



공개특허 10-2020-0088383

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0088383
(43) 공개일자 2020년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7016631

(22) 출원일자(국제) 2018년12월11일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년06월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/064971

(87) 국제공개번호 WO 2019/118475

국제공개일자 2019년06월20일

(30) 우선권주장

62/598,032 2017년12월13일 미국(US)

(71) 출원인

안센 바이오테크 인코포레이티드

미국 펜실베이니아주 19044 호샴 럿지뷰 드라이브
800/850

(72) 별명자

리, 존

미국 펜실베이니아 19477 스프링하우스 맥킨 로드
1400

무니, 질

미국 캘리포니아 92117 샌 디에고 롤폐 로드 4489

나소, 마이클

미국 펜실베이니아 19081 스와스모어 브린 메이어
애비뉴 544

(74) 대리인

특허법인한성

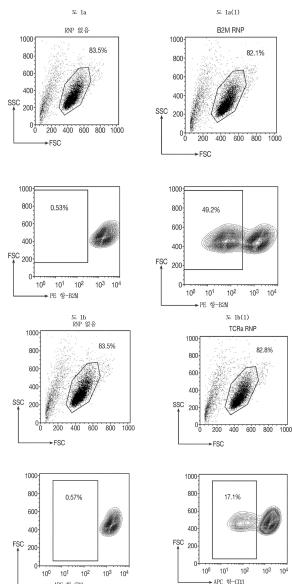
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 T-세포 수용체 및 베타 2-마이크로글로불린 발현을 제거하도록 유전자 변형된 불멸화 CAR-T 세포

(57) 요약

본 발명은 조작된 불멸화(immortalized) T-세포주, 이의 제조 방법, 및 특히 면역요법을 위한 약제로서의 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 조작된 불멸화 T-세포주는, 불멸화 T-세포를 비-동종반응성으로 되게 하기 위하여, 내인성 T-세포 수용체(TCR) 및 베타 2-마이크로글로불린(B2M)의 발현이, 예를 들어 TCR 및 B2M 유전자를 선 (뒷면에 계속)

대 표 도



택적으로 불활성화시킬 수 있게 하는 엔도뉴클레아제를 사용함으로써 억제되는 것을 특징으로 한다. 게다가, 숙주 유기체에서 이를 조작된 불멸화 T-세포의 생존을 연장시키기 위하여, 면역억제성 폴리펩티드의 발현이 이들 T-세포 상에서 수행될 수 있다. 그러한 조작된 불멸화 T-세포는 동종이계(allogeneic) 이식에 특히 적합한데, 그 이유는 특히, 이것이 숙주의 면역 시스템에 의한 거부 위험 및 이식편 대 숙주 질병을 발생시킬 위험 둘 모두를 감소시키기 때문이다. 본 발명은 암, 감염 및 자가면역 질병을 치료하기 위하여 불멸화 T-세포를 사용하는 표준적이고 적당한 비용의 입양 면역요법 전략에 대한 길을 열어준다.

(52) CPC특허분류

- A61P 35/00* (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
-

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 불멸화(immortalized) T-세포주로서,

상기 CAR은

- (a) 항원 결합 영역을 포함하는 세포의 도메인;
- (b) 막관통 도메인; 및
- (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,

상기 불멸화 T-세포주는 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체를 발현하지 않고 베타 2-마이크로글로불린(B2M)을 발현하지 않는, 조작된 불멸화 T-세포주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 영역은 종양 관련 항원에 결합하는, 불멸화 T-세포주.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 종양 관련 항원은 BCMA인, 불멸화 T-세포주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 영역은 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인에 결합하는, 불멸화 T-세포주.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 녹아웃(knock out)되는, 불멸화 T-세포주.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 TCR-알파인, 불멸화 T-세포주.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 KIR3DL2인, 불멸화 T-세포주.

청구항 8

제1항에 있어서, B2M은 녹아웃되는, 불멸화 T-세포주.

청구항 9

CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주로서,

상기 CAR은

- (a) 항원 결합 영역을 포함하는 세포의 도메인;
- (b) 막관통 도메인; 및
- (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,

상기 TALL-104 세포주는 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체를 발현하지 않고 베타 2-마이크로글로불린(B2M)을 발현하지 않는, 조작된 TALL-104 세포주.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항원 결합 영역은 종양 관련 항원에 결합하는, 세포주.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 종양 관련 항원은 BCMA인, 세포주.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 항원 결합 영역은 피브로네틴 III형(FN3) 도메인에 결합하는, 세포주.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 녹아웃되는, 세포주.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 TCR-알파인, 세포주.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 KIR3DL2인, 세포주.

청구항 16

제9항에 있어서, B2M은 녹아웃되는, 세포주.

청구항 17

CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주로서,

상기 CAR은

- (a) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 신호 웨티드;
- (b) 서열 번호 8 내지 44 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 FN3 도메인을 포함하는 세포외 도메인;
- (c) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역;
- (d) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 막관통 도메인; 및
- (e) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 공동자극성 도메인 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 1차 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,

상기 세포주는 TRCA, KIR3DL2 및 B2M을 발현하지 않는, 조작된 TALL-104 세포주.

청구항 18

CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주로서,

상기 CAR은

- (a) 서열 번호 54 및 55 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 scFv를 포함하는 세포외 도메인;
- (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역;
- (c) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 막관통 도메인; 및
- (d) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 공동자극성 도메인 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 1차 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,

상기 TALL-104 세포주는 TRCA, KIR3DL2 및 B2M을 발현하지 않는, 조작된 TALL-104 세포주.

청구항 19

CAR을 발현하는 조작된 불멸화 T-세포주를 생성하는 시험관내(*in vitro*) 방법으로서,

- a. 불멸화 T-세포주를 제공하는 단계;
- b. 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체 및 B2M의 발현을 억제하는 단계; 및
- c. 상기 불멸화 T 세포 내로 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 단계 b는 단계 c 이전에 일어나는, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 단계 c는 단계 b 이전에 일어나는, 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 단계 b는 엔도뉴클레아제를 사용함으로써 수행되는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제는 TAL-뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 또는 Cas9인, 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 단계 c는 전기천공 또는 바이러스-기반 유전자 전달 시스템에 의해 상기 불멸화 T 세포 내로 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 25

제4항에 있어서, 상기 바이러스-기반 유전자 전달 시스템은 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 조작된 면역 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 27

암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

제26항의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 암은 다발성 골수종인, 방법.

청구항 29

약제학적 조성물의 생성 방법으로서,

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 조작된 불멸화 T-세포주를 약제학적으로 허용되는 담체와 배합하여 상기 약제학적 조성물을 얻는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열 목록

본 출원은 ASCII 서식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 2018년 11월 20일자로 생성된 상기 ASCII 사본은 파일명이 JBI5146WOPCT1_SL.txt이며, 크기가 67,258

바이트이다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 불멸화(immortalized) T-세포주, 이의 제조 방법, 및 특히 면역요법을 위한 약제로서의 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 조작된 불멸화 CAR T-세포는, 불멸화 CAR T-세포를 비-동종반응성으로 되게 하기 위하여, 내인성 T-세포 수용체(TCR) 및 베타 2-마이크로글로불린(B2M)의 발현이, 예를 들어 TCR 및 B2M 유전자를 선택적으로 불활성화시킬 수 있게 하는 엔도뉴클레아제를 사용함으로써 억제되는 것을 특징으로 한다. 조작된 불멸화 CAR T-세포주는 동종이계(allogeneic) 이식에 특히 적합한데, 그 이유는 특히, 이것이 숙주의 면역 시스템에 의한 거부 위험 및 이식편 대 숙주 질병을 발생시킬 위험 둘 모두를 감소시키기 때문이다. 본 발명은 암, 감염 및 자가면역 질병을 치료하기 위하여 T-세포를 사용하는 표준적이고 적당한 비용의 입양 면역요법 전략에 대한 길을 열어준다.

배경 기술

[0005] 생체외(*ex vivo*)에서 생성된 자가(autologous) 항원-특이적 T-세포의 전달을 수반하는 입양 면역요법은 바이러스성 감염 및 암을 치료하기 위한 유망한 전략이다. 입양 면역요법을 위해 사용되는 T-세포는 유전자 조작을 통한 T-세포의 재유도(redirection) 또는 항원-특이적 T-세포의 증폭에 의해 생성될 수 있다(문헌[Park, Rosenberg et al. 2011]).

[0006] T-세포에서의 신규한 특이성은 유전자도입 T-세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체(CAR)의 유전자적 전달을 통해 성공적으로 생성되어 왔다(문헌[Jena, Dotti et al. 2010]). CAR은 단일 융합 분자 내의 하나 이상의 신호 전달 도메인과 회합된 표적화 모이어티(targeting moiety)로 이루어진 합성 수용체이다. 일반적으로, CAR의 결합 모이어티는, 예를 들어, 가요성 링커에 의해 연결된, 단일클론 항체의 경쇄 단편과 가변 단편을 포함하는, 단일쇄 항체(scFv)의 항원-결합 도메인으로 이루어진다. 제1 세대 CAR에 대한 신호전달 도메인은 CD3-제타 또는 Fc 수용체 감마 사슬의 세포질 영역으로부터 유래된다. 제1 세대 CAR은 T-세포 세포독성을 성공적으로 재유도하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 이들은 생체내(*in vivo*)에서의 연장된 증폭 및 항-종양 활성을 제공하는 데에는 실패하였다. CAR 변형된 T-세포의 생존을 향상시키고 증식을 증가시키기 위하여, CD28, OX-40(CD134), 및 4-1BB(CD137)를 포함한 공동자극성 분자로부터의 신호전달 도메인이 단독으로(제2 세대) 또는 조합하여(제3 세대) 첨가되어 왔다. CAR은 림프종 및 고령 종양을 포함한 다양한 악성종양으로부터의 종양 세포의 표면에서 발현되는 항원에 대해 성공적으로 T-세포가 재유도될 수 있게 하였다(문헌[Jena, Dotti et al. 2010]).

[0007] 입양 면역요법을 사용하는 환자의 치료를 위한 현재 프로토콜은 자가 세포 전달에 기초한다. 이러한 접근법에서는, T 림프구가 환자로부터 회수되고, 생체외(*ex vivo*)에서 유전자 변형되거나 선택되고, 필요하다면 세포수를 증폭시키기 위하여 시험관내(*in vitro*)에서 배양되고, 마지막으로 환자 안으로 주입된다. 림프구 주입에 더하여, 숙주는 T 세포의 생착(engraftment) 또는 면역 반응에의 이들의 참여를 지원하는 다른 방법으로 조작될 수 있으며, 이러한 방법에는, 예를 들어 사전-컨디셔닝(방사선 또는 화학요법을 사용함) 및 림프구 성장 인자(예컨대, IL-2)의 투여가 있다. 각각의 환자는 환자 자신의 림프구를 사용하여 개별적으로 구성된 치료를 제공받는다(즉, 자가 요법). 자가 요법은 실용적 응용에 대해 실질적인 기술적 및 실행적 난관에 직면해 있으며, 이들의 생성은 고가의 전용 시설 및 전문요원을 필요로 하며, 이들은 환자의 진단 후 단시간에 생성되어야 하며, 많은 경우에, 환자의 사전치료가 저하된 면역 기능을 초래해 왔으며, 이에 따라 환자의 림프구는 불량하게 기능하고 매우 적은 수로 존재할 수 있다. 이러한 난관들 때문에, 각각의 환자의 자가 세포 조제물은 사실상 새로운 생성물이며, 이는 효능 및 안전성의 실질적인 변화를 초래한다. 이상적으로는, 동종이계 치료 세포가 사전-제조되고, 상세히 특징규명되고, 환자에 대한 즉각적인 투여에 이용가능할 수 있는 표준화된 요법을 사용하는 것이 선호될 것이다. 동종이계란, 세포가 동일한 종에 속하는 개체로부터 획득되었지만 유전자적으로 상이한 것을 의미한다. 그러나, 동종이계 세포의 사용은 현재 많은 결점을 갖는다. 면역-적격성 숙주에서 동종이계 세포는 신속하게 거부되고(숙주 대 이식편 거부(HvG)로 불리는 과정), 이는 전달된 세포의 효능을 실질적으로 제한한다. 면역-부적격성 숙주에서는, 동종이계 세포가 생착될 수 있지만, 그들의 내인성 T-세포 수용체(TCR) 특이성이 숙주 조직을 외래물질로서 인식하여, 이식편 대 숙주 질병(GvHD)을 초래할 수 있으며, 이는 심각한 조직 손상 및 사망으로 이어질 수 있다.

[0008] 따라서, 환자-특이적 T-세포 생성물의 제조 시간, 이의 제조 비용, 및 이에 대한 거부 위험을 피하는 방법 및 시약을 개발할 필요성이 당업계에 남아 있다.

발명의 내용

- [0009] 본 발명은 면역요법 목적에 적합한 조작된 불멸화 T-세포주를 제공한다. 더 상세하게는, 본 발명은 면역 인식 및 조직적합성에 중요한 소정의 이펙터 분자가 발현되지 않는 T-세포주를 제공한다.
- [0010] 일 일반적인 태양에서, 본 발명은 CAR을 발현하는 조작된 불멸화 T-세포주에 관한 것으로, 상기 CAR은 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 도메인을 포함하며, 상기 세포외 도메인은 항원 결합 영역을 포함한다. 본 발명의 조작된 불멸화 T-세포주는 적어도 하나의 내인성 T-세포 수용체(TCR)를 발현하지 않고 베타 2-마이크로 글로불린(B2M)을 발현하지 않는다.
- [0011] 일 실시 형태에서, 적어도 하나의 내인성 TCR 및 B2M의 발현은 유전자 녹아웃(knockout)에 의해 제거된다. 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 불멸화 T-세포주는 TCR-알파를 발현하지 않는다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 불멸화 T-세포주는 KIR3DL2를 발현하지 않는다.
- [0012] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 불멸화 T-세포주는 B2M을 발현하지 않는다.
- [0013] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 불멸화 T-세포주는 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 조작된 불멸화 T-세포주는 BCMA에 특이적으로 결합하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 포함할 수 있다.
- [0014] 구체적인 실시 형태에서, 조작된 불멸화 T-세포주는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인에 특이적으로 결합하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 포함할 수 있다.
- [0015] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주에 관한 것으로, 상기 CAR은 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 도메인을 포함하며, 상기 세포외 도메인은 항원 결합 영역을 포함한다. 본 발명의 조작된 TALL-104 세포주는 적어도 하나의 내인성 T-세포 수용체(TCR)를 발현하지 않고 베타 2-마이크로 글로불린(B2M)을 발현하지 않는다.
- [0016] 일 실시 형태에서, 적어도 하나의 내인성 TCR 및 B2M의 발현은 유전자 녹아웃에 의해 제거된다. 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 TALL-104 세포주는 TCR-알파를 발현하지 않는다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 TALL-104 세포주는 KIR3DL2를 발현하지 않는다.
- [0017] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 TALL-104 세포주는 B2M을 발현하지 않는다.
- [0018] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 TALL-104 세포주는 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 조작된 TALL-104 세포주는 BCMA에 특이적으로 결합하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 포함할 수 있다.
- [0019] 구체적인 실시 형태에서, 조작된 TALL-104 세포주는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인에 특이적으로 결합하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 포함할 수 있다.
- [0020] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주에 관한 것으로, 상기 CAR은
- [0021] (a) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드;
- [0022] (b) 서열 번호 8 내지 44 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 FN3 도메인을 포함하는 세포외 도메인;
- [0023] (c) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역;
- [0024] (d) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 막관통 도메인; 및
- [0025] (e) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 공동자극성 도메인 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 1차 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,
- [0026] 상기 세포주는 TRCA, KIR3DL2 및 B2M을 발현하지 않는다.
- [0027] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주에 관한 것으로, 상기 CAR은
- [0028] (a) 서열 번호 54 및 55 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 scFv를 포함하는 세포외 도메인;
- [0029] (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역;
- [0030] (c) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 막관통 도메인; 및

- [0031] (d) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 공동자극성 도메인 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 1차 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,
- [0032] 상기 세포주는 TRCA, KIR3DL2 및 B2M을 발현하지 않는다.
- [0033] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 또한 CAR을 발현하는 조작된 불멸화 T-세포주를 생성하는 시험관내 방법에 관한 것으로, 상기 방법은
- 불멸화 T-세포주를 제공하는 단계;
 - 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체 및 B2M의 발현을 억제하는 단계; 및
 - 상기 불멸화 T 세포 내로 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 포함한다.
- [0037] 일 실시 형태에서, 단계 b는 단계 c 이전에 일어난다.
- [0038] 다른 실시 형태에서, 단계 c는 단계 b 이전에 일어난다.
- [0039] 다른 실시 형태에서, 단계 b는 엔도뉴클레아제를 사용하여 수행된다. 구체적인 실시 형태에서, RNA-가이드 (RNA-guided) 엔도뉴클레아제는 TAL-뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 또는 Cas9이다.
- [0040] 다른 실시 형태에서, CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 전기천공에 의해 불멸화 T 세포 내로 도입된다.
- [0041] 다른 실시 형태에서, CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 바이러스-기반 유전자 전달 시스템을 통해 불멸화 T 세포 내로 도입된다. 구체적인 실시 형태에서, 바이러스-기반 유전자 전달 시스템은 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터를 포함한다.
- [0042] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 조작된 불멸화 T 세포를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0043] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 바람직한 실시 형태에서, 암은 다발성 콜수종이다.
- [0044] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 약제학적 조성물의 생성 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 조작된 불멸화 T-세포주를 약제학적으로 허용되는 담체와 배합하여 상기 약제학적 조성물을 얻는 단계를 포함한다.
- [0045] 본 발명의 다른 태양, 특징 및 이점은 본 발명 및 그의 바람직한 실시 형태의 상세한 설명을 포함한 하기의 개시내용 및 첨부된 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

- 도 1a 및 도 1b.** TALL-104 세포에서의 HLA 클래스 I(도 1a) 및 TCR(도 1b)의 CRISPR-Cas9-매개 유전자 편집의 유세포측정 분석. 베타 2 마이크로글로불린(B2M) 및 TCRα 리보핵단백질(RNP) 복합체로 전기천공된 TALL-104 세포를 FACS 염색 완충액 중에 재현탁시키고, 항체를 제조자의 사용설명서에 따라 첨가하였다. 세포를 암실에서 4°C에서 45분 동안 인큐베이션하고, BD FACS Calibur 유세포측정기 상에서 데이터를 수집하였다.
- 도 2a 및 도 2b.** B2M/HLA-1(도 2a) 및 TCR(도 2b) 녹아웃 TALL-104 세포 집단의 정제. B2M 또는 TCRα 리보핵단백질(RNP) 복합체로 사전에 전기천공된 TALL-104 세포를 PE 항-B2M(도 2a) 또는 PE 항-CD3 항체로 표지하였다. 항체-표지 세포를 항-PE 마이크로비드와 함께 인큐베이션하고, QuadroMACS 분리기에 부착된 LS 걸럼에 통과시켰다. 용출액 중에 수집된 B2M 및 CD3-KO 세포 하위집단을 원심분리하고, 완전 TALL-104 세포 배지 중에 재현탁시키고, 37°C에서 배양하였다.
- 도 3a 및 도 3b.** 유세포측정에 의해 TALL-104 세포 상에서의 BCMA 또는 FN3 도메인을 표적화하는 CAR의 발현 및 검출. TALL-104 BCMA-CAR 세포(도 3a) 및 TALL-104 항-FN3 도메인 CAR 세포(도 3b)를, BD Biosciences FACSCalibur를 사용하여, 모의(mRNA 없음) 전기천공된 대조군 세포(회색)에 대한 결합과 대비하여, 다중클론 항-FN3 도메인 항체 및 접합된 FN3 도메인 각각에 대하여 세포에 대한 결합에 대하여 측정하였다. 데이터를 FlowJo 버전 10을 사용하여 분석하여, 산포도에 의해서는 세포 집단에 대해 그리고 Alexa647 또는 APC 강도에 의해서는 양성 결합에 대해 게이팅하였다.
- 도 4a 내지 도 4c:** BCMA 표적 세포의 TALL-104 CAR-발현 세포 사멸. TALL-104 항-FN3 도메인 CAR 세포를

BCMA-특이적 또는 비표적화된 대조군(NT) FN3 도메인과 동시-인큐베이션한 후 20시간째(도 4a) 및 40시간째(도 4b)에 BCMA 표적 세포의 사멸에 대해 평가하였다. TALL-104 BCMA-CAR 세포(도 4c)를 세포들을 동시-인큐베이션한 후 20시간째에 BCMA 표적 세포의 사멸에 대해 평가하였다.

도 5: TALL-104 세포를 인간 TERT 유전자 및 EGFP를 인코딩하는 렌티바이러스에 의해 형질도입시켰다. 세포들을 EGFP 발현에 대해 분류하고, 이어서 TALL-104 배양 조건에서 증폭되게 하였다. 야생형의 형질도입되지 않은 세포가 배양에서 증식을 정지한 후의 성장 프로파일이 나타나 있다.

도 6: hTERT 양성 TALL-104 세포를 렌티바이러스 p102에 의해 형질도입시키고, 외인성 IL-2의 부재 하에서 유지하였다.

도 7: 세포내 IL-2(p102)를 안정하게 발현하는 TALL-104 세포 또는 wt TALL-104 세포를 F11 BCMA 표적화된 CAR 서열을 인코딩하는 mRNA로 전기친공하고, 다양한 E:T 비로 MM1s 세포와 함께 인큐베이션하였다. % 죽은 표적 MM1s 세포가 E:T 비에 대해 도표로 나타나 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0047] 다양한 간행물, 논문, 및 특허가 배경기술에 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되어 있거나 기재되어 있으며; 이를 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 재료, 디바이스, 물품 등에 대한 논의는 본 발명에 대한 상황을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러한 논의는 이를 대상 중 임의의 것 또는 모든 것이 개시되거나 청구된 임의의 발명에 대하여 종래 기술의 일부를 형성하는 것을 인정하는 것은 아니다.

[0049] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그렇지 않으면, 본 명세서에 사용되는 소정의 용어는 본 명세서에 제시된 바와 같은 의미를 갖는다. 본 명세서에 인용된 모든 특허, 공개된 특허 출원 및 간행물은 마치 본 명세서에 완전히 기재되어 있는 것처럼 참고로 포함된다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태(부정 판사 및 정판사)는, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다.

[0050] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 농도 또는 농도 범위와 같은 임의의 수치 값은 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 수치 값은 전형적으로 인용된 값의 ± 10%를 포함한다. 예를 들어, 1 mg/mL의 농도는 0.9 mg/mL 내지 1.1 mg/mL를 포함한다. 마찬가지로, 1% 내지 10% (w/v)의 농도 범위는 0.9% (w/v) 내지 11% (w/v)를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 수치 범위의 사용은 모든 가능한 하위범위, 그 범위 내의 모든 개별 수치 값, 예를 들어 그러한 범위 내의 정수 및 값의 분율을 명시적으로 포함한다.

