 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 이는 또한, 선택된 치료 기법을 추가 또는 중단할 필요성을 평가하는 단계, 예를 들어, 본원에 기술된 CD33-관련 장애에 대한 임의의 치료를 추가 또는 중단하는 단계를 포함할 수 있다.

[0148] ***항체 및 CD33의 상호작용 측정***

[0149] CD33에 대한 본원에 기술된 항체의 결합 특성은 당 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어, 다음 방법 중 하나에 의해 측정될 수 있다: BIACORE 분석, 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay), x-선 결정학, 서열 분석 및 스캐닝 돌연변이 유발. 항체와 CD33의 결합 상호작용은 표면 플라스몬 공명(SPR, surface plasmon resonance)을 사용하여 분석될 수 있다. SPR 또는 생체분자 상호작용 분석(BIA, Biomolecular Interaction Analysis)은 어떠한 상호작용도 표지하지 않고서, 실시간으로 생체-특이적 상호작용을 검출한다. BIA 칩의 결합 표면에서의 질량 변화(결합 이벤트를 나타냄)는 표면 부근의 광의 굴절률의 변화를 초래한다. 굴절의 변화는 검출가능한 신호를 생성하며, 이는 생물학적 분자 사이의 실시간 반응의 표시로서 측정된다. SPR을 사용하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,641,640호; Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo 외 (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 및 BIAcore International AB(스웨덴 웁살라 소재)에 의해 제공된 온라인 자원에 기술되어 있다. 또한, Sapidyne Instruments(Boise, Id.)로부터 이용가능한 KinExA®(Kinetic Exclusion Assay) 분석법도 또한 사용될 수 있다.

[0150] SPR로부터의 정보는, 항체의 CD33에 대한 결합을 위한 평형 해리 상수(K_D), 및 K_{on} 및 K_{off}를 포함하는 동역학 파라미터의 정확한 정량적 측정을 제공하는데 사용될 수 있다. 이러한 데이터는 상이한 분자를 비교하는데 사용될 수 있다. SPR로부터의 정보는 또한 구조-활성 관계(SAR, structure-activity relationship를 개발하는데 사용될 수 있다. 특정 결합 파라미터, 예를 들어, 높은 친화도와 상관되는 주어진 위치에서의 변이체 아미노산이 식별될 수 있다.

[0151] 특정 실시예에서, 본원에 기술된 항체는 CD33 결합에 대해 높은 친화도를 나타낸다. 다양한 실시예에서, CD33에 대해 본원에 기술된 바와 같은 항체의 K_D는 약 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13}, 10^{-14}, 또는 10^{-15} M 미만이다. 특정 경우에, CD33에 대해 본원에 기술된 바와 같은 항체의 K_D는 0.001 내지 1 nM, 예를 들어, 0.001 nM, 0.005 nM, 0.01 nM, 0.05 nM, 0.1 nM, 0.5 nM, 또는 1 nM이다.

[0152] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체는, 예를 들어, CD33의 하나 이상의 특이적 아미노산을 포함하는 CD33의 특이적 에피토프에 결합한다. 이론에 구속되고자 함이 없이, 본원에 기술된 항체의 CD33 에피토프의 특이적 아미노산의 이용가능성의 파괴는(예를 들어, 돌연변이유발에 의하거나 경쟁 항체에 의한 결합에 의함) 항체의 결합을 감소시키거나 제거할 수 있다. CD33 상호작용에 대한 다중 항-CD33 항체가 요구되는 치료 적용 또는 제품 제조에서, 서로 간섭하는 것을 피하기 위해, 비-경쟁 CD33 에피토프를 표적으로 하는 항-CD33 항체를 선택하거나 설계하는 것이 중요할 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 아미노산 W22, H45, Y49, Y50, R98, 및 R122 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 모두(예를 들어, W22, H45, Y49, Y50, R98, 및 R122 모두)를 포함하는 CD33 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 아미노산 Y49, Y50, 및 L78 중 1개, 2개, 또는 모두(예를 들어, Y49, Y50, 및 L78 모두)를 포함하는 CD33 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 아미노산 K52, L78, R98, 및 R122 중 1개, 2개, 3개, 또는 모두(예를 들어, K52, L78, R98, 및 R122 모두)를 포함하는 CD33 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 아미노산 Y49, Y50, K52, 및 R98 중 1개, 2개, 3개, 또는 모두(예를 들어, Y49, Y50, K52, 및 R98 모두)를 포함하는 CD33 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 아미노산 N20, H45, Y49, 및 Y50 중 1개, 2개, 3개, 또는 모두(예를 들어, N20, H45, Y49, 및 Y50 모두)를 포함하는 CD33 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 W22를 포함하는 CD33 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 아미노산 Y49, Y50, 및 N99 중 1개, 2개, 또는 모두(예를 들어, Y49, Y50, 및 N99 모두)를 포함하는 CD33 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 아미노산 H45, Y49, Y50, K52, 및 R122 중 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 모두(예를 들어, H45, Y49, Y50, K52, 및 R122 모두)를 포함하는 CD33 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0153] ***치료 방법***

[0154] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 하나 이상의 항-CD33 항체는 본원에 기술된 하나 이상의 장애, 예를 들어, CD33 발현과 연관된 하나 이상의 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용된다. CD33 발현과 연관된 질환 또는 장애는, 예를 들어, 특정 혈액 악성종양 및 신생물, 예를 들어, MDS, AML 및 MM을 포함한다. 일부 실시예에서, 이러한 방법은 치료적 유효량의 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 임의의 전술한 것을 발현하는 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 임의의 항-CD33 항체를 포함하는 융합 단백질을 포함하여, 본원에 기술된 하나 이상의 항-CD33 항체는 CD33 발현과 연관된 질환 또는 장애를 치료하는 방법에서 사용된다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 하나 이상의 항-CD33 항체는 CD33 발현과 연관된 혈액의 신생물 질환 및 악성종양을 치료하는 방법에서 사용된다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 하나 이상의 항-CD33 항체는 MDS, AML 또는 MM을 치료하는 방법에서 사용된다.

[0155] ***병용 요법***

[0156] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항-CD33 항체는 화학요법제 또는 종양용해성 치료제와 같은 하나 이상의 추가 치료제와 병용하여 투여된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "병용 요법"은 대상체가 두 제제 모두에 동시에 노출되도록 둘 이상의 상이한 약학적 제제가 중첩되는 요법으로 투여되는 상황을 지칭한다. 병용 요법에 사용될 때, 둘 이상의 상이한 제제가 동시에 또는 개별적으로 투여될 수 있다. 병용 투여는 동일한 투여 형태로 둘 이상의 제제를 동시에 투여하는 것, 별도의 투여 형태로 동시에 투여하는 것, 및 별도의 투여를 포함할 수 있다. 즉, 2개 이상의 제제가 동일한 투약 형태로 함께 제형화되고 동시에 투여될 수 있다. 대안적으로, 2개 이상의 제제가 동시에 투여될 수 있으며, 여기서 제제는 별도의 제형으로 존재한다. 또 다른 대안적인 측면에서, 제1 제제 바로 다음에 하나 이상의 추가 제제가 투여될 수 있다. 별도의 투여 프로토콜에서, 2개 이상의 제제가 수 분 간격으로, 또는 수 시간 간격으로, 또는 수 일 간격으로 투여될 수 있다.

[0157] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "화학요법제" 또는 "종양용해성 치료제"(예를 들어, 항암제, 예를 들어, 면역 세포 요법과 같은 항암 요법)는 하나 이상의 세포사멸촉진제, 세포증식억제제 및/또는 세포독성제, 및/또는 호르몬제를 지칭하는 당 기술분야에서 이해되는 의미를 가지며, 예를 들어 특히 바람직하지 않은 세포 증식과 관련된 하나 이상의 질환, 장애 또는 병태를 치료하는데 사용하기 위해 사용 및/또는 권장되는 제제를 포함한다. 일부 실시예에서, 화학요법제 및/또는 종양용해성 치료제는 백금 화합물(예를 들어, 시스플라틴, 카보플라틴, 및 옥살리플라틴), 알킬화제(예를 들어, 사이클로포스파미드, 이포스파마이드, 클로람부실, 질소 머스타드, 티오테파, 멜팔란, 부설판, 프로카르바진, 스트렙토조신, 테모졸로마이드, 다카르바진, 및 벤다무스틴), 항종양 항생제(예를 들어, 다우노루비신, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 블레오마이신, 미토마이신 C, 플리카마이신, 및 닥티노마이신), 탁산(예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀), 항대사 물질(예를 들어, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 프리메트렉시드, 티오구아닌, 플록수리딘, 카페시타빈, 및 메토트렉세이트), 뉴클레오시드 유사체(예를 들어, 플루다라빈, 클로파라빈, 클라드리빈, 펜토스타틴, 및 넬라라빈), 토포이소머라제 억제제(예를 들어, 토포테칸 및 이리노테칸), 저메틸화제(예를 들어, 아자시티딘 및 데시타빈), 프로테오좀 억제제(예를 들어, 보르테조밉), 에피포도필로독소(예를 들어, 에토포시드 및 테니포시드), DNA 합성 억제제(예를 들어, 히드록시우레아), 빈카 알칼로이드(예를 들어, 비크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 및 빈블라스틴), 티로신 키나제 억제제(예를 들어, 이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 소라페닙, 및 수니티닙), 니트로소우레아(예를 들어, 카르무스틴, 포테무스틴, 및 로무스틴), 헥사메틸멜라민, 미토탄, 혈관형성 억제제(예를 들어, 탈리도마이드 및 레날리도마이드), 스테로이드(예를 들어, 프레드니손, 덱사메타손, 및 프레드니솔론), 호르몬 제제(예를 들어, 타목시펜, 랄록시펜, 루프롤리드, 비칼루아트마이드, 그라니세트론, 및 플루타미드), 아로마타제 억제제(예를 들어, 레트로졸 및 아나스트로졸), 비소 트리옥시드, 트레티노인, 비선택적 사이클로옥시게나제 억제제(예를 들어, 비스테로이드성 항염증제, 살리실레이트, 아스피린, 피록시캄, 이부프로펜, 인도메타신, 나프로신, 디클로페낙, 톨메틴, 케토프로펜, 나부메톤, 및 옥사프로진), 선택적 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 억제제, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있거나 이들을 포함할 수 있다.

[0158] 특정 실시예에서, 항암 치료를 위한 화학요법제 및/또는 종양용해성 치료제는 종양-침윤 림프구와 같은 생물학적 제제를 포함하고, CAR T-세포, 항체, 항원, 치료용 백신(예를 들어, 환자 자신의 종양 세포 또는 특정 종양에 의해 생성되는 항원과 같은 다른 물질로부터 제조), 면역-조절제(예를 들어, 사이토카인, 예를 들어, 면역조절 약물 또는 생물학적 반응 조절제), 체크포인트 억제제 또는 기타 면역 제제를 포함한다. 특정 실시예에서, 면역 제제는 면역글로빈, 면역자극제(예를 들어, 박테리아 백신, 콜로니 자극 인자, 인터페론, 인터류킨, 치료 백신, 백신 조합, 바이러스 백신) 및/또는 면역억제제(예를 들어, 칼시뉴린 억제제, 인터류킨 억제제, TNF 알파 억제제)를 포함한다. 특정 실시예에서, 호르몬 제제는 항-안드로겐 요법(예를 들어, 케토코나졸(Ketoconazole),

아비라테론(ABiraterone), TAK-700, TOK-001, 비칼루타마이드(Bicalutamide), 닐루타마이드(Nilutamide), 플루타마이드(Flutamide), 엔잘루타마이드(Enzalutamide), ARN-509)을 위한 제제를 포함한다.

[0159] 추가 화학요법제 및/또는 종양용해성 치료제는 면역 체크포인트 치료제(예를 들어, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 이필리무맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 트레멜리무맙, 또는 세미플리맙), 다른 모노클로날 항체(예를 들어, 리툭시맙, 세툭시맙, 판페투무맙, 토시투모맙, 트라스투주맙, 알렘투주맙, 겜투주맙 오조가마이신, 베바시주맙, 카탈룩소맙, 데노수맙, 오비누투주맙, 오파투무맙, 라무시루맙, 퍼투주맙, 니모투주맙, 람몰리주맙, 피딜리주맙, 실툭시맙, BMS-936559, RG7446/MPDL3280A, MEDI4736), 항체-약물 접합체(예를 들어, 브렌툭시맙 베도틴(ADCETRIS®, Seattle Genetics); 아도-트라스투주맙 엠탄신(KADCYLA®, Roche); 겜투주맵 오조가마이신(Wyeth); CMC-544; SAR3419; CDX-011; PSMA-ADC; BT-062; 및 IMGN901(예를 들어, Sassoon 외, Methods Mol. Biol. 1045:1-27 (2013); Bouchard 외, Bioorganic Med. Chem. Lett. 24: 5357-5363 (2014) 참조), 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0160] 일부 실시예에서, 항-CD33 항체와 추가 치료제의 병용 투여는 항-CD33 항체 또는 추가 치료제 단독에 의해 생산된 것보다 더 큰 정도로 암의 개선을 초래한다. 병용된 효과와 각 제제의 단독 효과 사이의 차이는 통계적으로 유의한 차이일 수 있다. 일부 실시예에서, 병용된 효과는 상승적(synergistic) 효과일 수 있다. 일부 실시예에서, 항-CD33 항체와 추가 치료제의 병용 투여는 표준 투여 요법, 예를 들어, 추가 치료제에 대해 승인된 투여 요법과 비교하여, 감소된 투여량으로, 감소된 투여량 수로, 및/또는 감소된 투여량 빈도로 추가 치료제의 투여를 허용한다.

[0161] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 치료 방법은 의학적 병태의 다른 치료가 실패했거나 다른 수단을 통한 치료에서 덜 성공한 대상체를 대상으로 수행된다. 또한, 본원에 기술된 치료 방법은 하나 이상의 의학적 병태의 추가 치료와 함께 수행될 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법은 본원에 기술된 항-CD33 항체, 또는 이의 조성물의 투여 전에, 이와 실질적으로 동시에, 또는 이후에, 암 요법, 예를 들어, 비-골수제거 화학요법, 수술, 호르몬 요법, 및/또는 방사선을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0162] 본 개시내용의 측면은 예를 들어, 이러한 조혈 줄기 세포를 필요로 하는 대상체를 치료하는 맥락에서 CD33의 발현을 감소시키거나 제거하도록 유전적으로 변형된 조혈 세포의 투여를 수반하며, 이러한 대상체는 예를 들어, 혈액학적 악성종양, 예를 들어 AML, 또는 전악성종양 예를 들어 MDS를 갖고, CD33을 표적으로 하는 면역요법, 예를 들어 CD33-항체-약물 접합체 또는 CD33 CAR-T 또는 CAR-NK 요법을 받고 있는 대상체를 포함할 수 있다. 이러한 치료 요법은 예를 들어, 다음 단계를 포함할 수 있다: (1) 본원에 기술되어 있거나 다르게는 본 개시내용에 기반하여 당 기술분야의 숙련자에게 명백한 바와 같이, 융합 단백질, 예컨대 *예를 들어*, CAR, 및 전술한 것 중 어느 하나를 발현하는 세포, *예를 들어*, CAR-T 또는 CAR-NK 세포를 포함하여, 항-CD33 항체, 이의 CD33 결합 단편 중 임의의 것의 치료적 유효량을 투여하는 단계; 및 (2) 환자에게 자가 또는 동종이계 조혈 줄기 세포를 투여(*예를 들어*, 주입 또는 재주입)하는 단계로서, 상기 조혈 세포는 CD33의 발현이 감소되었거나 제거되어 있는 단계. 일부 실시예에서, 조혈 세포는 CD33의 발현 감소를 갖도록 유전적으로 변형된다. 일부 실시예에서, 조혈 세포는 CD33의 발현을 제거하도록 유전적으로 변형된다. 일부 실시예에서, 조혈 세포는 본원에 개시된 바와 같이, 항체 또는 이의 CD33-결합 단편에 의해 결합된 CD33 에피토프의 발현이 감소되거나 제거되도록 유전적으로 변형된다.

[0163] ***제형 및 투여***

[0164] 다양한 실시예에서, 본원에 기술된 항체는 약학 조성물에 혼입될 수 있다. 이러한 약학 조성물은, 예를 들어, 질환, 예를 들어, AML, MDS, MM과 같은 암의 예방 및/또는 치료에 유용할 수 있다. 약학 조성물은 당 기술분야의 숙련자에게 공지된 방법(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) 참조)에 의해 제형화될 수 있다.

[0165] 일부 실시예에서, 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하도록 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체의 예는 생리학적으로 양립가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 염, 예를 들어, 산 부가염 또는 염기 부가염을 포함할 수 있다.

[0166] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체를 포함하는 조성물, 예를 들어, 주사용 멸균 제형은 비히클로서 주사용 증류수를 사용하여 종래의 약학적 관행에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들어, 글루코스 및 다른 보충제, 예컨대 D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 및 소듐 클로라이드를 함유하는 생리식염수 또는 등장성 용액은

주사용 수용액으로서, 선택적으로, 예를 들어, 에탄올 및/또는 폴리알코올, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 알코올, 및/또는 폴리소르베이트 80쩨 또는 HCO-50과 같은 비이온성 계면활성제와 같은 적절한 가용화제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0167] 본원에 개시된 바와 같이, 약학 조성물은 당 기술분야에 공지된 임의의 형태일 수 있다. 이러한 형태는, 예를 들어, 액체 용액(예를 들어, 주사식 및 주입식 용액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 알약, 분말, 리포좀 및 좌제와 같은, 액체, 반-고체 및 고체 투여 형태를 포함한다.

[0168] 임의의 특정 형태의 선택 또는 사용은, 부분적으로, 의도된 투여 방식 및 치료적 적용에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 전신 또는 국소 전달을 위한 조성물을 함유하는 조성물은 주사식 또는 주입식 용액의 형태일 수 있다. 따라서, 조성물은 비경구 모드(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내, 또는 근육 내 주사)에 의해 투여되도록 제형화될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 비경구 투여는 일반적으로 주사에 의한 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 지칭하며, 제한 없이, 정맥 내, 비강 내, 안구 내, 폐, 근육 내, 동맥 내, 척수강 내, 관절낭 내, 안와 내, 심장 내, 피내, 폐내, 복강 내, 경기관삽관, 피하, 표피하, 관절 내, 낭하, 지주막하, 척수 내, 경막 외, 뇌내, 두개 내, 경동맥 내 및 흉골 내 주사 및 주입을 포함한다.

