



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월24일

(11) 등록번호 10-2293062

(24) 등록일자 2021년08월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7029649
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월15일
 심사청구일자 2019년03월15일
- (85) 번역문제출일자 2015년10월15일
- (65) 공개번호 10-2015-0132850
- (43) 공개일자 2015년11월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/029943
- (87) 국제공개번호 WO 2014/153270
 국제공개일자 2014년09월25일
- (30) 우선권주장
 61/802,629 2013년03월16일 미국(US)
 61/838,537 2013년06월24일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 W02010095031 A2*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 노파르티스 아게
 스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
 더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
 미국, 19104 펜실바니아주, 필라델피아, 9층, 씨
 빅 센터 불러바드 3600
- (72) 발명자
 브로그돈, 제니퍼
 미국 02139 매사추세츠주 캄브리지 매사추세츠
 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼
 리서치, 인크.
 준, 칼 에이치.
 미국 19066 펜실베이니아주 메리온 스테이션 베어드
 로드 409
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 장덕순, 김영

전체 청구항 수 : 총 59 항

심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 인간화 항-CD19 키메라 항원 수용체를 사용한 암의 치료

(57) 요약

본 개시내용은 CD19의 발현과 연관된 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 CD19에 특이적인 키메라 항원 수용체 (CAR), 그를 코딩하는 벡터, 및 CD19 CAR을 포함하는 재조합 T 세포에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 CD19 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 유전자 변형된 T 세포를 투여하는 방법을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
C07K 14/70503 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70578 (2013.01)
C07K 16/3061 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

뢰브, 안드레아스

미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애
비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리
서치, 인크.

마우스, 마셀라

미국 19010 펜실베이니아주 브린 모어 하빌랜드 드라
이브 705

솔러, 존

미국 19072 펜실베이니아주 나버스 길핀 로드 410

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산 분자이며, 여기서 CAR은 인간화 항-CD19 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 자극 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편을 포함하고, 상기 항-CD19 결합 도메인은

서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1);

서열 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2);

서열 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3);

서열 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1);

서열 22, 21 또는 23 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2); 및

서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3)

을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, HC CDR2가 서열 21의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, HC CDR2가 서열 22의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, HC CDR2가 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열 32, 31 또는 33-42에 열거된 것 중 임의의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열 32, 31 또는 33-42에 열거된 것 중 임의의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 서열 32, 31 또는 33-42에 열거된 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD19 결합 도메인이 scFv인 단리된 핵산 분자.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역이 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 중쇄 가변 영역

의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD19 결합 도메인이 서열 2, 서열 1, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD19 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열이 서열 62, 서열 61, 서열 63, 서열 64, 서열 65, 서열 66, 서열 67, 서열 68, 서열 69, 서열 70, 서열 71 및 서열 72로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 86, 서열 85, 서열 87, 서열 88, 서열 89, 서열 90, 서열 91, 서열 92, 서열 93, 서열 94, 서열 95 및 서열 96으로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 코딩된 CAR이 막횡단 도메인으로 T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, 및 CD154의 알파, 베타 또는 제타 체로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, 코딩된 CAR이 막횡단 도메인으로 CD8의 알파 체의 막횡단 도메인을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 코딩된 막횡단 도메인이 서열 15의 아미노산 서열, 서열 15의 아미노산 서열의 적어도 1, 2, 또는 3개의 변형 내지 20, 10, 또는 5개 이하의 변형을 포함하는 아미노산 서열, 또는 서열 15의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

(ii) 단리된 핵산 분자가 막횡단 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 핵산 서열은 서열 56의 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인

단리된 핵산 분자.

청구항 17

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 코딩된 항-CD19 결합 도메인이 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인에 연결된 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 18

제17항에 있어서,

(i) 힌지 영역이 CD8 알파 힌지이거나;

(ii) 코딩된 힌지 영역이 서열 14의 아미노산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

(iii) 단리된 핵산 분자가 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 상기 핵산 서열은 서열 55의 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 것인

단리된 핵산 분자.

청구항 19

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 공동자극 도메인을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 20

제19항에 있어서,

(i) 공동자극 도메인이 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질로부터 얻은 기능적 신호전달 도메인이거나;

(ii) 코딩된 공동자극 도메인이 서열 16의 아미노산 서열, 또는 서열 16의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(iii) 단리된 핵산 분자가 공동자극 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 상기 핵산 서열은 서열 60의 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 것인

단리된 핵산 분자.

청구항 21

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 세포내 신호전달 도메인이 1차 신호전달 도메인을 포함하거나;

(ii) 코딩된 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함하거나;

(iii) 코딩된 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 및 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함하거나;

(iv) 코딩된 세포내 신호전달 도메인이

(a) 서열 16의 아미노산 서열, 또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열,

(b) 서열 16의 아미노산 서열, 및 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열,

(c) 서열 16의 아미노산 서열, 또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열,

(d) 서열 16의 아미노산 서열, 및 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열,

(e) 서열 16의 아미노산 서열, 또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는

(f) 서열 16의 아미노산 서열, 및 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열

을 포함하거나;

(v) 코딩된 세포내 신호전달 도메인이 서열 16의 아미노산 서열 및 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열이 동일한 프레임에서 단일 폴리펩티드 체로서 발현되거나; 또는

(vi) 단리된 핵산 분자가 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 상기 핵산 서열이

(a) 서열 60의 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열, 또는 서열 101 또는 서열 44의 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열; 또는

(b) 서열 60의 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열, 및 서열 101 또는 서열 44의 핵산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열

을 포함하는 것인

단리된 핵산 분자.

청구항 22

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 리더 서열을 추가로 코딩하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 리더 서열이 서열 13의 아미노산 서열, 또는 서열 13의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 24

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 핵산 분자에 의해 코딩되는 단리된 폴리펩티드 분자.

청구항 25

제24항에 있어서, 서열 32, 서열 31, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 및 서열 42로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드 분자.

청구항 26

(i) 인간화 항-CD19 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편, (ii) 막횡단 도메인, 및 (iii) 세포내 신호 전달 도메인을 포함하고, 여기서 상기 항-CD19 결합 도메인이

서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1);

서열 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2);

서열 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3);

서열 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1);

서열 22, 21 또는 23 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2); 및

서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3)

을 포함하는 것인 단리된 키메라 항원 수용체 (CAR) 분자.

청구항 27

제26항에 있어서, HC CDR2가 서열 21의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 28

제26항에 있어서, HC CDR2가 서열 22의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 29

제26항에 있어서, HC CDR2가 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD19 결합 도메인이 scFv인 단리된 CAR 분자.

청구항 31

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD19 결합 도메인이 서열 32, 31 또는 33-42에 열거된 아미노산 서열의 경쇄 및 중쇄를 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 32

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD19 결합 도메인이 (i) 서열 32, 31 또는 33-42에 열거된 경쇄 가변 영역, (ii) 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (iii) 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 경쇄 가변 영역과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 33

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD19 결합 도메인이 (i) 서열 32, 31 또는 33-42에 열거된 중쇄 가변 영역, (ii) 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 또는 (iii) 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 중쇄 가변 영역에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 34

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

항-CD19 결합 도메인이 서열 2, 서열 1, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는

항-CD19 결합 도메인이 서열 32, 서열 31, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 및 서열 42로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인

단리된 CAR 분자.

청구항 35

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 막횡단 도메인이 T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154의 알파, 베타 또는 제타 쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인이거나;

(ii) 막횡단 도메인이 CD8의 알파 쇄의 막횡단 도메인이거나, 또는

(iii) 막횡단 도메인이 (a) 서열 15의 아미노산 서열, (b) 서열 15의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 (c) 서열 15의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인

단리된 CAR 분자.

청구항 36

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항-CD19 결합 도메인이 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인에 연결된 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 37

제36항에 있어서,

힌지 영역이 CD8 알파 힌지이거나, 또는

코딩된 힌지 영역이 서열 14 또는 서열 102의 아미노산 서열, 또는 그에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을

포함하는 것인

단리된 CAR 분자.

청구항 38

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 공동자극 도메인을 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 39

제38항에 있어서,

(i) 공동자극 도메인이 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 신호전달 도메인을 포함하거나; 또는

(ii) 공동자극 도메인이 (a) 서열 16의 아미노산 서열, (b) 서열 16의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 (c) 서열 16의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인

단리된 CAR 분자.

청구항 40

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 세포내 신호전달 도메인이 1차 신호전달 도메인을 포함하거나;

(ii) 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함하거나;

(iii) 세포내 신호전달 도메인이 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 및 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함하거나;

(iv) 세포내 신호전달 도메인이

(a) 서열 16의 아미노산 서열, 또는 서열 17의 아미노산 서열 또는 서열 43의 아미노산 서열,

(b) 서열 16의 아미노산 서열, 및 서열 17의 아미노산 서열 또는 서열 43의 아미노산 서열,

(c) 서열 16의 아미노산 서열, 또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열,

(d) 서열 16의 아미노산 서열, 및 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 20, 10 또는 5개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열,

(e) 서열 16의 아미노산 서열, 또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는

(f) 서열 16의 아미노산 서열, 및 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

(v) 세포내 신호전달 도메인이 서열 16의 아미노산 서열, 및 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열이 동일한 프레임에서 단일 폴리펩티드쇄로서 발현되는 것인

단리된 CAR 분자.

청구항 41

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 리더 서열을 추가로 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 리더 서열이 서열 13의 아미노산 서열, 또는 서열 13의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 단리된 CAR 분자.

청구항 43

서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1);

서열 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2);

서열 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3);

서열 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1);

서열 22, 21 또는 23 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2); 및

서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3)

을 포함하는, 인간화 항-CD19 결합 도메인.

청구항 44

제43항에 있어서,

(i) 서열 32, 31 또는 33-42 중 어느 하나의 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 scFv, 또는

(ii) 서열 32, 31 또는 33-42 중 어느 하나에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 32, 31 또는 33-42에 제공된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,

(iii) 서열 32, 31 또는 33-42 중 어느 하나에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 32, 31 또는 33-42 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

(iv) (ii) 및 (iii) 모두

를 포함하는 인간화 항-CD19 결합 도메인.

청구항 45

제26항의 CAR 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 46

제45항에 있어서,

(i) 상기 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드 또는 바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

(ii) 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터이거나;

(iii) 상기 벡터는 (a) 프로모터, (b) EF-1 프로모터인 프로모터, 또는 (c) 서열 100의 핵산 서열을 포함하는 EF-1 프로모터를 추가로 포함하거나;

(iv) 상기 벡터는 시험관내 전사된 벡터이거나;

(v) 상기 벡터 내 핵산 서열은 폴리(A) 테일을 추가로 포함하거나; 또는

(vi) 상기 벡터 내 핵산 서열은 3' UTR을 추가로 포함하는 것인

벡터.

청구항 47

제45항의 벡터, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 핵산, 또는 제26항 내지 제29항 중 어느 한 항의 CAR 분자를 포함하는 세포.

청구항 48

제47항에 있어서, (a) 세포가 인간 T 세포이거나, (b) T 세포가 CD8+ 인간 T 세포인 세포.

청구항 49

제47항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인으로부터의 양성 신호를 제공하는 제2 폴리펩티드와 회합된, 억제 분자의 적어도 일부를 포함하는 제1 폴리펩티드를 포함하는 억제 분자를 추가로 발현하고, 여기서 억제 분자는 PD1의 적어도 일부를 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 공동자극 도메인 및 1차 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 것인 세포.

청구항 50

T 세포를 제45항의 벡터 또는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 핵산으로 형질도입시키는 것을 포함하는, 세포를 제조하는 방법.

청구항 51

시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 세포 내로 도입하는 것을 포함하며, 여기서 RNA는 제26항 내지 제29항 중 어느 한 항의 CAR 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 것인, RNA-조작된 세포 집단을 생성하는 방법.

청구항 52

제47항의 세포를 포함하는, CD19의 발현과 연관된 질환의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 53

제47항의 세포를 포함하는, CD19의 발현과 연관된 질환의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물로서,

(i) 상기 CD19의 발현과 연관된 질환이 증식성 질환 또는 CD19의 발현과 연관된 비-암 관련 적응증이거나;

(ii) 상기 CD19의 발현과 연관된 질환이 암, 악성종양, 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병이거나;

(iii) 상기 질환이 B-세포 급성 림프성 백혈병 ("BALL"), T-세포 급성 림프성 백혈병 ("TALL"), 급성 림프성 백혈병 (ALL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 급성 백혈병; 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 만성 백혈병; B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨 림프종, 형질모구성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 전백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 혈액암 또는 혈액 병태; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈액암이거나;

(iv) CAR 분자를 발현하는 세포가

(a) CAR 분자를 발현하는 세포의 효능을 증가시키는 작용제, CAR 분자를 발현하는 세포의 투여와 연관된 하나 이상의 부작용을 개선하는 작용제, CD19와 연관된 질환을 치료하는 작용제, 또는 억제 분자를 억제하는 작용제; 또는

(b) PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160 및 2B4를 억제하는 작용제

와 조합하여 투여되거나;

(v) CAR 분자를 발현하는 세포가 10^4 내지 10^9 세포/kg 체중, 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중, 용량 당 1.4×10^7 내지 1.1×10^9 세포, 용량 당 최대 5×10^7 , $1 \times 10^7 - 5 \times 10^8$, 또는 $1 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ 세포의 용량으로 투여되거나;

(vi) 대상체가 제47항의 세포를 1회 이상 후속 투여받거나; 또는

(vii) 상기 사용이 CAR 분자를 포함하는 세포를 1주 1회 초과로 투여하는 것을 포함하는 것인

제약 조성물.

청구항 54

CD19의 발현과 연관된 질환의 치료에 사용하기 위한, CD19 CAR 세포를 포함하는 제약 조성물로서, 상기 세포가

- (i) PD1의 세포외 도메인, 막통과 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 PD1 CAR;
 - (ii) GITR 효능제;
 - (iii) PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160 및 2B4 중 하나 이상을 억제하는 작용제;
 - (iv) CAR 분자를 발현하는 세포의 투여와 연관된 하나 이상의 부작용을 개선하는 작용제;
 - (v) IL-6 억제제;
 - (vi) 토실리주맙; 또는
 - (vii) mTOR 억제제
- 와 조합하여 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서,

- (i) PD1 CAR이 서열 121에 밑줄로 표시된 PD1의 세포외 도메인, 또는 서열 121의 아미노산 서열을 포함하는 것이거나;
 - (ii) CD19 CAR 및 PD1 CAR이 동일 세포에서 발현되는 것이거나;
 - (iii) 상기 (i)과 (ii) 모두에 해당되는 것인
- 제약 조성물.

청구항 56

세포 이식 전 세포 조건화 요법에 사용하기 위한, CD19 CAR 세포를 포함하는 제약 조성물.

청구항 57

제54항 또는 제55항에 있어서, CD19 CAR이 인간화 CD19 CAR인 제약 조성물.

청구항 58

CD19 CAR을 코딩하는 DNA 서열 상에서 시험관내 전사를 수행하는 것을 포함하고, 상기 시험관내 전사된 RNA가 제26항 내지 제29항 중 어느 한 항의 CAR 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 것인, CD19 CAR을 코딩하는 시험관내 전사된 RNA를 생성하는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서,

- (i) 상기 CD19 CAR이 인간화 CD19 CAR이거나;
 - (ii) 상기 시험관내 전사된 RNA가 5' 캡 및 100 내지 5000 아데노신의 폴리(A) 테일을 포함하는 것이거나,
 - (iii) 상기 (i)과 (ii) 모두에 해당되는 것인
- 방법.

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 2013년 3월 16일 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/802,629 및 2013년 6월 24일 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/838,537을 우선권 주장하며, 이들 출원 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0002] **서열 목록**

[0003] 본원은 ASCII 포맷으로 전자 제출되고 그 전부가 본원에 참조로 포함된 서열 목록을 포함한다. 2014년 3월 14일 생성된 상기 ASCII 카피는 N2067-7002WO_SL.txt로 명명되고 228,415 바이트 크기이다.

[0004] **발명의 분야**

[0005] 본 발명은 일반적으로 분화 클러스터 19 단백질 (CD19)의 발현과 연관된 질환을 치료하기 위한, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 조작된 T 세포의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] B 세포 악성종양에 걸린 많은 환자는 표준 요법으로 치유할 수 없다. 또한, 전통적인 치료 방식은 종종 심각한 부작용이 있다. 암 면역요법에서 많은 시도가 이루어졌지만, 여러 장애가 임상 효과 달성이라는 목표를 매우 어렵게 만든다. 소위 종양 항원 수백 개가 확인되었지만, 이들은 일반적으로 자신으로부터 유래하고, 따라서 면역원성이 낮다. 또한, 종양은 그 자체를 면역 공격의 개시 및 전파에 저항하도록 만드는 몇몇 메커니즘을 이용한다.

[0007] T 세포를 암세포, 예컨대 B 세포 악성종양 상의 적합한 세포-표면 분자로 재유도하는 것에 의존하는 키메라 항원 수용체 (CAR) 변형된 자가 T 세포 (CART) 요법을 사용한 최근의 개발은 B 세포 악성종양 및 다른 암을 치료하기 위한 면역계의 힘을 이용할 때 유망한 결과를 보여준다 (예를 들어, 문헌 [Sadelain et al., Cancer Discovery 3:388-398 (2013)] 참조). 무린 유래 CART19 (즉, "CTL019")의 임상 결과는 CLL 및 소아기 ALL을 앓고 있는 환자에서 완전한 회복을 확립할 때 유망한 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, [Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011)], [Porter et al., NEJM 365:725-733 (2011)], [Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)] 참조). 유전자 변형된 T 세포 상의 키메라 항원 수용체가 표적화 세포를 인식하고 파괴하는 능력 이외에, 성공적인 치료 T 세포 요법은 시간 경과에 따른 증식 및 지속 능력을 가지며 백혈병성 세포 도망자를 추가로 모니터링할 것을 필요로 한다. 무반응, 억제 또는 소진의 결과 여부와 상관 없이 T 세포의 가변적인 품질은 CAR-형질전환된 T 세포의 성능에 대해 영향을 줄 것이지만, 이때 숙련의의 이에 대한 제어가 제한된다. 효과를 보이기 위해, CAR 형질전환된 환자 T 세포는 CAR의 항원에 반응하여 증식하는 능력을 지속 및 유지할 필요가 있다. ALL 환자 T 세포는 무린 scFv를 포함하는 CART19를 사용하여 이를 수행할 수 있는 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 문헌 [Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)] 참조).

발명의 내용

- [0008] 본 발명은 환자에서 면역 반응을 유도하지 않고 장기 사용시에 안전하고 B 세포 유래 암의 치료를 위한 알려진 CART 요법에 비해 유지되거나 보다 우수한 임상 효과를 갖는, 키메라 항원 수용체 (CAR) 구축물 내로 통합된 분화 클러스터 19 단백질 (CD19)에 결합하는 최적화 및 인간화 항체 단편 (예를 들어, scFv)을 제공함으로써 환자에서 면역 반응을 제어하는 것을 다룬다. 본 발명은 추가로 CD19의 발현과 연관된 혈액암의 치료를 위해 CAR 내로 통합된 CD19에 결합하는 인간화 항체 단편 (OMIM 수탁번호 107265, 스위스 프롯(Swiss Prot) 수탁번호 P15391)을 발현하도록 조작된 T 세포의 용도에 관한 것이다.
- [0009] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이며, 여기서 CAR은 인간화 항-CD19 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함하는 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR은 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인, 본원에 기재된 막횡단 도메인, 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함하는 항체 또는 항체 단편을 포함한다.
- [0010] 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및/또는 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하고, 예를 들어 인간화 항-CD19 결합 도메인은 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR 및 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR를 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 적어도 HC CDR2를 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하고, 예를 들어 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 각각 본원에 기재된 HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3을 포함하는 2개의 가변 중쇄 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 적어도 HC CDR2를 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 경쇄 가변 영역은 VK3_L25 배선 서열의 1, 2, 3 또는 4개 모두의 프레임워크 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 경쇄 가변 영역은 변형 (예를 들어, 치환, 예를 들어 서열 58의 경쇄 가변 영역 내의 대응하는 위치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산의 치환, 예를 들어 위치 71 및 87 중 하나 이상의 위치에서의 치환)을 갖는다. 한 실시양태에서, 코딩된 중쇄 가변 영역은 VH4_4-59 배선 서열의 1, 2, 3 또는 4개 모두의 프레임워크 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 중쇄 가변 영역은 변형 (예를 들어, 치환, 예를 들어 서열 58의 중쇄 가변 영역 내의 대응하는 위치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산의 치환, 예를 들어 위치 71, 73 및 78 중 하나 이상의 위치에서의 치환)을 갖는다. 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 경쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의) 및/또는 본원에 기재된 인간화 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의)을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의), 예를 들어 적어도 2개의 본원에 기재된 인간화 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의)을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 항-CD19 결합 도메인은 표 3의 아미노산 서열의 경쇄 및 중쇄를 포함하는 scFv이다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 다음을 포함한다: 표 3에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 3의 아미노산 서열과 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 표 3에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 3의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역. 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 61, 서열 62, 서열 63, 서열 64, 서열 65, 서열 66, 서열 67, 서열 68, 서열 70, 서열 71 및 서열 72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 scFv이고, 본원에 기재된, 예를 들어 표 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역은 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커를 통해 본원에 기재된, 예를 들어 표 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역에 부착된다. 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 (Gly₄-Ser)_n 링커를 포함하

고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6, 바람직하게는 3 또는 4이다 (서열 53). scFv의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은 예를 들어 임의의 다음 배향으로 존재할 수 있다: 경쇄 가변 영역-링커-중쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역-링커-경쇄 가변 영역.

[0011] 한 실시양태에서, 코딩된 막횡단 도메인은 T-세포 수용체, CD27, CD28, CD3 엽실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154의 알파, 베타 또는 제타쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인이다. 한 실시양태에서, 코딩된 막횡단 도메인은 서열 15의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 막횡단 도메인은 서열 15의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20, 10 또는 5개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 15의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 56의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0012] 한 실시양태에서, 코딩된 항-CD19 결합 도메인은 힌지 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인에 연결된다. 한 실시양태에서, 코딩된 힌지 영역은 서열 14 또는 서열 45 또는 서열 47, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 55 또는 서열 46 또는 서열 48의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0013] 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 공동자극 도메인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질로부터 얻은 기능적 신호전달 도메인이다. 한 실시양태에서, 코딩된 공동자극 도메인은 서열 16의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 공동자극 도메인은 서열 16의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20, 10 또는 5개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 60의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 및/또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 CD27의 기능적 신호전달 도메인 및/또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 51의 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 43의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16, 또는 서열 51의 아미노산 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20, 10 또는 5개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16 또는 서열 51의 아미노산 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 51의 서열 및 서열 17 또는 서열 43의 서열을 포함하며, 여기서 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열은 동일한 프레임에서, 및 단일 폴리펩티드쇄로서 발현된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 60의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열, 및/또는 서열 101 또는 서열 44의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 52의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열, 및/또는 서열 101 또는 서열 44의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 리더 서열, 예를 들어 서열 13의 본원에 기재된 리더 서열; 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3을 포함하는 인간화 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 표 3에 제공된 인간화 항-CD19 결합 도메인, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열; 예를 들어 서열 14 또는 서열 45의 본원에 기재된 힌지 영역; 본원에 기재된 막횡단 도메인, 예를 들어 서열 15를 포함하는 막횡단 도메인; 및 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 코딩된 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인, 예를 들어 서열 16 또는 서열 51의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인, 및/또는 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 서열 17 또는 서열 43의 서열을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 54의 핵산 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 리더 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 61, 서열 62, 서열 63, 서열 64, 서열 65, 서열 66, 서열 67, 서열 69, 서열 70, 서열

71, 및 서열 72의 핵산 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 56의 핵산 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 막횡단 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 서열 60의 핵산 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열 및/또는 서열 101 또는 서열 44의 핵산 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열에 의해 코딩된 세포내 신호전달 도메인 서열을 포함한다.

[0015] 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 또는 서열 42의 CAR 아미노산 서열, 또는 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 또는 서열 42의 아미노산 서열의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 30개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 60, 50 또는 40개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 상기 서열에 대해 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함한다 (예를 들어, 이로 이루어진다).

[0016] 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 서열 85, 서열 86, 서열 87, 서열 88, 서열 89, 서열 90, 서열 91, 서열 92, 서열 93, 서열 94, 서열 95, 또는 서열 96의 핵산 서열 또는 서열 85, 서열 86, 서열 87, 서열 88, 서열 89, 서열 90, 서열 91, 서열 92, 서열 93, 서열 94, 서열 95, 또는 서열 96의 핵산 서열에 대해 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이로 이루어진다).

[0017] 한 측면에서, 본 발명은 인간화 항-CD19 결합 도메인을 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이며, 여기서 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하고, 예를 들어 인간화 항-CD19 결합 도메인은 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR 및 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 적어도 HC CDR2를 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 VK3_L25 배선 서열의 1, 2, 3 또는 4개 모두의 프레임워크 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 변형 (예를 들어, 치환, 예를 들어 서열 58의 묶린 경쇄 가변 영역 내의 대응하는 위치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산의 치환, 예를 들어 위치 71 및 87 중 하나 이상의 위치에서의 치환)을 갖는다. 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 VH4_4-59 배선 서열의 1, 2, 3 또는 4개 모두의 프레임워크 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 변형 (예를 들어, 치환, 예를 들어 서열 58의 묶린 중쇄 가변 영역 내의 대응하는 위치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산의 치환, 예를 들어 위치 71, 73 및 78 중 하나 이상의 위치에서의 치환)을 갖는다. 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 경쇄 가변 영역 (예를 들어, 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 내의) 및/또는 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 내의)을 포함한다. 한 실시양태에서, 코딩된 인간화 항-CD19 결합 도메인은 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 내의 아미노산 서열의 경쇄 및 중쇄를 포함하는 scFv이다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인 (예를 들어, scFv)는 다음을 포함한다: 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12에 제시되는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 아미노산 서열과 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12에 제시되는 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 61, 서열 62, 서열 63, 서열 64, 서열 65, 서열 66, 서열 67, 서열 68, 서열 69, 서열 70, 서열 71 및 서열 72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 핵산 서열에 의해 코딩되는 단리된 폴리펩티드 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드 분자는 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 및 서열 42로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단

리된 폴리펩티드는 서열 31의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 서열 32의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드 분자는 서열 35의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드 분자는 서열 36의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드 분자는 서열 37의 서열을 포함한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간화 항-CD19 결합 도메인 (예를 들어, CD19에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편), 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함하는 단리된 키메라 항원 수용체 (CAR) 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, CAR은 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 CD19에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편), 본원에 기재된 막횡단 도메인, 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 본원에 기재된 1차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함하는 항체 또는 항체 단편을 포함한다.

[0020] 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하고, 예를 들어 인간화 항-CD19 결합 도메인은 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR 및 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 적어도 HC CDR2를 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하고, 예를 들어 인간화 항-CD19 결합 도메인은 각각 본원에 기재된 HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3을 포함하는 2개의 가변 중쇄 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 적어도 HC CDR2를 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 VK3_L25 배선 서열의 1, 2, 3 또는 4개 모두의 프레임워크 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 변형 (예를 들어, 치환, 예를 들어 서열 58의 류린 경쇄 가변 영역 내의 대응하는 위치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산의 치환, 예를 들어 위치 71 및 87 중 하나 이상의 위치에서의 치환)을 갖는다. 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 VH4_4-59 배선 서열의 1, 2, 3 또는 4개 모두의 프레임워크 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 변형 (예를 들어, 치환, 예를 들어 서열 58의 류린 중쇄 가변 영역 내의 대응하는 위치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산의 치환, 예를 들어 위치 71, 73 및 78 중 하나 이상의 위치에서의 치환)을 갖는다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 경쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의) 및/또는 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의)을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 표 3의 아미노산 서열의 경쇄 및 중쇄를 포함하는 scFv이다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 다음을 포함한다: 표 3에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 3의 아미노산 서열과 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 표 3에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 3의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 scFv이고, 본원에 기재된, 예를 들어 표 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역은 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커를 통해 본원에 기재된, 예를 들어 표 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역에 부착된다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 (Gly₄-Ser)_n 링커를 포함하고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6, 바람직하게는 3 또는 4이다 (서열 53). scFv의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은 예를 들어 임의의 다음 배향으로 존재할 수 있다: 경쇄 가변 영역-링커-중쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역-링커-경쇄 가변 영역.

[0021] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD 154의 알파, 베타 또는 제타 체로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어,

치환) 내지 20, 10 또는 5개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 15의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0022] 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 힌지 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인에 연결된다. 한 실시양태에서, 코딩된 힌지 영역은 서열 14 또는 서열 45, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0023] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 공동자극 도메인을 코딩하는 서열, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 선택된 단백질의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 서열 16의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 서열 16 또는 서열 51의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20, 10 또는 5개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16 또는 서열 51의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0024] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 및/또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16의 서열 및/또는 서열 17의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16의 서열 및/또는 서열 43의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD27의 기능적 신호전달 도메인 및/또는 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 51의 서열 및/또는 서열 17의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 51의 서열 및/또는 서열 43의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 51의 아미노산 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 20, 10 또는 5개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 16 또는 서열 51의 아미노산 서열 및/또는 서열 17 또는 서열 43의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 51의 서열 및 서열 17 또는 서열 43의 서열을 포함하며, 여기서 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열은 동일한 프레임에서 단일 폴리펩티드 채로서 발현된다.

[0025] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 리더 서열, 예를 들어 본원에 기재된 리더 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 리더 서열은 서열 13의 아미노산 서열, 또는 서열 13의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 리더 서열, 예를 들어 본원에 기재된 리더 서열, 예를 들어 서열 13의 리더 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열; 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3을 포함하는 인간화 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 표 3에 제공된 인간화 항-CD19 결합 도메인, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열; 힌지 영역, 예를 들어 본원에 기재된 힌지 영역, 예를 들어 서열 14의 힌지 영역 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열; 막횡단 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 막횡단 도메인, 예를 들어 서열 15의 서열 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 갖는 막횡단 도메인; 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인)을 포함하는 단리된 CAR 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 공동자극 도메인, 예를 들어 서열 16 또는 서열 51의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인, 및/또는 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 서열 17 또는 서열 43의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함한다.

[0027] 한 실시양태에서, 단리된 CAR 분자는 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 또는 서열 42의 아미노산 서열, 또는 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 또는 서열 42의 아미노산 서열의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 또는 30개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 60, 50 또는 40개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 또는 서열 42의 아미노산 서열에 대해 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 이로 이루어진다).

- [0028] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하는 인간화 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR 및 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR을 포함하는 인간화 항-CD19 결합 도메인에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 적어도 HC CDR2를 갖는다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 VK3_L25 배선 서열의 1, 2, 3 또는 4개 모두의 프레임워크 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 변형 (예를 들어, 치환, 예를 들어 서열 58의 무린 경쇄 가변 영역 내의 대응하는 위치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산의 치환, 예를 들어 위치 71 및 87 중 하나 이상의 위치에서의 치환)을 갖는다. 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 VH4_4-59 배선 서열의 1, 2, 3 또는 4개 모두의 프레임워크 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 변형 (예를 들어, 치환, 예를 들어 서열 58의 중쇄 가변 영역 내의 대응하는 위치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산의 치환, 예를 들어 위치 71, 73 및 78 중 하나 이상의 위치에서의 치환)을 갖는다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 경쇄 가변 영역 (예를 들어, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12 내의) 및/또는 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12 내의)을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12 내의 아미노산 서열의 경쇄 및 중쇄를 포함하는 scFv이다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 다음을 포함한다: 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12에 제시된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열 또는 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12 내의 아미노산 서열과 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12에 제시된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12 내의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역.
- [0029] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0030] 한 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 한 실시양태에서, 벡터는 프로모터를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 프로모터는 EF-1 프로모터이다. 한 실시양태에서, EF-1 프로모터는 서열 100의 서열을 포함한다.
- [0031] 한 실시양태에서, 벡터는 시험관내 전사된 벡터, 예를 들어 본원에 기재된 핵산 분자의 RNA를 전사하는 벡터이다. 한 실시양태에서, 벡터 내의 핵산 서열은 폴리(A) 테일, 예를 들어 약 150개의 아데노신 염기를 포함하는 본원에 기재된 폴리 A 테일 (서열 104)을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터 내의 핵산 서열은 3' UTR, 예를 들어 인간 베타-글로불린으로부터 유래된 3' UTR의 적어도 하나의 반복체를 포함하는 본원에 기재된 3' UTR을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터 내의 핵산 서열은 프로모터, 예를 들어 T2A 프로모터를 추가로 포함한다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 세포는 인간 T 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 세포, 예를 들어 인간 T 세포, 예를 들어 본원에 기재된 인간 T 세포이다. 한 실시양태에서, 인간 T 세포는 CD8+ T 세포이다.
- [0033] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또 다른 작용제, 예를 들어 CAR-발현 세포의 능력을 향상시키는 작용제를 추가로 발현할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 작용제는 억제 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TIGER 베타를 포함한다. 한 실시양태에서, 억제 분자를 억제하는 작용제는 양성 신호를 세포에 제공하는 제2 폴리펩티드, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인과 회합하는 제1 폴리펩티드, 예를 들어 억제 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 예를 들어 억제 분자, 예컨대 PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA,

LAIR1, TIM3, 2B4 및 TIGIT의 제1 폴리펩티드, 또는 임의의 이들의 단편 (예를 들어, 임의의 이들의 세포외 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 41BB, CD27 또는 CD28) 및/또는 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)을 포함하는)인 제2 폴리펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 PD1의 제1 폴리펩티드 또는 그의 단편 (예를 들어, PD1의 세포외 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD28 신호전달 도메인 및/또는 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)의 제2 폴리펩티드를 포함한다.

[0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 T 세포를 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질도입하는 것을 포함하는, 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0035] 본 발명은 또한 외인성 RNA를 일시적으로 발현시키는 것을 포함하는, RNA-조작된 세포, 예를 들어 본원에 기재된 세포, 예를 들어 T 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공한다. 이 방법은 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 세포 내로 도입하는 것을 포함하며, 여기서 RNA는 본원에 기재된 CAR 분자를 코딩하는 핵산을 포함한다.

[0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 포유동물에게 CAR 분자를 포함하는 세포, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물에 항종양 면역을 제공하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 세포는 자가 T 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 동종 T 세포이다. 한 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0037] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CD19의 발현과 연관된 질환이 있는 포유동물에게 CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 포함하는 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0038] 한 실시양태에서, CD19 발현과 연관된 질환은 증식성 질환, 예컨대 암 또는 악성종양 또는 전암성 병태, 예컨대 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병으로부터 선택되거나, 또는 CD19의 발현과 연관된 비-암 관련 적응증이다. 한 실시양태에서, 질환은 혈액암이다. 한 실시양태에서, 혈액암은 백혈병이다. 한 실시양태에서, 암은 B-세포 급성 림프성 백혈병 ("BALL"), T-세포 급성 림프성 백혈병 ("TALL"), 급성 림프성 백혈병 (ALL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 급성 백혈병; 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 만성 백혈병; B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷(Burkitt) 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨(Hodgkin) 림프종, 형질모구성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬(Waldenstrom) 마크로글로불린혈증, 및 골수성 혈액 세포의 비효과적인 생산 (또는 이형성)과 연관된 혈액 병태의 다양한 집단인 "전백혈병", 및 CD19를 발현하는 비정형 및/또는 비전형 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는 CD19 발현과 연관된 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 혈액암 또는 혈액 병태; 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0039] 한 실시양태에서, 림프구 주입, 예를 들어 동종 림프구 주입액이 암의 치료에 사용되고, 여기서 림프구 주입액은 적어도 하나의 CD19 CAR-발현 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 자가 림프구 주입액이 암의 치료에 사용되고, 여기서 자가 림프구 주입액은 적어도 하나의 CD19-발현 세포를 포함한다.

[0040] 한 실시양태에서, CD19 CAR 발현 세포, 예를 들어 T 세포는 이전에 줄기세포 이식, 예를 들어 자가 줄기세포 이식을 받은 대상체에게 투여된다.

[0041] 한 실시양태에서, CD19 CAR 발현 세포, 예를 들어 T 세포는 선행 용량의 멜팔란을 투여한 대상체에게 투여된다.

[0042] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 CAR 분자를 발현하는 세포의 효능을 증가시키는 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 작용제와 조합으로 투여된다.

[0043] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 CAR 분자를 발현하는 세포의 투여와 관련된 하나 이상의 부작용을 개선하는 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 작용제와 조합으로 투여된다.

[0044] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 CD19와 연관된 질환을 치료하는 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 작용제와 조합으로 투여된다.

[0045] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 본원에 기재된 용량 및/또는

투여 일정으로 투여된다.

- [0046] 한 실시양태에서, CAR 분자는 예를 들어 시험관내 전사를 사용하여 T 세포 내에 도입되고, 대상체 (예를 들어, 인간)에게 CAR 분자를 포함하는 세포를 초기 투여하고, CAR 분자를 포함하는 세포를 1회 이상 후속 투여하고, 여기서 1회 이상의 후속 투여는 이전 투여 후 15일 이내에, 예를 들어 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2일에 투여된다. 한 실시양태에서, CAR 분자를 포함하는 세포의 1회 초과 투여는 매주 대상체 (예를 들어, 인간)에게 투여되고, 예를 들어 CAR 분자를 포함하는 세포는 매주 2, 3, 또는 4회 투여된다. 한 실시양태에서, 대상체 (예를 들어, 인간 대상체)에게 CAR 분자를 포함하는 세포를 매주 1회 초과로 투여한 후 (예를 들어, 매주 2, 3 또는 4회 투여) (본원에서 주기로도 칭함), 1주 동안 CAR 분자를 포함하는 세포를 투여하지 않고, CAR 분자를 포함하는 세포의 1회 이상의 추가 투여 (예를 들어, 매주 CAR 분자를 포함하는 세포의 1회 초과 투여)가 대상체에게 실시된다. 또 다른 실시양태에서, 대상체 (예를 들어, 인간 대상체)에게 CAR 분자를 포함하는 세포를 1회 초과 투여하고, 각각의 주기 사이의 시간은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 또는 3일 미만이다. 한 실시양태에서, CAR 분자를 포함하는 세포는 매주 3회 투여를 위해 격일로 투여된다. 한 실시양태에서, CAR 분자를 포함하는 세포는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 또는 그 초과 동안 투여된다.
- [0047] 한 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 질환, 예를 들어 암, 예를 들어 본원에 기재된 암에 대한 제1선 치료로서 투여된다. 또 다른 실시양태에서, CAR 분자, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 분자를 발현하는 세포는 질환, 예를 들어 암, 예를 들어 본원에 기재된 암에 대한 제2선, 제3선, 제4선 치료로서 투여된다.
- [0048] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 세포의 집단이 투여된다.
- [0049] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 본 발명의 CAR을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 본 발명의 CAR의 단리된 폴리펩티드 분자, 본 발명의 CAR을 포함하는 벡터, 및 본 발명의 CAR을 포함하는 세포에 관한 것이다.
- [0050] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CD19를 발현하는 질환의 치료에 사용하기 위한, 본 발명의 CAR을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 본 발명의 CAR의 단리된 폴리펩티드 분자, 본 발명의 CAR을 포함하는 벡터, 및 본 발명의 CAR을 포함하는 세포에 관한 것이다.
- [0051] 한 측면에서, 본 발명은 예를 들어 본원에 기재된 CD19-CAR 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질 감염 또는 형질도입된 자가 세포의 집단을 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 한 실시양태에서, 벡터는 본원의 다른 부분에서 설명되는 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 한 실시양태에서, 벡터는 세포, 예를 들어 T 세포로 전달되고 (예를 들어, 형질감염 또는 전기천공에 의해), 여기서 벡터는 mRNA 분자로서 전사되는, 본원에 기재된 CD19 CAR 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함하고, CD19 CAR 분자는 RNA 분자로부터 번역되고 세포의 표면 상에서 발현된다.
- [0052] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CAR-발현 세포, 예를 들어 CART 세포의 집단을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, CAR-발현 세포의 집단은 상이한 CAR을 발현하는 세포의 혼합물을 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, CART 세포의 집단은 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 상이한 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 제1 세포에 의해 발현된 CAR 내의 항-CD19 결합 도메인과 상이한 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, CAR-발현 세포의 집단은 예를 들어 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 CD19 이외의 다른 표적 (예를 들어, CD123)에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR-발현 세포의 집단은 예를 들어 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 2차 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함한다.
- [0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 집단 내의 적어도 하나의 세포가 본원에 기재된 항-CD19 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 세포의 집단, 및 또 다른 작용제, 예를 들어 CAR-발현 세포의 활성을 향상시키는 작용제를 발현하는 제2 세포를 제공한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 작용제는 억제 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TGFR 베타를 포함한다. 한 실시양태에서, 억제 분자를 억제하는 작용제는 양성 신호를 세포에 제공하는 제2 폴리펩티드, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인과 회합하는 제1 폴리펩티드, 예를 들어 억제 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 예를 들어 억제 분자, 예컨대 PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 및 TIGIT의 제1 폴리펩티드, 또는 임의의 이들의 단편 (예를 들어, 임의의 이들의 세포외 도메인의 적어도 일부), 및 본원

에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 41BB, CD27 또는 CD28) 및/또는 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)을 포함하는)인 제2 폴리펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 PD1의 제1 폴리펩티드 또는 그의 단편 (예를 들어, PD1의 세포외 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD28 신호전달 도메인 및/또는 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)의 제2 폴리펩티드를 포함한다.

[0054] 한 실시양태에서, 예를 들어 본원에 기재된 CD19 CAR 분자를 코딩하는 핵산 분자는 mRNA 분자로서 발현된다. 한 실시양태에서, 유전자 변형된 CD19 CAR-발현 세포, 예를 들어 T 세포는 목적하는 CAR을 코딩하는 RNA 분자 (예를 들어, 벡터 서열 없이)를 세포 내로 형질감염시키거나 전기천공함으로써 생성될 수 있다. 한 실시양태에서, CD19 CAR 분자는 도입된 후에 RNA 분자로부터 번역되고, 재조합 세포의 표면 상에 발현된다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1A, 1B 및 1C는 본 발명의 마우스 항-CD19 CAR 또는 인간화 항-CD19 CAR을 형질도입시키고 도 1A에 제시된 바와 같은 CD19를 발현하지 않는 대조군 K562 세포 (K562cc), 도 1B에 제시된 바와 같은 CD19로 형질전환시킨 K562 세포 (K562.CD19), 또는 도 1C에 제시된 바와 같은 CLL 환자로부터 분리된 악성 B 세포 (Pt 14 B 세포 단리물)와 함께 배양한 ND317 (정상 공여자) T 세포에서 검정할 때 세포독성의 그래프이다.

도 2A 및 2B는 CD19+ 세포로의 인간화 및 마우스 항-CD19CAR-발현 세포의 증식 반응을 보여주는 그래프이고, 여기서 보다 많은 수의 생존 CAR+ T 세포는 1차 CLL 세포로의 최대 CD4+ 및 CD8+ T 세포 증식을 보여주는 집단과 상호관련된다.

도 3은 본 발명의 scFv에 대한 디컨볼루션된 HPLC 질량 스펙트럼의 그래프이고, 여기서 상단 열은 비처리된 scFv를 도시하고, 하단 열은 동족 탈글리코실화된 scFv를 도시한다.

도 4는 시차 주사 형광측정법에 의해 측정된 입체형태적 안정성의 그래프이다. 마우스 scFv의 T_m은 57°C이다 (굵은 선). 모든 인간화 scFv 변이체는 모 마우스 scFv에 비해 약 70°C에서 더 높은 T_m을 보여준다. 인간화에 의해 도입된 잔기는 T_m을 10°C 초과로 개선하였다.

도 5는 CD19 CAR 형질도입시킨 T 세포 증식의 그래프이고, 여기서 CART19 세포는 (a) CD19의 발현에 대해 음성이고 따라서 음성 대조군으로서 사용되는 만성 골수성 백혈병 ("CML") 세포주; (b) CD19의 발현에 대해 양성이고 따라서 양성 대조군으로서 사용되는 재조합 K562 세포; 또는 (c) 세포 표면 상에 CD19를 발현하는, CLL 환자로부터 분리된 Pt14 B 세포를 향하여 지정된다.

도 6A 및 6B는 대표적인 CAR의 도면이다.

도 7은 CD19 형질도입된 CAR T 세포를 사용하여 처리한 후 NSG 마우스에서 HALLX5447 1차 ALL 질환 진행을 도시한다. CD19에 특이적인 CAR T 세포로 처리한 후 NSG 마우스에서 1차 인간 ALL 세포의 성장은 질환 진행의 제어를 입증하였다. CD19⁺ 인간 ALL 세포의 평균 백분율은 종양 이식 후 제65일까지 NSG 마우스에서 말초 혈액 내의 질환 부담의 표시자이다. 흑색 원: 꼬리 정맥을 통해 100 μ l의 PBS로 처리한 마우스; 적색 정사각형: 모의 형질도입시킨 T 세포로 처리한 마우스; 청색 삼각형: 무린 CD19 CAR 형질도입시킨 T 세포로 처리한 마우스; 및 자색 역삼각형: 인간화 CD19 CAR 형질도입시킨 T 세포로 처리한 마우스. ANOVA에 의해 계산된 유의성; *는 P<0.01을 나타낸다.

도 8은 환자의 종양 세포에서 CD19 발현을 도시한다. CD138⁺ CD45^{dim} 종양 세포를 CD19 (x-축) 및 CD38 (y-축)에 대해 염색하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 정의

[0057] 달리 규정하지 않으면, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0058] 용어 단수형태는 문장의 하나 초과 (즉, 적어도 하나의) 문법적 대상을 나타낸다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소들을 의미한다.

[0059] 용어 "약"은 측정가능한 값, 예컨대 양, 시간 등을 언급할 때, 특정된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 몇몇 경우에 $\pm$

10%, 또는 몇몇 경우에 $\pm 5\%$, 또는 몇몇 경우에 $\pm 1\%$, 또는 몇몇 경우에 $\pm 0.1\%$ 의 차이를 포함하는 의미이고, 그 이유는 상기 차이가 개시된 방법의 수행에 적합하기 때문이다.

[0060] 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 적어도 세포의 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 아래에서 규정되는 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인 (본원에서 "세포내 신호전달 도메인"으로도 언급됨)을 포함하는 재조합 폴리펩티드 구축물을 의미한다. 한 측면에서, 자극 분자는 T 세포 수용체 복합체와 회합된 제타 쇄. 한 측면에서, 세포질 신호전달 도메인은 아래에서 규정되는 적어도 하나의 공동자극 분자로부터 유래된 하나 이상의 기능적 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 공동자극 분자는 4-1BB (즉, CD137), CD27 및/또는 CD28로부터 선택된다. 한 측면에서, CAR은 세포외 항원 인식 도메인, 막횡단 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포외 항원 인식 도메인, 막횡단 도메인 및 공동-자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포외 항원 인식 도메인, 막횡단 도메인 및 하나 이상의 공동-자극 분자(들)로부터 유래된 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포외 항원 인식 도메인, 막횡단 도메인 및 하나 이상의 공동-자극 분자(들)로부터 유래된 적어도 2개의 기능적 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 CAR 융합 단백질의 아미노-말단 (N-ter)에 선택적인 리더 서열을 포함한다. 한 측면에서, CAR은 세포외 항원 인식 도메인의 N-말단에 리더 서열을 추가로 포함하고, 여기서 리더 서열은 CAR의 세포 처리 및 세포막으로의 국제화 동안 항원 인식 도메인 (예를 들어, aa scFv)으로부터 임의로 절단된다.

[0061] 용어 "신호전달 도메인"은 제2 메신저를 생성하거나 또는 상기 메신저에 반응하여 이펙터로서 기능함으로써 규정된 신호전달 경로를 통한 세포 활성을 조절하기 위해 정보를 세포 내로 전달함으로써 작용하는 단백질의 기능성 부분을 의미한다.

[0062] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CD19"는 백혈병 전구체 세포에 대해 검출가능한 항원 결정자인 분화 클러스터 19 단백질을 의미한다. 인간 및 무린 아미노산 및 핵산 서열은 공공 데이터베이스, 예컨대 진뱅크 (GenBank), 유니프룻(UniProt) 및 스위스-프룻에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 인간 CD19의 아미노산 서열은 유니프룻/스위스-프룻 수탁번호 P15391로서 찾을 수 있고, 인간 CD19를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 수탁번호 NM_001178098로 찾을 수 있다. CD19는 예를 들어, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구 백혈병 및 비-호지킨 림프종을 비롯한 대부분의 B 계열 암 상에서 발현된다. CD19를 발현하는 다른 세포를 아래에 "CD19의 발현과 연관된 질환"의 정의에서 제공한다. 이것은 또한 B 세포 전구체의 초기 마커이다. 예를 들어, 문헌 [Nicholson et al. Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165 (1997)]을 참조한다. 한 측면에서, CART의 항원-결합 부분은 CD19 단백질의 세포외 도메인 내의 항원을 인식하고 결합한다. 한 측면에서, CD19 단백질은 암세포 상에서 발현된다.

[0063] 용어 "항체"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 항원에 특이적으로 결합하는 이뮤노글로불린 분자로부터 유래된 단백질, 또는 폴리펩티드 서열을 의미한다. 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날, 다수의 또는 단일 쇄, 또는 무손상 이뮤노글로불린일 수 있고, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 항체는 이뮤노글로불린 분자의 사량체일 수 있다.

[0064] 용어 "항체 단편"은 무손상 항체의 적어도 하나의 부분, 또는 그의 재조합 변이체를 의미하고, 표적, 예컨대 항원에 대한 항체 단편의 인식 및 특이적 결합을 제공하기에 충분한, 무손상 항체의 항원 결합 도메인, 예를 들어 항원 결정 가변 영역을 의미한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, scFv 항체 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예컨대 sdAb (VL 또는 VH), 낙타류 VH8 도메인, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중-특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용어 "scFv"는 경쇄의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 항체 단편 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 나타내고, 여기서 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 짧은 가요성 폴리펩티드 링커를 통해 인접하여 연결되고, 단일 쇄 폴리펩티드로서 발현될 수 있고, scFv는 그가 유래되는 무손상 항체의 특이성을 보유한다. 달리 특정되지 않으면, 본원에서 사용되는 바와 같이 scFv는 VL 및 VH 가변 영역을 임의의 순서로 가질 수 있고, 예를 들어 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단부에 대해, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 또는 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.

[0065] 항체 또는 그의 항체 단편을 포함하는 본 발명의 CAR 조성물의 일부는 항원 결합 도메인이 예를 들어 단일 도메

인 항체 단편 (sdAb), 단일 쇠 항체 (scFv) 및 인간화 항체를 포함하는 인접 폴리펩티드 쇠의 일부로서 발현되는 다양한 형태로 존재할 수 있다 ([Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY]; [Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York]; [Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]; [Bird et al., 1988, Science 242:423-426]). 한 측면에서, 본 발명의 CAR 조성물의 항원 결합 도메인은 항체 단편을 포함한다. 추가의 측면에서, CAR은 scFv를 포함하는 항체 단편을 포함한다.