[0051] 세포 배양물에는 3가지 일반적인 유형이 있다: (1) 1차 배양물 - 인간 또는 동물 조직 및 기관으로부터 유래됨(만능성 줄기 세포 및 조직-특이적 선조세포(progenitor)가 이 카테고리 내에 포함됨), (2) 불멸화(또는 연속적) 배양물 - 배양물에서 무한으로 분열되고 증식하도록 조작된 1차 세포로부터 유래됨(이들 세포는, 부착 성 섬유아세포의 경우의 성장의 접촉-억제와 같은 정상 1차 세포의 많은 특성을 보유함), 및 (3) 형질전환된 배양물 - 암성 조직으로부터 유래되거나, 암-유도 바이러스에 의해 시험관내에서 발암성으로 형질전환됨(이들 세포는 정상 1차 세포와 유사하지 않으며 종양 세포처럼 거동함). 형질전환된 세포는 접촉-억제의 상실, 성장 인자-비의존성 또는 가용성 성장 인자 및 혈청에 대한 감소된 요건, 및 부착(ECM)-비의존성 성장을 나타낸다(문헌 [Flint et al, 2004]). 대부분의 생의학적 및 약제학적 연구 및 개발 응용(예를 들어, 약리학적 약물 후보의 시험관내 효능 및 독성 시험)의 경우, 정상 생리학적 조건을 근접하게 재현하는 세포 백그라운드를 사용하는 것이 대체적으로 바람직하다. 1차 배양물이 정상 조직 미세환경과 가장 근접하게 유사하지만, 인간 또는 동물 조직으로부터 이들 세포를 획득하는 데 상당한 어려움이 있으며, 복잡한 규제 요건(예를 들어, Institutional Animal Care & Usage Committees; Human Subjects Research-Institutional Review Boards), 및 시험관내에서 1차 세포를 유지하고 성장시키는 것과 관련된 일반적인 어려움(성장 인자- 및 기질-의존성)은 대부분의 응용에 이들 세포를 사용하는 것을 어렵게 한다. 1차 세포는 이들이 위기 및 노화를 겪기 전에 유한한 배가-용량(doubling-capacity)(통상 40 내지 60회의 복제 사이클)을 갖는다(문헌[Ra Weinberg, 2007]). 1차 배양물의 사용은 또한 유의한 재현성 오차를 끌어들일 수 있는데, 그 이유는, 다수의 실험을 수행하여야 위하여 이들 세

포가 계속 재단리되어야 하기 때문이다.

[0052] 따라서, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 1차 세포로부터 유래된 세포주의 세포 특성과 관련하여 용어 "불멸화" 또는 "연속적"은 배양 시에 무한으로 분열되고 증식하도록 조작된 T-림프구(또는 T 세포)를 지칭한다. 이들 세포는, 예를 들어 부착성 세포의 경우의 성장의 접촉-억제 및 IL-2 의존성과 같은 정상 1차 세포의 많은 특성을 보유한다.

[0053] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "T 세포"는 흥선에서 성숙되는 림프구의 한 유형을 지칭한다. T 세포는 세포-매개 면역에서 중요한 역할을 하며, 세포 표면 상의 T-세포 수용체의 존재에 의해 다른 림프구, 예컨대 B 세포와는 구별된다. T 세포는 구매가능한 공급원으로부터 단리되거나 획득될 수 있다. "T 세포"는 CD3을 발현하는 모든 유형의 면역 세포를 포함하며, 이에는 T-헬퍼 세포(CD4⁺ 세포), 세포독성 T-세포(CD8⁺ 세포), 자연 살해 T-세포, T-조절성 세포(Treg) 및 감마-델타 T 세포가 포함된다. "세포독성 세포"는 CD8⁺ T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 및 호중구를 포함하며, 이들 세포는 세포독성 반응을 매개할 수 있다. 구매가능한 T-세포주의 비제한적인 예에는 세포주 BCL2(AAA) Jurkat(ATCC® CRL-2902™), BCL2(S70A) Jurkat(ATCC® CRL-2900™), BCL2(S87A) Jurkat(ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat(ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat(ATCC® CRL-2898™), TALL-104 세포독성 인간 T-세포주(ATCC # CRL-11386)가 포함된다. 추가의 예에는 하기가 포함되지만 이로 한정되지 않는다: 성숙 T-세포주, 예컨대 Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, SKW-3, SMZ-1 및 T34; 및 미성숙 T-세포주, 예를 들어 ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD- Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1, Jurkat, Karpas 45, KE-37, KOPT-K1, K-T1, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT 3, MOLT-4, MOLT 13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, SUP-T1 내지 T14, TALL-1, TALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, TALL-197, TK-6, TLBR-1, -2, -3, 및 -4, CCRF-HSB-2(CCL-120.1), J.RT3-T3.5(ATCC TIB-153), J45.01(ATCC CRL-1990), J.CaM1.6(ATCC CRL-2063), RS4;11(ATCC CRL-1873), CCRF-CEM(ATCC CRM-CCL-119); 및 피부 T-세포 림프종 세포주, 예를 들어 HuT78(ATCC CRM-TIB-161), MJ[G11](ATCC CRL-8294), HuT102(ATCC TIB-162). REH, NALL-1, KM-3, L92-221을 포함하지만 이로 한정되지 않는 무표지(null) 백혈병 세포주는 면역 세포의 다른 구매가능한 공급원이며, K562 적백혈병, THP-1 단구성 백혈병, U937 림프종, HEL 적백혈병, HL60 백혈병, HMC-1 백혈병, KG-1 백혈병, U266 골수종과 같은 다른 백혈병 및 림프종으로부터 유래된 세포주도 마찬가지이다. 그러한 구매가능한 세포주에 대한 비제한적인 예시적인 공급처는 ATCC(American Type Culture Collection)(<http://www.atcc.org/>) 및 GCMCC(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)(<https://www.dsmz.de/>)를 포함한다.

[0054] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "키메라 항원 수용체(CAR)"는, 예를 들어 인공 T-세포 수용체, 키메라 T-세포 수용체, 또는 키메라 면역-수용체로 지칭될 수 있으며, 특정 면역 이펙터 세포 상에 인공 특이성을 이식하는 조작된 수용체를 포함한다. CAR은, T 세포 상에 단일클론 항체의 특이성을 부여하여, 예를 들어 입양 세포 요법에 사용 시, 다수의 특이적 T 세포가 생성될 수 있게 하기 위하여 사용될 수 있다. 특정 실시 형태에서, CAR은, 예를 들어 세포의 특이성을 종양 항원으로 유도한다. 일부 실시 형태에서, CAR은 세포 내 활성화 도메인, 막관통 도메인, 및 종양 관련 항원 결합 영역을 포함하는 세포의 도메인을 포함한다. 특정 태양에서, CAR은, CD3-제타 막관통 및 엔도도메인에 융합된, 단일클론 항체로부터 유래되는 단일쇄 가변 단편(scFv)의 융합체를 포함한다. 다른 태양에서, CAR은, CD3-제타 막관통 및 엔도도메인에 융합된, 피브로네틴 III형 도메인의 융합체를 포함한다. 다른 CAR 설계의 특이성은 수용체의 리간드(예를 들어, 웹티드)로부터 또는 Dectin으로부터 유도될 수 있다. 특정 실시 형태에서, B-계통 분자, BCMA에 특이적인 키메라 면역수용체를 사용하여 T 세포의 특이성을 재유도함으로써 악성 B 세포를 표적화할 수 있다. 소정 경우에, CAR은 추가의 공동자극성 신호전달을 위한 도메인, 예컨대 CD3-제타, FcR, CD27, CD28, CD137, DAP 10, 및/또는 OX40을 포함한다. 일부 경우에, 분자가 CAR과 동시발현될 수 있다. 이들은 공동자극성 분자, 이미징을 위한(예를 들어, 양전자 방출 단층촬영을 위한) 리포터 유전자, 전구약물의 침가 시에 T 세포를 조건부로 제거하는 유전자 산물, 호밍(homing) 수용체, 사이토카인, 및 사이토카인 수용체를 포함한다.

[0055] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "세포외 도메인"은 세포막의 외부에 위치하고 항원, 표적, 또는 리간드에 결합할 수 있는 CAR의 일부를 지칭한다.

[0056] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "막관통 도메인"은 세포막을 가로질러 연장되고 CAR을 세포막에 고정시키는 CAR의 부분을 지칭한다.

[0057] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 세포막의 내부에 위치하고 이펙터 신호를

전달할 수 있는 CAR의 일부를 지칭한다.

[0058] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "발현하다"는 유전자 산물의 생합성을 지칭한다. 이 용어는 RNA로의 유전자의 전사를 포함한다. 이 용어는 또한, 하나 이상의 폴리펩티드로의 RNA의 번역을 포함하고, 모든 천연 발생 전사후 및 번역후 변형을 추가로 포함한다. 발현된 T 세포 수용체 및 베타-2 마이크로불린은 T 세포막에 고착될 수 있다.

[0059] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "T 세포 수용체(TCR)"는 알파(α) 및 베타(β) 사슬의 이종이량체로 구성되는 T 세포 상의 단백질 수용체를 지칭하지만, 일부 세포에서 TCR은 감마 및 델타(γ / δ) 사슬로 이루어진다. 본 발명의 실시 형태에서, TCR은, 예를 들어 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절성 T 세포, 자연 살해 T 세포, 및 감마 델타 T 세포를 포함한, TCR을 포함하는 임의의 세포 상에서 변형될 수 있다.

[0060] "베타-2 마이크로글로불린" ("B2M"으로도 알려짐)은 MHC 클래스 I 분자의 경쇄이며, 그렇기 때문에 주요 조직적 합성 복합체의 필수 부분이다. 인간에서, B2M은 15번 염색체 상에 위치하는 *b2m* 유전자에 의해 인코딩되는데, 이는, 다른 MHC 유전자들이 6번 염색체 상에 유전자 클러스터로서 위치되는 것과는 대조적이다. 인간 단백질은 119개의 아미노산으로 구성되며, 분자량이 11.8 칠로달톤이다. 베타-2 마이크로글로불린이 결핍된 마우스 모델은 B2M이 MHC 클래스 I의 세포 표면 발현 및 웨პ티드 결합 흄(groove)의 안정성에 필요하다는 것을 보여주었다. 정상 세포-표면 MHC I 발현이 결핍된 마우스로부터의 조혈 이식물이 베타-2 마이크로글로불린 유전자에서의 표적화된 돌연변이 때문에 정상 마우스에서 NK1.1⁺ 세포에 의해 거부되는 것으로 추가로 밝혀졌는데, 이는, MHC I 분자의 결핍 발현이 골수 세포가 숙주 면역 시스템에 의한 거부에 민감해지게 한다는 것을 시사한다(문헌[Bix et al. 1991]).

[0061] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "BCMA"는 형질 세포 및 성숙 B 세포 상에 발현되는 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 패밀리 구성원인 B 세포 성숙 항원 단백질(TNFRSF17, BCM, 또는 CD269로도 지칭됨)을 지칭한다. 예를 들어, 인간 BCMA는 994개 뉴클레오티드 길이의 1차 mRNA 전사체(NM_001192.2)에 의해 인코딩되는 184개 아미노산 길이의 단백질이다. 인간 BCMA의 아미노산 서열은 GenBank 수탁 번호 NP_001183.2로 표시된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "BCMA"는 돌연변이, 예를 들어, 전장 야생형 BCMA의 점 돌연변이, 단편, 삽입, 결실, 및 스플라이스 변이체를 포함하는 단백질을 포함한다. 용어 "BCMA"는 또한, BCMA 아미노산 서열의 번역후 변형을 포함한다. 번역후 변형은 N- 및 O-연결된 글리코실화를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0062] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "피브로넥틴 III형 도메인" 또는 "FN3 도메인"은, 피브로넥틴, 테나신, 세포내 세포골격 단백질, 사이토카인 수용체 및 원핵생물 효소를 포함하는 단백질에서 자주 나타나는 도메인(문헌[Bork and Doolittle, PNAS USA 89:8990-8994, 1992]; 문헌[Meinke et al., J Bacteriol 175:1910-1918, 1993]; 문헌[Watanabe et al., J Biol Chem 265:15659-15665, 1990]), 또는 이들의 유도체를 지칭한다. 예시적인 FN3 도메인은 인간 테나신 C에 존재하는 15개의 상이한 FN3 도메인, 인간 피브로넥틴(FN)에 존재하는 15개의 상이한 FN3 도메인, 및 예를 들어 US8278419호의 비천연 합성 FN3 도메인이다. 개별적인 FN3 도메인은 도메인 번호 및 단백질 명칭(예를 들어, 테나신의 제3 FN3 도메인(TN3), 또는 피브로넥틴의 제10 FN3 도메인(FN10))에 의해 지칭된다.

[0063] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "담체"는 임의의 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 오일, 지질, 지질 함유 베시클, 미소구체, 리포좀 캡슐화, 또는 약제학적 제형에 사용하기 위한 당업계에 잘 알려진 다른 물질을 지칭한다. 담체, 부형제, 또는 희석제의 특성은 특정 응용을 위한 투여 경로에 좌우될 것임이 이해될 것이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 본 발명에 따른 조성물의 유효성 또는 본 발명에 따른 조성물의 생물학적 활성을 방해하지 않는 비독성 물질을 지칭한다.

[0064] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 동물, 바람직하게는 포유류를 지칭한다. 특정 실시 형태에 따르면, 대상체는 비-영장류(예를 들어, 낙타, 당나귀, 얼룩말, 소, 돼지, 말, 염소, 양, 고양이, 개, 래트, 토끼, 기니 피그, 또는 마우스) 또는 영장류(예를 들어, 원숭이, 침팬지, 또는 인간)를 포함하는 포유류이다. 특정 실시 형태에서, 대상체는 인간이다.

[0065] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "암"은 당업계에 알려진 바와 같이 조절되지 않은 세포 성장 또는 복제를 특징으로 하는 임의의 질병, 질환, 형질, 유전자형 또는 표현형을 의미한다. "암 세포"는 제어되지 않은 성장으로 비정상적으로 분열되고 재생성되는 세포이다. 이 세포는, 전이로 지칭되는 과정에서, 그의 기원 부위(예를 들어, 종양)로부터 떨어져 나와서 신체의 다른 부위로 이동하고 또 다른 부위(예를 들어, 또 다른 종양)를 셋업할 수 있다. "종양"은 제어되지 않고 진행성인 과도한 세포 분열로부터 발생되는 비정상적인 조직 덩어

리이며 신생물(neoplasm)로도 지칭된다. 종양은 양성(암성이 아님) 또는 악성일 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 암 및 종양 세포, 즉, 악성 종양 및 양성 종양 둘 모두의 치료에 유용하다. 따라서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물의 다양한 실시 형태에서, 암은, 제한 없이, 햄 암, 림프종, 유방암, 폐암, 전립선 암, 결직장암, 식도암, 위암, 방광암, 췌장암, 신장암, 자궁경부암, 간암, 난소암, 및 고환암을 포함할 수 있다.

[0066] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료적 유효량"은 대상체에서 원하는 생물학적 또는 의학적 반응을 도출하는 활성 성분 또는 성분의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 언급된 목적에 관하여 경험적으로 그리고 일상적인 방식으로 결정될 수 있다.

[0067] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 모두 암 또는 자가면역과 관련된 하나 이상의 측정가능한 물리적 파라미터의 개선 또는 역전을 지칭하고자 하는 것이며, 이는 반드시 대상체에서 식별가능하지는 않지만, 대상체에서 식별가능할 수 있다. 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 또한, 퇴행을 야기하거나, 진행을 예방하거나, 적어도 질병, 장애 또는 질환의 진행을 둔화시키는 것을 지칭할 수 있다. 특정 실시 형태에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질병, 장애, 또는 질환, 예컨대 종양 또는 더 바람직하게는 암과 관련된, 경감, 발생 또는 발병의 예방, 또는 하나 이상의 증상의 지속기간의 감소를 지칭한다. 특정 실시 형태에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질병, 장애 또는 질환의 재발의 예방을 지칭한다. 특정 실시 형태에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질병, 장애 또는 질환을 갖는 대상체의 생존율의 증가를 지칭한다. 특정 실시 형태에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 대상체에서 질병, 장애 또는 질환의 제거를 지칭한다.

본 발명의 일반적인 실시 형태

[0069] 키메라 항원 수용체(CAR)는 세포외 항원-결합 도메인을 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인(엔도도메인)에 연결함으로써 입양 면역요법을 위한 것으로 설계된다. 이것은, 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 입양 전달하여, 종양 세포 상에 제시되는 특이적 항원을 인식하고 T 세포를 활성화시켜 이를 종양 세포를 특이적으로 용해시킴으로써 종양 세포를 근절하기에 유용한 항-종양 접근법이다. 이러한 CAR 전략의 중요한 측면은, 종양 상에서 특이적으로 또는 선택적으로 발현되고; 모든 종양 세포 상에 존재하고; 세포 표면으로부터 조절되거나 떨어지기 쉽지 않은 막 에피토프인, 표적 에피토프의 선택이다. 그러나, 이상적으로는, CAR-T 세포는 임의의 포유류(예컨대, 인간) 수용자에 적합한 범용 시약 또는 약물로서 사용될 수 있을 것이다. 이들 세포를 그러한 방식으로 사용하기 위해서는, CAR-의존성 이펙터 기능을 손상시키지 않으면서, 이식편 대 숙주 반응에서의 그들의 거부를 방지해야 한다.

[0070] 본 발명의 실시 형태에서, "범용" T 세포-기반 면역요법을 확립하기 위하여 키메라 항원 수용체(CAR)-발현 T 세포(CAR-T 세포)로부터의 T-세포 수용체(TCR) α 과괴가 제공된다. 원하는 항원으로의 T-세포 특이성의 재유도는 CAR를 통해 달성될 수 있다. 그러나, 환자로부터의 CAR-T 세포의 생체의 생성은 시간 및 비용에 의해 제한된다. 더욱이, 환자로부터 유래된 T 세포는 림프독성(림프고갈성) 화학요법의 다회의 라운드로 인해 때때로 기능적으로 결함을 갖게 된다. 이를 위하여, 본 발명의 실시 형태는 "기성(off-the-shelf)" 시약으로서의 역할을 할 수 있는 CAR-T 세포를 불멸화 T 세포로부터 생성하는 것에 관한 것이다. 다시 말하면, 조작된 불멸화 T 세포가 사전준비되고, 이어서 다수의 수용자에게 주입될 수 있다. 이는, 범용 T 세포의 "중앙화된(centralized)" 제조 및 이에 후속되는, 요구 시 주입을 위한 지역 시설에의 T 세포의 사전비치(pre-positioning)를 용이하게 할 것이며, 효능이 강화된 임상 시험이 착수될 수 있게 하며, 범용 T 세포가 다른 생물학적 제제 및 치료제와 함께 투여될 수 있는 병용 요법을 촉진시킬 것이다. 이를 달성하기 위하여, 원치 않는 동종이계 면역 반응을 야기하는 내인성 TCR 및 B2M 발현을 제거할 수 있다. 그러한 단계는 임의의 적합한 방식으로 일어날 수 있으며, 이에는, Cas9/CRISPR 복합체를 도입함으로써, 예를 들어 TCR α 불변 영역 또는 β 불변 영역을 표적화 함으로써 이루어지는 방식이 포함된다. 본 발명의 실시 형태들은, 이들이 (i) CAR을 도입함으로써 불멸화 T 세포의 특이성을 재유도한다는 것과, (ii) 내인성 TCR 및 B2M의 발현을 제거하여 원하는 T-세포 산물을 생성한다는 것을 조합하고 있기 때문에 독특하다. 소정 실시 형태에서, CAR의 도입 및 TCR/B2M의 제거는 CAR을 안정하게 발현시킬 전기천공 및 시험관내-전사되는 mRNA의 원하는 일시적 형질감염에 의해 달성된다. 본 발명의 실시 형태에서, 주입용으로 특이적으로 조작된 불멸화 CAR-T 세포가 사전준비되고, 기성 시약으로서 요구 시에 주입되기 위해 해동된다.

[0071] 본 발명자들은 T 세포 내의 내인성 TCR 또는 B2M을 표적화하는 Cas9/CRISPR 복합체가 TCR 발현의 원하는 손실을 야기하였음을 보여준다. 예상되는 바대로, 이들 변형된 T 세포는 혼합 림프구 반응 검정에서는 TCR 자극에 반

응하지 않았지만, 예시적인 항원인 BCMA에 대해서는 그들의 CAR 매개 재유도된 특이성을 유지하였다.

[0072] 본 발명의 소정 실시 형태에서, 불멸화 T-세포는, 종양 관련 항원(TAA)으로 특이성을 재유도함으로써 생체내에서 항-종양 활성을 부여하는 쪽으로 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키도록 생체외에서 유전자 변형된다. BCMA-특이적 CAR을 발현하는 T-세포는, 특이성 도메인이 항-BCMA FN3 도메인으로부터 클로닝되기 때문에, MHC와 관계 없이 다수의 수용자에서 B-세포 악성종양을 인식한다. 본 발명은 다수의 수용자에게 투여될 수 있는 "범용" 조작된 불멸화 TAA-특이적 T 세포를 생성함으로써 환자-특이적 T 세포를 생성할 필요성을 제거하기 위한 주요 단계를 포함한다. 이는, 특이적 CAR T 세포를 유전자 편집하여 내인성 TCR 및 B2M의 발현을 제거하여, CAR-의존성 이펙터 기능을 손상시키지 않으면서 이식편 대 숙주 반응을 방지함으로써 달성되었다. 디자이너 Cas9/CRISPR 복합체를 사용하여 TCR 및 B2M을 영구적으로 결실시킨 후, 관심 대상의 특이적 CAR을 안정하게 도입함으로써 유전자 변형된 T 세포를 생성하였다. 본 발명자들은 이를 조작된 T 세포가 TCR 자극에 반응하지 않으면서 BCMA에 대한 재유도된 특이성을 가질 것으로 예상된 특성을 나타냄을 보여준다. 이를 조작된 불멸화 CAR-T 세포는 많은 유형의 암의 시험용 치료(investigational treatment)를 위한 기성 요법으로서 사용될 수 있다.

[0073] 특히, 조작된 불멸화 CAR-T 세포를 사용하는 것의 실현가능성을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 불멸화 T 세포의 계놈을 편집하여 TCR 및 B2M의 발현을 비가역적으로 제거하는 것을 포함시키도록 CAR-T 세포를 생성하기 위한 배양 과정을 변형시켰다. TCR 및 B2M 유전자좌를 녹아웃하기 위하여, 본 발명자들은 내인성 TCR 및 B2M의 불변 영역 내의 계놈 서열을 표적화하는, Cas9 엔도뉴클레아제로부터의 DNA 절단 도메인에 융합된 DNA-결합 도메인으로 구성된 Cas9/CRISPR 복합체를 개발하였으며, Cas9/CRISPR은 계놈 내의 DNA 이중 가닥 절단(DSB)의 형성을 촉매함으로써 계놈 편집을 매개한다. 유전자의 코딩 서열 내의 미리 결정된 부위로 DSB를 표적화하는 것은, 절단된 부위에서의 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실을 가져오는 오류-유발(error-prone) 세포 수복 경로인 비상동성 말단 결합(NHEJ)에 의한 수복을 통한 기능성 표적 유전자 발현의 영구적인 손실로 이어지는 것으로 이미 밝혀져 있다(문헌[Santiago et al., 2008]; 문헌[Perez et al., 2008]).

키메라 항원 수용체

[0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항원"은 항체 또는 T-세포 수용체에 의해 결합될 수 있는 분자이다. 항원은 추가로 체액성 면역 반응 및/또는 세포성 면역 반응을 유도할 수 있으며, 이는 B 및/또는 T 림프구의 생성으로 이어진다.

[0075] 본 발명은 핵산을 포함하며, 상기 핵산은 세포내 신호전달 도메인, 막관통 도메인, 및 하나 이상의 신호전달 모티프를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 폴리펩티드인 항원-특이적 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산을 포함하며, 상기 항원-특이적 CAR은 면역원성을 감소시키도록 인간화된 CAR(hCAR)을 포함한다. 소정 실시 형태에서, CAR은 하나 이상의 항원들 사이에 공유된 공간으로 구성된 에피토프를 인식할 수 있다. 소정 실시 형태에서, 결합 영역은 단일클론 항체의 상보성 결정 영역, 단일클론 항체의 가변 영역, 및/또는 이들의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 상보성 결정 영역(CDR)은 항원 수용체(예를 들어, 면역글로불린 및 T-세포 수용체) 단백질의 가변 도메인에서 발견되는 짧은 아미노산 서열로서, 이러한 아미노산 서열은 항원과 상보적이고 이에 따라 수용체에 그러한 특정 항원에 대한 그의 특이성을 제공한다. 항원 수용체의 각각의 폴리펩티드 사슬은 3개의 CDR(CDR1, CDR2, 및 CDR3)을 함유한다. 항원 수용체는 전형적으로 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성되기 때문에, 각각의 항원 수용체에 대해 항원과 접촉할 수 있는 CDR은 6개이다 - 각각의 중쇄 및 경쇄는 3개의 CDR을 함유한다. 면역글로불린 및 T-세포 수용체와 관련된 대부분의 서열 변이가 CDR에서 발견되기 때문에, 이들 영역은 때때로 초가변 도메인으로 지칭된다. 이들 중에서, CDR3이 최대 가변성을 나타내는데, 그 이유는, 이것은 VJ(중쇄의 경우의 VDJ 및 TCR α β 사슬) 영역의 재조합에 의해 인코딩되기 때문이다. 인간 CAR 핵산은 인간 환자에 대한 세포 면역요법을 향상시키기 위한 인간 유전자인 것으로 고려된다.