[0169] 투여 경로는 비경구 투여, 예를 들어, 주사에 의한 투여, 비강 내 투여, 폐 내 투여, 또는 경피 투여일 수 있다. 투여는 정맥 내 주사, 근육 내 주사, 복강 내 주사, 또는 피하 주사에 의해 전신 투여되거나 국소 투여될 수 있다.

[0170] 일부 실시예에서, 본 발명의 약학 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 분산액, 리포좀, 또는 고농도의 안정한 보관에 적합한 다른 질서있는 구조로서 제형화될 수 있다. 멸균 주사가능한 용액은, 필요에 따라, 위에서 열거된 성분 중 하나 또는 조합을 갖는 적절한 용매에 필요한 양으로 본원에 기술된 조성물을 혼입한 후 필터 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 본원에 기술된 조성물을 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은, 본원에 기술된 조성물의 분말과 이전에 멸균-여과된 이의 용액으로부터 임의의 추가의 원하는 성분(아래 참조)을 수득하는 진공 건조 및 동결 건조를 포함한다. 용액의 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사가능한 조성물의 장시간 흡수는 흡수를 지연시키는 시약, 예를 들어, 모노스테아레이트 염, 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0171] 약학 조성물은 물 또는 다른 약학적으로 허용되는 액체 중의 멸균 용액 또는 현탁액을 포함하는 주사가능한 제형의 형태로 비경구로 투여될 수 있다. 예를 들어, 약학적 조성물은 치료 분자를, 멸균수 및 생리식염수, 식물성 오일, 유화제, 현탁액, 계면활성제, 안정화제, 향미 부형제, 희석제, 비히클, 보존제, 결합제와 같은 약학적으로 허용되는 비히클 또는 배지와 적절히 조합한 다음, 일반적으로 허용되는 약학적 관행에 필요한 단위 투여 형태로 혼합함으로써 제형화될 수 있다. 약학적 제제에 포함된 활성 성분의 양은 지정된 범위 내의 적절한 투여량이 제공되도록 한다. 유성 액체의 비제한적인 예는 참기름 및 대두유를 포함하며, 가용화제로서 벤질 벤조에이트 또는 벤질 알코올과 조합될 수 있다. 포함될 수 있는 다른 물품은 인산염 완충액과 같은 완충제, 또는 소듐 아세테이트 완충액, 진정제 예를 들어 프로카인 히드로클로라이드, 안정화제 예를 들어 벤질 알코올 또는 페놀, 및 항산화제이다. 제형화된 주사는 적절한 앰플에 포장될 수 있다.

[0172] 다양한 실시예에서, 피하 투여는 주사기, 사전 충전형 주사기, 자동 주사기(예를 들어, 일회용 또는 재사용 가능), 펜 주사기, 패치 주사기, 착용식 주사기, 피하 주입 세트를 갖는 보행 주사기 주입 펌프, 또는 피하 주사용 항체 약물과 조합하기 위한 다른 장치와 같은 장치에 의해 달성될 수 있다.

[0173] 본 개시내용의 주사 시스템은, 미국 특허 제5,308,341호에 기술된 바와 같은 전달 펜을 사용할 수 있다. 당뇨병 환자에게 인슐린을 자가 전달하는데 가장 일반적으로 사용되는 펜 장치는 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 이러한 장치는 적어도 하나의 주사 바늘(예를 들어, 길이가 약 5 내지 8 ㎜인 31 게이지 바늘)을 포함할 수 있고, 일반적으로 하나 이상의 치료 용액의 치료 단위 투여량으로 미리 채워지고, 가능한 한 통증을 최소화하면서 용액을 대상체에게 신속하게 전달하는데 유용하다. 하나의 약물 전달 펜은 치료 또는 다른 약물의 바이알이 수용될 수 있는 바이알 홀더를 포함한다. 펜은 완전히 기계적인 장치일 수 있거나, 사용자에게 주입되는 약물의 투여량을 정확하게 설정하고/하거나 나타내기 위해 전자 회로와 조합될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,192,891호를 참조한다. 일부 실시예에서, 펜 장치의 바늘은 일회용이고, 키트는 하나 이상의 일회용 교체 바늘을 포함한다. 현재 특징적인 조성물 중 어느 하나의 전달에 적합한 펜 장치는 또한, 예를 들어, 미국 특허 제6,277,099호; 제6,200,296호; 및 제6,146,361호에 기술되어 있으며, 이들 각각의 개시는 그 전체가 참조로서 본

원에 통합된다. 미세바늘-기반 펜 장치는, 예를 들어, 미국 특허 제7,556,615호에 기술되어 있으며, 이의 개시 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 또한, Scandinavian Health Ltd에 의해 제조된 정밀 펜 주입기(PPI, Precision Pen Injector) 장치인 MOLLY™를 참조한다.

[0174] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 조성물은 국소 투여 방식으로 대상체에게 치료적으로 전달될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "국소 투여" 또는 "국소 전달"은, 혈관 시스템을 통해 의도된 표적 조직 또는 부위로의 조성물 또는 제제의 수송에 의존하지 않는 전달을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 조성물 또는 제제의 주사 또는 이식에 의해 또는 조성물 또는 제제를 함유하는 장치의 주사 또는 이식에 의해 전달될 수 있다. 특정 실시예에서, 표적 조직 또는 부위의 부근에서 국소 투여 후, 조성물 또는 제제, 또는 이의 하나 이상의 성분은 투여 부위가 아닌 의도된 표적 조직 또는 부위로 확산될 수 있다.

[0175] 일부 실시예에서, 조성물은 0℃ 미만의 온도(예를 들어, -20℃ 또는 -80℃에서 보관되도록 제형화될 수 있다. 일부 실시예에서, 조성물은 2 내지 8℃(예를 들어, 4℃)에서 최대 2년(예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 11/2년, 또는 2년) 동안 보관되도록 제형화될 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, 본원에 기술된 조성물은 2 내지 8℃(예를 들어, 4℃)에서 적어도 1년 동안 보관 시 안정적이다.

[0176] 일부 실시예에서, 약학 조성물은 용액으로서 제형화될 수 있다. 일부 실시예에서, 조성물은, 예를 들어, 2 내지 8℃(예를 들어, 4℃)에서 보관하기에 적합한 농도로 완충 용액으로서 제형화될 수 있다.

[0177] 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 항체를 포함하는 조성물은 면역리포좀 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 제형은 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 순환 시간이 강화된 리포좀은, 예를 들어, 미국 특허 제5,013,556호에 기술되어 있다.

[0178] 특정의 실시예에서, 조성물은, 이식물 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하여, 제어된 방출 제형과 같이, 신속한 방출로부터 화합물을 보호할 담체와 함께 제형화될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법이 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, J. R. Robinson (1978) "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems," Marcel Dekker, Inc., New York을 참조한다.

[0179] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체의 투여는 항체를 암호화하는 핵산을 대상체에게 투여함으로써 달성된다. 본원에 기술된 치료 항체를 암호화하는 핵산은 유전자 요법 프로토콜의 일부로서 사용되어 세포 내에서 항체를 발현하고 생산하는데 사용될 수 있는 핵산을 전달하기 위해 유전자 작제물에 통합될 수 있다. 이러한 성분의 발현 작제물은 임의의 치료적으로 효과적인 담체, 예를 들어, 생체 내에서 성분 유전자를 세포에 효과적으로 전달할 수 있는 임의의 제형 또는 조성물로 투여될 수 있다. 접근법은 재조합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 렌티바이러스, 및 단순 포진 바이러스-1(HSV-1), 또는 재조합 박테리아 또는 진핵 플라스미드를 포함하는 바이러스 벡터에 대상 유전자를 삽입하는 것을 포함한다. 바이러스 벡터는 세포를 직접 형질감염시킬 수 있다; 플라스미드 DNA는, 예를 들어, 양이온성 리포좀(리포펙틴) 또는 유도체화, 폴리리신 접합체, 그램시딘 S, 인공 바이러스 외피 또는 다른 이러한 세포 내 담체의 도움으로 전달될 수 있을 뿐만 아니라, 유전자 작제물의 직접 주입 또는 $CaPO_4$ 침전(예를 들어, 국제특허공개 WO04/060407)으로 전달될 수 있다. 적절한 레트로바이러스의 예는 당 기술분야의 숙련자에게 공지된 pLJ, pZIP, pWE 및 pEM을 포함한다(예를 들어, Eglitis 외 (1985) Science 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:6460-6464; Wilson 외 (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:3014-3018; Armentano 외 (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:6141-6145; Huber 외 (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:8039-8043; Ferry 외 (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:8377-8381; Chowdhury 외 (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem 외 (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:7640-7644; Kay 외 (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai 외 (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:10892-10895; Hwu 외 (1993) J Immunol 150:4104-4115; 미국특허 제4,868,116호 및 제4,980,286호; 및 PCT 특허공개 WO89/07136호, WO89/02468호, WO89/05345호, 및 WO92/07573호를 참조한다). 또 다른 바이러스 유전자 전달 시스템은 아데노바이러스-유래 벡터를 사용한다(예를 들어, Berkner 외 (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld 외 (1991) Science 252:431-434; 및 Rosenfeld 외 (1992) Cell 68:143-155를 참조한다). 아데노바이러스 균주 Ad 5 d1324 또는 아데노바이러스의 다른 균주(예를 들어, Ad2, Ad3, Ad7 등)로부터 유래된 적합한 아데노바이러스 벡터는 당 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 대상체 유전자의 전달에 유용한 또 다른 바이러스 벡터 시스템은 아데노-관련 바이러스(AAV, adeno-associated virus)이다. 예를 들어,

Flotte 외 (1992) Am J Respir Cell Mol Biol 7:349-356; Samulski 외 (1989) J Virol 63:3822-3828; 및 McLaughlin 외 (1989) J Virol 62:1963-1973을 참조한다.

[0180] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 조성물은 단위 투여 형태로 존재하며, 단위 투여 형태는 자가-투여에 적합할 수 있다. 이러한 단위 투여 형태는 용기, 통상적으로, 예를 들어 바이알, 카트리지, 사전 충전형 주사기 또는 일회용 펜 내에 제공될 수 있다. 미국 특허 제6,302,855호에 기술된 바와 같은 도저(doser) 장치와 같은 도저가 또한 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 주입 시스템과 함께 사용될 수 있다.

[0181] 대상체에서 장애를 치료하거나 예방할 수 있는, 본원에 기술된 조성물의 적절한 투여량은, 예를 들어, 치료될 대상체의 연령, 성별, 및 체중 및 사용된 특정 억제제 화합물을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 항체를 포함하는 하나의 조성물의 상이한 투여량은 그 항체의 상이한 제형의 투여량과 비교하여 암(예를 들어, AML)을 가진 대상체를 치료하는데 필요할 수 있다. 대상체에게 투여되는 투여량에 영향을 미치는 다른 인자는, 예를 들어, 장애의 유형 또는 중증도를 포함한다. 다른 인자는, 예를 들어, 대상체에게 동시에 또는 이전에 영향을 미치는 다른 의학적 장애, 대상체의 일반적인 건강, 대상체의 유전적 분포, 식이, 투여 시간, 배설 속도, 약물 조합, 및 대상체에게 투여되는 임의의 다른 추가 치료제를 포함할 수 있다. 또한, 임의의 특정 대상체에 대한 특정 투여량 및 치료 요법은 치료 의사의 판단에 기초하여 조정될 수 있음을 이해해야 한다.

[0182] 본원에 기술된 조성물은 고정 투여량으로, 또는 킬로그램 당 밀리그램(mg/kg) 투여량으로 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 투여량은 또한 조성물 내의 항원-결합 분자 중 하나 이상에 대한 항체 또는 다른 숙주 면역 반응의 생성을 감소시키거나 회피하도록 선택될 수 있다. 본원에 기술된 조성물과 같은 항체의 예시적인 투여량은, 예를 들어, 대상체의 체중의 0.0001 내지 100 mg/kg, 0.01 내지 5 mg/kg, 1 내지 1000 mg/kg, 1 내지 100 mg/kg, 0.5 내지 50 mg/kg, 0.1 내지 100 mg/kg, 0.5 내지 25 mg/kg, 1 내지 20 mg/kg, 및 1 내지 10 mg/kg을 포함한다. 예를 들어, 투여량은 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 3.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, 5.0 mg/kg, 10 mg/kg 또는 20 mg/kg 체중 또는 1 내지 20 mg/kg 체중 범위 이내일 수 있다. 예시적인 치료 요법은 매주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 월 1회, 3개월 마다 1회 또는 3 내지 6개월 마다 1회, 또는 처음에는 짧은 투여 간격(예를 들어 매주 1회 내지 3주 마다 1회)이고 이어서 이후에는 연장된 간격(예를 들어 월 1회 내지 3 내지 6개월 마다 1회)를 수반한다.

[0183] 약학 용액은 본원에 기술된 조성물의 치료적 유효량을 포함할 수 있다. 이러한 유효량은, 하나 이상의 제제가 사용되는 경우, 투여된 조성물의 효과, 또는 조성물 및 하나 이상의 추가 활성제의 병용 효과에 부분적으로 기초하여 당 기술분야의 숙련자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 본원에 기술된 조성물의 치료적 유효량은 또한 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자, 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 조성물(및 하나 이상의 추가 활성제)의 능력, 예를 들어 암(예를 들어, AML)의 적어도 하나의 병태의 개선에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 조성물의 치료적 유효량은 특정 장애, 및/또는 당 기술분야에 알려져 있거나 본원에 기술된 특정 장애의 증상 중 어느 하나를 억제(발생의 중증도를 감소시키거나 발생을 제거함)하고/하거나 예방할 수 있다. 치료적 유효량은 또한 조성물의 임의의 독성 또는 유해 효과가 치료적 유익한 효과보다 더 큰 것이다.

[0184] 본원에 기술된 임의의 조성물의 적절한 인간 투여량은, 예를 들어, 1상(Phase I) 투여량 증가 연구에서 추가로 평가될 수 있다. 예를 들어, van Gurp 외 *Am J Transplantation* (2008) 8(8):1711-1718; Hanouska 외 *Clin Cancer Res* (2007) 13(2, part 1):523-531; 및 Hetherington 외 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2006) 50(10): 3499-3500을 참조한다.

[0185] 조성물의 독성 및 치료 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물(예를 들어, 본원에 기술된 암 중 어느 하나의 동물 모델)에서 공지된 약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 이들 절차는, 예를 들어, LD_{50}(모집단의 50%까지 치사 투여량) 및 ED_{50}(모집단의 50%에서 치료적으로 유효한 투여량)을 결정하는데 사용될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량비는 치료 지수이며, LD_{50}/ED_{50} 비율로 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 본원에 기술된 조성물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 조성물이 사용될 수 있지만, 영향을 받은 조직의 부위에 이러한 화합물을 표적화하고 정상 세포에 대한 잠재적 손상을 최소화하여 부작용을 감소시키는 전달 시스템을 설계하도록 주의를 기울여야 한다.

[0186] 당 기술분야의 숙련자는 세포 배양 분석법 및 동물 연구로부터 수득된 데이터가 인간에서 사용하기 위한 투여량의 범위를 제형화하는데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 본원에 기술된 조성물의 적절한 투여량은 일반적으로 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED_{50}을 포함하는 조성물의 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투여 형태

및 사용된 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 달라질 수 있다. 본원에 기술된 조성물의 경우, 치료적 유효 투여량은 세포 배양 분석법으로부터 초기에 추정될 수 있다. 투여량은 세포 배양에서 결정된 바와 같이 IC_{50}(즉, 증상의 반수 최대 억제를 달성하는 항체의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장 내 수준은, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시예에서, 예를 들어, 국소 투여(예를 들어, 안구 또는 관절로 투여)가 바람직한 경우, 세포 배양 또는 동물 모델화는 국소 부위 내에서 치료적 유효 농도를 달성하는데 필요한 용량을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0187] NFAT-반응 리포터 시스템

[0188] 본 개시내용의 측면은, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)의 활성을 평가하고 본원에 기술된 임의의 항-CD3 항체를 포함하는 CAR을 발현하는 세포(*예를 들어*, T 세포)의 활성화를 평가하기 위해 사용될 수 있는, 활성화된 T-세포의 최소 핵 인자(NFAT, nuclear factor of activated T cell)-반응성 프로모터를 포함하는 핵산 작제물에 관한 것이다. CAR 활성화는 T 세포의 T-세포 활성화 및 효과기 기능을 유도하는 세포 내 경로를 이동 중에 설정하며, 이는 NFAT 신호전달 및 유전자 발현을 포함한다(*예를 들어*, Hogan, *Cell Calcium.* (2017)63:66-9 참조). 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "NFAT-반응성 프로모터"는 NFAT 신호전달에 의해 활성화되고 활성화 시 NFAT-반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 촉진하는 프로모터 영역을 지칭한다. 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된(이의 제어 하인) 유전자는 리포터 분자를 암호화한다.

[0189] 활성화된 T-세포의 핵 인자(NFAT)는 전사 인자 패밀리이며, 인터류킨-2(IL-2 발현)의 조절뿐만 아니라 T 세포 분화 및 자가-내성을 조절하는 것을 포함하여 면역 반응을 조절하는 것과 관련된 NFAT1-NFAT-5를 포함한다. *예를 들어*, Macian *Nat. Rev. Immunol.* (2005) 5: 472-484를 참조한다. NFAT 전사 인자는 2개의 성분을 포함한다: 세포질 Rel 도메인 단백질(NFAT 패밀리 구성원) 및 다양한 전사 인자를 포함하는 핵 성분(Chow, *Molecular and Cellular Biology,* 1999; 19(3):2300-7). NFAT1 및 NFAT2는 IL-2를 생산하는 말초 T 세포에서 주로 발현되고, NFAT 결합 부위는 일반적으로 IL-2와 같은 NFAT-조절된 유전자의 상류(5')에서 발견된다. *예를 들어*, Chow, *Molecular and Cellular Biology, (*1999) 19(3):2300-7; Rooney 외, *Molecular and Cellular Biology*, (1995) 15(11):6299-310; 및 Shaw 외, *Journal of Immunology*, (2010) 185(9):4972-5를 참조하며, 이들의 전체 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0190] 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이, 진핵 세포에서, 유전자에 작동가능하게 연결된 프로모터는 일반적으로 유전자의 전사 개시 부위(코딩 서열)에 인접하고 5'인 코어 프로모터를 포함한다. 코어 프로모터의 추가 상류(5')는 전사 인자 결합 부위와 같은 시스-조절 영역일 수 있다.