- [0066] 용어 "항체 중쇄"는 그의 천연 발생 입체형태로 항체 분자에 존재하고 항체가 속하는 클래스를 통상 결정하는, 폴리펩티드 쇠의 2개의 종류 중 더 큰 것을 의미한다.
- [0067] 용어 "항체 경쇄"는 그의 천연 발생 입체형태로 항체 분자에 존재하는 폴리펩티드 쇠의 2개의 종류 중 더 작은 것을 의미한다. 카파 (κ) 및 람다 (λ) 경쇄는 2개의 주요 항체 경쇄 이소형을 의미한다.
- [0068] 용어 "재조합 항체"는 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성된 항체, 예를 들어 박테리오파지 또는 효모 발현 시스템에 의해 발현된 항체를 나타낸다. 상기 용어는 또한 항체를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성된 항체를 의미하는 것으로 고려되어야 하고, 여기서 DNA 분자는 항체 단백질, 또는 항체를 특징하는 아미노산 서열을 발현하고, DNA 또는 아미노산 서열은 관련 기술분야에서 이용가능하고 잘 알려진 재조합 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 얻는다.
- [0069] 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자를 의미한다. 상기 면역 반응은 항체 생산, 또는 특이적 면역-적격 세포의 활성화, 또는 둘 모두를 수반할 수 있다. 통상의 기술자는 실질적으로 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원으로 기능할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래할 수 있다. 따라서, 통상의 기술자는 면역 반응을 유도하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가, 본원에서 사용되는 용어 "항원"을 코딩함을 이해할 것이다. 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 코딩될 필요는 없음을 이해할 것이다. 본 발명은 하나 초과 유전자의 부분적인 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하고 이로 제한되지 않으며, 이들 뉴클레오티드 서열은 목적하는 면역 반응을 유도하는 폴리펩티드를 코딩하기 위해 다양한 조합으로 배열됨이 분명하다. 또한, 통상의 기술자는 항원이 "유전자"에 의해 코딩될 필요는 없음을 이해할 것이다. 항원은 합성 방식으로 생성될 수 있거나 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있거나, 또는 폴리펩티드 이외의 거대분자일 수 있음이 분명하다. 그러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 다른 생물학적 성분을 갖는 체액을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0070] 용어 "항종양 효과"는 예를 들어, 종양 부피의 감소, 종양 세포의 수의 감소, 전이의 수의 감소, 기대 수명의 증가, 종양 세포 증식의 감소, 종양 세포 생존의 감소, 또는 암성 병태와 연관된 다양한 생리학적 증상의 개선을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 다양한 수단에 의해 나타내질 수 있는 생물학적 효과를 나타낸다. "항종양 효과"는 또한 먼저 종양 발생의 예방에서 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 능력에 의해 나타내질 수 있다.
- [0071] 용어 "자가"는 개체에게 재도입될 예정인, 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 나타낸다.
- [0072] 용어 "동종"은 물질이 도입되는 개체와 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 임의의 물질을 나타낸다. 둘 이상의 개체는 하나 이상의 유전자좌의 유전자가 동일하지 않을 때 서로 동종인 것으로 언급된다. 몇몇 측면에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종 물질은 항원과 상호작용하게는 유전적으로 충분히 상이할 수 있다.
- [0073] 용어 "이종"은 상이한 종의 동물로부터 유래하는 이식편을 의미한다.
- [0074] 용어 "암"은 이상 세포의 빠르고 제어되지 않은 성장을 특징으로 하는 질환을 나타낸다. 암세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산될 수 있다. 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부 암, 피부암, 췌장암, 결직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 암의 예가 본원에 기재된다.
- [0075] 문구 "CD19의 발현과 연관된 질환"은 CD19의 발현과 연관된 질환, 또는 예를 들어 증식성 질환, 예컨대 암 또는 악성종양 또는 전암성 병태, 예컨대 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병을 포함하는 CD19를 발현하는 세포와 연관된 병태; 또는 CD19를 발현하는 세포를 발현하는 비암 관련 적응증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 측면에서, CD19의 발현과 연관된 암은 혈액암이다. 한 측면에서, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다. 한 측면에서, CD19의 발현과 연관된 암은 예를 들어 B-세포 급성 림프성 백혈병 ("BALL"), T-세포 급성 림프성 백혈병 ("TALL"), 급성 림프성 백혈병 (ALL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 급성 백혈병;

예를 들어, 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 만성 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암 및 악성종양을 포함한다. CD19의 발현과 연관된 추가의 암 또는 혈액 병태는 예를 들어 B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨 림프종, 형질모구성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 골수성 혈액 세포의 비효과적인 생산 (또는 이형성)과 연관된 혈액 병태의 다양한 집단인 "전백혈병"을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CD19의 발현과 연관된 추가의 질환은 예를 들어, CD19의 발현과 연관된 비정형 및/또는 비전형 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CD19의 발현과 연관된 비-암 관련 적응증은 예를 들어, 자가면역 질환 (예를 들어, 루푸스), 염증성 장애 (알레르기 및 천식) 및 이식을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0076] 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체 또는 항체 단편의 결합 특징에 유의한 영향을 주거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 의미한다. 상기 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 관련 기술분야에 알려진 표준 기술, 예컨대 부위-지정 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발에 의해 본 발명의 항체 또는 항체 단편 내에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 교체된다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 관련 기술분야에서 규정되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 CAR 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 교체될 수 있고, 변경된 CAR은 본원에 설명된 기능성 검정을 이용하여 시험할 수 있다.

[0077] 용어 "자극"은 자극 분자 (예를 들어, TCR/CD3 복합체)가 그의 동족 리간드와 결합하여 신호 전달 사건, 비제한적인 예를 들어 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달을 매개함으로써 유도되는 1차 반응을 의미한다. 자극은 특정 분자의 변경된 발현, 예컨대 TGF- β 의 하향조절, 및/또는 세포골격 구조의 인식 등을 매개할 수 있다.

[0078] 용어 "자극 분자"는 T 세포 신호전달 경로의 적어도 몇몇 측면에 대한 자극 방식에서 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절하는 1차 세포질 신호전달 서열(들)을 제공하는 T 세포에 의해 발현되는 분자를 나타낸다. 한 측면에서, 1차 신호는 예를 들어 펩티드로 로딩된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 개시되고, 이것은 증식, 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 T 세포 반응을 매개한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열 (또한 "1차 신호전달 도메인"으로서 칭함)은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 본 발명에서 특히 유용한 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"로도 알려짐) 및 CD66d로부터 유래된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 특정 CAR에서, 본 발명의 임의의 하나 이상의 CAR 내의 세포내 신호전달 도메인은 세포내 신호전달 서열, 예를 들어 CD3-제타의 1차 신호전달 서열을 포함한다. 본 발명의 특정 CAR에서, CD3-제타의 1차 신호전달 서열은 서열 17로서 제공된 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기이다. 본 발명의 특정 CAR에서, CD3-제타의 1차 신호전달 서열은 서열 43에 제공된 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기이다.

[0079] 용어 "항원 제시 세포" 또는 "APC"는 그의 표면 상에 주요 조직적합성 복합체 (MHC)와 복합체화된 외래 항원을 보이는 면역계 세포, 예컨대 보조 세포 (예를 들어, B-세포, 수지상 세포 등)를 의미한다. T-세포는 그의 T-세포 수용체 (TCR)를 사용하여 상기 복합체를 인식하였다. APC는 항원을 처리하고, 이를 T-세포에 제시한다.

[0080] "세포내 신호전달 도메인"은 본원에서 사용되는 바와 같이, 분자의 세포내 부분을 의미한다. 세포내 신호전달 도메인은 CAR 함유 세포, 예를 들어 CART 세포의 면역 이펙터 기능을 촉진하는 신호를 생성한다. 예를 들어 CART 세포에서 면역 이펙터 기능의 예는 세포용해 활성 및 시토킨 분비를 포함하는 헬퍼 활성을 포함한다.

[0081] 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 1차 세포내 신호전달 도메인은 1차 자극, 또는 항원 의존성 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 공동자극 세포

내 신호전달 도메인은 공동자극 신호, 또는 항원 비의존성 자극을 담당하는 분자로부터 유래된 것을 포함한다. 예를 들어, CART의 경우에, 1차 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 수용체의 세포질 서열을 포함할 수 있고, 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공-수용체 또는 공동자극 분자로부터의 세포질 서열을 포함할 수 있다.

[0082] 1차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 CD3 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d DAP10 및 DAP12로부터 유래된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0083] 용어 "제타" 또는 대안적으로 "제타 쇠", "CD3-제타" 또는 "TCR-제타"는 진뱅크 수탁번호 BAG36664.1로서 제공된 단백질 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기로서 정의되고, "제타 자극 도메인" 또는 대안적으로 "CD3-제타 자극 도메인" 또는 "TCR-제타 자극 도메인"은 T 세포 활성화를 위해 필요한 초기 신호를 기능적으로 전달하기에 충분한 제타 쇠의 세포질 도메인으로부터의 아미노산 잔기로서 규정된다. 한 측면에서, 제타의 세포질 도메인은 진뱅크 수탁번호 BAG36664.1의 잔기 52 내지 164, 또는 그의 기능성 오르토포그인 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기를 포함한다. 한 측면에서, "제타 자극 도메인" 또는 "CD3-제타 자극 도메인"은 서열 17로서 제공된 서열이다. 한 측면에서, "제타 자극 도메인" 또는 "CD3-제타 자극 도메인"은 서열 43으로서 제공된 서열이다.

[0084] 용어 "공동자극 분자"는 공동자극 리간드에 특이적으로 결합하여, 예컨대 증식을 포함하나 이에 제한되지는 않는 T 세포에 의한 공동자극 반응을 매개하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 의미한다. 공동자극 분자는 효율적인 면역 반응에 필요한 항원 수용체 이외의 다른 세포 표면 분자 또는 그의 리간드이다. 공동자극 분자는 MHC 클래스 I 분자, BTLA 및 To11 리간드 수용체, 및 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0085] 공동자극 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 분자의 세포내 부분일 수 있다. 공동자극 분자는 다음 단백질 패밀리에 표시될 수 있다: TNF 수용체 단백질, 이뮤노글로불린-유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구성 활성화 분자 (SLAM 단백질), 및 활성화 NK 세포 수용체. 상기 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFTR, HVEM, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, Nkp80, CD160, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다.

[0086] 세포내 신호전달 도메인은 그가 유래되는 분자의 전체 세포내 부분, 또는 전체 천연 세포내 신호전달 도메인, 또는 그의 기능성 단편을 포함할 수 있다.

[0087] 용어 "4-1BB"는 진뱅크 수탁번호 AAA62478.2로서 제공된 아미노산 서열, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기를 갖는 TNFR 수퍼패밀리의 구성원을 의미하고; "4-1BB 공동자극 도메인"은 진뱅크 수탁번호 AAA62478.2의 아미노산 잔기 214-255, 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기로서 규정된다. 한 측면에서, "4-1BB 공동자극 도메인"은 서열 16으로 제공된 서열 또는 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 동등한 잔기이다.

[0088] 용어 "코딩하는"은 뉴클레오타이드 (예를 들어, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 규정된 서열 또는 아미노산의 규정된 서열 및 그에 따른 생물학적 특성을 갖는, 생물학적 과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 기능하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA 내의 뉴클레오타이드의 특정 서열의 고유한 특성을 의미한다. 따라서, 유전자, cDNA, 또는 RNA는 해당 유전자에 대응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생산할 경우 단백질을 코딩한다. 그의 뉴클레오타이드 서열이 mRNA 서열에 동일하고 대체로 서열 목록에 제시되는 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비-코딩 가닥 둘 모두는 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 코딩하는 것으로 언급될 수 있다.

[0089] 달리 특정되지 않으면, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은, 서로 축중성 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 문구 "단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은 또한 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 몇몇 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 포함한다.

[0090] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 본원에 설명된 바와 같이 특정 생물학적 결과를 달성하기 위해 효과적인 화합물, 제제, 물질, 또는 조성물의 양을 의미한다.

[0091] 용어 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 유래하거나 또는 이 내부에서 생산된 임의의 물질을

의미한다.

- [0092] 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 외부로부터 도입되거나 외부에서 생산된 임의의 물질을 의미한다.
- [0093] 용어 "발현"은 프로모터에 의해 유도되는 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역을 의미한다.
- [0094] 용어 "전달 벡터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포의 내부에 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 조성물을 의미한다. 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 회합된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 및 바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는 많은 벡터가 관련 기술분야에 알려져 있다. 따라서, 용어 "전달 벡터"는 자율 복제하는 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한 핵산의 세포 내로의 전달을 용이하게 하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물, 예컨대 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 추가로 포함함을 고려하여야 한다. 바이러스 전달 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0095] 용어 "발현 벡터"는 발현시킬 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 의미한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스 작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 코스미드, 플라스미드 (예를 들어, 네이키드 또는 리포솜 내에 포함된) 및 바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-연관 바이러스)를 포함하는 관련 기술분야에 알려진 모든 것을 포함한다.
- [0096] 용어 "렌티바이러스"는 레트로바이러스 과의 속을 의미한다. 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 특유한 것이고; 유의한 양의 유전 정보를 숙주 세포의 DNA 내로 전달할 수 있고; 따라서 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중의 하나이다. HIV, SIV, 및 FIV가 렌티바이러스의 모든 예이다.
- [0097] 용어 "렌티바이러스 벡터"는 특히 문헌 [Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]에서 제시되는 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 계통의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 의미한다. 임상에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는 예를 들어 렌티벡터(LENTIVECTOR)® 유전자 전달 기술 (옥스포드 바이오메디카(Oxford BioMedica), 렌티맥스(LENTIMAX)TM 벡터 시스템 (렌티젠(Lentigen)) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비임상 종류의 렌티바이러스 벡터가 또한 이용가능하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 알려져 있을 것이다.
- [0098] 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 2개의 중합체 분자 사이, 예를 들어 2개의 핵산 분자, 예컨대, 2개의 DNA 분자 또는 2개의 RNA 분자 사이, 또는 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 서브유닛 서열 동일성을 의미한다. 2개의 분자 내의 서브유닛 위치가 동일한 단량체 서브유닛에 의해 점유될 경우; 예를 들어, 각각의 2개의 DNA 분자 내의 위치가 아데닌에 의해 점유될 경우, 이들은 그 위치에서 상동성이거나 동일하다. 2개의 서열 사이의 상동성은 일치하는 또는 상동성 위치의 수의 직접적인 함수이고; 예를 들어, 2개의 서열 내의 위치의 1/2 (예를 들어, 10개 서브유닛 중합체 길이 내의 5개의 위치)이 상동성일 경우, 2개의 서열은 50% 상동성이고; 90%의 위치 (예를 들어, 10개 중 9개)가 일치하거나 상동성일 경우, 2개의 서열은 90% 상동성이다.
- [0099] 비-인간 (예를 들어, 뮌) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 쇄 또는 그의 단편 (예컨대 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 대개, 인간화 항체 및 그의 단편은 수용자의 상보성-결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 비-인간 중 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 랫트 또는 토끼의 CDR의 잔기로 교체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체 또는 항체 단편)이다. 몇몇 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 교체된다. 또한, 인간화 항체/항체 단편은 수용자 항체 및 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 상기 변형은 항체 또는 항체 단편 성능을 보다 개선하고 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체 또는 그의 항체 단편은 적어도 하나의, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 대응하고, FR 영역의 모든 또는 유의한 부분은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체 또는 항체 단편은 또한 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것을 포함할 수 있다. 추가의 상세한 내용에 대해서는, 문헌 [Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986]; [Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988]; [Presta, Curr.

Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992]을 참조한다.

- [0100] "완전한 인간"은 전체 분자가 인간에서 기원하거나 또는 항체 또는 이뮤노글로불린의 인간 형태와 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 이뮤노글로불린, 예컨대 항체 또는 항체 단편을 지칭한다.
- [0101] 용어 "단리된"은 천연 상태에서부터 변경되거나 제거됨을 의미한다. 예를 들어, 생존 동물에 천연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그의 천연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는 예를 들어 숙주 세포와 같은 비-천연 환경에 존재할 수 있다.
- [0102] 본 발명의 문맥에서, 통상적으로 발생하는 핵산에 대한 다음 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 나타내고, "C"는 시토신을 나타내고, "G"는 구아노신을 나타내고, "T"는 티미딘을 나타내고, "U"는 우리딘을 나타낸다.
- [0103] 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 "전사 제어"는 이중성 핵산 서열의 발현을 유도하는, 조절 서열과 이중성 핵산 서열 사이의 기능성 연결을 의미한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열은 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능성 관계로 위치할 때 제2 핵산 서열과 작동가능하게 연결된 것이다. 예를 들어, 프로모터는 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 준다면 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 서로 인접할 수 있고, 예를 들어 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하기 위해 필요한 경우, 동일한 판독 프레임으로 존재한다.
- [0104] 용어 면역원 조성물의 "비경구" 투여는 예를 들어, 피하 (s.c), 정맥내 (i.v.), 근육내 (i.m.), 또는 흉골내 주사, 종양내, 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0105] 용어 "핵산"또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 그의 중합체를 의미한다. 구체적으로 제한되지 않으면, 이 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 천연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 알려진 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 지시하지 않으면, 특정 핵산 서열은 또한 명시적으로 나타낸 서열뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축중성 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP, 및 상보성 서열을 함축적으로 포함한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 ([Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991)]; [Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)]; 및 [Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)]).
- [0106] 용어 "펩티드", "폴리펩티드", 및 "단백질"은 상호교환가능하게 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유 연결된 아미노산 잔기를 포함하는 화합물을 의미한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 포함하여야 하고, 단백질 또는 펩티드 서열을 이룰 수 있는 아미노산의 최대 수에 대한 제한은 존재하지 않는다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 이 용어는 관련 기술분야에서 예를 들어 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 통상적으로 언급되는 짧은 쇠 및 많은 종류가 존재하는, 일반적으로 관련 기술분야에서 단백질로 언급되는 더 긴 쇠 둘 모두를 의미한다. "폴리펩티드"는 특히 예를 들어, 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동성 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 의미한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0107] 용어 "프로모터"는 폴리뉴클레오티드 서열의 특이적 전사를 개시하기 위해 필요한, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열을 의미한다.
- [0108] 용어 "프로모터/조절 서열"은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 산물의 발현을 위해 필요한 핵산 서열을 의미한다. 몇몇 경우에, 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 예에서, 이 서열은 또한 인핸서 서열, 및 유전자 산물의 발현을 위해 요구되는 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은 예를 들어 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.
- [0109] 용어 "구성적" 프로모터는 유전자 산물을 코딩하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결될 때, 유전자 산물이 세포의 대부분의 또는 모든 생리학적 조건 하에 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다.
- [0110] 용어 "유도가능" 프로모터는 유전자 산물을 코딩하거나 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결될 때, 실질적으로 프로모터에 대응하는 인두서가 세포에 존재할 때에만 유전자 산물이 세포에서 생성되도록 하는 뉴클

레오티드 서열을 의미한다.

- [0111] 용어 "조직-특이적" 프로모터는 유전자에 의해 코딩되거나 특정되는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결될 때, 실질적으로 세포가 프로모터에 대응하는 조직 종류의 세포인 경우에만 유전자 산물이 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다.
- [0112] scFv의 측면에서 사용되는 바와 같이, 용어 "가요성 폴리펩티드 링커" 또는 "링커"는 가변 중쇄 및 가변 경쇄 영역을 함께 연결하기 위해 단독으로 또는 조합되어 사용되는 아미노산, 예컨대 글리신 및/또는 세린 잔기로 이루어진 펩티드 링커를 의미한다. 한 실시양태에서, 가요성 폴리펩티드 링커는 Gly/Ser 링커이고, 아미노산 서열 (Gly-Gly-Gly-Ser)_n을 포함하고, 여기서 n은 1과 동일하거나 1을 초과하는 양의 정수이다. 예를 들어, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 및 n=6, n=7, n=8, n=9 및 n=10 (서열 105)이다. 한 실시양태에서, 가요성 폴리펩티드 링커는 (Gly₄Ser)₄ (서열 106) 또는 (Gly₄Ser)₃ (서열 107)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 실시양태에서, 링커는 (Gly₂Ser), (GlySer) 또는 (Gly₃Ser)의 다수의 반복체 (서열 108)를 포함한다. 또한, 본원에 참조로 포함되는 WO2012/138475에 설명된 링커도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0113] 본원에서 사용되는 바와 같이, 5' 캡 (RNA 캡, RNA 7-메틸구아노신 캡 또는 RNA m⁷G 캡으로도 불림)은 전사 출발 직후에 진행 메신저 RNA의 "전면" 또는 5' 말단부에 부가된 변형된 구아닌 뉴클레오티드이다. 5' 캡은 제1 전사되는 뉴클레오티드에 연결된 말단기로 이루어진다. 그의 존재는 리보솜에 의한 인식 및 RNase로부터의 보호를 위해 매우 중요하다. 캡 부가는 전사와 연관되고, 서로 영향을 주도록 동시 전사 방식으로 발생한다. 전사 출발 직후에, 합성되는 mRNA의 5' 말단부는 RNA 폴리머라제와 회합된 캡-합성 복합체에 의해 결합된다. 상기 효소 복합체는 mRNA 캡핑에 필요한 화학 반응을 촉매한다. 합성은 다단계 생화학 반응으로서 진행된다. 캡핑 모이어티는 mRNA의 기능성, 예컨대 그의 안정성 또는 번역 효율을 조정하도록 변형될 수 있다.
- [0114] 본원에서 사용되는 바와 같이, "시험관내 전사된 RNA"는 시험관내에서 합성된 RNA, 바람직하게는 mRNA를 의미한다. 일반적으로, 시험관내 전사된 RNA는 시험관내 전사 벡터로부터 생성된다. 시험관내 전사 벡터는 시험관내 전사된 RNA를 생성하기 위해 사용되는 주형을 포함한다.
- [0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리(A)"는 폴리아데닐화에 의해 mRNA 부착된 일련의 아데노신이다. 일시적 발현을 위한 구축물의 바람직한 실시양태에서, 폴리A는 50 내지 5000개 (서열 109), 바람직하게는 64개 초과, 보다 바람직하게는 100개 초과, 가장 바람직하게는 300 또는 400개 초과이다. 폴리(A) 서열은 mRNA 기능성, 예컨대 국제화, 안정성 또는 번역 효율을 조정하기 위해 화학적으로 또는 효소에 의해 변형된다.
- [0116] 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리아데닐화"는 폴리아데닐일 모이어티, 또는 그의 변형된 변이체의 메신저 RNA 분자에 대한 공유 연결을 의미한다. 진행 유기체 내에서, 대부분의 메신저 RNA (mRNA) 분자는 3' 말단에서 폴리아데닐화된다. 3' 폴리(A) 테일은 효소 폴리아데닐레이트 폴리머라제의 작용을 통해 프리-mRNA에 부가된 아데닌 뉴클레오티드 (종종 수백 개)의 긴 서열이다. 고등 진핵세포에서, 폴리(A) 테일은 특정 서열, 즉 폴리아데닐화 신호를 포함하는 전사체 상에 부가된다. 폴리(A) 테일 및 그에 결합된 단백질은 mRNA를 엑소뉴클레아제에 의한 분해로부터 보호하는 것을 돕는다. 폴리아데닐화는 또한 전사 종결, mRNA의 핵으로부터의 외수송, 및 번역에도 중요하다. 폴리아데닐화는 DNA의 RNA로의 전사 직후에 핵에서 발생하지만, 추가로 세포질에서 추후 발생할 수도 있다. 전사가 종결된 후에, mRNA는 RNA 폴리머라제와 연관된 엔도뉴클레아제 복합체의 작용을 통해 절단된다. 절단 부위는 대체로 절단 부위 근처의 염기 서열 AAUAAA의 존재를 특징으로 한다. mRNA가 절단된 후에, 아데노신 잔기는 절단 부위의 자유 3' 단부에 부가된다.
- [0117] 본원에서 사용되는 바와 같이, "일시적"은 수 시간, 수 일 또는 수 주의 기간 동안 비-통합된 도입유전자의 발현을 나타내고, 여기서 발현 기간은 계능 내로 통합되거나 숙주 세포 내의 안정한 플라스미드 레플리콘 내에 포함될 경우 유전자의 발현을 위한 시간 미만이다.
- [0118] 용어 "신호 전달 경로"는 신호를 세포의 한 부분으로부터 세포의 또 다른 부분으로 전달할 때 기능하는 다양한 신호 전달 분자 사이의 생화학적 관계를 의미한다. 문구 "세포 표면 수용체"는 신호를 받고 신호를 세포막을 가로질러 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다.
- [0119] 용어 "대상체"는 면역 반응이 유도될 수 있는 생존 유기체 (예를 들어, 포유동물, 인간)를 포함하고자 의도된다.
- [0120] 용어 "실질적으로 정제된" 세포는 다른 세포 종류가 본질적으로 없는 세포를 나타낸다. 실질적으로 정제된 세

포는 또한 정상적으로는 그의 천연 발생 상태와 회합되는 다른 세포 종류로부터 분리된 세포를 의미한다. 몇몇 경우에, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 균질한 세포 집단을 의미한다. 다른 예에서, 이 용어는 단순히 천연적으로 그의 천연 상태와 회합되는 세포로부터 분리된 세포를 의미한다. 몇몇 측면에서, 세포는 시험관내에서 배양된다. 다른 측면에서, 세포는 시험관내에서 배양된다.

[0121] 용어 "치료"는 본원에서 사용되는 바와 같이 치료를 의미한다. 치료 효과는 질환 상태의 감소, 억제, 진정, 또는 근절에 의해 달성한다.

[0122] 용어 "예방" 본원에서 사용되는 바와 같이 질환 또는 질환 상태의 방지 또는 보호적 치료를 의미한다.

[0123] 본 발명의 문맥에서, "종양 항원" 또는 "과증식성 장애 항원" 또는 "과증식성 장애와 연관된 항원"은 특정 과증식성 장애에 공통적인 항원을 의미한다. 특정 측면에서, 본 발명의 과증식성 장애 항원은 원발성 또는 전이성 흑색종, 흉선종, 림프종, 육종, 폐암, 간암, 비-호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 자궁암, 자궁경부암, 방광암, 신장암 및 선암종, 예컨대 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장 암 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 암으로부터 유래된다.

[0124] 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염된, 형질전환된 또는 형질도입된 세포이다. 세포는 1차 대상체 세포 및 그의 자손체를 포함한다.

[0125] 용어 "특이적으로 결합하는"은 샘플에 존재하는 동족 결합 파트너 (예를 들어, T 세포 상에 존재하는 자극 및/또는 공동자극 분자) 단백질을 인식하고 결합하지만 샘플 내의 다른 분자는 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체, 또는 리간드를 의미한다.

[0126] 범위: 본원 전체에서, 본 발명의 다양한 측면은 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지 편의 및 간결함을 위한 것임을 이해하여야 하고, 본 발명의 범위에 대한 불변의 제한으로서 생각되지 않아야 한다. 따라서, 범위의 설명은 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위범위 및 범위 내의 개별 수치 값을 갖는 것으로 고려되어야 한다. 예를 들어, 범위, 예컨대 1 내지 6의 설명은 구체적으로 개시된 하위범위, 예컨대 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등, 및 그 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 갖는 것으로 고려되어야 한다. 또 다른 예로서, 95-99% 동일성과 같은 범위는 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 것을 포함하고, 하위범위, 예컨대 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% 및 98-99% 동일성을 포함한다. 이것은 범위의 폭에 상관없이 적용된다.

[0127] **설명**

[0128] 인간화 항-CD19 키메라 항원 수용체 (CAR)를 사용하여 질환, 예컨대 암의 치료를 위해 사용하는 물질의 조성물 및 방법을 본원에 제공한다.

[0129] 한 측면에서, 본 발명은 CD19 단백질에 대한 향상된 결합을 위해 조작된 항체 또는 항체 단편을 포함하는 많은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 CAR을 발현하도록 조작된 세포 (예를 들어, T 세포)를 제공하고, 여기서 CAR T 세포 ("CART")는 항종양 특성을 보인다. 한 측면에서, 세포는 CAR로 형질전환되고, CAR은 세포 표면 상에 발현된다. 몇몇 실시양태에서, 세포 (예를 들어, T 세포)는 CAR을 코당하는 바이러스 벡터로 형질도입된다. 몇몇 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 몇몇 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 몇몇 상기 실시양태에서, 세포는 CAR을 안정하게 발현할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 (예를 들어, T 세포)는 CAR을 코당하는 핵산, 예를 들어 mRNA, cDNA, DNA로 형질감염된다. 몇몇 상기 실시양태에서, 세포는 CAR을 일시적으로 발현할 수 있다.

[0130] 한 측면에서, CAR의 항-CD19 단백질 결합 부분은 scFv 항체 단편이다. 한 측면에서, 상기 항체 단편은 동등한 결합 친화도를 보유하는, 예를 들어 그 단편이 유래되는 IgG 항체와 대등한 효능으로 동일한 항원에 결합한다는 점에서 기능성이다. 한 측면에서, 상기 항체 단편은 통상의 기술자가 이해할 바와 같이 면역 반응의 활성화, 그의 표적 항원으로부터 신호-전달 개시의 억제, 키나제 활성의 억제 등을 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는 생물학적 반응을 제공한다는 점에서 기능성이다. 한 측면에서, CAR의 항-CD19 항원 결합 도메인은 그가 유래되는 scFv의 무린 서열에 비해 인간화 scFv 항체 단편이다. 한 측면에서, 무린 scFv 서열은 PCT 공개 WO2012/079000에 제시되고 본원에서 서열 58로 제시되는 CAR19 구축물이다.

[0131] 일부 측면에서, 본 발명의 항체는 키메라 항원 수용체 (CAR) 내로 도입된다. 한 측면에서, CAR은 PCT 공개 WO2012/079000에 서열 12로 제시되고 본원에서 서열 58로 제시되는 폴리펩티드 서열을 포함하고, 여기서 scFv

도메인은 서열 1-12로부터 선택된 하나 이상의 서열로 치환된다. 한 측면에서, 서열 1-12의 scFv 도메인은 인간 CD19에 특이적으로 결합하는 뮤린 기원의 scFv 단편인 서열 59의 scFv 도메인의 인간화 변이체이다. 상기 마우스 scFv의 인간화는 마우스-특이적 잔기가 CART19 치료, 예를 들어 CAR19 구축물을 형질도입한 T 세포를 사용한 치료를 받는 환자에서 인간-항-마우스 항원 (HAMA) 반응을 유도할 수 있는 임상 상황에서 요구될 수 있다.

[0132] 한 측면에서, 본 발명의 CAR의 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 인간화 scFv 부분은 그의 서열이 포유동물 세포 내에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 도입유전자에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 본 발명의 전체 CAR 구축물은 그의 전체 서열이 포유동물 세포 내에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 도입유전자에 의해 코딩된다. 코돈 최적화는 코딩 DNA 내의 동의어 코돈 (즉, 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈)의 발생 빈도가 상이한 종에서 편향된다는 발견을 나타낸다. 상기 코돈 축증성은 동일한 폴리펩티드가 다양한 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있도록 한다. 다양한 코돈 최적화 방법이 관련 기술분야에 알려져 있고, 예를 들어 적어도 US 특허 5,786,464 및 6,114,148에 개시된 방법을 포함한다.

[0133] 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 1에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 2에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 3에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 4에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 5에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 6에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 7에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 8에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 9에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 10에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 11에 제시된 scFv 부분을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR19는 서열 12에 제시된 scFv 부분을 포함한다.

[0134] 한 측면에서, 본 발명의 CAR은 특정 항체의 항원 결합 도메인을 세포내 신호전달 분자와 조합한다. 예를 들어, 몇몇 측면에서, 세포내 신호전달 분자는 CD3-제타 체, 4-1BB 및 CD28 신호전달 모듈 및 이들의 조합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 CD19에 결합한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 31-42 중 하나 이상에 제시된 서열로부터 선택된 CAR을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 31에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 32에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 33에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 34에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 35에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 36에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 37에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 38에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 39에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 40에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 41에 제시된 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD19 CAR은 서열 42에 제시된 서열을 포함한다.

[0135] 또한, 본 발명은 CD19 CAR 조성물 및 그의 의약에서의 용도 또는 다른 질환 중에서, CD19를 발현하는 세포 또는 조직을 수반하는 암 또는 임의의 악성종양 또는 자가면역 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0136] 한 측면에서, 본 발명의 CAR은 CD19-발현 정상 세포를 근절시키기 위해 사용될 수 있고, 이에 의해 세포 이식 전에 세포 조건화 요법으로서 사용하기 위해 적용될 수 있다. 한 측면에서, CD19-발현 정상 세포는 CD19-발현 정상 줄기세포이고, 세포 이식은 줄기세포 이식이다.

[0137] 한 측면에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 조작된 세포 (예를 들어, T 세포)를 제공하고, 여기서 CAR T 세포 ("CART")는 항종양 특성을 보인다. 바람직한 항원은 CD19이다. 한 측면에서, CAR의 항원 결합 도메인은 부분적으로 인간화 항-CD19 항체 단편을 포함한다. 한 측면에서, CAR의 항원 결합 도메인은 scFv를 포함하는 부분적으로 인간화 항-CD19 항체 단편을 포함한다. 따라서, 본 발명은 인간화 항-CD19 결합 도메인을 포함하고 T 세포 내로 조작된 CD19-CAR 및 입양 요법을 위한 그의 사용 방법을 제공한다.

[0138] 한 측면에서, CD19-CAR은 CD137 (4-1BB) 신호전달 도메인, CD28 신호전달 도메인, CD3제타 신호 도메인, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함한다. 한 측면에서, CD19-CAR은 CD137 (4-1BB) 또는 CD28 이외의 하나 이상의 공동-자극 분자(들)로부터의 적어도 하나의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0139] **키메라 항원 수용체 (CAR)**

[0140] 본 발명은 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 DNA 구축물을 포함하고, 여기서 CAR은 CD19, 예를 들어 인간 CD19에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 단편을 포함하고, 항체 단편의 서열은 세포내 신호전달 도메인을 코딩

하는 핵산 서열과 동일한 판독 프레임으로 인접하여 위치한다. 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 신호전달 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 제타 쇄를 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 도메인은 공동자극 분자의 세포내 도메인의 적어도 일부를 포함하는 CAR의 일부를 의미한다.

[0141] 구체적인 측면에서, 본 발명의 CAR 구축물은 서열 1-12로 이루어진 군으로부터 선택된 scFv 도메인을 포함하고, 여기서 scFv는 그 앞에 예컨대 서열 13에 제시된 선택적인 리더 서열이 존재하고, 예컨대 서열 14 또는 서열 45 또는 서열 47 또는 서열 49에 제시된 선택적인 힌지 서열, 예컨대 서열 15에 제시된 막횡단 영역, 서열 16 또는 서열 51을 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 서열 17 또는 서열 43을 포함하는 CD3 제타 서열이 그 뒤에 존재하고, 여기서 도메인들은 인접하여 동일한 판독 프레임으로 존재하여 단일 융합 단백질을 형성한다. 또한, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 각각의 scFv 단편의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 본 발명에 포함된다. 또한, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 각각의 scFv 단편, 및 서열 13-17의 각각의 도메인, 및 본 발명의 코딩된 CD19CAR 융합 단백질의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 본 발명에 포함된다. 한 측면에서, 예시적인 CD19CAR 구축물은 선택적인 리더 서열, 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막횡단 도메인, 및 세포내 자극 도메인을 포함한다. 한 측면에서, 예시적인 CD19CAR 구축물은 선택적인 리더 서열, 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막횡단 도메인, 세포내 공동자극 도메인 및 세포내 자극 도메인을 포함한다. 본 발명의 인간화 scFv 도메인을 포함하는 특이적 CD19 CAR 구축물은 서열 31-42로서 제시된다.

[0142] 전장 CAR 서열을 또한 표 3에 제공된 바와 같이 서열 31-42로서 본원에 제공한다.

[0143] 예시적인 리더 서열은 서열 13으로서 제시된다. 예시적인 힌지/스페이서 서열은 서열 14 또는 서열 45 또는 서열 47 또는 서열 49로서 제시된다. 예시적인 막횡단 도메인 서열은 서열 15로서 제시된다. 4-1BB 단백질의 세포내 신호전달 도메인의 예시적인 서열은 서열 16으로서 제시된다. CD27의 세포내 신호전달 도메인의 예시적인 서열은 서열 51로서 제시된다. 예시적인 CD3제타 도메인 서열은 서열 17 또는 서열 43으로서 제공된다.

[0144] 한 측면에서, 본 발명은 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 핵산 구축물을 포함하고, 여기서 핵산 분자는 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열과 인접하여 동일한 판독 프레임으로 존재하는, 예를 들어 본원에 설명된 항-CD19 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 1-12 중 하나 이상으로부터 선택된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 61-72 중 하나 이상에서 제시되는 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 61의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 62의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 63의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 64의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 65의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 66의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 67의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 68의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 69의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 70의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 71의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 서열 72의 뉴클레오티드 잔기 64 내지 813에 의해 코딩된다.

[0145] 한 측면에서, 본 발명은 CAR을 코딩하는 도입유전자를 포함하는 재조합 핵산 구축물을 포함하고, 여기서 핵산 분자는 서열 61-72 중 하나 이상으로부터 선택된 항-CD19 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 서열은 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열과 인접하여 동일한 판독 프레임으로 존재한다. CAR에 사용될 수 있는 예시적인 세포내 신호전달 도메인은 예를 들어 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 몇몇 경우에, CAR은 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 85-96 중 하나 이상으로부터 선택된다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 85이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 86이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 87이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 88이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 89이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 90이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 91이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 92이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 93이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 94

이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 95이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 96이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 97이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 98이다. 한 측면에서, CAR 구축물의 핵산 서열은 서열 99이다.

[0146] 목적하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 관련 기술분야에 공지된 재조합 방법을 이용하여, 예를 들어 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝함으로써, 이를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 유전자를 유도함으로써, 또는 표준 기술을 사용하여 이를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 얻을 수 있다. 대안적으로, 관심 있는 핵산은 클로닝이 아니라 합성에 의해 생산될 수 있다.

[0147] 본 발명은 세포 내로 직접 형질도입될 수 있는 CAR을 발현하는 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 구축물을 포함한다.

[0148] 본 발명은 또한 세포 내로 직접 형질감염될 수 있는 RNA 구축물을 포함한다. 형질감염에서 사용하기 위한 mRNA를 생성하는 방법은 특수하게 설계된 프라이머를 사용한 주형의 시험관내 전사 (IVT), 이어서 폴리A 첨가에 의해, 3' 및 5' 비번역 서열 ("UTR"), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 도입 부위 (IRES), 발현시킬 핵산, 및 폴리A 테일을 포함하는, 전형적으로 50-2000개 염기 길이의 구축물 (서열 118)을 생산하는 것을 수반한다. 이와 같이 생산된 RNA는 상이한 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 주형은 CAR에 대한 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, RNA CAR 벡터는 전기천공에 의해 T 세포 내로 형질도입된다.

[0149] 항원 결합 도메인

[0150] 한 측면에서, 본 발명의 CAR은 항원 결합 도메인으로도 언급되는 표적-특이적 결합 요소를 포함한다. 모이어티의 선택은 표적 세포의 표면을 규정하는 리간드의 종류 및 수에 따라 결정된다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 특정 질환 상태와 연관된 표적 세포 상에서 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서, 본 발명의 CAR 내의 항원 결합 도메인에 대한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예는 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염, 자가면역 질환 및 암세포와 연관된 것을 포함한다.

[0151] 한 측면에서, CAR-매개 T-세포 반응은 요구되는 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 CAR 내로 조작함으로써 관심 있는 항원으로 유도될 수 있다.

[0152] 한 측면에서, 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR의 부분은 CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 인간 CD19를 표적으로 한다. 한 측면에서, CAR의 항원 결합 도메인은 문헌 [Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17):1157-1165 (1997)]에 기재된 FMC63 scFv 단편과 동일하거나 유사한 결합 특이성을 갖는다.

[0153] 항원 결합 도메인은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 재조합 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 및 단일-도메인 항체, 예컨대 중쇄 가변 도메인 (VH), 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 낙타류 유래 나노바디의 가변 도메인 (VHH)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 그의 기능성 단편, 및 항원 결합 도메인으로 기능하는 것으로 관련 기술분야에 알려진 대체 스캐폴드, 예컨대 재조합 피브로넥틴 도메인 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 항원에 결합하는 임의의 도메인일 수 있다. 몇몇 경우에, 항원 결합 도메인이, CAR이 최종적으로 사용될 종과 동일한 종으로부터 유래하는 것이 유용하다. 예를 들어, 인간에서 사용하기 위해서, CAR의 항원 결합 도메인은 항체 또는 항체 단편의 항원 결합 도메인에 대해 인간 또는 인간화 잔기를 포함하는 것이 유용할 수 있다.

[0154] 따라서, 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 인간화 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두), 및/또는 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하고, 예를 들어 인간화 항-CD19 결합 도메인은 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 LC CDR 및 하나 이상의, 예를 들어 3개 모두의 HC CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 항-CD19 결합 도메인의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2) 및 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 중 하나 이상 (예를 들어, 3개 모두)을 포함하고, 예를 들어 인간화 항-CD19 결합 도메인은 각각 본원에 설명된 HC CDR1, HC CDR2 및 HC CDR3을 포함하는 2개의 가변 중쇄 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 경쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의) 및/또는 본원에 기재된 인간화 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의)을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 인간화 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의), 예를 들어 적어도 2개의 본원에 기재된

인간화 중쇄 가변 영역 (예를 들어, 표 3 내의)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인은 표 3의 아미노산 서열의 경쇄 및 중쇄를 포함하는 scFv이다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인 (예를 들어, scFv)은 다음을 포함한다: 표 3에 제공된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 3의 아미노산 서열과 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는 표 3에 제공된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형 (예를 들어, 치환) 내지 30, 20 또는 10개 이하의 변형 (예를 들어, 치환)을 갖는 아미노산 서열, 또는 표 3의 아미노산 서열에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 서열 61, 서열 62, 서열 63, 서열 64, 서열 65, 서열 66, 서열 67, 서열 68, 서열 70, 서열 71 및 서열 72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 scFv이고, 본원에 기재된, 예를 들어 표 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역은 링커, 예를 들어 본원에 기재된 링커를 통해 본원에 기재된, 예를 들어 표 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역에 부착된다. 한 실시양태에서, 인간화 항-CD19 결합 도메인은 (Gly₄-Ser)_n 링커를 포함하고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6, 바람직하게는 3 또는 4이다 (서열 53). scFv의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역은 예를 들어 임의의 다음 배향으로 존재할 수 있다: 경쇄 가변 영역-링커-중쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역-링커-경쇄 가변 영역.

[0155] 한 측면에서, 항원 결합 도메인 부분은 서열 1-12로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함한다. 한 측면에서, 인간화 CAR은 서열 31-42로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함한다. 몇몇 측면에서, 비-인간 항체는 인간화 항체로서, 항체의 특정 서열 또는 영역이 인간에서 천연적으로 생산되는 항체 또는 그의 단편에 대한 유사성을 증가시키도록 변형된다. 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 인간화된다.

[0156] 인간화 항체는 CDR-그라프팅 (예를 들어, 각각 그 전부가 본원에 참조로 포함된 유럽 특허 EP 239,400; 국제 특허 출원 공개 WO 91/09967; 및 미국 특허 5,225,539, 5,530,101, 및 5,585,089 참조), 베니어링 또는 표면 재구성 (예를 들어, 각각 그 전부가 본원에 참조로 포함된 유럽 특허 EP 592,106 및 EP 519,596; [Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498]; [Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814]; 및 [Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973] 참조), 쇄 서플링 (예를 들어, 그 전부가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 5,565,332 참조), 및 예를 들어, 각각 그 전부가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 출원 공개 US2005/0042664, 미국 특허 출원 공개 US2005/0048617, 미국 특허 6,407,213, 미국 특허 5,766,886, 국제 특허 출원 공개 WO 9317105, 문헌 [Tan et al., J. Immunol., 169: 1119-25 (2002)], [Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000)], [Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000)], [Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16): 10678-84 (1997)], [Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996)], [Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995)], [Couto et al., Cancer Res., 55(8): 1717-22 (1995)], [Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)], 및 [Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)]에 개시된 기술을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 종종, 프레임워크 영역 내의 프레임워크 잔기는 항원 결합을 변경하기 위해, 예를 들어 개선하기 위해 CDR 공여자 항체로부터의 대응하는 잔기로 치환될 것이다. 상기 프레임워크 치환은 관련 기술분야에 잘 공지된 방법, 예를 들어 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 CDR과 프레임워크 잔기의 상호작용의 모델링 및 흔히 않은 특정 위치에서 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인될 수 있다 (예를 들어, 그 전부가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 5,585,089 (Queen et al.); 및 [Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323] 참조).

[0157] 인간화 항체 또는 항체 단편은 비인간인 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 그 내에 존재한다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종 "도입" 잔기로 언급되고, 전형적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 유래된다. 본원에서 제시되는 바와 같이, 인간화 항체 또는 항체 단편은 비인간 이뮤노글로불린 분자로부터의 하나 이상의 CDR 및 프레임워크 영역을 포함하고, 여기서 프레임워크를 포함하는 아미노산 잔기는 완전히 또는 대부분 인간 배선로부터 유래된다. 항체 또는 항체 단편의 인간화를 위한 다수의 기술은 관련 기술분야에 잘 알려져 있고, 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 대응하는 서열을 치환함으로써, 즉, CDR-그라프팅 (그 내용 전부가 본원에 참조로 포함된 EP 239,400; PCT 공개 WO 91/09967; 및 미국 특허 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640)에 의해 본질적으로 윈터(Winter)와 그의 동료들의 방법에 따라 수행될 수

있다 ([Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)]). 상기 인간화 항체 및 항체 단편에서, 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 부분이 비인간 종으로부터의 대응하는 서열에 의해 치환되었다. 인간화 항체는 종종 몇몇의 CDR 잔기 및 가능하게는 몇몇의 프레임워크 (FR) 잔기가 설치류 항체로부터의 유사한 부위에 의해 치환된 인간 항체이다. 항체 및 항체 단편의 인간화는 베니어링 또는 표면 재구성 (EP 592,106; EP 519,596; [Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498]; [Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994)]; 및 [Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)]) 또는 쇄 셔플링 (미국 특허 5,565,332)에 의해 달성될 수 있고, 상기 참고문헌의 내용은 그 전부가 본원에 참조로 포함된다.

[0158] 인간화 항체 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시킨다. 소위 "최적 맞춤" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열은 알려진 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 이어서, 설치류의 것과 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체를 위한 인간 프레임워크 (FR)로서 수용된다 (그 내용 전부가 본원에 참조로 포함된 문헌 [Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 여러 개의 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (예를 들어, 그 내용 전부가 본원에 참조로 포함된 [Nicholson et al. Mol. Immun. 34(16-17): 1157-1165 (1997)]; [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조). 몇몇 실시양태에서, 중쇄 가변 영역의 프레임워크 영역, 예를 들어 모든 4개의 프레임워크 영역은 VH4_4-59 배선 서열로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 프레임워크 영역은 예를 들어 상응하는 뮤린 서열 (예를 들어, 서열 58의)에서의 아미노산으로부터 1, 2, 3, 4 또는 5개의 변형, 예를 들어 치환을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역의 프레임워크 영역, 예를 들어 모든 4개의 프레임워크 영역은 VK3_1.25 배선 서열로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 프레임워크 영역은 예를 들어 상응하는 뮤린 서열 (예를 들어, 서열 58의)에서의 아미노산으로부터 1, 2, 3, 4 또는 5개의 변형, 예를 들어 치환을 포함할 수 있다.

[0159] 몇몇 측면에서, 항체 단편을 포함하는 본 발명의 CAR 조성물의 부분은 표적 항원에 대한 고친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 갖도록 인간화된다. 본 발명의 한 측면에 따르면, 인간화 항체 및 항체 단편은 모 및 인간화 서열의 3-차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물에 대한 분석 과정에 의해 제조된다. 3-차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 친숙하다. 컴퓨터 프로그램은 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3-차원 입체형태적 구조를 예시하고 디스플레이한다. 이들 디스플레이의 조사는 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할에 대한 분석, 예를 들어 후보 이뮤노글로불린의 표적 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 방식에서, FR 잔기는 목적하는 항체 또는 항체 단편 특징, 예컨대 표적 항원에 대한 증가된 친화도가 달성되도록 수용자 및 도입 서열로부터 선택되고 조합될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 줄 때 직접 및 가장 실질적으로 관여한다.

[0160] 인간화 항체 또는 항체 단편은 원래의 항체와 유사한 항원 특이성, 예를 들어 본 발명에서 인간 CD19에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 인간화 항체 또는 항체 단편은 인간 CD19에 대한 개선된 친화도 및/또는 결합 특이성을 가질 수 있다.

[0161] 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 항체 또는 항체 단편의 특정 기능성 특징 또는 특성을 특징으로 한다. 예를 들어, 한 측면에서, 항원 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 CAR 조성물의 부분은 인간 CD19에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 인간 CD19에 대해 문헌 [Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17):1157-1165 (1997)]에 기재된 FMC63 scFv와 동일하거나 유사한 결합 특이성을 갖는다. 한 측면에서, 본 발명은 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항원 결합 도메인에 관한 것이고, 여기서 항체 결합 도메인은 CD19 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하고, 여기서 항체 또는 항체 단편은 서열 1-12의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 및/또는 가변 중쇄를 포함한다. 한 측면에서, 항원 결합 도메인은 서열 1-12로부터 선택된 scFv의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, scFv는 리더 서열과 인접하여 동일한 관독 프레임으로 존재한다. 한 측면에서, 리더 서열은 서열 13으로서 제시된 폴리펩티드 서열이다.

[0162] 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 단편, 예를 들어 단일 쇄 가변 단편 (scFv)이다. 한 측면에서, 항-CD19 결합 도메인은 Fv, Fab, (Fab')₂, 또는 이중-기능성 (예를 들어 이중-특이적) 하이브리드 항체이다 (예를 들어, [Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)]). 한 측면에서, 본 발명의 항체 및 그의 단편은 아

생형 또는 향상된 친화도로 CD19 단백질에 결합한다.

[0163] 몇몇 경우에, scFv는 관련 기술분야에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., (1988) Science 242:423-426] 및 [Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조). scFv 분자는 가용성 폴리펩티드 링커를 사용하여 VH 및 VL 영역을 함께 연결함으로써 생산할 수 있다. scFv 분자는 최적화된 길이 및/또는 아미노산 조성을 갖는 링커 (예를 들어, Ser-Gly 링커)를 포함한다. 링커 길이는 scFv의 가변 영역이 폴딩하고 상호작용하는 방식에 크게 영향을 줄 수 있다. 실제로, 짧은 폴리펩티드 링커가 사용되면 (예를 들어, 5-10개 아미노산), 쇠내 폴딩이 억제된다. 쇠간 폴딩은 또한 2개의 가변 영역을 함께 모아 기능성 에피토프 결합 부위를 형성하기 위해 필요하다. 링커 배향 및 크기의 예에 대해서는, 예를 들어 본원에 참조로 포함된 문헌 [Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448], 미국 특허 출원 공개 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, 및 PCT 공개 W02006/020258 및 W02007/024715를 참고한다.

[0164] scFv는 그의 VL 및 VH 영역 사이에 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 아미노산 잔기의 링커를 포함할 수 있다. 링커 서열은 임의의 천연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 링커 서열은 아미노산 글리신 및 세린을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 링커 서열은 글리신 및 세린 반복체의 세트, 예컨대 (Gly₄Ser)_n을 포함하고, 여기서 n은 1 이상의 양성 정수이다 (서열 18). 한 실시양태에서, 링커는 (Gly₄Ser)₄ (서열 106) 또는 (Gly₄Ser)₃ (서열 107)일 수 있다. 링커 길이의 차이는 활성을 유지시키거나 향상시켜 활성 연구에서 훨씬 더 우수한 효능을 유도할 수 있다.

[0165] 안정성 및 돌연변이

[0166] 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv 분자 (예를 들어, 가용성 scFv)의 안정성은 통상적인 대조군 scFv 분자 또는 전장 항체의 생물물리학적 특성 (예를 들어, 열 안정성)을 참고로 하여 평가할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간화 scFv는 설명되는 검정에서 대조군 결합 분자 (예를 들어 통상적인 scFv 분자)보다 약 0.1, 약 0.25, 약 0.5, 약 0.75, 약 1, 약 1.25, 약 1.5, 약 1.75, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 3.5, 약 4, 약 4.5, 약 5, 약 5.5, 약 6, 약 6.5, 약 7, 약 7.5, 약 8, 약 8.5, 약 9, 약 9.5, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 또는 약 15°C 더 높은 열 안정성을 갖는다.

[0167] 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 개선된 열 안정성은 후속적으로 전체 CART19 구축물에 부여되어, CART19 구축물의 개선된 치료 특성을 유도한다. 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 열 안정성은 통상적인 항체에 비해 적어도 약 2°C 또는 3°C 개선될 수 있다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 통상적인 항체에 비해 1°C 개선된 열 안정성을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 통상적인 항체에 비해 2°C 개선된 열 안정성을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, scFv는 통상적인 항체에 비해 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15°C 개선된 열 안정성을 갖는다. 예를 들어, 본원에 개시된 scFv 분자와, scFv VH 및 VL이 그로부터 유래된 항체의 scFv 분자 또는 Fab 단편을 비교할 수 있다. 열 안정성은 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, T_m을 측정할 수 있다. T_m 측정 방법 및 다른 단백질 안정성 결정 방법을 아래에서 보다 상세히 설명한다.

[0168] scFv 내의 돌연변이 (가용성 scFv의 인간화 또는 직접 돌연변이 유발을 통해 발생하는)는 scFv의 안정성을 변경하고 scFv 및 CART19 구축물의 전체 안정성을 개선한다. 인간화 scFv의 안정성을 T_m, 변성 온도 및 응집 온도와 같은 측정치를 사용하여 무린 scFv에 대해 비교한다.

[0169] 돌연변이체 scFv의 결합 능력은 실시예에 설명된 검정을 이용하여 결정할 수 있다.

