(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0018434
(43) 공개일자 2024년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2851 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7039553
(22) 출원일자(국제) 2022년06월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/032539
(87) 국제공개번호 WO 2022/261121
국제공개일자 2022년12월15일
(30) 우선권주장
63/208,407 2021년06월08일 미국(US)

(71) 출원인
사이포스 바이오사이언시스 인코포레이티드
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 킴볼 웨이 100
(72) 발명자
랜드그라프 카일
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 킴볼 웨이 100 사이포스 바이오사이언시스 인코포레이티드 씨/오
김 케이먼
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 킴볼 웨이 100 사이포스 바이오사이언시스 인코포레이티드 씨/오
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 **항체-NKG2D 리간드 도메인 융합 단백질**

(57) 요 약

본 개시내용은 (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄 및 (ii) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 융합 단백질을 제공하고, 경쇄는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 A1-A2 도메인에 C-말단에서 융합된다. 항체 융합 단백질의 일부 또는 전부를 암호화하는 핵산뿐만 아니라 예를 들면 CD20 양성 암의 치료에서 항체 융합 단백질을 사용하는 방법이 제공된다. 본 개시내용은 돌연변이체 A1-A2 도메인 펩타이드를 추가로 제공한다.

대 표 도 - 도1a

서열 번호	설명	서열
1	중쇄 가변 영역	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIG AIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY GGDWYFNVWGAGTTVTVSAA
2	중쇄 불변 영역- 옵션 1	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
3	중쇄 불변 영역- 옵션 2	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
4	신호를 갖는 중쇄, 전장 서열- 옵션 1	MMRPIVLVLLFATSALAQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
5	신호를 갖는 중쇄, 전장 서열- 옵션 2	MMRPIVLVLLFATSALAQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

(52) CPC특허분류
A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/464402 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄 및 (ii) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 융합 단백질로서, 경쇄는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 A1-A2 도메인에 C-말단에서 융합된, 항체 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, A1-A2 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 링커를 통해 경쇄에 융합된, 항체 융합 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항체 융합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 불변 도메인을 포함하는, 항체 융합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 융합 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 불변 도메인을 포함하는, 항체 융합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 융합 단백질.

청구항 8

서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 융합 단백질.

청구항 9

서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 융합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 융합 단백질의 경쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 11

제10항의 핵산 분자 및 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 12

제10항의 핵산 분자를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 추가로 포함하는, 발현 벡터.

청구항 14

제12항 또는 제13항의 발현 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 15

제12항의 발현 벡터 및 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 16

항체 융합 단백질을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 융합 단백질의 경쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자 및 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

상기 항체 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 융합 단백질을 포함하는 하나 이상의 용기 및 사용 설명서를 포함하는, 키트.

청구항 18

제17항에 있어서, 서열 번호 15를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 포유류 세포를 포함하는 하나 이상의 용기를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 19

제18항에 있어서, 포유류 세포는 인간 림프구 또는 인간 대식세포인, 키트.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 키메라 항원 수용체는 서열 번호 16-18을 추가로 포함하는, 키트.

청구항 21

CD20 양성 암을 겪는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 융합 단백질 및 서열 번호 15를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 포유류 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 포유류 세포는 인간 림프구 또는 인간 대식세포인, 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 키메라 항원 수용체는 서열 번호 16-18을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 24

서열 번호 30과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 A1-A2 도메인 펩타이드로서, 펩타이드는 서열 번호 30의 위치 40, 54 및/또는 84 중 하나 이상에서 알라닌 또는 글루타민을 포함하는, A1-A2 도메인 펩

타이드.

청구항 25

제24항에 있어서, 펩타이드는 서열 번호 30의 위치 40 및 54에서 글루타민 잔기를 포함하는, A1-A2 도메인 펩타이드.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 펩타이드는 서열 번호 30의 위치 84에서 글루타민을 포함하는, A1-A2 도메인.

청구항 27

제24항 또는 제25항에 있어서, 펩타이드는 서열 번호 30의 위치 84에서 알라닌을 포함하는, A1-A2 도메인.

청구항 28

제24항에 있어서, 펩타이드는 서열 번호 11, 서열 번호 31 또는 서열 번호 32를 포함하는, A1-A2 도메인 펩타이드.

청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 경쇄에 융합된, A1-A2 도메인 펩타이드.