[0191] 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터는 복수의 NFAT-결합 부위를 포함한다. 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 NFAT 결합 부위를 포함한다. 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터는 6개의 NFAT 결합 부위를 포함한다. 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터의 NFAT 결합 부위 각각은 동일한 NFAT 결합 부위(*예를 들어*, 동일한 유형의 NFAT 전사 인자에 결합함) 또는 상이한 NFAT 결합 부위(*예를 들어*, 상이한 유형의 NFAT 전사 인자에 결합함)일 수 있다. 일부 실시예에서, 각각의 NFAT 결합 부위는 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, NFAT 결합 부위는 상이한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0192] NFAT 결합 부위의 예는 서열번호 94에 의해 제공된 뉴클레오티드 서열에 의해 제공된다:

[0193] 5'-GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT-3'(서열번호 94).

[0194] 일부 실시예에서, NFAT 결합 부위 중 적어도 하나는 서열번호 94의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, NFAT 결합 부위 각각은 서열번호 94의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0195] 각각의 NFAT 결합 부위는 서로 바로 인접하게 위치한다(*예를 들어*, NFAT 결합 부위 사이에 임의의 추가 뉴클레오티드 없이 일렬로 위치함). 대안적으로, 하나 이상의 추가 뉴클레오티드가 둘 이상의 NFAT 결합 부위 사이에 존재할 수 있다.

[0196] 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터는 IL-2 프로모터 또는 이의 일부를 포함한다. 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터는 최소 IL-2 프로모터를 포함한다. 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터는 코어 IL-2 프로모터를 포함한다. 일반적으로, 자연적으로 발생하는 IL-2 프로모터는 상대적으로 콤팩트하며, TATA 박스 및 상류 조절 영역을 함유하는 코어 프로모터를 포함한다. 코어 프로모터는 전사 개시 부위의 약 -40 및 +40 뉴클레

오티드(*예를 들어*, 40개 뉴클레오티드 상류(5') 내지 40개 뉴클레오티드 하류(3')) 내의 영역으로 간주된다. *예를 들어*, Weaver 외 *Mol. Immunol.* (2007) 44(11) 2813-2819를 참조한다.

[0197] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "최소 IL-2 프로모터"는 전사를 위해 필요한 IL-2 프로모터의 최소 부분을 지칭한다. 일부 실시예에서, 최소 IL-2 프로모터는 IL-2 코어 프로모터이다. 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터는 TATA 박스를 포함하는 코어 IL-2 프로모터를 포함한다. TATA 박스("골드버그-호그니스(Goldberg-Hogness) 박스"로도 지칭됨)는 전사 개시 부위의 상류에서 발견되는 T/A 풍부한 서열이다(Shi & Zhou, *BMC Bioinformatics* (2006) 7, Article number S2). 일부 실시예에서, TATA 박스는 5'-TATA(A/T)A(A/T)-3' 공통 서열을 포함한다. TATA 박스는 유전자 전사를 위한 개시 전 복합체의 형성에 관여하고 TATA-결합 단백질(TBP, TATA-binding protein)에 결합하는 것으로 여겨진다.

[0198] 일부 실시예에서, 최소 IL-2 프로모터는 서열번호 95의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0199] 최소 IL-2 프로모터의 예는 서열번호 95에 의해 제공된 뉴클레오티드 서열에 의해 제공된다.

[0200] 5'-TAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGAATTCCA-3'(서열번호 95).

[0201] 일부 실시예에서, NFAT 결합 부위는 최소 IL-2 프로모터의 5'(상류)에 위치한다. 일부 실시예에서, NFAT 결합 부위는 최소 IL-2 프로모터의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 또는 그 이상의 뉴클레오티드 5'(상류)에 위치한다. 일부 실시예에서, NFAT 반응성 프로모터는 마지막 NFAT 결합 부위와 최소 IL-2 프로모터 사이의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0202] 최소 NFAT-반응성 프로모터의 예시적인 뉴클레오티드 서열은 서열번호 96에 의해 제공된다. 일부 실시예에서, 최소 NFAT-반응성 프로모터의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 96의 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 96의 뉴클레오티드 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 필수적으로 이루어진다.

[0203] 6개의 NFAT 결합 부위를 포함하는 최소 NFAT-반응성 프로모터의 예시적인 뉴클레오티드 서열(서열번호 96):

[0204] 5'-
GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGATCTAGACTTAGAGGGTATATAA
TGGAAGCTCGAATTCCA-3' (서열번호 96).

[0205] 본원에 기술된 IL-2 리포터 시스템을 암호화하는 임의의 핵산 작제물은 구성적 프로모터(구성적으로 활성인 프로모터로도 지칭됨)에 작동가능하게 연결된(이의 제어 하인) 제2 리포터 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 최소 NFAT-반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 분자는 구성적으로 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된 제2 리포터 분자와 상이하고, 이로써 최소 NFAT-반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 분자의 검출은 NFAT-반응성 프로모터의 활성을 나타내며, 구성적으로 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 분자의 검출은 구성적으로 활성인 프로모터의 활성을 나타낸다.

[0206] 일부 실시예에서, 제2 리포터 분자의 발현을 조절하는 구성적 프로모터는 "기준 프로모터"로서 지칭된다. 구성적으로 활성인 프로모터의 예는, 제한 없이, EF-1알파(EF1a), CMV 프로모터, SV40 프로모터, PGK1 프로모터, Ubc 프로모터, 베타 액틴 프로모터, CAG 프로모터, TRE 프로모터, UAS 프로모터, Ac5 프로모터, 폴리헤드린 프로모터, 및 U6 프로모터를 포함한다. 일부 실시예에서, 구성적으로 활성인 프로모터는 EF1a 프로모터이다.

[0207] 신장 인자 1 알파(EF-1알파) 프로모터의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 97의 뉴클레오티드 서열에 의해 제공된다.

[0208] EF1알파 프로모터(서열번호 97)

[0209] GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGC
GGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTT
CGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCC
ACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGA

GTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTT
TGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGAC
GGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTG
GTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCT
GCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCA
TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATG
GAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTC
ATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA

[0210] 본원에 기술된 핵산 작제물은 최소 NFAT-반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된(이의 제어 하인) 리포터 분자를 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산 작제물은 구성적으로 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된(이의 제어 하인) 제2 리포터 분자를 포함한다. 임의의 적절한 리포터 분자가 본원에 기술된 핵산 작제물에서 사용될 수 있다. 바람직하게는, 리포터 분자(리포터 단백질)는 발현 시 (직접 또는 간접적으로) 쉽게 검출될 수 있다. 일부 실시예에서, 리포터 분자는 스크리닝가능한 마커로서 지칭될 수 있다. 리포터 분자의 예는, 제한 없이, 효소, 예컨대 β-글루쿠로니다제, α-갈락토시다제, β-락타마제, 및 티로시나제; 루시퍼라제; 형광 마커/단백질을 포함한다. 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(GFP, green fluorescent protein), 적색 형광 단백질(RFP, red fluorescent prote), 청색 형광 단백질(BFP, blue fluorescent protein), EBFP, 시안 형광 단백질, ECFP, EG 형광 단백질, 황색 형광 단백질, mWasabi, ZsGreen, 황색 형광 단백질(YFP, yellow fluorescent protein), ZsYellow, mHoneydew, mApple, mRuby, mBanana, mOrange, mCherry, mCerulean, mTurquoise, mTangerine, mStrawberry, mGrape, mRaspberry, 및 mPlum을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 형광 단백질과 같은 적절한 리포터 분자의 선택은 리포터 분자를 검출하고/하거나 정량화하기 위한 수단과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다.

[0211] 본원에 기술된 핵산 작제물은 최소 NFAT-반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된(이의 제어 하인) 리포터 분자를 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산 작제물은 구성적으로 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된(이의 제어 하인) 제2 리포터 분자를 포함한다. 임의의 적절한 리포터 분자가 본원에 기술된 핵산 작제물에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 리포터 분자(리포터 단백질)는 발현 시 (직접 또는 간접적으로) 쉽게 검출될 수 있다. 일부 실시예에서, 리포터 분자는 스크리닝가능한 마커로서 지칭될 수 있다. 리포터 분자의 예는, 제한 없이, 효소, 예컨대 β-글루쿠로니다제, α-갈락토시다제, β-락타마제, 및 티로시나제; 루시퍼라제; 형광 마커/단백질을 포함한다. 형광단백질은 녹색 형광 단백질(GFP), 적색 형광 단백질(RFP), 청색 형광 단백질(BFP), EBFP, 시안 형광 단백질, ECFP, EG 형광 단백질, 황색 형광 단백질, mWasabi, ZsGreen, 황색 형광 단백질(YFP), ZsYellow, mHoneydew, mApple, mRuby, mBanana, mOrange, mCherry, mCerulean, mTurquoise, mTanerine, mStrawberry, mGrape, mRaspberry, 및 mPlum을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 형광 단백질과 같은 적절한 리포터 분자의 선택은 리포터 분자를 검출하고/하거나 정량화하기 위한 수단과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다.

[0212] 일부 실시예에서, 리포터 분자는 형광 단백질이다. 일부 실시예에서, NFAT-반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 분자는 형광 단백질이다. 일부 실시예에서, 형광 단백질은 mTurquoise 또는 mOrange이다.

[0213] mTurquoise를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 98에 의해 제공된다.

[0214] mTurquoise(서열번호 98)

[0215] ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGTCCTGGGGC
GTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAG
GACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC
ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACTTTAGCGACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCAC
AACATCGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACC
CAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTAC
AAG

[0216] mOrange를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 99에 의해 제공된다.

[0217] mOrange(서열번호 99)

[0218] ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGAATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATC
GAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCTTTCAGACCGCTAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCT
CATTTCACCTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTCAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATG
AACTACGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCC
GACGGCCCCGTGATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGTGCCCTGAAGGGCAAGATCAAGATGAGGCTG
AAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACACCTCCGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACATCGTCGACATCAAGTTG
GACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAG

[0219] 일반 기술

[0220] 본 개시내용의 실시는, 달리 명시되지 않는 한, 당 기술분야의 기술 범위 내에 있는, 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 종래의 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌, 예컨대 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2판(Sambrook, 외, 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.): Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, 외 eds. 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, 외, eds. 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan 외, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practice approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985≫; *Transcription and Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984≫; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1986≫; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986≫; 및 B. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel 외 (eds.)와 같은 문헌에 충분히 설명되어 있다.

[0221] 추가의 상세 설명 없이, 당 기술분야의 숙련자는, 전술한 설명에 기초하여, 본 개시내용을 최대한 활용할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 다음의 특정 실시예는 단지 예시적인 것으로 해석되고, 임의의 방식으로 본 개시내용의 나머지를 제한하지 않는다. 본원에 인용된 모든 간행물은 본원에 참조된 목적 또는 주제를 위해 참조로서 통합된다.

[0222] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참조 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다. 또한, 재료, 방법 및 예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 의도가 아니다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당 기술분야의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적절한 방법 및 재료가 본원에 기술된다.

[0223] 본 개시내용은 다음의 예에 의해 추가로 예시된다. 예시는 단지 예시를 위해 제공된다. 이들은 어떠한 방식으로도 본 개시내용의 범위 또는 내용을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0224] **예**

[0225] **예 1. CD33에 대한 신규한 항체의 생성**

[0226] 미처리 라마 파지 라이브러리를 패닝시키고 스크리닝하여 CD33을 특이적으로 인식하는 단일 도메인 항체를 식별하였다. CD33을 발현하는 MOLM-13 세포주를 CD33-양성 세포주로서 사용하였고, CD33의 녹아웃을 포함하는 MOLM-13 세포주를 CD-33 음성 세포주로서 사용하였다. 정제된 항-인간 CD33 항체를 양성 대조군으로서 사용하였다. 식별된 결합제의 특이적 결합 활성을 FACS로 확인하였다. 식별된 결합제의 중쇄 가변 영역 서열이 본원에 포함된다.

[0227] **예 2. CAR 작제물의 생성 및 평가**

[0228] *CAR 작제물*

[0229] CAR 작제물은 본원에 기술된 CD33-특이적 단일 도메인 항체 단편(sdAb)으로 개발된다. CAR 작제물은 4-1BB 또는 CD28 공동-자극 도메인 중 하나와 CD3ζ(제타) 신호전달 도메인이 쌍을 이룬 CD8a 또는 CD28 막관통 도메인 중 하나와 연결된 sdAb를 포함한다. CAR 서열은 3세대 렌티바이러스 플라스미드에서 클로닝된다.

[0230] *세포주*

[0231] 다양한 수준의 CD33 발현 및 엑손 2 스플라이스 변이(Laszlo 외, Oncotarget, 7: 43281-94 (2016))에 대한 상이한 유전자형을 함유하는 AML 세포주 MV411, THP1, 및 MOLM14를 발현하는 GFP 및 루시퍼라제를 사용하여 전술한 CAR 작제물의 효능을 시험하였다. MV411은 급성 단핵구 백혈병(AML FAB M5)이 있는 10세 소년으로부터 확립된 급성 단핵구성 백혈병 계통이다. THP-1은 급성 단핵구 백혈병 환자로부터 유래된 인간 단핵구 세포주이다. MOLM14는 최초 골수이형성 증후군(MDS, 모세포 과다를 동반한 불응성 빈혈증, RAEB(refractory anemia with excess of blasts)) 후 1995년에 재발 시 급성 골수성 백혈병(AML FAB M5a)이 있는 20세 남성의 말초 혈액으로부터 확립된 급성 골수성 백혈병 계통이다. DNA 단리를 통해, MOLM14는 CC 유전자형을 가지며 SNP를 함유하지 않는 반면, TE1P1 및 MV411은 모두 CT 유전자형을 갖는 SNP에 대해 이형접합체인 것으로 밝혀졌다(Lamba 외, J. Clin. Oncol., 35: 2674-82 (2017)). 이러한 세포주는 CD33 또는 CD123을 발현하지 않는다. K562는 53세 여성 만성 골수성 백혈병 환자로부터 확립되고 유래된 인간 적백혈병 백혈병 계통이다.

[0232] *CAR T-세포 생성*

[0233] CD33 CAR-암호화 렌티바이러스 벡터를 Lenti-X 293T 렌티 포장 세포주인 Lenti-X 293T 세포의 일시적 형질감염에 의해 생산하였고, 폴리-D 리신 코팅된 15-cm 플레이트(BD Biosciences, 미국 캘리포니아주 산 요세 소재)에 플레이팅하였다. 다음 날, 포장 및 엔벨로프 벡터(pMDLg/pRRE, pMD-2G, 및 pRSV-Rev)와 함께 CAR을 암호화하는 플라스미드를 사용하여 Lenti-X 293T 세포를 리포펙타민 3000(Thermo Fisher Scientific, 미국 매사추세츠주 월섬 소재)을 사용하여 형질감염시켰다. 형질감염 후 24시간 및 48시간에 렌티바이러스 상등액을 수확하고, 세포 잔해를 제거하기 위해 3000 RPM에서 10분 동안 원심분리하고, 드라이아이스 상에서 냉동시키고, -80℃에서 보관하였다. 정상 공여자로부터의 인간 PBMC를 NIH-승인된 프로토콜로 수득하고, 24시간 동안 40 IU/mL 재조합 IL-2 및 5% FBS를 함유하는 AIM-V 배지에서 1:3 비율의 CD3/CD28 마이크로비드(Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific, Cat# 11141D)로 활성화시켰다. 활성화된 T 세포를, 6-웰 플레이트에 10 mcg/mL의 프로타민 설페이트 및 100 IU/mL의 IL-2와 함께, 2 mL의 렌티바이러스 상등액 당 2백만 개의 세포와 1 mL의 신선한 AIM-V 배지로 재현탁하였다. 플레이트를 32℃에서 2시간 동안 1000 x g로 원심분리하고 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 제2 형질도입을 전술한 동일한 형질도입 절차를 반복함으로써 다음 날에 수행하였다. CD3/CD28 비드를 형질도입 후 3일차에 제거하고, 8일차 또는 9일차에 수확할 때까지 2 내지 3일 마다 첨가된 신선한 IL2-함유 배지와 함께 100 IU/mL IL2를 함유하는 AIM-V 중에서 300,000 세포/mL로 세포를 배양하였다.

[0234] *유세포 분석*

[0235] CD33 CAR-형질도입된 T 세포의 표면 발현은 단백질-L(Themo Fisher) 또는 비오티닐화된 인간 Siglec-3 / CD33 단백질(Aero Biosystems, 미국 델라웨어주 뉴왁 소재)을 사용한 유세포 계측법에 의해 결정한 다음 스트렙타비딘-PE(BioLegend, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)와 함께 인큐베이션하였다.

[0236] *PDX*

[0237] PDX 백혈병 세포주 JMM117의 100만개 세포를 적응(adoptive) CAR T 세포 전달 1주일 전에 NSG 마우스에 주입하였다. 0일차에 CAR T 세포로 마우스를 처리하였다. 2주 후, 마우스를 내려 분석을 수행하였다.