[0170] 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 돌연변이된 scFv가 CART19 구축물에 개선된 안정성을 부여하도록 인간화 과정에 의해 발생하는 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 돌연변이된 scFv가 CART19 구축물에 개선된 안정성을 부여하도록 인간화 과정에 의해 발생하는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 돌연변이를 포함한다.

[0171] 단백질 안정성의 평가 방법

[0172] 항원 결합 도메인의 안정성은 예를 들어 아래에서 설명되는 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 상기 방법은 가장 덜 안정한 도메인이 먼저 비폴딩되거나 또는 협동적으로 비폴딩하는 다중도메인 단위 (예를 들어, 단일 비폴딩 전이를 보이는 다중도메인 단백질)의 전체적인 안정성 역치를 제한하는 다수의 열 비폴딩 전이의 결정을 허용한

다. 가장 덜 안정한 도메인은 많은 추가의 방식으로 확인될 수 있다. 돌연변이 유발은 어떤 도메인이 전체 안정성을 제한하는지 조사하기 위해 수행할 수 있다. 추가로, 다중도메인 단백질의 프로테아제 내성은 가장 덜 안정한 도메인이 DSC 또는 다른 분광 방법을 통해 본질적으로 비폴딩되는 것으로 알려진 조건 하에 수행할 수 있다 ([Fontana, et al., (1997) Fold. Des., 2: R17-26]; [Dimasi et al. (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692]). 가장 덜 안정한 도메인이 확인된 후에, 상기 도메인 (또는 그의 일부)을 코딩하는 서열을 방법에서 시험 서열로 사용할 수 있다.

[0173] a) 열 안정성

[0174] 조성물의 열 안정성은 관련 기술분야에 공지된 많은 비-제한적인 생물물리적 또는 생화학적 기술을 이용하여 분석할 수 있다. 특정 실시양태에서, 열 안정성은 분석 분광법에 의해 평가된다.

[0175] 예시적인 분석적 분광법은 시차 주사 열량측정법 (DSC)이다. DSC는 대부분의 단백질 또는 단백질 도메인의 비폴딩을 수반하는 열 흡수에 감수성인 열량계를 사용한다 (예를 들어, 문헌 [Sanchez-Ruiz, et al., Biochemistry, 27: 1648-52, 1988] 참조). 단백질의 열 안정성을 결정하기 위해, 단백질의 샘플을 열량계 내로 삽입하고, 온도를 Fab 또는 scFv가 비폴딩될 때까지 상승시킨다. 단백질이 비폴딩되는 온도는 전체적인 단백질 안정성을 나타낸다.

[0176] 또 다른 예시적인 분석 분광법 방법은 원편광 이색성 (CD) 분광법이다. CD 분광 분석은 증가하는 온도의 함수로서 조성물의 광학 활성을 측정한다. 원편광 이색성 (CD) 분광법은 구조적 비대칭에 의해 발생하는 좌선회 편광 대 우선회 편광의 흡수 차이를 측정한다. 무질서한 또는 비폴딩된 구조는 정연한 또는 폴딩된 구조의 것과 매우 상이한 CD 스펙트럼을 생성한다. CD 스펙트럼은 증가하는 온도의 변성 효과에 대한 단백질의 감수성을 반영하고, 따라서 단백질의 열 안정성을 나타낸다 (문헌 [van Mierlo and Steemsma, J. Biotechnol., 79(3):281-98, 2000] 참조).

[0177] 열 안정성을 측정하기 위한 또 다른 예시적인 분석 분광법은 형광 방출 분광법이다 ([van Mierlo and Steemsma, 상기 문헌] 참조). 열 안정성을 측정하기 위한 또 다른 예시적인 분석 분광법은 핵 자기 공명 (NMR) 분광법이다 (예를 들어 [van Mierlo and Steemsma, 상기 문헌] 참조).

[0178] 조성물의 열 안정성은 생화학적으로 측정할 수 있다. 열 안정성을 평가하기 위한 예시적인 생화학적 방법은 열 시험처리 검정이다. "열 시험처리 검정"에서, 조성물은 설정된 시간 동안 다양한 상승된 온도에 적용된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 시험 scFv 분자 또는 scFv 분자를 포함하는 분자는 다양한 온도에, 예를 들어 1-1.5 시간 동안 적용된다. 이어서, 단백질의 활성을 관련 생화학적 검정에 의해 검정한다. 예를 들어, 단백질이 결합 단백질 (예를 들어 scFv 또는 scFv-함유 폴리펩티드)이면, 결합 단백질의 결합 활성은 기능성 또는 정량적 ELISA에 의해 결정할 수 있다.

[0179] 상기 검정은 고속 처리 형식 및 이. 콜라이(*E. coli*)를 사용하는 실시예에 개시된 것 및 고속 처리 스크리닝으로 수행될 수 있다. 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv 변이체의 라이브러리는 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 생성할 수 있다. 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv 발현은 유도되고, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 열 시험처리에 적용될 수 있다. 시험처리된 시험 샘플은 결합에 대해 검정될 수 있고, 안정한 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 규모를 확대하여 추가로 특성이 파악될 수 있다.

[0180] 열 안정성은 임의의 상기 기술 (예를 들어 분석적 분광 기술)을 사용하여 조성물의 용점 (T_m)를 측정함으로써 평가한다. 용점은 조성물의 50%의 분자가 폴딩된 상태로 존재하는 열 전이 곡선의 중간 지점의 온도이다 (예를 들어, [Dimasi et al. (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692] 참조). 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 T_m 값은 약 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C이다. 한 실시양태에서, IgG의 T_m 값은 약 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C이다. 한 실시양태에서, 다가 항체의 T_m 값은 약 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C,

69℃, 70℃, 71℃, 72℃, 73℃, 74℃, 75℃, 76℃, 77℃, 78℃, 79℃, 80℃, 81℃, 82℃, 83℃, 84℃, 85℃, 86℃, 87℃, 88℃, 89℃, 90℃, 91℃, 92℃, 93℃, 94℃, 95℃, 96℃, 97℃, 98℃, 99℃, 100℃이다.

[0181] 열 안정성은 또한 분석적 열량 측정 기술 (예를 들어 DSC)을 사용하여 조성물의 비열 또는 열 용량 (Cp)을 측정함으로써 평가한다. 조성물의 비열은 1 mol의 물의 온도를 1℃ 상승시키기 위해 필요한 에너지 (예를 들어 kcal/mol 단위)이다. 큰 Cp는 변성된 또는 불활성 단백질 조성물의 특징이다. 조성물의 열 용량의 변화 (ΔC_p)는 그의 열 전이 전과 후에 조성물의 비열을 결정함으로써 측정된다. 열 안정성은 또한 비폴딩의 깁스 (Gibbs) 자유 에너지 (ΔG), 비폴딩의 엔탈피 (ΔH), 또는 비폴딩의 엔트로피 (ΔS)를 포함하는 열역학적 안정성의 다른 파라미터를 측정하거나 결정함으로써 평가할 수 있다. 상기 생화학적 검정 중 하나 이상 (예를 들어 열 시험처리 검정)이, 조성물의 50%가 그의 활성 (예를 들어 결합 활성)을 보유하는 온도 (즉, Tc 값)를 결정하기 위해 사용된다.

[0182] 또한, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv에 대한 돌연변이는 돌연변이되지 않은 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv에 비해 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 열 안정성을 변경시킨다. 인간화 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv가 CART19 구축물 내로 포함될 때, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 인간화 scFv는 전체 항-CD19 CART 구축물에 열 안정성을 부여한다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv에 열 안정성을 부여하는 단일 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv는 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv에 열 안정성을 부여하는 다수의 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv 내의 다수의 돌연변이는 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 열 안정성에 부가 효과를 갖는다.

[0183] b) 응집 %

[0184] 조성물의 안정성은 그의 응집하려는 경향을 측정함으로써 결정될 수 있다. 응집은 많은 비-제한적인 생화학적 또는 생물물리적 기술에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피, 예를 들어 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)를 사용하여 조성물의 응집을 평가할 수 있다. SEC는 크기를 기초로 하여 분자를 분리한다. 칼럼을 이온 및 소분자는 그 내부로 받아들이지만 큰 분자는 받아들이지 않을 중합체 겔의 반-고체 비드로 채운다. 단백질 조성물을 칼럼의 상단에 적용하면, 작은 폴딩된 단백질 (즉, 비-응집된 단백질)은 큰 단백질 응집체에 이용가능한 것보다 더 큰 부피의 용매를 통해 분배된다. 그 결과, 큰 응집체는 칼럼을 통해 보다 빠르게 이동하고, 상기 방식으로 혼합물이 그의 성분으로 분리되거나 분별화될 수 있다. 각각의 분획을 겔로부터 용리되면서 별개로 정량할 수 있다 (예를 들어 광 산란에 의해). 따라서, 조성물의 응집 %는 분획의 농도를 겔에 적용된 단백질의 총 농도와 비교함으로써 결정될 수 있다. 안정한 조성물은 칼럼으로부터 본질적으로 단일 분획으로 용리되고, 용리 프로파일 또는 크로마토그램에서 본질적으로 단일 피크로 나타난다.

[0185] c) 결합 친화도

[0186] 조성물의 안정성은 그의 표적 결합 친화도를 결정함으로써 평가할 수 있다. 결합 친화도를 결정하기 위한 매우 다양한 방법이 관련 기술분야에 알려져 있다. 결합 친화도를 결정하기 위한 예시적인 방법은 표면 플라즈몬 공명을 이용한다. 표면 플라즈몬 공명은 예를 들어 비아코어(BIAcore) 시스템 (파마시아 바이오센서 에이비 (Pharmacia Biosensor AB), 스웨덴 옉살라 및 미국 뉴저지주 피츠크타웨이)를 사용하여 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변화를 검출함으로써 실시간 생체특이적 상호작용의 분석을 가능하게 하는 광학 현상이다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌 ([onsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26]; [Jonsson, U., i (1991) Biotechniques 11:620-627]; [Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131]; 및 [Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277}을 참조한다.

[0187] 한 측면에서, CAR의 항원 결합 도메인은 본원에 설명된 항원 결합 도메인 아미노산 서열에 상동성인 아미노산 서열을 포함하고, 항원 결합 도메인은 본원에 설명된 항-CD19 항체 단편의 목적하는 기능성 특성을 보유한다. 하나의 구체적인 측면에서, 본 발명의 CAR 조성물은 항체 단편을 포함한다. 추가의 측면에서, 항체 단편은 scFv를 포함한다.

[0188] 다양한 측면에서, CAR의 항원 결합 도메인은 가변 영역의 하나 또는 둘 모두 (예를 들어, VH 및/또는 VL) 내의, 예를 들어 하나 이상의 CDR 영역 내의 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역 내의 하나 이상의 아미노산을 변형함으로써 조작된다. 하나의 구체적인 측면에서, 본 발명의 CAR 조성물은 항체 단편을 포함한다. 추가의 측면에서, 항체 단편은 scFv를 포함한다.

[0189] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 요구되는 활성은 변하지 않으면서 아미노산 서열 (예를 들어,

야생형으로부터)이 변하도록 추가로 변형될 수 있음을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해할 것이다. 예를 들어, "비-필수" 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 야기하는 추가의 뉴클레오타이드 치환이 단백질에서 이루어질 수 있고, 예를 들어 분자 내의 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또 다른 아미노산 잔기로 교체될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 일련의 아미노산은 측쇄 패밀리 구성원의 순서 및/또는 조성에서 상이한 구조적으로 유사한 일련의 아미노산으로 교체될 수 있고, 예를 들어 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 교체된 보존적 치환이 이루어질 수 있다.

[0190] 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하는, 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 관련 기술분야에서 규정되었다.

[0191] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 측면에서 동일성 %는 동일한 2개 이상의 서열에 대한 것이다. 다음 서열 비교 알고리즘 중의 하나를 사용하여 또는 수동 정렬 및 시각적 조사에 의해 비교창 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 대응을 위해 비교되고 정렬될 때 2개의 서열이 특정된 비율의 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 가질 경우 (예를 들어, 특정된 영역에 걸쳐, 또는, 특정되지 않을 경우 전체 서열에 걸쳐 60% 동일성, 임의로 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성), 2개의 서열은 "실질적으로 동일하다". 임의로, 동일성은 길이가 적어도 약 50개 뉴클레오타이드 (또는 10개 아미노산)인 영역에 걸쳐, 또는 보다 바람직하게는 길이가 100 내지 500 또는 1000개 또는 그 초과 뉴클레오타이드 (또는 20, 50, 200개 또는 그 초과 아미노산)인 영역에 걸쳐 존재한다.

[0192] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 참조 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 및 참조 서열은 컴퓨터에 입력되고, 필요한 경우 하위서열 좌표가 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터가 지정된다. 디폴트 프로그램 파라미터가 사용될 수 있거나, 또는 대체 파라미터가 지정될 수 있다. 이어서, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터를 기초로 하여 참조 서열에 대한 시험 서열의 서열 동일성 %를 계산한다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어 국소 상동성 알고리즘 (Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c), 상동성 정렬 알고리즘 (Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443), 유사성 검색 방법 (Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444), 이들 알고리즘 (제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group, 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575)의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지 (Wisconsin Genetics Software Package) 내의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)의 컴퓨터 실행, 또는 수동 정렬 및 시각적 조사 (예를 들어, 문헌 [Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology] 참조)에 의해 수행할 수 있다.

[0193] 서열 동일성 및 서열 유사성 %를 결정하기 위해 적합한 알고리즘의 2가지 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이것은 각각 문헌 [Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402]; 및 [Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 내셔널 센터 포 바이오테크놀로지 인포메이션(National Center for Biotechnology Information)을 통해 공개적으로 이용가능하다.

[0194] 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성 %는 또한 PAM120 가중치 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하는, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 통합된 문헌 [E. Meyers and W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17]의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 또한, 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성 %는 Blossom 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지 (www.gcg.com에서 입수가능) 내의 GAP 프로그램에 통합된 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453]의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.

[0195] 한 측면에서, 본 발명은 기능적으로 동등한 분자를 생성하는 출발 항체 또는 단편 (예를 들어, scFv) 아미노산 서열의 변형을 고려한다. 예를 들어, CAR 내에 포함된 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 VH 또는 VL은 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 scFv의 출발 VH 또는 VL 프레임워크 영역에 적어도 약 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 보유하도록 변형될 수 있다. 본 발명은 기능적으로 동등한 분자를 생

성하기 위해 전체 CAR 구축물의 변형, 예를 들어 CAR 구축물의 다양한 도메인의 하나 이상의 아미노산 서열의 변형을 고려한다. CAR 구축물은 출발 CAR 구축물에 적어도 약 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 보유하도록 변형될 수 있다.

[0196] **막횡단 도메인**

[0197] 막횡단 도메인에 관하여, 다양한 실시양태에서, CAR은 CAR의 세포외 도메인에 부착된 막횡단 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 막횡단 도메인은 막횡단 영역에 인접한 하나 이상의 추가의 아미노산, 예를 들어 그로부터 막횡단 도메인이 유래되는 단백질의 세포외 영역과 회합된 하나 이상의 아미노산 (예를 들어, 세포외 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 내지 15개의 아미노산) 및/또는 그로부터 막횡단 도메인이 유래되는 단백질의 세포내 영역과 회합된 하나 이상의 추가의 아미노산 (예를 들어, 세포내 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 내지 15개의 아미노산)을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 사용되는 CAR의 다른 도메인의 하나와 회합되는 것이다. 몇몇 경우에, 막횡단 도메인은 막횡단 도메인의 동일한 또는 상이한 표면 막 단백질의 상이 도메인에 대한 결합을 방지하기 위해, 예를 들어 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 선택되거나 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 CART 세포 표면 상의 또 다른 CAR와 동종이량체를 형성할 수 있다. 상이한 측면에서, 막횡단 도메인의 아미노산 서열은 동일한 CART에 존재하는 천연 결합 파트너의 결합 도메인과의 상호작용을 최소화하기 위해 변형되거나 치환될 수 있다.

[0198] 막횡단 도메인은 천연 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 천연 공급원일 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 한 측면에서, 막횡단 도메인은 CAR이 표적에 결합할 때마다 세포내 도메인(들)에 신호를 전달할 수 있다. 본 발명에서 특히 유용한 막횡단 도메인은 예를 들어 T-세포 수용체, CD28, CD3 앵글론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 알파, 베타 또는 제타쇄의 적어도 막횡단 영역(들)을 포함할 수 있다.

[0199] 몇몇 경우에, 막횡단 도메인은 힌지, 예를 들어 인간 단백질로부터의 힌지를 통해 CAR의 세포외 영역, 예를 들어 CAR의 항원 결합 도메인에 부착될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지는 인간 Ig (이뮤노글로불린) 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지, 또는 CD8a 힌지일 수 있다. 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 서열 14의 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 그로 이루어진다). 한 측면에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 막횡단 도메인을 포함한다 (예를 들어, 그로 이루어진다).

[0200] 한 측면에서, 힌지 또는 스페이서는 IgG4 힌지를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 하기 아미노산 서열의 힌지를 포함한다:

```
ESKYGPCCPPCAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLGKM
```

[0201]

[0202] (서열 45). 몇몇 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 하기 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 힌지를 포함한다:

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGG
 ACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA
 CCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCA
 GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG
 GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
 GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
 AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
 TGTACACCCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
 CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
 GGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
 GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
 CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA
 GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

[0203]

[0204]

(서열 46).

[0205]

한 측면에서, 힌지 또는 스페이서는 IgD 힌지를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 다음 아미노산 서열의 힌지를 포함한다:

RWPESPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
 KTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG
 GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAQA
 PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG
 STTFWAWSVLRVPAPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH

[0206]

[0207]

(서열 47). 몇몇 실시양태에서, 힌지 또는 스페이서는 다음 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 힌지를 포함한다:

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA
 GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT
 GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA
 GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
 TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT
 TTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGA
 AAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT
 CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC
 TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG
 AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG
 ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCGGCTTTAGCCCGCCC
 AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG
 CTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC
 TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTC
 CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACG
 TGACTGACCATT

[0208]

[0209]

(서열 48).

[0210]

한 측면에서, 막형단 도메인은 재조합 도메인일 수 있고, 이 경우에 막형단 도메인은 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 우세하게 포함할 것이다. 한 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체가 재조합 막형단 도메인의 각각의 말단부에서 발견될 수 있다.

- [0211] 임의로, 2 내지 10개 아미노산 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 CAR의 막형단 도메인과 세포질 영역 사이에 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 이중체는 특히 적합한 링커를 제공한다. 예를 들어, 한 측면에서, 링커는 GGGSGGGGS (서열 49)의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 링커는 다음 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다:
- [0212] GGTGGCGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (서열 50).
- [0213] **세포질 도메인**
- [0214] CAR의 세포질 도메인 또는 영역은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 신호전달 도메인은 일반적으로 CAR이 도입된 면역 세포의 적어도 하나의 정상 이펙터 기능의 활성화를 책임진다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 특수 기능을 나타낸다. T 세포의 이펙터 기능은 예를 들어 시토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 특수 기능을 수행하도록 유도하는 단백질의 부분을 의미한다. 대체로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 체를 사용할 필요가 있는 것은 아니다. 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분이 사용되는 정도로, 상기 말단절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한, 무손상 채 대신에 사용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 따라서 이펙터 기능 신호를 전달하기 위해 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 말단절단된 부분을 포함하는 의미를 갖는다.
- [0215] 본 발명의 CAR에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 항원 수용체 결합 후에 신호 전달을 개시하기 위해 함께 작용하는 T 세포 수용체 (TCR) 및 공-수용체의 세포질 서열, 및 동일한 기능적 능력을 갖는 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 임의의 재조합 서열을 포함한다.
- [0216] TCR을 통해 생성된 신호 단독은 T 세포의 완전한 활성화를 위해 불충분하고 2차 및/또는 공동자극 신호가 또한 필요함이 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화는 다음과 같은 세포질 신호전달 서열의 2개의 별개의 클래스에 의해 매개된다고 언급될 수 있다: TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것 (1차 세포내 신호전달 도메인) 및 2차 또는 공동자극 신호를 제공하기 위해 항원-비의존성 방식으로 작용하는 것 (2차 세포질 도메인, 예를 들어 공동자극 도메인).
- [0217] 1차 신호전달 도메인은 TCR 복합체의 1차 활성화를 자극 방식으로 또는 억제 방식으로 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호 전달 모티프를 함유할 수 있다.
- [0218] 본 발명에 특히 유용한 1차 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d의 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR은 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 CD3-제타의 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0219] 한 실시양태에서, 1차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM 도메인, 예를 들어 천연 ITAM 도메인에 비해 변경된 (예를 들어, 증가된 또는 감소된) 활성을 갖는 돌연변이된 ITAM 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 1차 신호전달 도메인은 변형된 ITAM-함유 1차 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 최적화된 및/또는 말단절단된 ITAM-함유 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 1차 신호전달 도메인은 1, 2, 3 또는 4개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다.
- [0220] CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인만을 포함할 수 있거나 또는 본 발명의 CAR의 측면에서 유용한 임의의 다른 요구되는 세포내 신호전달 도메인(들)과 조합될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타 체 부분 및 공동자극 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 도메인은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 의미한다. 공동자극 분자는 항원 수용체 이외의 다른 세포 표면 분자 또는 림프구의 항원에 대한 효율적인 반응을 위해 필요한 그의 리간드이다. 상기 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다. 예를 들어, CD27 공동자극은 시험관내에서 인간 CART 세포의 확장, 이펙터 기능, 및 생존을 향상시키고 생체내에서 인간 T 세포 존속성 및 항종양 활성을 증가시키는 것으로 입증되었다 (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).
- [0221] 본 발명의 CAR의 세포질 부분 내의 세포내 신호전달 서열은 서로 무작위로 또는 특정한 순서로 연결될 수 있다. 임의로, 예를 들어 2 내지 10개 아미노산 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산) 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커는 세포내 신호전달 서열 사이에 연결을 형성할 수 있다. 한 실시양태에서,

글리신-세린 이중체가 적합한 링커로서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 단일 아미노산, 예를 들어 알라닌, 글리신이 적합한 링커로서 사용될 수 있다.

[0222] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과와 공동자극 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 실시양태에서, 2개 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과와 공동자극 신호전달 도메인은 링커 분자, 예를 들어 본원에 설명된 링커 분자에 의해 분리된다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개의 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 링커 분자는 글리신 잔기이다. 몇몇 실시양태에서, 링커는 알라닌 잔기이다.

[0223] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, 4-1BB의 신호전달 도메인은 서열 16의 신호전달 도메인이다. 한 측면에서, CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열 17의 신호전달 도메인이다.

[0224] 한 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD27의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 한 측면에서, CD27의 신호전달 도메인은 QRRKYRSNKGESVPEAPEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (서열 51)의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, CD27의 신호전달 도메인은 하기 핵산 서열에 의해 코딩된다:

```
AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
GCCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA
GCCTATCGCTCC
```

[0225]

[0226] (서열 52).

[0227] 한 측면에서, 본원에 설명되는 CAR-발현 세포는 예를 들어 동일한 표적 (CD19) 또는 상이한 표적 (예를 들어, CD123)에 결합하기 위해 제2 CAR, 예를 들어 상이한 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 CAR을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR-발현 세포가 2개 이상의 상이한 CAR을 포함할 때, 상이한 CAR의 항원 결합 도메인은 항원 결합 도메인들이 서로 상호작용하지 않도록 하는 것일 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 CAR을 발현하는 세포는 제1 CAR의 항원 결합 도메인을, 예를 들어 제2 CAR의 항원 결합 도메인과 회합을 형성하지 않는 단편, 예를 들어 scFv로서 가질 수 있고, 예를 들어 제2 CAR의 항원 결합 도메인은 VHH이다.

[0228] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 또 다른 작용제, 예를 들어 CAR-발현 세포의 활성을 향상시키는 작용제를 추가로 발현할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 작용제는 억제 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 억제 분자, 예를 들어 PD1는 몇몇 실시양태에서 면역 이펙터 반응을 일으키는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TGFR 베타를 포함한다. 한 실시양태에서, 억제 분자를 억제하는 작용제는 양성 신호를 세포에 제공하는 제2 폴리펩티드, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인과 회합하는 제1 폴리펩티드, 예를 들어 억제 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 예를 들어 억제 분자, 예컨대 PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 및 TIGIT의 제1 폴리펩티드, 또는 임의의 이들의 단편 (예를 들어, 임의의 이들의 세포의 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 41BB, CD27 또는 CD28) 및/또는 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)을 포함하는)인 제2 폴리펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 PD1의 제1 폴리펩티드 또는 그의 단편 (예를 들어, PD1의 세포의 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD28 신호전달 도메인 및/또는 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)의 제2 폴리펩티드를 포함한다. PD1은 CD28, CTLA-4, ICOS, 및 BTLA를 또한 포함하는 CD28 패밀리의 수용체의 억제성 구성원이다. PD1은 활성화된 B 세포, T 세포 및 골수성 세포 상에서 발현된다 (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). PD1, PD-L1 및 PD-L2에 대한 2개의 리간드는 PD1에 결합할 때 T 세포 활성화를 하향조절하는 것으로 나타났다 ([Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34]; [Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8]; [Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43]). PD-L1은 인간 암에 풍부하다 ([Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7]; [Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314]; [Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094]). 면역 억제는 PD1과 PD-L1의 국소 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있다.

[0229] 한 실시양태에서, 작용제는 억제 분자의 세포외 도메인 (ECD)을 포함하고, 예를 들어 프로그램화된 사멸 (Programmed Death) 1 (PD1)은 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인, 예컨대 41BB 및 CD3 제타 (본원에서 PD1 CAR로도 언급됨)에 융합될 수 있다. 한 실시양태에서, PD1 CAR은 본원에 기재된 CD19 CAR과 조합하여 사용

될 때, T 세포의 존속성을 향상시킨다. 한 실시양태에서, CAR은 서열 121에 밑줄로 표시한 PD1의 세포외 도메인을 포함하는 PD1 CAR이다. 한 실시양태에서, PD1 CAR은 서열 121의 아미노산 서열을 포함한다.

Malpvtalllplalllhaarppgwflsdprpwnpptsfallvvtgednatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdk
laafpedrsqpgqdcfrvtqlpngrdfhmsvvrarndsgtylclgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfql
vtppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttq
eedgcscrfeeeggcclrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprknqpqeglynelqkdk
maeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0230]

(서열 121).

[0231]

한 실시양태에서, PD1 CAR은 아래 제시된 아미노산 서열 (서열 119)을 포함한다.

[0232]

pgwflsdprpwnpptsfallvvtgednatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvt
qlpngrdfhmsvvrarndsgtylclgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtppaprpptpaptiasqpl
slrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeggccl
rvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprknqpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgk
ghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0233]

(서열 119).

[0234]

한 실시양태에서, 작용제는 PD1 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 PD1 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, PD1 CAR에 대한 핵산 서열을 아래 제시하고, 여기서 PD1 ECD는 서열 120에 밑줄로 표시한다.

[0235]

atggccctccctgtcactgcctgtcttccccctgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatggtttctggac
tctccggatcggccgtggaatcccccaaccttctaccggcactcttgggttgactgagggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctc
caacacctccgaatcattcgtgctgaactgtgtaccgcatgagcccgtaaacagaccgacaagctcggcggcgtttccggaagatcggt
cgcaacccgggacagattgtcgtgtccgcgtgactcaactccgaatggcagagactccacatgagcgtgtccgcgctaggcgaaa
cgactccgggacactacgtgtgcggagccatctcgtgctgcctaaaggcccaaatcaaaagagcctgaggggcgaactgagagtgc
cgagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgccctcgccctgcggggcagtttcagacctgtgcacgaccatccg
gcgccgcgccaccgactccggcccaactatcgcgagccagccctgtcgtgagggcggaagcatgccgccctgccgccggagg
tgtgtgcataccggggattgctgactcgcgacatctacatttggctcctctcgcgggaactgtgtgctgctccttctgtccctggt
catcacctgtactgcaagcggggtcggaataaagcttctgtacattttcaagcagccctcatgagggccgtgcaaacaccagaggga
ggacgggtgtcctcggcgttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgctggaagtctccggagcgccgacgccccgc
ctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcggaagagtagatgtgctggacaagcggcgcgcc
gggacccccgaatggcggggaagcctagaagaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccga
ggcctactccgaaattgggatgaaggagagcgggcgagggggaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccacc
aaggacacatacgtatgcctgcacatgcaggccctccccctcgc

[0236]

(서열 120).

[0237]

또 다른 측면에서, 본 발명은 CAR-발현 세포, 예를 들어 CART 세포의 집단을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, CAR-발현 세포의 집단은 상이한 CAR을 발현하는 세포의 혼합물을 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, CART 세포의 집단은 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 제1 세포에 의해 발현된 CAR 내의 항-CD19 결합 도메인과 상이한, 상이한 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, CAR-발현 세포의 집단은 예를 들어 본원에 설명된 바와 같은 항-CD19 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 CD19 이외의 다른 표적 (예를 들어, CD123)에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, CAR-발현 세포의 집단은 예를 들어 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제1 세포, 및 2차 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 제2 세포를 포함한다.

[0239]

또 다른 측면에서, 본 발명은 집단 내의 적어도 하나의 세포는 본원에 기재된 항-CD19 도메인을 갖는 CAR을 발현하고 제2 세포는 또 다른 작용제, 예를 들어 CAR-발현 세포의 활성을 향상시키는 작용제를 발현하는 세포의

집단을 제공한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 작용제는 억제 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 예를 들어, 억제 분자는 몇몇 실시양태에서 면역 이펙터 반응을 일으키는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TGFR 베타를 포함한다. 한 실시양태에서, 억제 분자를 억제하는 작용제는 양성 신호를 세포에 제공하는 제2 폴리펩티드, 예를 들어 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인과 회합하는 제1 폴리펩티드, 예를 들어 억제 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 예를 들어 억제 분자, 예컨대 PD1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TGFR 베타의 제1 폴리펩티드, 또는 임의의 이들의 단편 (예를 들어, 임의의 이들의 세포외 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 공동자극 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 41BB, CD27 또는 CD28) 및/또는 1차 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)을 포함하는)인 제2 폴리펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 작용제는 PD1의 제1 폴리펩티드 또는 그의 단편 (예를 들어, PD1의 세포외 도메인의 적어도 일부), 및 본원에 기재된 세포내 신호전달 도메인 (예를 들어, 본원에 기재된 CD28 신호전달 도메인 및/또는 본원에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인)의 제2 폴리펩티드를 포함한다.

[0240] RNA 형질감염

[0241] 시험관내 전사된 RNA CAR을 생산하는 방법이 본원에 개시된다. 본 발명은 또한 세포 내로 직접 형질감염될 수 있는 CAR 코딩 RNA 구축물을 포함한다. 형질감염에서 사용하기 위한 mRNA를 생성하는 방법은 특수하게 설계된 프라이머를 사용한 주형의 시험관내 전사 (IVT), 이어서 폴리A 첨가에 의해, 3' 및 5' 비번역 서열 ("UTR"), 5' 캡 및/또는 내부 리보솜 도입 부위 (IRES), 발현시킬 핵산, 및 폴리A 테일을 포함하는, 전형적으로 50-2000개 염기 길이의 구축물 (서열 118)을 생산하는 것을 수반할 수 있다. 이와 같이 생산된 RNA는 상이한 종류의 세포를 효율적으로 형질감염시킬 수 있다. 한 측면에서, 주형은 CAR에 대한 서열을 포함한다.

[0242] 한 측면에서, 항-CD19 CAR은 메신저 RNA (mRNA)에 의해 코딩된다. 한 측면에서, 항-CD19 CAR을 코딩하는 mRNA는 CART 세포의 생산을 위해 T 세포 내로 도입된다.

[0243] 한 실시양태에서, 시험관내 전사된 RNA CAR은 일시적 형질감염의 형태로서 세포 내로 도입될 수 있다. RNA는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)-생성 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생산된다. 임의의 공급원으로부터의 관심 있는 DNA는 적절한 프라이머 및 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 PCR에 의해 직접 전환될 수 있다. DNA의 공급원은 예를 들어 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 임의의 다른 적절한 DNA 공급원일 수 있다. 시험관내 전사를 위한 목적하는 주형은 본 발명의 CAR이다. 예를 들어, RNA CAR을 위한 주형은 항종양 항체의 단일쇄 가변 도메인을 포함하는 세포외 영역; 힌지 영역, 막횡단 도메인 (예를 들어, CD8a의 막횡단 도메인); 및 예를 들어 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 영역을 포함한다.

[0244] 한 실시양태에서, PCR을 위해 사용되는 DNA는 오픈 리딩 프레임을 포함한다. DNA는 유기체의 게놈으로부터 천연 발생 DNA 서열로부터 유래된 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산은 몇몇의 또는 모든 5' 및/또는 3' 비번역 영역 (UTR)을 포함할 수 있다. 핵산은 엑손 및 인트론을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, PCR을 위해 사용되는 DNA는 인간 핵산 서열이다. 또 다른 실시양태에서, PCR을 위해 사용되는 DNA는 5' 및 3' UTR을 포함하는 인간 핵산 서열이다. DNA는 대안적으로 천연 발생 유기체에서 정상적으로는 발현되지 않는 인공 DNA 서열일 수 있다. 예시적인 인공 DNA 서열은 함께 라이게이션되어 융합 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 형성하는 유전자의 부분들을 포함하는 것이다. 함께 라이게이션되는 DNA의 부분은 단일 유기체로부터 또는 하나 초과 유기체로부터 유래될 수 있다.

[0245] PCR은 형질감염을 위해 사용되는 mRNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성하기 위해 사용된다. PCR을 수행하기 위한 방법은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는 PCR을 위한 주형으로서 사용되는 DNA의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 갖도록 설계된다. "실질적으로 상보적인"은 본원에서 사용되는 바와 같이, 프라이머 서열 내의 대부분의 또는 모든 염기가 상보성이거나 또는 하나 이상의 염기가 비-상보성이거나 미스매치된 뉴클레오타이드의 서열을 의미한다. 실질적으로 상보적인 서열은 PCR을 위해 사용하는 어닐링 조건 하에서 의도된 DNA 표적과 어닐링하거나 혼성화할 수 있다. 프라이머는 DNA 주형의 임의의 부분에 실질적으로 상보성이도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함하는, 세포에서 정상적으로 전사되는 핵산의 부분 (오픈 리딩 프레임)을 증폭하도록 설계될 수 있다. 프라이머는 또한 관심 있는 특정 도메인을 코딩하는 핵산의 부분을 증폭하도록 설계될 수 있다. 한 실시양태에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함하는 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭하도록 설계될 수 있다. PCR을 위해 유용한 프라이머는 관

런 기술분야에 잘 알려진 합성 방법에 의해 생성할 수 있다. "정방향 프라이머"는 증폭될 DNA 서열의 상류에 존재하는 DNA 주형 상의 뉴클레오타이드에 실질적으로 상보성인 뉴클레오타이드의 영역을 포함하는 프라이머이다. "상류"는 코딩 가닥에 대해 증폭시킬 DNA 서열의 5'에 존재하는 위치를 나타내기 위해 본원에서 사용된다. "역방향 프라이머"는 증폭시킬 DNA 서열의 하류에 존재하는 이중-가닥 DNA 주형에 실질적으로 상보성인 뉴클레오타이드의 영역을 포함하는 프라이머이다. "하류"는 코딩 가닥에 대해 증폭시킬 DNA 서열의 3'에 존재하는 위치를 나타내기 위해 본원에서 사용된다.

- [0246] PCR에 유용한 임의의 DNA 폴리머라제가 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 시약 및 폴리머라제는 많은 공급원으로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0247] 안정성 및/또는 번역 효율을 촉진하는 능력을 갖는 화학 구조도 사용될 수 있다. RNA는 바람직하게는 5' 및 3' UTR을 갖는다. 한 실시양태에서, 5' UTR의 길이는 1 내지 3000개 뉴클레오타이드이다. 코딩 영역에 추가되는 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTR의 상이한 영역에 어닐링하는 PCR용 프라이머의 설계를 포함하나 이에 제한되지는 않는 상이한 방법에 의해 변경될 수 있다. 상기 방안을 이용하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 전사된 RNA의 형질감염 후에 최적 번역 효율을 달성하기 위해 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 변경할 수 있다.
- [0248] 5' 및 3' UTR은 관심 있는 핵산에 대해 천연 발생하는 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 대안적으로, 관심 있는 핵산에 내인성이 아닌 UTR 서열은 UTR 서열을 정방향 및 역방향 프라이머 내로 도입함으로써 또는 주형의 임의의 다른 변형에 의해 추가될 수 있다. 관심 있는 핵산에 내인성이 아닌 UTR 서열은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율의 변경에 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열 내의 AU-풍부 요소가 mRNA의 안정성을 감소시킨다고 알려져 있다. 따라서, 3' UTR은 관련 기술분야에 잘 알려진 UTR의 특성을 기초로 하여 전사되는 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택되거나 설계될 수 있다.
- [0249] 한 실시양태에서, 5' UTR은 내인성 핵산의 코작(Kozak) 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 관심 있는 핵산에 내인성이 아닌 5' UTR이 상기 설명된 바와 같이 PCR에 의해 추가될 때, 컨센서스 코작 서열은 5' UTR 서열의 추가에 의해 재설계될 수 있다. 코작 서열은 몇몇의 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 효율적인 번역의 실행을 위해 모든 RNA에 필요한 것으로 보이지는 않는다. 많은 mRNA에 대한 코작 서열의 필요성은 관련 기술분야에 알려져 있다. 다른 실시양태에서, 5' UTR은 그의 RNA 게놈이 세포에서 안정한 RNA 바이러스의 5' UTR일 수 있다. 다른 실시양태에서, 다양한 뉴클레오타이드 유사체가 mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하기 위해 3' 또는 5' UTR에 사용될 수 있다.
- [0250] 유전자 클로닝을 필요로 하지 않으면서 RNA를 DNA 주형으로부터 합성할 수 있기 위해, 전사 프로모터는 전사시킴 서열의 상류의 DNA 주형에 부착되어야 한다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터로서 기능하는 서열이 정방향 프라이머의 5' 말단부에 추가될 때, RNA 폴리머라제 프로모터는 전사되는 오픈 리딩 프레임의 상류의 PCR 산물 내로 도입된다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 본원의 다른 곳에서 설명되는 T7 폴리머라제 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터는 T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오타이드 서열이 관련 기술분야에 알려져 있다.
- [0251] 바람직한 실시양태에서, mRNA는 세포에서 리보솜 결합, 번역의 개시 및 mRNA의 안정성을 결정하는 5' 말단부 및 3' 폴리(A) 테일 둘 모두에 캡을 갖는다. 원형 DNA 주형, 예를 들어 플라스미드 DNA에서, RNA 폴리머라제는 진핵 세포 내에서 발현을 위해 적합하지 않은 긴 연쇄체 산물을 생산한다. 3' UTR의 말단부에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는 전사 후에 폴리아데닐화된 경우에도 진행 형질감염에 효과적이지 않은 정상 크기의 mRNA를 생성한다.
- [0252] 선형 DNA 주형 상에서, 파지 T7 RNA 폴리머라제는 주형의 마지막 염기를 넘어 전사체의 3' 말단부를 연장할 수 있다 ([Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985)]; [Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270: 1485-65 (2003)]).
- [0253] 폴리A/T 스트레치의 DNA 주형 내로의 통상적인 통합 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA 내로 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 야기할 수 있고, 이것은 박테리아 세포로부터 얻은 플라스미드 DNA 주형에 종종 결실 및 다른 결함이 매우 높은 수준으로 존재하는 이유이다. 이것은 클로닝 절차를 번거롭고 많은 시간이 소요되게 만들 뿐만 아니라 종종 실패할 수 없게 만든다. 이러한 이유 때문에, 클로닝을 수행하지 않으면서 폴리A/T 3' 스트레치를 갖는 DNA 주형의 구축을 허용하는 방법이 매우 바람직하다.
- [0254] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 절편은 폴리T 테일, 예컨대 100T 테일 (서열 110) (크기는 50-5000 T일 수 있음 (서열 111))을 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 동안, 또는 DNA 라이게이션 또는 시험관내 재조합을 포함하

나 이에 제한되지는 않는 임의의 다른 방법에 의해 PCR 후에 생산될 수 있다. 폴리(A) 테일은 또한 안정성을 RNA에 제공하고, 그의 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 테일의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양의 상관관계가 있다. 한 실시양태에서, 폴리(A) 테일은 100 내지 5000 아데노신 (서열 112)이다.

[0255] RNA의 폴리(A) 테일은 폴리(A) 폴리머라제, 예컨대 이. 콜라이 폴리A 폴리머라제 (E-PAP)를 사용하여 시험관내 전사 후에 추가로 연장될 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리(A) 테일의 길이를 100개의 뉴클레오티드로부터 300 내지 400개의 뉴클레오티드 (서열 113)로 증가시키면, RNA의 번역 효율이 약 2배 증가한다. 추가로, 상이한 화학기의 3' 말단부에 대한 부착은 mRNA 안정성을 증가시킬 수 있다. 상기 부착은 변형된/인공 뉴클레오티드, 압타머 및 다른 화합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, ATP 유사체는 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 폴리(A) 테일 내로 도입될 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다.

[0256] 5' 캡도 RNA 분자에게 안정성을 제공할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 관련 기술분야에 공지되고 본원에 설명된 기술을 사용하여 제공된다 ([Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001)]; [Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001)]; [Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)]).

[0257] 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 RNA는 또한 내부 리보솜 도입 부위 (IRES) 서열을 포함할 수 있다. IRES 서열은 mRNA에 대한 캡-비의존성 리보솜 결합을 개시하고 번역의 개시를 용이하게 하는 임의의 바이러스, 염색체 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 세포 투과 및 생존을 용이하게 하는 인자를 포함할 수 있는 세포 전 기전공에 적합한 임의의 용질, 예컨대 당, 펩티드, 지질, 단백질, 항산화제, 및 계면활성제가 포함될 수 있다.

[0258] RNA는 임의의 많은 상이한 방법, 예를 들어 전기천공 (아막사 뉴클레오펙터(Amaxa Nucleofector)-II (아막사 바이오시스템(Amaxa Biosystem, 독일 쾰른)), (ECM 830 (BTX) (하버드 인스트루먼트(Harvard Instruments, 미국 매사추세츠주 보스턴)) 또는 진 펄서(Gene Pulser) II (바이오라드(BioRad), 미국 콜로라도주 덴버), 멀티포레이터(Multiporator) (에펜도르프(Eppendorf, 독일 함부르크)), 리포펙션을 사용한 양이온성 리보솜 매개된 형질 감염, 중합체 캡슐화, 펩티드 매개된 형질감염, 또는 비올리스틱 입자 전달 시스템, 예컨대 "유전자 총" (예를 들어, 문헌 [Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)]참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 상업적으로 이용가능한 방법을 사용하여 표적 세포 내로 도입될 수 있다.

[0259] CAR을 코딩하는 핵산 구축물

[0260] 본 발명은 또한 본원에 설명된 하나 이상의 CAR 구축물을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 한 측면에서, 핵산 분자는 메신저 RNA 전사체로서 제공된다. 한 측면에서, 핵산 분자는 DNA 구축물로서 제공된다.

[0261] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이며, 여기서 CAR은 항-CD19 결합 도메인 (예를 들어, 인간화 항-CD19 결합 도메인), 막횡단 도메인, 및 자극 도메인, 예를 들어 공동자극 신호전달 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인, 예를 들어 제타 쇄를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인은 본원에 기재된 항-CD19 결합 도메인, 예를 들어 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항-CD19 결합 도메인이다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 T-세포 수용체, CD28, CD3 앵글론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154의 알파, 베타 또는 제타 쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인이다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인은 힌지 영역, 예를 들어 본원에 설명된 힌지에 의해 막횡단 도메인에 연결된다. 한 실시양태에서, 힌지 영역은 서열 14 또는 서열 45 또는 서열 47 또는 서열 49, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 공동자극 도메인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 신호전달 도메인이다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 서열 16의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 및 CD3 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16 또는 서열 51의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열, 및 서열 17 또는 서열 43의 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 여기서 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열은 동일한 프레임에서 단일 폴리펩티드 쇄로서 발현된다.

- [0262] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 13의 리더 서열, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 (또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열)을 갖는 scFv 도메인, 서열 14의 힌지 영역 또는 서열 45 또는 서열 47 또는 서열 49 (또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열), 서열 15의 서열 (또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열)을 갖는 막횡단 도메인, 서열 16의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인 또는 서열 51의 서열 (또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열)을 갖는 CD27 공동자극 도메인, 및 서열 17 또는 서열 43의 서열 (또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열)을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함하는 CAR 구축물을 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0263] 또 다른 측면에서, 본 발명은 핵산 분자에 의해 코딩되는 단리된 폴리펩티드 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드 분자는 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 및 서열 42로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0264] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-CD19 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 자극 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR) 분자를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이며, 여기서 상기 항-CD19 결합 도메인은 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0265] 한 실시양태에서, 코딩된 CAR 분자는 공동자극 도메인을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 및 4-1BB (CD137)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 신호전달 도메인이다. 한 실시양태에서, 공동자극 도메인은 서열 16의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 T-세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD 154의 알파, 베타 또는 제타 채로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인이다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열 15의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 4-1BB의 기능적 신호전달 도메인 및 제타의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 16의 서열 및 서열 17의 서열을 포함하며, 여기서 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 서열은 동일한 프레임에서 단일 폴리펩티드 채로서 발현된다. 한 실시양태에서, 항-CD19 결합 도메인은 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인에 연결된다. 한 실시양태에서, 힌지 영역은 서열 14를 포함한다. 한 실시양태에서, 힌지 영역은 서열 45 또는 서열 47 또는 서열 49를 포함한다.
- [0266] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 13의 리더 서열, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 갖는 scFv 도메인, 서열 14 또는 서열 45 또는 서열 47 또는 서열 49의 힌지 영역, 서열 15의 서열을 갖는 막횡단 도메인, 서열 16의 서열을 갖는 4-1BB 공동자극 도메인 또는 서열 51의 서열을 갖는 CD27 공동자극 도메인, 및 서열 17 또는 서열 43의 서열을 갖는 CD3 제타 자극 도메인을 포함하는 코딩되는 CAR 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 코딩된 CAR 분자는 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35, 서열 36, 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41 및 서열 42로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 그에 대해 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0267] 목적하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 관련 기술분야에 공지된 재조합 방법을 사용하여, 예컨대, 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝함으로써, 이를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 유전자를 유도함으로써, 또는 표준 기술을 사용하여 이를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 얻을 수 있다. 대안적으로, 관심 있는 유전자는 클로닝이 아니라 합성에 의해 생산될 수 있다.
- [0268] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA가 삽입된 벡터를 제공한다. 레트로바이러스, 예컨대 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 딸 세포에서 도입유전자의 장기간의 안정한 통합 및 그의 증식을 허용하기 때문에 장기간의 유전자 전달을 달성하기 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 비-증식 세포, 예컨대 간세포를 형질도입할 수 있다는 점에서 종양-레트로바이러스, 예컨대 무인 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 추가의 이점을 갖는다. 이 벡터는 또한 낮은 면역원성이라는 추가의 이점을 갖는다.
- [0269] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 목적하는 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터는 아데노바이러스 벡터 (A5/35)이다. 또 다른 실시양태에서, CAR을 코딩하는 핵산의 발현은 트랜스포존, 예컨대 슬리핑 뷰티(sleeping beauty), 크리스퍼(crisper), CAS9, 및 징크 핑거(zinc finger) 뉴클레아제를 사용하여 달성할 수 있다. 본원

에 참조로 포함된 문헌 [June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716]을 참고한다.

- [0270] 간단히 요약하면, CAR을 코딩하는 천연 또는 합성 핵산의 발현은 대개 CAR 폴리펩티드 또는 그의 일부를 코딩하는 핵산을 프로모터에 작동가능하게 연결하고, 구축물을 발현 벡터 내로 삽입함으로써 달성된다. 벡터는 복제 및 통합 진핵세포에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열, 및 목적하는 핵산 서열의 발현의 조절을 위해 유용한 프로모터를 함유한다.
- [0271] 본 발명의 발현 구축물은 또한 표준 유전자 전달 프로토콜을 사용한 핵산 면역화 및 유전자 요법을 위해 사용될 수 있다. 유전자 전달을 위한 방법은 관련 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어, 그 전체를 본원에 참조로 포함하는 미국 특허 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466을 참조한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.
- [0272] 핵산은 많은 종류의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드를 포함하나 이에 제한되지는 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특히 중요한 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 및 서열결정 벡터를 포함한다.
- [0273] 또한, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY], 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능성인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택가능 마커를 포함한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 6,326,193).
- [0274] 많은 바이러스 기반 시스템이 포유동물 세포 내로의 유전자 전달을 위해 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 벡터 내로 삽입되고 관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 레트로바이러스 입자 내에 패키징된다. 이어서, 재조합 바이러스는 단리되고, 생체내에서 또는 생체외에서 대상체의 세포로 전달될 수 있다. 많은 레트로바이러스 시스템이 관련 기술분야에 알려져 있다. 몇몇 실시양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 많은 아데노바이러스 벡터가 관련 기술분야에 알려져 있다. 한 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0275] 추가의 프로모터 요소, 예를 들어 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 출발 부위의 30-110 bp 상류의 영역에 위치하지만, 많은 프로모터는 기능성 요소를 또한 출발 부위의 하류에 포함하는 것으로 밝혀졌다. 프로모터 요소 사이의 간격은 자주 탄력적이어서, 프로모터 기능은 요소들이 도립되거나 서로에 대해 이동할 때 보존된다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전의 50 bp까지 증가할 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소는 전사를 활성화하기 위해 서로 협동하거나 또는 독립적으로 기능할 수 있는 것으로 보인다.
- [0276] 포유동물 T 세포 내에서 CAR 도입유전자를 발현할 수 있는 프로모터의 예는 EF1a 프로모터이다. 천연 EF1a 프로모터는 리보솜으로 아미노아실 tRNA의 효소적 전달을 책임지는 연장 인자-1 복합체의 알파 서브유닛의 발현을 유도한다. EF1a 프로모터는 포유동물 발현 플라스미드에서 광범하게 사용되었고, 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝된 도입유전자로부터 CAR 발현을 유도할 때 효과적인 것으로 나타났다. 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]을 참조한다. 한 측면에서, EF1a 프로모터는 서열 100으로서 제공된 서열을 포함한다.
- [0277] 프로모터의 또 다른 예는 극초기 시토크갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 그 서열에 작동가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 그러나, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복체 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 극초기 프로모터, 라우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터, 및 에컨대 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 연장 인자-1α 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나제 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 인간 유전자 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되지 않아야 한다. 유도가능 프로모터도 본 발명의 일부로서 고려되어야 한다. 유도가능 프로모터의 사용은 발현이 요구될 때 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켤 수 있거나, 발현이 요구되지 않을 때 발현을 끌 수 있는 분자 스위

치를 제공한다. 유도가능 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라시클린 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0278] CAR 폴리펩티드 또는 그의 일부의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입되는 발현 벡터는 또한 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염될 목적하는 세포의 집단으로부터 발현 세포의 확인 및 선택을 용이하게 하기 위한 선택가능 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 선택가능 마커는 DNA의 별개의 조각 상에 보유되고, 동시-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택가능 마커 및 리포터 유전자 둘 모두는 숙주 세포 내에서 발현이 가능하도록 하는 적절한 조절 서열과 인접할 수 있다. 유용한 선택가능 마커는 예를 들어 항생제-내성 유전자, 예컨대 neo 등을 포함한다.

[0279] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고 조절 서열의 기능성을 평가하기 위해 사용된다. 일반적으로 리포터 유전자는, 수용자 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 발현되지 않고 그의 발현이 몇몇 쉽게 검출가능한 특성, 예를 들어 효소 활성에 의해 표시되는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후 적절한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제를 코딩하는 유전자, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82] 참조). 적합한 발현 시스템은 잘 알려져 있고, 알려진 기술을 사용하여 제조하거나 상업적으로 입수할 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 최고 수준의 발현을 보이는, 최소 5' 인접 영역을 갖는 구축물은 프로모터로서 확인된다. 상기 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결되고, 프로모터-유도 전사를 조정하는 능력을 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0280] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현시키는 방법은 관련 기술분야에 알려져 있다. 발현 벡터의 측면에서, 벡터는 관련 기술분야의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모, 또는 곤충 세포 내로 쉽게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다.

[0281] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 폭격, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY]을 참조한다. 숙주 세포 내로 폴리뉴클레오티드의 도입을 위한 바람직한 방법은 인산칼슘 형질감염이다.