[0076] 다른 실시 형태에서, 그러한 특이성은 텐콘(Tencon)으로 알려진 인간 테나신-C로부터의 15개의 FN3 도메인의 공통 서열로부터 설계된 천연 비발생 FN3 도메인으로부터 유래된다(문헌[Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012]; US2010/0216708호). 텐콘의 결정 구조는 FN3 도메인들에 특징적인 바와 같은 7개의 베타-가닥을 연결하는 6개의 표면-노출된 루프를 나타내며, 베타-가닥은 A, B, C, D, E, F, 및 G로 지칭되고, 루프는 AB, BC, CD, DE, EF, 및 FG 루프로 지칭된다(문헌[Bork and Doolittle, PNAS USA 89:8990-8992, 1992]; US6673901호). 이들 루프, 또는 각각의 루프 내의 선택된 잔기들은, 관심 항원에 결합하는 신규 분자들을 선택하는 데 사용될 수 있는 FN3 도메인의 라이브러리를 작제하기 위하여 무작위화될 수 있다. 따라서, 텐콘 서열(서열 번호 1)에 기초하여 설계된 라이브러리는 루프 또는 가닥 중 하나 이상에서 무작

위화된 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 텐콘에 기초한 라이브러리는 AB 루프, BC 루프, CD 루프, DE 루프, EF 루프, 및 FG 루프 중 하나 이상에서 무작위화된 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 텐콘 BC 루프는 7개 아미노산의 길이이며, 따라서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개의 아미노산이 텐콘 서열에 기초한 라이브러리에서 무작위화되어 BC 루프에서 다양화될 수 있다. 텐콘 CD 루프는 6개 아미노산의 길이이며, 따라서 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 아미노산이 텐콘 서열에 기초한 라이브러리에서 무작위화되어 CD 루프에서 다양화될 수 있다. 텐콘 EF 루프는 5개 아미노산의 길이이며, 따라서 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산이 텐콘 서열에 기초한 라이브러리에서 무작위화되어 EF 루프에서 다양화될 수 있다. 텐콘 FG 루프는 7개 아미노산의 길이이며, 따라서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개의 아미노산이 텐콘 서열에 기초한 라이브러리에서 무작위화되어 FG 루프에서 다양화될 수 있다. 텐콘 라이브러리 내의 루프들에서의 추가의 다양성(diversity)이 루프들에서의 잔기들의 삽입 및/또는 결실에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, BC, CD, EF 및/또는 FG 루프는 1 내지 22개의 아미노산만큼 연장되거나, 또는 1 내지 3개의 아미노산만큼 감소될 수 있다. 텐콘 내의 FG 루프는 7개의 아미노산 길이인 반면에, 항체 중쇄 내의 상응하는 루프는 4 내지 28개 잔기의 범위이다. 최대 다양성을 제공하기 위하여, FG 루프는 서열에 있어서 뿐만 아니라 4 내지 28개 잔기의 항체 CDR3 길이 범위에 상응하도록 길이에 있어서도 다양화될 수 있다. 예를 들어, FG 루프는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 추가 아미노산에 의해 루프를 연장시킴으로써 길이에 있어서 추가로 다양화될 수 있다. 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리는 또한, FN3 도메인의 일측에 형성되고 2개 이상의 베타 가닥과 적어도 하나의 루프를 포함하는 무작위화된 대체 표면들을 가질 수 있다. 하나의 그러한 대체 표면은 C 및 F 베타-가닥과 CD 및 FG 루프 내의 아미노산들에 의해 형성된다(C-CD-F-FG 표면). 텐콘 대체 C-CD-F-FG 표면에 기초한 라이브러리 설계가 US2013/0226834호에 기재되어 있다. 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리는 또한 텐콘 변이체, 예컨대 잔기 위치 11, 17, 46, 및/또는 86에서 치환을 갖는, 개선된 열 안정성을 나타내는 텐콘 변이체에 기초하여 설계된 라이브러리를 포함한다. 예시적인 텐콘 변이체가 US2011/0274623호에 기재되어 있으며, 텐콘에 비교할 때 치환 E11R, L17A, N46V, 및 E86I를 갖는 텐콘27(서열 번호 2)을 포함한다. 텐콘 라이브러리 및 다른 FN3 서열 기반 라이브러리는, 무작위 또는 규정된 세트의 아미노산들을 사용하여, 선택된 잔기 위치들에서 무작위화될 수 있다. 예를 들어, 20개의 천연 발생 아미노산 모두를 인코딩하는 NNK 코돈을 사용하여 무작위 치환을 갖는 라이브러리 내의 변이체를 생성할 수 있다. 다른 다양화 스킴(scheme)에서는, DVK 코돈을 사용하여 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, 및 Cys를 인코딩할 수 있다. 대안적으로, NNS 코돈을 사용하여 20개의 아미노산 잔기 모두를 발생시키면서 그와 동시에 정지 코돈의 빈도를 감소시킬 수 있다. 예를 들어, Slonomics® 기술(http://www_sloning_com)을 사용하여, 다양화하고자 하는 위치에 편향된 아미노산 분포를 가진 FN3 도메인의 라이브러리를 합성할 수 있다. 이 기술은, 수천개의 유전자 합성 과정에 충분한 보편적 빌딩 블록(building block)으로서 작용하는 사전제조된 이중 가닥 삼중체들의 라이브러리를 사용한다. 삼중체 라이브러리는 임의의 원하는 DNA 문자를 구성하는 데 필요한 모든 가능한 서열 조합을 나타낸다. 코돈 표기는 잘 알려진 IUB 코드에 따른다.

[0078] 특정 실시 형태에서, 본 발명은 전장 CAR cDNA 또는 코딩 영역을 포함한다. 항원 결합 영역 또는 도메인은 특정 인간 단일클론 항체로부터 유래되는 단일쇄 가변 단편(scFv)의 VH 및 VL 쇄의 단편을 포함할 수 있다. 항원 결합 영역 또는 도메인은 또한 FN3 도메인을 포함할 수 있다.

[0079] 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 키메라 수용체가 넣어진 면역 세포의 정상 이펙터 기능들 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 용어 "이펙터 기능"은 분화된 세포의 특수화된 기능을 지칭한다. T 세포의 이펙터 기능은, 예를 들어 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있으며, 이에는 사이토카인의 분비가 포함된다. 기억 T 세포 또는 기억-유형 T 세포에서의 이펙터 기능은 항원-의존성 증식을 포함한다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은, 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 특수화된 기능을 수행하도록 유도하는 단백질의 일부분을 지칭한다. 통상 세포내 신호전달 도메인 전체가 사용되겠지만, 많은 경우에 세포내 폴리펩티드 전체를 사용하는 것이 반드시 필요하지는 않을 것이다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용될 수 있는 한에 있어서, 그러한 절단된 부분은 그것이 여전히 이펙터 기능 신호를 전달하기만 한다면 온전한 사슬 대신에 사용될 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것으로 의미된다. 예에는 T-세포 수용체의 제타 사슬 또는 임의의 그의 동족체(예를 들어, 에타, 엘타, 감마, 또는 엡실론), MB1 사슬, B29, Fc γ RUT, Fc γ R, 및 신호전달 분자들의 조합, 예컨대 O β 3 γ 와 CD2.8, 4-1BB, OX40, 및 이들의 조합뿐만 아니라, 다른 유사한 문자 및 단편이 포함된다. 활성화 단백질의 패밀리의 다른 구성원의 세포내 신호전달 부분, 예컨대 Fc γ RIII 및 Fc γ RL이 사용될 수 있다. 이를 대안적인 막관통 및 세포내 도메인을 사용하는 cTCR의 개시내용에 대해서는 문헌[Gross et al. (1992)], 문헌[Stancovski et al. (1993)], 문헌[Moritz et al. (1994)], 문헌[Hwu et al. (1995)], 문

현[Weijtens et al. (1996)], 및 문헌[Hekele et al (1996)]을 참조한다. 바람직한 실시 형태에서, 인간 CD3 ζ 세포내 도메인을 활성화를 위하여 취하였다.

[0080] 항원-특이적 세포외 도메인과 세포내 신호전달 도메인은 막관통 도메인, 예컨대 인간 IgG₄Fc 헌지 및 Fc 영역, 인간 CD4 막관통 도메인, 인간 CD28 막관통 도메인, 막관통 인간 CD3 도메인, 또는 시스테인 돌연변이된 인간 €'O3 ζ 도메인, 또는 다른 인간 막관통 신호전달 단백질로부터의 다른 막관통 도메인, 예컨대 CD16 및 CD8 및 에리트로포이에틴 수용체에 의해 연결될 수 있다.

[0081] 일부 실시 형태에서, CAR 핵산은 다른 공동자극성 수용체, 예컨대 막관통 도메인 및 변형된 CD28 세포내 신호전달 도메인을 인코딩하는 서열을 포함한다. 다른 공동자극성 수용체는 CD28, OX-40(CD134), DAP 10, 및 4-IBB(CD137) 중 하나 이상을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. CD3에 의해 개시되는 1차 신호에 더하여, 인간 CAR 내에 삽입되는 인간 공동자극성 수용체에 의해 제공되는 추가의 신호는 T 세포의 완전한 활성화를 위해 중요하며, 생체내 지속성 및 입양 면역요법의 치료적 성공을 개선하는 데 도움이 될 수 있다. 특정 실시 형태에서, 본 발명은 CAR을 인코딩하는 DNA 서열을 도입시킨 단리된 핵산 세그먼트 및 발현 카세트에 관한 것이다. 본 발명의 벡터는 주로, 조절된 진핵생물 프로모터, 예를 들어 MNDU3 프로모터 또는 EFlapha 프로모터, 또는 유비퀴틴 프로모터의 제어 하에서 면역 세포, 바람직하게는 T 세포에 원하는 유전자를 전달하도록 설계된다. 또한 벡터는, 다른 이유가 없다면, 시험관내에서의 그들의 조작을 용이하게 하기 위해 선택가능한 마커를 함유할 수 있다.

[0082] 키메라 항원 수용체 분자는 재조합이며, 항원에 결합하고 또한 그들의 세포질 꼬리에 존재하는 면역수용체 활성화 모티프(ITAM)를 통해 활성화 신호를 전달하는 그들의 능력에 의해 구별된다. (예를 들어, 단일쇄 항체(scFv)로부터 생성된) 항원-결합 모이어티를 이용하는 수용체 작제물은 이들이 HLA-비의존성 방식으로 표적 세포 표면 상의 천연 항원에 결합한다는 점에서 "범용"이라는 추가의 이점을 제공한다. 예를 들어, 몇몇 실험실은 CD3 복합체의 제타 사슬(ζ), Fc 수용체 감마 사슬, 및 Sky 티로신 키나제의 세포내 부분을 코딩하는 서열에 융합된 scFv 작제물에 대해 보고하였다(문헌[Eshhar et al., 1993]; 문헌[Fitzer-Attas et al., 1998]). CTL에 의한 종양 인식 및 용해를 포함하는 재유도된 T 세포 이펙터 기전이 몇몇 뮤린 및 인간 항원-scFv: ζ 시스템에서 문서로 기록되어 있다(문헌[Eshhar, 1997]; 문헌[Altenschmidt et al., 1997]).

[0083] 지금까지는, 키메라 항원 수용체를 작제하는 데 비인간 항원 결합 영역이 전형적으로 사용되고 있다. 뮤린 단일클론 항체와 같은 비인간 항원 결합 영역의 사용으로 인한 잠재적인 문제는 인간 이펙터 기능성이 결여되어 있고 종양 덩어리 내로의 침투 능력이 없다는 것이다. 다시 말하면, 그러한 항체는 보체-의존성 용해를 매개할 수 없거나 항체-의존성 세포 독성 또는 Fc-수용체 매개 식세포작용을 통해 인간 표적 세포를 용해할 수 없어서 CAR을 발현하는 세포를 파괴할 수 없다. 더욱이, 비인간 단일클론 항체는 인간 숙주에 의해 외래 단백질로서 인식될 수 있으며, 이에 따라 그러한 외래 항체의 반복된 주사는 면역 반응의 유도로 이어지고, 이는 유해한 과민성 반응을 초래할 수 있게 된다. 뮤린-기반 단일클론 항체의 경우, 이는 종종 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응으로 지칭된다. 따라서, 인간 항체의 사용은, 이것이 뮤린 항체만큼 강하게 HAMA 반응을 도출하지 않기 때문에 더 바람직하다. 유사하게, CAR에서의 인간 서열의 사용은 면역-매개 인식을 피할 수 있으며, 이에 따라 수용자 내에 존재하여 HLA와 관련하여 처리 항원을 인식하는 내인성 T 세포에 의한 제거를 피할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 키메라 항원 수용체는 (a) 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인; (b) 막관통 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0084] 구체적인 실시 형태에서, CAR 내의 세포내 수용체 신호전달 도메인은 T 세포 항원 수용체 복합체의 것들, 예컨대 CD3의 제타 사슬, 또한 Fc감마 RIII 공동자극성 신호전달 도메인, 예를 들어 단독으로의 또는 CD3제타와의 시리즈로의 CD28, DAP 10, CD2를 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 세포내 도메인(이는 세포질 도메인으로서 지칭될 수 있음)은 TCR 제타 사슬, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcsRTy, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP 분자, CD27, DAP 10, DAP 12, 및 CD40 중 하나 이상의 일부 또는 전부를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 세포내 도메인에서 내인성 T 세포 수용체 복합체의 임의의 일부를 사용한다. 하나 또는 다수의 세포질 도메인이 사용될 수 있는데, 이는, 이른바 제3 세대 CAR은, 예를 들어 상가적 또는 상승적 효과를 위해 함께 융합된 적어도 2개 또는 3개의 신호전달 도메인을 갖기 때문이다. 키메라 항원 수용체의 소정 실시 형태에서, 수용체의 항원-특이적 부분(이는 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인으로 지칭될 수 있음)은 종양 관련 항원 또는 병원체-특이적 항원을 포함한다.

[0085] 종양 관련 항원은 그것이 종양 세포의 세포 표면 상에서 발현되는 한 임의의 종류의 것일 수 있다. 종양 관련 항원의 예시적인 실시 형태는 BCMA, CD19, CD20, 암배아 항원, 알파태아단백질, CA-125, MUC-1, 상피 종양

항원, 흑색종-관련 항원, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras 등을 포함한다.

[0086] 소정 실시 형태에서, 세포내 종양 관련 항원, 예컨대 HA-1, WT1, 또는 p53이 표적화될 수 있다. 이는 HLA와 관련하여 세포내 종양 관련 항원으로부터 묘사되는 처리 웹티드를 인식하는 범용 T 세포 상에서 발현되는 CAR에 의해 달성될 수 있다. 게다가, 범용 T 세포는 HLA와 관련하여 세포내 처리 종양 관련 항원을 인식하는 T-세포 수용체 쌍형성을 발현하도록 유전자 변형될 수 있다.

[0087] 병원체는 임의의 종류의 것일 수 있지만, 구체적인 실시 형태에서 병원체는, 예를 들어 진균, 세균, 또는 바이러스이다. 예시적인 바이러스성 병원체는 아데노바이러스과(Adenoviridae), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 거대 세포바이러스(CMV), 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), JC 바이러스, BK 바이러스, HSV, HHV 바이러스 패밀리, 피코르나바이러스과(Picornaviridae), 헤르페스바이러스과(Herpesviridae), 헤파드나바이러스과(Hepadnaviridae), 플라비바이러스과(Flaviviridae), 레트로바이러스과(Retroviridae), 오르토믹소바이러스과(Orthomyxoviridae), 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae), 파포바바이러스과(Papovaviridae), 폴리오마바이러스(Polyomavirus), 랍도바이러스과(Rhabdoviridae), 및 토가바이러스과(Togaviridae)의 것들을 포함한다. 예시적인 병원성 바이러스는 두창, 인플루엔자, 볼거리, 홍역, 수두, 에볼라, 및 풍진을 야기한다. 예시적인 병원성 진균은 칸디다(Candida), 아스페르길루스(Aspergillus), 크립토콕쿠스(Cryptococcus), 히스토플라스마(Histoplasma), 뉴모시스티스(Pneumocystis), 및 스타키보트리스(Stachybotrys)를 포함한다. 예시적인 병원성 세균은 스트렙토콕쿠스(Streptococcus), 슈도모나스(Pseudomonas), 시겔라(Shigella), 캄필로박ter(Campylobacter), 스타필로콕쿠스(Staphylococcus), 헬리코박터(Helicobacter), E. 콜라이(E. coli), 리케치아(Rickettsia), 바실루스(Bacillus), 보르데텔라(Bordetella), 클라미디아(Chlamydia), 스피로해타(Spirochete), 및 살모넬라(Salmonella)를 포함한다. 일 실시 형태에서, 병원체 수용체 Dectin-1은 진균의 세포벽 상의 탄수화물 구조를 인식하는 CAR을 생성하는 데 사용될 수 있다. Dectin-1의 특이성에 기초하여 CAR을 발현하도록 유전자 변형된 T 세포는 아스페르길루스 및 표적 균사 성장을 인식할 수 있다. 다른 실시 형태에서, CAR은 바이러스성 감염 및 병리를 차단하기 위해 바이러스 결정인자(예를 들어, CMV 및 에볼라로부터의 당단백질)를 인식하는 항체에 기초하여 제조될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 병원성 항원은 아스페르길루스 탄수화물 항원으로서, 이에 대해 CAR 내의 세포외 도메인은 진균 세포벽의 탄수화물의 패턴을 인식한다.

[0088] 본 발명에 따른 키메라 면역수용체는 당업계에 알려진 임의의 수단에 의해 생성될 수 있지만, 바람직하게는 그 것은 재조합 DNA 기법을 사용하여 생성된다. 키메라 수용체의 몇몇 영역을 인코딩하는 핵산 서열이 제조되고, 분자 클로닝의 표준 기법(게놈 라이브러리 스크리닝, PCR, 프라이머-보조 라이게이션, 효모 및 세균으로부터의 scFv 라이브러리, 부위-지정 돌연변이유발 등)에 의해 완전한 코딩 서열로 조립될 수 있다. 생성된 코딩 영역은 발현 백터 내로 삽입되고 적합한 발현 숙주 불멸화 T-세포주를 형질전환시키는 데 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "핵산 작제물" 또는 "핵산 서열" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 T 세포 내로 형질전환되거나 도입되고 전사되고 번역되어 생성물(예를 들어, 키메라 수용체)을 생성할 수 있는 DNA 분자를 의미하는 것으로 의도된다.

[0089] 본 발명에 사용되는 예시적인 핵산 작제물(폴리뉴클레오티드)에서, 프로모터는 본 발명의 키메라 수용체를 인코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결되며, 즉, 이것은 키메라 수용체를 인코딩하는 DNA로부터의 메신저 RNA의 전사를 촉진하도록 위치된다. 프로모터는 게놈 기원의 것일 수 있거나 합성에 의해 생성될 수 있다. T 세포에 사용하기 위한 다양한 프로모터가 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Marodon et al. (2003)]에 개시된 CD4 프로모터). 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있으며, 여기서 유도는, 예를 들어 특정 세포 유형 또는 특정 수준의 성숙과 관련된다. 대안적으로, 다수의 잘 알려진 바이러스 프로모터가 또한 적합하다. 관심 프로모터는 β -액틴 프로모터, SV40 초기 및 후기 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 인간 거대세포바이러스 프로모터, 레트로바이러스 프로모터, 및 프렌드(Friend) 비장 집중-형성 바이러스 프로모터를 포함한다. 프로모터는 인핸서와 회합될 수 있거나 회합되지 않을 수 있으며, 여기서 인핸서는 특정 프로모터와 천연적으로 회합되거나 상이한 프로모터와 회합될 수 있다. 키메라 수용체를 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)의 서열은 게놈 DNA 공급원 또는 cDNA 공급원으로부터 얻어질 수 있거나, 또는 (예를 들어, PCR을 통해) 합성될 수 있거나, 이들이 조합될 수 있다. 게놈 DNA의 크기 및 인트론의 개수에 따라, cDNA 또는 이들의 조합을 사용하는 것이 바람직할 수 있는데, 그 이유는, 인트론이 mRNA를 안정화하거나 T 세포-특이적 발현을 제공하는 것으로 확인되기 때문이다(문헌[Barthel and Goldfeki, 2003]). 또한, 내인성 또는 외인성 비-코딩 영역을 사용하여 mRNA를 안정화하는 것이 추가로 유리할 수 있다.

[0090] 본 발명의 키메라 수용체의 발현을 위하여, 키메라 수용체의 N-말단 성분을 인코딩하는 핵산 서열의 천연 발생 또는 내인성 전사 개시 영역이 표적 숙주에서 키메라 수용체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 구성

적 또는 유도성 발현을 가능하게 하는 외인성 전사 개시 영역이 사용될 수 있으며, 여기서는 표적 숙주, 원하는 발현 수준, 표적 숙주의 성질 등에 따라 발현이 제어될 수 있다.

[0091] 마찬가지로, 키메라 수용체를 표면 막으로 유도하는 신호 서열이 키메라 수용체의 N-말단 성분의 내인성 신호 서열일 수 있다. 선택적으로, 일부 경우에, 이 서열을 상이한 신호 서열로 교환하는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 선택된 신호 서열은 키메라 수용체가 T 세포의 표면 상에 제시되도록 T 세포의 분비 경로와 양립가능해야 한다. 유사하게, 키메라 수용체의 C-말단 성분을 인코딩하는 핵산 서열의 천연 발현 또는 내인성 전사 종결 영역에 의해 종결 영역이 제공될 수 있다. 대안적으로, 종결 영역은 상이한 공급원으로부터 유래될 수 있다. 대부분, 종결 영역의 공급원은 일반적으로 재조합 단백질의 발현에 중요한 것으로 간주되지 않으며, 발현에 불리한 영향을 주지 않고서 매우 다양한 종결 영역이 사용될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 일부 경우에, CAR 내의 항원 결합 도메인의 말단에 있는 수 개의 아미노산이 결실될 수 있으며, 이는 통상, 예를 들어 10개 이하, 더 통상적으로는 5개 이하의 잔기이다. 또한, 이를 경계부에서 적은 수의 아미노산, 통상 10개 이하, 더 통상적으로는 5개 이하의 잔기를 도입하는 것이 바람직할 수 있다. 아미노산의 결실 또는 삽입은 작제물의 요구의 결과로서 행해질 수 있으며, 이는 편리한 제한 부위, 조작 용이성, 발현 수준의 개선 등을 제공할 수 있다. 게다가, 하나 이상의 아미노산의 상이한 아미노산으로의 치환이 유사한 이유로 일어날 수 있으며, 통상 임의의 하나의 도메인에서 약 5개 초과의 아미노산을 치환하지 않는다.