[0238] *세포독성 분석법*

[0239] 100 μl의 RPMI 배지 중의 표적 종양 세포 5E4를 96-웰 플레이트(Corning® (Croning, NY) BioCoat쩨 Poly-L-Lysine 96-Well Clear TC-Treated Flat Bottom Assay Plate)에 로딩하였다. 다음 날에 동량의 CAR T 세포를 지정된 웰에 첨가하였다. 초기 인큐사이트 세포자멸사 마커(Essen BioScience, 미국 미시간 주 앤아버 소재)를 100 μL PBS에 희석하고, 1 μL의 희석제를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 GFP 및/또는 RFP 형광 발현에 대해 스캔하여 40시간의 지속시간 동안 30분마다 IncuCyte ZOOM® 시스템을 사용하여 세포의 세포자멸사를 모니터링하였다. 각 시점에서의 세포 사멸 백분율을 기준선-보정하였다.

[0240] *사이토카인 생성 분석*

[0241] 표적 종양 세포 및 형질도입된 CAR-양성 T 세포를 1XPBS로 3회 세척하고, 1E6/mL로 RPMI에 재현탁하였다. 100 μL의 CAR 양성 T 세포를 갖는 종양 세포의 100 μL를 96-웰 플레이트의 각 웰에 로딩하였다. T 세포 단독 대조군 및 종양 세포 단독 대조군을 설정하였다. 모든 시험을 2회 중복 또는 3회 중복으로 수행하였다. 세포를 37℃에서 18시간 동안 인큐베이션하고, 사이토카인 생성의 검출을 위해 120 μL의 배양 상등액을 수확하였다. 상등액 내 사이토카인 수준을 ELISA 키트(R&D Systems, 미국 미네소타주 미니애폴리스 소재) 또는 다중 분석법(Meso Scale Discovery, 미국 매릴랜드주 락빌 소재)을 사용하여 측정하였다.

[0242] *생체에너지 분석*

[0243] 당분해 스트레스 시험을 위해, L-글루타민(200 mM) 및 NaCl(143 mM)이 보충된 무혈청 미완충 DMEM 배지(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)에 CAR-T 세포를 현탁시켰다. 0.5% 페놀 레드 용액(SigmaP0290) 0.6 mL를 첨가하여 3 mg/L의 최종 농도를 얻고 pH를 7.35+/-0.05로 조정하였다. CAR-T 세포를 Seahorse 세포 플레이트(웰 당 3E5 세포) 상에 도말하고, Cell-Tak(Corning)로 코팅하여 T 세포 부착을 용이하게 하였다. 간략하게, 카트리지를 분석법 전날에 수화하였다. 분석 당일에, 플레이트를 Cell-Tak로 코팅하고, 세포를 Cell-Tak 코팅된 플레이트에 시딩하고, 분석을 위해 XF24 Analyzer 상에 놓았다. 상세한 절차는 다음과 같다.

[0244] 분석 카트리지를 초기에 200 μL/웰의 XF 보정 용액으로 수화하고, 하이드로 부스터를 첨가하고, 파라필름으로 포장하고, 센서 카트리지를 유틸리티 플레이트의 상단에 놓고, CO_2 없이 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음, 세포 배양 플레이트를 다음과 같이 Cell-Tak로 코팅하였다: 1 플레이트의 경우, 46 mL의 Cell-Tak을 204 mL의 TC 물과 1 mL의 $NaHCO_3$에 희석하였다. 혼합물을 각 웰에 50 mL씩 분배하고, 플레이트를 실온에서 적어도 20분 동안 인큐베이션하였다. Cell-Tak 용액을 제거한 후, 250 mL의 TC 물을 사용하여 각 웰을 세척하였다. CAR-T 세포(3E5/웰)를 158 mL 분석 배지에 도말하였다. 그런 다음, 세포 배양 플레이트를 저속 가속으로 감속 없이 1초 동안 450 rpm으로 회전시킨 다음, 플레이트를 방향에서 역전시키고, 저속 가속으로 감속 없이 1초 동안 650 rpm으로 회전시켰다. 그런 다음, 플레이트를 37℃ 0% CO2에서에서 25 내지 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0245] 25 내지 30분 동안 인큐베이션한 후, 수동 P200 피펫터를 사용하여 158 μL의 따뜻한 분석 배지를 벽의 측면을 따라 각 웰의 상단에 서서히 부드럽게 첨가하였다. 세포 플레이트를 15 내지 25분 동안 인큐베이션하였다. 15 내지 25분 후, 플레이트를 XF24 Analyzer에 놓았다(보정 완료 후). 그런 다음, XF 분석법을 실행하였다. 용액을 3개의 포트를 통해 순차적으로 주입하였다: 포트 A: 글루코스 80 mM(3mL 분석 배지 중 96 mL의 원액). 포트 B: 올리고마이신 18mM(3 mL 분석 배지 중 10.8 mL의 원액). 포트 C: 2DG는 원액을 사용한다. 카트리지 포트에 75 mL의 약물 용액을 로딩한 후, 항정 상태(steady state)에서 ECAR(mpH/분)을 측정함으로써 당분해 스트레스 시험을 수행하였다.

[0246] 미토콘드리아 스트레스 시험을 위해, CAR T 세포를 D-글루코스(25 mM) 및 소듐 피루베이트(1 mM)를 갖는 무혈청 비완충 DMEM 배지에 현탁하였다. 미토콘드리아 스트레스 시험은 항정 상태에서 OCR(pmol/분)을 측정하고, 올리고마이신(0.5 mM), FCCP(0.5 mM), 로테논(1 mM) 및 항마이신 A(1 mM)(Sigma-Aldrich)를 순차적으로 주입한 후, 위와 유사하게 수행하였다. Seahorse 시스템을 사용하는 실험은 다음의 분석 조건을 사용하였다: 2분 혼합물; 2분 대기; 및 3분 측정. 모든 샘플을 6개의 복제물로 시험하였다.

[0247] *형광 현미경 영상화 및 분석*

[0248] MOLM14(4x10s) 종양 세포를 ibidi m-Dish 35 mm의 Cell-tak 코팅된 내부 웰 상에 1 mL의 따뜻한 RPMI에 도말하고 37℃ 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음, 종양 세포를 Hoechst Dye(2.5 μg/mL)로 염색하였다. T 세포를 형질도입하여 CAR-mCherry 융합 단백질을 발현시켰다. CAR-T 양성 세포를 분류한 다음, 이들 CAR-T 세포의 7.5 E5를 고정된 MOLM14 세포와 함께 접시에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 새로 제조된 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 영상화를 위한 준비로 비-경질화 장착 배지에 장착하였다.

[0249] 면역 시냅스에서 액틴 발현을 평가하기 위해, 상기 프로토콜을 변형시키고, 파라포름알데히드 고정 후 0.1% 트리톤 x로 샘플을 투과시켰다. 세포를 Phalloidin 640(165 nM)으로 염색한 다음, 장착 전에 세척하였다. Airyscan 영상을 Zeiss LSM 880을 사용하여 획득하였다. 노출 설정은 전체 실험에 대해 동일하였다. 영상을 면역 시냅스의 전체 부피를 커버하기 위해 z 스택으로서 수집하였다.

[0250] 영상을 63x 대물렌즈를 갖는 Nikon Eclipse Ti2 회전 디스크 공초점 현미경을 사용하여 획득하였다. 0.5 μM 두께의 Z 스택은 3개의 채널(405, 488, 640 nm)에 대해 초점면 위 및 아래에 10 μM의 범위에 걸쳐 병렬로 획득하

였다. 각 채널을 50% 레이저 강도에서 여기하였으며, 노출 시간은 각각 405, 488 및 640에 대해 300 ms, l s 및 300 ms이었다. ImageJ 소프트웨어를 데이터 분석에 사용하였다.

[0251] CAR 및 액틴 축적을 평가하기 위해 각 CAR에 대한 n>10 면역 시냅스에 대한 정량적 분석을 수행한하였다. 구체적으로, 시냅스에서의 평균 형광 강도(MFI, mean fluorescence intensity)의 비율 대 T 세포 표면의 나머지 부분에서의 MFI 비율을 결정하였다. 추가 파라미터는 IS에서의 MFP부피 대 T 세포 표면의 나머지 부분에 대한 MFI* 부피의 비율을 포함하며, IS의 MF 부피 대 T 세포의 MFI* 부피, 및 세포 내 CAR 신호 대 세포 외 CAR 신호를 또한 평가하였다. 액틴의 경우, IS에서의 형광 강도를 기준선 액틴 T 세포 발현에 대해 정규화하였다. IS에서 액틴의 MFP 부피를 결정하고, 미결합 T 및 종양 세포의 MFI* 부피를 차감하여 기준선 액틴 발현을 설명하였다.

[0252] ***생체 내 실험***

[0253] 동물 실험을 동물 보호 및 사용 위원회(Animal Care and Use Committee)가 승인한 프로토콜에 따라 수행하였다. AML 세포주 및 이종이식된 인간 AML 시편을 NSG 마우스에 IV 주사하였다. 루시퍼라제-발현 계통의 경우, 백혈병을 Xenogen IVIS Lumina(Caliper Life Sciences, 미국 매사추세츠주 홉키턴 소재)를 사용하여 검출하였다. NSG에 3 mg의 D-루시퍼린(Caliper Life Sciences)을 복강 내 주입하고, AML 세포주에 대한 1분의 노출 시간으로 4분 후에 영상화하였다. Living Image Version 4.1 소프트웨어(Caliper Life Sciences)를 각 마우스에 대한 총 생체발광 신호 플럭스를 광자로서 분석하기 위해 사용하였다. 감소 시점에, 마우스의 골수, 비장 및 간을 수확하고 유세포 계측법으로 평가하였다.

[0254] ***통계 분석***

[0255] 통계 분석을 Prism 7.0 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 플롯을 평균+/- SD로서 제시하였다. 모든 데이터의 통계적 유의성을 쌍을 이루지 않은 스튜던트 t 검정을 사용하여 계산하였다. $p<0.05$를 유의한 것으로 간주한다.

[0256] 예 3: CAR 작제물의 에피토프 맵핑 및 평가

[0257] 항-CD33 CAR 작제물이 결합하는 CD33 에피토프를 이해하면 항-CD33 CAR 작제물 설계 및 치료 적용의 개선을 가능하게 할 수 있으며, 예를 들어, CD33을 표적화하고 서로 간섭하지 않는 항-CD33 결합 도메인의 조합을 사용할 수 있게 한다. Octet® Red 96 분석법을 수행하여 항-CD33 단일 도메인 항체 단편(sdAbs)을 평가하였고, 주어진 2개의 항-CD33 sdAb가 CD33 분자 상의 동일한 결합 부위에 대해 경쟁하는지 여부를 결정하였다.

[0258] 비오티닐화된 CD33 단백질을 스트렙타비딘(SA) 센서 상에서 포획시키고, 제1 sdAb를 CD33에 결합시킨다(도 1). 그런 다음, 제2 항체를 결합에 대해 확인한다. CD33에 대한 제1 sdAb의 결합은 광 신호의 변화를 유도하였고, 흡수의 변화는 곡선으로서 반영되었고, 제2 항체의 첨가는 유사한 곡선을 유도할 수도, 유도하지 않을 수도 있다. 제2 항체가 첨가될 때 신호 증가가 없다는 것은 제2 항체가 제1 항체와 동일한 결합 부위에 대해 경쟁한다는 것을 시사한다. 제2 항체가 첨가될 때 신호의 증가는 두 항체 간에 경쟁이 없음을 시사한다.

[0259] 본 개시내용의 10개의 예시적인 항-CD33 sdAb는 서로에 대한 경쟁 결합(도 2 및 도 3) 및 대조군 항-CD33 항체인 hu195에 대해 Octet 비오티닐화된-CD33 SA 센서를 사용하여 시험하였다. 데이터의 히트맵 표현에서, 제2 항체 결합에 대한 신호(및 이에 따른 경쟁의 결여)는 녹색으로 표시되고, 제2 항체 결합에 대한 신호의 결여(및 그에 따른 제1 항체와 제2 항체 사이의 결합에서의 경쟁)는 황색 및 적색으로 표시된다. 도 3의 데이터가 표 1에 제공되어 있다.

표 1

도 3의 수치 데이터

AB#	348	353	389	413	416	420	424	426	429	430	h195
348	-	0.3219	0.5838	0.6233	0.0635	0.3805	0.0143	0.1583	0.0422	0.6512	0.7988
353	0.0077	-	0.1518	0.0204	-0.0696	-0.0387	-0.1077	-0.0122	-0.1296	0.2314	0.2952
389	-0.1456	-0.1005	-	-0.0267	-0.2797	-0.0649	-0.2709	-0.1369	-0.2601	0.0905	0.3548
413	-0.024	0.2477	0.4832	-	-0.0586	0.1497	-0.0796	0.0667	-0.0887	0.6296	0.6478
416	0.2287	0.4379	0.4564	0.3756	-	0.3396	0.2198	0.5139	0.2608	0.6968	0.565
420	0.1387	0.1833	0.376	0.2	-0.094	-	-0.0931	0.0276	-0.124	0.4565	0.5786
424	0.1542	0.4437	0.3562	0.3703	0.086	0.266	-	0.239	0.1627	0.7327	0.6483
426	0.1833	0.2589	0.5304	0.2572	0.3042	0.1906	0.0441	-	0.0225	0.5381	0.7433
429	0.616	1.0142	1.1629	0.8645	0.5524	0.9497	0.6276	0.5435	-	1.4405	1.3678
430	-0.2119	-0.1116	0.0436	-0.1084	-0.2683	-0.1694	-0.3765	-0.2267	-0.2904	-	0.1358
h195	0.2634	0.3987	0.5851	0.3223	0.0872	0.2632	0.1624	0.1257	0.1467	0.8139	-

스케일	
-0.4 내지 0	경쟁
0.1 내지 0.6	보통 경쟁
0.61 내지 1.5	경쟁 없음

[0260]

[0261] 결과는 시험된 sdAb가 CD33의 동일하거나 중첩되는 에피토프에 결합하는 경쟁군으로 분할될 수 있음을 보여준다: 군 1(sdAbs 389 및 430), 군 2(sdAbs 353, 413 및 420), 및 군 3(sdAbs 348, 416, 424 및 426).

[0262] 항-CD33 sdAb CDR 부근에서 CD33 상의 아미노산 잔기를 예측하기 위해 *인 실리코* 모델링 실험으로 CD33 및 모델 항체를 도킹하였다. CDR로부터 2.5 내지 3.0 Å 이내의 CD33 아미노산을 돌연변이 유발을 위해 선택하였다. 잔기를 알라닌으로 돌연변이시키거나 반대 전하로 변화시키거나 극성에서 소수성 잔기로 변화시키거나 그 반대의 경우로 변화시켰다(도 4). 돌연변이체 CD33-GFP 작제물을 293FT 세포 내로 일시적으로 형질감염시키고, 형질감염 후 약 48시간 시점에 293FT 세포를 항-CD33 sdAb와 함께 인큐베이션하였다. FACS를 사용하여 돌연변이체 CD33-GFP 작제물에 대한 sdAb 결합을 검출하였다. 도 5의 예시적인 FACS 데이터를 참조하면, 살아있는 W22A CD33 293FT 세포(P1, 상단 좌측), 단일 비-이중 세포(상단 중간), GFP 양성 세포(상단 우측), 및 sdAb 348(하단 좌측) 및 hu195(하단 우측)에 대한 최종 CD33 돌연변이 결합의 세포 게이팅이 도시되어 있다. 표 2는 시험된 CD33 돌연변이체 및 시험한 10개의 sdAb에 대한 데이터를 나열하고; hu195를 대조군으로서 사용하였다. 'AEAD'는 sdAb가 결합하지 않거나 293FT 상에서 발현하지 않은 4중 돌연변이체 CD33이었다.

[0263] [표 2]

sdAb FACS 결합 데이터 파트 1

	M1 (W22A)	M2 (H45E)	M3 (N99A)	M4 (R122D)	M5 (AEAD)
hu195	99.33	99.63	99.52	99.63	0.26
348	8.08	2.54	81.86	1.43	0.41
353	99.38	98.82	99.44	98.52	0.31
389	99.33	84.41	96.96	6.01	0.16
420	98.41	91.54	98.93	97.75	0.15
430	99.42	99.34	99.3	98.37	0.79
413	76.42	5.93	96.84	75.96	0.81
416	1.25	96.59	98.72	99.32	0.24
424	80.12	97.33	3.43	98.6	0.07
426	99.5	97.71	99.48	95.9	1.2
429	99.12	65.5	98.98	21.14	0.12

표 2: sdAb FACS 결합 데이터 파트 2

	M6 (F43N)	M7 (R98D)	M8 (K52A)	M9 (Y49,50A)	M10 (Y127A)
hu195	99.44	98.43	99.52	94.37	92.45
348	95.31	0.48	91.24	0.39	98.45
353	98.97	98.78	97.31	0.64	96.27
389	98.26	21.5	0.15	97.36	97.21
420	98.29	74.79	8.64	34.63	98.11
430	98.8	98.52	97.07	1.01	94.21
413	97.54	97.05	91.37	0.79	90.18
416	97.87	98.6	98.91	99.12	98.91
424	98.57	97.16	95.36	0.23	83.71
426	99.15	99.11	96.79	1.25	96.09
429	97.58	97.09	66.08	0.22	93.93

표 2: sdAb FACS 결합 데이터 파트 3

	M11 (L78T)	M12 (G88S)	M13 (R91E)	M14 (E170R)	M15 (Q171A)
hu195	86.75	98.29	98.09	98.2	97.56
348	33.37	98.22	98.57	98.23	98.68
353	77.99	99.01	98.68	98.66	98.21
389	62.83	99.01	99.07	98.85	98.79
420	72.39	98.74	98.77	98.74	98.91
430	73.75	98.49	98.7	97.42	97.21
413	58.51	98.57	98.51	98.24	98.61
416	45.12	99.08	99.25	98.96	98.89
424	65.94	98.77	99.07	98.77	98.73
426	77.83	99.18	99.34	99.15	99.28
429	67.35	98.63	98.51	98.43	98.94

[0264]

표 2: sdAb FACS 결합 데이터 파트 4

	M16 (4889 전부)	M17 (F21Y)	M18 (353AAL)	M19 (348ATAI)	N20D
hu195	97.19	98.72	99.41	99.69	1.31
348	98.37	98.88	97.34	98.96	98.93
353	98.36	98.17	99.02	99.62	98.69
389	98.73	98.54	99.45	99.59	98.46
420	98.55	99.11	99.09	99.41	99.07
430	97.4	96.06	99.39	99.75	97.54
413	98.3	84.62	49.24	99.35	56.68
416	80.78	99.13	99.82	99.57	98.99
424	98.48	99.03	70.24	99.53	98.31
426	99.03	99.12	99.29	99.75	99.11
429	98.58	94.1	15.56	98.31	96.59

표 2: sdAb FACS 결합 데이터 파트 5

	JS23 (L23N)	JS24 (Q24E)	JS25 (V25M)	JS28 (S28L)	야생형
hu195	99.39	72.49	99.79	99.88	97.76
348	95.41	98.76	99.34	99.51	98.27
353	99.06	99.44	99.7	99.62	98.34
389	99.04	99.31	99.54	99.6	98.41
420	98.7	99.06	99.45	99.57	98.58
430	99.19	99.56	99.68	99.7	97.56
413	98.42	97.02	99.48	99.43	98.04
416	94.31	98.62	99.03	99.63	98.77
424	97.8	99.38	99.61	99.59	98.64
426	99.2	99.38	99.74	99.73	99.17
429	98.43	98.22	99.58	99.6	98.02

[0265]

[0266] 도 6은 표 2로부터의 sdAb 결합 데이터의 선택을 히트맵의 형태로 도시한다. sdAb가 CD33 점 돌연변이체에 대한 결합을 상실한 경우, 그 잔기는 결합에 중요한/중대한 것으로 결정하였다. 일부 실시예에서, 다수의 잔기는 에피토프를 형성하므로, 하나 이상의 잔기가 sdAb 결합에 중요할 수 있다.