[0282] 숙주 세포 내로 관심있는 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포 내로 삽입하기 위한 가장 널리 사용되는 방법이다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0283] 숙주 세포 내로 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드 분산액 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미세구, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합된 미셀, 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내에서 및 생체내에서 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포)이다. 핵산의 최신의 표적화된 전달, 예컨대 표적화된 나노입자 또는 다른 적합한 마이크로미터 미만 크기의 전달 시스템을 사용한 폴리뉴클레오티드의 전달을 위한 다른 방법이 이용가능하다.

[0284] 비-바이러스 전달 시스템이 이용될 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제제의 사용은 숙주 세포 내로 핵산의 도입 (시험관내에서, 생체외에서 또는 생체내에서)을 위해 고려된다. 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 회합된다. 지질과 회합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 모두와 회합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 포획되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질 함유 용액 내에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 내에 현탁액으로서 포함되거나, 미셀과 함께 포함되거나 복합체되거나, 또는 지질과 달리 회합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 회합 조성물은 용액 내의 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 이중층 구조로, 미셀로서, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단순히 용액 내에 산재되고, 가능하게는 크기 또는 형태가 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 천연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 천연 발생하는 지방 소적 및 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체, 예컨대 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜, 및 알데히드를 포함하는 화합물의 클래스를 포

함한다.

[0285] 사용하기 적합한 지질은 상업적인 공급원으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 시그마(Sigma, 미국 미주리주 세인트 루이스)로부터 얻을 수 있고; 디세틸 포스페이트 ("DCP")는 케이 & 케이 레보라토리즈(K & K Laboratories, 미국 뉴욕주 플레인뷰)로부터 얻을 수 있고; 콜레스테롤 ("Chol")은 칼바이오켄-베링(Calbiochem-Behring)으로부터 얻을 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 다른 지질은 아반티 폴라 리피즈, 인크.(Avanti Polar Lipids, Inc., 미국 앨라배마주 버밍엄)로부터 얻을 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 내의 지질의 원액은 약 -20℃에서 보관된다. 클로로포름이 유일한 용매로서 사용되고, 이것은 클로로포름이 메탄올보다 쉽게 증발되기 때문이다. "리포솜"은 둘러싸인 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다층막 지질 비히클을 포함하는 포괄적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 다층막 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다수의 지질층을 갖는다. 이들은 인지질이 과량의 수용액 내에 현탁될 때 자연적으로 형성된다. 지질 성분은 폐쇄된 구조의 형성 전에 자가 재배열을 겪고, 물 및 지질 이중층 사이의 용해된 용질을 포획한다 (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나, 정상 소포 구조가 아니라 용액 내에 상이한 구조를 갖는 조성물도 포함된다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조를 취할 수 있거나 또는 단지 지질 분자의 불균일 응집체로서 존재할 수 있다. 또한, 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0286] 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 도입하거나 또는 달리 세포를 본 발명의 억제제에 노출시키기 위해 사용된 방법과 상관없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해 다양한 검정을 수행할 수 있다. 그러한 검정은 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 "분자 생물학적" 검정, 예컨대 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR; 예를 들어 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범위에 포함되는 작용제를 확인하기 위해 본원에 설명된 검정에 의한, 예컨대 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 "생화학적" 검정을 포함한다.

[0287] 본 발명은 CAR 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 한 측면에서, CAR 벡터는 세포, 예를 들어 T 세포 내로 직접 형질도입될 수 있다. 한 측면에서, 벡터는 클로닝 또는 발현 벡터, 예를 들어 하나 이상의 플라스미드 (예를 들어, 발현 플라스미드, 클로닝 벡터, 미니썬클, 미니벡터, 이중 미소 염색체), 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 구축물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 벡터이다. 한 측면에서, 벡터는 포유동물 T 세포 내에서 CAR 구축물을 발현할 수 있다. 한 측면에서, 포유동물 T 세포는 인간 T 세포이다.

[0288] T 세포의 공급원

[0289] 확장 및 유전적 변형에 앞서, T 세포의 공급원을 대상체로부터 얻는다. 용어 "대상체"는 면역 반응이 유도될 수 있는 생존 유기체 (예를 들어, 포유동물)를 포함하고자 의도된다. 대상체의 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트, 및 그의 트랜스제닉 종을 포함한다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막삼출액, 비장 조직, 및 종양을 포함하는 많은 공급원으로부터 얻을 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, 관련 기술분야에서 이용가능한 임의의 많은 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, T 세포는 통상의 기술자에게 알려진 임의의 많은 기술, 예컨대 퍼콜 (Ficoll)TM 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 얻을 수 있다. 하나의 바람직한 측면에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집술에 의해 얻어진다. 성분채집술 생성물은 대개 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포를 포함하는 림프구, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함한다. 한 측면에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고 세포를 후속 처리 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지에 두기 위해 세척될 수 있다. 본 발명의 한 측면에서, 세포를 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세척하였다. 다른 측면에서, 세척 용액은 칼슘이 결여되고, 마그네슘이 결여될 수 있거나 또는 전부는 아니지만 많은 2가 양이온이 결여될 수 있다. 칼슘 부재 하에 초기 활성화 단계는 확대된 활성화를 유도할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 쉽게 이해할 수 있는 바와 같이, 세척 단계는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해, 예컨대 제조자의 지시에 따라 반-자동화 "관류" 원심분리기 (예를 들어, 코브(Cobe) 2991 세포 처리기, 박스터 시토메이트(Baxter CytoMate), 또는 해모네틱스 셀 세이버(Haemonetics Cell Saver) 5)를 사용하여 달성할 수 있다. 세척 후에, 세포를 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대, Ca-비함유, Mg-비함유 PBS, 플라스마라이트(PlasmaLyte) A, 또는 완충제 함유 또는 비함유 다른 염수 용액으로 재현탁할 수 있다. 대안적으로, 성분채집술 샘플의 바람직하지 않은 성분을 제거하고, 세포를 배양 배지 내에 직접 재현탁할 수 있다.

[0290] 한 측면에서, T 세포는 예를 들어 적혈구를 용해시키고 퍼콜(PERCOLL)TM 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심분리 세정에 의해 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 분리된다. T 세포의 특이적 하위집

단, 예컨대 CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및 CD45RO+ T 세포는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, T 세포는 항-CD3/항-CD28 (예를 들어, 3x28)-접합된 비드, 예컨대 다이아비즈(DYNABEADS)® M-450 CD3/CD28 T와 함께 목적하는 T 세포의 양성 선택을 위한 충분한 시간 동안 인큐베이션함으로써 분리된다. 한 측면에서, 시간은 약 30분이다. 추가의 측면에서, 시간은 30분 내지 36시간 또는 그 초과 및 그 사이의 모든 정수 값이다. 추가의 측면에서, 시간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 추가의 또 다른 바람직한 측면에서, 시간은 10 내지 24시간이다. 한 측면에서, 인큐베이션 시간은 24시간이다. 다른 세포 종류에 비해 매우 적은 T 세포가 존재하는 임의의 상황에서, 예컨대 종양 조직으로부터 또는 면역손상된 개체로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)를 분리할 때 T 세포를 분리하기 위해 보다 긴 인큐베이션 시간이 사용될 수 있다. 또한, 보다 긴 인큐베이션 시간의 사용은 CD8+ T 세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 단순히 상기 시간을 단축하거나 연장함으로써 T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 만들고/만들거나, 비드 대 T 세포의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써 (본원에서 추가로 설명되는 바와 같이), 배양 개시시에 또는 과정 동안의 다른 시점에 T 세포의 하위집단을 우선적으로 양성 또는 음성 선택할 수 있다. 추가로, 비드 또는 다른 표면 상의 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체의 비를 증가시키거나 감소시킴으로써, T 세포의 하위집단은 배양 개시시에 또는 과정 동안의 다른 시점에 우선적으로 양성 또는 음성 선택될 수 있다. 통상의 기술자는 다수의 선택 라운드가 본 발명의 측면에서 사용될 수 있음을 알 것이다. 특정 측면에서, 활성화 및 확장 과정에서 선택 절차를 수행하고 "비선택된" 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. "비선택된" 세포는 또한 추가 라운드의 선택에 적용될 수 있다.

[0291] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 농축은 음성 선택된 세포에 특유한 표면 마커에 대해 작용하는 항체의 조합을 사용하여 달성될 수 있다. 한 방법은 음성 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대해 작용하는 모노클로날 항체의 각테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유동 세포추출을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 농축하기 위해, 모노클로날 항체 각테일은 대개 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 특정 측면에서, 대개 CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+, 및 FoxP3+를 발현하는 조절 T 세포를 농축하거나 또는 양성 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 특정 측면에서, T 조절 세포는 항-CD25 접합된 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 고갈된다.

[0292] 한 실시양태에서, IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, 그랜자임 B 및 페르포린, 또는 다른 적절한 분자, 예를 들어 다른 시토카인 중 하나 이상을 발현하는 T 세포 집단이 선택될 수 있다. 세포 발현에 대해 스크리닝하는 방법은 예를 들어 PCT 공개 WO 2013/126712에 기재된 방법에 의해 결정할 수 있다.

[0293] 양성 또는 음성 선택에 의한 세포의 목적하는 집단의 분리를 위해, 세포의 농도 및 표면 (예를 들어, 입자, 예컨대 비드)은 변할 수 있다. 특정 측면에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 (예를 들어, 세포의 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 2십억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 한 측면에서, 1십억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 측면에서, 1억 개의 세포/ml 초과의 농도가 사용된다. 추가의 측면에서, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5천만 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 한 측면에서 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5천만, 또는 1억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 측면에서, 1.25억 또는 1.5억 개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도의 사용은 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장을 유도할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 많은 종양 세포가 존재하는 샘플 (예를 들어, 백혈병 혈액, 종양 조직 등)로부터 관심 있는 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포의 보다 효율적인 포획을 가능하게 한다. 그러한 세포의 집단은 치료 가치를 가질 수 있고, 얻는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 높은 농도의 세포를 사용하면, 정상적으로는 보다 약한 CD28 발현을 보이는 CD8+ T 세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있다.

[0294] 관련 측면에서, 보다 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포 및 표면 (예를 들어, 입자, 예컨대 비드)의 혼합물을 유의하게 희석함으로써, 입자와 세포 사이에 상호작용이 최소화된다. 이것은 입자에 결합되는 다량의 요구되는 항원을 발현하는 세포를 선택한다. 예를 들어, CD4+ T 세포는 보다 높은 수준의 CD28을 발현하고, 희석 농도에서 CD8+ T 세포보다 더 효율적으로 포획된다. 한 측면에서, 사용된 세포의 농도는 5×10^6 /ml이다. 다른 측면에서, 사용된 농도는 약 1×10^5 /ml 내지 1×10^6 /ml, 및 그 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.

[0295] 다른 측면에서, 세포를 2-10°C 또는 실온에서 상이한 속도로 상이한 시간 동안 회전장치에서 인큐베이션할 수 있다.

- [0296] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 후에 동결될 수 있다. 이론에 매이기를 바라지 않지만, 동결 및 후속적인 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도의 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 후에, 세포는 동결 용액 내에 현탁될 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터가 관련 기술분야에 알려져 있고 상기 맥락에서 유용할 것이지만, 한 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% 플라스마라이트-A, 31.25% 텍스트로스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로스, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO 또는 예를 들어, 헤스판(Hespan) 및 플라스마라이트 A를 포함하는 다른 적합한 세포 동결 매질을 함유하는 배양 배지를 사용하는 것을 수반하고, 세포는 이어서 1℃/분의 속도로 -80℃로 동결하고, 액체 질소 저장 탱크의 증기상에 보관한다. 다른 제어 동결 방법 및 -20℃에서의 또는 액체 질소 내의 즉각적인 제어되지 않은 동결이 사용될 수 있다.
- [0297] 특정 측면에서, 동결보존된 세포를 해동하고 본원에 설명된 바와 같이 세척하고, 1시간 동안 실온에서 휴지시킨 후, 본 발명의 방법을 사용하여 활성화시킨다.
- [0298] 또한, 본 발명의 측면에서 본원에 기재된 바와 같은 확장된 세포가 필요할 수 있을 때 이전에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집술 생성물의 수집이 고려된다. 따라서, 확장시킬 세포의 공급원은 필요한 임의의 시점에 수집하고, 요구되는 세포, 예컨대 T 세포를 단리하고, T 세포 요법으로부터 도움을 받을 임의의 많은 질환 또는 병태, 예컨대 본원에 설명된 것에 대한 T 세포 요법에 추후 사용하기 위해 동결시킬 수 있다. 한 측면에서, 혈액 샘플 또는 성분채집술 생성물은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취한다. 특정 측면에서, 혈액 샘플 또는 성분채집술 생성물은 질환이 발병할 위험이 있지만 아직 질환이 발병하지 않은 일반적으로 건강한 대상체로부터 채취하고, 관심 있는 세포를 단리하고, 추후 사용을 위해 동결시킨다. 특정 측면에서, T 세포는 확장되고, 동결되고, 나중에 사용될 수 있다. 특정 측면에서, 샘플은 본원에 설명된 바와 같은 특정 질환의 진단 직후에, 그러나 임의의 치료 이전에 환자로부터 수집된다. 추가의 측면에서, 세포는 나탈리주맵, 에팔리주맵, 항바이러스제, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역절제제, 예컨대 캄파트(CAMPATH), 항-CD3 항체, 시톡산(Cytoxan), 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228와 같은 작용제, 및 방사선조사를 사용하는 치료를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 많은 관련 치료 양식 이전에 대상체로부터 혈액 샘플 또는 성분채집술 생성물로부터 단리된다.
- [0299] 본 발명의 추가의 측면에서, T 세포는 기능성 T 세포를 사용한 대상체의 치료 후에 환자로 부터 직접 환자로 부터 얻는다. 이와 관련하여, 특정 암 치료, 특히 면역계를 손상시키는 약물을 사용한 치료 후에, 환자가 치료로부터 정상적으로 회복되는 기간 동안 치료 직후에, 얻어진 T 세포의 품질은 생체외에서 확장하는 그들의 능력 면에서 최적화되거나 개선될 수 있음이 관찰되었다. 마찬가지로, 본원에 설명된 방법을 이용한 생체외 조작 후에, 이들 세포는 향상된 이식 및 생체내 확장을 위한 바람직한 상태로 존재할 수 있다. 따라서, 상기 회복기 동안 T 세포, 수지상 세포, 또는 조혈 계열의 다른 세포를 포함하는 혈액 세포를 수집하는 것이 본 발명의 측면 내에서 고려된다. 추가로, 특정 측면에서, 특히 요법을 따른 규정된 시간 구간 동안 특정 세포 종류의 재증식, 재순환, 재생, 및/또는 확장이 유리한 조건을 대상체에 생성하기 위해 동원 (예를 들어, GM-CSF를 사용한 동원) 및 조건화 방법이 사용될 수 있다. 예시적인 세포 종류는 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 면역계의 다른 세포를 포함한다.
- [0300] **T 세포의 활성화 및 확장**
- [0301] T 세포는 일반적으로 예를 들어 미국 특허 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국 특허 출원 공개 20060121005에 기재된 방법을 이용하여 활성화되고 확장될 수 있다.
- [0302] 일반적으로, 본 발명의 T 세포는 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 작용제 및 T 세포의 표면 상의 공동자극 분자를 자극하는 리간드가 부착된 표면과 접촉시킴으로써 확장될 수 있다. 특히, T 세포 집단은 본원에 설명된 바와 같이, 예컨대 항-CD3 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 표면 상에 고정된 항-CD2 항체와 접촉시킴으로써, 또는 칼슘 이온운반체와 공동으로 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)와 접촉시킴으로써 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자의 공동-자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드를 사용한다. 예를 들어, T 세포의 집단은 T 세포의 증식을 자극하기 위해 적절한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28

항체와 접촉될 수 있다. 항-CD28 항체의 예는 9.3, B-T3, XR-CD28 (디아클론(Diaclone, 프랑스 브장송))을 포함하고, 관련 기술분야에 통상적으로 공지된 다른 방법이 사용될 수 있다 ([Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998]; [Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999]; [Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999]).

[0303] 특정 측면에서, T 세포에 대한 1차 자극 신호 및 공동자극 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각각의 신호를 제공하는 작용제는 용액 내에 존재하거나 표면에 커플링될 수 있다. 표면에 커플링될 때, 작용제는 동일한 표면 (즉, "시스" 형태) 또는 별개의 표면 (즉, "트랜스" 형태)에 커플링될 수 있다. 대안적으로, 한 작용제는 표면에 커플링되고, 다른 작용제는 용액 내에 존재할 수 있다. 한 측면에서, 공동자극 신호를 제공하는 작용제는 세포 표면에 결합하고, 1차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 용액 내에 존재하거나 표면에 커플링된다. 특정 측면에서, 두 작용제 모두 용액 내에 존재할 수 있다. 한 측면에서, 작용제는 가용성 형태로 존재한 후, 표면, 예컨대 Fc를 발현하는 세포 또는 작용제에 결합할 항체 또는 다른 결합제에 가교결합될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명에서 T 세포를 활성화하고 확장하는데 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)에 대해, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 20040101519 및 20060034810을 참조한다.

[0304] 한 측면에서, 2개의 작용제는 동일한 비드 상에, 즉, "시스"로, 또는 별개의 비드에, 즉, "트랜스"로 비드 상에 고정된다. 예를 들어, 1차 활성화 신호를 제공하는 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 공동자극 신호를 제공하는 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고; 두 작용제 모두 동일한 비드에 동등한 분자량으로 동시에 고정된다. 한 측면에서, CD4+ T 세포 확장 및 T 세포 성장을 위해 비드에 결합된 1:1 비의 각각의 항체가 사용된다. 본 발명의 특정 측면에서, 비드에 결합된 항 CD3:CD28 항체의 비는 1:1의 비를 이용하여 관찰된 확장에 비해 T 세포 확장의 증가가 관찰되도록 사용된다. 한 특정 측면에서, 1:1의 비를 사용하여 관찰된 확장에 비해 약 1 내지 약 3배의 증가가 관찰된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100 및 그 사이의 모든 정수 값이다. 본 발명의 한 측면에서, 항-CD3 항체보다 더 많은 항-CD28 항체가 입자에 결합되고, 즉, CD3:CD28의 비는 1 미만이다. 본 발명의 특정 측면에서, 비드에 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체의 비는 2:1을 초과한다. 하나의 특정 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:100 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:75 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가의 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:50 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:30 CD3:CD28 비가 사용된다. 하나의 바람직한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:10 CD3:CD28 비가 사용된다. 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 1:3 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가의 한 측면에서, 비드에 결합된 항체의 3:1 CD3:CD28 비가 사용된다.

[0305] 1:500 내지 500:1 및 상기 범위 내의 임의의 정수 값의 입자 대 세포의 비가 T 세포 또는 다른 표적 세포를 자극하기 위해 사용될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 쉽게 이해할 수 있는 바와 같이, 입자 대 세포의 비는 표적 세포에 대한 입자 크기에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 작은 크기의 비드는 몇몇 세포에만 결합할 수 있지만, 더 큰 비드는 많은 세포에 결합할 수 있다. 특정 측면에서, 세포 대 입자의 비는 1:100 내지 100:1 및 그 사이의 임의의 정수 값이고, 추가의 측면에서, 비는 1:9 내지 9:1 및 그 사이의 임의의 정수 값을 포함하고, 또한 T 세포를 자극하기 위해 사용될 수 있다. T 세포 자극을 유발하는 항-CD3- 및 항-CD28-커플링된 입자 대 T 세포의 비는 상기 나타낸 바와 같이 상이할 수 있지만, 특정한 바람직한 값은 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1을 포함하고, 하나의 바람직한 비는 T 세포당 적어도 1:1 입자이다. 한 측면에서, 1:1 또는 그 미만의 입자 대 세포의 비가 사용된다. 하나의 특정 측면에서, 바람직한 입자:세포 비는 1:5이다. 추가의 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극일에 따라 변할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 입자 대 세포의 비는 제1일에 1:1 내지 10:1이고, 추가의 입자가 이어서 세포에 매일 또는 격일로 10일까지의 시간 동안 1:1 내지 1:10의 최종 비 (첨가일의 세포 계수를 기초로 하여)로 첨가된다. 하나의 특정 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극 제1일에 1:1이고, 자극 제3일 및 제5일에 1:5로 조정된다. 한 측면에서, 입자를 제1일에 1:1, 및 자극 제3일 및 제5일에 1:5의 최종 비로 매일 또는 격일 기준으로 첨가한다. 한 측면에서, 입자 대 세포의 비는 자극 제1일에 2:1이고, 자극 제3일 및 제5일에 1:10으로 조정된다. 한 측면에서, 입자를 제1일에 1:1, 및 자극 제3일 및 제5일에 1:10의 최종 비로 매일 또는 격일 기준으로 첨가한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 다양한 다른 비가 본 발명에 사용하기 적합할 수 있음을 이해할 것이다. 특히, 비는 입자 크기 및 세포 크기 및 종류에 따라 상이할 것이다. 한 측면에서, 사용하기 위한 가장 전형적인 비는 제1일에 약 1:1, 2:1 및 3:1이다.

[0306] 본 발명의 추가의 측면에서, 세포, 예컨대 T 세포는 작용제-코팅된 비드와 조합되고, 비드 및 세포를 후속적으

로 분리한 후, 세포를 배양한다. 다른 측면에서, 배양 전에, 작용제-코팅된 비드 및 세포를 분리하지 않고, 함께 배양한다. 추가의 측면에서, 비드 및 세포는 먼저 힘, 예컨대 자력을 인가하여 농축함으로써, 세포 표면 마커의 라이게이션을 증가시켜 세포 자극을 유도한다.

[0307] 예를 들어, 세포 표면 단백질은 항-CD3 및 항-CD28이 부착되는 상자성 비드 (3x28 비드)가 T 세포에 결합하도록 함으로써 라이게이션될 수 있다. 한 측면에서, 세포 (예를 들어, 10^4 내지 10^9 개 T 세포) 및 비드 (예를 들어, 1:1 비율의 다이아비즈® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)를 완충제, 예를 들어 PBS (2가 양이온, 예컨대, 칼슘 및 마그네슘 미함유) 내에 조합한다. 다시, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 임의의 세포 농도가 사용될 수 있음을 쉽게 이해할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포는 샘플에 매우 드물 수 있고, 단지 샘플의 0.01%만을 이루거나 또는 전체 샘플 (즉, 100%)이 관심 있는 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 세포 수가 본 발명의 측면에 포함된다. 특정 측면에서, 세포 및 입자의 최대 접촉을 보장하기 위해 입자 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 (즉, 세포의 농도를 증가시키는) 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 측면에서, 약 2십억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 한 측면에서, 1억 개의 세포/ml 초과 농도가 사용된다. 추가의 측면에서, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5천만 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 한 측면에서 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5천만, 또는 1억 개의 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 측면에서, 1.25억 또는 1.5억 개의 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 높은 농도의 사용은 증가된 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장을 유도할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 관심 있는 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포, 예컨대 CD28-음성 T 세포의 보다 효율적인 포획을 가능하게 한다. 그러한 세포의 집단은 치료 가치를 가질 수 있고, 특정 측면에서 얻는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 높은 농도의 세포를 사용하면, 정상적으로는 보다 약한 CD28 발현을 보이는 CD8+ T 세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있다.

[0308] 본 발명의 한 측면에서, 혼합물은 수 시간 (약 3시간) 내지 약 14일 또는 그 사이의 임의의 정수 시간 값 동안 배양될 수 있다. 한 측면에서, 혼합물은 21일 동안 배양할 수 있다. 본 발명의 한 측면에서, 비드 및 T 세포를 약 8일 동안 함께 배양한다. 한 측면에서, 비드 및 T 세포를 2-3일 동안 함께 배양한다. 또한, T 세포의 배양 시간이 60일 이상이 될 수 있도록 몇 주기의 자극이 요구될 수 있다. T 세포 배양을 위해 적절한 조건은 혈청 (예를 들어, 태아 소 또는 인간 혈청), 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , 및 TNF- α 또는 통상의 기술자에게 알려진 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 포함하는 증식 및 생존에 필요한 인자를 포함할 수 있는 적절한 배지 (예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는, X-vivo 15 (론자(Lonza)))를 포함한다. 세포의 성장을 위한 다른 첨가제는 계면활성제, 플라스마네이트, 및 환원제, 예컨대 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 배지는 혈청-비함유 또는 적절한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 규정된 세트의 호르몬으로 보충된 아미노산, 피루브산나트륨, 및 비타민, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장을 위해 충분한 양의 시토카인(들)과 함께 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, 및 X-Vivo 20, 최적화제를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험적 배양에만 포함되고, 대상체 내에 주입되어야 하는 세포의 배양물에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 지지하기 위해 필요한 조건, 예를 들어 적절한 온도 (예를 들어, 37°C) 및 분위기 (예를 들어, 공기 + 5% CO₂) 하에 유지된다.

[0309] 상이한 자극 횟수에 노출된 T 세포는 상이한 특징을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 일반적인 혈액 또는 성분채집된 말초 혈액 단핵 세포 생성물은 세포독성 또는 억제인자 T 세포 집단 (TC, CD8+)보다 큰 헬퍼 T 세포 집단 (TH, CD4+)을 갖는다. 자극성 CD3 및 CD28 키메라에 의한 T 세포의 생체외 확장은 약 제8-9일 이전에는 주로 TH 세포로 이루어진 T 세포의 집단을 생산하는 반면, 약 제8-9일 후에 T 세포의 집단은 TC 세포의 점증하는 더 큰 집단을 포함한다. 따라서, 치료의 목적에 따라, 대상체에게 주로 TH 세포를 포함하는 T 세포 집단을 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, TC 세포의 항원-특이적 하위세트가 단리되면, 이 하위세트를 더 큰 정도로 확장시키는 것으로 유익할 수 있다.

[0310] 추가로, CD4 및 CD8 마커 이외에, 다른 표현형 마커는 세포 확장 과정 동안 유의하게, 그러나 대부분 재현가능하게 상이하다. 따라서, 그러한 재현가능성 때문에, 특정 목적을 위해 활성화된 T 세포 생성물을 적합하게 조정할 수 있다.

[0311] CD19 CAR이 구축된 후, 예컨대 항원 자극 후에 T 세포를 확장시키고, 제자극 부재 하에 T 세포 확장을 유지하는 능력, 및 적절한 시험관내 및 동물 모델에서의 항암 활성을 포함하나 이에 제한되지는 않는 분자의 활성을 평가하기 위해 다양한 검정이 사용될 수 있다. CD19 CAR의 효과를 평가하기 위한 검정을 아래에 추가로 상세히 설명된다.

- [0312] 1차 T 세포에서 CAR 발현의 웨스턴 블롯 분석은 단량체 및 이량체의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)]을 참조한다. 아주 간단히 설명하면, CAR을 발현하는 T 세포 ($CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 1:1 혼합물)를 10일 초과 동안 시험관내에서 확장시킨 후, 용해 및 환원 조건 하의 SDS-PAGE를 수행한다. 전장 TCR- ζ 세포질 도메인 및 내인성 TCR- ζ 쇄를 포함하는 CAR은 TCR- ζ 쇄에 대한 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 검출된다. 동일한 T 세포 하위세트는 공유 이량체 형성의 평가를 허용하는 비-환원 조건 하의 SDS-PAGE 분석을 위해 사용된다.
- [0313] 항원 자극 후에 CAR^+ T 세포의 시험관내 확장은 유동 세포측정에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 혼합물을 $\alpha CD3/\alpha CD28$ aAPC로 자극한 후, 분석할 프로모터의 제어 하에 GFP를 발현하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입시킨다. 예시적인 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1 α , 유비퀴틴 C, 또는 포스포글리세로키나제 (PGK) 프로모터를 포함한다. GFP 형광은 유동 세포측정에 의해 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포 하위세트에서 배양 제6일에 평가된다. 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)]을 참조한다. 대안적으로, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 혼합물을 제0일에 $\alpha CD3/\alpha CD28$ 코팅된 자기 비드로 자극하고, 2A 리보솜 스킵핑 서열을 사용하여 eGFP와 함께 CAR을 발현하는 2시스템성 렌티바이러스 벡터를 사용하여 제1일에 CAR로 형질도입시킨다. 배양물을 세척 후에 항CD3 및 항-CD28 항체 (K562-BBL-3/28)의 존재 하에 $CD19^+$ K562 세포 (K562-CD19), 야생형 K562 세포 (K562 야생형) 또는 hCD32 및 4-1BBL을 발현하는 K562 세포로 재자극한다. 외인성 IL-2를 배양물에 격일로 100 IU/ml로 첨가한다. GFP $^+$ T 세포를 비드-기반 계수를 이용하여 유동 세포측정에 의해 계수한다. 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)]을 참조한다.
- [0314] 재자극의 부재 하에 지속된 CAR^+ T 세포 확장을 또한 측정할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)] 참조). 간단히 설명하면, 평균 T 세포 부피 (f1)은 제0일에 $\alpha CD3/\alpha CD28$ 코팅된 자기 비드를 사용한 자극, 및 제1일에 나타난 CAR을 사용한 형질도입 후에 코울터(Coulter) 멀티사이저(Multisizer) III 입자 계수기를 사용하여 배양 제8일에 측정한다.
- [0315] CART 활성을 측정하기 위해 동물 모델을 또한 사용할 수 있다. 예를 들어, 면역결핍 마우스에서 1차 인간 프리-B ALL을 치료하기 위해 인간 $CD19$ -특이적 CAR^+ T 세포를 사용하는 이중이식편 모델을 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)] 참조). 간단히 설명하면, ALL의 확립 후에, 마우스를 처리군으로 무작위로 나누었다. 상이한 수의 $\alpha CD19$ - ζ 및 $\alpha CD19$ -BB- ζ 조작된 T 세포를 1:1 비로 B-ALL를 보유하는 NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ 마우스 내에 동시주사하였다. 마우스로부터의 비장 DNA 내의 $\alpha CD19$ - ζ 및 $\alpha CD19$ -BB- ζ 벡터의 카피수를 T 세포 주사 후에 다양한 시간에 평가한다. 동물을 백혈병에 대해 매주 간격으로 평가한다. 말초 혈액 $CD19^+$ B-ALL 모세포 계수를 $\alpha CD19$ - ζ CAR^+ T 세포 또는 모의-형질도입된 T 세포를 주사한 마우스에서 측정하였다. 군에 대한 생존 곡선을 로그 순위 검정 사용하여 비교한다. 또한, NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ 마우스에서 T 세포 주사 4주 후에 절대 말초 혈액 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 계수를 또한 분석할 수 있다. 마우스에게 백혈병 세포를 주사하고, 3주 후에 eGFP에 연결된 CAR을 코딩하는 2시스템성 렌티바이러스 벡터에 의해 CAR을 발현하도록 조작된 T 세포를 주사한다. T 세포를 주사에 앞서 모의-형질도입된 세포와 혼합함으로써 45-50% 투입 GFP $^+$ T 세포로 표준화하고, 유동 세포측정에 의해 확인한다. 1주 간격으로 백혈병에 대해 동물을 평가한다. CAR^+ T 세포군에 대한 생존 곡선을 로그 순위 검정을 사용하여 비교한다.
- [0316] 용량 의존성 CAR 치료 반응을 평가할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)] 참조). 예를 들어, 제21일에 CAR T 세포, 동등한 수의 모의-형질도입시킨 T 세포를 주입하거나 또는 T 세포를 주입하지 않은 마우스에서 백혈병 확립 35-70일 후에 말초 혈액을 얻는다. 각각의 군으로부터의 마우스를 말초 혈액 $CD19^+$ ALL 모세포 계수의 결정을 위해 무작위로 채혈한 후, 제35일 및 제49일에 치사시킨다. 남아있는 동물을 제57일 및 제70일에 평가한다.
- [0317] 세포 증식 및 시토카인 생산의 평가는 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)]에서 이전에 설명되었다. 간단히 설명하면, CAR-매개 증식의 평가는 세척된 T 세포를 $CD19$ (K19) 또는 $CD32$ 및 $CD137$ (KT32-BBL)을 발현하는 K562 세포와 2:1의 최종 T-세포:K562 비로 혼합함으로써 마이크로타이터

플레이트에서 수행된다. K562 세포에 사용 전에 감마-방사선을 조사한다. 항-CD3 (클론 OKT3) 및 항-CD28 (클론 9.3) 모노클로날 항체를 배양물에 첨가하고, KT32-BBL 세포는 T-세포 증식을 자극하기 위한 양성 대조군으로 기능하고, 이것은 이들 신호가 생체외에서 장기간 CD8⁺ T 세포 확장을 지지하기 때문이다. T 세포는 제조자가 설명한 바와 같이 카운트브라이트(CountBright)TM 형광 비드 (인비트로젠(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드)) 및 유동 세포측정기를 사용하여 배양물에서 계수한다. CAR⁺ T 세포는 eGFP-2A 연결 CAR-발현 렌티바이러스 벡터로 조작된 T 세포를 사용한 GFP 발현에 의해 확인된다. GFP를 발현하지 않는 CAR⁺ T 세포에 대해, CAR⁺ T 세포는 비오틴화 재조합 CD19 단백질 및 2차 아비딘-PE 접합체로 검출된다. T 세포 상의 CD4⁺ 및 CD8⁺ 발현은 또한 특이적 모노클로날 항체 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences))로 동시에 검출된다. 시토카인 측정은 제조자의 지시에 따라 인간 TH1/TH2 시토카인 세포측정 비드 어레이 키트 (비디 바이오사이언시스, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 재자극 24시간 후에 상청액에 대해 수행된다. 형광을 FACS칼리버 (FACScalibur) 유동 세포측정기를 사용하여 평가하고, 데이터를 제조자의 지시에 따라 분석한다.

[0318] 세포독성은 표준 51Cr-방출 검정에 의해 평가할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464 (2009)]을 참조한다. 간단히 설명하면, 표적 세포 (K562 세포주 및 1차 프로-B-ALL 세포)를 37°C에서 2시간 동안 빈번하게 교반하면서 51Cr (NaCrO4로서, 뉴 잉글랜드 뉴클리어(New England Nuclear, 미국 매사추세츠주 보스턴))를 로딩하고, 완전 RPMI 내에 2회 세척하고, 마이크로타이터 플레이트 내로 플레이팅한다. 이펙터 T 세포를 웰 내에서 완전 RPMI 내에서 표적 세포와, 이펙터 세포:표적 세포 (E:T)의 다양한 비로 혼합한다. 배지만 함유하는 (자연 방출, SR) 또는 트리톤-X100 세제의 1% 용액 (총 방출, TR)을 함유하는 추가의 웰을 또한 제조한다. 37°C에서 4시간 인큐베이션한 후, 각각의 웰로부터 상청액을 수거한다. 이어서, 방출된 51Cr을 감마 입자 계수기 (패카드 인스트루먼트 코.(Packard Instrument Co., 미국 매사추세츠주 윌담))를 사용하여 측정한다. 각각의 조건은 적어도 삼중으로 수행되고, 용해 백분율은 다음 식을 사용하여 계산된다: % 용해 = (ER - SR)/(TR - SR) (여기서, ER은 각각의 실험 조건에서 방출된 평균 51Cr을 나타낸다).

[0319] 영상화 기술이 종양-보유 동물 모델에서 CAR의 특이적 수송 및 증식을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 상기 검정은 예를 들어 문헌 [Barrett et al., Human Gene Therapy 22: 1575-1586 (2011)]에 기재되어 있다. 간단히 설명하면, NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NSG) 마우스에게 Nalm-6 세포를 IV 주사하고, 7일 후에 CAR 구축물을 사용한 전기천공 4시간 후에 T 세포를 주사한다. T 세포를 반딧불이 루시페라제를 발현하도록 렌티바이러스 구축물로 안정하게 형질감염시키고, 마우스를 생체발광에 대해 영상화한다. 대안적으로, Nalm-6 이종이식편 모델에서 CAR⁺ T 세포의 단일 주사의 치료 효능 및 특이성은 다음과 같이 측정할 수 있다: 반딧불이 루시페라제를 발현하도록 형질도입된 NSG 마우스에게 Nalm-6을 주사한 후, 7일 후에 CD19 CAR로 전기천공된 T 세포를 꼬리-정맥에 1회 주사한다. 동물을 주사 후 다양한 시점에서 영상화한다. 예를 들어, 제5일 (치료 2일 전) 및 제8일 (CAR⁺ PBL 24 hr 후)에 대표적인 마우스에서 반딧불이 루시페라제 양성 백혈병의 광자-밀도 열 지도를 생성할 수 있다.

[0320] 본원의 실시예 섹션에서 설명되는 것 및 관련 기술분야에 알려진 것을 포함하는 다른 검정도 본 발명의 CD19 CAR 구축물을 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0321] 치료 용도

[0322] CD19 연관 질환 및/또는 장애

[0323] 한 측면에서, 본 발명은 CD19 발현과 연관된 질환의 치료 방법을 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 종양의 일부는 CD19에 대해 음성이고 종양의 일부는 CD19에 대해 양성인 질환의 치료 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 CAR은 상승된 CD19의 발현과 연관된 질환의 치료를 거친 대상체의 치료에 유용하고, 여기서 상승된 수준의 CD19에 대한 치료를 거친 대상체는 상승된 수준의 CD19와 연관된 질환을 보인다.

[0324] 한 측면에서, 본 발명은 포유동물 T 세포 내에서 발현을 위해 프로모터에 작동가능하게 연결된 CD19 CAR을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 한 측면에서, 본 발명은 CD19-발현 종양을 치료하는데 사용하기 위한 CD19 CAR을 발현하는 재조합 T 세포를 제공하고, 여기서 CD19 CAR을 발현하는 재조합 T 세포는 CD19 CART로 불린다. 한 측면에서, 본 발명의 CD19 CART는 CART가 종양 세포를 표적화하고 종양의 성장이 억제되도록 종양 세포를 그의 표면 상에 발현된 본 발명의 적어도 하나의 CD19 CAR과 접촉시킬 수 있다.

[0325] 한 측면에서, 본 발명은 CART가 항원에 반응하여 활성화되고 암세포를 표적화하도록 종양 세포를 본 발명의 CD19 CAR T 세포와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 종양의 성장이 억제되는 것인, CD19-발현 종양 세포의 성

장을 억제하는 방법에 관한 것이다.

- [0326] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암의 치료 방법에 관한 것이다. 이 방법은 대상체에서 암이 치료되도록 대상체에게 본 발명의 CD19 CAR T 세포를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 CD19 CAR T 세포에 의해 치료가능한 암의 예는 CD19의 발현과 연관된 암이다. 한 측면에서, CD19의 발현과 연관된 암은 혈액암이다. 한 측면에서, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다. 한 측면에서, CD19의 발현과 연관된 암은 예를 들어 B-세포 급성 림프성 백혈병 ("BALL"), T-세포 급성 림프성 백혈병 ("TALL"), 급성 림프성 백혈병 (ALL)을 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 급성 백혈병; 예를 들어 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 만성 백혈병을 포함하나 이에 제한되지 않는 암 및 악성종양을 포함한다. CD19의 발현과 연관된 추가의 암 또는 혈액 병태는 예를 들어 B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포 - 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨 림프종, 형질모구성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 및 골수성 혈액 세포의 비효과적인 생산 (또는 이형성)과 연관된 혈액 병태의 다양한 집단인 "전백혈병" 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. CD19의 발현과 연관된 추가의 질환은 예를 들어, CD19의 발현과 연관된 비정형 및/또는 비전형 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0327] 몇몇 실시양태에서, 예를 들어 본원에 설명된 CD19 CAR로 치료될 수 있는 암은 다발성 골수종이다. 다발성 골수종은 골수 내의 형질 세포 클론의 축적을 특징으로 하는 혈액의 암이다. 다발성 골수종에 대한 현재의 요법은 탈리도마이드의 유사체인 레날리도마이드를 사용하는 치료를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 레날리도마이드는 항종양 활성, 혈관신생 억제, 및 면역조정을 포함하는 활성을 갖는다. 일반적으로, 골수종 세포는 유동 세포측정에 의해 CD19 발현에 대해 음성인 것으로 생각된다. 본 발명은 실시예 6에서 입증된 바와 같이 작은 비율의 골수종 종양 세포가 CD19를 발현한다는 인식을 포함한다. 따라서, 몇몇 실시양태에서, 예를 들어 본원에 기재된 C19 CAR은 골수종 세포를 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, CD19 CAR 요법은 하나 이상의 추가의 요법, 예를 들어 레날리도마이드 치료와 조합으로 사용될 수 있다.
- [0328] 본 발명은 T 세포를 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 유전자 변형시키고, CAR T 세포를 그를 필요로 하는 수용자에 주입하는 일종의 세포 요법을 포함한다. 주입된 세포는 수용자 내에서 종양 세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 치료제와는 달리, CAR-변형된 T 세포는 생체내에서 복제할 수 있어 장기간 존속하고, 이에 의해 지속된 종양 제어가 가능하다. 다양한 측면에서, 환자에 투여된 T 세포, 또는 그의 자손체는 환자에게 T 세포를 투여한 후에 환자 내에서 적어도 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 2년, 3년, 4년, 또는 5년 동안 지속된다.
- [0329] 본 발명은 또한 T 세포를 키메라 항원 수용체 (CAR)를 일시적으로 발현하도록, 예를 들어 시험관내 전사된 RNA에 의해 변형시키고, CAR T 세포를 그를 필요로 하는 수용자에 주입하는 일종의 세포 요법을 포함한다. 주입된 세포는 수용자 내에서 종양 세포를 사멸시킬 수 있다. 따라서, 다양한 측면에서, 환자에게 투여된 T 세포는 환자에게 T 세포 투여 후에 1개월 미만, 예를 들어 3주, 2주, 1주 동안 존재한다.
- [0330] 임의의 특정 이론에 매이기를 바라지 않지만, CAR-변형된 T 세포에 의해 유도된 항종양 면역 반응은 능동 또는 수동 면역 반응일 수 있거나, 또는 대안적으로 직접 대 간접 면역 반응에 의한 것일 수 있다. 한 측면에서, CAR 형질도입시킨 T 세포는 CD19를 발현하는 인간 암세포에 반응하여 특이적 전염증성 시토카인 분비 및 강력한 세포용해 활성을 보이고, 가용성 CD19 억제에 저항하고, 방관자 사멸을 매개하고, 확립된 인간 종양의 퇴행을 매개한다. 예를 들어, CD19-발현 종양의 불균일 영역 내의 항원이 없는 종양 세포는 인접한 항원-양성 암세포에 대해 이전에 반응한 CD19-재유도된 T 세포에 의한 간접적인 파괴에 감수성일 수 있다.
- [0331] 한 측면에서, 본 발명의 완전-인간 CAR-변형된 T 세포는 포유동물에서 생체의 면역화 및/또는 생체내 요법을 위한 백신의 일종일 수 있다. 한 측면에서, 포유동물은 인간이다.
- [0332] 생체의 면역화에 관하여, 다음 중 적어도 하나가 세포를 포유동물 내로 투여하기 전에 시험관내에서 발생한다: i) 세포의 확장, ii) CAR을 코딩하는 핵산의 세포 내로의 도입 또는 iii) 세포의 동결보존.
- [0333] 생체의 절차는 관련 기술분야에 잘 알려져 있고, 아래에 보다 상세히 논의한다. 간단히 설명하면, 세포는 포유동물 (예를 들어, 인간)로부터 분리하고, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터로 유전자 변형된다 (즉, 시험관내

에서 형질도입 또는 형질감염된다). CAR-변형된 세포는 치료 이익을 제공하도록 포유동물 수용자에게 투여될 수 있다. 포유동물 수용자는 인간일 수 있고, CAR-변형된 세포는 수용자에 관하여 자가일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수용자에 관하여 동종, 동계 또는 이종일 수 있다.

[0334] 조혈 줄기 및 전구체 세포의 생체의 확장 절차는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 5,199,942에 설명되어 있고, 본 발명의 세포에 적용될 수 있다. 다른 적합한 방법이 관련 기술분야에 알려져 있고, 따라서 본 발명은 세포의 생체의 확장을 위한 임의의 특정 방법으로 제한되지 않는다. 간단히 설명하면, T 세포의 생체의 배양 및 확장은 (1) 말초 혈액 수거물 또는 골수 외식편으로부터 포유동물의 CD34+ 조혈 줄기 및 전구체 세포를 수집하고; (2) 상기 세포를 생체외에서 확장시키는 것을 포함한다. 미국 특허 5,199,942에 기재된 세포 성장 인자에 추가로, 다른 인자, 예컨대 flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드가 세포의 배양 및 확장을 위해 사용될 수 있다.

[0335] 생체의 면역화 측면에서 세포-기반 백신을 사용하는 것에 추가로, 본 발명은 또한 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0336] 일반적으로, 본원에 설명된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포는 면역손상된 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 이용될 수 있다. 특히, 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 CD19의 발현과 연관된 질환, 장애 및 병태의 치료에서 사용된다. 특정 측면에서, 본 발명의 세포는 CD19의 발현과 연관된 질환, 장애 및 병태를 발병할 위험이 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 CAR-변형된 T 세포를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, CD19의 발현과 연관된 질환, 장애 및 병태의 치료 또는 예방을 위한 방법을 제공한다.

[0337] 한 측면에서, 본 발명의 CART 세포는 증식성 질환, 예컨대 암 또는 악성종양 또는 전암성 병태, 예컨대 골수이형성증, 골수이형성 증후군 또는 전백혈병을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 한 측면에서, 암은 혈액암이다. 한 측면에서, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다. 한 측면에서, 본 발명의 CART 세포는 암 및 악성종양, 예컨대, 비제한적인 예를 들어 B-세포 급성 림프성 백혈병 ("BALL"), T-세포 급성 림프성 백혈병 ("TALL"), 급성 림프성 백혈병 (ALL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 급성 백혈병; 예를 들어, 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 만성 백혈병; 예를 들어, B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포- 또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨 림프종, 형질모구성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신생물, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 골수성 혈액 세포의 비효과적인 생산 (또는 이형성)과 연관된 혈액 병태의 다양한 집단인 "전백혈병"을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 혈액암 또는 혈액 병태 등을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 추가의 CD19 발현과 연관된 질환은 예를 들어, CD19를 발현하는 비정형 및/또는 비전형 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CD19의 발현과 연관된 비-암 관련 적응증은 예를 들어 자가면역 질환, (예를 들어, 루푸스), 염증성 장애 (알레르기 및 천식) 및 이식을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0338] 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 단독으로, 또는 희석제 및/또는 다른 성분, 예컨대 IL-2 또는 다른 시토카인 또는 세포 집단과 조합된 제약 조성물로서 투여될 수 있다.

[0339] 혈액암

[0340] 혈액암 병태는 암의 종류, 예컨대 혈액, 골수 및 림프계에 영향을 주는 백혈병 및 악성 림프증식성 병태이다.

[0341] 백혈병은 급성 백혈병 및 만성 백혈병로서 분류될 수 있다. 급성 백혈병은 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 급성 림프성 백혈병 (ALL)으로서 추가로 분류될 수 있다. 만성 백혈병은 만성 골수성 백혈병 (CML) 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함한다. 다른 관련 병태는 골수성 혈액 세포의 비효과적인 생산 (또는 이형성) 및 AML로의 변환 위험과 연관된 혈액 병태의 다양한 집단인 골수이형성 증후군 (MDS, 이전에 "전백혈병"으로 알려짐)을 포함한다.

[0342] 본 발명은 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 한 측면에서, 암은 혈액암이고, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다. 한 측면에서, 본 발명의 CART 세포는 암 및 악성종양, 예컨대, 비제한적인 예를 들어, B-세포 급성 림프성 백혈병 ("BALL"), T-세포 급성 림프성 백혈병 ("TALL"), 급성 림프성 백혈병 (ALL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 급성 백혈병; 예를 들어, 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 만성 백혈병; 예를 들어, B 세포 전림프구성 백혈병, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 버킷 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상 세포 백혈병, 소세포-

또는 대세포-여포성 림프종, 악성 림프증식성 병태, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 변연부 림프종, 다발성 골수종, 골수이형성증 및 골수이형성 증후군, 비-호지킨 림프종, 형질모구성 림프종, 형질세포양 수지상 세포 신 생물, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증, 및 골수성 혈액 세포의 비효과적인 생산 (또는 이형성)과 연관된 혈액 병태의 다양한 집단인 "전백혈병"을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 혈액암 또는 혈액 병태 등을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 추가의 CD19 발현과 연관된 질환은 예를 들어, CD19를 발현하는 비정형 및/또는 비전 형 암, 악성종양, 전암성 병태 또는 증식성 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0343] 본 발명은 또한 CD19-발현 세포 집단의 증식을 억제하거나 감소시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 CD19-발현 세포를 포함하는 세포의 집단을 CD19-발현 세포에 결합하는 본 발명의 항-CD19 CART 세포와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명은 CD19를 발현하는 암세포의 집단의 증식을 억제하거나 감소시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 CD19-발현 암세포 집단을 CD19-발현 세포에 결합하는 본 발명의 항-CD19 CART 세포와 접촉시키는 것을 포함한다. 한 측면에서, 본 발명은 CD19를 발현하는 암세포의 집단의 증식을 억제하거나 감소시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 CD19-발현 암 세포 집단을 CD19-발현 세포에 결합하는 본 발명의 항-CD19 CART 세포와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명의 항-CD19 CART 세포는 골수성 백혈병 또는 CD19-발현 세포와 연관된 또 다른 암을 갖는 대상체 또는 그에 대한 동물 모델에서 세포 및/또는 암 세포의 수량, 수, 양 또는 백분율을 음성 대조군에 비해 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 감소시킨다. 한 측면에서, 대상체는 인간이다.

[0344] 본 발명은 또한 CD19-발현 세포와 연관된 질환 (예를 들어, 혈액암 또는 CD19를 발현하는 비정형적인 암)을 예방, 치료 및/또는 관리하는 방법을 제공하고, 이 방법은 CD19-발현 세포에 결합하는 본 발명의 항-CD19 CART 세포를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 측면에서, 대상체는 인간이다. CD19-발현 세포와 연관된 장애의 비-제한적인 예는 자가면역 장애 (예컨대 루푸스), 염증성 장애 (예컨대 알레르기 및 천식) 및 암 (예컨대 혈액암 또는 CD19를 발현하는 비정형적인 암)을 포함한다.

[0345] 본 발명은 또한 CD19-발현 세포와 연관된 질환을 예방, 치료 및/또는 관리하는 방법을 제공하고, 이 방법은 CD19-발현 세포에 결합하는 본 발명의 항-CD19 CART 세포를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 측면에서, 대상체는 인간이다.

[0346] 본 발명은 CD19-발현 세포와 연관된 암의 재발을 예방하는 방법을 제공하고, 이 방법은 CD19-발현 세포에 결합하는 본 발명의 항-CD19 CART 세포를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 측면에서, 이 방법은 CD19-발현 세포에 결합하는 본원에 기재된 유효량의 항-CD19 CART 세포를 유효량의 또 다른 요법과 조합하여 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0347] 조합 요법

[0348] 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 다른 알려진 작용제 및 요법과 조합으로 사용될 수 있다. "조합으로" 투여되는 이란 본원에서 사용되는 바와 같이, 2개의 (또는 그 초과) 상이한 치료제가 대상체가 장애로 고통받는 동안 대상체에게 전달됨을 의미하고, 예를 들어 대상체가 장애로 진단된 후에 및 장애가 치유되거나 제거되기 전에 또는 치료가 다른 이유로 종료되기 전에 2개 이상의 치료제가 전달된다. 몇몇 실시양태에서, 한 치료제의 전달은 제2 치료제의 전달이 시작될 때 계속 이루어지고, 이에 의해 투여가 중복된다. 이것은 때로 본원에서 "동시" 또는 "병용 전달"로 언급된다. 다른 실시양태에서, 한 치료제의 전달은 다른 치료제의 전달이 시작될 때 종료된다. 두 경우의 몇몇 실시양태에서, 치료는 조합 투여 때문에 더 효과적이다. 예를 들어, 제2 치료제가 보다 효과적이고, 예를 들어 동등한 효과가 제2 치료제 미투여시에 관찰되거나, 또는 제2 치료제는 제2 치료제가 제1 치료제의 부재 하에 투여될 경우 관찰되는 것보다 더 큰 정도로 증상을 감소시키거나, 또는 제1 치료제와 유사한 상황이 관찰된다. 몇몇 실시양태에서, 전달은 증상, 또는 장애와 관련된 다른 파라미터의 감소가, 다른 치료제의 부재 하에 한 치료제의 전달시에 관찰되는 것보다 더 크도록 한다. 2개의 치료제의 효과는 부분 적으로 상가적, 완전히 상가적이거나, 또는 상가적 효과보다 더 클 수 있다. 전달은 전달되는 제1 치료제의 효과가 제2 치료제가 전달될 때 계속 검출가능하도록 하는 것일 수 있다.