[0092] 본 발명에 따른 키메라 수용체를 인코딩하는 키메라 작제물은 통상적인 방법으로 제조될 수 있다. 대부분의 경우, 천연 서열이 사용될 수 있기 때문에, 다양한 성분들의 적절한 결합을 가능하도록 하기 위하여, 천연 유전자들은 적절한 경우에 단리되고 조작될 수 있다. 따라서, 키메라 수용체의 N-말단 및 C-말단 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 유전자의 원치 않는 부분의 결실을 가져오는 적절한 프라이머를 사용하여, 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용함으로써 단리될 수 있다. 대안적으로, 클로닝된 유전자의 제한 효소분해가 키메라 작제물을 생성하는 데 사용될 수 있다. 어느 경우이든, 서열은, 블런트-말단화(blunt-ended)되거나 또는 상보적인 중복을 갖는 제한 부위를 제공하도록 선택될 수 있다.

[0093] 키메라 작제물을 제조하기 위한 다양한 조작이 시험관내에서 수행될 수 있으며, 특정 실시 형태에서, 키메라 작제물은 표준 형질전환 또는 형질감염 방법을 사용하여 적절한 숙주에서의 클로닝 및 발현을 위한 벡터 내로 도입된다. 따라서, 매 조작 후마다, DNA 서열의 결합으로부터 생성되는 작제물을 클로닝하고, 벡터를 단리하고, 서열을 스크리닝하여 서열이 원하는 키메라 수용체를 인코딩한다는 것을 보장한다. 서열은 제한 분석, 서열분석 등에 의해 스크리닝될 수 있다. 본 발명의 키메라 작제물은 암을 가지거나 이를 갖는 것으로 의심되는 대상체에서, 이들 대상체에서 종양의 크기를 감소시키거나 종양의 성장을 방지함으로써 응용된다. 따라서, 본 발명은 추가로 대상체에서 종양 성장을 감소시키거나 종양 형성을 방지하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 키메라 작제물을 조작된 불멸화 T 세포 내로 도입하는 단계, 및 조작된 불멸화 CAR-T 세포를 대상체 내로 도입함으로써 대상체에서 항-종양 반응을 달성하여 종양을 감소시키거나 제거하는 단계에 의해 수행된다. 사용될 수 있는 적합한 불멸화 T 세포는 세포독성 림프구(CTL) 또는 파괴를 필요로 하는 T 세포 수용체를 갖는 임의의 불멸화 세포를 포함한다.

[0094] 키메라 작제물은, 외피 비보유(naked) DNA로서 존재하거나 적합한 벡터 내에 존재하는 불멸화 T 세포 내로 도입될 수 있는 것으로 고려된다. 외피 비보유 DNA를 사용하여 전기천공에 의해 T 세포를 안정하게 형질감염시키는 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특히 제6,410,319호를 참조한다. 일반적으로, 외피 비보유 DNA는, 발현을 위해 적절한 배향으로 플라스미드 발현 벡터 내에 함유된 본 발명의 키메라 수용체를 인코딩하는 DNA를 지칭한다. 유리하게도, 외피 비보유 DNA의 사용은 본 발명의 키메라 수용체를 발현하는 불멸화 T 세포를 생성하는 데 필요한 시간을 감소시킨다.

[0095] 대안적으로, 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터)가 키메라 작제물을 불멸화 T 세포로 도입하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 따라 사용하기에 적합한 벡터는 불멸화 T 세포 내에서 비복제성이다. 바이러스에 기반한 다수의 벡터가 알려져 있으며, 여기서 세포 내에 유지되는 바이러스의 카피수는 세포의 생존력을 유지하기에 충분히 낮다. 예시적인 벡터는 pFB-네오 벡터(STRATAGENE®)뿐만 아니라, HIV, SV40, EBV, HSV, AAV 또는 BPV에 기반한 벡터를 포함한다.

[0096] 일단 형질감염되거나 형질도입된 불멸화 T 세포가 키메라 수용체를 원하는 조절을 가지면서 그리고 원하는 수준으로 표면 막 단백질로서 발현할 수 있다는 것이 확립되면, 키메라 수용체가 숙주 세포에서 원하는 신호 유도를 제공하기에 기능적인지의 여부가 결정될 수 있다. 후속으로, 형질도입된 불멸화 T 세포를 대상체에게 재도입하

거나 투여하여 대상체에서 항-종양 반응을 활성화시킨다. 투여를 용이하게 하기 위하여, 본 발명에 따른 형질도입된 T 세포는, 또한 약제학적으로 허용되는 적절한 담체 또는 희석제를 사용하여, 약제학적 조성물로 제조될 수 있거나 생체내 투여에 적절한 이식물로 제조될 수 있다. 그러한 조성물 또는 이식물을 제조하는 수단이 당업계에 기재되어 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980)] 참조). 적절한 경우, 형질도입된 불멸화 T 세포는 반고체 또는 액체 형태의 제제, 예컨대 캡슐, 용액, 주사제, 흡입제, 또는 에어로졸로 제형화될 수 있으며, 이는 이들 각각의 투여 경로에 대하여 통상적인 방법으로 행해진다. 조성물이 표적 조직 또는 기관에 도달할 때까지 조성물의 방출 및 흡수를 방지하거나 최소화하기 위하여, 또는 조성물의 적시-방출을 보장하기 위하여 당업계에 알려진 수단이 이용될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 키메라 수용체를 발현하는 세포를 무효화하지 않는 약제학적으로 허용되는 형태가 사용된다. 따라서, 바람직하게는 형질도입된 불멸화 T 세포는 평형 염 용액, 바람직하게는 헹크 평형 염 용액, 또는 생리 식염수를 함유하는 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0097] 예시적인 BCMA-특이적 키메라 T-세포 수용체(또는 키메라 항원 수용체, CAR)

MM 요법에 대한 잠재적인 표적은 성숙 B 세포 상에서 주로 발현되는 종양 괴사 인자 수용체 패밀리의 구성원인 B 세포 성숙 항원(BCMA)이다(문헌[Coquery and Erickson, Crit Rev Immunol. 2012;32(4):287-305]). BCMA는 그의 리간드, TNF 패밀리의 B 세포 활성화 인자(BAFF: B cell activator of the TNF family) 및 중식 유도 리간드(APRIL: a proliferation inducing ligand)에 결합 시에 생존촉진 신호를 전달한다. BCMA는 B 세포에서 항원 제시를 촉발하며, 이는 NF- κ B 및 JNK 신호전달에 의존한다. 건강한 개체에서, BCMA는 장기간 체액성 면역을 유지하는 형질 세포의 생존을 매개하는 역할을 하지만, 그의 발현은 또한 다수의 암, 자가면역 장애, 및 감염성 질병과 연관되고 있다. 예를 들어, BCMA RNA는 MM 세포에서 그리고 다른 럼프종에서 보편적으로 검출되고 있으며, BCMA 단백질은 MM 환자로부터의 형질 세포의 표면 상에서 검출되고 있다(문헌[Novak et al., Blood. 2004 Jan 15;103(2):689-94]; 문헌[Neri et al., Clin Cancer Res. 2007 Oct 1;13(19):5903-9]; 문헌[Bellucci et al., Blood. 2005 May 15;105(10):3945-50]; 문헌[Moreaux et al., Blood. 2004 Apr 15;103(8):3148-57]).

[0099] 일 태양에서, 본 발명의 조성물은 BCMA-특이적 FN3 도메인을 포함하는 BCMA-표적화 CAR을 포함한다.

[0100] 일 태양에서 본 발명은 CAR에 관한 것으로, 상기 CAR은

[0101] a. BCMA에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인을 갖는 세포외 도메인;

[0102] b. 막관통 도메인; 및

[0103] c. 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0104] 일부 실시 형태에서, 신생 CAR에서 세포외 도메인 앞에 N-말단에 신호 웨პ티드가 존재한다. 임의의 적합한 신호 웨პ티드가 본 발명에 사용될 수 있다. 신호 웨პ티드는 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일 실시 형태에 따르면, 신호 웨პ티드는 인간 CD8 신호 웨პ티드, 인간 CD3 엘타 신호 웨პ티드, 인간 CD3 엡실론 신호 웨პ티드, 인간 GMCSFR 신호 웨პ티드, 인간 4-1BB 신호 웨პ티드, 또는 이들의 유도체이다. 특정 실시 형태에 따르면, 신호 웨პ티드는 서열 번호 3과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는다. 다른 특정 실시 형태에 따르면, 신호 웨პ티드는 서열 번호 46 내지 서열 번호 49 중 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 50 내지 서열 번호 53 중 하나의 아미노산 서열을 갖는다. 신호 웨პ티드는 전좌 중에 또는 전좌의 완결 후에 신호 웨პ티다제에 의해 절단되어 신호 웨პ티드가 없는 성숙 CAR을 생성할 수 있다.

[0105] 본 발명의 실시 형태에 따르면, CAR의 세포외 도메인은 BCMA-특이적 FN3 도메인을 포함한다. 서열 번호 8 내지 서열 번호 44에 따른 아미노산 서열을 포함하지만 이로 한정되지 않는, 본 발명의 실시 형태에 따른 임의의 BCMA-특이적 FN3 도메인이 CAR의 세포외 도메인에 사용될 수 있다.

[0106] 본 발명의 실시 형태에 따르면, CAR은 세포외 도메인과 막관통 도메인을 연결하는 힌지 영역을 추가로 포함할 수 있다. 힌지 영역은 세포외 도메인을 조작된 면역 세포의 표면으로부터 멀리 이동시켜 적절한 세포/세포 접촉, 표적 또는 항원에 대한 결합, 및 활성화를 가능하게 하는 기능을 한다(문헌[Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419]). 임의의 적합한 힌지 영역이 본 발명의 CAR에 사용될 수 있다. 그것은 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, CAR의 힌지 영역은 6x GS 웨პ티드(서열 번호 66), 또는 그의 단편, 또는 CD8 단백질로부터의 힌지 영역, 또는 이들의 유도체이다. 특정 실시 형태에서, 힌지 영역은 서열 번호 4와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 4의 아미노산

서열을 갖는다.

[0107] 임의의 적합한 막관통 도메인이 본 발명의 CAR에 사용될 수 있다. 막관통 도메인은 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 막관통 도메인은 CD8, CD28, CD4, CD2, GMCSFR 등과 같은 분자로부터의 막관통 도메인이다. 특정 실시 형태에서, 막관통 도메인은 서열 번호 5와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는다. 다른 실시 형태에서, 막관통 도메인은 서열 번호 50 내지 서열 번호 53 중 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 50 내지 서열 번호 53 중 하나의 아미노산 서열을 갖는다.

[0108] 임의의 적합한 세포내 신호전달 도메인이 본 발명의 CAR에 사용될 수 있다. 특정 실시 형태에서는, 세포내 신호전달 도메인 전체가 사용된다. 다른 특정 실시 형태에서는, 이펙터 신호를 전달하는 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용된다. 본 발명의 실시 형태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은, 증식, 활성화, 및/또는 분화를 포함하지만 이로 한정되지 않는 CAR-함유 세포, 예를 들어 CAR-T 세포의 면역 이펙터 기능을 촉진하는 신호를 생성한다. 특정 실시 형태에서 신호는, 예를 들어 CAR-T 세포의 세포용해 활성, 헬퍼 활성, 및/또는 사이토카인 분비를 촉진한다.

[0109] 일부 실시 형태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타, TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 엘타, CD3 엡실론, CD16, CD22, CD27, CD28, CD30, CD79a, CD79b, CD134(TNFRSF4 또는 OX-40으로도 알려짐), 4-1BB(CD137), CD278(ICOS로도 알려짐), Fc ε RI, DAP10, DAP12, ITAM 도메인, 또는 CD66d 등으로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 포함한다.

[0110] 특정 실시 형태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공동자극성 신호전달 도메인을 포함한다.

[0111] 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD3제타로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 갖는 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시 형태에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 서열 번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는다.

[0112] 일부 실시 형태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은 인간 4-1BB로부터 유래된 공동자극성 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시 형태에서, 공동자극성 세포내 신호전달 도메인은 서열 번호 6과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는다.

[0113] 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 번호 45와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 45의 아미노산 서열을 갖는다.

[0114] 특정 실시 형태에서 CAR은, N-말단에서 C-말단으로, BCMA-특이적 FN3 도메인(Centyrin), 인간 CD8 힌지 영역, 인간 CD8 막관통 영역, 인간 4-1BB 세포내 도메인, 및 인간 CD3 제타 세포내 도메인을 포함하는 구조를 갖는다. 신생 CAR은 인간 CD8 신호 웨티드를 추가로 포함하며, 이는 후속으로 성숙 CAR에서 절단된다.

[0115] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 CAR은 CAR을 발현하는 숙주 세포와 회합된다.

[0116] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 CAR은 조작된 불멸화 T 세포 내에 존재한다.

[0117] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 CAR은 CAR을 발현하는 숙주 세포의 다른 성분들로부터 정제되거나 단리된다.

예시적인 FN3 도메인-표적화 키메라 T-세포 수용체(또는 키메라 항원 수용체, CAR)

[0119] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 FN3 도메인-특이적 scFv를 포함하는 FN3 도메인-표적화 CAR에 관한 것이다.

[0120] 일부 태양에서 본 발명은 CAR에 관한 것으로, 상기 CAR은

[0121] a. FN3 도메인의 비무작위화 영역에 특이적으로 결합하는 scFv를 갖는 세포외 도메인;

[0122] b. 막관통 도메인; 및

[0123] c. 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0124] FN3 도메인-특이적 scFv를 포함하는 CAR은, 조작된 세포 상에 사전-로딩되거나 투여되고 제어되어 독성을 방지할 수 있는 표적화된 FN3 도메인을 사용하여 T-세포 매개 사멸을 제어하는 데 사용될 수 있다. 또한, 비표적화(non-targeting) FN3 도메인이 리간드와 접합되어 리간드/수용체 특이적 방식으로 다른 세포 유형과 결합할 수 있거나, 또는 선택성을 달성하여 다수의 리간드와 동시에 결합할 수 있다.

- [0125] 일부 실시 형태에서, 신생 CAR에서 세포외 도메인 앞에 N-말단에 신호 펩티드가 존재한다. 임의의 적합한 신호 펩티드가 본 발명에 사용될 수 있다. 신호 펩티드는 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0126] 본 발명의 실시 형태에 따르면, CAR의 세포외 도메인은 FN3 도메인의 비무작위화 영역에 특이적으로 결합하는 scFv를 포함한다. 서열 번호 54 및 서열 번호 55에 따른 아미노산 서열을 포함하지만 이로 한정되지 않는, 본 발명의 실시 형태에 따른 FN3 도메인에 특이적으로 결합하는 임의의 scFv가 CAR의 세포외 도메인에 사용될 수 있다.
- [0127] 일부 실시 형태에서, 신생 CAR에서 세포외 도메인 앞에 N-말단에 신호 펩티드가 존재한다. 임의의 적합한 신호 펩티드가 본 발명에 사용될 수 있다. 신호 펩티드는 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 신호 펩티드는 인간 CD8 신호 펩티드, 인간 CD3 엘타 신호 펩티드, 인간 CD3 웹실론 신호 펩티드, 인간 GMCSFR 신호 펩티드, 인간 4-1BB 신호 펩티드, 또는 이들의 유도체이다. 특정 실시 형태에 따르면, 신호 펩티드는 서열 번호 3과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는다. 다른 특정 실시 형태에 따르면, 신호 펩티드는 서열 번호 46 내지 서열 번호 49 중 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 50 내지 서열 번호 53 중 하나의 아미노산 서열을 갖는다. 신호 펩티드는 전좌 중에 또는 전좌의 완결 후에 신호 펩티다제에 의해 절단되어 신호 펩티드가 없는 성숙 CAR을 생성할 수 있다.
- [0128] 임의의 적합한 막관통 도메인이 본 발명의 CAR에 사용될 수 있다. 막관통 도메인은 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시 형태에 따르면, 막관통 도메인은 CD8, CD28, CD4, CD2, GMCSFR 등과 같은 문자로부터의 막관통 도메인이다. 특정 실시 형태에서, 막관통 도메인은 서열 번호 5와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는다. 다른 실시 형태에서, 막관통 도메인은 서열 번호 50 내지 서열 번호 53 중 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 50 내지 서열 번호 53 중 하나의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0129] 임의의 적합한 세포내 신호전달 도메인이 본 발명의 CAR에 사용될 수 있다. 특정 실시 형태에서는, 세포내 신호전달 도메인 전체가 사용된다. 다른 특정 실시 형태에서는, 이펙터 신호를 전달하는 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용된다. 본 발명의 실시 형태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은, 중식, 활성화, 및/또는 분화를 포함하지만 이로 한정되지 않는 CAR 함유 세포, 예를 들어 CAR-T 세포의 면역 이펙터 기능을 촉진하는 신호를 생성한다. 특정 실시 형태에서 신호는, 예를 들어 CAR-T 세포의 세포용해 활성, 헤파 활성, 및/또는 사이토 카인 분비를 촉진한다. 다른 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인이 본 발명의 CAR에 사용되지 않으며, 본 발명의 FN3 도메인에 특이적으로 결합하는 scFv를 포함하는 CAR은 이펙터 세포를 표적 세포로 표적화하기 위해 FN3 도메인과 함께 사용된다.
- [0130] 일부 실시 형태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타, TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 엘타, CD3 웹실론, CD16, CD22, CD27, CD28, CD30, CD79a, CD79b, CD134(TNFRSF4 또는 OX-40으로도 알려짐), 4-1BB(CD137), CD278(ICOS로도 알려짐), Fc ε RI, DAP10, DAP12, ITAM 도메인, 또는 CD66d 등으로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0131] 특정 실시 형태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공동자극성 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0132] 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD3제타로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 갖는 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시 형태에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 서열 번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0133] 일부 실시 형태에 따르면, 세포내 신호전달 도메인은 인간 4-1BB로부터 유래된 공동자극성 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시 형태에서, 공동자극성 세포내 신호전달 도메인은 서열 번호 6과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0134] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 CAR은 CAR을 발현하는 숙주 세포와 회합된다.
- [0135] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 CAR은 CAR을 발현하는 숙주 세포의 단리된 세포막에 존재한다.
- [0136] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 CAR은 CAR을 발현하는 숙주 세포의 다른 성분들로부터 정제되거나 단리된다.

[0137] TCR 및 B2M을 파괴하기 위한 예시적인 엔도뉴클레아제

본 발명의 결과로서, 개선된 특성을 갖는 조작된 불멸화 T-세포가 얻어질 수 있다. 특히, 본 발명은 조작된, 바람직하게는 불멸화 T-세포를 제공하며, 이는 TCR 및 B2M의 발현이 억제되는 것을 특징으로 한다.

소정 실시 형태에 따르면, 조작된 불멸화 T-세포는 관심 유전자, 예컨대 TCR 또는 B2M을 인코딩하는 유전자를 DNA 절단에 의해 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 엔도뉴클레아제를 발현한다. 용어 "엔도뉴클레아제"는 DNA 또는 RNA 분자, 바람직하게는 DNA 분자 내의 핵산들 사이의 결합의 가수분해(절단)를 촉매할 수 있는 야생형 또는 변이 효소를 지칭한다. 특히, 상기 엔도뉴클레아제는 고도로 특이적이며, 10 내지 45개의 염기쌍(bp) 길이 범위, 통상 10 내지 35개의 염기쌍 길이 범위, 더 통상적으로는 12 내지 20개의 염기쌍 길이 범위의 핵산 표적 부위를 인식한다. 본 발명에 따른 엔도뉴클레아제는, "표적 서열"로도 지칭되는 특이적 폴리뉴클레오티드 서열에서 인식하고, 상기 엔도뉴클레아제의 분자 구조에 따라, 이를 표적 서열 내부의 핵산을 절단하거나 그에 인접한 서열 내로 들어가서 핵산을 절단한다. 엔도뉴클레아제는 특이적 폴리뉴클레오티드 서열에서 인식하고 단일 가닥 또는 이중 가닥 절단을 생성할 수 있다.

특정 실시 형태에서, 상기 엔도뉴클레아제는 Cas9/CRISPR 복합체이다. Cas9/CRISPR 엔도뉴클레아제는 Cas9가 RNA 분자와 회합하는 게놈 조작 툴의 새로운 세대를 구성한다. 이러한 시스템에서, RNA 분자 뉴클레오티드 서열은 표적 특이성을 결정하고 엔도뉴클레아제를 활성화시킨다(문헌[Gasiunas, Barrangou et al. 2012]; 문헌[Jinek, Chylinski et al. 2012]; 문헌[Cong, Ran et al. 2013]; 문헌[Mali, Yang et al. 2013]). Csn1로도 명명된 Cas9는 crRNA 생물발생 및 침습 DNA의 파괴 둘 모두에 참여하는 큰 단백질이다. Cas9는 상이한 세균종, 예컨대 *S. thermophilus*, 리스테리아 이노쿠아(*Listeria innocua*)(문헌[Gasiunas, Barrangou et al. 2012]; 문헌[Jinek, Chylinski et al. 2012]) 및 *S. Pyogenes*(*S. Pyogenes*)(문헌[Deltcheva, Chylinski et al. 2011])에 존재하는 것으로 기재되어 있다. 큰 Cas9 단백질(1200개 초과의 아미노산)은 2개의 예측된 뉴클레아제 도메인, 즉 이 단백질의 중간에 위치된 HNH(McrA-유사) 뉴클레아제 도메인 및 분할된 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인(RNase H 폴드)을 함유한다. Cas9 변이체는, 자연에서 천연적으로 존재하지 않고 단백질 조작에 의해 또는 무작위 돌연변이유발에 의해 얻어지는 Cas9 엔도뉴클레아제일 수 있다. 본 발명에 따른 Cas9 변이체는, 예를 들어 돌연변이, 즉, *S. Pyogenes* Cas9 엔도뉴클레아제(COG3513)의 아미노산 서열 내의 적어도 하나의 잔기의 삽입 또는 치환, 또는 그로부터의 결실에 의해 얻어질 수 있다.

다른 실시 형태에서, 상기 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제라는 명칭으로도 알려진 호밍 엔도뉴클레아제일 수 있다. 그러한 호밍 엔도뉴클레아제는 당업계에 잘 알려져 있다(문헌[Stoddard 2005]). 호밍 엔도뉴클레아제는 고도로 특이적이며, 12 내지 45개의 염기쌍(bp) 길이 범위, 통상 14 내지 40개의 bp 길이 범위의 DNA 표적 부위를 인식한다. 본 발명에 따른 호밍 엔도뉴클레아제는, 예를 들어 LAGLIDADG(서열 번호 67) 엔도뉴클레아제, HNH 엔도뉴클레아제, 또는 GIY-YIG 엔도뉴클레아제에 상응할 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 호밍 엔도뉴클레아제는 I-CreI 변이체일 수 있다. "변이" 엔도뉴클레아제, 즉 자연에서 천연적으로 존재하지 않고 유전자 조작에 의해 또는 무작위 돌연변이유발에 의해 얻어지는 엔도뉴클레아제는 야생형 엔도뉴클레아제에 의해 인식되는 것과 상이한 DNA 서열에 결합할 수 있다(국제 특허 출원 공개 WO2006/097854호 참조).