[0267] 도 7 및 도 8은 지시된 항-CD33 sdAb의 결합에 중요한 것으로 결정된 아미노산을 강조하는 CD33의 구조 모델을 보여준다. 표 3은 아미노산 부위 데이터를 요약한 것이다.

표 3

[0268] sdAb CD33 결합 부위 요약

항체	아미노산
348	W22, H45, Y49, Y50, R98, R122
353	Y49, Y50, L78
389	K52, L78, R98, R122
420	Y49, Y50, K52, R98
413	N20, H45, Y49, Y50
416	W22
424	Y49, Y50, N99
426	Y49, Y50, L78
429	H45, Y49, Y50, K52, R122
430	Y59, Y50, L78

[0269] 예 4: T 세포 활성화 리포터 시스템 확립

[0270] 예시적인 핵산 작제물은 최소 NFAT-반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 분자 및 구성적 프로모터(예를 들어, EF1a)에 작동가능하게 연결된 제2 리포터 분자를 암호화하도록 설계하였다. 최소 NFAT-반응성 프로모

터는 TATA 박스 및 리포터 분자의 코딩 서열을 포함하는 최소 IL-2 프로모터의 상류에 6개의 NFAT 결합 부위를 함유하였다. 핵산은 당 기술분야에 공지된 종래의 방법을 사용하여 생산하였다.

[0271] 제1 핵산 작제물(EF1a_mOrange_IL-2_mTurq)은 구성적으로 활성인 E1F알파 프로모터의 제어 하의 mOrange 리포터 분자 및 최소 NFAT-반응성 프로모터의 제어 하의 mTurqoise 리포터 분자(mTurq)를 함유하였다. 제2 핵산 작제물(EF1a_mTurq_IL-2_mOrange)은 구성적으로 활성인 E1F알파 프로모터의 제어 하의 mTurqoise 리포터 분자 및 최소 NFAT-반응성 프로모터의 제어 하의 mOrange 리포터 분자를 함유하였다.

[0272] 2개의 IL-2 리포터 세포주를 렌티바이러스 벡터를 Jurkat 세포로 형질도입하여 생성하였다. $1x10^6$ 세포/mL을 2 μL의 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA) 및 이오노마이신(예를 들어, T-세포 활성화 칵테일, 예를 들어 BioLegend 활성화 칵테일 참조)을 사용하여 24시간 동안 활성화시키고, 각각의 리포터 분자 및 T 세포 활성화의 지표인 CD69의 발현에 대해 유세포 분석법을 사용하여 평가하였다. 도 9a 및 도 9b에 도시된 바와 같이, 최소 NFAT-반응성 프로모터의 제어 하에 있는 리포터 분자의 발현은 세포가 활성화되지 않은 경우 최소로 검출되었고, 이는 세포가 PMA/이오노마이신으로 활성화된 경우 유의하게 증가하였다. 대조적으로, EF1a(구성적 프로모터)의 제어 하에 있는 리포터 분자의 발현은 세포 활성화의 존재 및 부재에서 검출하였다. 최소 NFAT-반응성 프로모터의 제어 하에 있는 리포터 분자의 발현을 EF1a(구성적 프로모터)의 제어 하에 있는 리포터 분자의 발현에 대해 정규화하였다. 도 9c를 참조한다.

[0273] 이들 결과는, 최소 NFAT-반응성 프로모터가 활성화될 때 리포터 분자의 발현을 유도함을 나타낸다. EF1a(구성적 프로모터)의 제어 하에 있는 리포터 분자의 발현에 비해, 최소 NFAT-반응성 프로모터의 제어 하에 있는 리포터 분자의 발현은 작제물 간의 임의의 상이한 형질도입 효율과 같은 인자를 설명하기 위해 발현을 정규화하는 수단을 제공한다.

[0274] 예 5: 리포터 시스템을 사용하여 CAR 작제물을 평가하는 단계

[0275] 예 2에 기술된 바와 같이, CD33을 표적화하도록 CAR 작제물을 설계하였다. Siglec(시알산-결합 면역글로불린-유사 렉틴)으로도 알려진 CD33은 세포-세포 상호작용을 매개하고 휴지 상태에서 면역 세포를 유지하는 역할을 한다. CD33은 모세포 위기에서 대부분의 AML 모세포 및 만성 골수성 백혈병 표면에서 발현된다. 이는 또한 T 세포 급성 림프구성 백혈병의 하위 집합에서 비정상적으로 발현된다. 정상 조직 발현은 정상 골수 세포로 제한된다. 현재, CD33을 표적으로 하는 요법으로 AML을 치료하는 것이 효과적일 수 있지만, 이러한 요법은 정상적인 혈액 및 골수에 대한 독성으로 인해 유용성이 제한될 수 있다. 본원에 기술된 방법은 CAR 작제물의 활성 및 기능과 같은 CAR 작제물의 비교뿐만 아니라, 원하는 특성(예를 들어, T 세포의 활성화 수준)을 갖는 CAR 작제물을 식별하기 위한 고처리량 스크리닝 방법을 허용한다. 예시적인 CAR 작제물은 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, PCT 공개 번호 WO 2019/178382 A1호뿐만 아니라 Kenderian, 외 *Leukemia* (2015) 29: 1637-1647을 참조한다.

[0276] 예시적인 핵산 작제물 EF1a_mOrange_IL-2_mTurq 또는 EF1a_mTurq_IL-2_mOrange를 함유하는 리포터 세포를 예 2에 기술된 바와 같이 생성하였다. 세포를 표 1 및 표 5에 나타낸 8개의 상이한 CD33 CAR로 형질도입하였다. 세포를 야생형 MOLM-13 세포(CD33+) 또는 CD33에 대해 결핍된 MOLM-13 세포(MOLM-13 CD33KO)와 함께 24시간 동안 공동 배양하였다.

[0277] 공동 배양 후, 리포터 분자의 발현을 유세포 계측법으로 평가하였다. 세포를 EF1a 프로모터에 연결된 형광 마커를 나타내는(displaying) Jurkat 세포 상에서 사전 게이팅하였으며, 이는 핵산 작제물로 형질도입되고 작제물을 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 다음으로, 구성적-형광-양성 세포(예를 들어, EF1a_mOrange_IL-2_mTurq로 형질도입된 세포, mOrange-양성 세포의 백분율로서 mTurq의 발현)의 백분율로서 IL2 연결된 형광 리포터의 발현을 각 CD33 CAR 작제물에 대한 각 공동 배양에서 결정하였다. CD33 CAR의 활성(CD33-특이적 활성화)을 결정하기 위해 MOLM-13 CD33KO 세포의 존재 하에 공동-배양했을 때의 NFAT-유도성 리포터의 발현에 비해 야생형 MOLM-13 세포의 존재 하에 공동-배양했을 때의 NFAT-유도성 리포터의 발현에 대한 비율을 결정하였다. 표 4를 참조한다.

[0278] 결과는 IL-2 리포터 시스템 세포가 CAR 작제물의 활성을 비교하기 위한 객관적이고 신뢰성 있는 리포터 시스템으로서 사용될 수 있음을 나타낸다. 구성적으로 발현되는 리포터 분자의 발현을 평가하면 변경된 전달 효율로 인한 잠재적으로 잘못된 결과를 제거하고 리포터 작제물의 성공적인 전달을 확인한다. 활성화된 세포에서만 유도되는 리포터 분자의 발현은 CAR 작제물에 의한 항원 인식 및 CAR 작제물의 활성을 나타낸다.

표 4

[0279] 표 1 항-CD33-CAR 대한 T 세포 활성화 결과

CD33CAR	기준선 FP2 발현 (CD33KO)	FP2 발현 테스트 (CD33+)	비율
1	해당 없음	해당 없음	해당 없음
2	4.67	27.79	5.95
3	2.7	3.9	1.44
4	1.72	4.14	2.41
5	3.32	28.21	8.50
6	6.36	22.89	3.60
7	8.87	17.55	1.98
8	5.01	29.36	5.86

[0280] 결과는 본 개시내용의 항-CD33 항체를 포함하는 항-CD33 CAR(CD33 CAR 5 내지 8)이 적어도 하나의 이전에 공지된 항-CD33 CAR보다 큰 T 세포 활성화 활성을 나타냄을 도시한다. 항-CD33-CAR5는 시험된 모든 항-CD33 CAR의 가장 높은 T 세포 활성화 활성을 나타냈다. 이들 결과는 CD33-발현 암을 표적으로 하는 CAR T 치료제의 구성에서 본 개시내용의 항-CD33 CAR의 가능성을 입증한다.

[0281] 8개의 CD33 CAR이 T 세포를 활성화하는 정도를 NFAT-유도성 형광의 배수 증가(도 10, 표 5의 데이터), NFAT-유도성 형광의 절대 변화(ΔFP2)(도 11), 및 형질도입된 Jurkat 세포가 CD33 CAR을 발현하는 정도(표 4)를 조사함으로써 추가로 평가하였다. 대조군으로서, 공지된 공동자극제 또는 공동-억제제(OX40, ICOS, TIM3, 또는 CD28에 대한 VH/VL)를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 EF1a_mOrange_IL-2_mTurq 또는 EF1a_mTurq_IL-2_mOrange 작제물로 이전에 형질도입된 Jurkat 세포 내로 형질도입하였다.

표 5

[0282] 시험된 CAR에서 FP2의 배수 및 델타 증가

CAR #	EF1a_mOrange_IL-2_mTurq (배수 증가)	EF1a_mTurq_IL-2_mOrange (배수 증가)	EF1a_mOrange_IL-2_mTurq (델타)	EF1a_mTurq_IL-2_mOrange (델타)
1	0.182770672	0.36735279	0.06768948	0.06560674
2	0.060681329	0.029963018	0.09615783	0.11017492
3	0.064981794	0.224606151	0.3825048	0.07078721
4	0.337347505	0.131762658	0.41099215	0.48320023
5	0.43677822	0.046825787	0.09053537	0.04881308
6	0.675153525	0.482256984	0.15073833	0.12741785
7	0.097575115	0.270767959	0.26618319	0.52298681
8	0.437212356	0.475518004	0.13344737	0.18178983

[0283] 도 10 및 도 11의 결과는 본 개시내용의 항-CD33 항체 또는 이의 단편을 사용하여 생성된 CAR이 CAR-IRS 분석법에서 T 세포 활성화 활성을 다양한 정도로 나타낸다는 것을 보여준다. 예를 들어, 항-CD33-CAR5는 높은 FP2 배수 증가를 나타내며(도 10), 이는 시험된 다른 CAR보다 더 높은 T 세포 활성화 활성을 시사한다.

[0284] **예시적인 서열**

[0285] ***항-CD33 단일-도메인 항체 서열***

[0286] 본원에서 사용되는 바와 같이, sdCD33_2로 지칭되는 항체는 또한 "348" 또는 "sdAb348"로 지칭될 수 있다. sdCD33_3으로 지칭되는 항체는 또한 "353" 또는 "sdAb353"으로 지칭될 수 있다. sdCD33_4로 지칭되는 항체는 "389" 또는 "sdAb389"로 지칭될 수 있다. sdCD33_5로 지칭되는 항체는 "413" 또는 "sdAb413"으로 지칭될 수 있다. sdCD33_6으로 지칭되는 항체는 "416" 또는 "sdAb416"으로 지칭될 수 있다. sdCD33_7로 지칭되는 항체는 "420" 또는 "sdAb420"으로 지칭될 수 있다. sdCD33_8로 지칭되는 항체는 "424" 또는 "sdAb424"로 지칭될 수 있다. sdCD33_9로 지칭되는 항체는 "426" 또는 "sdAb426"으로 지칭될 수 있다. sdCD33_10으로 지칭되는 항체는 "429" 또는 "sdAb429"로 지칭될 수 있다. sdCD33_11로 지칭되는 항체는 "430" 또는 "sdAb430"으로 지칭될 수 있다.

[0287] *중쇄 가변 영역 서열*

[0288] sdCD33_1

sdCD33_1

V-D-J 영역	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTLRRYRMGWFRQALGKEREFVAGFTWSGGYAYADSVKGRFAISGDNAKNTGYLQMNSLKPEDTAVYYCALSRQVSLGPGPPNFDYWGQGTQVTVSS (**서열번호 1**)
중쇄 FR1	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAAS (**서열번호 2**)
중쇄 CDR1	GRTLRRYR (**서열번호 3**)
중쇄 FR2	MGWFRQALGKEREFVAG (**서열번호 4**)
중쇄 CDR2	FTWSGGY (**서열번호 5**)
중쇄 FR3	AYADSVKGRFAISGDNAKNTGYLQMNSLKPEDTAVYYC (**서열번호 6**)
중쇄 CDR3	ALSRQVSLGPGPPNFDY (**서열번호 7**)
중쇄 FR4	WGQGTQVTVSS (**서열번호 8**)

[0289]

[0290] sdCD33_2

V-D-J 영역	QVQLVQPGGSLRLFCVASEEFFSIYAMGWYRQAPGKQHEMVARFTRDGKITYADSAKGRFTITRDAKNTLNLQMNGLIPEDTAVYYCNINHYWGQGTQVTVSS (**서열번호 9**)
중쇄 FR1	QVQLVQPGGSLRLFCVAS (**서열번호 10**)
중쇄 CDR1	EEFFSIYA (**서열번호 11**)
중쇄 FR2	MGWYRQAPGKQHEMVAR (**서열번호 12**)
중쇄 CDR2	FTRDGKI (**서열번호 13**)
중쇄 FR3	TYADSAKGRFTITRDAKNTLNLQMNGLIPEDTAVYYC (**서열번호 14**)
중쇄 CDR3	NINHY (**서열번호 15**)
중쇄 FR4	WGQGTQVTVSS (**서열번호 16**)

[0291]

[0292] sdCD33_3

V-D-J 영역	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGNIDRFYAMGWYRQA PGKQRELVAQLTNNEITTYGDSVEGQFSISGDFDANTVYL QMDSLKPEDTAVYYCHAHVTTTRWSQDYYWGQGTRVTV SS (서열번호 17)
중쇄 FR1	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVS (서열번호 18)
중쇄 CDR1	GNIDRFYA (서열번호 19)
중쇄 FR2	MGWYRQAPGKQRELVAQ (서열번호 20)
중쇄 CDR2	LTNNEIT (서열번호 21)
중쇄 FR3	TYGDSVEGQFSISGDFDANTVYLQMDSLKPEDTAVYYC (서열번호 22)
중쇄 CDR3	HAHVTTTRWSQDYY (서열번호 23)
중쇄 FR4	WGQGTRVTVSS (서열번호 24)

[0293]

[0294] sdCD33_4

V-D-J 영역	QVKLEESGGGSVQAGESLRLSCTASGITFRDYDIDWYRQAP GKEREWLATITPSGTTHYPDSVKGRATISRDSAKNTVYLQ MNSLKPEDTARYECNTLAYWGSGTQVTVSS (서열번호 25)
중쇄 FR1	QVKLEESGGGSVQAGESLRLSCTAS (서열번호 26)
중쇄 CDR1	GITFRDYD (서열번호 27)
중쇄 FR2	IDWYRQAPGKEREWLAT (서열번호 28)
중쇄 CDR2	ITPSGTT (서열번호 29)
중쇄 FR3	HYPDSVKGRATISRDSAKNTVYLQMNSLKPEDTARYEC (서열번호 30)
중쇄 CDR3	NTLAY (서열번호 31)
중쇄 FR4	WGSGTQVTVSS (서열번호 32)

[0295]

[0296] sdCD33_5

V-D-J 영역	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFSIYAMAWYRQA PGKQRELVAVITSGGATNYADSVKGRFTISRDIAKKTLYLQ MNTLKPEDTAVYYCYAHLLIQPFDRFYDYWGQGTQVTVSS (서열번호 33)
중쇄 FR1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열번호 34)
중쇄 CDR1	GSVFSIYA (서열번호 35)
중쇄 FR2	MAWYRQAPGKQRELVAV (서열번호 36)
중쇄 CDR2	ITSGGAT (서열번호 37)
중쇄 FR3	NYADSVKGRFTISRDIAKKTLYLQMNTLKPEDTAVYYC (서열번호 38)
중쇄 CDR3	YAHLLIQPFDRFYDY (서열번호 39)
중쇄 FR4	WGQGTQVTVSS (서열번호 40)

[0297]