[0349] 본원에 기재된 CAR-발현 세포 및 적어도 하나의 추가의 치료제는 동시에, 동일한 조성물 내에 또는 별개의 조성물 내에, 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적인 투여를 위해, 본원에 기재된 CAR-발현 세포가 먼저 투여될 수 있고 추가의 작용제는 두 번째로 투여될 수 있거나, 투여 순서가 역전될 수 있다.

[0350] 추가의 측면에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 수술, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역절제제, 예컨대 캄파트, 항-

CD3 항체 또는 다른 항체 치료제, 사이토신, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 시토카인, 및 방사선조사, 펩티드 백신, 예컨대 문헌 [Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971]에 설명된 것과 조합하여 치료 요법에서 사용될 수 있다.

[0351] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포는 화학치료제와 조합으로 사용될 수 있다. 예시적인 화학치료제는 안트라시클린 (예를 들어, 독소루비신 (예를 들어, 리포솜화 독소루비신)), 빈카 알칼로이드 (예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈), 알킬화제 (예를 들어, 시클로포스파미드, 데카르바진, 멜팔란, 이포스파미드, 테모졸로미드), 면역 세포 항체 (예를 들어, 알렘투주맙, 겐투주맙, 리툽시맙, 토시투모맙), 항대사물질 (예를 들어, 엽산 길항제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체 및 아데노신 데아미나제 억제제 (예를 들어, 플루다라빈) 포함), mTOR 억제제, TNFR 글루코코르티코이드 유도된 TNFR 관련 단백질 (GITR) 효능제, 프로테아솜 억제제 (예를 들어, 아클라시노마이신 A, 글리오톡신 또는 보르테조미), 면역조절물질, 예컨대 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유도체 (예를 들어, 레날리도마이드)를 포함한다.

[0352] 조합 요법에서 사용하는 것으로 고려되는 일반적인 화학치료제는 아나스트로졸 (아리미덱스(Arimidex)®), 비칼루타미드 (카소덱스(Casodex)®), 황산블레오마이신 (블레녹산(Blenoxane)®), 부술판 (미레란(Myleran)®), 부술판 주사제 (부설팩스(Busulfex)®), 카페시타빈 (젤로다®), N4-헵톡시카르보닐-5-데옥시-5-플루오로시티딘, 카르보플라틴 (파라플라틴(Paraplatin)®), 카르무스틴 (비아이시엔유(BiCNU)®), 클로람부실 (류케란(Leukeran)®), 시스플라틴 (플라티놀(Platinol)®), 클라드리빈 (류스타틴(Leustatin)®), 시클로포스파미드 (시톡산® 또는 네오사르(Neosar)®), 시타라빈, 시토신 아라비노시드 (싸이토사유(Cytosar-U)®), 시타라빈 리포솜 주사 (데포사이트(DepoCyt)®), 다카르바진 (디티아이씨-돔(DTIC-Dome)®), 닥티노마이신 (악티노마이신-D(Actinomycin-D), 코스메간(Cosmegen)), 염산다우노루비신 (세루비딘(Cerubidine)®), 구연산다우노루비신 리포솜 주사 (다우노솜(DaunoXome)®), 텍사메타손, 도세탁셀 (탁소텔(Taxotere)®), 염산독소루비신 (아드리아마이신(Adriamycin)®, 루텍스(Rubex)®, 에토포시드 (베페시드(Vepesid)®), 인산플루다라빈 (플루다라(Fludara)®), 5-플루오로우라실 (아드루실(Adrucil)®, 에퓨덱스(Efudex)®, 플루타미드 (유렉신(Eulexin)®, 테자시티빈, 겐시타빈 (디플루오로데옥시시티딘), 히드록시우레아 (하이드리아(Hydrea)®), 이다루비신 (이다마이신(Idamycin)®, 이포스파미드 (이팩스(IFEX)®, 이리노테칸 (캄프토사(Camptosar)®), L-아스파라기나제 (엘스파(ELSPAR)®, 류코보린 칼슘, 멜팔란 (알케란(Alkeran)®), 6-메르캅토피린 (퓨리네톨(Purinethol)®), 메토크세이트 (폴렉스(Folex)®), 미톡산트론 (노반트론(Novantrone)®, 마일로타그(mylotarg), 파클리탁셀 (탁솔(Taxol)®), 피닉스(phoenix) (이트륨(Yttrium)90/MX-DTPA), 펜토스타틴, 카르무스틴 임플란트 (implant)를 갖는 폴리페프로산 20 (글리아델(Gliadel)®, 구연산타목시펜 (놀바덱스(Nolvadex)®, 테니포사이드 (부몬(Vumon)®), 6-티오구아닌, 치오테과, 티라파자민 (티라존(Tirazone)®, 주사용 염산토포테칸 (하이캄틴(Hycamptin)®, 빈블라스틴 (벨반(Velban)®, 빈크리스틴 (온코빈(Oncovin)®, 및 비노렐빈 (나벨빈(Navelbine)®)를 포함한다.

[0353] 예시적인 알킬화제는 비제한적으로 질소 머스타드, 에틸렌이민 유도체, 알킬 술포네이트, 니트로소우레아 및 트리아젠): 우라실 머스타드 (아미노우라실 머스타드(Aminouracil Mustard)®, 클로레타미나실 (Chlorethaminacil)®, 데메틸도판(Demethylidopan)®, 데스메틸도판(Desmethylidopan)®, 해만타민(Haemanthamine)®, 노르도판(Nordopan)®, 우라실 나이트로젠 머스타드(Uracil nitorgen mustard)®, 우라실 로스트(Uracillost)®, 우라실모스타자(Uracilmostaza)®, 우라무스틴(Uramustin)®, 우라무스틴(Uramustine)®, 클로르메틴 (무스타젠(Mustargen)®, 시클로포스파미드 (시톡산®, 네오사르(Neosar)®, 클라펜(Clafen)®, 엔독산(Endoxan)®, 프로사이톡스(Procytox)®, 레비문(Revimmune)™), 이포스파미드 (미톡사나(Mitoxana)®), 멜팔란 (알케란®), 클로람부실 (류케란®), 피포브로만 (아메델(Amedel)®, 베르사이트(Vercyte)®, 트리에틸렌멜라민 (헤멜(Hemel)®, 헥살렌(Hexalen)®, 헥사스탯트(Hexastat)®, 트리에틸렌티오포스포라민, 테모졸로미드 (테모다르(Temodar)®, 치오테과 (치오플렉스(Thioplex)®), 부술판 (부설팩스(Busilvex)®, 미레란®, 카르무스틴 (비아이시엔유®), 로무스틴 (시이이엔유(CeeNU)®), 스트렙토조신 (자노사르(Zanosar)®), 및 다카르바진 (디티아이씨-돔®)을 포함한다. 추가의 예시적인 알킬화제는 비제한적으로 옥살리플라틴 (엘록사틴(Eloxatin)®); 테모졸로미드 (테모다르® 및 테모달®); 닥티노마이신 (악티노마이신디, 코스메겐(Cosmegen)®으로도 알려짐); 멜팔란 (L-PAM, L-사르코리신, 및 페닐알라닌 머스타드, 알케란®으로도 알려짐); 알트레타민 (헥사메틸멜라민 (HMM), 헥살렌®으로도 알려짐); 카르무스틴 (비아이시엔유®); 벤다무스틴 (트린다(Treanda)®); 부술판 (부설팩스® 및 미레란®); 카르보플라틴 (파라플라틴®); 로무스틴 (시이이엔유(CCNU), 시이이엔유®로도 알려짐); 시스플라틴 (CDDP, 플라티놀® 및 플라티놀®-AQ로도 알려짐); 클로람부실 (류케란®); 시클로포스파미드 (시톡산® 및 네오사르®); 다카르바진 (디티아이씨(DTIC), DIC 및 이미다졸 카복사미드, 디티아이씨-돔®으로도 알려짐); 알트레타민 (헥사메틸멜라민 (HMM), 헥살렌®으로도 알려짐); 이포스파미

드 (이펙스®); 프레드누무스틴; 프로카르바진 (마추란(Matulane)®); 메클로레타민 (질소 머스타드, 무스틴 및 염산메클로레타민, 무스타젠®으로도 알려짐); 스트렙토조신 (자노사르®); 치오테파 (티오포스포아미드, TESPA 및 TSPA, 치오플렉스®로도 알려짐); 시클로포스포미드 (엔독산®, 시톡산®, 네오사르®, 프로사이톡스®, 레비문®); 및 벤다무스틴 HCl (트린다®)을 포함한다.

[0354] 예시적인 mTOR 억제제는 예를 들어, 템실로리무스; 리다포로리무스 (이전에 데페로리무스로서 알려짐, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R, 23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-디히드록시-19,30-디메톡시-15,17,21,23,29,35-헥사메틸-2,3,10,14,20-펜타옥소-11,36-디옥사-4-아자트리시클로[30.3.1.0^{4,9}]헥사트리아콘타-16,24,26,28-테트라엔-12-일]프로필]-2-메톡시시클로헥실 디메틸포스피네이트, 또한 AP23573 및 MK8669로도 알려지고, PCT 공개 WO 03/064383에 기재됨); 에베로리무스 (아피니토(Afinitor)® 또는 RAD001); 라파마이신 (AY22989, 실로리무스(Sirolimus)®); 시마피모드 (CAS 164301-51-3); 엠실로리무스, (5-{2,4-비스[(3S)-3-메틸모르폴린-4-일]피리도[2,3-d]피리미딘-7-일}-2-메톡시페닐)메탄올 (AZD8055); 2-아미노-8-[트랜스-4-(2-히드록시에톡시)시클로헥실]-6-(6-메톡시-3-피리미딜)-4-메틸-피리도[2,3-d]피리미딘-7(8H)-온 (PF04691502, CAS 1013101-36-4); 및 N²-[1,4-디옥소-4-[[4-(4-옥소-8-페닐-4H-1-벤조피란-2-일)모르폴리늄-4-일]메톡시]부틸]-L-아르기닐글리실-L-α-아스파르틸 L-세린, 내부염 (SF1126, CAS 936487-67-1), 및 XL765를 포함한다.

[0355] 예시적인 면역조절물질은 예를 들어 아푸투주맵 (로슈(Roche)®로부터 이용가능함); 페그필그라스티 (뉴라스타(Neulasta)®); 레날리도마이드 (CC-5013, 레블리미드(Revlimid)®); 탈리도마이드 (탈로미드(Thalomid)®), 악티미드 (CC4047); 및 IRX-2 (인터류킨 1, 인터류킨 2, 및 인터페론 γ을 포함한 인간 시토카인의 혼합물, CAS 951209-71-5, 아이알엑스 테라퓨틱스(IRX Therapeutics)로부터 이용가능함)을 포함한다.

[0356] 예시적인 안트라시클린은 예를 들어 독소루비신 (아드리아마이신® 및 루텍스®); 블레오마이신 (블레녹산®); 다우노루비신 (염산다우노루비신, 다우노마이신, 및 염산루비도마이신, 세루비딘®); 리포솜화 다우노루비신 (구연산다우노루비신 리포솜, 다우노솜®); 미톡산트론 (DHAD, 노반트론®); 에피루비신 (엘렌스(Ellence)™); 이다루비신 (이다마이신®, 이다마이신 PFS®); 미토마이신 C (무타마이신(Mutamycin)®); 겔다나마이신; 헤르비마이신; 라비도마이신; 및 데스아세틸라비도마이신을 포함한다.

[0357] 예시적인 빈카 알칼로이드는 예를 들어 주석산비노렐빈 (나벨빈®), 빈크리스틴 (온코빈®), 및 빈데신 (엘디신(Eldisine)®)); 빈블라스틴 (또한 황산빈블라스틴, 빈카류코블라스틴 및 VLB, 알카반(Alkaban)-AQ® 및 벨반®로서도 알려짐); 및 비노렐빈 (나벨빈®)을 포함한다.

[0358] 예시적인 프로테오솜 억제제는 보르테조미 (벨케이드(Velcade)®); 카르필조미 (PX-171-007, (S)-4-메틸-N-((S)-1-(((S)-4-메틸-1-((R)-2-메틸옥시란-2-일)-1-옥소펜탄-2-일)아미노)-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)-2-((S)-2-(2-모르폴리노아세타미도)-4-페닐부탄아미도)-펜탄아미드); 마리조미 (NPI-0052); 구연산 익사조미 (MLN-9708); 데란조미 (CEP-18770); 및 O-메틸-N-[(2-메틸-5-티아졸릴)카르보닐]-L-세틸-O-메틸-N-[(1S)-2-[(2R)-2-메틸-2-옥시라닐]-2-옥소-1-(페닐메틸)에틸]-L-세린아미드 (ONX-0912)를 포함한다.

[0359] 예시적인 G1TR 효능제는 예를 들어, G1TR 융합 단백질 및 항-G1TR 항체 (예를 들어, 2가 항-G1TR 항체), 예컨대, 예를 들어 미국 특허 6,111,090, 유럽 특허 090505B1, 미국 특허 8,586,023, PCT 공개 WO 2010/003118 및 2011/090754에 기재된 G1TR 융합 단백질, 또는 예를 들어 미국 특허 7,025,962, 유럽 특허 1947183B1, 미국 특허 7,812,135, 미국 특허 8,388,967, 미국 특허 8,591,886, 유럽 특허 EP 1866339, PCT 공개 WO 2011/028683, PCT 공개 WO 2013/039954, PCT 공개 WO2005/007190, PCT 공개 WO 2007/133822, PCT 공개 WO2005/055808, PCT 공개 WO 99/40196, PCT 공개 WO 2001/03720, PCT 공개 WO99/20758, PCT 공개 WO2006/083289, PCT 공개 WO 2005/115451, 미국 특허 7,618,632, 및 PCT 공개 WO 2011/051726에 기재된 항-G1TR 항체를 포함한다.

[0360] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR 발현 세포는 mTOR 억제제, 예를 들어 본원에 설명되는 mTOR 억제제, 예를 들어 에베로리무스와 같은 라파로그와 조합으로 대상체에게 투여된다. 한 실시양태에서, mTOR 억제제는 CAR-발현 세포에 앞서 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, mTOR 억제제는 세포의 성분채집술에 앞서 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체는 CLL에 걸려 있다.

[0361] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR 발현 세포는 G1TR 효능제, 예를 들어 본원에 설명되는 G1TR 효능제와 조합으로 대상체에게 투여된다. 한 실시양태에서, G1TR 효능제는 CAR-발현 세포에 앞서 투여된다. 예를 들어, 한

실시양태에서, G1TR 효능제는 세포의 성분채집술에 앞서 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체는 CLL에 걸려 있다.

[0362] 칼슘 의존성 포스포타제 칼시뉴린을 억제하는 약물 (시클로스포린 및 FK506) 또는 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제하는 약물 (라파마이신) ([Liu et al., Cell 66:807-815, 1991]; [Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991]; [Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993])이 또한 사용될 수 있다. 추가의 측면에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, 플루다라빈과 같은 화학요법제를 사용하는 T 세포 절제 요법, 외부 빔 (external-beam) 방사선 요법 (XRT), 시클로포스파미드, 및/또는 항체, 예컨대 OKT3 또는 캄파트와 공동으로(예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에게 투여될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 세포 조성물은 B-세포 절제 요법, 예컨대 CD20과 반응하는 작용제, 예를 들어 리툭산(Rituxan) 이후에 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 대상체는 말초 혈액 줄기세포 이식 이후 고용량 화학요법을 이용한 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 실시양태에서, 이식 이후에, 대상체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가의 실시양태에서, 확장된 세포는 수술 전에 또는 수술 이후에 투여된다.

[0363] 한 실시양태에서, 대상체는 CAR-발현 세포의 투여와 연관된 부작용을 감소 또는 개선시키는 작용제를 투여받을 수 있다. CAR-발현 세포의 투여와 연관된 부작용은 CRS, 및 혈구포식성 림프조직구성증식증 (HLH, 또한 대식세포 활성화 증후군 (MAS)으로 칭함)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CRS의 증상은 고열, 구역, 일시적 저혈압, 저산소증 등을 포함한다. 따라서, 본원에 설명된 방법은 본원에 기재된 CAR-발현 세포를 대상체에게 투여하고, CAR-발현 세포를 사용하는 치료로부터 발생하는 상승된 수준의 가용성 인자를 관리하기 위해 작용제를 추가로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체에서 상승되는 가용성 인자는 IFN- γ , TNF α , IL-2 및 IL-6 중 하나 이상이다. 따라서, 상기 부작용을 치료하기 위해 투여되는 작용제는 이들 가용성 인자 중 하나 이상을 중화시키는 작용제일 수 있다. 그러한 작용제는 스테로이드, TNF α 의 억제제, 및 IL-6의 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. TNF α 억제제의 예는 엔타네르셉트이다. IL-6 억제제의 예는 토실리주맙 (toc)이다.

[0364] 한 실시양태에서, 대상체에게 CAR-발현 세포의 활성을 향상시키는 작용제를 투여할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 작용제는 억제 분자를 억제하는 작용제일 수 있다. 억제 분자, 예를 들어 프로그램화된 사멸 1 (PD1)은 몇몇 실시양태에서 면역 이펙터 반응을 일으키는 CAR-발현 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 억제 분자의 예는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및 TIGIT 베타를 포함한다. 예를 들어, DNA, RNA 또는 단백질 수준에서 억제에 의한 억제 분자의 억제는 CAR-발현 세포 성능을 최적화할 수 있다. 임의의 실시양태에서, 억제성 핵산, 예를 들어 dsRNA, 예를 들어 siRNA 또는 shRNA와 같은 억제성 핵산이 CAR-발현 세포에서 억제 분자의 발현을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 억제제는 shRNA이다. 한 실시양태에서, 억제 분자는 CAR-발현 세포 내에서 억제된다. 이들 실시양태에서, 억제 분자의 발현을 억제하는 dsRNA 분자는 CAR의 성분, 예를 들어 모든 성분을 코딩하는 핵산에 연결된다. 한 실시양태에서, 억제성 신호의 억제제는 예를 들어, 억제 분자에 결합하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 예를 들어, 작용제는 PD1, PD-L1, PD-L2 또는 CTLA4 (예를 들어, 이필리무맙 (또한 MDX-010 및 MDX-101로서도 칭하고, 예르보이 (Yervoy®; 브리스톨-마이어스 스킵(Bristol-Myers Squibb)로서 시판됨); 트레멜리무맙 (화이자(Pfizer)로부터 이용가능한 IgG2 모노클로날 항체, 이전에 티실리무맙, CP-675,206으로서 알려짐))에 결합하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 한 실시양태에서, 작용제는 TIM3에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 작용제는 LAG3에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다.

[0365] PD1은 CD28, CTLA-4, ICOS, 및 BTLA를 또한 포함하는 CD28 패밀리의 수용체의 억제성 구성원이다. PD1은 활성화된 B 세포, T 세포 및 골수성 세포 상에서 발현된다 (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). PD1, PD-L1 및 PD-L2에 대한 2개의 리간드는 PD1에 결합할 때 T 세포 활성화를 하향조절하는 것으로 나타났다 ([Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34]; [Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8]; [Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43]). PD-L1은 인간 암에 풍부하다 ([Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7]; [Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314]; [Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094]). 면역 억제는 PD1과 PD-L1의 국소 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있다. PD1, PD-L1 및 PD-L2의 항체, 항체 단편 및 다른 억제제는 관련 기술분야에서 이용가능하고, 본원에 기재된 CD19 CAR과 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 니볼루맙 (또한 BMS-936558 또는 MDX1106으로서 칭함; 브리스톨-마이어스 스킵)은 PD1을 특이적으로 차단하는 완전 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. 니볼루맙 (클론 5C4) 및 PD1에 특이적으로 결합하는 다른 인간 모노클로날 항체는 US 8,008,449 및 WO2006/121168에 기재되어 있다. 피딜리주맙 (CT-011; 큐어텍(Cure Tech))은 PD1에 결합하는 인간화 IgG1k 모노클로날 항체이다. 피딜리주맙 및 다른 인간화 항-PD1 모노클로날

항체는 WO2009/101611에 기재되어 있다. 램브롤리주맵 (또한 MK03475로도 칭함; 머크(Merck))은 PD1에 결합하는 인간화 IgG4 모노클로날 항체이다. 램브롤리주맵 및 다른 인간화 항-PD1 항체는 US 8,354,509 및 WO2009/114335에 개시되어 있다. MDPL3280A (제넨테크(Genentech)/로슈)는 PD-L1에 결합하는 인간 Fc 최적화된 IgG1 모노클로날 항체이다. MDPL3280A 및 PD-L1에 대한 다른 인간 모노클로날 항체는 미국 특허 7,943,743 및 미국 특허 출원 공개 20120039906에 개시되어 있다. 다른 항-PD-L1 결합체는 YW243.55.S70 (중쇄 및 경쇄 가변 영역이 WO2010/077634의 서열 20 및 21에 제시되어 있다) 및 MDX-1 105 (또한 BMS-936559로서도 칭함, 예를 들어 WO2007/005874에 개시된 항-PD-L1 결합체)을 포함한다. AMP-224 (B7-DCIg; 암플리문 (Amplimmune); 예를 들어 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 개시됨)는 PD1 및 B7-H1 사이의 상호작용을 차단하는 PD-L2 Fc 융합 가용성 수용체이다. 다른 항-PD1 항체는 AMP 514 (암플리문), 특히 예를 들어 US 8,609,089, US 2010028330 및/또는 US 20120114649에 개시된 항-PD1 항체를 포함한다.

[0366] 몇몇 실시양태에서, CAR-발현 세포의 활성을 향상시키는 작용제는 예를 들어, 제1 도메인 및 제2 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있고, 여기서 제1 도메인은 억제 분자 또는 그의 단편이고, 제2 도메인은 양성 신호와 연관된 폴리펩티드, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩티드이다. 몇몇 실시양태에서, 양성 신호와 연관된 폴리펩티드는 CD28, CD27, ICOS의 공동자극 도메인, 예를 들어 CD28, CD27 및/또는 ICOS의 세포내 신호전달 도메인, 및/또는 예를 들어, 본원에 설명된 것과 같은 CD3 제타의 1차 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 CAR을 발현하는 동일한 세포에 의해 발현된다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 항-CD19 CAR을 발현하지 않는 세포, 예를 들어 T 세포에 의해 발현된다.

[0367] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 세포의 활성을 향상시키는 작용제는 miR-17-92이다.

[0368] 제약 조성물 및 치료

[0369] 본 발명의 제약 조성물은 본원에 설명된 바와 같은 CAR-발현 세포, 예를 들어 복수의 CAR-발현 세포를 하나 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합으로 포함할 수 있다. 상기 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 방부제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 한 측면에서 정맥내 투여를 위해 제제화된다.

[0370] 본 발명의 제약 조성물은 치료할 (또는 예방할) 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여의 양 및 빈도는 환자의 상태, 환자의 질환의 종류 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이지만, 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 것이다.

[0371] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 예를 들어 내독소, 미코플라스마, 복제 적격 렌티바이러스 (RCL), p24, VSV-G 핵산, HIV gag, 잔류 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드, 마우스 항체, 모여진 인간 혈청, 소 혈청 알부민, 소 혈청, 배양 배지 성분, 박터 패키징 세포 또는 플라스미드 성분, 박테리아 및 진균으로 이루어진 군으로부터 선택된 오염물이 실질적으로 없고, 예를 들어 검출가능한 수준의 오염물이 없다. 한 실시양태에서, 박테리아는 알칼리 게네스 패칼리스(*Alcaligenes faecalis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 나이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 및 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 그룹 A로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나이다.

[0372] "면역학적 유효량", "항종양 유효량", "종양-억제 유효량", 또는 "치료량"이 지시될 때, 투여할 본 발명의 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 및 환자 (대상체)의 상태에서의 개체 차이를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 본원에 기재된 T 세포를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^9 세포/kg 체중, 몇몇 경우에 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중 (상기 범위 내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여될 수 있는 것으로 일반적으로 언급될 수 있다. T 세포 조성물은 또한 이들 투여량으로 다수의 횟수로 투여할 수 있다. 세포는 면역요법에서 일반적으로 알려진 주입 기술을 이용하여 투여할 수 있다 (예를 들어 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988] 참조).

[0373] 특정 측면에서, 활성화된 T 세포를 대상체에게 투여한 후, 후속적으로 혈액을 재채취하고 (성분채집술을 수행하고), 본 발명에 따라 그로부터 T 세포를 활성화하고, 환자에게 이들 활성화되고 확장된 T 세포를 재주입하는 것

이 바람직할 수 있다. 상기 과정은 수주마다 다수의 횟수로 수행할 수 있다. 특정 측면에서, T 세포는 10 cc 내지 400cc의 혈액 채취로부터 활성화될 수 있다. 특정 측면에서, T 세포는 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc 또는 100 cc의 혈액 채취로부터 활성화된다.

[0374] 대상 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수술, 체내이식 또는 이식에 의한 것을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행할 수 있다. 본원에 설명되는 조성물은 경동맥, 피하, 피부내, 종양내, 결절내, 수질내, 근육내, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해, 또는 복강내로 환자에게 투여될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 피부내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 한 측면에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 i.v. 주사에 의해 투여된다. T 세포의 조성물은 종양, 림프절, 또는 감염 부위 내로 직접 투여될 수 있다.

[0375] 특정 예시적인 측면에서, 대상체는 백혈구구성분채집술을 받을 수 있고, 여기서 백혈구는 수집되고, 농축되거나, 또는 생체외에서 고갈되어 관심 있는 세포, 예를 들어 T 세포를 선택하고/하거나 분리한다. 이들 T 세포 분리물은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 확장되고, 본 발명의 하나 이상의 CAR 구축물이 도입되어, 본 발명의 CAR T 세포를 생성할 수 있도록 처리될 수 있다. 그를 필요로 하는 대상체는 후속적으로 말초 혈액 줄기세포 이식 이후 고용량 화학요법을 이용한 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 측면에서, 이식 이후에 또는 이식과 동시에, 대상체는 본 발명의 확장된 CAR T 세포의 주입을 받는다. 추가의 측면에서, 확장된 세포는 수술 전에 또는 수술 이후에 투여된다.

[0376] 환자에게 투여할 상기 치료제의 투여량은 치료되는 병태의 정확한 성질 및 치료의 수용자에 따라 변할 것이다. 인간 투여를 위한 투여량의 스케일링은 관련 기술분야에 인정되는 실무에 따라 수행할 수 있다. 예를 들어, 일반적으로 캄파트에 대한 용량은 대체로 1 내지 30일 기간 동안 매일 투여되는, 성인 환자에 대해 1 내지 약 100 mg 범위일 것이다. 바람직한 일일 용량은 1 내지 10 mg/일이지만, 몇몇 경우에 40 mg/일까지의 보다 많은 용량을 사용할 수 있다 (미국 특허 6,120,766에 기재된).

[0377] 한 실시양태에서, CAR 분자는 예를 들어, 시험관내 전사를 사용하여 T 세포 내에 도입되고, 대상체 (예를 들어, 인간)에게 본 발명의 CAR T 세포를 초기 투여하고, 본 발명의 CAR T 세포를 1회 이상 후속 투여하고, 여기서 1회 이상의 후속 투여는 선행 투여 후 15일 이내에, 예를 들어 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2일에 투여된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR T 세포의 1회 초과 투여는 매주 대상체 (예를 들어, 인간)에게 투여되고, 예를 들어 본 발명의 CAR T 세포는 매주 2, 3 또는 4회 투여된다. 한 실시양태에서, 대상체 (예를 들어, 인간 대상체)에게 CAR T 세포를 매주 1회 초과로 투여한 후 (예를 들어, 매주 2, 3 또는 4회 투여) (본원에서 주기로서도 칭함), 1주 동안 CAR T 세포를 투여하지 않고, 이어서, CAR T 세포의 1회 이상의 추가 투여 (예를 들어, 매주 CAR T 세포의 1회 초과 투여)를 대상체에게 실시한다. 또 다른 실시양태에서, 대상체 (예를 들어, 인간 대상체)에게 CAR T 세포를 1회 초과 주기로 투여하고, 각각의 주기 사이의 시간은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 또는 3일 미만이다. 한 실시양태에서, CAR T 세포는 매주 3회 투여를 위해 격일로 투여된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR T 세포는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 또는 그 초과 동안 투여된다.

[0378] 한 측면에서, CD19 CART는 렌티바이러스 바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스를 이용하여 생성된다. 상기 방식으로 생성된 CART는 안정한 CAR 발현을 가질 것이다.

[0379] 한 측면에서, CART는 형질도입 후 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15일 동안 CAR 벡터를 일시적으로 발현한다. CAR의 일시적 발현은 RNA CAR 벡터 전달에 의해 실행될 수 있다. 한 측면에서, CAR RNA는 전기천공에 의해 T 세포 내로 형질도입된다.

[0380] 일시적으로 발현하는 CAR T 세포를 사용하여 (특히, 무린 scFv 보유 CART를 사용하여) 치료받는 환자에서 일어날 수 있는 잠재적인 문제는 다수 치료 후 아나필락시스이다.

[0381] 상기 이론에 매이지 않지만, 그러한 아나필락시스 반응은 체액성 항-CAR 반응, 즉, 항-IgE 이소형을 갖는 항-CAR 항체를 생성하는 환자에 의해 유발될 수 있는 것으로 생각된다. 환자의 항체 생산 세포는 항원에 노출에서 10 내지 14일 휴지기가 있을 때 IgG 이소형 (아나필락시스를 유발하지 않는)으로부터 IgE 이소형으로 클래스 스위칭을 겪는 것으로 생각된다.

[0382] 환자가 일시적 CAR 요법 (예컨대, RNA 형질도입에 의해 생성된 것)의 과정 동안 항-CAR 항체 반응을 일으킬 위험이 크면, CART 주입 휴지기는 10 내지 14일 초과로 지속되어서는 안 된다.

[0383] 실시예

[0384] 본 발명은 다음 실험 실시예를 참조로 추가로 상세히 설명된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로

제공되고, 달리 명시하지 않으면 제한을 의도하지 않는다. 따라서, 본 발명은 어떠한 방식으로든 다음 실시예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되고, 대신에 본원에 제공된 교시내용의 결과로서 자명해지는 임의의 및 모든 변이를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0385] 추가의 설명 없이, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 선행하는 상세한 설명과 아래의 예시적인 실시예를 이용하여, 본 발명의 화합물을 제조하고 이용하고 청구된 방법을 실시할 수 있는 것으로 생각된다. 다음 실시예는 본 발명의 다양한 측면을 구체적으로 나타내고, 나머지 개시내용을 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0386] **실시예 1: 뮤린 항-CD19 항체의 인간화**

[0387] 뮤린 CD19 항체의 인간화는 마우스-특이적 잔기가 CART19 치료에서 인간-항-마우스 항원 (HAMA) 반응을 유도할 수 있는 임상 상황에서, 즉, CAR19 구축물을 형질도입시킨 T 세포를 사용한 치료를 받는 환자에서 요구된다. 하이브리도마 유래된 뮤린 CD19 항체의 VH 및 VL 서열은 공개된 문헌으로부터 추출하였다 (Nicholson et al., 1997, 상기 문헌). 인간화는 뮤린 CD19 항체로부터 CDR 영역을 인간 배선 수용자 프레임워크 VH4_4-59 및 VK3_L25 (vBASE 데이터베이스) 상으로 그라프팅함으로써 달성하였다. CDR 영역에 추가로, CDR 영역의 구조적 온전성을 지지하는 것으로 생각되는 5개의 프레임워크 잔기, 즉, VH #71, #73, #78 및 VL #71, #87이 뮤린 서열로부터 보유되었다. 추가로, 인간 J 요소 JH4 및 JK2는 각각 중쇄 및 경쇄에 대해 사용되었다. 인간화 항체의 생성되는 아미노산 서열을 각각 FMC63_VL_hz 및 FMC63_VH_hz1로 지정하고 아래 표 1에 제시한다. 잔기 넘버링은 카바트(Kabat) (Kabat E.A. et al., 1991, 상기 문헌)에 따른다. CDR 정의를 위해, 카파트 및 코티아(Chothia) (Chothia et al., 1987 상기 문헌)을 모두 사용하였다. 마우스 CD19로부터 오는 잔기는 굵게/이탤릭체로 제시한다. 상자표시한 위치 #60/61/62는 CDR H2 (또한 HCDR2로 명명함) 내의 잠재적인 번역후 변형 (PTM) 부위를 나타낸다.

[0388] <표 1>

[0389] 인간화 CD19 가변 도메인의 아미노산 서열 (각각 서열 114-117, 출현 순서).

코티아 CDR	CDRH1	CDRH2
카바트 CDR	CDRH1	CDRH2
카바트 #		
FMC63 VH hz1	QVQIQESGPGGVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSEFTYYNSIKS	
FMC63 VH hz2	QVQIQESGPGGVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSEFTYYSSSKS	
FMC63 VH hz3	QVQIQESGPGGVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSEFTYYQSSSKS	
코티아 CDR	CDRH3	
카바트 CDR	CDRH3	
카바트 #		
FMC63 VH hz1	RVTTISKDNKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYFGSSYAMDYWGQGTLVTVSS	
FMC63 VH hz2	RVTTISKDNKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYFGSSYAMDYWGQGTLVTVSS	
FMC63 VH hz3	RVTTISKDNKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYFGSSYAMDYWGQGTLVTVSS	
코티아 CDR	CDRL1	CDRL2
카바트 CDR	CDRL1	CDRL2
카바트 #		
FMC63 VL hz	EIVMTQSPATLSISLSPGERATLSRASQDTSKYLNWYQQKPGQAPRLIYHTSRLLHS	
코티아 CDR	CDRL3	
카바트 CDR	CDRL3	
카바트 #		
FMC63 VL hz	GISPARFSGSGSGTDYTLTISSIQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFSGGTGLEIK	

[0390] 이들 인간화 CD19 IgG를 사용하여, 발현에 대해 시험하기 위한 가용성 scFv 및 전체 CART CD19 구축물에 대한 scFv를 생성하였다 (아래 실시예 참조). 인간화 동안, CDRH2 영역 내의 위치 62가 뮤린 CDRH2 내에 존재하는 알라닌보다는 세린 잔기인 것을 선호하는 것은 흥미롭다. 뮤린 서열은 번역후 변형 (PTM)이 결핍되고, CDRH2 내에 위치 60/61/62에서 각각 아스파라긴-세린-알라닌을 갖는다. 이것은 인간화 과정 동안 잠재적인 PTM 모티프 (CDRH2 내에 상자표시한 부위로서 나타냄)를 생성한다. 인간화 과정 동안 생성된 PTM 부위가 실제로 "진정한" PTM 부위인지 또는 단지 이론적인 것인지 시험하였다. 아미노산 모티프 아스파라긴 이후 세린 (NS)은 번역후 탈아미드화에 감수성일 수 있지만 이것은 쉽게 명백하지 않은 것으로 가정되었다. 아스파라긴 이후 프롤린을 제외한 임의의 아미노산, 이어서 세린 (NxS, x≠P)은 번역후 N-글리코실화에 감수성일 수 있음이 또한 가정되었다. 상기 가설을 시험하기 위해, 위치 60 (글리코실화 부위인 것으로 알려짐)에서 아스파라긴이 세린 또는 글루타민으로 돌연변이되는 2개의 IgG 변이체를 생성하고, 각각 FMC63_VH_hz2 (N60S) 및 FMC63_VH_hz2 (N60Q)로 지정하였다. 이들 구축물은 잠재적인 번역후 변형 부위 (PTM)를 제거하고 보유된 활성화에 대해 시험하기 위해 생성하였다 (아래 실시예 2 참조).

- [0392] 클로닝:
- [0393] 마우스 및 인간화 VL 및 VH 도메인을 코딩하는 DNA 서열을 얻고, 구축물에 대한 코돈을 호모 사피엔스(Homo sapiens)로부터의 세포 내에서 발현을 위해 최적화하였다.
- [0394] VL 및 VH 도메인을 코딩하는 서열을 클로닝 벡터로부터 포유동물 세포 내에서 분비를 위해 적합한 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 중쇄 및 경쇄를 동시-형질감염을 허용하는 개별 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 발현 벡터의 요소는 프로모터 (시토메갈로바이러스 (CMV) 인핸서-프로모터), 분비를 촉진하는 신호 서열, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결인자 (소 성장 호르몬 (BGH) 유전자), 에피솜 복제 및 원핵세포 내의 복제를 허용하는 요소 (예를 들어 SV40 기원 및 CoIE1 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 것), 및 선택을 허용하는 요소 (암피실린 내성 유전자 및 제오신 마커)를 포함한다.
- [0395] 발현:
- [0396] 키메라 및 인간화 IgG 후보물질을 1 ml 규모로 HEK293F 포유동물 세포 내에서 발현시켰다. 청정화된 상청액을 FACS 결합 연구를 위해 사용하였다. 보다 정확하게, HEK293F 세포를 Pen/Strep을 보충한 프리스타일 (FreeStyle) 배지 내에 5E5개의 세포/ml로 희석하고, 1 ml을 24 환저 딥 웰 플레이트 내로 옮겼다. 0.5 μ g의 경쇄 및 0.5 μ g의 중쇄 포유동물 발현 플라스미드를 동일한 배지 내에 4 μ l의 FuGENE HD (로슈 REF 04709705001)와 함께 희석하였다. 15 min RT 인큐베이션 후에, DNA/Fugene 혼합물을 세포에 적가하고, 5% CO₂ 인큐베이터 내에 250 rpm, 37°C에서 5일 동안 넣었다. 이어서, 상청액을 원심분리에 의해 세포로부터 분리하였다. IgG 함량을 측정하기 위해, 200 μ l의 분취액을 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 웰 내에 넣었다. 모든 샘플 및 표준물은 단백질 A 딥 앤드 리드(Dip and read) 바이오센서 (포르테비오(Fortebio) Cat No 18-5010)을 사용하여 이중으로 측정하였다. 플레이트를 옥테트(Octet) 기구 (포르테비오) 내에 넣고, 온도조절 챔버 내에서 27°C로 평형화시켰다. 데이터를 옥테트 유저(Octet User) 소프트웨어 버전 3.0을 사용하여 자동으로 처리하고, IgG 표준 곡선에 비교함으로써 농도를 결정하였다.
- [0397] FACS에 의한 결합 분석:
- [0398] 인간화 항체 및 키메라 항체를 세포주 300.19-hsCD19FL을 사용한 유동 세포측정 결합 검정을 이용하여 평가하였다. 상기 세포주는 마우스 preB 세포주 300.19를 제오신 내성 유전자뿐만 아니라 천연 프로모터 및 전장 인간 CD19 코딩 서열을 코딩하는 벡터 (hCD19 FL/pEF4-myc-His A)로 형질감염시킴으로써 생성하였다. 간단히 설명하면, 300.19 세포를 선형화된 플라스미드를 사용하여 전기천공시키고, 이어서 높은 수준의 hsCD19를 발현하는 세포를 APC-접합된 항-인간 CD19 Ab (BD 555415로부터 클론 HIB19)을 사용하여 확인하고, 후속적으로 FACS 아리아 (Aria) 유동 세포측정기를 사용하여 분류하였다. 분류된 hsCD19+ 세포를 배양하였고, 높은 수준의 hsCD19를 안정하게 발현하는 것을 확인하였다.
- [0399] 결합 검정은 발현된 IgG를 함유하는 혈청 비함유 배양 배지를 사용하여 직접 수행할 수 있었다. 모든 평가된 IgG를 동일한 농도 (85 nM)로 표준화한 후, 3배 연속 희석에 의해 1.4 pM까지 희석하였다. 이어서, 96-웰 플레이트 내에서, 5 x 10⁵개 세포/웰의 분취액을 희석된 IgG와 함께 4°C에서 30 min 동안 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충제 (PBS 내 0.5% BSA)로 2회 세척한 후, FACS 완충제 내에 1:1000 희석시킨 검출 항체 (APC 접합된 염소 항-hu IgG, Fc 단편 특이적 (다이나노바(Dianova) #109-136-098))를 첨가하였다. 세포를 4°C에서 추가로 30 min 동안 인큐베이션한 후, FACS 완충제 내에 2회 세척하고, FACS 칼리버 (비디 바이오사이언시스)를 이용하여 검정하였다. 결합 곡선 플로팅 (형광 강도의 중간값 대 IgG 농도) 및 EC₅₀ 결정은 비선형 회귀 분석, S자형 용량 반응 (가변 기울기)를 갖는 그래프패드(GraphPad) 프리즘(Prism)TM 3.0 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.
- [0400] FACS 분석은 모든 평가된 IgG에 대한 겔보기 결합은 매우 다양할 수 있고, 여기서 몇몇 구축물은 IgG 대 scFv로서 EC₅₀에서 5 내지 10배 이동을 보였음을 보여준다. EC₅₀ 값에 기반하여, 키메라 참조물에 비해 2의 인수 내의 또는 더 우수한 결합 친화도를 갖는 선도 후보물질을 선택하였다.
- [0401] 실시예 2: 인간화 CD19 IgG 항체로부터 유래된 항-CD19 가용성 scFv 단편의 특성화
- [0402] 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 실시예1에 설명된 인간화 CD19 IgG로부터 가용성 scFv 단편을 생성하였다. 이들 가용성 scFv는 scFv의 안정성, 세포 표면 발현, 및 결합 특성을 검토하기 위해 특성화 연구에서 사용하였다. 추가로, 인간화 과정 동안 도입된 잠재적인 PTM의 영향을 조사하기 위해 또한 실험을 수행하였다.

- [0403] *scFv 발현 및 정제*
- [0404] 각각의 scFv 구축물의 형질감염을 위해, 약 3e8개의 293F 세포를 형질감염 시약으로서 3:1 (PEI:DNA)의 비로 PEI를 사용하여 100 μ g의 플라스미드로 형질감염시켰다. 세포를 37℃, 125 rpm, 8% CO₂에서 진탕기 플라스크 내에서 100 ml EXPi293 발현 배지 (인비트로젠) 내에서 성장시켰다. 배양물을 6일 후에 수거하고, 단백질을 정제하기 위해 사용하였다.
- [0405] 293F 세포는 3500g에서 20분 동안 원심분리하여 수거하였다. 상청액을 수집하고, 배큐캡(VacuCap)90 PF 필터 유닛 (w/0.8/0.2 μ m 수퍼 멤브레인(Super Membrane), PALL)을 통해 여과하였다. 약 400 μ l의 Ni-NTA 아가로스비드 (키아젠(Qiagen))를 상청액에 첨가하였다. 혼합물을 회전시키고 4℃에서 4 hr 동안 인큐베이션하였다. 이것을 정제 칼럼 상에 로딩하고, 20 mM 히스티딘을 함유하는 세척 완충제로 세척하였다. 단백질을 300 mM 히스티딘을 함유하는 500 μ l 용리 완충제로 용리시켰다. 샘플을 4℃에서 PBS 완충제에 대해 철야 투석하였다. 단백질 샘플을 나노드롭 2000c를 사용하여 정량하였다.
- [0406] *scFv 입체형태 및 콜로이드 안정성 분석*
- [0407] scFv의 열안정성을 DSF에 의해 결정하였다: 10-20 μ l의 단백질 샘플을 PBS 내에 25 μ l의 총 부피 내에서 1:1000의 최종 희석비의 염료 사이프로 오렌지(Sypro Orange) (인비트로젠 Cat#S6650)와 혼합하고, 바이오라드 CFX1000 (25℃에서 2 min, 이어서 30초 동안 0.5℃ 증가량, 25 내지 95℃).
- [0408] 분석적 SEC 실험을 위해, 20 μ l PBS 내의 약 15-20 μ g의 scFv 단백질을 애질런트(Agilent) 1100 시리즈 상에서 0.3 ml/min 유속으로 TSKgel Super SW2000 상으로 주입하였다.
- [0409] *FACS 결합에 의한 EC50*
- [0410] 마우스 세포주 300.CD19를 0.5 mg/ml 제오신을 갖는 RPMI 1640 내에서 성장시켰다. 약 5e5개의 세포/웰을 BD 팔콘(Falcon) 96 웰 플레이트에 옮겼다. 세포를 900 rpm (소르발 레전드(Sorval Legend) XT 원심분리기)에서 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하였다. 항-CD19 scFv 단백질을 5% FBS를 함유하는 DPBS 내에 희석하였다. 샘플을 웰에 첨가하고, 세포와 잘 혼합하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 5% FBS를 함유하는 DPBS 내에 2회 세척하였다. 세포를 항폴리His PE (알앤디)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하고, 2회 세척한 후, FACS 분석 (비디 바이오사이언시스의 LSRII)하였다.
- [0411] *프로테온(Proton)에 의한 운동학 분석*
- [0412] 운동학은 바이오-라드(Bio-Rad) 프로테온을 이용하여 결정하였다. 고정된 GLC 센서 칩 상에서 표준 아민 커플링을 이용하여 수행하였다. scFv 샘플을 아세트산 (pH 4.5) 내에 0.03 mg/mL로 희석하고, 칩에 30 μ l/min의 유속으로 300초 동안 적용하였다. 이어서, CD19 리간드를 PBS-Tween 내에 연속 희석하고, 480초의 해리 시간을 가지면서 50 μ l/min의 유속으로 120초 동안 적용하였다. 칩 표면은 글리신 (pH 2.5)로 재생하였다. 데이터를 1:1 랭뮤어(Langmuir) 모델을 이용하여 피팅시켰다.
- [0413] *CART19 구축물의 표면 발현 및 FACS에 의한 염색*
- [0414] 상이한 항-hCD19 CART로 일시적으로 형질감염시킨 HEK293F 현탁 세포를 형질감염 2일 후에 수거하였다. 대략 1e6개의 세포를 V자형 96 웰 플레이트 (그라이너 바이오-원(Greiner Bio-One, 독일))의 각각의 웰 내에 넣고, 0.2 ml FACS 완충제 (4% 소 혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 1XPBS (BSA 분획 V, 로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics, 미국 인디애나주 인디애나폴리스))로 3회 세척하였다. 세포를 0.2 μ g의 비오틴화 단백질 L (젠 스크립트(GenScript, 미국 뉴저지주 피츠카타웨이)) 또는 100 nM의 hCD19(AA 1-291)-hIgG1 Fc (NIBRI에서 생성됨)와 함께 0.2 ml의 FACS 완충제 내에 재현탁시키고, 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 0.2 ml의 FACS 완충제로 3회 세척하고, 단백질을 갖는 샘플에 대해 1 μ l 스트렙타비딘 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies, 미국 뉴욕주 그랜드아일랜드)와 함께 0.2 ml의 FACS 완충제 내에서, 또는 hCD19-hIgG1 Fc를 갖는 샘플에 대해 2 μ l의 PE 항-인간 FC γ (잭슨 면역리서치 래보러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories, 미국 펜실베이니아주 웨스트그로브))와 함께 0.2 ml의 FACS 완충제 내에서 30분 동안 4℃에서 암소에서 인큐베이션하였다. 0.2 ml의 FACS 완충제로 3회 세척한 후, 세포를 LSRII (비디 바이오사이언시스, 미국 캘리포니아주 산호세) 기기 상에서 FACSDiva 소프트웨어 (비디 바이오사이언시스, 미국 캘리포니아주 산호세)를 사용하여 분석하였다. 면역형광 염색을 생존 세포의 상대적인 로그 형광도로서 분석하고, 알렉사 플루오르 488 양성 또는 PE 양성 세포의 백분율을 측정하였다.

- [0415] **인간화 과정 동안 생성된 잠재적인 PMT의 분석**
- [0416] 인간화 동안, CDRH2 영역 내의 위치 62가 실시예 1에 설명된 바와 같이 뮤린 CDRH2 내에 존재하는 알라닌보다는 세린 잔기인 것을 선호하는 것은 흥미롭다. 인간화 과정 동안 생성된 PTM 부위가 실제로 "진정한" PTM 부위인지 또는 단지 이론적인 것인지 시험하였다. 위치 60 (글리코실화 부위인 것으로 알려짐)에서 아스파라긴이 세린 또는 글루타민으로 돌연변이되는 2개의 IgG 변이체를 생성하고, 각각 FMC63_VH_h2 (N60S) 및 FMC63_VH_h22 (N60Q)로 지정하였다. 이들 구축물은 잠재적인 번역후 변형 부위 (PTM)를 제거하고 보유된 활성에 대해 시험하기 위해 생성하였다.
- [0417] **결과**
- [0418] 항-CD19 인간화 scFvs 및 마우스 scFv를 293F 세포 내에서 발현시키고, His 태그를 통해 정제하였다. 모든 인간화 scFv의 발현 및 수율은 원래의 마우스 scFv보다 훨씬 더 높았다 (데이터를 제시하지 않음).
- [0419] 정제를 확인하고 온전성을 평가하기 위해, scFv 구축물을 N-글리카나제 F (PNGaseF)와 함께 또는 그 없이 인큐베이션한 후 고-성능 액체 크로마토그래피 질량 분광분석법 (HPLC-MS) (도 3 참조) 및 SDS-PAGE (데이터를 제시하지 않음) 모두를 이용하여 분석하였다. PNGaseF는 컨센서스 서열 N-X-S/T/C (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)로부터 N-연결된 글리칸 구조의 제거를 위한 특이적 효소이다. 간단히 설명하면, 샘플을 물 내에 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 희석하고, 비처리 상태로 두거나 1:2(w/w) PNGaseF:scFV 비로 PNGaseF와 함께 3시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다.
- [0420] SDS-PAGE 분석은 NuPAGE 4-12% Bis-Tris 겔 (노벡스(Novex))을 사용하여 수행하였다. 대략 2 μg scFV를 각각의 레인 내에 로딩하고, 200 V 정전압에서 40분 동안 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후에, 겔을 파스트겔 블루 (PhastGel Blue) R 250 스테인 (아머삼 파마시아(Amersham Pharmacia))을 사용하여 염색하고, 10% 아세트산, 30% 메탄올을 사용하여 탈염시켰다.
- [0421] HPLC-MS 분석은 Xevo-Tof 질량 분광분석기에 결합된 워터스(Water's) 액유티(Acquity) UPLC 시스템 상에서 수행하였다. 약 1 μg 의 각각의 샘플을 60°C로 설정한 R 1/10 2.1x100 mm 10 μm POROS 칼럼 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosciences)) 상으로 0.5 mL/min의 유속으로 로딩하였다. 이동상은 0.1% 포름산 (A) 및 0.1% 포름산, 75% 이소프로판올, 25% 아세토니트릴 (B)로 이루어졌다. 12분 내에 25%-90% B의 역상 구배를 이용하여 단백질을 칼럼으로부터 용리시켰다. 획득은 전원 콘 전압 램프 20-50 V를 이용하여 600-4000 Da의 m/z 범위에서 전기분무 양이온 스캔을 사용하여 수행하였다. 생성되는 스펙트럼은 MaxEnt1을 이용하여 디컨볼루션시켰다.
- [0422] 글리코실화 부위는 인간화의 과정 동안 도입되었다. 비-PTM 변이체 (VH: N60S 또는 N60Q)는 상기 추가의 형태를 갖지 않았다. 구축물은 HC CDR2 내에 N-연결된 글리코실화의 컨센서스 부위를 갖는 유일한 것이다. SDS-PAGE 분석으로부터, 단일 밴드로서 이동한 비처리된 샘플은 이중체가 관찰된 103101-WT (S/N)을 제외한 모든 구축물에 대한 서열의 근사 분자량과 일치한다. 상기 구축물은 H-CDR2 내에 N-연결된 글리코실화의 컨센서스 부위를 갖는 유일한 것이다. PNGaseF로 처리할 때, 이중체의 보다 고분자량 밴드는 더 이상 존재하지 않고, 이것은 부위의 부분적인 점유를 제안한다. 유사하게, 디컨볼루션된 질량 스펙트럼으로부터 관찰된 분자량은 아미노산 서열로부터 예측된 것과 일치한다. 그러나, 다른 구축물은 단일 주요 분자 종을 나타냈지만, 103101-WT (S/N)는 또한 PNGaseF를 사용한 처리 후에 더 이상 존재하지 않는 서열로부터 예측된 것보다 더 높은 집단 1217 달톤을 가졌다. 이것은 단일의 우세한 N-연결된 당형 (질량에 기반하여 아마도 올리고만노스 5 기반)의 존재와 일치한다. 글리코실화된 형태의 존재는 도 3에 제시한 바와 같이 MS 분석에 의해 확인하였다.
- [0423] 입체형태적 안정성을 시차 주사 형광측정법 (DSF)에 의해 측정하였다. 도 4에 제시한 바와 같이, 마우스 scFv의 T_m은 57°C인 반면, 인간 변이체는 약 70°C로 더 높은 T_m을 보여주었다. 모든 인간화 scFv에 대한 T_m은 뮤린 scFv보다 훨씬 더 우수하였고, 이것은 모든 인간화 scFv가 뮤린 scFv보다 더 안정함을 명백하게 보여준다. 상기 안정성은 아마도 CART19 구축물로 번역될 것이고, 아마도 개선된 치료 특성으로 이어질 수 있다.
- [0424] 정제된 scFv의 활성은 SPR 기반 검출 방법을 이용하여 hCD19 발현 세포에 대한 결합에 의해 및 hCD19 항원에 대한 결합에 의해 측정하였다. scFv의 결합을 결정하기 위해 마우스 세포주 300을 사용하였다. hCD19에 대한 마우스 scFv의 EC₅₀은 약 0.6-1.6 nM이었다. 인간화 변이체는 낮은 또는 nM 미만 EC₅₀ 범위 내에서 동일한 범위의 EC₅₀을 보여주었다.
- [0425] **실시예 3: CD19 CAR 구축물**

[0426] 최종 CAR 구축물 내에 사용할 scFv는 실시예 1에 기재된 인간화 IgG로부터 유래하였다. VL 및 VH 도메인이 scFv 내에서 나타나는 순서는 변하였고 (즉, VL-VH, 또는 VH-VL 배향), 여기서, 3 또는 4개의 카피의 "G4S" (서열 18) 서브유닛 (여기서, 각각의 서브유닛은 서열 GGGGS (서열 18) (예를 들어, (G4S)₃ (서열 107) 또는 (G4S)₄ (서열 106))을 포함한다)는 가변 도메인을 연결하여 표 2에 제시된 바와 같이 전체 scFv 도메인을 생성한다.