다른 실시 형태에서, 상기 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 "징크 평거 뉴클레아제"(ZFN)일 수 있는데, 이것은 일반적으로 IIS형 제한 효소인 FokI의 절단 도메인과 3개 이상의 C2H2 아연 평거 모티프를 함유하는 DNA 인식 도메인 사이의 융합체이다. 정확한 배향 및 간격으로 존재하는 2개의 개별 ZFN의 DNA 내의 특정 위치에서의 이중이량체화는 DNA에서의 이중 가닥 절단(DSB)으로 이어진다. 그러한 키메라 엔도뉴클레아제의 사용은 문헌[Genome editing with engineered zinc finger nucleases (2010) *Nature reviews Genetics* 11:636-646]에 의해 검토된 바와 같이 당업계에 광범위하게 보고되어 있다. 표준 ZFN은 절단 도메인을 각각의 아연 평거 도메인의 C-말단에 융합시킨다. 2개의 절단 도메인이 이량체화되어 DNA를 절단할 수 있게 하기 위하여, 2개의 개별 ZFN은 DNA의 서로 반대쪽에 있는 가닥을 소정의 거리를 떨어뜨려서 그들의 C-말단과 결합시킨다. 아연 평거 도메인과 절단 도메인 사이에 가장 대체적으로 사용되는 링커 서열은 각각의 결합 부위의 5' 에지가 5 내지 7개의 bp만큼 분리될 것을 필요로 한다. 새로운 아연-평거 어레이를 생성하는 가장 간단한 방법은 특이성이 알려진 더 작은 아연-평거 "모듈들"을 조합하는 것이다. 가장 일반적인 모듈식 조립 프로세스는 3개의 별개의 아연 평거를 조합하는 것을 포함하는데, 이때 각각의 아연 평거는 3-염기쌍 DNA 서열을 인식하여 3-평거 어레이를 생성할 수 있으며, 3-평거 어레이는 9-염기쌍 표적 부위를 인식할 수 있다. 많은 선택 방법이 원하는 서열을 표적화할 수 있는 아연-평거 어레이를 생성하는 데 사용되어 왔다. 선택을 위한 초기의 노력은 파지 디스플레이를 이용하여, 부분 무작위화된 아연-평거 어레이의 큰 폴(pool)로부터 주어진 DNA 표적에 결합된 단백질을 선택하였다. 더욱 최근의 노력은 효모 1-하이브리드 시스템, 세균 1-하이브리드 및 2-하이브리드 시스템, 및 포유류

세포를 이용하였다.

[0143]

다른 실시 형태에서, 상기 엔도뉴클레아제는 "TALE-뉴클레아제" 또는 "MBBD-뉴클레아제"로서, 이것은, 전형적으로 전사 활성화 인자 유사 이펙터 단백질(TALE)로부터 또는 모듈식 염기당 염기 결합 도메인(MBBBD)으로부터 유래된 DNA 결합 도메인과 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 촉매 도메인의 융합으로부터 생성된다. 그러한 촉매 도메인은 통상 효소, 예컨대 I-TevI, CoIE7, NucA 및 Fok-I로부터 유래된다. TALE-뉴클레아제는 선택된 촉매 도메인에 따라 단량체 또는 이량체 형태로 형성될 수 있다(국제 특허 출원 공개 WO2012138927호). 그러한 조작된 TALE-뉴클레아제는 상표명 TALENT™(프랑스 75013 파리 8 rue de la Croix Jarry 소재의 Cellectis)으로 구매가능하다. 일반적으로, DNA 결합 도메인은 전사 활성화 인자 유사 이펙터(TALE)로부터 유래되며, 여기서 서열 특이성은 잔토모나스(*Xanthomonas*) 또는 랄스토니아(*Ralstonia*) 세균 단백질인 비제한적인 예로서의 AvrBs3, PthXo1, AvrHah1, PthA, Tal1c로부터 기원되는 일련의 33 내지 35개의 아미노산 반복부에 의해 유도된다. 이들 반복부는 염기쌍과의 상호작용을 특정하는 2개의 아미노산 위치에 의해 본질적으로 상이하다(문현[Boch, Scholze et al. 2009]; 문현[Moscou and Bogdanove 2009]). DNA 표적 내의 각각의 염기쌍이 단일 반복부에 의해 접촉되며, 이때 특이성은 반복부의 2개의 변이 아미노산(이른바 반복 가변 다이펩티드, RVD)으로부터 생성된다. TALE 결합 도메인은 표적화된 서열의 제1 티민 염기(T0)의 요건을 담당하는 N-말단 전위 도메인 및 핵 위치 신호(NLS)를 함유하는 C-말단 도메인을 추가로 포함할 수 있다. TALE 핵산 결합 도메인은 일반적으로 복수의 TALE 반복 서열을 포함하는 조작된 코어 TALE 스캐폴드에 상응하며, 각각의 반복부는 TALE 인식 부위의 각각의 뉴클레오티드 염기에 특이적인 RVD를 포함한다. 본 발명에서, 상기 코어 스캐폴드의 각각의 TALE 반복 서열은 30 내지 42개의 아미노산, 더 바람직하게는 33개 또는 34개로 만들어지며, 여기서 위치 12 및 13에 위치된 2개의 중요한 아미노산(이른바 반복 가변 다이펩티드, RVD)은 상기 TALE 결합 부위 서열의 하나의 뉴클레오티드의 인식을 매개하며; 동등한 2개의 중요한 아미노산은, 특별히 33개 또는 34개 아미노산 길이보다 더 긴 TALE 반복 서열에서, 12 및 13 이외의 위치에 위치될 수 있다. 바람직하게는, 상이한 뉴클레오티드의 인식과 관련된 RVD는, C를 인식하기 위한 HD, T를 인식하기 위한 NG, A를 인식하기 위한 NI, G 또는 A를 인식하기 위한 NN이다. 다른 실시 형태에서, 중요한 아미노산 12 및 13은 뉴클레오티드 A, T, C 및 G로 그들의 특이성을 조절하고, 특히 이러한 특이성을 향상시키기 위하여 다른 아미노산 잔기로 돌연변이될 수 있다. TALE 핵산 결합 도메인은 통상 8 내지 30개의 TALE 반복 서열을 포함한다. 더 바람직하게는, 본 발명의 상기 코어 스캐폴드는 8 내지 20개의 TALE 반복 서열; 더욱 더 바람직하게는, 15개의 TALE 반복 서열을 포함한다. 이는 또한 상기 TALE 반복 서열 세트의 C-말단에 위치된 20개의 아미노산으로 만들어진 추가의 단일 절단 TALE 반복 서열, 즉 추가의 C-말단 절반-TALE 반복 서열을 포함할 수 있다. 다른 모듈식 염기당 염기 특이적 핵산 결합 도메인(MBBBD)은 국제 특허 출원 공개 WO 2014/018601호에 기재되어 있다. 상기 MBBBD는, 예를 들어 새롭게 확인된 단백질, 즉 내부공생 진균 부르크홀데리아 리족시니카(*Burkholderia rhizoxinica*)의 최근에 서열분석된 게놈으로부터의 EAV36_BURRH, E5AW43_BURRH, E5AW45_BURRH 및 E5AW46_BURRH 단백질로부터 조작될 수 있다. 이들 핵산 결합 폴리펩티드는 염기 특이성인 약 31 내지 33개의 아미노산의 모듈을 포함한다. 이들 모듈은 잔토모나스 TALE 공통 반복부와 40% 미만의 서열 동일성을 나타내며, 더 많은 폴리펩티드 서열 가변성을 제시한다. 부르크홀데리아 및 잔토모나스로부터의 상기 단백질로부터의 상이한 도메인들(모듈, N 및 C-말단)은 특이적 핵산 서열에 대한 결합 특성을 갖는 새로운 단백질 또는 스캐폴드를 조작하는 데 유용하고, 이들은 조합되어 키메라 TALE-MBBBD 단백질을 형성할 수 있다.

[0144]

본 발명의 실시 형태와 관련된 방법 및 조성물

[0145]

소정 태양에서, 본 발명은 항원-특이적인 재유도된 조작된 불멸화 CAR-T 세포를 제조하고/하거나 증폭시키는 방법을 포함하며, 상기 방법은 TCR/B2M 결핍 불멸화 T 세포를 CAR을 인코딩하는 DNA 작제물을 함유하는 발현 벡터로 형질감염시키는 단계를 포함한다.

[0146]

다른 태양에서, 본 발명은 전기천공에 의해, 또는 외피 비보유 DNA를 사용하는 비-바이러스 유전자 전달(예컨대, 제한 없이, 초음파 천공)에 의해 조작된 불멸화 T 세포를 안정하게 형질감염시키고 재유도하는 방법이다. 대부분의 연구자들은 이종 유전자를 T 세포 내로 운반하는 데 바이러스 벡터를 사용해 왔다. 외피 비보유 DNA를 사용함으로써, 재유도된 T 세포를 생성하는 데 필요한 시간이 감소될 수 있다. "외피 비보유 DNA"는 발현을 위해 적절한 배향으로 발현 카세트 또는 벡터 내에 함유된 키메라 T-세포 수용체(cTCR)를 인코딩하는 DNA를 의미한다. 본 발명의 전기천공 방법은 안정된 형질감염체를 생성하며, 이러한 형질감염체는 키메라 TCR(cTCR)을 발현하고 그들의 표면 상에 이것을 가진다.

[0147]

"키메라 TCR"은, T 세포에 의해 발현되고 세포내 신호전달 도메인, 막관통 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하는 수용체를 의미하며, 세포외 도메인은 MHC 비제한 방식으로 T-세포 수용체에 의해 정상적으로 결합되지 않는

항원에 그러한 방식으로 특이적으로 결합할 수 있다. 적절한 조건 하에서의 항원에 의한 T 세포의 자극은 세포의 증식(증폭)을 가져온다. 본 발명의 예시적인 BCMA 및 FN3 도메인-특이적 키메라 수용체는 키메라 TCR의 예이다. 그러나, 상기 방법은 다른 표적 항원에 특이적인 키메라 TCR, 예컨대 HER2/Neu, ERBB2, 엽산염 결합 단백질, 신세포 암종, 및 HIV-1 외피 당단백질인 gp20 및 gp41에 특이적인 키메라 TCR을 사용한 형질감염에 적용 가능하다. 다른 세포-표면 표적 항원은 CD20, 암배아 항원, 메소텔린, c-Met, CD56, HERV-K, GD2, GD3, 알파胎아단백질, CD23, CD30, CD123, IL-IIR알파, 카파 사슬, 람다 사슬, CD70, CA-125, MUC-1, EGFR 및 변이체, 상피 종양 항원 등을 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0148] 소정 태양에서, T 세포는 불멸화 인간 T 세포이다. 조건은 mRNA 및 DNA, 그리고 전기천공의 사용을 포함한다. 형질감염 후에, 세포는 즉시 주입될 수 있거나 저장될 수 있다. 소정 태양에서, 형질감염 후, 세포는 세포 내로의 유전자 전달 후 약 1, 2, 3, 4, 5일 또는 그 이상의 일수 이내에 벌크 집단으로서 생체외에서 수일, 수주, 또는 수개월 동안 증식될 수 있다. 추가의 태양에서, 형질감염 후, 형질감염체를 클로닝하고, 단일 통합된 또는 에피솜에 유지된 발현 카세트 또는 플라스미드의 존재, 및 키메라 수용체의 발현을 보여주는 클론을 생체외에서 증폭시킨다. 증폭을 위해 선택된 클론은 BCMA-발현 표적 세포를 특이적으로 인식하고 용해시키는 능력을 보여준다. 재조합 불멸화 T 세포는 IL-2, 또는 공통 감마-사슬에 결합하는 다른 사이토카인(예를 들어, IL-7, IL-15, IL-21, 및 기타)에 의한 자극에 의해 증폭될 수 있다. 추가의 태양에서, 유전자 변형된 세포는 동결보존될 수 있다.

[0149] 주입 후 T-세포 증식(생존)은 하기에 의해 평가될 수 있다: (i) CAR에 특이적인 프라이머를 사용하는 q-PCR; 및 /또는 (ii) CAR에 특이적인 항체를 사용하는 유세포측정.

[0150] 본 발명은 또한 TCR 및 B2M 발현이 없는 재유도된 불멸화 T 세포를 사용하여, 세포-표면 에피토프가 BCMA-특이적인 암, 더 특히, 다발성 골수종을 표적화하는 것을 나타낸다. 악성 B 세포는 재유도된 T 세포에 대한 탁월한 표적인데, 그 이유는, B 세포는 T 세포를 위한 면역자극성 항원-제시 세포로서의 역할을 할 수 있기 때문이다. 본 발명의 소정 실시 형태에서, 본 발명의 조작된 불멸화 T 세포는 이를 필요로 하는 개체, 예컨대 암 또는 감염을 갖는 개체에게 전달된다. 이어서, 세포는 개체의 면역 시스템을 증강시켜 각각의 암 또는 병원성 세포를 공격한다. 일부 경우에, 개체에게 항원-특이적인 조작된 불멸화 T 세포의 1회 이상의 용량이 제공된다. 개체에게 항원-특이적인 조작된 불멸화 T 세포의 2회 이상의 용량이 제공되는 경우에, 투여간 지속기간은 개체에서 증식을 위한 시간을 허용하기에 충분해야 하며, 구체적인 실시 형태에서, 투여간 지속기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일, 또는 그 이상의 일수이다.

[0151] 키메라 항원 수용체를 포함하고 그리고 또한 기능성 TCR 및 B2M이 결여되도록 변형된 불멸화 T 세포의 공급원은 임의의 종류의 것일 수 있지만, 구체적인 실시 형태에서, 세포는, 예를 들어 제대혈, 말초 혈액, 인간 배아 줄기 세포, 또는 유도 만능 줄기 세포의 뱅크로부터 입수된다. 상이한 뱅크들은 동일한 HLA를 공유하지 않을 것이며, 따라서 다수의 뱅크가 사용될 수 있다.

[0152] 치료적 효과를 위한 적합한 용량은, 예를 들어, 바람직하게는 일련의 투여 사이클에서, 용량당 적어도 10^5 개 또는 약 10^5 개 내지 약 10^{10} 개의 세포일 것이다. 예시적인 투여 계획(dosing regimen)은 일수 0에서 적어도 약 105개의 세포에서 시작하여, 점증하는 용량의 4회의 1주 투여 사이클로 이루어지며, 예를 들어, 환자내 용량 점증 계획을 개시한지 수주 이내에 약 10^{10} 개의 세포의 표적 용량에 이르기까지 증분적으로 증가시킨다. 적합한 투여 방식은 정맥내, 피하, 강내(예를 들어, 저장소-접근 디바이스에 의함), 복막내, 및 종양 덩어리 내로의 직접 주사를 포함한다.

[0153] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독으로 사용되거나 암을 치료하는 데 유용한 다른 잘 확립된 작용제와 병용하여 사용될 수 있다. 단독으로 전달되든지 다른 작용제와 병용하여 전달되든지 어느 것이든 간에, 본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 경로를 통해 포유류, 특히 인간의 체내의 다양한 부위로 전달되어 특정 효과를 달성할 수 있다. 당업자는 하나 초과의 경로가 투여를 위해 사용될 수 있지만, 특정 경로가 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 피내 전달은 흑색종의 치료에 있어서 흡입에 비하여 유리하게 사용될 수 있다. 국부 또는 전신 전달은 체강 내로의 제형의 점적주입 또는 적용, 에어로졸의 흡입 또는 취입을 포함하는 투여에 의해 달성되거나, 근육내, 정맥내, 문맥내, 간내, 복막, 피하, 또는 피내 투여를 포함하는 비경구 도입에 의해 달성될 수 있다.

[0154] 본 발명의 조성물은 단위 투여 형태로 제공될 수 있으며, 여기서 각각의 투여 단위, 예를 들어 주사제는 단독으로의 또는 다른 활성제와 적절하게 병용된 조성물을 미리 결정된 양으로 함유한다. 본 명세서에 사용되는 바와

같이, 용어 단위 투여 형태는 인간 및 동물 대상체를 위한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 단독으로의 또는 다른 활성제와 병용된 본 발명의 조성물을, 원하는 효과를 생성하기에 충분한 양으로 계산된 미리 결정된 양으로 함유하며, 상기 조성물은 적절한 경우 약제학적으로 허용되는 회석제, 담체, 또는 비히클과 회합된다. 본 발명의 신규한 단위 투여 형태에 대한 사양은 특정 대상체에서의 약제학적 조성물과 관련된 특정 약력학적 특성에 좌우된다.

[0155] 바람직하게는, 조작된 불멸화 T 세포의 유효량 또는 충분한 수가 조성물에 존재하고 대상체 내로 도입되어 장기간의 특이적 항-종양 반응이 확립되도록 하여, 달리 그러한 치료의 부재 하에서 초래될 종양 성장 또는 재성장을 제거하거나 종양의 크기를 감소시키도록 한다. 바람직하게는, 대상체 내로 재도입되는 조작된 불멸화 T 세포의 양은, 조작된 불멸화 T 세포가 존재하지 않는 것 이외에는 동일한 조건과 대비하여 종양 크기의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 100% 감소를 야기한다.

[0156] 따라서, 투여되는 조작된 불멸화 T 세포의 양은 투여 경로를 고려해야 하며, 원하는 치료적 반응을 달성하도록 조작된 불멸화 T 세포의 충분한 수가 도입되도록 하는 것이어야 한다. 더욱이, 본 명세서에 기재된 조성물 내에 포함된 각각의 활성제의 양(예를 들어, 각각의 세포당 접촉되게 될 양 또는 소정 체중당 양)은 상이한 응용에서 변동될 수 있다. 일반적으로, 조작된 불멸화 T 세포의 농도는 바람직하게는 치료되는 대상체에서 적어도 약 1×10^6 내지 약 1×10^9 개의 조작된 불멸화 T 세포, 더욱 더 바람직하게는, 약 1×10^7 내지 약 5×10^8 개의 조작된 불멸화 T 세포를 제공하기에 충분하여야 하지만, 이보다 초과(예를 들어, 5×10^8 개 초과의 세포)이거나 이보다 미만(예를 들어, 1×10^7 개 미만의 세포)인 임의의 적합한 양이 이용될 수 있다. 투여 스케줄은 잘 확립된 세포-기반 요법에 기초할 수 있거나(예를 들어, 문헌[Topalian and Rosenberg, 1987]; 미국 특허 제4,690,915호 참조), 또는 대안적인 연속 주입 전략이 사용될 수 있다.

[0157] 이들 값은 본 발명의 실시를 위해 본 발명의 방법을 최적화할 때 실무인에 의해 이용될 조작된 불멸화 T 세포의 범위에 대한 일반적인 지침을 제공한다. 본 명세서에서의 그러한 범위의 언급은 성분의 더 많거나 더 적은 양의 사용을 결코 배제하지 않으며, 이는 마찬가지로 특정 응용에서도 보장될 수 있다. 예를 들어, 실제 용량 및 스케줄은 조성물이 다른 약제학적 조성물과 병용되어 투여되는지의 여부에 따라, 또는 약동학적 특성, 약물 체내동태(disposition), 및 대사의 개인간 차이에 따라 변동될 수 있다. 당업자는 특정 긴급 상황에 따라 임의의 필요한 조정을 용이하게 행할 수 있다.

면역 시스템 및 면역요법

[0158] 일부 실시 형태에서, 특이적 면역 반응을 도출하는 재유도된 불멸화 T 세포의 전달에 의해 의학적 장애가 치료된다. 본 발명의 일 실시 형태에서, 특이적 면역 반응을 도출하는 재유도된 불멸화 T 세포의 전달에 의해 암 또는 의학적 장애가 치료된다. 따라서, 면역학적 반응에 대한 기본적인 이해가 필요하다.

[0159] 적응 면역 시스템의 세포는 림프구로 불리는 백혈구의 한 유형이다. B 세포 및 T 세포가 주요 유형의 림프구이다. B 세포 및 T 세포는 동일한 만능 조혈 줄기 세포로부터 유래되며, 이들이 활성화된 이후에야 서로 구별 가능하다. B 세포는 체액성 면역 반응에서 큰 역할을 하는 반면, T 세포는 세포-매개 면역 반응에 밀접하게 관여되어 있다. T 세포는, T-세포 수용체(TCR)로 불리는 그들의 세포 표면 상의 특별한 수용체의 존재에 의해 B 세포 및 NK 세포와 같은 다른 림프구 유형과 구별될 수 있다. 거의 모든 다른 척추동물에서, B 세포 및 T 세포는 골수 내의 줄기 세포에 의해 생성된다. T 세포는 흉선으로 이동하고 거기서 발달하며, 이로부터 그의 명칭이 유래된다. 인간에서, 항원-특이적 림프구가 2차 림프계 조직 내에서 그들의 특이적 항원을 찾을 가능성을 최적화하기 위하여 림프구 풀의 대략 1% 내지 2%가 매시간마다 재순환된다.

[0160] T 림프구는 골수 내의 조혈 줄기 세포로부터 발생하고, 흉선으로 이동하여 성숙하게 된다. T 세포는 그들의 막상에 특유의 항원 결합 수용체(T-세포 수용체)를 발현하며, 이것은 단지 다른 세포의 표면 상의 주요 조직적 합성 복합체(MHC) 분자와 회합된 항원만을 인식할 수 있다. T 헬퍼 세포 및 T 세포독성 세포로 알려진 T 세포의 적어도 2개의 집단이 존재한다. T 헬퍼 세포 및 T 세포독성 세포는 그들이 각각 디스플레이하는 막 결합 당단백질 CD4 및 CD8에 의해 구별된다. T 헬퍼 세포는 B 세포, T 세포독성 세포, 대식세포, 및 면역 시스템의 다른 세포의 활성화에 중요한 다양한 림포카인을 분비한다. 대조적으로, 항원-MHC 복합체를 인식하는 T 세포독성 세포는 증식하고 세포독성 T 림프구(CTL)로 불리는 이팩터 세포로 분화하며, CTL은 세포 용해를 가져오는 물질을 생성함으로써 항원을 디스플레이하는 신체의 세포, 예컨대 바이러스 감염된 세포 및 종양 세포를 제거한다. 자연 살해 세포(또는 NK 세포)는 선천 면역 시스템의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구의 한 유형이다. NK 세포는 종양 및 바이러스에 의해 감염된 세포의 거부에 있어서 주요 역할을 한다. 이러한 세포는 표적 세포가

아폽토시스에 의해 죽게 하는, 퍼포린 및 그란자임으로 불리는 작은 세포질 단백질 과립을 방출함으로써 사멸시킨다.

[0162] B 세포는 그의 표면 상의 항체가 특이적 외래 항원에 결합할 때 병원체를 확인한다. 이러한 항원/항체 복합체는 B 세포에 의해 흡수되고 단백질 분해에 의해 처리되어 웨티드가 된다. 이어서, B 세포는 그의 표면 MHC를 래스 II 분자 상에 이를 항원성 웨티드를 디스플레이한다. MHC와 항원의 이러한 조합은 매칭 헬퍼 T 세포를 끌어당기며, 이는 림포카인을 방출하고 B 세포를 활성화시킨다. 이어서, 활성화된 B 세포가 분할되기 시작함에 따라, 그의 자손(형질 세포)은 이러한 항원을 인식하는 항체의 수백만 카피를 분비한다. 이들 항체는 혈장 및 림프 중에서 순환하고, 항원 및 마크(보체 활성화에 의한 파괴 또는 죽세포에 의한 흡수 및 파괴를 위한 힘)를 발현하는 병원체에 결합한다. 항체는 또한, 세균 독소에 결합함으로써 또는 바이러스 및 세균에 의해 사용되는 수용체를 방해하여 세포를 감염시킴으로써 공격물(challenge)을 직접 중화시킬 수 있다.

[0163] NK 세포 또는 자연 살해 세포는, T-세포 항원 수용체(TCR) 또는 Pan T 마커 CDS 또는 표면 면역글로불린(Ig) B 세포 수용체를 발현하지 않지만, 통상 인간에서는 표면 마커 CD16(FcyRIII) 및 CD56을 그리고 소정의 마우스 계통에서는 NK1.1/NK1.2를 발현하는 대과립 림프구로서 정의된다.

[0164] 대식세포, B 림프구, 및 수지상 세포를 포함한 항원-제시 세포는 그들이 발현하는 특정 MHC 분자에 의해 구별된다. APC는 항원을 내재화하고, 그의 외부 세포막 상의 MHC 분자와 함께, 그러한 항원의 일부를 재발현한다. 주요 조직적합성 복합체(MHC)는 다수의 유전자좌를 갖는 큰 유전자 복합체이다. MHC 유전자좌는 클래스 I 및 클래스 II MHC로 지칭되는 2개의 주요 클래스의 MHC 막 분자를 인코딩한다. T 헬퍼 림프구는 일반적으로 MHC 클래스 II 분자와 회합된 항원을 인식하고, T 세포독성 림프구는 MHC 클래스 I 분자와 회합된 항원을 인식한다. 인간에서, MHC는 HLA 복합체로 지칭되고, 마우스에서는 H-2 복합체로 지칭된다.