[0298] sdCD33_6

V-D-J 영역	EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCVVSGSMSSIYSMSWYRQPPGKQRELVAHITTTGTTNYIDSVKGRFTISIDNDINVIYLQMNTLKPEDTAVYYCNAGLKAGPGPRLDYWGLGTQVTVSS (서열번호 41)
중쇄 FR1	EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCVVS (서열번호 42)
중쇄 CDR1	GSMSSIYS (서열번호 43)
중쇄 FR2	MSWYRQPPGKQRELVAH (서열번호 44)
중쇄 CDR2	ITTTGTT (서열번호 45)
중쇄 FR3	NYIDSVKGRFTISIDNDINVIYLQMNTLKPEDTAVYYC (서열번호 46)
중쇄 CDR3	NAGLKAGPGPRLDY (서열번호 47)
중쇄 FR4	WGLGTQVTVSS (서열번호 48)

[0299]

[0300] sdCD33_7

V-D-J 영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFKDYGMTWVRQAPGKALEWVSDINSAGDGIYYSDSVKGRFTISRDDSKGTLYLQMNSLTPEDTAIYYCAAERQRAGDVKRSLAPITAHIWGQGTQVTVSS (서열번호 49)
중쇄 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS (서열번호 50)
중쇄 CDR1	GFTFKDYG (서열번호 51)
중쇄 FR2	MTWVRQAPGKALEWVSD (서열번호 52)
중쇄 CDR2	INSAGDGI (서열번호 53)
중쇄 FR3	YYSDSVKGRFTISRDDSKGTLYLQMNSLTPEDTAIYYC (서열번호 54)
중쇄 CDR3	AAERQRAGDVKRSLAPITAHI (서열번호 55)
중쇄 FR4	WGQGTQVTVSS (서열번호 56)

[0301]

[0302] sdCD33_8

V-D-J 영역	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGAFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAIAWTGTHTYYSDSVKGRFTISRDNDKNTVFLQMNSLKPEDTAVYYCAQASSRYRAVTDSLSENHWGPGTQVTVST (서열번호 57)
중쇄 FR1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS (서열번호 58)
중쇄 CDR1	GGAFSTYT (서열번호 59)
중쇄 FR2	MGWFRQAPGKEREFVAA (서열번호 60)
중쇄 CDR2	IAWTGTHT (서열번호 61)
중쇄 FR3	YYSDSVKGRFTISRDNDKNTVFLQMNSLKPEDTAVYYC (서열번호 62)
중쇄 CDR3	AQASSRYRAVTDSLSENH (서열번호 63)
중쇄 FR4	WGPGTQVTVST (서열번호 64)

[0303]

[0304] sdCD33_9

V-D-J 영역	QVKLEESGGGLVRAGGSLRLSCAASGGTFSTYAMAWFRQAPGKEREFVAAITWGGGSTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTGVLQMNNLDVDDTAVYYCYAFGRSRAGDANGDYWGQGTQVTVSS (서열번호 65)
중쇄 FR1	QVKLEESGGGLVRAGGSLRLSCAAS (서열번호 66)
중쇄 CDR1	GGTFSTYA (서열번호 67)
중쇄 FR2	MAWFRQAPGKEREFVAA (서열번호 68)
중쇄 CDR2	ITWGGGST (서열번호 69)
중쇄 FR3	YYEDSVKGRFTISRDNAKNTGVLQMNNLDVDDTAVYYC (서열번호 70)
중쇄 CDR3	YAFGRSRAGDANGDY (서열번호 71)
중쇄 FR4	WGQGTQVTVSS (서열번호 72)

[0305]

[0306] sdCD33_10

V-D-J 영역	QVQLVETGGGLVRAGGSLRLSCAASGRTADIYNIGWFRQAPGKEREFVAAITWIGRTPYYADAVKGRFAFSTDSAKNTVSLQMDNLKPEDTGVYYCNAAHYLEGNTDYYWGQGTQVTVSS (서열번호 73)
중쇄 FR1	QVQLVETGGGLVRAGGSLRLSCAAS (서열번호 74)
중쇄 CDR1	GRTADIYN (서열번호 75)
중쇄 FR2	IGWFRQAPGKEREFVAA (서열번호 76)
중쇄 CDR2	ITWIGRTP (서열번호 77)
중쇄 FR3	YYADAVKGRFAFSTDSAKNTVSLQMDNLKPEDTGVYYC (서열번호 78)
중쇄 CDR3	NAAHYLEGNTDYY (서열번호 79)
중쇄 FR4	WGQGTQVTVSS (서열번호 80)

[0307]

[0308] sdCD33_11

V-D-J 영역	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGDTFANYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDSSTHYADSVKGRFTIPRDNAKNAVYLQMDQLKPEDMAVYYCYAYIRGVGEVRYVDYWGQGTQVTVSS (서열번호 81)
중쇄 FR1	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS (서열번호 82)
중쇄 CDR1	GDTFANYA (서열번호 83)
중쇄 FR2	MGWFRQAPGKEREFVAA (서열번호 84)
중쇄 CDR2	ISWSDSST (서열번호 85)
중쇄 FR3	HYADSVKGRFTIPRDNAKNAVYLQMDQLKPEDMAVYYC (서열번호 86)
중쇄 CDR3	YAYIRGVGEVRYVDY (서열번호 87)
중쇄 FR4	WGQGTQVTVSS (서열번호 88)

[0309]

[0310] [표 4]

[0311] 예 3에서 시험된 sdAb 및 그 안에 포함된 예시적인 서열

예시적인 서열 명칭	예 3의 sdAb
sdCD33_1	Hu195
sdCD33_2	348
sdCD33_3	353
sdCD33_4	389
sdCD33_5	413
sdCD33_6	416
sdCD33_7	420
sdCD33_8	424
sdCD33_9	426
sdCD33_10	429
sdCD33_11	430

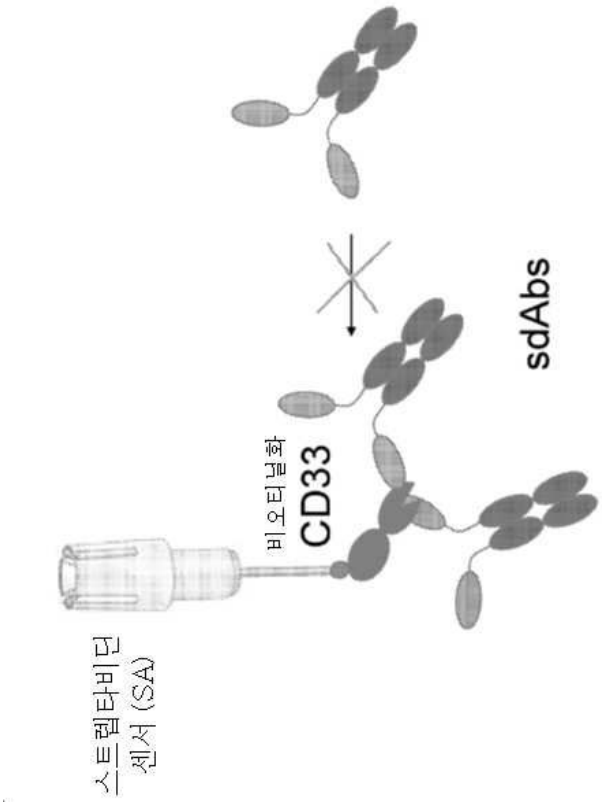
[0312]

[0313] **균등물**

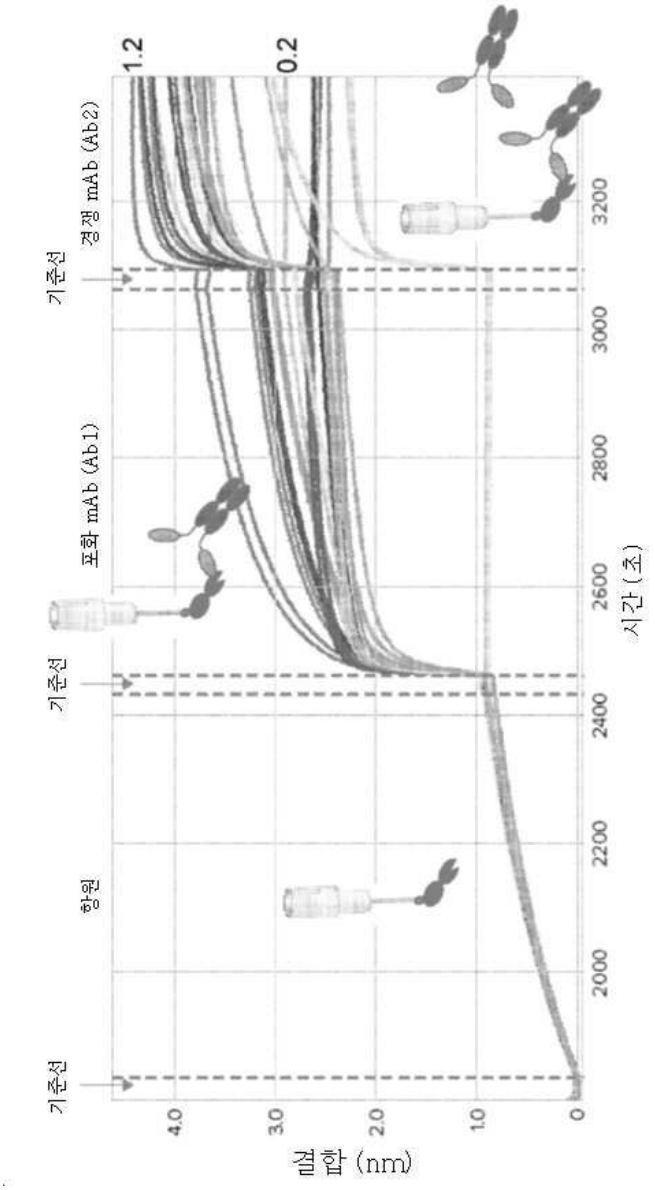
[0314] 본 발명이 본 발명의 상세한 설명과 함께 설명되었지만, 전술한 설명은 첨부된 청구범위의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범주를 예시하고 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다. 다른 측면, 장점, 및 변형은 다음의 청구범위의 범주 내에 있다.

도면

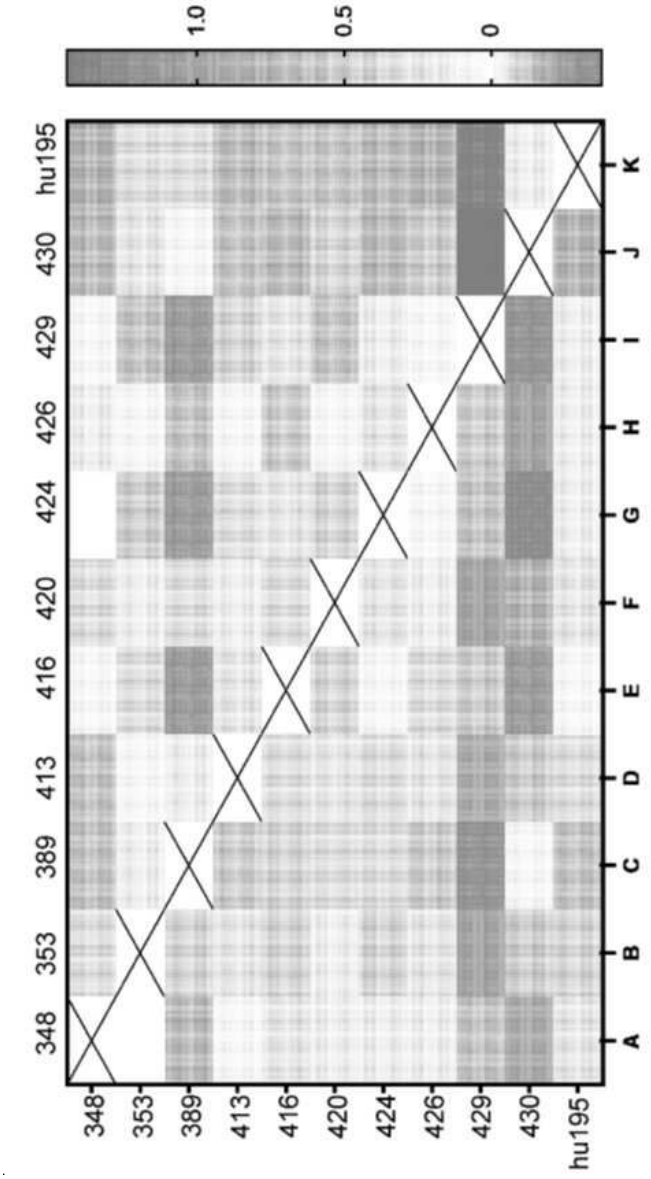
도면1



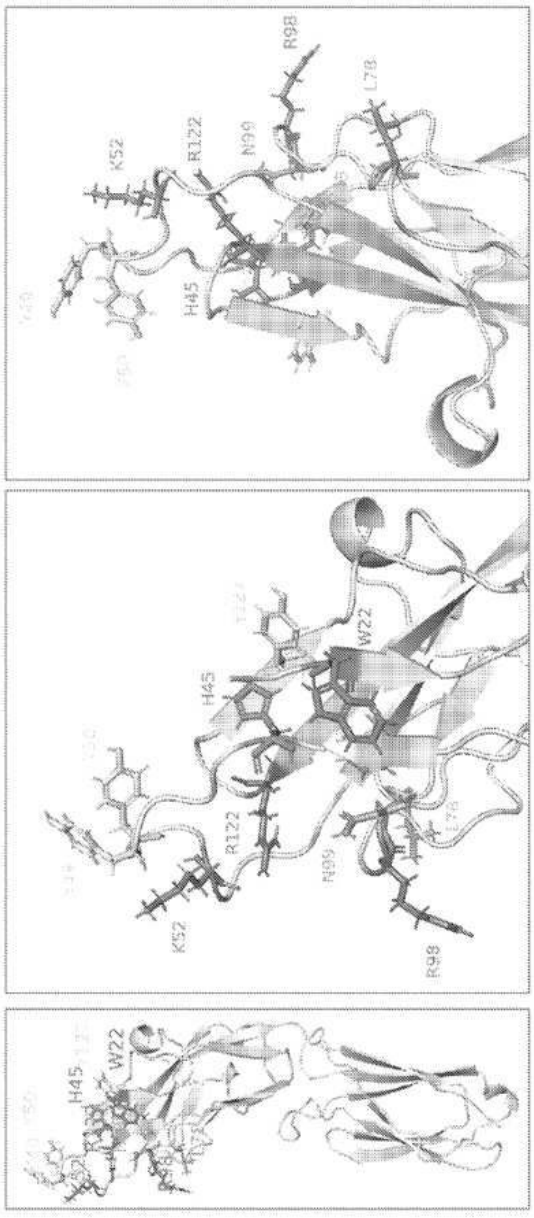
도면2


1.2
0.2
기준선
경쟁 mAb (Ab2)
기준선
포획 mAb (Ab1)
기준선
항원
기준선
4.0
3.0
2.0
1.0
0
결합 (nm)
2000
2200
2400
2600
2800
3000
3200
시간 (초)

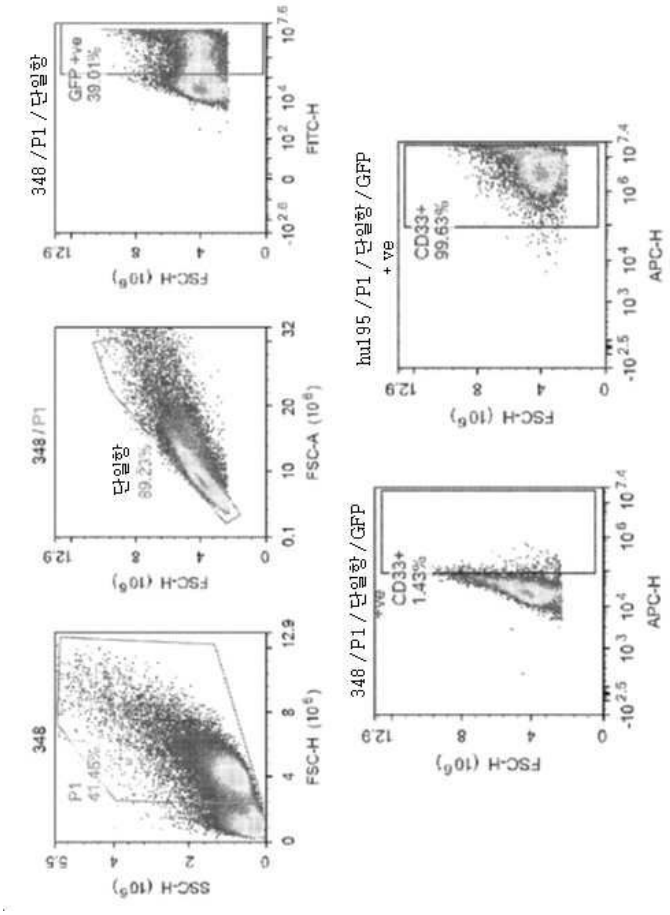
도면3


1.0
0.5
0
348
353
389
413
416
420
424
426
429
430
hu195
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K