[0427] <표 2>

[0428] VH 및 VL 배향 및 링커 길이를 보여주는 인간화 CD19 scFv 구축물 ("3G4S"는 서열 107로서 개시되고, "4G4S"는 서열 106으로서 개시된다).

구축물 ID	길이 aa	주석	Vh 변화
mScFvCTL019	486	VL-VH, 3G4S	
104879	491	VL-VH, 4G4S	N/S
104880	491	VL-VH, 4G4S	N/Q
104881	491	VH-VL, 4G4S	N/S
104882	491	VH-VL, 4G4S	N/Q
104875	486	VL-VH, 3G4S	N/S
104876	486	VL-VH, 3G4S	N/Q
104877	486	VH-VL, 3G4S	N/S
104878	486	VH-VL, 3G4S	N/Q
105974	491	VL-VH, 4G4S	S/N
105975	491	VH-VL, 4G4S	S/N
105976	486	VL-VH, 3G4S	S/N
105977	486	VH-VL, 3G4S	S/N

[0429]

[0430] 인간화 scFv 단편의 서열 (서열 1-12)을 아래 표 3에 제공한다. 전체 CAR 구축물은 서열 31-42의 전체 CAR 구축물을 생성하기 위해 서열 1-12를 아래 제시된 추가의 서열, 즉, 서열 13-17과 함께 사용하여 생성하였다.

[0431] · 리더 (아미노산 서열) (서열 13)

[0432] MALPVTALLPLALLHAARP

[0433] · 리더 (핵산 서열) (서열 54)

[0434] ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACC
C

[0435] · CD8 힌지 (아미노산 서열) (서열 14)

[0436] TTTPAPRPPTPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0437] · CD8 힌지 (핵산 서열) (서열 55)

[0438] ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTG
TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCTGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTG
GACTTCGCCTGTGAT

[0439] · CD8 막횡단 (아미노산 서열) (서열 15)

[0440] IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC

- [0441] · 막횡단 (핵산 서열) (서열 56)
- ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACCTGGTTATCAC
- [0442] CCTTTACTGC
- [0443] · 4-1BB 세포내 도메인 (아미노산 서열) (서열 16)
- [0444] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
- [0445] · 4-1BB 세포내 도메인 (핵산 서열) (서열 60)
- AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAA
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAGAAGAAGAAGGAGGATGT
GAACTG
- [0446]
- [0447] · CD3 제타 도메인 (아미노산 서열) (서열 17)
- RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0448]
- [0449] · CD3 제타 (핵산 서열) (서열 101)
- AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTC
TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA
TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0450]
- [0451] · CD3 제타 도메인 (아미노산 서열; NCBI 참조 서열 NM_000734.3) (서열 43)
- RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0452]
- [0453] · CD3 제타 (핵산 서열; NCBI 참조 서열 NM_000734.3) (서열 44)
- AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0454]
- [0455] · IgG4 힌지 (아미노산 서열) (서열 102)
- ESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKM
- [0456]

[0457] · IgG4 힌지 (뉴클레오타이드 서열) (서열 103)

GAGAGCAAGTACGGCCCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCTTGGGCGGACCCA
GCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCGTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGT
GACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACC
TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC
AAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCC
AAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACC
AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACA
GCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGG
GCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAG
CCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

[0458]

[0459] 이들 클론은 모두 4-1BB로부터 유래된 공동-자극 도메인의 신호 도메인 내에 Q/K 잔기 변화를 함유하였다.

[0460] <표 3>

[0461] 인간화 CD19 CAR 구축물

명칭	서열 번호	서열
CAR 1		
CAR1 scFv 도메인	1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGSGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS
103101 CAR1 가용성 scFv - nt	61	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggtcttctgctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaacccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgagacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagagacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcgaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtagc ggagtgtctctcccgattacgggtgtcttggatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgttgggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtcacgctcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgagccgacaccgctgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtaactctggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR1 가용성 scFv - aa	73	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> eivmtqspatlspsgeratlsccrasqdiskylnw yqqkpgqaprllyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvs gvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyssslksrvtiskdnsknqvs lssvtaadtavyycakhyyggsyamdywgqglvtvss <u>hhhhhhhh</u>

[0462]

104875 CAR 1 - 전체 - nt	85	atggccctccctgtcaccgcctgtgtcttcgctggctcttctgtccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaacctgtcttgacagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccagctcgagattaaagggtgagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgactgtactgtgagc ggagtgtctctcccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgttggggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcggtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggactctggtcacggtgt ccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccggtgca taccgggggtcttgacttcgctgcgatctctacatttgggcccctctggtggta cttgcggggtcctgtgctttcactcgtgatcactcttactgtgaagcgggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggaca gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgagaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104875 CAR 1 - 전체 - aa	31	MALPVTALLPLALLHARPeivmtqspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskyl</u>nw yqqkpgqaprlliy<u>htsrlhs</u>giparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfc<u>qgg</u> <u>ntlpyt</u>fgqggtkleikggggsgggsgggsgvqlqesgplvkpsetlsltctvs gvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyssls</u>rvtis kdnskqvslk lssvtaadtavyycak<u>hyvyggsyamdy</u>wgggtlvtvssttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgl dfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr kklliyifkqpfmrpvqttqeedgcscr fpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qllynelnlgrr eeydvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0463]

CAR 2		
CAR2 scFv 도메인	2	eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylwnwyqqkpgqaprlliyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavfycqqgntlpytfgggtkleikggggs ggggsgggsgvqlqesgpglvkpsltsltctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyyqsslskrrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyg gsyamdywggtltvtvss
103102 CAR2 - 가용성 scFv - nt	62	atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggctcttctgctccaagccgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggttagcggtatctgggaccgactacacc tcaactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tgccagcgaggaggtgggtccggcggtggaggaaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccacggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggtctgagactacttactaccaatcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggtactctggtcacccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103102 CAR2 - 가용성 scFv - aa	74	<u>MALFVTALLPLALLHAARPE</u> eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylwn yqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavfycqqg ntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsltsltctvs gvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslskrrvtiskdnknqvsllk lssvtaadtavyycahyyyggsyamdywggtltvtvss <u>hhhhhhh</u>

[0464]

104876 CAR 2 - 전체 - nt	86	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgcg tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaagggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccacggggaaggg tctggaatggattggagtgttggggctctgagactacttactaccaatcatccc tcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacacccgctgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggactctggtcaccgtgt ccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgctccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggccctctggtggtgta cttgccgggtctctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgccgctgaaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggaca gcggagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgagactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcccctc gg
104876 CAR 2 - 전체 - aa	32	MALPVTALLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskyl</u>nw yqqkpgqaprlly<u>htsr</u>lhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc<u>qgg</u> <u>ntlpyt</u>fgggtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgplvkpsetlsltctvs gvsld<u>dygvs</u>wirqppgkglewig<u>viwgsettyqsslks</u>rvtis kdnsknqvslk lssvtaadtavyycak<u>hyvyggsyamdy</u>wgqgtlvtssttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrpfeeeeggcclrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprkrnpqeglynelqdkkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0465]

CAR 3		
CAR3 scFv 도메인	3	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqpqgkglewigviwgset tyysslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgq gtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleik
103104 CAR 3 - 가용성 scFv - nt	63	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgctccctcccagactacggagtgagc tgattagacagcctcccgaaaggactggagtgatcgagtgatttgggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgcatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtgaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtgagggtggtccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggaacgggctaccctttcttgcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccctaggcttcttatctacc acacctctgcctgcatacgggattcccgacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgctgtactt ctgccagcagggtaacaccctgcccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR 3 - 가용성 scFv - aa	75	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqpqgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdsknqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamdywggtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatls ispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsg tdytlttisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik <u>hhhhhhh</u>

[0466]

104877 CAR 3 - 전체 - nt	87	atggctctgcccgtgaccgcaactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaagggaactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggctcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggagcgcg ggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccgggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacagaatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagccctaggcttcttatctacc acacctctcgccctgcatagcgggattcccgacgcttttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaaccactactccgctccaaggccaccaccctgcccgcaccatcgccctct cagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggt cttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagggaagcggctgcgaac tgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggaca gcccagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcagaaagaatcccaag agggcctgtacaacgagctccaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104877 CAR 3 - 전체 - aa	33	MALPVTALLPLALLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyvssslksrvtiskdnknqvs1klssvtaadta vyycahhyvyggsyandywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasgdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsr1hs giparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcggntlpytfgggtkleiktttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcclrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreeyvdldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0467]

CAR 4		
CAR4 scFv 도메인	4	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqsslsksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleik
103106 CAR4 - 가용성 scFv - nt	64	atggctctgccccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgctccctcccagactacggagtgagc tggtattagacagcctcccggaaagggactggagtggtcgagtgatttgggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggtccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaacctgtcc ctttctcccgggaacgggctaccctttcttgcggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggccctaggcttcttatctacc acacctctcgctgcatacgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgcggtctactt ctgccagcagggtaacacctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103106 CAR4 - 가용성 scFv -aa	76	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslsksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggsgggsgggsgggseivmtqspatls ispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytlttisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik <u>hhhhhhhh</u>

[0468]

104878 CAR 4 - 전체 - nt	88	atggctctgtcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgtgcttcacgcgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctgggaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtggtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtgatcgagtgatttgggtag cgaaaccaacttactatcaatcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccaggggaactctggctactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttcttgcgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccctaggtcttctatctacc acacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgcttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgcgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaaccactactcccgctccaaggccacccaccctgcccgcacatcgccctc cagccgctttccctggtcggagggcatgtagaccgcagctgggtgggcccgtgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggccctctgtctggta cttgccgggtcctgctgttctactcgtgatcactctttactgtaagcgcgggtcgg aagaagctgtgtacatctttaagcaacccttcagggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaaggcggctgcgaa tgccgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaa cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggaca gaggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcagaaagaatcccaag aggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcacccgcccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104878 CAR 4 - 전체 - aa	34	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlslctctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdsknqvsllkssvtaadta vyycakhyvyggsyandywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylwyqqkpgqaprllyhtsrllhsqiparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcgggntlpvtfgggtkleiktttpprptpaptias qpislrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr kkillyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqlppr

[0469]

CAR 5		
CAR5 scFv 도메인	5	eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggs ggggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpslsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789 CAR5 - 가용성 scFv - nt	65	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcaacttcttccatgccgc tcggcctgagatcgatcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggcaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggtatccccgccagattttcgggagcgggtctggaaccgactacaccc tcaccatctcttctctgcagcccaggatttgcgctctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaatcaagggaggcgg aggatcaggcgggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaccctctccctg acttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttgattcgcca gcctccggggaagggcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactactt actactcttcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR5 - 가용성 scFv -aa	77	<u>MALPVTALLPLALLHAAR</u> eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpslsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsk qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss <u>hhhhhhh</u>

[0470]

104879 CAR 5 - 전체 - nt	89	atggccctccctgtcaccgacctgtgcttccgctggctcttctgtctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaacctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggcgaggcgggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtagctgtgagcggagtgtctctcccgattacggggtgtcttgatcagaca gccacccgggaagggtctggaatggattggagtgttggggtcttgagactactt actactcttcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacccgcgtgactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcacccgtgtccagcaccactacccagcaccgagccacccaccccgct cctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccgagggcatgtagaccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttggg cccctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgtgtgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggagcggctgttcatgcgggttccagaggaggagg aaggcgggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgactgtctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcga gaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgcagg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104879 CAR 5 - 전체 - aa	35	MALPVTALLLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdiskyl</u> nw yqqkpgqaprlliy <u>htsrlhs</u> giparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfc <u>qgg</u> <u>ntlpyt</u> fqqgtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsctsl tctvsgvslp <u>dygvs</u> wirppgkglewig <u>viwgsettyssslks</u> rvtiskdnsk qvsllkssvtaadtavyyca <u>hyvyggsyandy</u> wgqgtlvtvssttpparpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfeeeeggcclrvkfsrsadapay kqggnqlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0471]

CAR 6		
CAR6 scFv 도메인	6	eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrliiyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavycqgntlpytfgqgtkleikggggs ggggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpslsetlslctvsgvslpdygvswirgpp gkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyyca hyyyggsyamdywggtlvtvss
99790 CAR6 - 가용성 scFv - nt	66	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgatcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggcaaccctttcatgcaggggcagccagacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgctgctgactaccacaccagccgcct ccacagcggatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacc tcaccatctcttctctgcagcccagagatttgcgcgtctatttctgcagcagggg aatactctgcgcgtacaccttcgggtcaaggtaccaagctggaaatcaaggaggcgg aggatcaggcgggtggcggaagcgggagaggtggctccggaggaggaggttccaag tgagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctg acttgtagcgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagttctcttgattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactactt actaccagtcacttaagtcacgggtcaccatcagcaagataatagcaagaac caagtgtagcacttaagctgtcatctgtgaccgcccgtgacacgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccacatcatcac
99790 CAR6 - 가용성 scFv - aa	78	~~MALEVTALLPLALLHAARP~~ eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprrliiyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavycqgg ntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpslsetlsl ctvsgvslpdygvswirgppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnkn qvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywggtlvtvss <hhhhhhhh< h=""></hhhhhhhh<>

[0472]

104880 CAR6 - 전체 - nt	90	atggccctccctgtcaccgacctgtgcttccgctggctcttctgctccacgcgcg tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgctcagcaagg aacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaagggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggagggcggaggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctcccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgttggggtctctgagactactt actaccaatcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacccggtgtactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcacggtgtccagcaccactacccagcaccgagccacccaccccgct cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttggg ccctctggctgttacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tghtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggagagcggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcgggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctac aagcaggggagcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgcagg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104880 CAR6 - 전체 - aa	36	MALPVTALLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdiskyl</u> nw yqqkpgqaprlliy <u>htsrlhs</u> giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc <u>qgg</u> <u>ntlpyt</u> fgggtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetls tctvsgvslp <u>dygvs</u> wirppgkglewig <u>viwgsettyyqssls</u> krvtiskdnsk qvslklssvtaadtavyycak <u>hyvyggsyandy</u> wgqgtlvtvssttpparpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqggnqlynelnlgrreeydvldkrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0473]

CAR 7		
CAR7 scFv 도메인	7	qvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyyssslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgq gtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlsctasqd iskylwnyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgggtkleik
100796 CAR7 - 가용성 scFv - nt	67	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggcccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggatgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgatccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgta tgatccgccaacctcccgggaaggcctgaatggattgggtgtcatctggggttc tgaaaccacctactactcatcttccctgaagtcagggtgacctacgaaggata attccaagaaccagggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgtgacacgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcgcggtggagggtctggagggtggag gatccgggtggtgggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatgactcagtc ccagccaccctttctctttcaccggcgagagagcaacctgagctgtagagccag ccaggacattttctaagtaacctcaactggatcagcaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccataacctcagccttcactctggtatccccgctcggttttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgacctttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgcccagcagggaataaccttccttacaccttcgggtcagg gaaccaagctcgaatcaagcaccatcaccatcatcaccacat
100796 CAR7 - 가용성 scFv - aa	79	~~MALFVTALLPLALLHAARP~~ qvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslpdygvs wirppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadta vyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlsispgeratlsctasqdiskylwnyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik <u>hhhhhhhh</u>

[0474]

104881 CAR 7 전체 - nt	91	atggctctgcccgtgaccgcaactcctcctgccactggctctgctgcttcacgcgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgacccgtgagcggagtgctccctcccagactacggagtgagc tggtattagacagcctcccggaaaggactggagtgatcgagtgatttggggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacacggcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgcatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggctccggaggtggcgaagcgaatcgtgatgaccagagc cctgcaacccctgtccctttctccggggaacgggtaccctttcttctgctgggcac acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccta ggcttcttatctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgacgcttttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgacatctcatctccagcccgagga cttcgcccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccacccctgcc ccgaccatcgctctcagccgctttccctgcgtccggagcagtagacccgcagc tggtggggcgctgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttggg ccctctcggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacgctgttcatgccgttccagaggaggagg aaggcgctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgagctgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggaagccgcgca gaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104881 CAR 7 전체 - aa	37	MALPVTALLPLALLHAARPqvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvs wirpppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycahhyvyggsyamydwgqgtltvtvssggggsgggsgggsgggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrllhsqiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfcggntlpvtfgqgtkleiktttpprptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrkklliyfkqpfmrpvqttqeedgcsrpfpeeeeggcelrvkfssadapay kqqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0475]

CAR 8		
CAR8 scFv 도메인	8	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqsslksrvtiskdnskqnqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgq gtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlsclscrasqd iskylwnyqqkpgqaprllyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlstisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgggtkleik
100798 CAR8 - 가용성 scFv - nt	68	atggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggcctccttctgcatgccgc cagggcccaagtccagctgcaagagtcaggaaccggactggatgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgatca tgatccgccaacctcccggaaagggttgatgagtggtgtcatctggggttc tgaaaccacctaactaccagtccttccctgaagtcagggtgacatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgtgctgacacggcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggagagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcgggtggaggtctggaggtggag gatccgggtgggtgggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatgactcagtc ccagccaccccttctcttccacccggcgagagagcaacctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctaactgggtatcagcaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcagccttcaactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgatcttctgccagcagggaataaccttcttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcatcaccac
100798 CAR8 - 가용성 scFv - aa	80	<u>MALFVTAALLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqnqvsllkssvtaadta vyycahyyyggsyamdywggtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlsispgeratlsclscrasqdiskylwnyqqkpgqaprllyhtsrlhsgiparfs gsgsgtdytlstisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik <u>hhhhhhh</u>

[0476]

104882 CAR 8 - 전체 - nt	92	atggctctgtcccgtagccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgctcctcccagactacggagtgagc tggtattagacagcctcccgaaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaccacttactatcaatcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggagtagcggaggaggcg ggagcgggtggagtggtcccgaggcgggtgggtcagaaatcgtgatgaccagagc cctgcaaccctgtccctttctccggggaacgggctaccctttctgtcgggcac acaagatatctcaaaatacctcaattgggtatcaacagaagccgggacaggcccta ggcttcttatctaccacacctctcgctcatagcggattcccgacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgacctctcatctccagcccaggga cttcgcgctctacttctgccagcagggtaacaccctgcggtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccaccacccctgcc ccgacctcgcctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tggtggggcggtgcataccggggtcttgacttgcctgcgatatctacatttggg ccctctggtggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatcccgaagggtcgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104882 CAR 8 - 전체 - aa	38	MALPVTALLPLALLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlsispgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyhtsrllhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavyfcggntlpytfgggtkleiktttpprptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrklliyifkqpfmrpvqttgeedgcsrfpeeeeggcelrvkfssrsadapay kqqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0477]

CAR 9		
CAR9 scFv 도메인	9	eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrliiyhtsrhsgiparfsqsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgqgtlvtvss
99789 CAR9 - 가용성 scFv - nt	69	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgcgcctcgccctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcgagagggcaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgtatcagcagaagccagggcaggctcctcgctgctgatctaccacaccagccgctccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacccctcaccatctcttctctgcagcccagagatttcgcctgtctatttctgccagcaggggaatactctgcctacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaaggagagcgaggatcaggcggtggcggaagcggagaggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctgacttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagctctcttgattcgccagcctccgggaagggctctgaatggattggggtgatttggggatcagagactactactacaattcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaagataatagcaagaacaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccccgctgacaccccgctgtactattgtgccaaacattactattacggaggggtcttatgctatggactactggggacaggggaccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccatcatcac
99789 CAR9 - 가용성 scFv - aa	81	<u>MALPVTALLPLALLHAARPE</u> eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrliiyhtsrhsgiparfsqsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgqgtlvtvss <u>hhhhhhh</u>

[0478]

105974 CAR 9 - 전체 - nt	93	atggccctccctgtcacgcctgtgcttccgctggctcttctgctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccggg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggtatctgggaccgactacccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgcaaggg aacacctgccctacacctttggacagggcaccagctcgagattaaaggtggagg tggcagcgaggaggtgggtccggcggtggaggaagcgaggcggtgggagccagg tccaactccaagaaagcgaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtagctgtgagcgagtgctctctcccgattacgggggtgcttggatcagaca gccaccggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggtctgagactactt actacaactcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgacgcgagccgacaccgctgtactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgagggcaccaccccggt cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggtatgtagaccgcagc tgggtggggcggtgcatacccggggtcttgacttcgctcgatctacatttggg ccctctgggtgtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggc tgtgcagactactcaagaggagcggtgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcgagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaagggccacgcg actgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgctcgg
105974 CAR 9 - 전체 - aa	39	MALPVTALLPLALLHAARPeivmtgspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlliy<u>htsrllhs</u>giparfsgsgtdytltiisslqpedfavyfc<u>ggg</u> <u>ntlpvt</u>fgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgplvkpsetls tctvsgvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyynsslks</u>rvtiskdnsk qvsllkssvtaadtavyycah<u>hyvyggsyandy</u>wggtlvtvssttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrklliyfkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcclrvkfsrsadapay kqqgnqlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprknppqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0479]

CAR10		
CAR10 scFv 도메인	10	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgq gtlvtvssggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlscrasqd iskylwnyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfa vyfcqqgntlpytfqggtkleik
100796 CAR10 - 가용성 scFv - nt	70	atggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggcctccttctgcatgcgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaacctcagcggcggtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctcccggaaagggttgatgagtggtgtcatctggggttc tgaaccacactactacaactcttccctgaagtccagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgtgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcgcggtggaggtctggaggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatgactcagtca ccagccaccctttctctttcaccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctaactggtatcagcaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgatatttctgccagcagggaatacccttccttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccacat
100796 CAR10 - 가용성 scFv - aa	82	<u>MALPVTALLPLALLLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadta vyycahyyyggsyamdywggtlvtvssggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlsispgeratlscrasqdiskylwnyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfqggtkleik <u>hhhhhhhh</u>

[0480]

105975 CAR 10 전체 - nt	94	atggccctccctgtcacgcctgtgtcttcgctggctcttctgtctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaggtggagg tggcagcgaggagggtgggtccggcggtggaggaagcgaggcggtgggagccagg tccaaactccaagaagcgagccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcgagtgctctccccgattacggggtgtcttgatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actacaactcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccccggtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggt ctctggtcacggtgtccagcaccactacccagcaccgagccacccaccccggt cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tggtggggcggtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatctacatttggg cccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggtgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgagagaggagta cgacgtgctggacaagcgagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgagaagaggcaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105975 CAR 10 전체 - aa	40	MALPVTALLPLALLHARFEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQDISKYL</u>NW YQQKPGQAPRLIY<u>HTSRLHS</u>GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC<u>QQG</u> <u>NTLPYT</u>FGQGTKLEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGVSLP<u>DYGV</u>SWIRQPPGKLEWIG<u>VIWGSETTYNSSLKS</u>RVTIISKDNSKN QVSLKLSVTAADTAVYYCAK<u>HYYYGGSYAMDY</u>WGQGLTVTSSTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGCSGRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE AYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0481]

CAR11		
CAR11 scFv 도메인	11	eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgqqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
103101 CAR11 - 가용성 scFv - nt	71	Atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcaccgcactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggtatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacacccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaagtgagg tggcagcgaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgactgtgagc ggagtgtctctcccgattacggggtgtcttgatcagacagccacggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactacaattcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggtactctgggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR11 - 가용성 scFv - aa	83	<u>MALEVTALLPLALLHAARP</u> eivmtqspatlsislspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgqqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss <u>hhhhhhh</u>

[0482]

105976 CAR 11 전체 - nt	95	atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tgattagacagcctcccgaaaggactggagtggatcgagtgatttggggtag cgaaccacttactataactcttccctgaagtcaagggtcaccatttcaaaggata actcaagaatcaagtgaacctcaagctctcatcagtcaccgccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaaacttactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggctccggagggtggcggaagcgaatcgtgatgaccagagc cctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggtaccccttcttctgctgggcac acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccta ggcttcttactctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctccagcccaggga cttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccacccctgcc ccgaccatcgctctcagccgcttccctgctccggaggcatgtagaccgcagc tggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgcgatctacatttggg ccctctggctggtagtctgctgggtctctgctgtcttctactcgtgatcactcttac tgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcagcgggtccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcga gaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaggcgaagggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105976 CAR 11 전체 - aa	41	MALPVTALLPLALLHAARPQVLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPPDYGVs WIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEIVMTQS PATLSLSPGERATLSCRAQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNLPHYTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPA PTIASQFLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPFMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE AYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0483]

CAR12		
CAR12 scFv 도메인	12	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgq gtlvtvssgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskyl nwyqqkpggaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleik
103104 CAR12 - 가용성 scFv - nt	72	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgacccgtgagcggagtggtccctccagactacggagtgagc tggtattagacagcctcccggaaaggactggagtgatcgagtgatttggggtag cgaaccacttactataactcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttcttgcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggccctaggtcttcttctacc acacctctgcctgcatacgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgacatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacacctgcccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR12 - 가용성 scFv -aa	84	~~MALEVTALLLPLALLHAARP~~ qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadta vyycahyyyggsyamdywggtlvtvssgggsgggsgggseivmtqspatls ispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpggaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsg tdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik <hhhhhhhh< h=""></hhhhhhhh<>

[0484]

105977 CAR 12 - 전체 - nt	96	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttcgctggctcttctgtccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccagggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatctgtcagcaaggg aacacccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaagggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccagggtccaactccaagaaa gcggaaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgactgtgagc ggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccacggggaaggg tctggaatggattggagtgtttggggctctgagactactactacaactcatccc tcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacacggcggtgactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgctcgcatatctacatttgggcccctctggtggta cttgcggggtcctgtgctttcactcgtgatcactctttactgtaacgcgggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcagcggttccagaggaggaggaaggcggtcgcaac tgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcggggcagaaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaaatccccaa agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
105977 CAR 12 - 전체 - aa	42	MALPVTALLLPLALLLHARFEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQDISKYL</u>NW YQQKPGQAPRLLIY<u>HTSRLHS</u>GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFC<u>QQG</u> <u>NTLPYT</u>FGQGTKLEIKGGGSGGGSGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLP<u>DYGV</u>SWIRQPPGKLEWIG<u>VIWGSETTYNSSLKS</u>RVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAK<u>HYYYGGSYAMDY</u>WGQGLVTVSSTTPAPRPPTPAPTAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0485]

CTL019		
CTL019 - 가용성 scFv- His 태그 - nt	97	atggccctgcccgtcacogctctgctgctgccccttgctctgcttcttcatgcagc aaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgacctcttggag acagggtgaccatttcttgtcgcgccagccaggacatcagcaagtatctgaactgg tatcagcagaagccggacggaacogtgaagctcctgatctaccatacctctcgct gcatagcggcggtgccctcacgcttctctggaagcggatcaggaaccgattattctc tcactatttcaaactcttgagcaggaagatattgccacctatttctgccagcaggg aataacctgccctacaccttcggaggaggaccaagctcgaatcacoggtggagg aggcagcggcggtggagggtctggtggagggtggttctgaggtgaagctgaagaat caggccctggacttgtggccccttcacagtccctgagcgtgacttgcacogtgtcc ggagtctccctgcccgactacggagtgtcatggatcagacaacctcccgaaagg actggaatggctcggtgtcatctgggtagcgaaactacttactacaattcagccc tcaaagcaggtgactattatcaaggacaacagcaagtccaagtcttcttaag atgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgtgctaagcactacta ctacggaggatcctacgctatggattactggggacaaggtacttccgtcactgtct cttcacaccatcatcaccatcaccatcac
CTL019 - 가용성 scFv- His 태그 - aa	98	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkllyhtsrhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevkqlqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrktiikdnksqvflk mnsqtddtaiyycahyyyggsyamdywgqgtsvtvss <u>hhhhhhhh</u>

[0486]

CTL019 전체 - nt	99	atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccgtggccttgcctgccagccgc caggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggag acagagtcaccatcagttgcagggccaaagtcaggacattagtaaatatttaaattgg tatcagcagaaaaccagatggaaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagatt acactcaggagtcacctcaagggttcagtgccagtggtctggaacagattattctc tcaccattagcaacctggagcaagaagatatggcacttacttttgccaacagggt aatacgcttccgtacacggttcgaggggggaccaaagctggagatcacaggtggcgg tggctcggggcgttggtgggtcgggtggcggcgatctgaggtgaaactgcaggagt caggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctca ggggtctcattaccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaaagg tctggagtggctgggagtaatatgggtagtgaaaccacatactataattcagctc tcaaatccagactgacctcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaa atgaacagtctgcaaacatgatgacacagccatttactactgtgccaaacattatta ctacgggtgtagctatgctatggactactggggccaaggaaacctcagtcaccgtct cctcaaccacgagccagcgcgcgcgaccaccaacacccggcgccccaccatcgctcg cagccccctgtccctgcgccagaggcgtgcggccagcggcgggggcgcgagtga cacgagggggctggacttcgcctgtgatctacatctgggccccttggccggga cttgtggggctccttctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaaacggggcaga aagaaactcctgtatatattcaaaacacatttatgagaccagtacaaactactca agaggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaagaaggaggatgtgaac tgagagtgaagttcagcaggagcgcacagcccccggtacaagcagggccagaac cagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagcatgttttggacaa gagacgtggccgggacacctgagatggggggaaagccgagaaggaagaacctcagg aagccctgtacaatgaaatgacagaagataagatgcggaggccctacagtgaagatt gggatgaaaggcgacgcggcgaggggcaaggggcacgattggcctttaccaggtct cagtcacagccaccaaggacacctacgacgccccctcacatgcaggccctgccccctc gc
CTL019 전체 - aa	58	MALPVTALLLLPLALLLHAARPdiqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdiskylw yqqkpdgtvklliyhtsrhshgvpvrsfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitgggsgggsggggsevkqlqesgpglvapsqlsvtctvs gvslpdygvswirqprrkglewlgviwgsettynsalksrliiikdnssqvflk mnsqtdtdtaiyycahhyyggsyamdywggtsvtvssttpprptptptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldefacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrpvqtteedgcsrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn glynelnlgrreedydvldkrrrdpemmkgkprkrnpqeglynelqdkdkaeysei gmkgerrrgkhgdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0487]

CTL019 scFv 도메인	59	diqmtqtstsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllihtsrllhs gvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqngtlptyfgggtkleitggggs ggggsgggsevkllqesgpplvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirgpprkgle wlgviwgsettyynsalksrlltiikdnksqvflkmnslqtdtdtaiyycahyyyg gsyamdywgqgtsvtvss
--------------------	----	---

[0488]

[0489] scFv 도메인의 인간화 CDR 서열의 서열을 중쇄 가변 도메인에 대해 표 4에, 및 경쇄 가변 도메인에 대해 표 5에 제시한다. "ID"는 각각의 CDR에 대한 각각의 서열 번호를 나타낸다.

[0490] <ㄷ 4>

[0491] 중쇄 가변 도메인 CDR (카바트)

후보	FW	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
뮤린_CART19		GVSLPDYGV	19	VIWGSETTYNSALK	20	HYYYGGSYAMD	24
인간화_CART19 a	VH4	GVSLPDYGV	19	VIWGSETTY ~~SS~~ SLK	21	HYYYGGSYAMD	24
인간화_CART19 b	VH4	GVSLPDYGV	19	VIWGSETTY ~~QS~~ SLK	22	HYYYGGSYAMD	24
인간화_CART19 c	VH4	GVSLPDYGV	19	VIWGSETTYNS ~~SL~~ K	23	HYYYGGSYAMD	24

[0492]

[0493] <표 5>

[0494] 경쇄 가변 도메인 CDR

후보	FW	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
뮤린_CART19		RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
인간화_CART19 a	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
인간화_CART19 b	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
인간화_CART19 c	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27

[0495]

[0496] 표 6은 CD19 구축물 수치 명칭을 scFv의 경쇄 및 중쇄의 특이적 배향, 중쇄 및 경쇄를 분리시키는 링커 단위의 수 (즉 (G4S)₃ (서열 107) 또는 (G4S)₄ (서열 106)), 및 중쇄 CDR2 내의 특징적인 아미노산 서열에 상호관련시키는 식별 키이다.

[0497] <표 6>

[0498] CD19 CAR 명칭.

클론 ID/CAR#	Alt. 클론 ID	쇄 배향	링커	중쇄 CDR2 돌연변이의 부위	서열 번호
104875 (CAR1)	C2136	L2H	3x	YSSSL	28
104876 (CAR2)	C2137	L2H	3x	YQSSL	29
104877 (CAR3)	C2138	H2L	3x	YSSSL	28
104878 (CAR4)	C2139	H2L	3x	YQSSL	29
104879 (CAR5)	C2140	L2H	4x	YSSSL	28
104880 (CAR6)	C2141	L2H	4x	YQSSL	29
104881 (CAR7)	C2142	H2L	4x	YSSSL	28
104882 (CAR8)	C2143	H2L	4x	YQSSL	29
105974 (CAR9)	C2144	L2H	4x	YNSSL	30
105975 (CAR10)	C2145	H2L	4x	YNSSL	30
105976 (CAR11)	C2146	L2H	3x	YNSSL	30
105977 (CAR12)	C2147	H2L	3x	YNSSL	30
CTL019	muCART19	L2H	3x	YNSAL	57

[0499]

[0500] 이어서, CAR scFv 단편을 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝하여, 발현을 위해 EF1 알파 프로모터 (서열 100)를 사용하여 단일 코딩 프레임 내에 전장 CAR 구축물을 형성하였다.

[0501] EF1 알파 프로모터

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGG
CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCCTTTT
CCCCAGGGTGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCA
GAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCTGGCCCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAAT
TACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCT
TGCGCTTAAGGAGCCCTTCGCCCTCGTGTCTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGTGCGAATCT
GGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGCTGCGAC
GCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCG
GGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCG
GACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCTTGGCTTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGC
GGCAAGGCTGGCCCGTGGCACAGATTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCA
AAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAGGGCCCTTTCCGTCCTCAG
CCGTCGCTTCAITGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTAC
GTCGTCTTTAGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGG
CCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTCGATTGGATCTTGGTTTCATTCTCAAGCCTC
AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTGA

[0502]

[0503] (서열 100).

[0504] 인간화 CAR 구축물의 분석을 실시예 4에 설명된 바와 같이 수행하였다.

[0505] **실시예 4: CART 내에서 인간화 CD19 구축물의 분석**

[0506] CAR 기술을 통한 표적화 CD19의 실행성을 평가하기 위해, 항-CD19 항체에 대한 단일쇄 가변 단편을 CD3제타쇄와 함께 렌티바이러스 CAR 발현 벡터 내로 클로닝하고, 4개의 상이한 입체형태의 4-1BB 공동자극 분자 및 최적 구축물을 CD19+ 표적에 반응한 CD19 CAR 형질도입시킨 T 세포 ("CART19" 또는 "CART19 T 세포")의 이펙터 T 세포 반응의 양 및 품질에 기반하여 선택하였다. 이펙터 T 세포 반응은 세포 확장, 증식, 배가, 시토카인 생산 및 표적 세포 사멸 또는 세포용해 활성 (탈과립)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0507] **물질 및 방법**

[0508] *재유도된 인간화 CART19 T 세포의 생성*

[0509] 인간화 CART19 렌티바이러스 전달 벡터를 VSVg 슈도타이핑된 렌티바이러스 입자로 패키징되는 게놈 물질을 생산하기 위해 사용하였다. 렌티바이러스 전달 벡터 DNA를 293T 세포 내로 이들을 함께 형질감염시키기 위해 리포펙타민 시약과 조합으로 VSVg의 3가지 패키징 성분, 즉, gag/pol 및 rev와 혼합하였다. 24 및 48 hr 후에, 배지를 수집하고, 여과하고, 초원심분리에 의해 농축하였다. 생성되는 바이러스 제제를 -80℃에서 저장하였다. 형질도입 단위의 수를 SupT1 세포 상에서 적정에 의해 결정하였다. 재유도된 CART19 T 세포는 CD3x28 비드를 24hr 동안 결합시킨 후, 목적하는 백분율의 형질도입된 T 세포를 얻기 위해 적절한 수의 형질도입 단위를 첨가함으로써 신선한 나이브 T 세포를 활성화함으로써 생산하였다. 이들 변형된 T 세포를 휴지하고 크기가 줄어들 때까지 확장시키고, 이 때 나중의 분석을 위해 동결보존시켰다. 세포 수 및 크기를 코울터 멀티사이저 III을 사용하여 측정하였다. 동결보존 전에, 형질도입된 세포 (세포 표면 상에 CART19를 발현하는)의 백분율 및 그 발현의 그들의 상대 형광 강도를 LSRII 상에서 유동 세포측정 분석에 의해 결정하였다. 막대그래프 플롯으로부터, CAR의 상대 발현 수준은 형질도입된 백분율을 그들의 상대 형광 강도와 비교함으로써 검사할 수 있다.

[0510] *인간화 CART19 재유도된 T 세포의 세포용해 활성, 증식 능력 및 시토카인 분비의 평가.*

[0511] 치사시키고 증식하고 시토카인을 분비하는 인간화 CAR19 T 세포의 기능성 능력을 평가하기 위해, 세포를 해동시키고 철야 회복시켰다. 인간화 CART19에 추가로, 무린 CART19를 비교 목적을 위해 사용한 한편, SS1-BBz를 배경 CAR/T 세포 효과에 대해 비-표적화 발현된 CAR로서 사용하였다. "대조군" 금 표준물 (GS) CART19를 검정 변이를 비교하기 위해 모든 검정에서 사용하였다. 중요하게는, GS CART19는 연구 등급 (즉, 임상 등급이 아님) 제조 조건에서 생산된 세포이고, 성장 배양물 내에 IL-2의 첨가를 포함한다. 이것은 아마도 이들 세포의 전체 생존력 및 기능성에 영향을 미치고, 다른 형질도입된 T 세포 집단의 연구 등급 생산에 대한 직접 비교로서 평가되어서는 안 된다. T 세포를 K562 (CD19를 발현하거나 발현하지 않는 만성 골수성 백혈병 세포주), 또는 Pt14 (CLL 환자로부터 단리된 B 세포)를 향해 유도하였다. 상기 유동 기반 세포독성 검정을 위해, 표적 세포를 그들의 존재를 정량하기 위해 CFSE로 염색하였다. 표적 세포를 유사한 표적 항원 수준을 확인하기 위해 CD19 발현에 대해 염색하였다. CAR19 T 세포의 세포용해 활성은 10:1, 3:1, 1:1, 0.3:1 및 0:1의 이펙터:표적 세포 비의 적정에서 측정하였고, 여기서 이펙터는 항-CD19 키메라 수용체를 발현하는 T 세포로서 규정되었다. 검정은

적절한 수의 T 세포를 불변 수의 표적 세포와 혼합함으로써 개시하였다. 16 hr 후에, 각각의 혼합물의 총 부피를 제거하고, 세척된 각각의 웰을 적절하게 합하였다. T 세포를 CD2에 대해 염색하고, 모든 세포를 마커 7AAD로 생존/사멸에 대해 염색하였다. 최종 세척 후에, 펠렛화시킨 세포를 예정된 수의 계수 비드와 함께 특정한 부피 내에 재현탁하였다. 세포 염색 데이터를 LSRII 유동 세포측정에 의해 수집하고, 결과를 정량하기 위해 비드를 사용하여 F1oJo 소프트웨어로 분석하였다.

[0512] 인간화 CAR19 T 세포의 세포 증식 및 시토킨 생산을 측정하기 위해, 세포를해동시키고 철야 회복시켰다. 인간화 CART19에 추가로, 무린 CART19를 비교 목적을 위해 사용한 한편, SS1-BBz를 배경 CAR/T 세포 효과에 대해 비-표적화 발현된 CAR로서 사용하였다. "대조군" 금 표준물 (GS) CART19를 검정 변이를 비교하기 위해 모든 검정에서 사용하였다. T 세포를 K562 (CD19를 발현하거나 발현하지 않는 만성 골수성 백혈병 세포주), 또는 Pt14 (CLL 환자로부터 단리된 B 세포)를 향해 유도하였다. 또한, 내인성 면역학적 신호에 반응하여 T 세포의 잠재력을 평가하기 위해 CD3x28 비드를 사용하였다. 증식을 분석하기 위해, T 세포를 CFSE로 염색하였다. 증식은 이제 2개의 딸 세포로의 모 마킹의 분리를 반영하는 CFSE 염색의 희석이다. 검정은 단지 1:1 및 1:0의 이펙터:표적 비를 시험하고, 여기서 이펙터는 항-CD19 키메라 수용체를 발현하는 T 세포로서 규정되었다. 검정은 이중으로 수행하고, 세포의 혼합 24 hr 후에, 50%의 배지를 인간 시토킨 검출의 루미넥스(Luminex) 10-플렉스 패널을 사용하여 시토킨 분석에 대해 제거/교체하였다. 5일 후에, T 세포를 CAR 발현에 대해 염색하고, CD4 또는 CD8 세포로서 표현형 결정하고, 생존/사멸에 대해 7AAD로 염색하였다. 최종 세척 후에, 펠렛화시킨 세포를 예정된 수의 BD 계수 비드와 함께 특정한 부피 내에 재현탁하였다. 세포 염색 데이터를 LSRII 유동 세포측정에 의해 수집하고, 결과를 정량하기 위해 비드를 사용하여 F1oJo 소프트웨어로 분석하였다. 총 세포 계수는 특정한 수의 비드에 비해 계수된 세포의 수에 계수할 비드의 분율을 곱하여 결정하였다.

[0513] 현재 성공적인 무린 CART19와 유사하게 기능하는 인간화 CART19 세포에 대한 잠재성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 표적화 세포를 치사시키고, 표적화된 항원에 반응하여 증식하고, 존속의 징후를 보이는 그들의 능력을 시험관내에서 평가하기를 원하였다. 각각의 인간화 CART19 렌티바이러스 구축물을 패키징하고 이들을 SupT1 세포 상에 적정함으로써, 본 발명자들은 형질도입을 약 50%로 표준화하기 위한 바이러스의 양을 결정할 수 있었다. 이것은 세포당 유사한 평균 통합 부위로 출발하여 활성의 보다 직접적인 비교를 가능하게 한다.

[0514] 치료적 CAR19 T 세포는 그의 나이브 T 세포가 T 세포, CD4+ 및 CD8+ 림프구에 대한 음성 선택에 의해 얻어지는, 정상 성분채집된 공여자로부터의 혈액을 출발물질로 사용하여 생성하였다. 이들 세포를 37°C, 5% CO₂에서 10% RPMI 내에서 CD3x28 비드에 의해 활성화시켰다.

[0515] 24hr 후에, T 세포는 과열하고, 표준화된 양의 바이러스를 첨가하였다. T 세포는 대수 성장 패턴으로 분할하기 시작하였고, 이것은 1 ml당 세포 계수 및 세포 크기를 측정함으로써 모니터링한다. T 세포가 휴지하기 시작함에 따라, 대수 성장은 약해지고, 세포 크기는 줄어든다. 느려지는 성장 속도 및 ~300 fl에 접근하는 T 세포 크기의 조합은 동결보존되거나 재자극시킬 T 세포에 대한 상태를 결정한다.

[0516] 크기에 의해 보이는 바와 같이 휴지하는 T 세포의 매우 유사한 경향이 존재한다. UTD 집단 및 현재 무린 CART19를 갖는 인간화 CART 세포들 사이에 거의 중첩하는 패턴은 활성화 이후 정상 T 세포 확장에 대한 인간화 CAR19의 흔치 않은 효과가 없음을 나타낸다. 대조군으로서, SS1-BBz를 원치않는 항원 비의존성 CAR 활성을 규정하도록 사용하였다. 총 세포 수에서 확장 프로파일은 아마도 주로 세포의 상이한 출발 수 때문에 개별 확장에서 실제 수의 차이를 보여준다. 출발 T 세포 수를 표준화함으로써, 밀접한 클러스터가 모든 CART19 세포에 대해 나타났다. 또한, 항원 비의존성 CAR 활성화의 원치않는 효과가 군으로부터 멀어지고 보다 아래로 가는 선에서 검출되었다.

[0517] 각각의 이들 CAR19 발현 세포에 대한 표면 발현의 수준을 결정하였다. 형질도입을 위해 표준화된 적정된 바이러스는 형질도입 효율, 형질도입된 세포%와 상호관련하는 대등한 발현 수준을 보여준다. 일부 CAR은 보다 초기 패키징으로부터 추론된 그들의 역가를 가졌고, 그들의 형질도입된 백분율은 낮지만, 그들의 MFI는 또한 예상된 바와 같이 감소하였다. 결과는 UTD 및 무린 CAR19 T 세포에 비해, 정상적으로 확장하는 세포 능력에 대한 인간화 CAR19의 검출가능한 부정적인 효과가 없음을 나타낸다.

[0518] 세포 상에 발현된 세포 표면 특이적 에피토프를 선택적으로 포착하고 그를 파괴하는 인간화 CART19 세포의 능력을 분석하였다. 야생형 K562 세포는 CD19를 발현하지 않지만, CD19를 발현하도록 형질도입될 수 있다. 이들 치사 곡선을 비교하면, 이펙터 세포의 양을 적정하면 CD19를 발현하는 세포가 파괴되는 것을 보여준다. 인간화 CART19 세포 또는 현재 임상 무린 CART19 세포로 변형된, 동일한 공여자로부터의 재유도된 T 세포는 치사시키는 그들의 능력에서 차이가 없음을 나타낸다. 치사 곡선은 환자 14로부터 CD19+ CLL 세포를 표적화하는 인간화

CART19 세포 사이에 매우 유사한 치사 능력이 발견됨을 보여준다. 흥미롭게도, 특히 GS CART19에서 전체 세포 용해 활성의 감소가 존재하고, 이것은 이들 세포가 특이적 억제 특성을 가질 수 있음을 제안한다. 표적 세포 상에 발현된 유사한 수준의 CD19는 발현 수준이 세포 치사에서의 차이에 대한 이유가 아님을 나타낸다.

[0519] 표적 세포를 만난 후 증식하는 인간화 CART19 세포의 필수 특성은 대조군 CD3x28 비드 및 CD19 발현 표적에 의해 자극된 후 모든 구축물에서 발견된다. 표적화 Pt14 CLL 세포는 경쇄 대 중쇄 배향을 갖는 scFv를 사용하여 근소하게 더 큰 증식 속도를 나타내는 것으로 나타나고, 여기서 3x 또는 4x GGGGS 연결 (각각 서열 107 및 106)을 가질 때 편향은 보이지 않았다. 증식 결과는 5일에 걸쳐 축적된 세포의 총수를 반영하고, 이것은 인간화 CART19, 2146, 2144, 2136, 2141 및 2137이 보다 많은 증식 신호를 T 세포에 보내는 것을 나타낸다. 인상적으로, 이것은 Pt14 CLL 세포를 표적화하는 인간화 CART19 세포에서 검출되었다.

[0520] 종합하면, 인간화 CART19 구축물은 세포용해 활성, 증식 반응 및 항원 특이적 표적에 대한 시토카인 분비에서 현재 무린 CART19와 매우 유사한 특징을 보인다. 표적 활성화시에 보다 많은 증식 신호를 T 세포에 보내는 인간화 CART19 세포 (2146, 2144, 2136, 2141 및 2137)의 잠재성은 치료 반응을 잠재적으로 향상시키기 위해 이들 새로운 구축물의 잉여 이익인 것으로 보일 것이다.

[0521] **결과**

[0522] 탈과립 및 시토카인 생산 검정 모두를 이용하여, 조작된 CART19 T 세포가 CD19+ 세포를 특이적으로 표적화함을 입증하였다.

[0523] 본 발명의 인간화 CD19CAR 구축물 ("huCART19"로도 알려짐)로 형질도입시킨 ND317 세포를 분석하였다. 무린 CART19 및 비변형된 (UTD) T 세포에 비해 인간화 CART19 후보물질을 사용한 CD3x28 활성화 및 형질도입 후에, 그들의 확장 동안 T 세포의 크기에서 밀접한 유사성이 존재하였다.

[0524] 실험에서는 무린 CART19 및 비변형된 (UTD) T 세포에 비해 상이한 인간화 CART19 후보물질을 사용한 CD3x28 활성화 및 형질도입 후에, 그들의 확장 동안 축적된 T 세포의 수에서 차이가 적음을 보여주었다.

[0525] 인간화 CART19의 세포 표면 발현은 무린 CART19와 대등하고 발현 수준은 매우 유사하였다. 막대그래프의 오버레이는 각각의 인간화 CART19 형질도입시킨 T 세포의 세포 표면 발현 염색 패턴을 플로팅하고, 이들 프로파일로부터 계산된 평균 형광 강도 (MFI)는 형질도입된 세포의 백분율과 잘 상호관련되었다.

[0526] 또한, 인간화 CART19는 CD19 발현 표적 세포를 표적화하는데 있어서 무린 CART19와 유사한 특이적 세포독성 활성을 갖고 대등하였다. CSFE 표지된 K562cc (도 1A, 비-발현 CD19 대조군), K562.CD19 (도 1B, CD19를 발현하도록 형질도입된 K562 세포) 또는 Pt14 (도 1C, CLL 환자로부터의 B 세포)를 표적화하는 이펙터 인간화 CART19 세포를 사용하여 이펙터 대 표적 (E:T) 비의 적정을 이용하는 16 hr-유동-기반 사멸 검정으로부터 플로팅하였다. 모든 인간화 CART19 세포의 세포용해 활성은 무린 CART19와 유사하고 대등하다. 상이한 표적 사이에 세포용해 활성에서의 차이는 유사하고 대등하였고, 이것은 무린 CART19의 활성이 인간화 형태의 CART19에서 보존됨을 나타낸다.

[0527] 표적 세포와 혼합한 6일 후 CFSE 표지된 인간화 CART19 세포의 막대그래프 오버레이는 그들의 증식 능력을 보여준다 (도 5). CAR19로부터 전달된 증식 반응은 양성 임상 반응을 생성하기 위해 표적 세포와의 결합 및 그의 사멸 후 필수적인 반응이다. SS1-BBz CSFE 염색 (모 세포 염색을 희석시키는 분할하는 딸 세포의 표시자)은 표적화 비의존성 메카니즘에서 분할을 유지시키는 휴지하지 않는 T 세포의 결과이다.