[0165] T-세포 수용체 또는 TCR은 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 것을 일반적으로 담당하는 T 림프구(또는 T 세포)의 표면 상에서 발견되는 분자이다. 이것은 T 세포의 95%에서 알파 및 베타 사슬로 이루어진 이종이량체이며, 한편 T 세포의 5%는 감마 및 델타 사슬로 이루어진 TCR을 갖는다. TCR과 항원 및 MHC의 결합은 관련 효소, 공동수용체, 및 특수화된 보조 분자에 의해 매개되는 일련의 생화학적 사건을 통해 T 림프구의 활성화를 가져온다. 면역학에서, CDS 항원(CD는 문화 클러스터를 나타냄)은 포유동물에서 4개의 별개의 사슬(CDS_v, CD35, 및 2배의 CDSe)로 구성된 단백질 복합체로서, 이러한 단백질 복합체는 T-세포 수용체(TCR) 및 ζ-사슬로서 알려진 분자와 회합하여 T 림프구에서 활성화 신호를 생성한다. TCR, ζ-사슬, 및 CDS 분자는 함께 TCR 복합체를 구성한다. CD3y, CD38, 및 CD3s 사슬은 단일 세포의 면역글로불린 도메인을 함유하는 면역글로불린 수퍼페밀리의 고도로 관련된 세포 표면 단백질이다. CDS 사슬의 막관통 영역은 음으로 하전되는데, 이러한 특성으로 인해 이러한 사슬이 양으로 하전된 TCR 사슬(TCRα 및 TCRβ)과 회합될 수 있다. CDS 분자의 세포내 꼬리는 면역수용체 티로신제 활성화 모티프 또는 약칭으로 ITAM으로 알려진 단일의 보존된 모티프를 함유하며, 이는 'TCR의 신호전달 능력에 필수적이다.

[0166] CD28은 T 세포 상에 발현되는 분자들 중 하나로서, 이는 T 세포 활성화에 필요한 공동자극성 신호를 제공한다. CD28은 B7.1(CD80) 및 B7.2(CD86)에 대한 수용체이다. 틀-유사(Toll-like) 수용체 리간드에 의해 활성화될 때, B7.1 발현은 항원 제시 세포(APC)에서 상향조절된다. 항원 제시 세포 상에서의 B7.2 발현은 구성적이다. CD28은 미감작(naive) T 세포 상에서 구성적으로 발현되는 유일한 B7 수용체이다. TCR에 더하여 CD28을 통한 자극은 다양한 인터류킨(특히, IL-2 및 IL-6)의 생성을 위하여 T 세포에 강력한 공동자극성 신호를 제공할 수 있다.

[0167] 인간 질병에 대한 치료적 개입으로서 항원-특이적 T 세포를 단리하고 증폭시키는 전략은 임상 시험에서 입증되어 왔다(문헌[Riddell et al., 1992]; 문헌[Walter et al., 1995]; 문헌[Heslop et al., 1996]).

[0168] 악성 B 세포는 재유도된 T 세포에 대한 탁월한 표적인 것으로 나타나는데, 그 이유는, B 세포는 T 세포를 위한 면역자극성 항원-제시 세포로서의 역할을 할 수 있기 때문이다(문헌[Glimcher et al., 1982]). 림프종은 림프절 지향성으로 인해, T 세포-매개 인식 및 제거에 있어서 해부학적으로 이상적으로 위치되어 있다. 주입된 T 세포의 다수가 림프절로 국재화되는 것은 HIV-특이적 CD8⁺ CTL 클론의 주입을 제공받은 HIV 환자에 대해 문서로 기록되어 있다. 이를 환자에서, 림프절 생검 재료의 평가는 주입된 클론이 림프절의 CD8⁺ 세포의 대략 2% 내지 8%를 구성함을 보여주었다. 림프절 호밍은 T 세포를 구성적 프로모터 하에서 L-선택 분자를 인코딩하는 cDNA 작제물로 공동-형질감염시킴으로써 추가로 개선될 수 있는데, 그 이유는, 이러한 부착 분자는 순환 T 세포를 림프절로 다시 유도하고 시험관내 증폭에 의해 하향조절되기 때문이다(문헌[Chao et al., 1997]). 본 발명은 내

인성 BCMA를 발현하는 세포와 관련된 인간 질병 상태를 치료하는 방법을 제공할 수 있으며, 상기 방법은 전술된 바와 같은 재조합 인간 BCMA-특이적 CAR 발현 세포의 치료적 유효 용량을 환자에게 주입하는 단계를 포함한다. 내인성 BCMA를 발현하는 세포와 관련된 인간 질환 상태는 다발성 골수종, 림프종, 백혈병, 비호지킨 림프종, 급성 림프아구성 백혈병, 만성 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 및 B 세포-관련 자가면역 질병으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0169] 다발성 골수종(MM)은 클론 형질 세포의 축적을 특징으로 하는 암이다. MM은 두 번째로 가장 일반적인 혈액학적 악성종양이며, 그것은 모든 암으로 인한 사망 중 무려 2%를 차지한다. MM은 이질적 질병이고, 광범위한 공격 및 치료 저항성을 특징으로 한다. 일부 환자는 진단 후 10년 이상 생존하는 반면에, 다른 환자는 급속한 치료-저항성 진행을 겪고 2년 이내에 사망한다. 새로운 치료제의 개발의 진행에도 불구하고, 현재 MM에 대한 치유법은 없다. 현재의 요법은 종종 MM의 관해로 이어지지만, 이 질병은 결국 거의 모든 환자에서 재발하고 궁극적으로 치명적이다(문헌[Naymagon and Abdul-Hay, J Hematol Oncol. 2016 Jun 30;9(1):52]). 게다가, 화학요법 및 방사선 요법을 포함하는 전통적인 치료 방법은 독성 부작용으로 인해 제한된 유용성을 갖는다.

[0170] 백혈병은 혈액 또는 골수의 암이며, 혈액 세포, 통상 백혈구의 비정상 증식(multiplication)에 의한 생산)을 특징으로 한다. 이것은 혈액학적 신생물로 불리는 광범위한 질병군의 일부이다. 백혈병은 광범위한 질병을 커버하는 광의의 용어이다. 백혈병은 임상적으로 그리고 병리학적으로 그의 급성 및 만성 형태로 나누어 진다.

[0171] 급성 백혈병은 미성숙 혈액 세포의 급속한 증식을 특징으로 한다. 이러한 밀집(crowding)은 골수가 건강한 혈액 세포를 생성할 수 없게 한다. 급성 형태의 백혈병은 소아 및 젊은 성인에서 발생할 수 있다. 실제로, 이는 미국에서 어떠한 다른 유형의 악성 질병보다도 소아 사망의 더 일반적인 원인이다. 악성 세포의 신속한 진행 및 축적 - 이어서, 이것은 넘쳐서 혈류 내로 유입되고 신체의 다른 기관으로 퍼짐 - 으로 인해 급성 백혈병에서 즉각적인 치료가 필요하다. 중추 신경계(CNS) 침범은 흔하지 않지만, 이 질병은 때때로 두개 신경 마비를 야기 할 수 있다. 만성 백혈병은 비교적 성숙하지만 여전히 비정상적인 혈액 세포의 과도한 축적에 의해 구별된다. 전형적으로 진행되기까지 수개월 내지 수년이 걸리는데, 세포는 정상 세포보다 훨씬 더 높은 속도로 생성되며, 그 결과 혈액 중에 비정상 백혈구가 많아지게 된다. 만성 백혈병은 대부분 노인에게서 발생하지만, 이론상 어려한 연령군에서도 발생할 수 있다. 급성 백혈병은 즉시 치료되어야 하지만, 만성 형태는 치료의 최대 유효성을 보장하기 위하여 치료 전에 때때로 어느 정도의 시간 동안 모니터링된다.

[0172] 더욱이, 이를 질병은 림프구성 또는 림프아구성 및 골수원성(myelogenous) 또는 골수성(myeloid)으로 분류되는데, 림프구성 또는 림프아구성은 정상적으로 진행되어 림프구를 형성하는 골수 세포 유형에서 암성 변화가 일어났음을 나타내고, 골수원성 또는 골수성은 정상적으로 진행되어 적혈구, 일부 유형의 백혈구, 및 혈소판을 형성하는 골수 세포 유형에서 암성 변화가 일어났음을 나타낸다(림프계 세포 vs. 골수계 세포 참조).

[0173] 급성 림프구성 백혈병(급성 림프아구성 백혈병 또는 ALL로도 알려짐)은 어떤 소아에서 가장 일반적인 유형의 백혈병이다. 이 질병은 또한 성인, 특히 65세 이상의 성인에게 영향을 준다. 만성 림프구성 백혈병(CLL)은 55세 이상의 성인에게 가장 흔히 영향을 준다. 그것은 때때로 더 젊은 성인들에서 발생하지만, 소아에게는 거의 영향을 주지 않는다. 급성 골수원성 백혈병(급성 골수성 백혈병 또는 AML로도 알려짐)은 소아에게서보다 성인에게서 더 일반적으로 발생한다. 이러한 유형의 백혈병은 이전에는 "급성 비림프구성 백혈병"이라고 불렸다. 만성 골수원성 백혈병(CML)은 주로 성인에게서 발생하며, 매우 적은 수의 소아에게서 또한 이 질병이 발생된다.

[0174] 림프종은 림프구(척추동물 면역 시스템에서의 백혈구의 한 유형)에서 기원된 암의 한 유형이다. 많은 유형의 림프종이 있다. 미국 국립 보건원(U.S. National Institutes of Health)에 따르면, 림프종은 미국에서 모든 암 사례의 약 5%를 차지하고, 특히 호지킨 림프종은 미국에서 모든 암 사례의 1% 미만을 차지한다. 림프계는 신체 면역 시스템의 일부이기 때문에, 예를 들어 HIV 감염으로 인해 또는 소정의 약물 또는 의약으로 인해, 악화된 면역 시스템을 갖는 환자는 또한 더 높은 림프종 발병률을 갖는다.

[0175] 19세기 및 20세기에, 이 질병은 호지킨병으로 불렸는데, 그 이유는, 이것이 1832년에 토마스 호지킨(Thomas Hodgkin)에 의해 발견되었기 때문이다. 일상적으로, 림프종은 폭넓게 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종(다른 유형의 모든 림프종)으로 카테고리화된다. 림프종의 유형의 과학적 분류를 더 상세히 설명한다. 구 분류는 조직구조 림프종으로 지칭하지만, 이들은 신 분류에서는 B, T, 또는 NK 세포 계통으로 인식된다.

[0176] 자가면역 질병, 또는 자가면역은 유기체가 "자기"로서 그 자신의 구성 부분(분자 아래 수준(sub-molecular)까지 내려감)을 인식하지 못하는 것이며, 그 결과 그 자신의 세포 및 조직에 대해 면역 반응을 일으킨다. 그러한 비

정상적인 면역 반응으로부터 발생되는 임의의 질병을 자가면역 질병이라 부른다. 주된 예에는 셀리악병(Celiac disease), 제1형 진성 당뇨병(IDDM), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증(MS), 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 특발성 혈소판감소성 자반증, 및 류마티스성 관절염(EA)이 포함된다.

[0177] 자가면역 질병을 포함한 염증성 질병이 또한 B-세포 장애와 관련된 질병의 한 부류이다. 자가면역 질병의 예에는 급성 특발성 혈소판감소성 자반증, 만성 특발성 혈소판감소성 자반증, 피부근염, 시드남 무도병(Sydenham's chorea), 중증 근무력증, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 류마티스성 열, 다분비선 증후군, 수포성 유사천포창, 진성 당뇨병, 헤노흐-쇤라인 자반증(Henoch-Schonlein purpura), 연쇄상 구균 감염 후 신염, 결절 홍반, 타카야스 관절염, 애디슨병, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 유육종증, 궤양성 결장염, 다형 홍반, IgA 신장병증, 결절성 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 굿파스처 증후군, 폐색성 혈전혈관염, 쇼그伦 증후군, 원발성 담즙성 간경변, 하시모토 갑상선염, 갑상선증독증, 경피증, 만성 활동성 간염, 다발성근염/피부근염, 다발성연골염, 심상성 천포창, 베케너 육아종증, 막성 신경병증, 근위축성 측삭 경화증, 척수 매독, 거대 세포 관절염/다발성근통, 악성 빈혈, 급속 진행성 사구체신염, 건선, 및 섬유화 폐포염이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 가장 일반적인 치료제는 코르티코스테로이드 및 세포독성 약물이며, 이들은 매우 독성일 수 있다. 이들 약물은 또한 면역 시스템 전체를 억제하고, 심각한 감염을 초래할 수 있으며, 골수, 간, 및 신장에 악영향을 미칠 수 있다. 지금까지 클래스 III 자가면역 질병을 치료하기 위해 사용되어 온 다른 치료제는 T 세포 및 대식세포에 대해 유도되어 왔다. 자가면역 질병, 특히 클래스 III 자가면역 질병을 치료하는 더 효과적인 방법에 대한 필요성이 있다.

본 발명의 키트의 실시 형태

[0179] 본 명세서에 기재된 임의의 조성물이 키트 내에 포함될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 조작된 불멸화 CAR-T 세포가 키트 내에 제공되며, 상기 키트는 또한 세포를 증폭시키기에 적합한 시약, 예컨대 배지를 포함할 수 있다.

[0180] 비제한적인 예로서, 키메라 수용체 발현 작제물, 키메라 수용체 발현 작제물을 생성하기 위한 하나 이상의 시약, 발현 작제물의 형질감염을 위한 세포, 및/또는 발현 구조물의 형질감염을 위한 불멸화 T 세포를 얻기 위한 하나 이상의 기구를 포함할 수 있다(그러한 기구는 주사기, 피펫, 겹자, 및/또는 임의의 그러한 의학적으로 승인된 장치일 수 있음).

[0181] 일부 실시 형태에서, 내인성 TCR 발현 및 B2M을 제거하기 위한 발현 작제물, 상기 작제물을 생성하기 위한 하나 이상의 시약, 및/또는 CAR⁺ T 세포가 키트 내에 제공된다.

[0182] 일부 실시 형태에서, Cas9 엔도뉴클레아제를 인코딩하는 발현 작제물이 포함된다.

[0183] 일부 태양에서, 키트는 세포의 전기천공을 위한 시약 또는 장치를 포함한다.

[0184] 일부 실시 형태에서, 키트는 인공 항원 제시 세포를 포함한다.

[0185] 키트는 본 발명의 조성물을 생성하기 위하여 본 발명의 하나 이상의 적합하게 분취된 조성물 또는 시약을 포함할 수 있다. 키트의 성분들은 수성 매질 내에 또는 동결건조된 형태로 패키징될 수 있다. 키트의 용기 수단은, 성분이 안으로 넣어질 수 있으며, 바람직하게는 적합하게 분취될 수 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기, 또는 다른 용기 수단을 포함할 수 있다. 키트 내에 하나 초과의 성분이 존재하는 경우, 일반적으로 키트는 또한, 추가의 성분이 개별적으로 안으로 넣어질 수 있는 제2, 제3, 또는 다른 추가의 용기를 수용할 것이다. 그러나, 성분들의 다양한 배합물이 바이알 내에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 전형적으로 시판용으로 염증하게 관리된 상태로 키메라 수용체 작제물을 수용하기 위한 수단 및 임의의 다른 시약 용기를 포함할 것이다. 그러한 용기는 예를 들어 원하는 바이알이 내부에 보유되어 있는 사출 또는 블로우 성형된 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

실시 형태

[0187] 본 발명은 또한 하기의 비제한적인 실시 형태를 제공한다.

[0188] 1. 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 불멸화 T-세포주로서, 상기 CAR은

[0189] (a) 항원 결합 영역을 포함하는 세포의 도메인;

[0190] (b) 막관통 도메인; 및

[0191] (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,

- [0192] 상기 불멸화 T-세포주는 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체를 발현하지 않고 베타 2-마이크로글로불린(B2M)을 발현하지 않는, 조작된 불멸화 T-세포주.
- [0193] 2. 실시 형태 1에 있어서, 상기 항원 결합 영역은 종양 관련 항원에 결합하는, 불멸화 T-세포주.
- [0194] 3. 실시 형태 2에 있어서, 상기 종양 관련 항원은 BCMA인, 불멸화 T-세포주.
- [0195] 4. 실시 형태 1에 있어서, 상기 항원 결합 영역은 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인에 결합하는, 불멸화 T-세포주.
- [0196] 5. 실시 형태 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 녹아웃되는, 불멸화 T-세포주.
- [0197] 6. 실시 형태 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 TCR-알파인, 불멸화 T-세포주.
- [0198] 7. 실시 형태 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 KIR3DL2인, 불멸화 T-세포주.
- [0199] 8. 실시 형태 1에 있어서, B2M은 녹아웃되는, 불멸화 T-세포주.
- [0200] 9. CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주로서, 상기 CAR은
- [0201] (a) 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인;
- [0202] (b) 막관통 도메인; 및
- [0203] (c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,
- [0204] 상기 TALL-104 세포주는 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체를 발현하지 않고 베타 2-마이크로글로불린(B2M)을 발현하지 않는, 조작된 TALL-104 세포주.
- [0205] 10. 실시 형태 9에 있어서, 상기 항원 결합 영역은 종양 관련 항원에 결합하는, 세포주.
- [0206] 11. 실시 형태 10에 있어서, 상기 종양 관련 항원은 BCMA인, 세포주.
- [0207] 12. 실시 형태 9에 있어서, 상기 항원 결합 영역은 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인에 결합하는, 세포주.
- [0208] 13. 실시 형태 9에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 녹아웃되는, 세포주.
- [0209] 14. 실시 형태 9에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 TCR-알파인, 세포주.
- [0210] 15. 실시 형태 9에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체는 KIR3DL2인, 세포주.
- [0211] 16. 실시 형태 9에 있어서, B2M은 녹아웃되는, 세포주.
- [0212] 17. CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주로서, 상기 CAR은
- [0213] (a) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드;
- [0214] (b) 서열 번호 8 내지 44 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 FN3 도메인을 포함하는 세포외 도메인;
- [0215] (c) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역;
- [0216] (d) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 막관통 도메인; 및
- [0217] (e) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 공동자극성 도메인 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 1차 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,
- [0218] 상기 세포주는 TRCA, KIR3DL2 및 B2M을 발현하지 않는, 조작된 TALL-104 세포주.
- [0219] 18. CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포주로서, 상기 CAR은
- [0220] (a) 서열 번호 54 및 55 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 scFv를 포함하는 세포외 도메인;
- [0221] (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역;
- [0222] (c) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 갖는 막관통 도메인; 및
- [0223] (d) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는 공동자극성 도메인 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 1차 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하며,
- [0224] 상기 TALL-104 세포주는 TRCA, KIR3DL2 및 B2M을 발현하지 않는, 조작된 TALL-104 세포주.

- [0225] 19. CAR을 발현하는 조작된 불멸화 T-세포주를 생성하는 시험관내 방법으로서,
- [0226] a. 불멸화 T-세포주를 제공하는 단계;
- [0227] b. 적어도 하나의 내인성 T 세포 수용체 및 B2M의 발현을 억제하는 단계; 및
- [0228] c. 상기 불멸화 T 세포 내로 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0229] 20. 실시 형태 19에 있어서, 단계 b는 단계 c 이전에 일어나는, 방법.
- [0230] 21. 실시 형태 19에 있어서, 단계 c는 단계 b 이전에 일어나는, 방법.
- [0231] 22. 실시 형태 19에 있어서, 단계 b는 엔도뉴클레아제를 사용함으로써 수행되는, 방법.
- [0232] 23. 실시 형태 22에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제는 TAL-뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 또는 Cas9인, 방법.
- [0233] 24. 실시 형태 19에 있어서, 단계 c는 전기천공 또는 바이러스-기반 유전자 전달 시스템에 의해 상기 불멸화 T 세포 내로 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계로서 추가로 정의되는, 방법.
- [0234] 25. 실시 형태 4에 있어서, 상기 바이러스-기반 유전자 전달 시스템은 레트로바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 아데노-관련 바이러스 백터, 또는 렌티바이러스 백터를 포함하는, 방법.
- [0235] 26. 실시 형태 1 내지 실시 형태 18 중 어느 하나의 조작된 면역 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0236] 27. 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 실시 형태 26의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0237] 28. 실시 형태 27에 있어서, 상기 암은 다발성 골수종인, 방법.
- [0238] 29. 약제학적 조성물의 생성 방법으로서, 실시 형태 1 내지 실시 형태 18 중 어느 하나의 조작된 불멸화 T-세포 주를 약제학적으로 허용되는 담체와 배합하여 상기 약제학적 조성물을 얻는 단계를 포함하는, 방법.
- [0239] **실시예**
- [0240] 본 발명의 하기 실시예는 본 발명의 성질을 추가로 예시하기 위한 것이다. 하기 실시예는 본 발명을 제한하지 않으며, 본 발명의 범주는 첨부된 청구범위에 의해 결정됨이 이해되어야 한다.
- [0241] **실시예 1: 전기천공을 위한 TALL-104 세포의 제조**
- [0242] 지수적으로 성장하는 TALL-104 세포를 완전 TALL-104 세포 배지[Myelocult H5100 배지(StemCell Technologies 05150); 1% 소듐 피루베이트(Invitrogen 11360-070); 1% 비필수 아미노산(Invitrogen 11140-050); 4 uM 하이드로코르티손(StemCell Technologies 07904); 100 IU/ml 재조합 인간 IL-2(R&D Systems 202-IL, 2.1E4 IU/ug)] 중에 0.7×10^6 개 세포/mL의 밀도로 시딩하고, 37°C에서 인큐ベ이션하였다. 다음날, 원하는 수의 세포(1×10^6 개/전기천공)를 100x g로 10분 동안 원심분리하여 수집하였다. 세포를 10 mL의 차가운 Opti-MEM(ThermoFisher Scientific, 31985062)으로 2회 세척하고, 100x g로 10분 동안 원심분리하고, 실온에서 사전에 평형화된 OPTI-MEM 0.1 mL × (전기천공 실험의 총 횟수 + 1) 중에 재현탁시켰다.
- [0243] **실시예 2: 리보핵단백질 복합체의 제조**
- [0244] **가이드 RNA**

[0245] TCR α 유전자의 불변 사슬의 첫 번째 엑손을 표적화하도록 gRNA를 설계되었다. TCR α의 막관통 도메인의 상류에 위치된, 표적화된 서열은 TCR α와 β의 조립, 및 세포-표면으로의 어드레싱에 필요하다. Cas9 엔도뉴클레아제-매개 DNA 절단 시에, 상동성 유도 수복(HDR)에 의한 CAR의 통합 또는 비상동성 말단 결합(NHEJ)은 TRAC 유전자의 제거를 가져올 것이다. B2M 유전자좌의 파괴를 위해, 제1 엑손을 표적화하는 gRNA를 설계하였다. 자연 살해 세포 및 T 세포의 하위세트 상에 막관통 당단백질을 생성하는 것을 담당하는 유전자인 KIR3DL2의 경우, 제3 엑손을 표적화하는 gRNA를 설계하였다.

[0246]

[표 1]

유전자 편집을 위한 가이드 RNA의 서열.