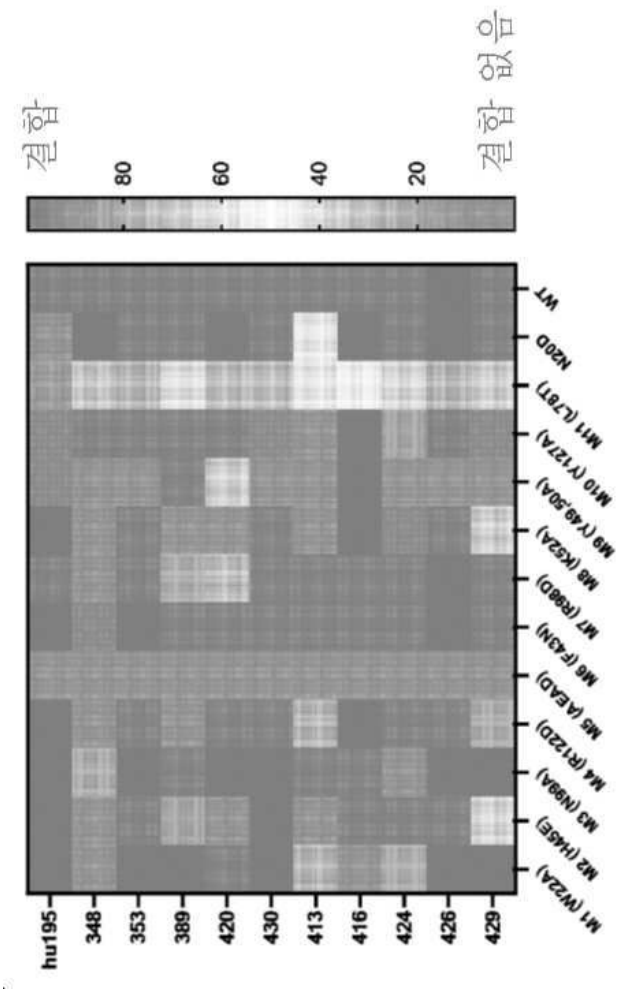
도면4



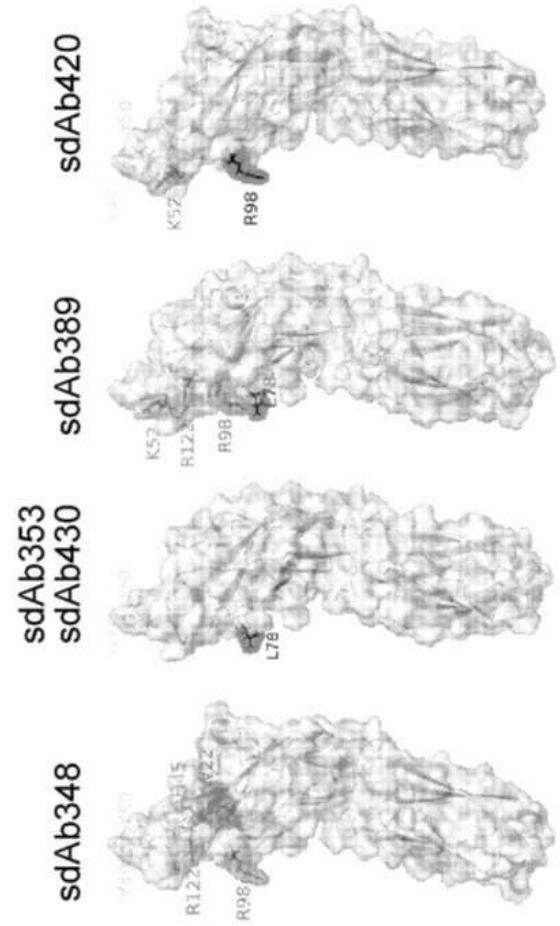
도면5


348
P1
41.45%
SSC-H (10⁵)
FSC-H (10⁵)
348/P1
단일항
89.23%
FSC-A (10⁵)
348/P1/단일항
GFP +ve
39.01%
FITC-H
348/P1/단일항/GFP
CD33+
1.43%
APC-H
hu195/P1/단일항/GFP
+ve
CD33+
99.63%
APC-H

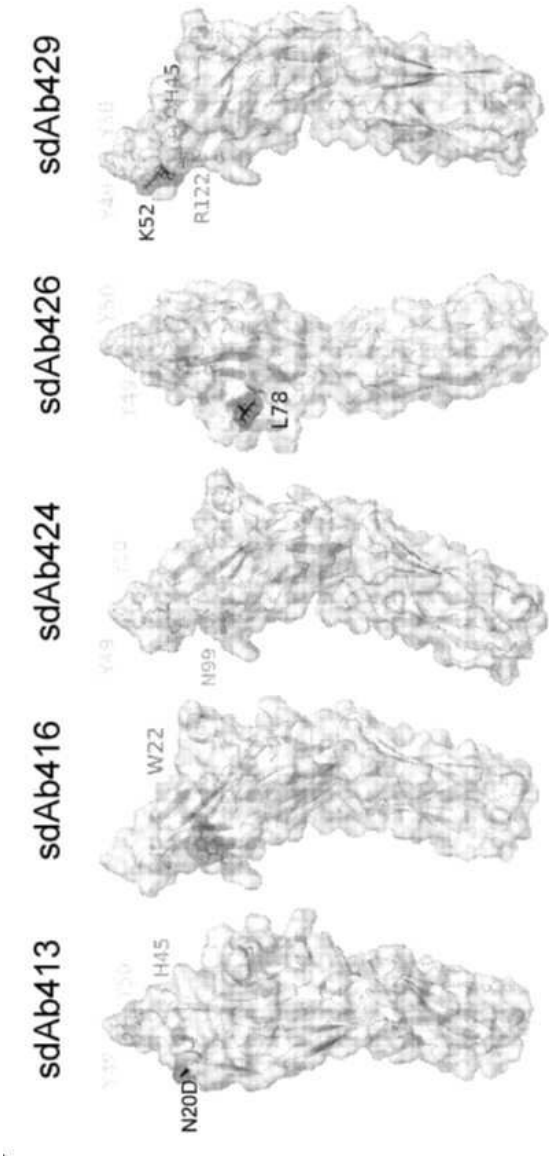
도면6


결합
80
60
40
20
결합 없음
hu195
348
353
389
420
430
413
416
424
426
429
M1 (W22A)
M2 (H46E)
M3 (N89A)
M4 (R122D)
M5 (A6AD)
M6 (F43N)
M7 (R98D)
M8 (K52A)
M9 (Y49,50A)
M10 (Y127A)
M11 (L78T)
N20D
WT

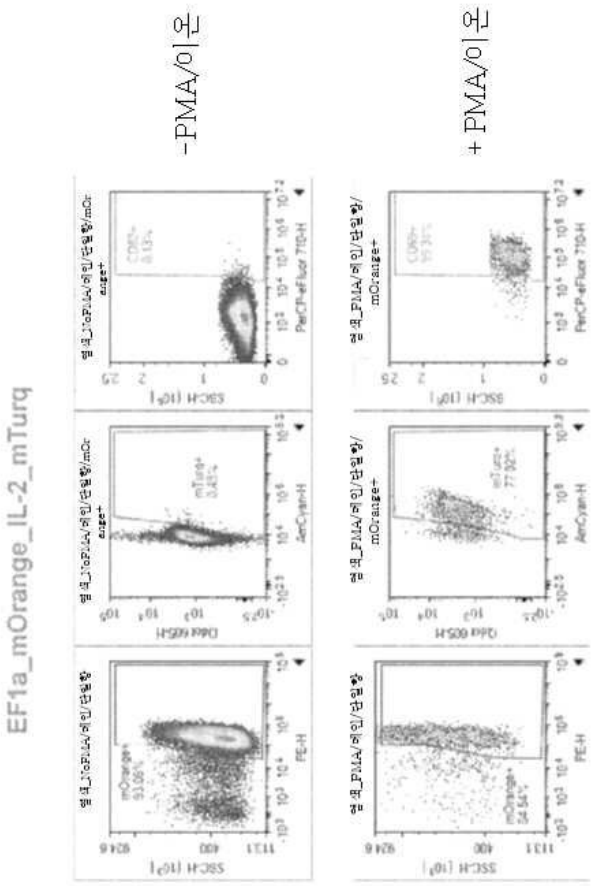
도면7



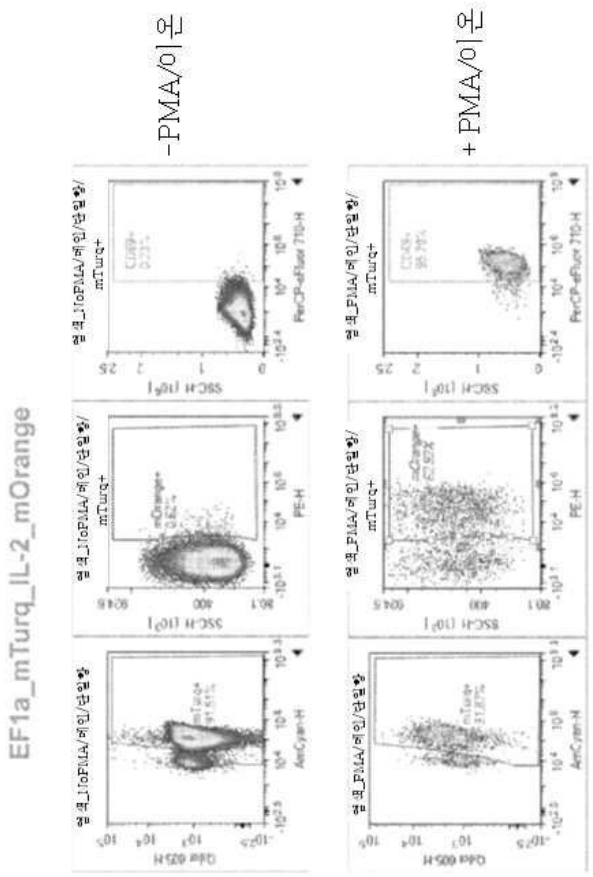
도면8


sdAb429
H45
K52
R122
sdAb426
L78
sdAb424
N99
sdAb416
W22
sdAb413
H45
N20D

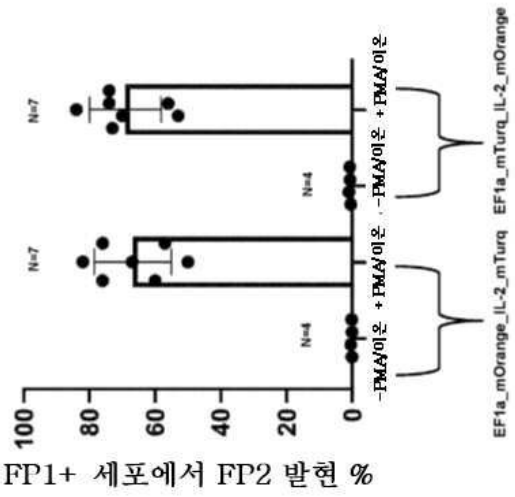
도면9a



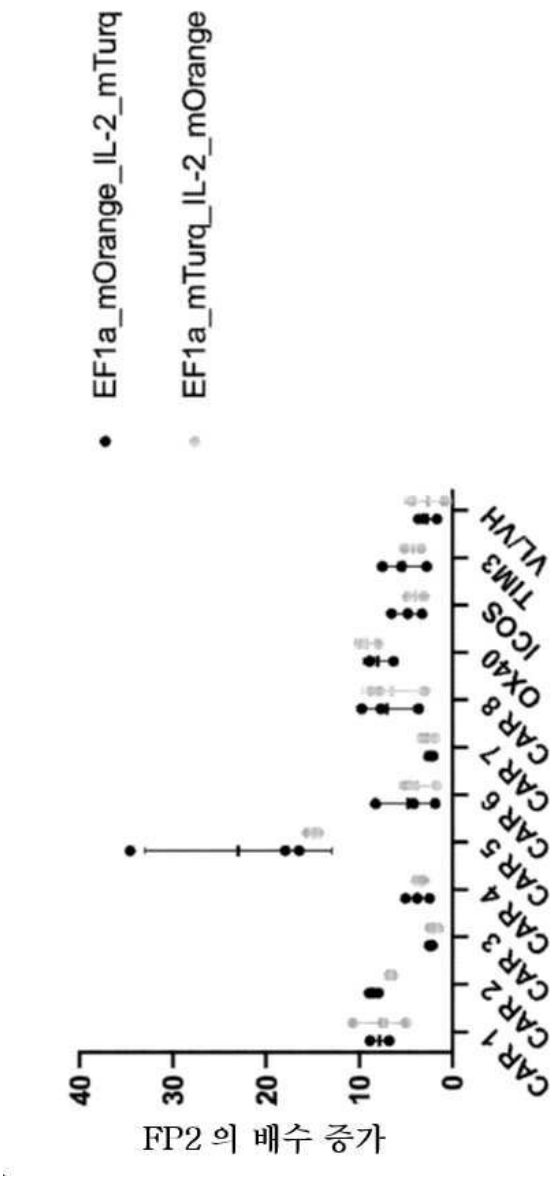
도면9b


-PMA/이온
+ PMA/이온
EF1a_mTurq_IL-2_mOrange

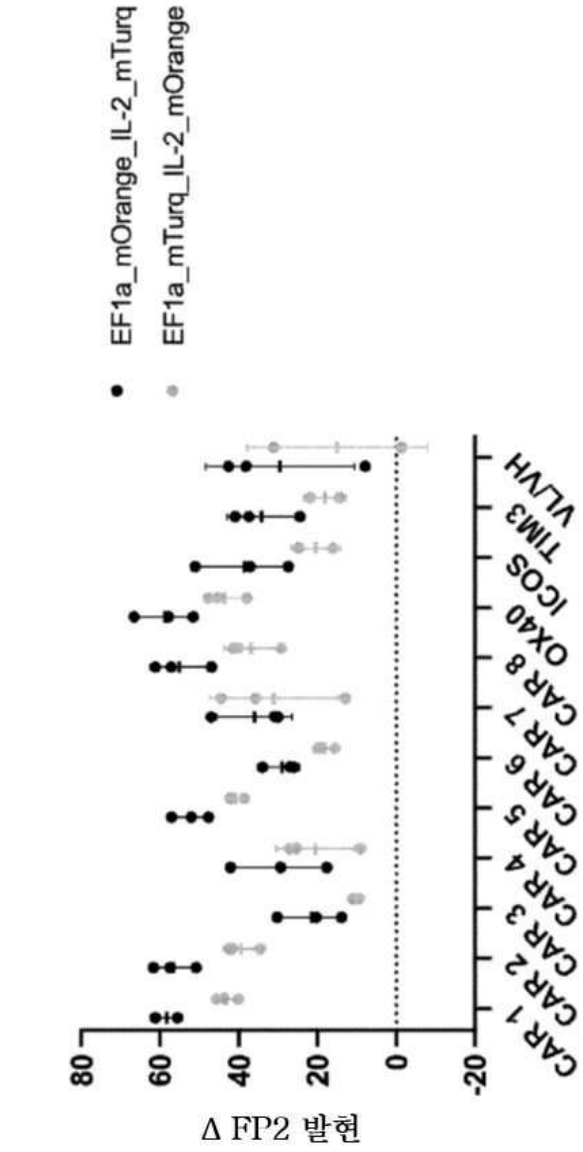
도면9c


100
80
60
40
20
0
N=7
N=4
N=7
N=4
-PMA/이온
+PMA/이온
-PMA/이온
+PMA/이온
EF1a_mOrange_IL-2_mTurq
EF1a_mTurq_IL-2_mOrange
FP1+ 세포에서 FP2 발현 %

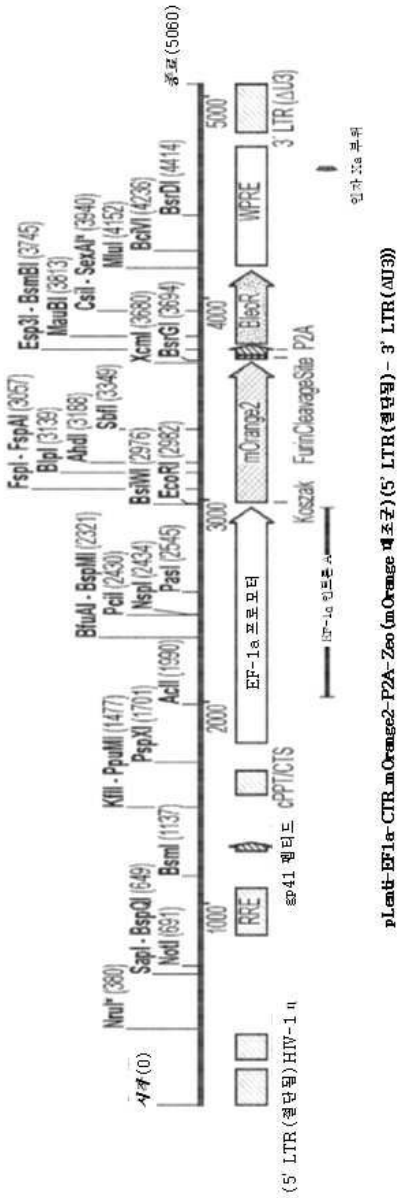
도면10


EF1a_mOrange_IL-2_mTurq
EF1a_mTurq_IL-2_mOrange
FP2 의 배수 증가
40
30
20
10
0
CAR 1
CAR 2
CAR 3
CAR 4
CAR 5
CAR 6
CAR 7
CAR 8
OX40
ICOS
TIM3
VL/VH

도면11

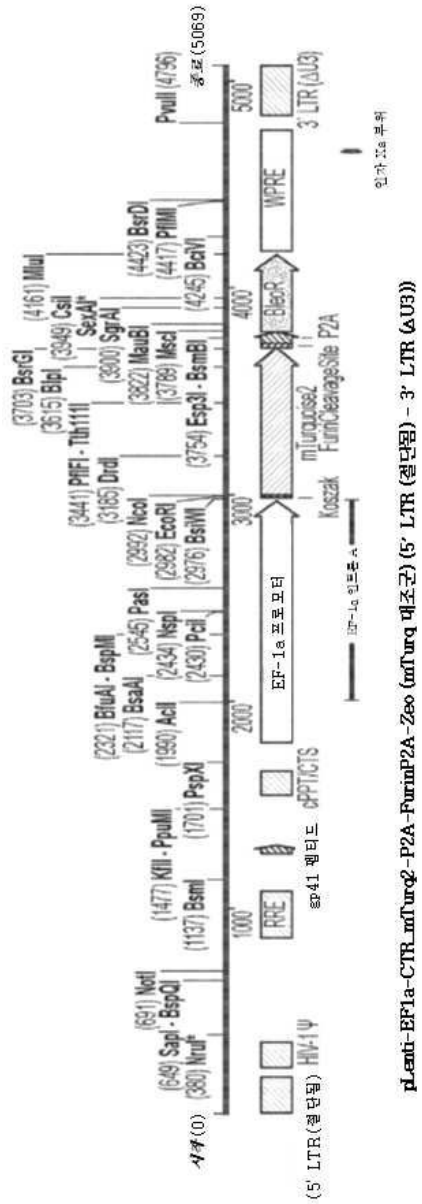

EF1a_mOrange_IL-2_mTurq
EF1a_mTurq_IL-2_mOrange
80
60
40
20
0
-20
CAR 1
CAR 2
CAR 3
CAR 4
CAR 5
CAR 6
CAR 7
CAR 8
OX40
ICOS
TIM3
VL/VH
Δ FP2 발현