[0528] 증식하는 세포 집단 전체 능력은 TCR과 공동-자극물질 CD28의 내인성 결합을 모방하는 CD3x28 비드를 사용하여 평가하였다. 데이터는 각각의 세포 집단이 대등한 증식 잠재력을 가짐을 나타냈다. 모든 인간화 CART19 세포 및 무린 CART19 세포는 CD19를 발현하는 K562 세포와 결합 시에 대등하게 강하게 증폭하였다. 인간화 CART19 세포는 또한 CLL 환자로부터 얻어진 B 세포에 잘 반응하였지만, 몇몇은 근소하게 더 적게 반응하는 것으로 보였다. 도 2A 및 2B에 제시된 바와 같이, 인간화 CART19 세포 2136, 2137, 2140, 2141, 2144 및 2146은 CSFE 염색의 보다 큰 희석에 의해 입증된 바와 같이 근소하게 더 강건한 증식을 갖는 것으로 보일 수 있다. 이들 구축물은 모두 경쇄 대 중쇄의 동일한 가변 쇠 배향을 가졌고, 이것은 배향의 선택임을 나타낸다. 중쇄 CDR2 부위에서 아미노산 변화를 보다 자세히 살펴보면 (표 1) 각각의 3개의 변이 YSSSL, YQSSL 및 YNSSL (각각 서열 28, 29 및 30)은 표적을 만난 후 보다 강건한 증식을 갖는 것으로 보이는 구축물에서 나타남을 밝혀졌다. 또한, 이들 관찰된 구축물은 3개 카피의 서브유닛 (3G4S)을 함유하는 G4S 링커 (서열 107) 및 4개 카피의 서브유닛 (4G4S)을 함유하는 G4S 링커 (서열 106)를 모두 갖고, 이것은 링커 크기가 기능에 영향을 미치지 않았음을 나타

낸다.

[0529] 상기 설명된 증식성 확장으로부터, 종양 결합 이후 5일 후의 총 세포 수를 결정하였다. 세포는 초기 접종된 것보다 수의 감소를 보여주었고, 이것은 생존을 유지하기 위해 활성화가 요구됨을 나타낸다. 6일의 끝에 총 세포 계수가 유사하였음을 보여주기 위해 내인성 활성화 대조군을 분석하였다. CD19를 발현하는 K562 세포를 표적화하는 인간화 CART19 세포는 2개의 무린 CART19 세포는 둘 모두 보다 많은 세포 수를 갖게 되었음을 보여주고, 여기서 2146이 유사한 값을 갖는 모든 다른 구축물에 비해 근소하게 더 높았다. 총 세포 수를 또한 환자 14 (pt14)로부터 B 세포에 노출의 6일 후에 분석하였고, 흥미롭게도 앞서 선택된 인간화 CART19 구축물 2146, 2144, 2136, 2141 및 2137 (이들은 모든 경계 대 중쇄 배향을 갖고 3개의 아미노산 변이 YSSSL, YQSSL 및 YNSSL (각각 서열 28, 29 및 30)을 나타낸다)이 무린 CART19보다 더 높은 총 세포 수를 생성시킴을 보여준다. 다양한 인간화 항-CD19CAR 클론들 사이의 상기 예상되지 않은 구별은 이들 구축물을 형질도입시킨 CART 세포의 보다 우수한 임상 효능으로 번역될 수 있다.

[0530] CD19를 발현하지 않는 대조군 K562 세포에 노출된 후 인간화 CART19 세포로부터 생산된 시토카인의 배경 수준을 분석하였다. 24 hr 상청액을 루미넥스 30-플렉스 패널을 사용하여 분석하였다. CD3x28 비드를 사용한 내인성 면역계의 자극으로부터 잠재적인 시토카인 프로파일은 각각의 세포 집단이 대등한 시토카인 프로파일을 가짐을 나타낸다.

[0531] 데이터는 또한 인간화 CART19 및 무린 CART19가 동일한 표적에 반응할 때 유사한 수준에서 유사한 시토카인 프로파일을 생산함을 보여준다. 시토카인 프로파일은 Pt14 표적 세포에 표적화할 때 더 낮지만 유사하였다.

[0532] **실시예 5: 생체내 ALL 모델에서 인간화 CD19 CAR T 세포 치료.**

[0533] 1차 인간 ALL 세포는 시험관내에서 배양해야 할 필요 없이 면역손상된 마우스 내에서 성장할 수 있다. 진료소에 발견된 환자 집단을 나타내는 모델에서 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포의 효능을 시험하기 위해 이들 마우스를 사용할 수 있다. 본원에서 사용된 모델 HALLX5447을 CAR T 세포의 효능을 시험하는 연구에서 사용하기에 앞서 NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 마우스에서 2회 계대배양하였다.

[0534] 무린 CD19 CAR T 세포는 이전에 1차 인간 ALL의 NSG 마우스 모델에서 백혈병 세포를 표적화하고 사멸시키는 것으로 나타났다. CD19 scFv (단일쇄 Fc 가변 단편)은 인간화되었고, 본 실시예는 생체내에서 ALL 종양 세포를 제거하는 인간화 CD19 CAR을 발현하는 T 세포 (CAR 2)의 능력을 무린 CD19 CAR T 세포에 비교하였다. 여기서, 이들 세포의 효능을 인간 CD19+ 세포의 말초 혈액 FACS 분석에 의해 검정할 때 확립된 1차 인간 ALL을 갖는 마우스에서 직접 비교하였다. 1.5x10⁶개의 1차 ALL 세포의 정맥내 이식 후에, 혈액 내에 2.5-4% CD19+ 인간 세포의 질환 부담을 종양 이식 2주 후에 달성하였다. 상기 CD19 백분율은 마우스의 혈액 내의 총 세포에 대한 비율이다. CAR T 세포를 사용한 처리 이전에 마우스 내의 인간 세포의 100%는 종양 세포이다. 말초 혈액 내에 2% 초과 CD19+ 인간 세포의 백분율을 상기 모델에서 확립된 인간 ALL 질환인 것으로 간주하였다. 백혈병-보유 마우스를 일단 백혈병이 마우스에서 확립된 후에, 대략 종양 이식의 대략 2 내지 3주 후에 CAR T 세포로 처리하였다. 각각의 군의 마우스를 5x10⁶개의 총 인간 T 세포로 처리하였다. CAR 발현 렌티바이러스를 사용한 공여자 인간 T 세포의 형질도입 효능은 40-60%이었다. T 세포를 사용한 처리 이후에, 질환 진행에 대한 생체마커로서 혈액 내의 CD19⁺ 인간 세포의 백분율 분석을 위해 마우스를 매주 채혈하였다.

[0535] 물질 및 방법:

[0536] **1차 인간 ALL 세포:** 1차 세포를 이식에 앞서 시험관내에서 배양하지 않았다. 이들 세포를 ALL 환자로부터 수거한 후에, 확립 및 확장을 위해 마우스 내로 전달하였다. 종양 세포가 마우스 내에서 확장된 후, 골수 및 비장 세포를 수거하고, 재이식을 위해 별개의 배치로 생존가능하게 동결시켰다. 세포를 90% DMSO 및 10% FBS 내에서 5x10⁶개 세포/ml의 최소 농도로 동결시켰다. 재이식을 위해, 동결된 ALL 세포를 해동한 후, NSG 마우스에게 정맥내 주사하여, 인간화 CD19 CAR T 세포 및 무린 CD19 CAR T 세포의 항종양 효능을 비교하기 위해 사용할 ALL을 갖는 마우스를 생성하였다.

[0537] **마우스:** 6주령 NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스를 잭슨 래보라토리(Jackson Laboratory) (스톡(stock) 번호 005557)로부터 입수하였다. 동물을 실험에 앞서 노파르티스(Novartis) NIBRI 동물 시설에서 적어도 3일 동안 적응시켰다. 동물은 노파르티스 ACUC 규정 및 지침에 따라 취급하였다.

- [0538] **종양 이식:** 생체내 연속 계대배양한 1차 인간 ALL 세포, 모델 HALLX5447을 37℃ 수조 내에서 해동시켰다. 이어서, 세포를 15 ml 원뿔형 튜브에 옮기고, 냉 멸균 PBS로 2회 세척하였다. 이어서, 1차 ALL 세포를 계수하고, 15×10^6 개 세포/ml의 PBS의 농도로 재현탁시켰다. 세포를 얼음 상에 놓고, 마우스에 즉시 (1시간 이내에) 이식하였다. ALL 세포를 100 μ l 부피 내에서 꼬리 정맥을 통해 마우스당 총 1.5×10^6 개 세포로 정맥내 주사하였다.
- [0539] **CAR T 세포 투약:** 마우스에게 종양 이식의 16일 후에 5×10^6 개 T 세포를 투여하였다. 세포를 섭씨 37도 수조 내에서 부분적으로 해동시키고, 세포를 담은 튜브에 1 ml의 냉 멸균 PBS를 첨가하여 완전히 해동시켰다. 해동시킨 세포를 15 ml 팔콘 튜브에 옮기고, PBS를 사용하여 10 ml의 최종 부피로 조정하였다. 세포를 1000rpm에서 각각 10분 동안 2회 세척한 후, 혈구계 상에서 계수하였다. 이어서, T 세포를 50×10^6 개 세포/ml의 냉 PBS의 농도로 재현탁시키고, 마우스에게 투약할 때까지 얼음 상에 유지하였다. 마우스에게 5×10^6 개 T 세포/마우스의 용량에 대해 100 μ l의 CAR T 세포를 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주사하였다. 군 당 5마리 마우스를 100 μ l의 PBS 단독 (PBS), 형질도입되지 않은 T 세포 (모의), 무린 CD19 CAR T 세포 (muCTL019), 또는 인간화 CD19 CAR T 세포 (huCTL019)로 처리하였다. 형질도입되지 않은 T 세포, muCTL019 T 세포, 및 huCTL019 T 세포는 모든 동일한 인간 공여자로부터 평행으로 제조하였다.
- [0540] **동물 모니터링:** 매주 2회 체중 측정을 비롯하여 마우스의 건강 상태를 매일 모니터링하였다. 체중 변화 %는 $(BW_{\text{현재}} - BW_{\text{초기}}) / (BW_{\text{초기}}) \times 100\%$ 로서 계산하였다. 종양 부담은 말초 혈액 FACS 분석에 의해 매주 모니터링하였다. 마우스를 꼬리 정맥을 통해 얼음 상에 유지시킨 EDTA 코팅된 튜브 내로 매주 채혈하였다. 10-20 μ l의 혈액을 튜브로부터 얼음 상의 96 웰 플레이트로 플레이팅하였다. 적혈구를 ACK 적혈구 용해 완충제 (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 A10492-01)로 용해시킨 후, 냉 PBS로 2회 세척하였다. 세포를 인간 및 마우스 Fc 블록(block)의 Fc 차단 믹스(blocking mix) (밀테나이어 바이오텍(Miltenyi Biotec), 카탈로그 번호 130-059-901 및 130-092-575)와 함께 30분 동안 인큐베이션한 후, 항-인간 CD19 항체와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 2% 파라포름알데히드 용액으로 20분 동안 고정시키고, 세척하고, PBS + 2% FBS 내에 철야 저장한 후, 비디 칸토(BD Canto) 또는 포르테사(Fortessa) 상에서 분석하고, 이어서 플로우조(FlowJo) FACS 분석 소프트웨어를 이용하여 추가로 분석하였다. 세포를 인간 HALLX5447 ALL 종양-보유 NSG 마우스의 혈액 내에 인간 CD19⁺ 세포의 비율을 결정하기 위해 분석하였다. 혈액 내의 CD19 백분율을 평균±평균의 표준 오차 (SEM)로서 기록하였다.
- [0541] % 처리군/대조군 (T/C) 값은 다음 식을 사용하여 계산하였다:
- [0542] $\Delta T \geq 0$ 인 경우에 % T/C = $100 \times \Delta T / \Delta C$;
- [0543] $\Delta T < 0$ 인 경우에 % 퇴행 = $100 \times \Delta T / T_{\text{초기}}$;
- [0544] 여기서, T = 연구의 최종일에 약물 처리군의 평균 말초 혈액 CD19 백분율; $T_{\text{초기}}$ = 투약의 초기일에 약물 처리군의 말초 혈액 CD19 백분율; ΔT = 연구의 최종일에 약물 처리군의 평균 말초 혈액 CD19 백분율 - 투약의 초기일에 약물 처리군의 평균 말초 혈액 CD19 백분율; C = 연구의 최종일에 대조군의 평균 말초 혈액 CD19 백분율; ΔC = 연구의 최종일에 대조군의 평균 말초 혈액 CD19 백분율 - 투약의 초기일에 대조군의 평균 말초 혈액 CD19 백분율.
- [0545] 100% 내지 42% 범위의 T/C 값은 항종양 활성을 전혀 갖지 않거나 최소로 갖는 것으로 해석되고; T/C 값 $\leq 42\%$ 및 $> 10\%$ 는 항종양 활성 또는 종양 성장 억제제를 갖는 것으로 해석된다. T/C 값 $\leq 10\%$ 또는 퇴행 값 $\geq -10\%$ 는 종양 정체인 것으로 해석된다. 퇴행 값 $< -10\%$ 를 퇴행으로서 기록한다.
- [0546] **결과:**
- [0547] 인간 ALL의 1차 모델에서 무린 및 인간화 CD19 CAR T 세포의 항종양 활성을 평가하고 직접 비교하였다. 제0일에 종양 이식 이후에, 마우스를 처리군으로 무작위로 나누고, 제16일에 5×10^6 개 T 세포로 정맥내 처리하였다. 동물이 종점에 도달할 때까지 ALL 질환 부담 및 동물 건강을 모니터링하였다. 모든 군 내의 마우스를 대조군 내의 질환 부담이 말초 혈액 내에서 80% 초과인 인간 CD19⁺ 세포일 때 종양 이식 후 제65일에 안락사시켰다.
- [0548] 대조군, 및 무린 또는 인간화 CD19 CAR T 세포로 처리한 군 사이에서 $P < 0.01$ 을 갖는 질환 부담의 명백한 차이가 보였고, 이것은 종양 이식 후 제24일부터 제65일의 연구 끝까지 지속하였다. 무린 및 인간 CD19 CAR T 세포는

NSG 마우스에서 인간 HALLX5447 ALL 종양 세포 성장을 제어하는 유사한 능력을 나타냈다. 두 군은 HALLX5447 이식 후 제21일에 12-15% 인간 CD19⁺ 세포의 피크 말초 혈액 질환 수준을 보여주었다. 종양 세포 이식의 42일 후에, huCTL019 군에서 인간 CD19⁺ 세포는 검출가능하지 않은 반면, muCTL019 군에서 인간 CD19⁺ 세포의 백분율은 약 1%로 하락하였다. 무린 및 인간화 CD19 CAR T 세포는 둘 모두 상기 모델에서 1차 인간 ALL 세포의 확장을 제어하는 대등한 능력을 야기하였다 ($P>0.05$). 모의 형질도입된 T 세포 군에 대한 % T/C 값은 94.40%이었고, 이것은 모의 형질도입된 T 세포는 항종양 활성을 갖지 않음을 나타낸다. muCTL019 군의 % 퇴행은 -89.75%이고 huCTL019 군은 -90.46%이었고, 이것은 이들 치료가 둘 모두 HALLX5447 종양 모델의 퇴행을 유발할 수 있음을 입증한다. 이들 마우스에서 질환 부담의 척도로서 말초 혈액 인간 CD19⁺ 세포 백분율을 도 7에 제시한다. 임의의 T 세포를 투여받지 않은 PBS 처리군은 정맥내 이식된 NSG 마우스에서 기준선 1차 ALL 종양 성장 운동학을 나타냈다. 모의 치료군은 CAR T 세포와 동일한 시험관내 확장 과정을 거친 형질도입되지 않은 T 세포를 투여받았다. 이들 세포는 상기 종양 모델에서 T 세포의 비-특이적 반응을 보여주는 T 세포 대조군으로서 역할을 한다. PBS 및 모의 형질도입된 T 세포 치료군은 둘 모두 실험 내내 지속적인 종양 진행을 나타냈다. 무린 및 인간화 CD19 CAR T 세포는 둘 모두 5×10^6 개 T 세포 주사의 1주 이내에 질환의 진행을 제어하고, 상기 65일 연구 과정에 걸쳐 질환 제어를 지속시키는 유사한 능력을 나타냈다.

[0549] 무린 및 인간화 CD19 CAR 형질도입된 T 세포의 항종양 활성을 1차 인간 ALL 모델, HALLX5447을 보유하는 NSG 마우스에서 효능 연구로 평가하였다. 상기 연구는 무린 및 인간화 CD19 CAR T 세포 (muCTL019 및 huCTL019)가 둘 모두 인간 ALL의 1차 모델에서 항종양 반응을 시작시킬 수 있음을 입증하였다. 또한, 말초 혈액 질환 부담에 의해 검정할 때 상기 반응은 muCTL019 및 huCTL019 세포에 대해 동일하였다. 무린 및 인간화 CD19 CAR T 세포는 둘 모두 T 세포를 투약한 마우스의 1주 이내에 1차 ALL 성장을 제어한다. 처리 후 초기에, 질환 부담은 실질적으로 검출불가능한 수준으로 감소하기 전에 계속 증가하였다. 무린 또는 인간화 CAR T 세포를 사용한 1회 처리는 대조군 처리된 마우스에서 65일 질환 진행의 과정에 걸쳐 지속된 항종양 반응을 야기하였다. 인간화 CD19 CAR T 세포는 무린 CD19 CAR T 세포에서 보인 바와 같이 효과적인 항-CD19 종양 반응을 시작시키고 ALL 질환 부담을 제어하는 유사한 능력을 나타냈다.

[0550] **실시예 6: 다발성 골수종을 치료하는데 사용하기 위한 CD19 CAR T 세포.**

[0551] 화학요법, 표적화 요법 및 자가 줄기세포 이식의 현재 요법을 사용하더라도, 골수종은 불치의 질환으로 여겨진다. 본 실시예에서는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD19에 대해 생성된 자가 T 세포 (렌티바이러스/CD19:4-1BB:CD3제타; "CART19" 또는 CTL019로도 알려짐)를 사용하는 다발성 골수종 (MM)의 치료를 설명한다. 본 실시예는 CD19-유도된 CAR 요법이 매우 낮은 (대부분의 방법에 의해 검출불가능한) 수준의 CD19를 발현하는 골수종 줄기세포 및/또는 종양 세포를 표적화하는데 기반한 깊은 장기간의 오래가는 회복을 확립하는 잠재력을 갖는 것을 입증한다.

[0552] 침습성 2차 형질 세포 백혈병이 있는 환자를 치료하는데 있어서, 본 발명자들은 구제 자가 줄기세포 이식의 2일 후에 투여된 CART19가 다중 라인의 화학요법을 통해 진행된 환자에서 형질 세포 백혈병의 신속한 청소 및 매우 우수한 부분적인 반응을 일으켰음을 발견하였다. 상기 환자는 치료에 앞서 수개월 동안 수혈-의존성이었고; 치료의 2개월 후에, 혈액 계수 (정상-범위 혈소판 계수 및 백혈구 계수를 갖는)를 회복하였고, 치료로부터 병원에서 퇴원한 이래로 수혈을 필요로 하지 않았다.

[0553] 골수종 세포는 자연적으로 CD19를 발현하지 않기 때문에, CART19 치료가 상기 종양에서 신속하고 유의한 종양 반응을 유도하였다는 발견은 놀라웠다. 특정 이론에 매이기를 바라지 않지만, 다음 이유 때문에 CART19가 골수종을 치료하기 위해 사용될 수 있는 것으로 추론되었다: (1) 골수종 세포는 전통적으로 유동 세포측정에 의해 CD19 발현에 대해 음성인 것으로 생각되었지만, 발현이 RNA에 의해서 검출가능하지만 유동 세포측정 또는 면역조직화학에 의해 측정가능하지 않은 정도로, 골수종 세포가 매우 낮은 수준의 CD19를 발현할 수 있다는 것을 나타내는 데이터가 존재한다; (2) 특히 화학요법에 내성이고, 다발성 골수종을 일으키는 암성 줄기세포인 것으로 생각되는 클론형 B 세포를 표적화하는 개념. B 세포 및 골수종 종양 세포 사이에 클론 관계가 존재하지만, 전통적인 골수종 요법은 B 세포보다는 악성 형질 세포를 목표로 한다. 따라서, 골수종을 치료하기 위한 CART19는 대부분의 골수종 요법과는 상이한 세포 집단을 표적으로 한다.

[0554] 본 발명자들의 단일 환자 경험에서, 환자는 순환 형질 세포를 갖고, 본 발명자들은 그녀의 종양 세포를 CD19의 발현에 대해 시험할 수 있었다. 종양 세포의 대략 1-2%가 CD19 항원을 발현하였다 (도 8). 따라서, CART19는 종양 세포의 매우 작은 집단에 대해 직접적인 효과를 가질 수 있는 것으로 추론되었고; 이것은 단지 CD19+ 종양

세포의 매우 작은 집단을 표적화하는데 기반하여 예측되지 않았지만 매우 우수한 부분적인 반응이었다.

[0555] 본 사례에서, 고-용량 펠팔란 후 자가 줄기세포 이식 구조 이후에 CART19를 투여하였다. 이것은 골수종에서 표준 요법이지만, 치유하는 것은 아니다. 또한, 상기 환자는 이전에 직렬식 자가 줄기세포 이식을 받았고 이식 후 초기에 (<6개월) 재발하였다. 특정 이론에 매이기를 바라지 않지만, 본 실시예에 설명된 바와 같은 CART19 세포의 사용은 구체 자가 줄기세포 이식과 조합할 때 골수종 치료에서 중첩하지 않는 메커니즘을 가질 수 있다.

[0556] 추가의 10명의 다발성 골수종 환자를 I상 임상시험에서 CART19로 치료할 것이다.

[0557] 용량 근거 및 위험/이익

[0558] 본 발명자들은 상기 프로토콜에 대해 정맥내 투여 경로를 통한 평편 (flat) 용량을 사용하기 위해 선택하였다. 상기 프로토콜의 1차 목적은 다발성 골수종의 환자에게 CART-19 세포를 투여하는 안전성 및 실행성을 시험하는 것이다. 예상되는 1차 독성은 (1) CAR이 악성 또는 정상 B 세포 상에서 그들의 대리 CD19 항원을 만날 때 시토키인 방출; (2) 리툭시맙 요법과 유사한 정상 B 세포의 고갈; (3) 확장된/공동자극된 자가 T-세포를 MM에 대해 ASCT와 결합할 때 이전에 보인 바와 같은 이식편-대-숙주 질환을 흉내내는 스테로이드-반응성 피부 및 위장관 증후군. 이론적인 관심은 CART-19 T 세포의 형질전환 또는 제어되지 않은 증식은 높은 수준의 CD19에 반응하여 일어날 수 있는지 여부였다. 이것은 CLL 환자의 또 다른 연구에 비해 본원에서 덜 문제가 되었고, 이것은 MM에서 클론형 B-세포의 부담은 상기 연구에서 치료된 난치성 CLL 환자에서 악성 B-세포의 부담보다 훨씬 더 낮은 것으로 예상되기 때문이다.

[0559] 용량 근거

[0560] 처음 3명의 환자에서, 본 발명자들은 1.4×10^7 내지 1.1×10^9 개 CART-19 세포 범위의 용량에서 임상 활성을 관찰하였다. 상기 관찰은 적어도 치료된 처음 3명의 환자에서, 명백한 용량 반응 관계가 존재하지 않음을 보여 준다. 완전한 반응은 용량에서 2 로그 배수 차이를 투여된 환자에서 관찰되었다. 따라서, 대사되는 표준 약물과는 달리, CAR T 세포는 넓은 용량 반응 범위를 가질 수 있다. 이것은 아마도 CAR T 세포가 환자 내에서 광범하게 증식할 수 있기 때문이다. 따라서, 본 발명자들은 주입을 위해 $1-5 \times 10^8$ 개 CART-19 세포의 용량 범위를 설정하였다. 동정적 사용에 기초하여 제공된 상기 단일-환자 연구에서, 환자는 5×10^8 개까지의 CART19 세포를 제공받을 것이고, 여기서 용량 하한은 없다. 10명의 환자 시험에 대해, 환자는 $1-5 \times 10^7$ 개 CART-19 세포를 제공할 것이다.

[0561] 일반적인 설계

[0562] 이것은 동정적 사용에 기초하여 제공된 단일 환자-연구이고; CART-19를 발현하도록 형질도입된 자가 T 세포의 주입이 안전한지 결정하기 위해 I상 연구 후 모델을 제시하였다. 연구의 1차 목표는 처음 ASCT 이후 초기 재발한 후 구체 ASCT를 받은 환자에서 CART-19 T 세포의 안전성, 내약성 및 이식 능력을 결정하는 것이었다. 프로토콜은 공개 파일럿 연구로 이루어진다.

[0563] 도입 시에, 대상체는 골수 생검 및 그들의 MM의 일상적 실험실 시험 및 영상화 평가를 받을 것이다. 적격 대상체는 CART-19 제조를 위한 많은 수의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 얻기 위해 정상 상태 성분채집술을 받을 것이다. T 세포를 PBMC로부터 정제시키고, TCR ζ /4-1BB 렌티바이러스 벡터로 형질도입시키고, 시험관내에서 확장시킨 후, 미래의 투여를 위해 동결시킬 것이다. 성공적으로 제조된 T 세포를 갖는 환자의 수에 비해 부적당한 T 세포 수집물, 확장 또는 제조를 갖는 환자의 수가 기록될 것이다; 제품 제조의 실행성은 상기 환자 집단에서 문제가 되는 것으로 예상되지 않는다.

[0564] 대상체는 일반적으로 2회의 추가 ASCT를 수행하기 위해, 그들의 처음 ASCT에 대한 준비에서 수행된 동원/수집으로부터 저장되어 남아있는 적당한 말초 혈액 줄기세포를 가질 것이다. 치료의 선호도에 따른 요법으로 그들의 정상 상태 성분채집술 전 또는 후에 제2 동원/수집 절차를 받지 않을 것이다. 초기 백혈구성분채집술의 대략 2주 후에, 대상체는 병원에 입원하고 고-용량 펠팔란 (제 -2일)에 이어서, 2일 후 (제0일)에 자가 줄기세포의 주입을 받을 것이고, 모든 대상체는 4일 후 (제 +2일)에 CART-19 세포의 주입을 받을 것이다. 10명까지의 환자가 등록될 것이다.

[0565] 모든 대상체는 연구의 제4주까지 규칙적인 간격으로 CART-19 세포의 안전성, 및 이식 및 존속을 평가하기 위해 혈액 시험을 받을 것이다. 제 +42일 및 제 +100일에, 대상체는 골수 형질 세포 부담 및 골수로의 CART-19 세포의 수송을 평가하기 위해 골수 흡인물/생검을 받을 것이다. 공식적인 반응 평가는 제100일에 국제 골수암 실무

그룹(International Myeloma Working Group; IMWG) 기준 136에 따라 이루어질 것이고, TTP는 다발성 골수종의 환자에 대한 임상적 임상 실무에 따라 모니터링될 것이다. 상기 연구에서 측정된 주요 효능 성과는 상기 연구에서 ASCT 이후 TTP에 대한 환자의 초기 ASCT 이후 TTP의 비교일 것이다.

[0566] 본 연구의 1차 중점은 ASCT와 함께 CART-19 세포의 주입의 안전성 및 실행성이므로, 연구에서는 초기 중단 원칙을 이용할 것이다. 간단히 설명하면, 치료한 처음 5명의 대상체 사이에 2개 미만의 중대한 예상치 않은 유해 사례가 발생하면, 연구에서는 10명의 표적 등록을 향해 추가의 5명의 대상체를 추적할 것이다. 본 발명자들은 치료된 대상체를 5명의 대상체를 등록시키고 관찰할 때까지 후속 대상체를 등록하기 전에 CART-19 주입 후 40일 동안 관찰할 것이다 (즉, 제42일에 처음 공식적 반응 평가). 제2 군의 5명의 환자의 치료를 위해, 대상체들 사이에 대기 기간은 요구되지 않을 것이다.

[0567] 6개월의 광범한 추적조사 이후, 대상체를 병력, 신체 검사 및 혈액 시험으로 2년 동안 적어도 연 4회 평가할 것이다. 상기 평가 후에, 대상체는 새로운 악성종양의 발병과 같은 장기간 건강 문제의 진단을 평가하기 위해 추가로 13년까지 전화 및 질문지에 의한 매년 추적조사를 위해 연장 연구에 도입될 것이다.

[0568] 1차 연구 중점

[0569] 상기 파일럿 시험은 처음 ASCT 후 초기 재발한 후에 MM에 대한 구제 ASCT를 받은 환자에서 CD19 TCR ζ/4-1BB로 형질도입시킨 자가 T 세포의 안전성 및 실행성을 시험하기 위해 설계되었다.

[0570] 1차 안전성 및 실행성 중점은 다음을 포함한다:

[0571] NCJ CTC 2로서 규정된 연구-관련 유해 사례의 발생: 주입으로부터 제24주까지 임의의 시간에 가능하게, 아마도 또는 명백히 연구 치료와 관련된 등급 3 징후/증상, 실험실 독성 및 임상 사례. 이것은 주입 독성, 및 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 가능하게 CART-19 세포에 관련된 임의의 독성을 포함할 것이다:

[0572] a. 열

[0573] b. 발진

[0574] c. 호중구감소증, 혈소판감소증, 빈혈, 골수 무형성증

[0575] d. 간 기능장애

[0576] e. 폐 침윤물 또는 다른 폐 독성

[0577] f. 위장관 또는 피부에 침범하는 GVHD-유사 증후군.

[0578] 환자 성분채집술 생성물로부터 CART-19 세포를 제조하는 실행성. 백터 형질도입 효능, T 세포 순도, 생존력, 멸균성 및 종양 오염에 대해 방출 기준을 만족하지 않는 제조된 생성물의 수가 결정될 것이다.

[0579] CART19를 갖는 자가 줄기세포 이식 이후 반응의 깊이 및 지속시간을 표준 자가 줄기세포 이식 이후 각각의 환자가 초기에 달성한 반응의 깊이 및 지속시간에 비교할 것이다.

[0580] 대상체 선택 및 배제

[0581] 포함 기준

[0582] 대상체는 MM에 대해 선행 ASCT를 받고 줄기세포 주입의 365일 이내에 진행되어야 한다. 계획된 직렬식 ASCT 강화 요법의 일부로서 2회 선행 ASCT를 받은 대상체가 적격이다. 진행은 진행성 질환에 대한 IMWG 기준에 따라, 또는 초기 ASCT 이후 CR 또는 sCR을 획득한 환자에 대해 CR로부터 재발에 대한 기준에 따라 규정될 것이다 (Durie et al. Leukemia 2006;20(9): 1467-1473). N.B.: 환자는 선행 ASCT의 365일 이내에 등록되어야 하고, 환자는 상기 연구에 대한 등록 이전에 선행 ASCT 후 재발/진행 이후에 실험 약제를 포함한 다른 약제로 치료받을 수 있다는 필요 요건이 존재하지 않는다.

[0583] 대상체는 피험자 동의서에 서명해야 한다.

[0584] 대상체는 펠팔란 주입 날짜의 12주 이내에 측정된, 다음 기준에 의해 규정된 바와 같이 고-용량 펠팔란을 투여 받기 위해 적당한 생명에 필수적인 장기 기능을 가져야 한다: a. 혈청 크레아티닌 ≤ 2.5 또는 추정된 크레아티닌 청소율 ≥ 30 ml/min 및 투석-의존성이 아님. b. SGOT $\leq 3x$ 정상 상한, 및 총 빌리루빈 ≤ 2.0 mg/dl (파빌리루빈혈증이 길버트 (Gilbert) 증후군에 기인하는 환자를 제외함). c. 좌심실 박출물 (LVEF) $\geq 45\%$, 또는 LVEF가 $<45\%$ 이면 임상적으로 유의한 심혈관 기능 손상이 없는 것을 확인한 심장 전문의에 의한 공식적인 평

가. LVEF 평가는 등록 6주 이내에 수행되어야 한다. d. FEV1, FVC, TLC, DLCO (폐 부피 및 헤모글로빈 농도에 대한 적절한 조정 후에) $\geq$ 예측된 값의 40%를 갖는 적당한 폐 기능. 폐 기능 시험은 등록 6주 이내에 수행되어야 한다.

[0585] 대상체는 보다 높은 성능 상태가 전적으로 뼈 통증으로 인한 것이 아니라면 0-2의 ECOG 성능 상태를 가져야 한다.

[0586] 배제 기준

[0587] 대상체는 임의의 활동성 및 제어되지 않은 감염을 갖지 않아야 한다.

[0588] 대상체는 활동성 B형 간염, C형 간염, 또는 HIV 감염을 갖지 않아야 한다.

[0589] 대상체는 개략한 바와 같이 참여를 방해하는 임의의 제어되지 않은 의학적 장애를 갖지 않아야 한다.

[0590] 치료 요법

[0591] 재발/진행성 다발성 골수종에 대한 요법

[0592] 환자는 등록에 앞서 그들의 치료의 선호도에 따라 재발/진행성 다발성 골수종에 대한 요법을 받을 수 있다. 치료는 등록 시에 지속할 수 있다.

[0593] 환자는 성분채집술에 앞서 2주 동안 및 고-용량 멜팔란에 앞서 2주 동안 모든 요법을 중단해야 한다. 성분채집술 및 고-용량 멜팔란 사이에 2주 초과로 경과할 것이 예상되면, 환자는 그들의 치료의 재량으로 성분채집술 후에 요법을 재개할 수 있다.

[0594] 고-용량 멜팔란 (제 -2일)

[0595] 환자는 제 -3일 또는 제 -2일에 병원에 입원할 것이고, 담당의, 및 치료 프로토콜의 개시에 앞서 종양 용해 증후군에 대한 파라미터를 모니터링하는 것을 포함하는 일상적 실험실 시험에 의해 검사를 받을 것이다. MM 모니터링 실험실 시험 (SPEP, 정량적 이뮤노글로불린, 및 혈청 비함유 전해 분석)을 위한 혈액은 그러한 시험이 입원 7일 이내에 취해지지 않았다면 요법의 개시에 앞서 채취될 것이다.

[0596] 고-용량 요법은 제 -2일에 대략 20분에 걸쳐 정맥내 투여되는 200 mg/m^2 의 용량의 멜팔란으로 이루어질 것이다. 환자 >70세, 또는 치료의 재량에서 200 mg/m^2 의 용량을 견딜 수 없는 임의의 연령의 환자에 대해 멜팔란의 용량은 140 mg/m^2 으로 감소될 것이다. 모든 환자는 텍사메타손을 포함할 수 있는 표준 항구토제 예방, 및 표준 항생제 예방을 투여받을 것이다.

[0597] 줄기-세포 재-주입 (제0일)

[0598] 줄기세포 주입은 제0일에, 고-용량 멜팔란의 투여의 적어도 적어도 18시간 후에 일어날 것이다. 줄기세포는 표준 기관 실무에 따라 예비투약 후 대략 20-60분에 걸쳐 정맥내 주입될 것이다. 체중 1 kg 당 적어도 2×10^6 개 CD34+ 전구체를 주입할 것이다. 추가로, 체중 1 kg 당 적어도 1×10^6 개 CD34+ 전구체가 지연된 이식 또는 후기 이식 실패의 경우에 주입할 예비 줄기세포 제품으로서 이용가능해야 한다. G-CSF는 표준 기관 실무에 따른 용량으로 제 +5일에 시작하여 SQ 투여되어야 한다. 수혈 지원과 같은 다른 지원 가료 수단은 표준 기관 지침에 따라 이루어질 것이다.

[0599] CART19 세포 주입 (제 +2일)

[0600] 5×10^7 개 이하의 CART-19 세포로 이루어지는 단일 용량의 CART-19 형질도입된 T 세포가 제공될 것이다. 상기 단일-환자 프로토콜에서 CD19 TCR $\zeta/4-1\text{BB}$ 로 벡터로 형질도입시킨 세포의 주입에 대한 최소 허용 용량은 없다. CART-19 세포는 줄기세포 주입 후 제 +2일에 신속 i.v. 주입에 의한 단일 용량으로서 제공될 것이다.

[0601] 유지 레날리도마이드

[0602] 처음 ASCT 후에 유지 레날리도마이드를 투여받고 견디는 대상체는 치료의 판탁으로 금기가 없는 것으로 여겨지면 대략 제 +100일에 레날리도마이드 유지 요법을 재개할 것이다.

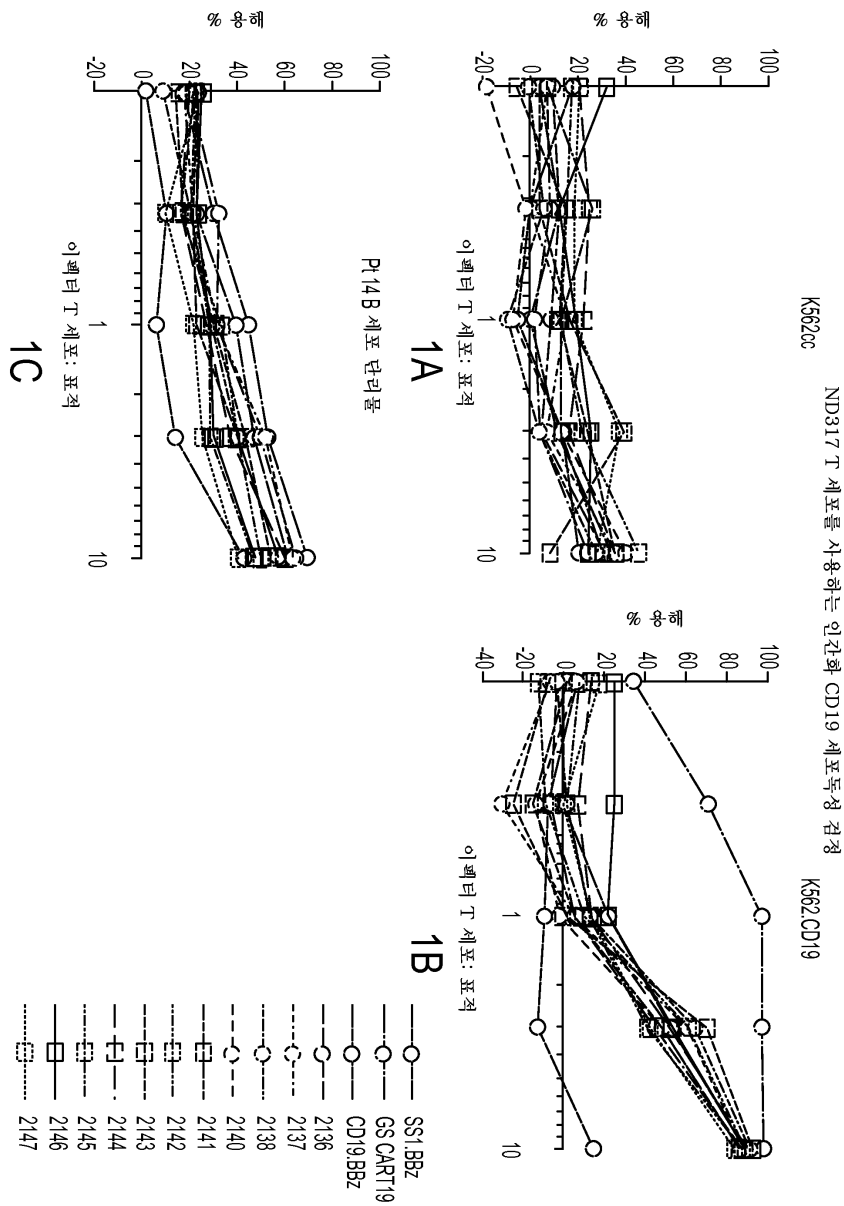
[0603] 연구 약물의 제조 및 투여

- [0604] CART-19 T 세포는 CVPF내에서 제조하고, 주입 세포에 대한 FDA 승인 방출 기준 (예를 들어, 세포 용량, 세포 순도, 멸균성, 백터/세포의 평균 카피수 등)이 만족될 때까지 CVPF로부터 방출되지 않는다. 방출 시에, 세포를 투여를 위해 병상에서 취한다.
- [0605] 세포 해동. 동결된 세포를 드라이아이스 내에서 대상체 병상으로 옮길 것이다. 세포를 36℃ 내지 38℃로 유지한 수조를 사용하여 병상에서 해동할 것이다. 세포가 막 해동할 때까지 백 (bag)을 부드럽게 주무를 것이다. 동결된 덩어리가 용기 내에 남지 않아야 한다. CART-19 세포 제품이 손상된 것으로 보이거나 백이 누출되거나 달리 손상된 것으로 보이면, 주입하지 않고 아래 명시된 바와 같이 CVPF로 돌려보내야 한다.
- [0606] 예비투약. T 세포 주입 후 부작용은 일시적인 열, 오한 및/또는 구역을 포함한다 (검토를 위해 문헌 [Cruz et al. (Cytotherapy 2010;12(6):743-749)] 참조). 대상체에게 CART-19 세포의 주입에 앞서 아세트아미노펜 및 디펜히드라민 염산염을 예비투약하는 것이 권장된다. 이들 투약은 필요하면 6시간마다 반복할 수 있다. 환자가 아세트아미노펜에 의해 완화되지 않고 계속하여 열이 나는 경우에 비스테로이드성 소염제 의약의 과정이 처방될 수 있다. T 세포에 대한 유해한 효과를 가질 수 있으므로, 생명을 위협하는 응급 상황을 제외하고는 환자는 임의의 시간에 전신 코르티코스테로이드, 예컨대 히드로코르티손, 프레드니손, 메틸프레드니솔론 또는 텍사메타손을 투여받지 않는 것이 권장된다. 급성 주입 반응을 위해 코르티코스테로이드가 필요한 경우, 히드로코르티손 100 mg의 초기 용량이 권장된다.
- [0607] 열성 반응. CAR T 세포 주입 후에 대상체가 패혈증 또는 전신 박테리아혈증을 발병하는 가능성이 적은 경우에, 적절한 배양 및 의료 관리가 개시되어야 한다. 오염된 CART-19 T 세포 제품이 예상되면, 제품은 CVPF에 저장된 보존 샘플을 사용하여 멸균성에 대해 재시험될 수 있다.
- [0608] 투여. 주입은 면역억제된 환자에 대한 예방책을 이용하여 로즈 (Rhoads) 내의 격리실에서 일어날 것이다. 형질도입된 T 세포는 3-방향 꼭지 (stopcock)를 갖는 18-게이지 라텍스 비함유 Y자형 혈액 세트를 통해 약 10 mL 내지 20 mL/분의 유속으로 신속 정맥내 주입에 의해 투여할 것이다. 주입 지속시간은 대략 2-20분일 것이다. 각각의 주입 백에는 다음 내용을 포함한 라벨을 부착할 것이다: "절대 자가 용도". 또한, 라벨은 적어도 2개의 특유한 식별자, 예컨대 대상체의 이니셜, 출생일자 및 연구 번호를 포함할 것이다. 주입에 앞서, 2명의 개인이 대상체의 존재 하에 상기 모든 정보를 독립적으로 확인하여, 정보가 참여자에게 정확하게 일치하는지 확인할 것이다.
- [0609] 대상체가 주입에 대해 알러지성 반응, 또는 중증 저혈압 발작, 또는 임의의 다른 반응을 일으키는 경우에 주입 동안 응급 의료 장비 (즉, 응급 카트)가 이용가능할 것이다. 생명 징후 (체온, 호흡률, 맥박 및 혈압)를 주입 전후에, 이어서 적어도 1시간 동안 15분마다, 및 이들 징후가 만족스럽고 안정할 때까지 검토할 것이다. 대상체에게 치료 의사가 안전한 것으로 여길 때까지 떠나지 않도록 요청할 것이다.
- [0610] 패키징
- [0611] 주입은 $1-5 \times 10^8$ 개 CA T19-형질도입된 세포의 단일 용량으로 이루어질 것이고, 여기서 최소 허용 용량은 주입에 대해 1×10^7 개 CART-19 세포이다. 각각의 백은 다음 주입 등급 시약 (% v/v)을 함유하는 냉동매질의 분취액 (용량에 의존한 부피)을 담을 것이다: 31.25% 플라스마라이트-에이-A, 31.25% 텍스트로스 (5%), 0.45% NaCl, 7.5% 이하 DMSO, 1% 텍스트란 40, 5% 인간 혈청 알부민.
- [0612] 성분채집술
- [0613] 대량 부피 (12-15 리터 또는 4-6 혈액 부피) 성분채집술 절차를 성분채집술 센터에서 수행한다. 상기 절차 동안 CART-19를 위한 PBMC를 얻는다. 단일 백혈구성분채집술로부터, 목적은 CART-19 T 세포를 제조하기 위해 적어도 50×10^9 개 백혈구를 수거하는 것이다. FDA 역추적조사 요건을 위한 및 연구를 위한 기준선 혈액 백혈구를 또한 얻고 동결보존한다. 세포 제품은 약 2-4주 후 방출을 위해 준비되는 것으로 예상된다. CD19 및 CD20 B 세포 결정을 비롯한 유동 세포측정 림프구 하위세트 정량. 기준선 평가는 인간 항-VSV-G 및 항-뮤린 항체 (HAMA)에 대해 이루어진다. 대상체가 이전에 클리니컬 셀 앤드 백신 프러덕션 퍼실리티(Clinical Cell and Vaccine Production Facility)에서 현재 우수 제조 실무(Good Manufacturing Practices)에 따라 쌓여진 적당히 성분채집술 수집을 받았으면, 이들 세포는 CART-19 제조를 위한 세포의 공급원으로서 사용될 수 있다. 쌓여진 성분채집술 제품을 사용하는 것은 추가의 성분채집술 수집을 받는 대상체에 대한 비용, 시간 및 위험을 방지할 것이다.

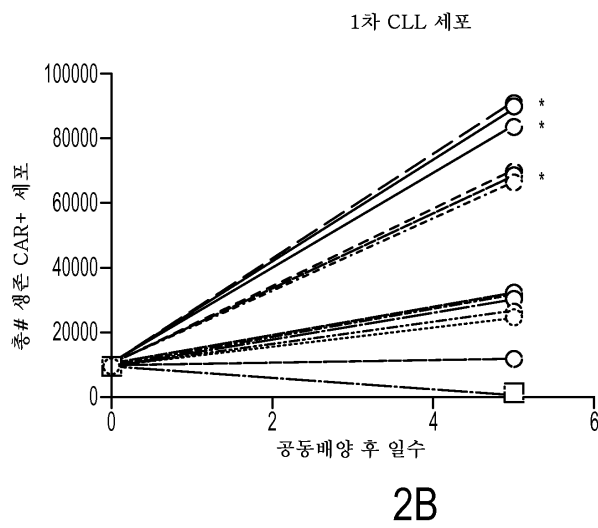
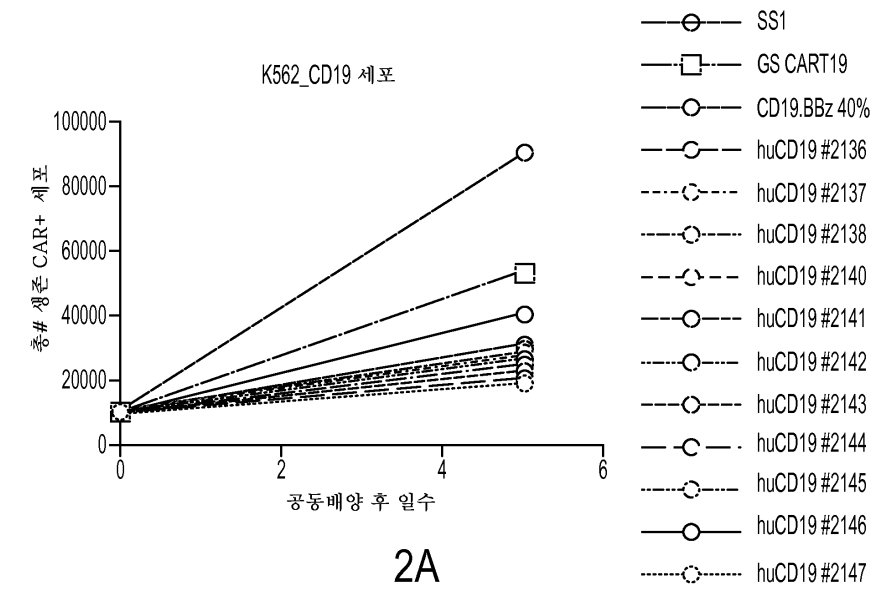
- [0614] 세포감소 화학요법
- [0615] 림프구 고갈 화학요법은 본원에 설명된 바와 같은 고용량 멜팔란일 것이다.
- [0616] CART-19 주입
- [0617] 주입은 줄기세포 재주입 후 제 +2일에 시작할 것이다.
- [0618] 제1 주입에 앞서 제 +2일에, 화학요법이 부분적으로 림프구감소증을 유도하기 위해 제공되기 때문에 환자는 CD3, CD4 및 CD8 계수의 차이 및 평가를 갖는 CBC를 받을 것이다.
- [0619] 제1 용량은 단일 용량을 이용하여 투여될 것이다. 세포를 환자 병상에서 해동시킨다. 해동된 세포는 주입 지속시간이 대략 10-15분이 되도록 하는 견더질 수 있는 한 신속한 주입 속도로 제공될 것이다. 혼합을 용이하게 하기 위해, 세포를 Y-어댑터를 사용하여 동시에 투여할 것이다. 대상체에게 본원에 설명된 바와 같이 주입하고 예비투약할 것이다. 대상체의 생명 징후를 평가할 것이고, 펄스 산소측정은 투약 전에, 주입의 끝에, 및 그 후 15분마다 1시간 동안 및 이들이 안정하고 만족스러울 때까지 이루어진다. 기준선 CART-19 수준의 결정을 위한 혈액 샘플은 제1 주입에 앞서 및 각각의 주입의 20분 내지 4시간 후 임의의 시간에 얻는다 (그리고 TCSL에 보낸다).
- [0620] 고-용량 멜팔란에 관련된 독성을 겪은 환자는 이들 독성이 해소될 때까지 그들의 주입 일정을 지연시킬 것이다. T 세포 주입의 지연이 정당한 것으로 인정되는 구체적인 독성은 다음의 것을 포함한다: 1) 폐: 포화를 95% 초과로 유지하기 위해 보충적 산소에 대한 요건 또는 진행성인 흉부 x-선 상의 방사선사진상 이상의 존재; 2) 심장: 의학적 관리로 제어되지 않는 새로운 심 부정맥, 3) 승압제 지원을 요구하는 저혈압. 4) 활성형 감염: T 세포 주입의 48-시간 이내에 박테리아, 진균, 또는 바이러스에 대한 양성 혈액 배양.
- [0621] 독성의 관리
- [0622] 제어되지 않은 T 세포 증식. 동종 또는 자가 T 세포 주입과 연관된 독성은 약물학적 면역억제의 과정에서 관리되었다. T 세포 연관 독성은 전신 코르티코스테로이드에 반응하는 것으로 보고되었다. 제어되지 않은 T 세포 증식이 발생하면 (CART-19 세포에 관련된 등급 3 또는 4 독성), 대상체를 코르티코스테로이드로 치료할 수 있다. 대상체는 펄스 메틸프레드니솔론 (2 mg/kg i.v., q8 hr마다 분할 x 2일)로 치료한 후, 신속하게 투여량을 감소시킬 것이다.
- [0623] 또한, 또 다른 프로토콜로 치료한 대상체의 관찰에 기반하여, CD19+ 종양 부담이 CLL의 환자보다 골수종의 환자에서 훨씬 더 낮은 것으로 예상되지만 대식세포 활성화 증후군 (MAS)에 대한 몇몇 문제가 있다. 상기 독성의 치료 및 치료 시기는 환자의 의사 및 연구 조사자의 재량으로 결정될 것이다. 제안된 관리는 다음을 포함할 수 있다: 대상체가 연속 2일 넘게 지속하는 101°F 초과 열이 있고 감염의 증거가 없으면 (음성 혈액 배양, CXR 또는 다른 공급원), 토실리주맙 4 mg/kg를 고려할 수 있다. 코르티코스테로이드 및 항-TNF 요법의 추가는 의사 재량으로 고려될 수 있다.
- [0624] B 세포 고갈. B 세포 고갈 및 저감마글로불린혈증이 발생하는 것이 가능하다. 이것은 항-CD20 유도 요법에서 흔하다. 임상적으로 유의한 저감마글로불린혈증 (즉, 전신 감염)의 경우에, 대상체에게 정상 수준의 혈청 이뮤노글로불린 수준을 회복하기 위해 확립된 임상 투약 지침에 의해 정맥내 이뮤노글로불린 (IVIG)을 제공할 것이고, 이것은 리톡시맙과 함께 이루어진다.
- [0625] 1차 이식 실패. 1차 이식 실패 (즉, 비-이식)은 제1 ASCT에 비해 제2 ASCT 후에 더 일반적일 수 있다. 적격 기준은 1차 이식 실패의 경우에 치료의 재량으로 구조 재주입을 위해 충분한 줄기세포가 이용가능해야 하는 것을 규정한다.
- [0626] 등가물
- [0627] 본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특허 출원 및 공개문의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명은 구체적인 측면을 참조로 하여 개시되지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 본 발명의 진정한 취지 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 본 발명의 다른 측면 및 변형을 고안할 수 있을 것이 명백하다. 첨부된 청구항은 그러한 모든 측면 및 균등한 변형을 포함하는 것으로 해석되는 것으로 의도된다.