가이드 RNA 표적(gRNA)	gRNA 서열(프로토스페이서)	PAM	가닥	엑손
TCRa #1	GCUGGUACACGGCAGGGU CA (서열 번호 56)	GGG	-	1
TCRa #2	GAGAAUCAAAAUCGGUGA AU (서열 번호 57)	AGG	-	1
B2M-L	CCGGUGCCUCGCUUGUA GA (서열 번호 58)	GCC	-	1
B2M-R	ACUCUCUCUUUCUG CCU GG (서열 번호 59)	AGG	+	1
KIR3DL2 #2	AGAGCCACGUGUCC CCU CG (서열 번호 60)	AGG	-	3
KIR3DL2 #3	UCUCCUGGAUAAUCUGC CG (서열 번호 61)	TGG	-	3

[0247]

gRNA의 형성:tracrRNA 이중체

[0249]

표적-특이적 Alt-R™ CRISPR-Cas9 가이드 RNA(gRNA)를 Integrated DNA Technologies에 의해 주문-합성하였다. gRNA에 혼성화되는 범용 67량체 Alt-R™ CRISPR-Cas9 tracrRNA(1072534)를 Integrated DNA Technologies로부터 입수하였다. Alt-R™ CRISPR-Cas9 gRNA 및 Alt-R™ CRISPR-Cas9 tracrRNA를 IDTE 완충액(Integrated DNA Technologies, 11-01-03-01) 중에 200 μM의 최종 농도로 재현탁시켰다. 2개의 RNA 올리고(oligo)를 100 μM의 최종 이중체 농도가 되도록 멀균 미세원심분리 퓨브 내에서 등을 농도로 혼합하였다. gRNA:tracrRNA 혼합물을 95°C에서 5분 동안 가열하고, 이후에 이것을 벤치탑(benchtop) 상에서 실온으로 냉각되게 하여 이중체 형성을 촉진하였다.

[0250]

리보핵단백질(RNP) 복합체의 형성

[0251]

멀균 PCR 퓨브 내에, 2.1 uL의 PBS, 1.2 uL(120 pmol)의 gRNA:tracrRNA 이중체 및 1.7 uL(104 pmol)의 Alt-R S. 피오제네스 Cas9 효소(Integrated DNA Technologies, 1078728) 믹스(Mix)를 첨가하고, 실온에서 20분 동안 인큐베이션하여 RNP가 형성되게 하였다.

[0252]

실시예 3: RNP 복합체에 의한 TALL-104 세포의 전기천공

[0253]

5 μL의 RNP 복합체 및 0.1 μL(1×10^6 개 세포)의 준비된 TALL-104 세포를 2 mm 캡 크기의 BTX 전기천공 큐벳(BTX, 45-0135) 내로 첨가하였다. 제조자의 프로토콜에 따라 ECM 830 구형과 전기천공 시스템(Square Wave Electroporation System)(BTX)을 사용하여 200 V에서 10 밀리초 동안 단일 펄스로 세포를 전기천공하였다. 전기천공된 세포를 37°C에서 사전에 평형화된 TALL-104 세포 배지가 담긴 하나의 12웰 플레이트 내로 즉시 옮겼다. 배지를 전기천공 후 24시간째에 교체하였다.

[0254]

CRISPR-Cas9-매개 유전자 편집의 효율을 FACS Calibur or LSRIFortessa(BD Biosciences) 상에서 유세포측정에 의해 분석하였다. RNP 복합체의 전기천공 후 5일째에 100x g에서 10분 동안 원심분리함으로써 100,000개의 세포를 수확하였다. 세포를 200 uL의 염색 완충액(BD Biosciences, 554657)으로 2회 세척하고, 100 uL의 염색 완충액 중에 재현탁시켰다. 관련 항체(PE-표지 마우스 항-인간 베타 2 마이크로글로불린(B2M) 항체(BD Pharmingen, 551337) 또는 동종형 대조군 항체(Biolegend, 400214), APC-표지 마우스 항-인간 CD3 항체(Biolegend, 300439) 또는 동종형 대조군(Biolegend, 400120)을 제조자의 사용설명서에 따라 처리하고, 암실에서 4°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 100x g로 원심분리하고, 염색 완충액으로 2회 세척하고, 200 uL의 염색 완충액 중에 재현탁시켰다. 유세포측정에 의해 데이터를 수집하고, FloJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 도 1은 관련 RNP 복합체에 의해 전기천공한 후의 B2M 및 TCR 녹아웃 하위집단의 수준을 나타낸다.

[0255]

실시예 4: CRISPR Cas9-매개 편집 후의 유전자-편집된 TALL-104 하위집단의 단리

[0256]

항-피코에리트린 단일클론 항체(mAb)로 코팅된 자성 비드를 사용하여, 자성 세포 분리(MACS) 기술에 의해 편집되지 않은 야생형 세포로부터 유전자-편집된 TALL-104 세포를 단리하였다. 간략하게 말하면, TALL-104 세포를 계수하고, 4°C에서 10분 동안 100x g로 원심분리하고, 5 mL의 차가운 탈기된 완충액 X(0.5% BSA 및 2 mM EDTA를 함유하는 PBS)로 2회 세척하였다. 세포를 1 mL의 완충액 × 중에 재현탁시키고, 제조자의 사용설명서에 따라 관심 단백질을 표적화하는 PE-접합된 항체(PE 항-CD3 또는 PE 항-B2M)와 함께 4°C에서 45 내지 60분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 4°C에서 10분 동안 100x g로 원심분리하고, 항-PE 마이크로비드(Miltenyi Biotec,

Cat# 130-105-639)를 함유하는 0.5 mL의 차가운 완충액 X 중에 재현탁시켰다. 혼합물을 암실에서 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, 원심분리하고, 500 μL 완충액 X 중에 재현탁시켰다. 세포를 3 mL의 Buffer X로 사전에 평형화된 QuadroMACS 분리기(Miltenyi Biotec, 130-090-976) 상에 배치된 LS 컬럼(Miltenyi Biotec 130-042-401) 상에 로딩하였다. 컬럼을 1 mL의 완충액 X로 2회 세척하였다. 유전자-편집된 녹아웃 TALL-104 세포를 단리하고, 관류형 장치(flow through) 내에 수집하고, 37°C 및 5% CO₂에서 TALL-104 완전 세포 배지(0.7x10⁶ 개 세포/mL) 중에서 배양하였다. 도 2는 MACS 자성 비드 표지 기술을 사용하여 유전자-편집된 녹아웃 세포의 단리를 보여준다.

[0257] **실시예 5: BCMA 또는 퍼브로넥틴 III형 도메인을 표적화하는 CAR을 발현하는 조작된 TALL-104 세포의 생성 및 분석**

[0258] 2개의 상이한 CAR 서열의 아미노산 서열을 역번역하고(back-translate), 신호 펩티드, 헌지 서열, TM 도메인, 및 신호전달 도메인을 사용하여 조작하였다. 완성된 작제물을 시판용 mMESSAGE mMACHINE® T7 울트라 전사 키트(ULTRA Transcription Kit)를 사용하여 T7 시험관내 전사 백터 내로 클로닝하여 mRNA를 생성하였다.

[0259] [표 2]

BCMA를 표적화할 수 있는 세포의 FN3 도메인을 특징으로 하는 D08 CAR 작제물의 아미노산 서열.

도메인	서열
인간 CD8 신호 펩티드	서열 번호 3 MALPV TALLPL ALLLHAARP
인간 CD8 헌지	서열 번호 4 TTPPAPR PPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIY
세포의 BCMA-특이적 FN3 도메인	서열 번호 14 (D08) MLPAPK NLV VSHV TEDS ARLS WTAPDA AFDS IIIV YREN IETGEA IVLT VPGSER SYDL TD LKPG TE YYV QIA GVK GNIS FPLSA IFTT
인간 CD8 TM 도메인	서열 번호 5 IWAPLAGTCGVLLSLV ITLYCK
인간 4-1BB 세포내 도메인	서열 번호 6 RGRKK LLYIFK QPFM RPVQTT QEEDGC S CRFPEEE EGG CEL
인간 CD3 제타 세포내 도메인	서열 번호 7 RVKFSRSADAPAYK QGQN QLYN ELNL GRRE EYDV LDK RR GRDPE MG GKPRRK NPQEG LYNE LQDK MAE AYSEIG MKGER RGKG HDGL YQG LSTAT KDTY DALH MQL PPR

[0260]

[0261] [표 3]

FN3 도메인을 표적화하는 AS7B91 CAR 작제물의 아미노산 서열.

도메인	서열
세포의 AS7B91	서열 번호 55 (L-H 배향) DV VMT QTPAS VSGP VGGT VTI KQC ASERI YSNL AWY QQKPG QPPK LLIYK AST LASGVSSRF KGS GSGT EFTL TIRD LECADA ATYS CQ YT SYGSGY VGTF GGGTEVV VEGGGG SGGGG SGGGG SGGGG SLEES GGRL VTPG TP TLTC TV SGID LST SVM GWV RQAP GK GLE SIGFI YTN VN TY ASWAK GRFT ISRT STTVDL KITS PTG DTA TY FCAR AYAGA MDL WQG QTL VTVSS
인간 CD8 헌지	서열 번호 4 TTPPAPR PPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIY
인간 CD8 TM 도메인	서열 번호 5 IWAPLAGTCGVLLSLV ITLYCK
인간 4-1BB 세포내 도메인	서열 번호 6 RGRKK LLYIFK QPFM RPVQTT QEEDGC S CRFPEEE EGG CEL
인간 CD3 제타 세포내 도메인	서열 번호 7 RVKFSRSADAPAYK QGQN QLYN ELNL GRRE EYDV LDK RR GRDPE MG GKPRRK NPQEG LYNE LQDK MAE AYSEIG MKGER RGKG HDGL YQG LSTA TKDTY DALH MQL PPR

[0263] ECM 830 구형과 전기천공 시스템(BTX)을 사용하여 mRNA를 TALL-104 세포 내로 전기천공하였다. 완전 TALL-104 배지 중에서 3주 동안 성장해 오고 있던 3.5x10⁶ 개의 TALL-104 세포에 10 μg의 CAR mRNA의 존재 하에서 또는 부재 하에서 제조자의 프로토콜에 따라 단일 전기 펄스(400 V, 750 us)를 제공하였다. AS7B91 항-FN3 도메인 항체를 사용하여 24시간 후에 D08 CAR의 표면 발현을 평가하였다. 유사하게, 접합된 FN3 도메인을 사용하여 24시간 후에 AS7B91 CAR의 표면 발현을 평가하였다. 도 3에 나타낸 결과는 TALL-104가 BCMA 및 항-FN3 도메인 CAR을 발현함을 보여준다.

[0264] **실시예 6: 이펙터 세포로서 TALL-104 조작된 세포를 사용한 세포독성 검정**

[0265] BCMA-표적화(D08) 및 FN3 도메인-표적화(AS7B91) CAR-TALL-104 세포 사멸을 표적 세포로서 BCMA-발현 및 CellTracker™ 녹색-염색된 RPMI-8226 세포(ATCC: CCL-155), Daudi 세포(ATCC: CCL-213), 및 K562 세포(ATCC: CCL-243) - 이들 모두는 다양한 수준으로 BCMA를 발현함 - 를 사용하여 평가하였다. AS7B91-CAR-TALL-104 세포, D08-CAR-TALL-104 세포, 및 모의 TALL-104 세포(mRNA 없이 전기천공됨)를 웰당 약 0.2의 E:T 비로 BCMA 표적 세포와 20시간 동안 동시-인큐베이션하였다. AS7B91-CAR-TALL-104 세포의 경우, BCMA-특이적 또는 비표적화

된 대조군(NT) FN3 도메인을 세포와 함께 동시-인큐베이션하였다. 이 실험의 종료 시점에서, 세포를 HOECHST 33342(핵 염색제) + 프로피듐 요오다이드(죽은 세포 염색제)로 15분 동안 염색하였다.

[0266] 세포를 웰당 5개의 이미지로 20 배율로 PerkinElmer Opera 공초점 현미경 상에서 이미지화하여 하기를 검출하였다: HOECHST 33342(UV 램프, 이는 모든 세포의 핵을 검출함), CellTracker™ 그린(Green)(488 nm 레이저, 이는 표적 세포만을 검출함), 및 프로피듐 요오다이드(561 nm 레이저, 이는 모든 죽은 세포를 검출함). 이미지를 PerkinElmer Columbus 소프트웨어를 사용하여 분석하여 표적 세포를 확인하고(CellTracker™ 그린 강도를 사용함), 이들을 핵 내의 프로피듐 요오다이드 염색제의 강도에 기초하여 살아있는 상태 또는 죽은 상태로 정의한다. 웰당 % 죽은 표적 세포를 GraphPad PRISM 소프트웨어에서 도표로 나타내었다. BCMA-특이적 FN3 도메인을 첨가한 후 40시간째에, 원래의 사멸 검정 반응 혼합물로부터의 세포의 분취물을 수집하고, 다시 염색하여 % 죽은 표적 세포에 대해 평가하였다. 도 4는 표적 특이적 방식으로 TALL-104 CAR-발현 세포에 의한 표적 세포의 사멸을 나타낸다. 세포의 동시-인큐베이션 후 20시간째의 AS7B91-CAR-TALL-104 세포의 경우(도 4a), RPMI-8226 세포의 사멸은 10 nM 비표적화된 대조군(NT) FN3 도메인(27%)과 대비하여, 동시-인큐베이션된 0.32 nM BCMA-특이적 FN3 도메인의 존재 하에서 증가하였다(40% 사멸). Daudi 세포의 사멸은 동시-인큐베이션된 0.32 nM BCMA-특이적 FN3 도메인의 존재 하에서 17% (NT)에서 58%로 증가하였다. K562 세포의 사멸은 동시-인큐베이션된 0.32 nM BCMA-특이적 FN3 도메인의 존재 하에서 증가하지 않았다. 40시간째에(도 4b), Daudi 세포의 AS7B91-CAR-TALL-104 세포 사멸은 10 nM NT FN3 도메인에 대한 15%에서 0.32 nM BCMA-특이적 FN3 도메인의 존재 하에서 70%로 증가하였다. RPMI-8226 세포의 AS7B91-CAR-TALL-104 세포 사멸은 NT 대조군에 대한 45%와 대비하여 동시-인큐베이션된 0.32 nM BCMA-특이적 FN3 도메인의 존재 하에서 59%였다. 40시간째에, K562 세포에서 BCMA-특이적 사멸은 관찰되지 않았다. 세포의 동시-인큐베이션 후 20시간째의 D08-CAR-TALL-104 세포의 경우(도 4c), RPMI-8226 세포의 사멸은 동시-인큐베이션된 0.32 nM BCMA-특이적 FN3 도메인의 존재 하에서의 모의 TALL-104 세포(23%)와 대비하여 증가하였다(37% 사멸). Daudi 세포의 사멸은 11%(모의 TALL-104)에서 동시-인큐베이션된 D08-CAR-TALL-104 세포의 존재 하에서 42%로 증가하였다. K562 세포의 사멸은 11%(모의 TALL-104)에서 동시-인큐베이션된 D08-CAR-TALL-104 세포의 존재 하에서 20%로 증가하였다.

[0267] 실시예 7: 증가된 증식 능력을 갖는 hTERT 조작된 TALL-104 세포

[0268] TALL-104 세포를 인간 TERT 유전자 및 EGFP 리포터 유전자를 인코딩하는 렌티바이러스 벡터에 의해 형질도입시켰다. 성공적으로 형질도입되고 이를 도입유전자와 안정하게 일체화된 녹색 형광 세포를 EGFP 양성 세포에 대하여 FACS에 의해 선택하고, 표준 배양 절차에 따라 인간 IL-2가 보충된 TALL-104 배지 중에서 증폭되게 하였다. 세포를 시간 경과에 따라 증폭되게 하고 세포는 계속 증폭된 반면, 형질도입되지 않은 세포는 증식을 정지하였다(도 5).

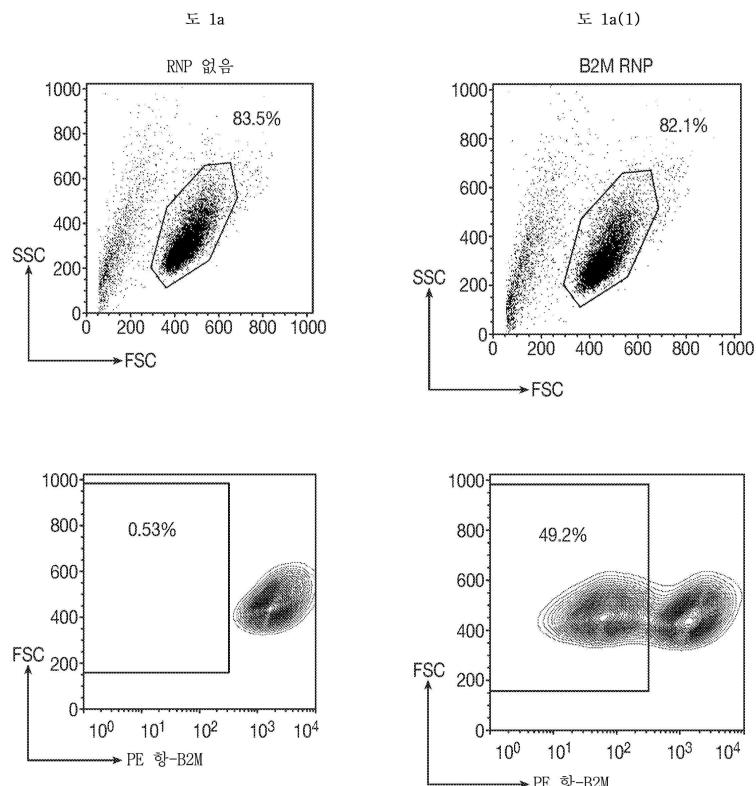
[0269] 실시예 8: IL-2 비의존성 성장을 위한 TALL-104 세포의 조작

[0270] hTERT 형질도입된 세포를 C-말단 변형을 갖는 인간 IL-2 도입유전자, KDEL(서열 번호 68)를 갖는 제2 렌티바이러스 벡터에 의해 추가로 형질도입시켰으며, 이때 KDEL은 세포의 소포체 내에 인코딩된 단백질을 보유한다. 외인성 IL-2의 부재 하에서의 이를 형질도입된 세포의 배양은 성공적으로 형질도입된 세포의 증폭을 가져온 반면, 형질도입되지 않은 세포는 증폭을 정지하고 죽었다(도 6).

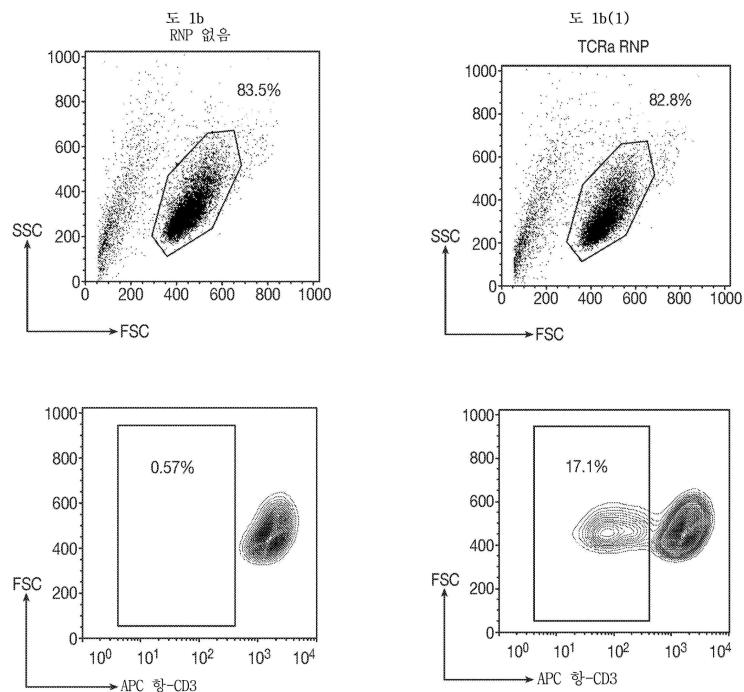
[0271] 이어서, F11 BCMA 표적화된 CAR mRNA를 p102 세포 내로 일시적으로 전기천공함으로써 p102 세포를 표적화된 사멸에 대해 시험하였다. 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 외인성 IL-2의 부재 하에서 성장하지만 ER 보유된 IL-2를 안정하게 발현하는 p102 세포는 외인성 IL-2의 존재 하에서 성장하고 동일한 F11 BCMA 표적화된 CAR을 발현하는 야생형 TALL-104 세포만큼 효과적으로 MM1 세포를 사멸시킨다.