도면12a



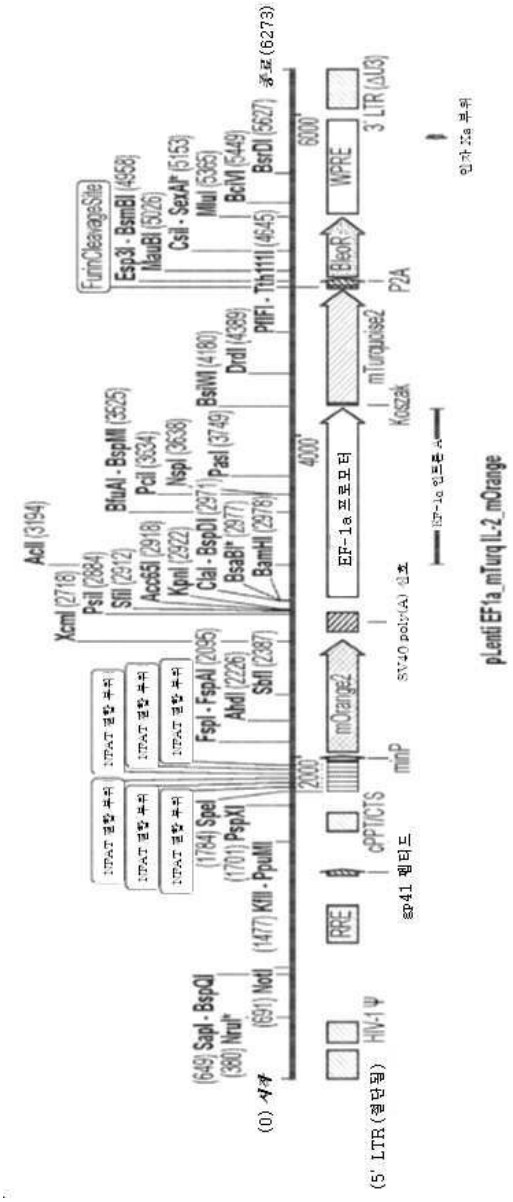
종료(5060)
시작(0)
Nrul* (380)
SapI - BspQI (649)
NotI (691)
BsmI (1137)
KfII - PpuMI (1477)
PspXI (1701)
AclI (1990)
BfuAI - BspMI (2321)
PciI (2430)
NspI (2434)
PasI (2545)
FspI - FspAI (3057)
BlpI (3139)
AhdI (3188)
SbfI (3349)
BsiWI (2976)
EcoRI (2982)
Esp3I - BsmBI (3745)
MauBI (3813)
CsiI - SexAI* (3940)
MluI (4152)
XcmI (3680)
BsrGI (3694)
BcWI (4236)
BsrDI (4414)
1000
2000
3000
4000
5000
RRE
cPPT/CTS
EF-1a 프로모터
mOrange2
BleoR
WPRE
3' LTR (ΔU3)
Koszak
FurinCleavageSite
P2A
(5' LTR(절단됨)HIV-1 η
sp41 펩티드
EF-1a 인트론 A
인가 Xa 부위
pLenti-EF1a-CTR_mOrange2-P2A-Zeo (mOrange 대조군)(5' LTR(절단됨) - 3' LTR(ΔU3))

도면12b

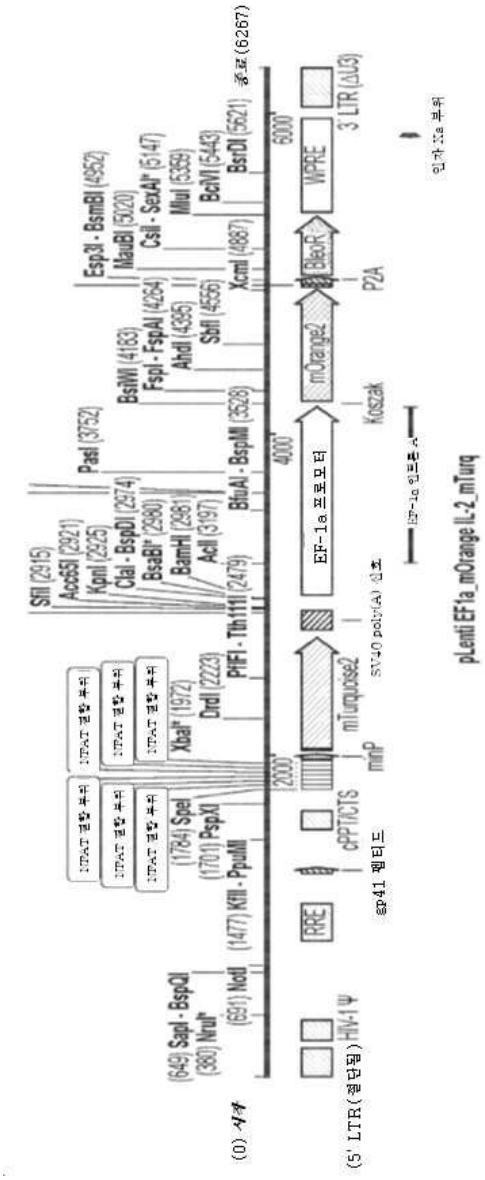


pLenti-EF1a-CTR_mTurq2-P2A-FurinP2A-Zeo (mTurq 대조군) (5' LTR (절단됨) - 3' LTR (ΔU3))

도면13a


(0) 시작
(649) SapI - BspQI
(380) NruI*
(691) NotI
(1477) KfII - PpuMI
(1784) SpeI
(1701) PspXI
INTAT 결합 부위
INTAT 결합 부위
INTAT 결합 부위
INTAT 결합 부위
INTAT 결합 부위
INTAT 결합 부위
FspI - FspAI (2095)
AhdI (2226)
SbfI (2387)
XcmI (2718)
PsiI (2884)
SfiI (2912)
AccI (3194)
Acc65I (2918)
KpnI (2922)
ClaI - BspDI (2971)
BsaBI* (2977)
BamHI (2978)
BfuAI - BspMI (3525)
PciI (3634)
NspI (3638)
PasI (3749)
BsiWI (4180)
DrdI (4389)
PflFI - Tth111I (4645)
FurinCleavageSite
Esp3I - BsmBI (4958)
MauBI (5026)
CsiI - SexAI* (5153)
MluI (5365)
BciVI (5449)
BsrDI (5627)
종료 (6273)
2000
4000
6000
(5' LTR (절단됨)
HIV-1 Ψ
RRE
gp41 펩티드
cPPT/CTS
mOrange2
minP
SV40 poly(A) 신호
EF-1a 프로모터
EF-1a 인트론 A
Koszak
mTurquoise2
P2A
BleoR
WPRE
3' LTR (ΔU3)
인가 Xa 부위
pLenti EF1a_mTurq IL-2_mOrange

도면13b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> VOR BIOPHARMA, INC.

<120> SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AGAINST CD33

<130> V0291.70030WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 63/078,134

<151> 2020-09-14

<160> 111

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Arg Arg Tyr
20 25 30

Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Leu Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Gly Phe Thr Trp Ser Gly Gly Tyr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Ala Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Leu Ser Arg Gln Val Ser Leu Gly Pro Gly Pro Pro Asn Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Gly Arg Thr Leu Arg Arg Tyr Arg

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Leu Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Phe Thr Trp Ser Gly Gly Tyr

1 5

<210> 6

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Gly Asp Asn

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

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

1 5 10 15

Tyr

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Phe Cys Val

1 5 10 15

Ala Ser Glu Glu Phe Phe Ser Ile Tyr Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln

20 25 30

Ala Pro Gly Lys Gln His Glu Met Val Ala Arg Phe Thr Arg Asp Gly
35 40 45
Lys Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg
50 55 60

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

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 10
Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Phe Cys Val
1 5 10 15

Ala Ser

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 11
Glu Glu Phe Phe Ser Ile Tyr Ala
1 5
<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 12

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln His Glu Met Val Ala
1 5 10 15
Arg

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223
> Synthetic

<400> 13

Phe Thr Arg Asp Gly Lys Ile
1 5

<210> 14

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

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

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

Asn Ile Asn His Tyr
1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Val Ser Gly Asn Ile Asp Arg Phe Tyr

20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His

85 90 95

Ala His Val Thr Thr Thr Arg Trp Ser Gln Asp Tyr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Val Ser

20 25

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

Gly Asn Ile Asp Arg Phe Tyr Ala

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala

1 5 10 15

Gln

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

Leu Thr Asn Asn Glu Ile Thr

1 5

<210> 22

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

Thr Tyr Gly Asp Ser Val Glu Gly Gln Phe Ser Ile Ser Gly Asp Phe

1 5 10 15

Asp Ala Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

His Ala His Val Thr Thr Thr Arg Trp Ser Gln Asp Tyr Tyr

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 25

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 25

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

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

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser
20 25

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

Gly Ile Thr Phe Arg Asp Tyr Asp
1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

Ile Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Leu Ala

1 5 10 15

Thr

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

Ile Thr Pro Ser Gly Thr Thr

1 5

<210> 30

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

His Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Ser

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Arg Tyr Glu Cys

35

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

Asn Thr Leu Ala Tyr

1 5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Trp Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 33

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Ser Ile Tyr

20 25 30

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35 40 45

Ala Val Ile Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr

85 90 95

Ala His Leu Leu Ile Gln Pro Phe Asp Arg Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

Gly Ser Val Phe Ser Ile Tyr Ala

1 5

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala

1 5 10 15

Val

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

Ile Thr Ser Gly Gly Ala Thr

1 5

<210> 38

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile

1 5 10 15

Ala Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

Tyr Ala His Leu Leu Ile Gln Pro Phe Asp Arg Phe Tyr Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Ser Met Ser Ser Ile Tyr
20 25 30

Ser Met Ser Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala His Ile Thr Thr Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Ile Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Asn Asp Ile Asn Val Ile Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Gly Leu Lys Ala Gly Pro Gly Pro Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Leu
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser
20 25

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

Gly Ser Met Ser Ser Ile Tyr Ser

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala

1 5 10 15

His

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

Ile Thr Thr Thr Gly Thr Thr

1 5

<210> 46

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

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

1 5 10 15

Asp Ile Asn Val Ile Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 47
Asn Ala Gly Leu Lys Ala Gly Pro Gly Pro Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213
> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 48
Trp Gly Leu Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 49
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Asp Ile Asn Ser Ala Gly Asp Gly Ile Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Gly Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Glu Arg Gln Arg Ala Gly Asp Val Lys Arg Ser Leu Ala Pro
100 105 110

Ile Thr Ala His Ile Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 50

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser

20 25

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr Gly
1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15
Asp

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
<400> 53
Ile Asn Ser Ala Gly Asp Gly Ile
1 5

<210> 54
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 54
Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
1 5 10 15
Ser Lys Gly Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
35

<210> 55
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 55
Ala Ala Glu Arg Gln Arg Ala Gly Asp Val Lys Arg Ser Leu Ala Pro
1 5 10 15
Ile Thr Ala His Ile

20

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 57

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 57

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ala Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Ala Ile Ala Trp Thr Gly Thr His Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Asn His Trp Gly Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Thr

115 120 125

<210> 58

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 58

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 59

Gly Gly Ala Phe Ser Thr Tyr Thr

1 5

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 60

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala

1 5 10 15

Ala

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 61

Ile Ala Trp Thr Gly Thr His Thr

1 5

<210> 62

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400>

62

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

1 5 10 15

Asp Lys Asn Thr Val Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 63

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

1 5 10 15

Asn His

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 64

Trp Gly Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Thr

1 5 10

<210> 65

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Ala Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Thr Trp Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Glu Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Val
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Asp Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Tyr Ala Phe Gly Arg Ser Arg Ala Gly Asp Ala Asn Gly Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 66

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 67

Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Ala

1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala

1 5 10 15

Ala

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 69

Ile Thr Trp Gly Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 70

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 70

Tyr Tyr Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Gly Val Leu Gln Met Asn Asn Leu Asp Val Asp Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 71

Tyr Ala Phe Gly Arg Ser Arg Ala Gly Asp Ala Asn Gly Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 72

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 73

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 73

Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Arg Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Ala Ile Thr Trp Ile Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Ala Asp Ala Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Thr Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Ser
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala His Tyr Leu Glu Gly Asn Thr Asp Tyr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 74

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 75

Gly Arg Thr Ala Asp Ile Tyr Asn
1 5

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 76

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala

1 5 10 15

Ala

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 77

Ile Thr Trp Ile Gly Arg Thr Pro

1 5

<210> 78

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 78

Tyr Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Thr Asp Ser

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Pro Glu Asp

20 25 30

Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 79

Asn Ala Ala His Tyr Leu Glu Gly Asn Thr Asp Tyr Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 80

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 81

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 81

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Thr Phe Ala Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Trp Ser Asp Ser Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Pro Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Gln Leu Lys Pro Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Tyr Ala Tyr Ile Arg Gly Val Gly Glu Val Arg Tyr Val Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 82

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 82

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 83

Gly Asp Thr Phe Ala Asn Tyr Ala
1 5

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 84

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10 15

Ala

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 85

Ile Ser Trp Ser Asp Ser Ser Thr
1 5

<210> 86

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 86

His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Pro Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ala Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met Asp Gln Leu Lys Pro Glu Asp

20 25 30

Met Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400

> 87

Tyr Ala Tyr Ile Arg Gly Val Gly Glu Val Arg Tyr Val Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 88

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 89

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 89

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 90
<211> 356
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 90

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Val Leu Ala Ala Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
20 25 30

Ala Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ile Thr Phe
35 40 45

Arg Asp Tyr Asp Ile Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
50 55 60

Glu Trp Leu Ala Thr Ile Thr Pro Ser Gly Thr Thr His Tyr Pro Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr
85 90 95

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

Glu Cys Asn Thr Leu Ala Tyr Trp Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
130 135 140

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
145 150 155 160

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
165 170 175

Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
180 185 190

Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
195 200 205

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
210 215 220

Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly

225 230 235 240

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

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
305 310 315 320
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
325 330 335
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
340 345 350
Leu Pro Pro Arg
355

<210> 91
<211> 365
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 91
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Val Leu Ala Ala Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15
Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Arg
20 25 30
Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ala
35 40 45
Asp Ile Tyr Asn Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
50 55 60

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

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

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

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
260 265 270
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
275 280 285
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
290 295 300
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met

305 310 315 320

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
325 330 335
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
340 345 350
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360 365

<210> 92
<211> 348
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 92

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Val Leu Ala Ala Leu Leu Gln Gly

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

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

130 135 140

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

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

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

325 330 335
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
340 345

<210> 93
<211> 365
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 93

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Val Leu Ala Ala Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15
Val Gln Ala Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

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

Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys His Ala His Val Thr Thr Thr Arg Trp Ser Gln Asp Tyr Tyr
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr
130 135 140
Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
145 150 155 160

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

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
225 230 235 240
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

245 250 255

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln

260 265 270

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

275 280 285

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

290 295 300

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

<210> 94

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 94

ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 30

<210> 95

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 95

tagagggtat ataatggaag ctcgaattcc a 31

<210> 96

<211> 221

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 96

ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 60

ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 120

ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 180

gatctagact tagagggtat ataatggaag ctcgaattcc a 221

<210> 97

<211> 1179

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 97

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60

ggaggggtcg gcaattgatc cggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120

gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gagggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180

gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc 240

gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt 300

acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg 360

gagagttcga ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg 420

cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tggtggcacc ttcgcgcctg tctcgctgct 480

ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg 540

caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc 600

gcgggcggcg acggggcccg tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga 660

gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct 720

ggcctcgcgc cgccgtgtat cgccccgccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca 780

gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctg cagggagctc aaaatggagg 840

acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac aaaggaaaag ggcctttccg 900

tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg cgccgtccag gcacctcgat 960

tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg 1020

gagtttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa 1080

ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttggt tcattctcaa gcctcagaca 1140

gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtga 1179

<210> 98

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 98

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccctgtcctg gggcgtgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactactt tagcgacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcggcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccaa gctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaag 717

<210> 99

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 99

atggtgagca agggcgagga gaataacatg gccatcatca aggagttcat gcgcttcaag 60

gtgcgcatgg agggctccgt gaacggccac gagttcgaga tcgagggcga gggcgagggc 120

cgcccctacg agggctttca gaccgctaag ctgaaggtga ccaagggtgg ccccctgccc 180

ttcgcctggg acatcctgtc ccctcatttc acctacggct ccaaggccta cgtgaagcac 240

cccgccgaca tccccgacta cttcaagctg tccttccccg agggcttcaa gtgggagcgc 300

gtgatgaact acgaggacgg cggcgtggtg accgtgaccc aggactcctc cctgcaggac 360

ggcgagttca tctacaaggt gaagctgcgc ggcaccaact tcccctccga cggccccgtg 420

atgcagaaga agaccatggg ctgggaggcc tcctccgagc ggatgtaccc cgaggacggt 480

gccctgaagg gcaagatcaa gatgaggctg aagctgaagg acggcggcca ctacacctcc 540

gaggtcaaga ccacctacaa ggccaagaag cccgtgcagc tgcccggcgc ctacatcgtc 600

gacatcaagt tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcgtgga acagtacgaa 660

cgcgccgagg gccgccactc caccggcggc atggacgagc tgtacaag 708

<210> 100

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 100

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 101

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 102

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

1 5 10 15

<210> 103

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 103

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

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

20 25 30

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

<210> 104

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 104

Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
1 5 10 15

Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
20 25 30

Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
35 40

<210> 105

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(1)

<223> May be repeated 3-12 times

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(2)

<223> May be repeated 3-12 times

<400> 105

Gly Ser

1

<210> 106

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 106

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 107

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 107

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser

20 25 30

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly

35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala

50 55 60

Ala Tyr Arg Ser

65

<210> 108

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 108

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

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

85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 109

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 109

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

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

85 90 95

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

<210> 110

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 110

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 111

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(1)

<223> May be repeated 1-10 times

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(2)

<223> May be repeated 1-5 times

<220><221> REPEAT

<222> (2)..(2)

<223> May be repeated 1-3 times

<400> 111

Gly Ser

1