도면

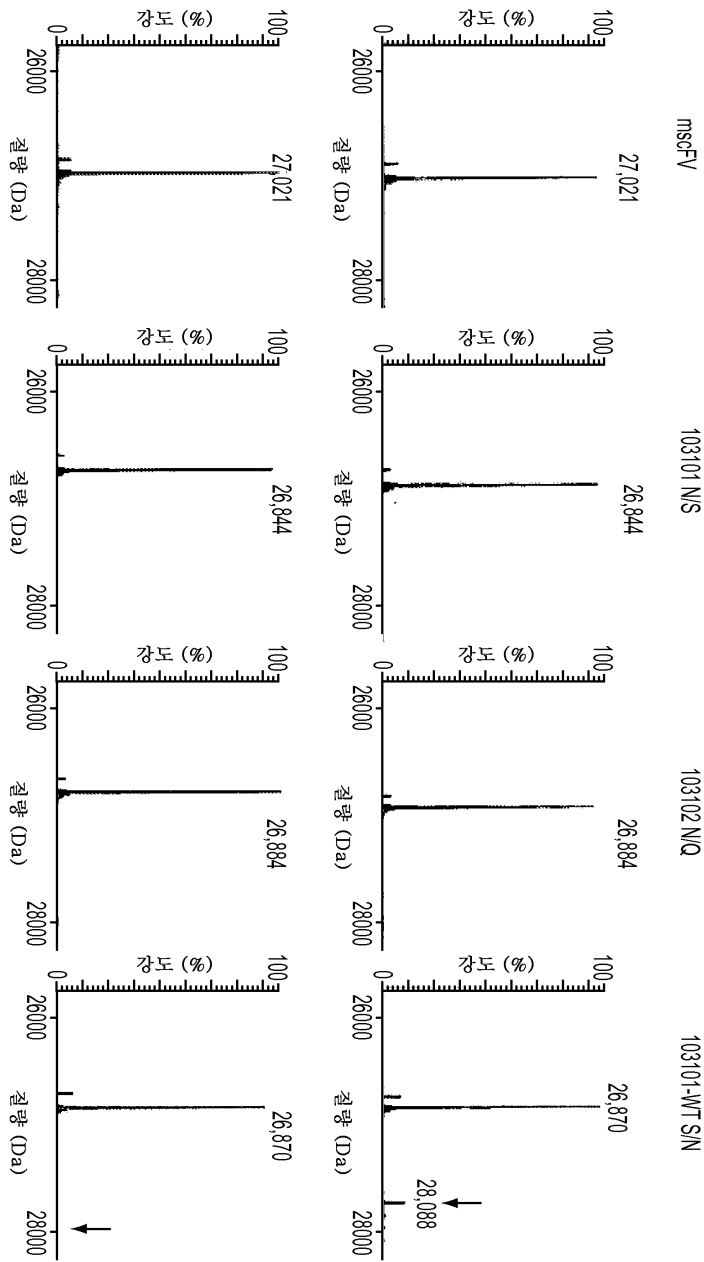
도면1



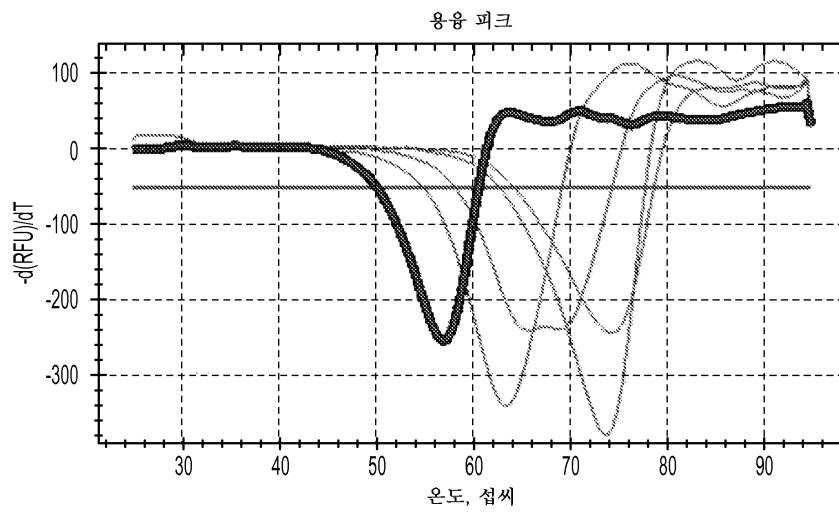
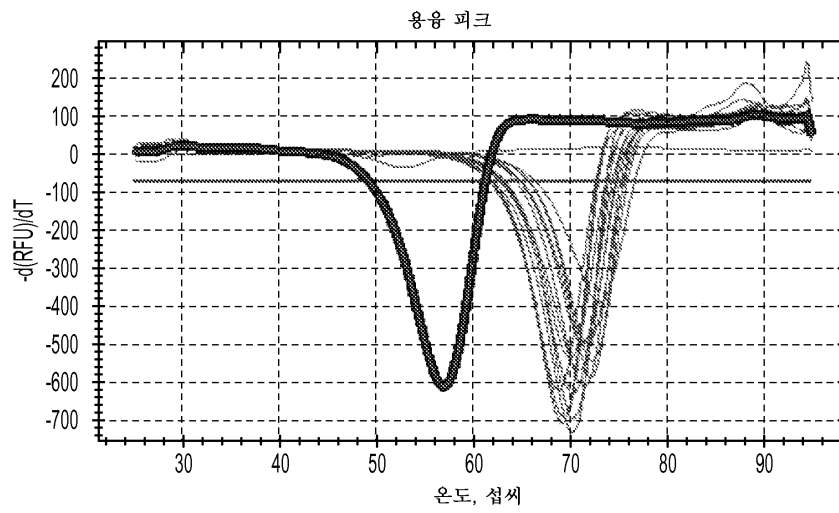
도면2



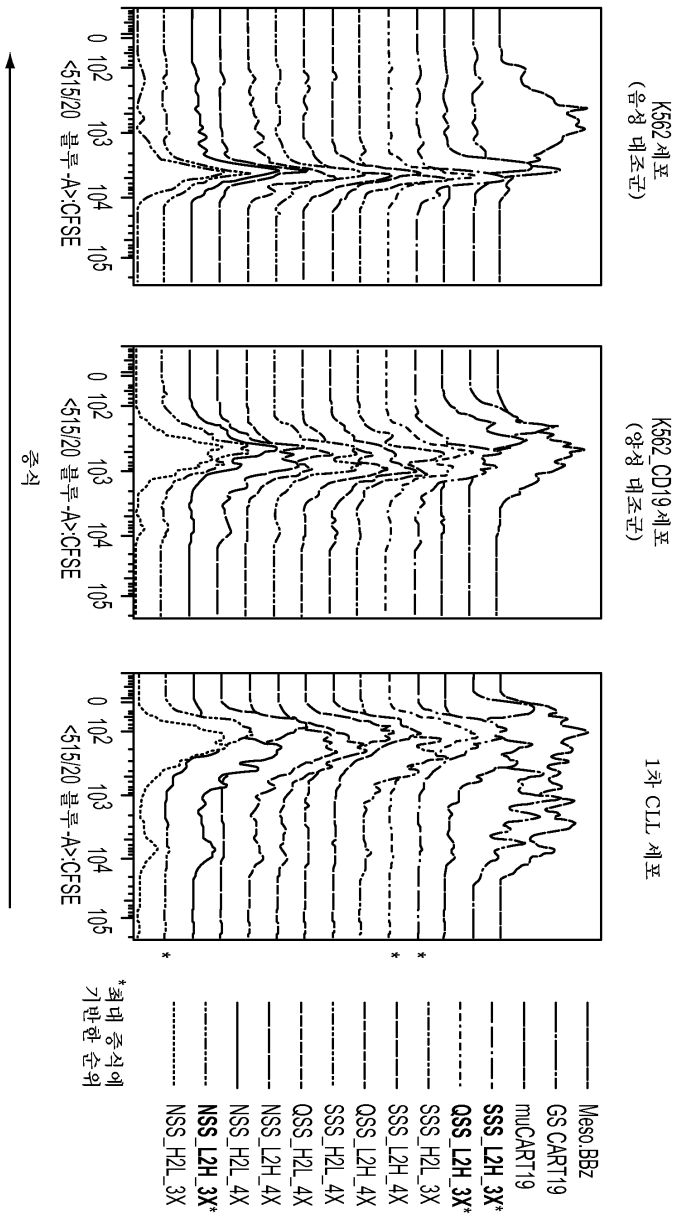
도면3



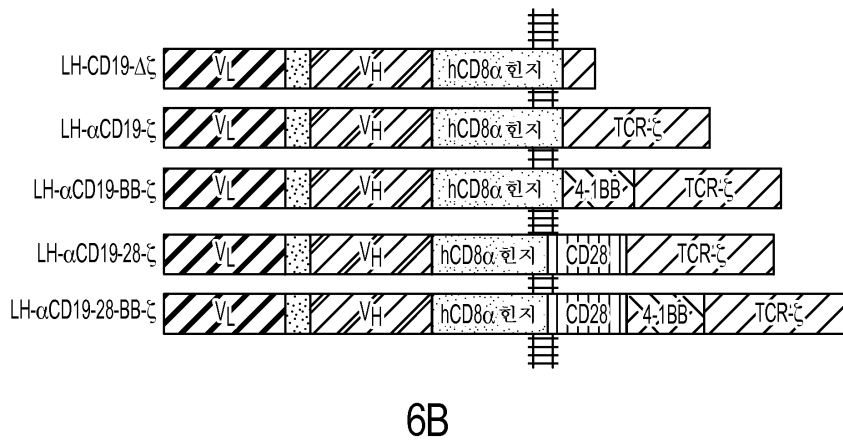
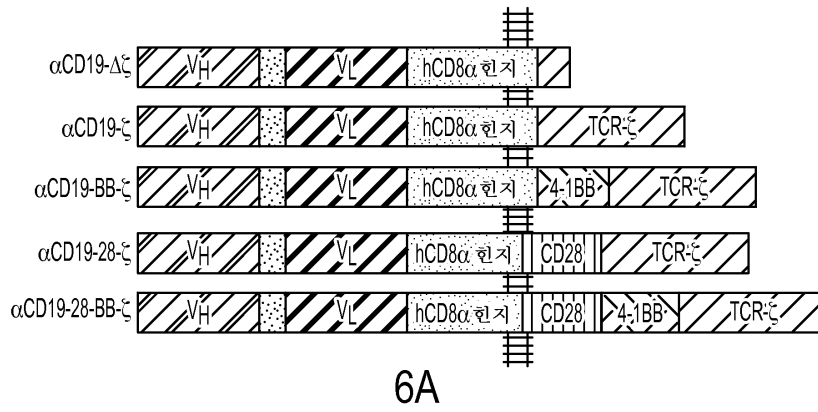
도면4



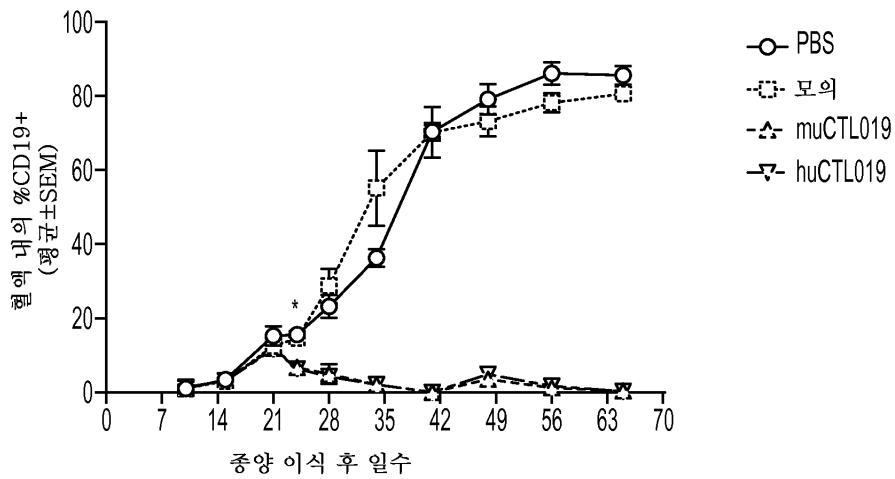
도면5



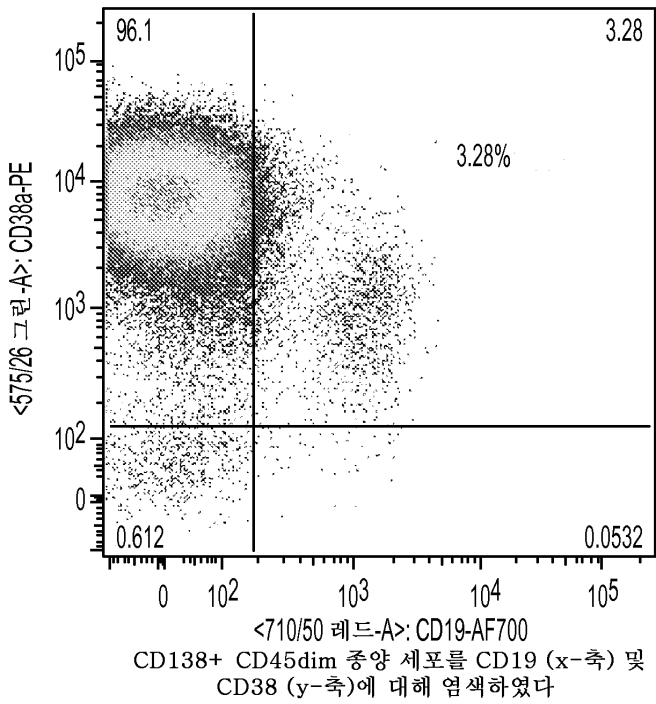
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

<120> TREATMENT OF CANCER USING HUMANIZED ANTI-CD19 CHIMERIC ANTIGEN
RECEPTOR

<130> N2067-7002WO

<140> PCT/US2014/029943

<141> 2014-03-15

<150> 61/838,537

<151> 2013-06-24

<150> 61/802,629

<151> 2013-03-16

<160> 121

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg

145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser

165 170 175

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

180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr

195 200 205

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly

210 215 220
 Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser

<210> 2

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 2

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

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

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 130 135 140
 Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg

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

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

<210> 3

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 3

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

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

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

<210> 4

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys
 50 55 60

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

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

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

<210> 5

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

115 120 125

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr

130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 210 215 220
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 6
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 6
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

 115 120 125
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 165 170 175
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
 180 185 190
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 195 200 205
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 210 215 220
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 7

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 7

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 8

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

195 200 205

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

245

<210> 9

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

115 120 125

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr

130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 10

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

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

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

130 135 140
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr

145 150 155 160
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr

165 170 175
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser

180 185 190
Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

195 200 205
Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

210 215 220
Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln

225 230 235 240
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

245

<210> 11

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

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

<210> 12

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 12

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln

210 215 220

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

225 230 235 240

Ile Lys

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 14

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 19

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser

1

5

10

<210> 20

<211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 20
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 21
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 22
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

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

peptide"

<400> 23

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

1 5 10 15

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 24

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 26

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 27

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 28

Tyr Ser Ser Ser Leu

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 29

Tyr Gln Ser Ser Leu

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

Tyr Asn Ser Ser Leu

1 5

<210> 31

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 31

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
165 170 175

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

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser
195 200 205

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
355 360 365

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

370 375 380
Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
385 390 395 400

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

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
465 470 475 480
Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 32

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 32

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45
Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro

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

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

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

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

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

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
325 330 335
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
340 345 350
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
355 360 365
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
370 375 380
Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
385 390 395 400
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
405 410 415
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
420 425 430
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
435 440 445
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
450 455 460
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
465 470 475 480
Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485
<210> 33
<211> 486
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 33
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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
195 200 205

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
225 230 235 240

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro

260 265 270
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285

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

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

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 34

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 34

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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

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

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

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

 420 425 430
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

450 455 460
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 35

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser
 165 170 175

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

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

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

 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 36

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 36

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
145 150 155 160

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser
165 170 175

Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln
195 200 205

Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
210 215 220

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp
245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro
260 265 270

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
305 310 315 320

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

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

340 345 350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
370 375 380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465 470 475 480
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 37

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 37

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val

35	40	45
Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr		
65	70	75
Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys		
85	90	95
Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala		
100	105	110
Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met		
115	120	125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
130	135	140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
145	150	155
Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro		
165	170	175
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys		
180	185	190
Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
195	200	205
Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser		
210	215	220
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
225	230	235
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro		
245	250	255
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro		
260	265	270
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
275	280	285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
305 310 315 320

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

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430

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

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

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

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 38

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 38

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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro

165 170 175

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys

180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

195 200 205

Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser

210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

225	230							235							240						
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro						
245								250				255									
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro						
260								265				270									
Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu						
275								280				285									
Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His						
290								295				300									
Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu						
305				310				315				320									
Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr						
325								330				335									
Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe						
340								345				350									
Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg						
355								360				365									
Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser						
370				375				380													
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr						
385				390				395				400									
Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys						
405								410				415									
Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn						
420								425				430									
Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu						
435				440				445													
Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly						
450				455				460													
His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr						
465				470				475				480									

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

490

<210> 39

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 39

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165	170	175
Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly		
180	185	190
Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn		
195	200	205
Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn		
210	215	220
Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val		
225	230	235
		240
Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp		
245	250	255
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro		
260	265	270
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
275	280	285
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
290	295	300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
305	310	315
		320
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		
325	330	335
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
340	345	350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
355	360	365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
370	375	380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
385	390	395
		400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
405	410	415

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

420

425

430

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

435

440

445

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

450

455

460

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

465

470

475

480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

490

<210> 40

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 40

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

1

5

10

15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20

25

30

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

35

40

45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100	105	110	
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
115	120	125	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
130	135	140	
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val			
145	150	155	160
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser			
165	170	175	
Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly			
180	185	190	
Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn			
195	200	205	
Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn			
210	215	220	
Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val			
225	230	235	240
Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp			
245	250	255	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro			
260	265	270	
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu			
275	280	285	
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His			
290	295	300	
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu			
305	310	315	320
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr			
325	330	335	
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe			
340	345	350	

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430

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

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

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

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 41

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 41

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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
20 25 30

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

35	40	45
Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr		
65	70	75
Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys		
85	90	95
Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala		
100	105	110
Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met		
115	120	125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
130	135	140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
145	150	155
Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro		
165	170	175
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys		
180	185	190
Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
195	200	205
Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser		
210	215	220
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
225	230	235
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro		
245	250	255
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro		
260	265	270
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
275	280	285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
305 310 315 320

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

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430

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

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

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

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 42

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 42

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

130 135 140

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr

145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

225						230						235						240
His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly			
					245						250						255	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro			
					260						265						270	
Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu			
					275						280						285	
Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp			
					290						295						300	
Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly			
					310						315						320	
Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg			
					325						330						335	
Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln			
					340						345						350	
Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu			
					355						360						365	
Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala			
					370						375						380	
Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu			
					385						390						395	400
Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp			
					405						410						415	
Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu			
					420						425						430	
Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile			
					435						440						445	
Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr			
					450						455						460	
Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met			
					465						470						475	480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

<210> 43

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 44

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc cttaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggccgaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 45

<211> 230

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

20 25 30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys Met

225 230

<210> 46

<211> 690

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc cagagttcct gggcggaccc 60
agcgtgttcc tgttccccc caagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgag 120
gtgacctgtg tggagggtga cgtgtcccag gaggacccc aggtccagtt caactggtac 180

gtggacggcg tggagggtga caacccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240
acctaccggg tgggtgtccgt gctgacctg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300
tacaagtgtg aggtgtccaa caaggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360
gccaagggcc agcctcgga gcccagggtg tacacctgc cccctagcca agaggagatg 420
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 480
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc cctgtgctg 540
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggtgaccg tggacaagag ccggtggcag 600

gagggaacg tctttagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 660
aagagcctga gcctgtcctt gggcaagatg 690

<210> 47

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys

35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 50 55 60
 Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
 65 70 75 80
 Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
 85 90 95
 Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
 100 105 110
 Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
 115 120 125
 Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
 130 135 140
 Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
 165 170 175
 Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
 180 185 190
 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
 195 200 205
 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
 210 215 220
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
 260 265 270
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
 275 280

<210> 48

<211> 847

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

```

aggtggcccg aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gcccaggca      60

gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc      120
ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc      180
cctgaatgtc catccatac ccagccgtg ggcgctctatc tcttgactcc cgcagtacag      240
gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag      300
gatgccatt tgacttggga gggtgccgga aaggtagcca cagggggggg tgaggaaggg      360
ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac ctttccgaga      420
tcctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca      480

cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccaggcac cagttaagct tagcctgaat      540
ctgctgcga gtagtgatcc ccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc      600
tttagccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc      660
ggcttcgctc cagccccgcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggcctggagt      720
gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc      780
catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggtttc ctacgtgact      840
gaccatt                                           847

```

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 50

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 50

ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc

30

<

210> 51

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 51

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro

1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr

20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro

35 40 45

<210> 52

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 52

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc

60

gggccccccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc

120

tcc

123

<210> 53

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(30)

<223> /replace=" "

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(30)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations for

variant positions"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> /note="This sequence may encompass 1-6 "Gly Gly Gly Gly Ser"

repeating units"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> /note="See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments"

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 54

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

oligonucleotide"

<400> 54

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60

ccc 63

<210> 55

<211> 135

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 55

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccctg 60

tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120

gacttcgcct gtgat 135

<210> 56

<211> 72

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 56

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggtcc ttctcctgc actggttatc 60

accctttact gc 72

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 57

Tyr Asn Ser Ala Leu

1

5

<210> 58

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 58

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

165 170 175

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

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

<210> 59

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 59

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

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

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

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

<210> 60

<211> 126

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 60

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg 126

<210> 61

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 61

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg	60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcga	120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag	300
ccagaggact tcgtgtctta tttctgtcag caagggaaca cctgcccta cacctttgga	360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgg	420

ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact	480
ctttcactga ctgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc	540
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact	600
tactactctt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag	660
gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag	720
cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc	780
gtgtccagcc accaccatca tcaccatcac cat	813

<210> 62

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 62

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg	60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcga	120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240

gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcactatcag ctactgcag 300

ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga 360

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420

ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480

ctttcactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc 540

agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660

gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780

gtgtccagcc accacatca tcacatcac cat 813

<210> 63

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 63

atggctctgc ccgtgaccgc actcctctctg ccactggctc tgctgttca cgccgtctgc 60

ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctgggtga agccatctga gactctgtcc 120

ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180

ctctccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtacggaac cacttactat 240

tcatcttccc tgaagtcacg ggtcacatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300

ctcaagctct catcagtcac cgccgtgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360

tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420

tctgggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480

accagagcc ctgcaacctt gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg 540

gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatatcaac agaagccggg acaggccctt 600

aggtttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttccgcacg ctttagcggg 660

tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720

gtctacttct gccagcaggg taacacctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780

gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac 813

<210> 64

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 64

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60

ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120

ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180

cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240

caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300

ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360

tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420

tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480

accagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg 540

gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct 600

aggcttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttccgcacg ctttagcggg 660

tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720

gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780

gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac 813

<210> 65

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 65

atggccctcc cagtgaccgc tctgtgctg cctctcgac ttcttctcca tgccgctcgg 60

cctgagatcg tcatgaccca aagccccgct accctgtccc tgtcaccgg cgagaggga 120
accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180
ccagggcagg ctctctgctt gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggtatcccc 240
gccagatfff ccgggagcgg gtctggaacc gactacaccc tcaccatctc ttctctgcag 300
cccaggatt tcgccgtcta ttcttgccag caggggaata ctctgccga caccttcggt 360

caaggtacca agctggaaat caaggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420
ggtggctccg gaggaggagg ttccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480
aagccatcag aaacctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540
ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggtcttg aatggattgg ggtgatttgg 600
ggatcagaga ctacttacta ctcttcatca cttaagtcac gggtcaccat cagcaaatat 660
aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcactgtga ccgccgtga caccgccgtg 720
tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggtcttatg ctatggacta ctggggacag 780

gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 66

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 66

atggccctcc cagtaccgc tctgtctgtg cctctcgac ttctttcca tgccgtcgg 60
cctgagatcg tcatgaccca aagccccgct accctgtccc tgtcaccgg cgagaggga 120
accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180
ccagggcagg ctctctgctt gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggtatcccc 240

gccagatfff ccgggagcgg gtctggaacc gactacaccc tcaccatctc ttctctgcag 300
cccaggatt tcgccgtcta ttcttgccag caggggaata ctctgccga caccttcggt 360
caaggtacca agctggaaat caaggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420
ggtggctccg gaggaggagg ttccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480
aagccatcag aaacctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540
ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggtcttg aatggattgg ggtgatttgg 600

ggatcagaga ctacttacta ccagtcac caaagtcac gggtcacat cagcaaagat 660

aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcactgtga ccgccgtga caccgccgtg 720

tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggtcttatg ctatggacta ctggggacag 780

gggaccttg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 67

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 67

atggcactgc ctgtcactgc cctcctgtg cctctggccc tccttctgca tgcccagg 60

ccccaagtc agctgcaaga gtcaggacc ggactggtga agccgtctga gactctctca 120

ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcaa 180

cctcccggga aagggttga atggattggt gtcatctggg gttctgaaac cacctactac 240

tcactttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc 300

cttaagctgt catctgtgac cgctgtgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac 360

tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc 420

agcggcggtg gagggctctg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg 480

agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc ttccaccgg cgagagagca 540

accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggtg tcagcaaaaa 600

ccggggcagg cccctgcct cctgacttac catactcac gccttactc tggatatccc 660

gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag 720

ccagaagatt tcgcagtgt tttctgccag cagggaata ccttctta caccttcggt 780

cagggaacca agctcgaat caagcaccat caccatcatc accaccat 828

<210> 68

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 68

atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg	60
ccccaagtcc agctgcaaga gtcaggaccc ggactgggtga agccgtctga gactctctca	120
ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcca	180
cctcccggga aagggttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac	240
cagtcttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc	300
cttaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac	360
tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc	420

agcggcggtg gaggtcttg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggagg	480
agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcacccgg cgagagagca	540
accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa	600
ccggggcagg cccctgcct cctgatctac catacctcac gccttcactc tggtatcccc	660
gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag	720
ccagaagatt tcgcagtga tttctgccag cagggaata ccttctctta caccttcggt	780
cagggaacca agctcgaat caagcacat caccatcacc atcaccac	828

<210> 69

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 69

atggccctcc cagtgaccgc tctgtgctg cctctcgac tttcttcca tgccgtcgg	60
cctgagatgc tcatgaccca aagccccgt accctgtccc tgtcacccgg cgagaggga	120
accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag	180
ccagggcagg ctctcgcct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggtatcccc	240
gccagatfff ccgggagcgg gtctggaacc gactacaccc tcaccatctc tttctgcag	300
cccaggagatt tcgccgtcta tttctgccag cagggaata ctctgccga caccttcggt	360

caaggtacca agctggaaat caaggaggagc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420
 ggtggctccg gaggaggagg ttcccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480
 aagccatcag aaacctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540
 ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggtcttg aatggattgg ggtgatttgg 600
 ggatcagaga ctacttacta caattcatca cttaagtcac gggtcacat cagcaaagat 660
 aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcatctgtga ccgccgtga caccgccgtg 720

tactatttgt ccaaacatta ctattacgga gggctttatg ctatggacta ctggggacag 780
 gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 70

<211> 828

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 70

atggcactgc ctgtcaactgc cctcctctgt cctctggccc tcttctgtca tgccgccagg 60
 cccaagtcc agctgcaaga gtcaggacc ggactggtga agccgtctga gactctctca 120
 ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcca 180

cctcccgga aagggttga atggatttgt gtcatctggg gttctgaaac cacctactac 240
 aactcttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc 300
 cttaagctgt catctgtgac cgctgtgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac 360
 tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctctg gactgtgagc 420
 agcggcggtg gagggtctgg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg 480
 agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcacccgg cgagagagca 540
 accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa 600

ccggggcagg cccctcgct cctgatctac catacctcac gccttcactc tggatatccc 660
 gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag 720
 ccagaagatt tcgcagtgt tttctgccag cagggaata ccttcccta caccttcggt 780
 cagggaacca agctcgaaat caagcacat caccatcacc accacat 828

<210> 71

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 71

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc tctgtctca cgccgtcgg 60

cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca 120

accctgtctt gcagagctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180

cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240

gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag 300

ccagaggact tcgtgtctta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga 360

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420

ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccggggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480

ctttcactga ctgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggg gtcttgatc 540

agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactacaatt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660

gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780

gtgtccagcc accaccatca tcaccatcac cat 813

<210> 72

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 72

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgtcgc 60

ccacaagtc agcttcaaga atcagggcct ggtctgggtga agccatctga gactctgtcc 120

ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180

cctcccgaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240

aactcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
ctcaagctct catcagtcac cgccgtgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360

tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480
accagagcc ctgcaacct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgcgg 540
gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatatcaac agaagccggg acaggccct 600
aggcttctta tctaccacac ctctgcctg catagcggga ttccgcacg ctttagcggg 660
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
gtctacttct gccagcaggg taacacctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780

gagatcaaac atcaccacca tcataccat cac 813

<210> 73

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 73

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 145 150 155 160

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

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
 260 265 270

<210> 74

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 74

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

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

<210> 75

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 75

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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr

180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
 195 200 205
 Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220

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

<210> 76

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 76

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
195 200 205

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
225 230 235 240

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His His His
260 265 270

<210> 77

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 77

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

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

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

His His His His

275

<210> 78

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 78

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

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

245 250 255
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His
 260 265 270
 His His His His
 275

<210> 79

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 79

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

65						70						75						80
Ser	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys			
85					90					95								
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala			
100					105					110								
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met			
115					120					125								
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly			
130					135					140								
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly			
145					150					155					160			
Ser	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
165					170					175								
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys			
180					185					190								
Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu			
195					200					205								
Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser			
210					215					220								
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln			
225					230					235					240			
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro			
245					250					255								
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	His	His	His	His			
260					265					270								
His	His	His	His															
275																		
<210> 80																		
<211> 276																		
<212> PRT																		
<213> Artificial Sequence																		

<220><221> source

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

<400> 80

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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro

165 170 175

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys

180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

195 200 205

Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser

210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

225 230 235 240

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro

245 250 255

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His

260 265 270

His His His His

275

<210> 81

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 81

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser
 165 170 175
 Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 180 185 190

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

 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His
 260 265 270
 His His His His
 275
 <210> 82
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 82
 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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

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

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

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

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

260 265 270

His His His His

275

<210> 83

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 83

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

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

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140
Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
145 150 155 160
Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His

260 265 270

<210> 84

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 84

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 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

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

<210> 85

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 85

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc tttgtctcca cgccgtcgg 60
 cccgaaattg tgatgacca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca 120
 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggt tcaacagaag 180
 cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaatatcag ctactgcag 300

ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420
 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
 ctttactga ctgtactgt gagcggagt tctctccccg attacggggt gtcttgatc 540
 agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600
 tactactctt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
 gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780
 gtgtccagca ccactacccc agcaccgagg ccaccacccc cggtcctac catgcctcc 840
 cagcctctgt ccctgcgtcc ggaggcatgt agacccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
 cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggcc cttctggctgg tacttgccgg 960
 gtctgtctgc tttactcgt gatcactctt tactgtaage gcggtcggaa gaagctgctg 1020
 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
 tcatgccgtt tccagagga ggaggaagc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140

agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
 ggtcggagag aggagtacga cgtgtgtgac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260
 gggaagccgc gcagaaagaa tcccaagag ggcctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320
 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac 1380
 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440
 caggccctgc cgcctcgg 1458

<210> 86

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 86

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgttggtc tttgtctcca cgcgctcgg	60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca	120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcactgcag	300
ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga	360

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgg	420
ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact	480
ctttcactga ctgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggtac	540
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact	600
tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag	660
gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag	720
cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc	780

gtgtccagca ccaactacccc agcaccgagg ccacccaccc cggctctctac catcgcctcc	840
cagcctctgt cctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc	900
cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg	960
gtctgtctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg	1020
tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt	1080
tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc	1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt	1200

gttcggagag aggagtacga cgtgtggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc	1260
gggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaagataag	1320
atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaagggaac gcagaagagg caaagccac	1380
gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg	1440
caggccctgc cgcctcgg	1458

<210> 87

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 87

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc	60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc	120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag	180
cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat	240
tcatcttccc tgaagtacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc	300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac	360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca	420
tctgggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg	480
accagagcc ctgcaacct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg	540
gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatatcaac agaagccggg acaggccct	600
aggtttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga tteccgcacg ctttagcggg	660
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagccccga ggacttcgcc	720
gtctacttct gccagcaggg taacacctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt	780
gagatcaaaa ccactactcc cgctccaagg ccaccaccc ctgccccgac catgcctct	840
cagccgcttt cctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctgggtgggc cgtgcatacc	900
cggggtcttg acttcgctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttcggg	960
gtcctgctgc tticactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg	1020
tacatcttta agcaacctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt	1080
tcatgccgtt tccagagga ggaggaaggc ggtgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc	1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt	1200
ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc	1260
gggaagccgc gcagaaagaa tccccaaagag ggcctgtaca acgagctcca aaaggataag	1320
atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaagggaac gcagaagagg caaaggccac	1380
gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg	1440
caggccctgc cgcctcgg	1458

<210> 88

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 88

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60

ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120

ctcacttgca ccgtgagcgg agtgcctc cagactacg gactgagctg gattagacag 180

cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240

caatcttccc tgaagtcacg ggtcacatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300

ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360

tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420

tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480

accagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggtaccct ttcttgtcgg 540

gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggccct 600

aggtttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg 660

tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctatctc tccagcccga ggacttcgcc 720

gtctacttct gccagcagg taacacctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780

gagatcaaaa cactactcc cgctccaagg ccaccaccc ctgccccgac catgcctct 840

cagccgcttt cctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900

cggggtcttg acttcgctg cgatatctac atttgggcc ctctggctgg tacttgcggg 960

gtctgtctgc ttctactctg gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020

tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080

tcatgccgt tccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgctgaa attcagccgc 1140

agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200

ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260

gggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggcctgtaca acgagctcca aaagataag 1320

atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaagggaac gcagaagagg caaaggccac 1380

gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440

caggccctgc cgcctcgg 1458

<210> 89

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 89

atggccctcc ctgtaccgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca cgcgctcgg	60
cccgaattg tgatgacca gtcaccgcc actcttagcc ttccaccgg tgagcgcga	120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc taaaatacc ttaattgta tcaacagaag	180
cccggacagg ctctcgctt tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcactatcag ctactgcag	300
ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga	360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgg	420
ggaggaagcg gcggaggcgg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctctgtg	480
aagccatcag aaactcttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccattac	540
ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttg	600
ggctctgaga ctacttacta ctcttcaccc ctcaagtcac gcgtcaccat ctcaaaggac	660
aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcactgtga ccgcagccga caccgccgtg	720
tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag	780
ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgt	840
cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt	900
ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg	960
gctggctactt gcggggtcct gctgttttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcgg	1020
cggaagaagc tgctgtacat cttaagcaa cccttcacga ggctgtgca gactactcaa	1080
gaggaggacg gctgttcacg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc	1140
gtgaaattca gccgcagcg agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac	1200
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg	1260
gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag	1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat	1440

gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 90

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 90

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttcigtcca gccgctcgg 60

cccgaaattg tgatgaccca gtcaccgcc actcttagcc ttccaccgg tgagcgcga 120

accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattgga tcaacagaag 180

cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240

gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag 300

ccagaggact tcgtgtctta tttctgtcag caagggaaca cctgcccta cacctttgga 360

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420

ggaggaagcg gaggcggagg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctcttg 480

aagccatcag aaactcttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctt ccccgattac 540

ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttgg 600

ggctctgaga ctacttacta ccaatcatcc ctcaagtcac gcgtcaccat ctcaaaggac 660

aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcatctgtga ccgcagccga caccgccgtg 720

tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780

ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgt 840

cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900

ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggccctctg 960

gctggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcgg 1020

cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa 1080

gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140

gtgaaattca gccgcagcgc agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200

aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260

gacccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320

ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380

agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440

gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 91

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 91

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggtc tgctgcttca cgccgctcgc 60

ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120

ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180

cctcccggaaggaggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240

tcatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300

ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360

tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420

tctgttggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccgg aggtggcgga 480

agcgaatcg tgatgaccca gagccctgca accctgtccc tttctcccg ggaacgggct 540

accctttctt gtcgggcac cacaagatac taaaataacc tcaattggta tcaacagaag 600

ccgggacagg cccctaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc 660

gcacgcttta ggggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag 720

cccaggagact tcgccgtcta cttctgccag cagggttaaca cctgccgta caccttcggc 780

cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc 840

ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900

ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg 960

gctgtgactt gggggctct gctgtttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcggt 1020

cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa ccttcatga ggctgtgca gactactcaa 1080

gaggaggacg gctgttcatg ccggttcca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140

gtgaaattca gccgcagcgc agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200

aacgaactca atcttggctg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260

gacccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca cgcaccacaa ggacacctat 1440
gacgctcttc acatgcagge cctgccgcct cgg 1473

<210> 92

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 92

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60
ccacaagtec agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
cctcccgaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240
caatcttccc tgaagtcacg ggtaaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300

ctcaagctct catcagtcac cgccgtgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
tctggtggag gaggtagcgg aggagcgagg agcgggtggag gtggctccgg aggcggtggg 480
tcagaaatcg tgatgaccca gagccctgca accctgtccc tttctcccgg ggaacgggct 540
accctttctt gtcgggcac cacaagatata tcaaaatacc tcaattggt tcaacagaag 600
ccgggacagg cccctaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc 660
gcacgcttta gcgggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag 720

cccaggagact tcgccgtcta cttctgccag cagggttaaca cctgcccga caccttcggc 780
cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc 840
ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900
ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gctgcgata tctacatttg ggccctctg 960
gctggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgatca ctctttactg taagcgcggt 1020
cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa 1080
gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aagcgggctg cgaactgcgc 1140

gtgaaattca gccgcagcgc agatgtctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
gaccagaaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440
gacgctcttc acatgcagge cctgccgcct cgg 1473

<210> 93

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 93

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc ttctgtcca ccccgtcgg 60
cccgaaattg tgatgacca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcga 120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc taaaataacc ttaattggta tcaacagaag 180
cccgacagg ctctcgctt tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300
ccagaggact tcgtgtcta tttctgtcag caagggaaca cctgccta cacctttgga 360

caggcacca agctcgagat taaagtgga ggtggcagcg gaggagtggt gtccggcgg 420
ggaggaagcg gaggcggagg gagccagtc caactccaag aaagcggacc gggctctgtg 480
aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccattac 540
ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttg 600
ggctctgaga ctacttacta caactcatcc ctcaagtcac gcgtcaccat ctcaaaggac 660
aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcactgtga ccgcagccga caccgccgtg 720
tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780

ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgt 840
cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900
ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggccctctg 960
gctgggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgatca ctctttactg taagcgcgg 1020
cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa 1080

gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140
 gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200

aacgaactca atcttggctg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
 gaccagaaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320
 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
 agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440
 gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 94
 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 94

atggccctcc ctgtaccgc cctgtctgtt ccgttggtc ttctgtcca cgcgctcgg 60
 cccgaaattg tgatgaccca gtcaccgcc actcttagcc tttcaccgg tgagcgcga 120
 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc taaaataacc ttaattgta tcaacagaag 180
 cccggacagg ctctctgcct tetgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgag 300
 ccagaggact tcgtgtctta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 cagggcacca agctcgagat taaagggtga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgg 420

ggaggaagcg gaggcggtgg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggtcttgtg 480
 aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtagcgc gagtgtctct ccccgattac 540
 ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttgg 600
 ggctctgaga ctacttacta caactcatcc ctcaagtcac gcgtcacat ctcaaaggac 660
 aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcactgtga ccgcagccga caccgccgtg 720
 tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780
 ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgt 840

cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctgg 900
 ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggccctctg 960

gctgggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcggt 1020
 cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cctttcatga ggctgtgca gactactcaa 1080
 gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140
 gtgaaattca gccgcagcgc agatgttcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
 aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260

gacccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320
 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
 agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440
 gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 95

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 95

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60

ccacaagtc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
 ctcaattgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
 cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240
 aactcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
 tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggtctcgg aggtggcgga 480

agcgaaatcg tgatgacca gagccctgca accctgtccc tttctcccgg ggaacgggct 540
 accctttctt gtcgggcacg acaagatata tcaaaatacc tcaattggtg tcaacagaag 600
 ccgggacagg ccctaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc 660
 gcacgcttta gcgggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag 720
 cccgaggact tcgccgtcta cttctgccag cagggttaaca cctgccgta caccttcggc 780
 cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc 840

ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900

ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg 960

gctggctactt gcggggctct gctgctttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcggt 1020

cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cctttcatga ggccctgtgca gactactcaa 1080

gaggaggacg gctgtttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140

gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200

aacgaactca atcttggctg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260

gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320

ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380

agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440

gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 96

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 96

atggccctcc ctgtcacgc cctgtgtctt ccgtggctc tttctgtcca cgccgtctgg 60

cccgaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcga 120

accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc taaaataacc ttaattggtg tcaacagaag 180

cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240

gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag 300

ccagaggact tcgtgtctta tttctgtcag caagggaaca cctgcacctc cacctttgga 360

cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420

ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480

ctttcactga ctgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc 540

agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactacaact catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660

gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780
 gtgtccagca ccactacccc agcaccgagg caccacccc cggctcctac catcgctcc 840
 cagcctctgt ccttgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
 cggggctctt acttcgctg cgatactac atttggggc ccttggtgg tacttgcggg 960

gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
 tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
 agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
 ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggacc agaaatgggc 1260
 gggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320
 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac 1380

gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440
 caggccctgc cgcctcgg 1458

<210> 97

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 97

atggccctgc ccgtaccgc tctgtctgtg ccccttctc tcttcttca tgcagcaagg 60
 ccggacatcc agatgaccca aaccacctca tcctctctg cctctcttg agacagggtg 120
 accatttctt gtgcgccag ccaggacatc agcaagtatc tgaactgta tcagcagaag 180

ccggacggaa ccgtgaagct cctgatctac catacctctc gcctgcatag cggcgtgccc 240
 tcacgcttct ctggaagcgg atcaggaacc gattattctc tcaactttc aaatcttgag 300
 caggaagata ttgccaccta tttctgccag cagggttaata cctgcccta caccttcgga 360
 ggagggacca agctcgaat caccggtgga ggaggcagc gcggtggagg gtctggtgga 420
 ggtggttctg aggtgaagct gcaagaatca ggccctggac ttgtggcccc ttcacagtcc 480
 ctgagcgtga cttgcacct gtccggagtc tcctgcccg actacggagt gtcatggatc 540
 agacaacctc cacggaagg actggaatgg ctcggtgtca tctgggtag cgaaactact 600

tactacaatt cagccctcaa aagcaggctg actattatca aggacaacag caagtcccaa 660
gtctttctta agatgaactc actccagact gacgacaccg caatctacta ttgtgctaag 720
cactactact acggaggatc ctacgctatg gattactggg gacaaggtac ttccgtcact 780
gtctcttcac accatcatca ccatcaccat cac 813

<210> 98

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 98

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

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

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

130	135	140
Val	Lys	Leu
Gln	Glu	Ser
Gly	Pro	Gly
Leu	Val	Ala
Pro	Ser	Gln
Ser		
145	150	155
160		

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
165 170 175
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
180 185 190
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
195 200 205
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
210 215 220
Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
225 230 235 240
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His

260 265 270
<210> 99
<211> 1458
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 99
atggccttac cagtgaccgc cttgtctctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccggacatcc agatgacaca gactacatcc tcctgtctg cctctctggg agacagagtc 120
accatcagtt gcagggaag tcaggacatt agtaaatt taaattggta tcagcagaaa 180
ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac catacatcaa gattacactc aggagtccca 240

tcaaggttca gtggcagtg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300
caagaagata ttgccactta cttttgccaa cagggttaata cgcttcgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggagat cacaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
ggcggatctg aggtgaaact gcaggagtca ggacctggcc tgggtggcgc ctcacagagc 480
ctgtccgtca catgcactgt ctcaggggtc tcattaccg actatggtg aagctggatt 540
cgccagcctc cagaaaagg tctggagtgg ctgggagtaa tatgggtag tgaaaccaca 600

tactataatt cagctctcaa atccagactg accatcatca aggacaactc caagagccaa 660

gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccatttacta ctgtgccaaa 720

cattattact acggtggtag ctatgctatg gactactggg gccaaagAAC ctCagtcacc 780

gtctctctcaa ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaacac cggcgccac catcgctcg 840

cagccctgt cctcgcccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 900

agggggctgg acttcgctg tgatatctac atctgggcgc cttggccgg gacttgtggg 960

gtccttctcc tgtcactggt taccacctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg 1020

tatatattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1080

agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg 1140

agcgagacg cccccgcgtA caagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200

ggacgaagag aggagtacga tgttttgac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 1260

ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 1320

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380

gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg 1440

caggccctgc cccctcgc 1458

<210> 100

<211> 1184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 100

ctgaggctc cgtgcccgt cagtgggcag agcgacatc gccacagtc cccgagaagt 60

tggggggagg ggtcggcaat tgaaccgtg cctagagaag gtggcgcggt gtaaactggg 120

aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggt tgggggagaa ccgtatataa 180

gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240

gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300

gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360

ggtgggagag ttcgaggcct tgcgttaag gagcccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420

cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480

ctgcttttga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540
tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600
gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720

tgcctggcct cgcgccgccc tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagttagc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840
ggaggacgcg gcgctcgga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct 900
ttccgtctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccc tccaggcacc 960
tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020
cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140

agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcagggtgc gtga 1184

<210> 101

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 101

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggccca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgcc ttacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 102

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 102

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

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

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys Met

225 230

<210> 103

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 103

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc cagagttcct gggcggaccc	60
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag	120
gtgacctgtg tgggtggtga cgtgtcccag gaggacccc aggtccagtt caactggtac	180

gtggacggcg tggaggtgca caacccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc	240
acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	300
tacaagtgtg aggtgtccaa caaggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag	360
gccaagggcc agcctcggga gccccagtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg	420
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc	480
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc cctgtgctg	540
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggtgaccg tggacaagag ccggtggcag	600

gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag	660
aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg	690

<210> 104

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 104

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	150

<210> 105

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(40)

<223> /replace=" "

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(40)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations for
variant positions"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(40)

<223> /note="This sequence may encompass 1-10 "Gly Gly Gly Ser"

repeating units"

<400> 105

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

 35 40

<210> 106

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 106

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 107

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

1 5 10 15

<210> 108

<211>

> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 108

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 109

<211> 5000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> Variation

<222> (51)..(5000)

<223> /replace=" "

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(5000)

<223> /note="Variant bases given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations for
variant positions"

<400> 109

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	480
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	540
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	600
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	660
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	720
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1440

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1500
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1560
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1620
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1680
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1740
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1800
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1860
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1920
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1980
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2040
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2100
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2160
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2220
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2280
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2340
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2400
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2460
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2520
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2580
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2640
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2700
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2760
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2820
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2880
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2940
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3000
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3060
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3120
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3180
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3240

[illegible]

```

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                5000

<210> 110
<211> 100
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polynucleotide"
<400> 110
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      60
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt                                100
<210> 111
<211> 5000
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

        polynucleotide"
<220><221> Variation
<222> (51)..(5000)
<223> /replace=" "
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(5000)
<223> /note="Variant bases given in the sequence have no
        preference with respect to those in the annotations for
        variant positions"
<400> 111
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      60
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      120
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      180

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      240
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      300
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      360

```

[illegible]

[illegible]

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4020
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4080
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4140
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4200
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4260
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4320
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4380

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4440
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4500
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4560
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4620
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4680
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4740
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4800

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4860
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4920
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4980
 tttttttttt tttttttttt 5000

<210> 112

<211> 5000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> Variation

<222> (101)..(5000)

<223> /replace=" "

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (101)..(5000)

<223> /note="Variant bases given in the sequence have no
 preference with respect to those in the annotations for

variant positions"					
<400> 112					
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	60
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	120
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	180
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	240
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	300
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	360
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	420
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	480
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	540
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	600
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	660
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	720
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	780
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	840
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	900
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	960
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1020
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1080
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1140
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1200
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1260
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1320
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1380
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1440
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1500
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1560
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1620
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1680
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1740

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3600
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3660
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3720
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000

<210> 113

<211> 400

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

```

        polynucleotide"
<220><221> Variation
<222> (101)..(400)
<223> /replace=" "
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(400)
<
223> /note="Variant bases given in the sequence have no
        preference with respect to those in the annotations for
        variant positions"
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(400)
<223> /note="See specification as filed for detailed description of
        substitutions and preferred embodiments"
<400> 113
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        180

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                400
<210> 114
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polypeptide"
<400> 114
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1                5                10                15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

```

20 25 30
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu

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

<210> 115

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 115

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 116

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 118

<211> 2000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> Variation

<222> (51)..(2000)

<223> /replace=" "

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(2000)

<223> /note="Variant bases given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for

variant positions"					
<400> 118					
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					60
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					120
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					180
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					240
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					300
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					360
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					420
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					480
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					540
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					600
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					660
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					720
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					780
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					840
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					900
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					960
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1020
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1080
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1140
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1200
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1260
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1320
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1380
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1440
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1500
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1560
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1620
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa
					1680

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2000

<210> 119

<211> 373

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 119

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr

1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe

20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn

85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

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

 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 325 330 335
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 340 345 350
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 355 360 365
 Ala Leu Pro Pro Arg
 370
 <210> 120

<211> 1182

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><221> source

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

<400> 120

atggccctcc ctgtcactgc cctgtttctc cccctcgac tctgtctcca cgccgctaga	60
ccacccgat gggtttctga ctctccgat cgccgtgga atccccaac cttctcaccg	120
gcactcttgg ttgtgactga gggcgataat gcgacctca cgtgctcgtt ctccaacacc	180
tccgaatcat tctgtctgaa ctggtaccgc atgagcccg caaaccagac cgacaagctc	240
gccgcgtttc cggaagatcg gtgcgaaccg ggacaggatt gtcggttccg cgtgactcaa	300
ctgccgaatg gcagagactt ccacatgagc gtggtccgcg ctaggcgaaa cgactccggg	360
acctacctgt gcggagccat ctctgtggcg cctaaggccc aaatcaaaga gagcttgagg	420
gccgaactga gactgaccga gcgcagagct gaggtgcaa ctgcacatcc atcccatcg	480
cctcgccctg cggggcagtt tcagaccctg gtcacgacca ctccggcgcc gcgcccaccg	540
actccggccc caactatcgc gagccagccc ctgtcgtga ggccggaagc atgccgcct	600
gccgcgggag gtgtgtgca taccgggga ttggacttcg catgcgacat ctacatttgg	660
gtctctctcg ccggaacttg tggcgtgctc cttctgtccc tggatcatcac cctgtactgc	720
aagcggggtc ggaaaaagct tctgtacatt ttcaagcagc cttcatgag gcccggtgcaa	780
accacccagg aggaggacgg ttgtctctgc cggttccccg aagaggaaga aggaggttgc	840
gagctgcgcg tgaagtctc ccggagcgcc gacgccccg cctataagca gggccagaac	900
cagctgtaca acgaactgaa cctgggacgg cggaagagt acgatgtgct ggacaagcgg	960
cgcgccggg accccgaaat gggcggaag cctagaagaa agaaccctca ggaaggcctg	1020
tataacgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctact ccgaaattgg gatgaaggga	1080
gagcggcgga ggggaaaggg gcacgacggc ctgtaccaag gactgtccac cgccaccaag	1140
gcacatacg atgccctgca catgcaggcc ctccccctc gc	1182

<210> 121

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 121

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 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro

20 25 30

Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly

35 40 45

Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe

50 55 60

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg

130 135 140

Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser

145 150 155 160

Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Thr Thr Thr Pro Ala

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
225 230 235 240

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
245 250 255

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
260 265 270

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
275 280 285

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
290 295 300

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
305 310 315 320

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
325 330 335

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
340 345 350

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
355 360 365

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
370 375 380

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
385 390