도면

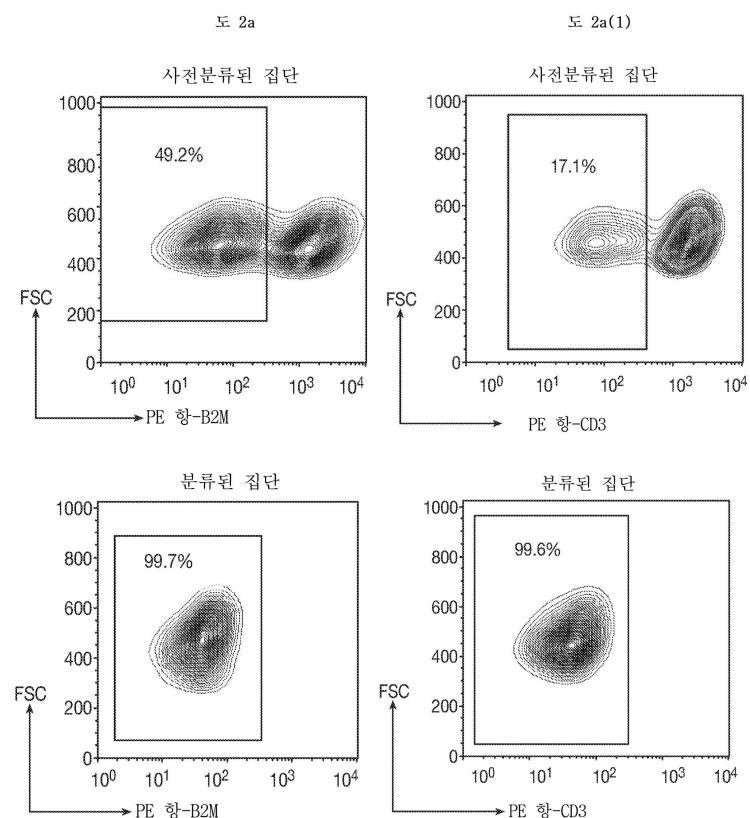
도면 1a



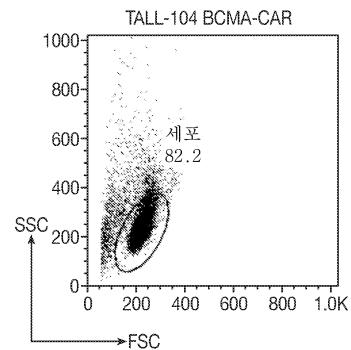
도면 1b



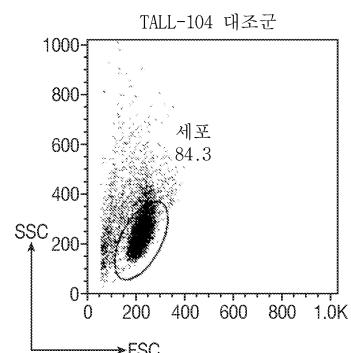
도면2a



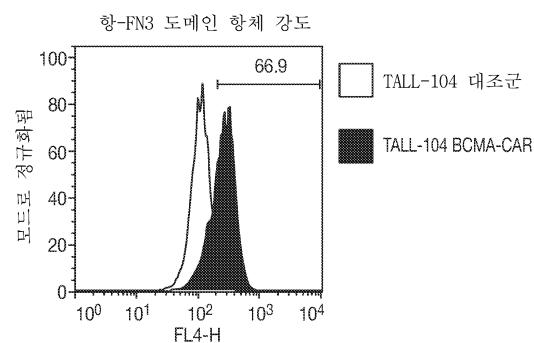
도면3a



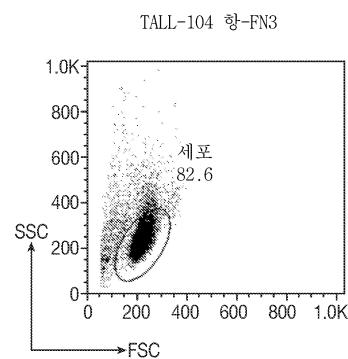
도면3b



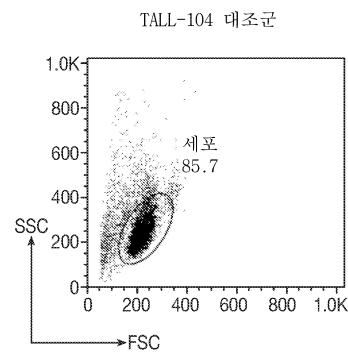
도면3c



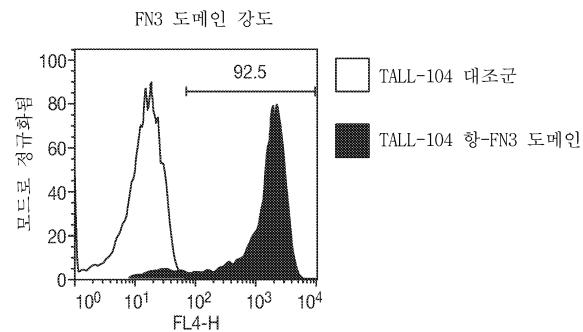
도면3d



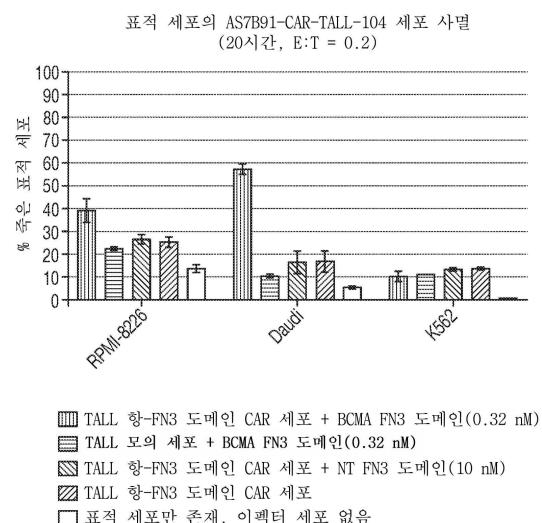
도면3e



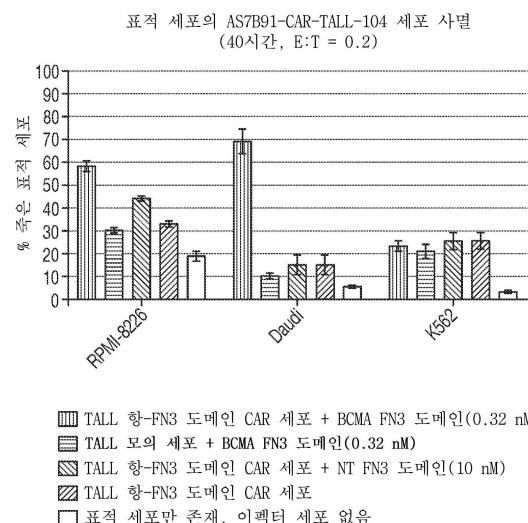
도면3f



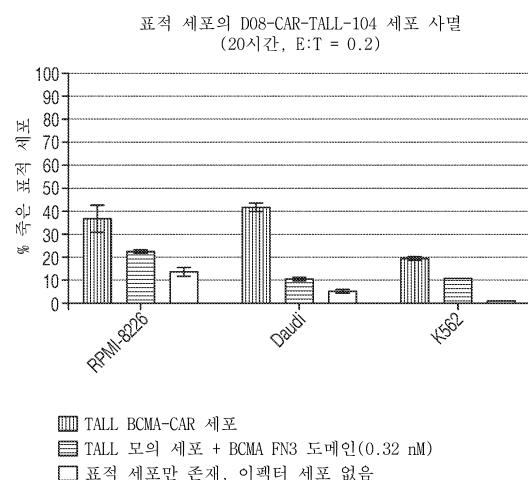
도면4a



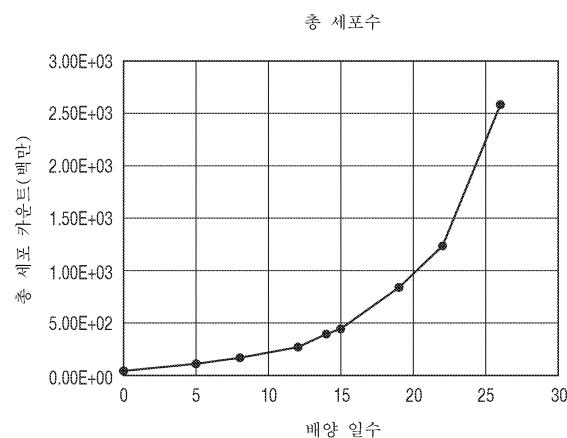
도면4b



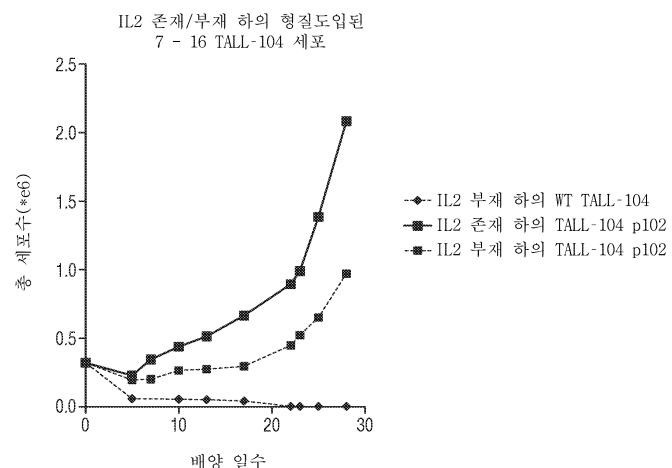
도면4c



도면5



도면6



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> LEE, JOHN

MOONEY, JILL

NASO, MICHAEL

<120> IMMORTALIZED CAR-T CELLS GENETICALLY MODIFIED TO ELIMINATE

T-CELL RECEPTOR AND BETA 2-MICROGLOBULIN EXPRESSION

<130> JBI5146WOPCT1

<140> Unknown

<141> Herewith

<150> 62/598,032

<151> 2017-12-13

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 1

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

1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr

85

<210> 2

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 2

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

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu

20 25 30

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

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 4

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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 Ile Tyr

35 40 45

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
 20

<210> 6

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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 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> 8

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 8

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Val Ala Thr Phe Thr Thr

85 90

<210> 9

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Val Ile Val Tyr Ser Glu Pro Asp Val Cys Gly Glu Ala Ile Val Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Trp Val Arg Ile Ala Gly Val Lys Gly Gly Asp Phe

65 70 75 80

Ser Arg Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85 90

<210> 10

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ile Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Ile Ile Val Tyr Arg Glu Asn Ile Glu Thr Gly Glu Ala Ile Val Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Gln Ile Ala Gly Val Lys Gly Gly Asn Ile

65 70 75 80

Ser Phe Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85 90

<210> 11

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu
35 40 45Asp Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60Gly Thr Glu Tyr Val Val Val Ile Asp Gly Val Lys Gly Asp His
65 70 75 80Ser Lys Pro Leu Val Ala Thr Phe Thr Thr
85 90

<210> 12

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 12

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu
35 40 45

Tyr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Thr Glu Tyr Thr Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Ser Tyr Pro Leu Ile Ala Ala Phe Thr Thr
 85 90

<210> 13

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 13

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
 20 25 30

Val Ile Val Tyr Ser Glu Pro Asp Val Cys Gly Glu Ala Ile Val Leu
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Trp Val Arg Ile Pro Gly Val Lys Gly Gly Asp Phe
 65 70 75 80

Phe His Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85 90

<210> 14

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 14

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Ile Ile Val Tyr Arg Glu Asn Ile Glu Thr Gly Glu Ala Ile Val Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Gln Ile Ala Gly Val Lys Gly Gly Asn Ile

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Phe Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85	90
----	----

<210> 15

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 15

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Lys Pro Leu Val Ala Thr Phe Thr Thr

85 90

<210> 16

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Val Ile Val Tyr Ser Glu Pro Asp Val Cys Gly Glu Ala Ile Val Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Trp Val Arg Ile Pro Gly Val Lys Gly Asp Phe

65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85 90

<210> 17

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 17

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val Lys Gly Gly Arg Phe

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 18

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 18

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Val Ile Val Tyr Ser Glu Pro Asp Val Cys Gly Glu Ala Ile Val Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Trp Val Arg Ile Pro Gly Val Lys Gly Gly Asp Phe

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Gln Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 19

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 19

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Ile Ile Val Tyr Arg Glu Asn Ile Glu Thr Gly Glu Ala Ile Val Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Gln Ile Ala Gly Val Lys Gly Gly Asn Ile

65 70 75 80

Ser Phe Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85 90

<210> 20

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 20

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

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

50	55	60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Val Ile Asp Gly Val Lys Gly Gly Arg		
65	70	75
		80

Ser Gln Pro Leu Phe Ala Gln Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 21

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 21

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Trp Glu

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Thr Pro Leu Val Ala Pro Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 22

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 22

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Trp Ile Arg Tyr Val Glu Arg Leu Val Trp Gly Glu Ala Ile His Leu

35	40	45
----	----	----

His Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Val Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Gly Trp Glu

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Thr Pro Leu Val Ala Pro Phe Thr Thr

85	90
----	----

<210> 23

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 23

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Val Glu Arg Ile Val Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

His Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Val Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Gly Trp Glu

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Thr Pro Leu Val Ala Pro Phe Thr Thr

<210> 24
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

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

Ser Gln Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr
85 90
<210> 25
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 25

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Val Ile Gly Gly Val Lys Gly Gly His Asn

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Trp Pro Leu Ser Ala Lys Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 26

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 26

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Trp Ile Arg Tyr Val Glu Arg Leu Val Trp Gly Glu Ala Ile His Leu

35	40	45
----	----	----

His Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Glu Gln

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser His Pro Leu Tyr Ala Thr Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 27

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

Gln Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Val Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Gly Trp Glu

65 70 75 80

Ser Lys Pro Leu Ile Ala Ala Phe Thr Thr

85 90

<210> 28

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 28

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60
 Gly Thr Glu Tyr Thr Val Val Ile Asp Gly Val Lys Gly Gly Arg
 65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr

85 90

<210> 29

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 29

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Glu Gln

65 70 75 80

Ser His Pro Leu Tyr Ala Thr Phe Thr Thr

85 90

<210> 30

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 30

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

Phe Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Val Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Glu Gln

65 70 75 80

Ser His Pro Leu Tyr Ala Thr Phe Thr Thr

85 90

<210> 31

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 31

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

Asn Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Trp Pro Leu Ile Ala Tyr Phe Thr Thr

<210> 32
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

1 5 10 15

Ser His Pro Leu Tyr Ala Thr Phe Thr Thr

85 90

<210> 33

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 33

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

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Val Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Gly Glu Gln

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser His Pro Leu Tyr Ala Thr Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 34

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 34

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Asn Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Trp Pro Leu Trp Ala Ser Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 35

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ile Pro Leu Ile Ala His Phe Thr Thr

85 90

<210> 36

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 36

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

Asn Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50	55	60
Gly Thr Glu Tyr Val Val Leu Ile Asn Gly Val Lys Gly Gly Pro Glu		
65	70	75
		80

Ser Trp Pro Leu Ile Ala His Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 37

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 37

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Val Val Ile Ser Gly Val Lys Gly Glu Gln

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser His Pro Leu Tyr Ala Thr Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 38

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 38

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Ala Thr Glu Tyr Val Val Val Ile Thr Gly Val Lys Gly Arg Lys

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Tyr Pro Leu Val Ala Glu Phe Thr Thr

85	90
----	----

<210> 39

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 39

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Gln Pro Leu Ile Thr His Phe Thr Thr

20	25	30
----	----	----

Trp Ile Arg Tyr Val Glu Arg Leu Val Trp Gly Glu Ala Ile His Leu

35	40	45
----	----	----

His Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Lys Pro Leu Val Ala Thr Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 42

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 42

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Val Ile Gln Tyr Ile Glu Arg Leu Arg Trp Gly Glu Ala Ile Thr Leu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Thr Glu Tyr Val Val Pro Ile Ser Gly Val Lys Gly Gly Arg Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Thr Pro Leu Ile Ala Ser Phe Thr Thr

85	90	
----	----	--

<210> 43

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 43

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Thr Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

Asn Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Trp Pro Leu Ile Ala Tyr Phe Thr Thr

85 90

<210> 44

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 44

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Ile Ile Gly Tyr Ile Glu Gln Ile Val Trp Gly Glu Ala Ile His Leu

35 40 45

Asn Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Glu Pro Leu Val Ala Pro Phe Thr Thr

85 90

<210> 45

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 45

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln

85 90 95

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

100 105 110

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp

115 120 125

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

130 135 140

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

145 150

<210> 46

<211> 21

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 46

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro

20

<210> 47

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 47

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser

1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln

20

<210> 48

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 48

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

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser

20

<210> 50

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 50

Phe Trp Val Leu 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

20 25

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51

Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile

1 5 10 15

Gly Leu Gly Ile Phe Phe

20

<210> 52

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52

Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly Ser Leu Leu Met Val

1 5 10 15

Phe Val Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile Thr

20 25

<210> 53

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 53

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

1 5 10 15

Val Cys Gly Ile Val Leu Gly Phe Leu Phe

20 25

<210> 54

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 54

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Thr Ser Val
 20 25 30

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

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

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

Ser Pro Thr Thr Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Val
 85 90 95

Tyr Ala Gly Ala Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
 130 135 140

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

Glu Arg Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 165 170 175

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
 180 185 190

Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr

195

200

205

Ile Arg Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Tyr

210

215

220

Thr Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Val Gly Thr Phe Gly Gly Thr Glu

225 230 235 240

Val Val Val Glu Gly

245

<210> 55

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 55

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Gly Pro Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Arg Asp Leu Glu Cys

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Tyr Thr Ser Tyr Gly Ser Gly

85 90 95

Tyr Val Gly Thr Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Glu Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130	135	140
Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Thr Ser		
145	150	155
Val Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Ile		
165	170	175
Gly Phe Ile Tyr Thr Asn Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys		
180	185	190
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile		
195	200	205
Thr Ser Pro Thr Thr Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ala		
210	215	220
Val Tyr Ala Gly Ala Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
225	230	235
Val Ser Ser		

<210> 56

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 56

gcugguacac ggcagggua 20

<210> 57

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 57

gagaaucaaa aucggugaaau 20

<210> 58

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<

400> 58

ccggugccuc gcucuguaga 20

<210> 59

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 59

acucucucuu ucugccugg 19

<210> 60

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400

> 60

agagccacgu guccccucg 19

<210> 61

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 61

ucuccuggaa uauucugccg 20

<210> 62

<211> 3396

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

atgcgcgcg ctccccctg ccgagccgtg cgctccctgc tgcgacgcca ctaccgcgag 60
gtgcgtgcgc tggcacgtt cgtgcggcgc ctggggccccc agggctggcg gctggtgca 120cgcggggacc cggcggttt ccgcgcgtg gtggccagt gcctgggtg cgtgccctgg 180
gacgcacggc cggcccccgc cgccccctcc ttccgcagg tgtcctgcct gaaggagctg 240
gtggcccgag tgcgtcagag gtcgtgcgag cgccgcgcga agaacgtgct ggccttcggc 300
ttcgcgtgc tggacggggc ccgcggggc ccccccggg ctttaccac cagcgtgcgc 360
agctacctgc ccaacacggt gaccgacgca ctgcggggga gcggggcggt ggggctgtc 420
ctgcgcgcg tggcgacga cgtgcgtgtt cacctgcgtt cacgctgcgc gctcttgt 480
ctggtgtgctc ccagctgcgc ctaccagggt tgccggccgc cgctgtacca gctcgccgt 540gccactcagg cccggccccc gccacacgt agtggacccc gaaggcgct gggatgcgaa 600
cgggcctgga accatagcgt cagggaggcc ggggtcccc tgggcctgccc agcccccgggt 660
gcgaggaggc gcgggggcag tgccagccga agtctgcgt tgcccaagag gcccaggcgt 720
ggcgctgccc ctgagccgga gcggacgccc gttggcagg ggtcctggc ccacccggc 780
aggacgcgtg gaccgagtga ccgtggttt tgcgtgggtt cacctgccag accccggcaa 840
gaagccacct cttggaggg tgcgtctct ggcacgcgc actcccaccc atccgtggc 900
cgccagcacc acgcgggccc cccatccaca tcgcggccac cacgtccctg ggacacgcct 960tgtccccgg tgtacgccga gaccaagcac ttccctact cctcaggcga caaggaggcag 1020
ctgcggccct cttccctact cagctctcg aggcccagcc tgactggcgc tcggaggctc 1080
gtggagacca tcttctggg ttccaggccc tggatgccag ggactccccg cagggtggcc 1140
cgcctgcccc agcgctactg gcaaattcgg cccctgtttc tggagctgct tggaaaccac 1200
gcgcagtgcc cctacgggt gtcctcaag acgcactgcc cgctgcgagc tgccgtcacc 1260
ccagcagccg gtgtctgtgc ccgggagaag ccccaaggct ctgtggccgc ccccgaggag 1320

gaggacacag acccccgctc cctgggtcag ctgctccgc agcacagcag cccctggcag	1380
gtgtacggct tcgtgcgggc ctgcctgcgc cggtggc ccccaggcct ctggggctcc	1440
aggcacaacg aacgcccgtt cctcaggaac accaagaagt tcatctccct ggggaagcat	1500
gccaagctct cgctgcagga gctgacgtgg aagatgagcg tgccggactg cgcttggctg	1560
cgcaggagcc caggggttgg ctgtgttcgg gccgcagagc accgtctgcg tgaggagatc	1620
ctggccaagt tcctgcactg gctgatgagt gtgtacgtcg tcgagctgct caggtcttc	1680
ttttatgtca cggagaccac gttcaaaaag aacaggctct tttctaccg gaagagtgtc	1740
tggagcaagt tgcaaagcat tggaaatcaga cagcacttga agagggtgca gctgcgggag	1800
ctgtcggaaag cagaggtcag gcagcatcgga gaagccaggc ccgcctgct gacgtccaga	1860
ctccgcttca tccccaaagcc tgacgggctg cggccgattt tgaacatggatc acgtcgttg	1920
ggagccagaa cgttccgcag agaaaagagg gccgagcgctc tcacctcgag ggtgaaggca	1980
ctgttcagcg tgctcaacta cgagcgggctc cggcgccccg gcctcttggg cgcctctgtg	2040
ctgggcctgg acgataatcca cagggcctgg cgccacccgt tgctgcgtgt gccccccag	2100
gaccgcgcgc ctgagctgtta ctttgtcaag gtggatgtga cgggcgcgtt cgcacccatc	2160
ccccaggacaca ggctcacggc ggtcatcgcc agcatcatca aacccagaa cacgtactgc	2220
gtgcgtcggt atgccgttgtt ccagaaggcc gcccattggc acgtccgcaaa ggccttcaag	2280
agccacgtct ctacccgttgc agacctccag ccgtacatgc gacagttcggtt ggctcacctg	2340
caggagacca gcccgttagg ggtatggcgtc gtcatcgagc agagctccctc cctgaatggat	2400
gccagcagtgc gcctcttgcgat cgtcttcata cgcttcatgtt gccaccacgc cgtgcgcac	2460
agggggcaagt cctacgttca gtgccagggg atcccgagg gctccatctt ctccacgtgt	2520
ctctgcagcc tgtgtacgg cgacatggag aacaagctgt ttgcggggat tggcggggac	2580
gggctgctcc tgcgttttgtt ggtatgttttgc ttgttgtga cacctcacctt cacccacgc	2640
aaaaccttcc tcaggacccctt ggtccggagggt gtccctgagt atggctgcgtt ggtgaacttgc	2700
cggaagacacatc tggtgaactt ccctgttagaa gacgaggccc tgggtggcac ggcttttgtt	2760
cagatgcggg cccacggcctt attccctgg tgccggctgc tgctggatacc cggaccctgg	2820
gaggtgcaga ggcgactactc cagctatgcc cggacccatca tcagagccag tctcacccatc	2880
aaccgcggct tcaagggtgg gaggaacatcg cgtcgaaacac tctttgggtt ctgcggctgt	2940
aagtgtcaca gcctgttttgc ggtttgcag gtgaacagcc tccagacgggtt gtgcaccaac	3000
atctacaaga tcctccgtctt gcaggcgtac aggtttcagc catgtgtgtt gcaagctccca	3060

tttcatcgc aagttggaa gaacccaca ttttcctgc gcgtcatctc tgacacggcc	3120
tccctctgct actccatcct gaaagccaag aacgcaggga tgtcgctggg ggccaagggc	3180
gccggccggcc ctctgccctc cgaggccgtg cagtggctgt gccaccaagc attcctgctc	3240
aagctgactc gacaccgtgt cacctacgt ccactctgg ggtcacttag gacagcccag	3300
acgcagctga gtcggaagct cccggggacg acgctgactg ccctggaggc cgcaagccaa	3360
ccggcactgc cctcagactt caagaccatc ctggac	3396

<210> 63

<211> 1132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser

1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro

50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu

65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val

85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Pro Pro

100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr

115 120 125

Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val

130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val

145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr

165	170	175
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly		
180	185	190
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg		
195	200	205
Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg		
210	215	220
Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg		
225	230	235
Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp		
245	250	255
Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val		
260	265	270
Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala		
275	280	285
Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His		
290	295	300
Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro		
305	310	315
320		
Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly		
325	330	335
Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro		
340	345	350
Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser		
355	360	365
Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln		
370	375	380
Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His		
385	390	395
Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg		
405	410	415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln

420 425 430

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

435 440 445

Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe

450 455 460

Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser

465 470 475 480

Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser

485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met

500 505 510

Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys

515 520 525

Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe

530 535 540

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe

545 550 555 560

Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr

565 570 575

Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His

580 585 590

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

595 600 605

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile

610 615 620

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660	665	670
Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg		
675	680	685
Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro		
690	695	700
Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile		
705	710	715
Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln		
725	730	735
Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His		
740	745	750
Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp		
755	760	765
Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser		
770	775	780
Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu		
785	790	795
Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His		
805	810	815
Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro		
820	825	830
Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp		
835	840	845
Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu		
850	855	860
Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala		
865	870	875
Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys		
885	890	895
Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu		
900	905	910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe

915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser

930 935 940

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

945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly

965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn

980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln

995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln

1010 1015 1020

Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp

1025 1030 1035

Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly

1040 1045 1050

Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu

1055 1060 1065

Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr

1070 1075 1080

Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys

1115 1120 1125

Thr Ile Leu Asp

1130

<210> 64

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 64

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

50 55 60

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

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala

115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

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

145 150 155

<210> 65

<211> 474

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

polynucleotide"

<400> 65

atgtatcgta tgcaactgct gagctgcac gcttatctt tagcttagt gaccaattcc	60
--	----

gcccccacca gcagcagcac caagaagaca cagctgcac tggagcattt actgctggat	120
--	-----

ttacagatga tttaaacgg catcaacaac tacaaaaacc ccaagctgac aaggatgctg	180
--	-----

accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga agcattaca gtgttagag	240
---	-----

gaggagctga acccttaga ggaggtgctg aatttagccc agagcaagaa cttccattt	300
---	-----

aggcctcgat attaatcg caacatcaac gtgatcgatc tggagctgaa aggctccgag	360
---	-----

accacccatca tgtgcgagta cgccgacgag accgccccca tcgtggagtt tttaatcgat	420
--	-----

tggatcacct tctgccagag catcatcagc acttaacca aggacgagct gtga	474
--	-----

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 66

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

'LAGLIDADG' family peptide motif sequence"

<400> 67

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1	5
---	---

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 68

Lys Asp Glu Leu

1