청구항 30

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 중쇄에 융합된, A1-A2 도메인 펩타이드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 기술분야

[0002] 본 발명은 비천연 NKG2D 수용체에 결합하는 비천연 NKG2D 리간드의 A1-A2 도메인 및 상기 도메인을 포함하는 항체 융합 단백질에 관한 것이다.

[0003] 관련 출원의 상호 참조

[0004] 본 출원은 2021년 6월 8일에 출원된 미국 가출원 제63/208,407호의 이익을 주장하고, 이의 전체 내용은 본원에 참고로 완전히 포함된다.

[0005] 전자로 제출된 자료의 참고에 의한 포함

[0006] 본원과 동시에 제출되고 하기로서 확인된 컴퓨터 판독 가능한 뉴클레오타이드/아미노산 서열 목록이 그 전체가 참고로 포함된다: 2022년 6월 7일에 생성된 명칭이 "56867_Seqlisting.txt"인 63,727 바이트 ASCII(텍스트) 파일.

배 경 기 술

[0007] 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 환자 유래 T 세포의 조작은 입양 세포 치료의 랜드마크를 변경하여서, 과학자 및 임상의에게 T 세포의 강력한 세포용해 역량을 이용하고 MHC 독립적 방식으로 특이적 항원 발현 표적에 이들을 지시하는 능력을 제공한다. 혈액학적 악성종양을 치료하기 위한 이들의 초기 적용은 믿기 어려운 반응으로 이어졌고, 비혈액학적 적응증에서 이의 효과적인 사용을 유발시키도록 조사 노력의 급증을 고무시켰다. 그러나, CAR-T 세포 치료는 단일 목적 표적화 도메인의 이들의 이용, 사이토카인 방출 증후군에 기여할 수 있는 용량 제어의 결여, 질환 재발로 이어지는 종양 항원 소실의 해결 불능 및 지속 부족으로 이어지는 비인간 표적화 도메인의 면역원성에 의해 제한된다. 당해 분야에서 현재의 치료 옵션의 이 제한을 해결하기 위해 개선된 CAR 기반 세포 치료에 대한 수요가 있다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄 및 (ii) 서열 번

호 8의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 융합 단백질을 제공하고, 경쇄는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 A1-A2 도메인에 C-말단에서 융합된다. 다양한 양태에서, 중쇄는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 불변 도메인을 포함한다. 선택적으로, A1-A2 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 링커를 통해 경쇄에 융합된다. 이 점에서, 경쇄는 다양한 양태에서 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함한다. 다양한 양태에서, 중쇄는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 본 개시내용은 항체 융합 단백질의 경쇄(예를 들면, 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄, 경쇄는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 A1-A2 도메인에 C-말단에서 융합됨)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 추가로 제공한다. 본 개시내용은 항체 융합 단백질의 경쇄를 암호화하는 핵산 분자 및 본원에 기재된 항체 융합 단백질의 중쇄(예를 들면, 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 본원에 기재된 항체 융합 단백질의 경쇄를 암호화하는 핵산 분자를 포함하고, 선택적으로 본원에 기재된 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 추가로 포함하는 발현 벡터가 또한 제공된다. 본원에 기재된 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 추가로 제공된다. 본 개시내용은 항체 융합 단백질의 경쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자 및 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 항체 융합 단백질을 제조하는 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 항체 융합 단백질의 경쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자 및 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계 및 항체 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.

[0010] 본원에 기재된 항체 융합 단백질을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함하는 키트가 또한 제공된다. 선택적으로, 키트는 서열 번호 15를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 포유류 세포(예를 들면, 인간 림프구 또는 인간 대식세포)를 포함하는 하나 이상의 용기를 추가로 포함한다. 다양한 양태에서, 키메라 항원 수용체는 서열 번호 16-18을 추가로 포함한다.

[0011] 본 개시내용은 CD20 양성 암을 겪는 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 항체 융합 단백질 및 서열 번호 15를 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 포유류 세포(예를 들면, 인간 림프구 또는 인간 대식세포)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 선택적으로, 키메라 항원 수용체는 서열 번호 16-18을 추가로 포함한다. CD20 양성 세포를 치료하기 위한 항체 융합 단백질 및 포유류 세포의 용도뿐만 아니라 CD20 양성 암을 치료하기 위한 약제의 제조에서의 항체 융합 단백질 및 포유류 세포의 용도가 제공된다.

[0012] 본 개시내용은 또한 서열 번호 30과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 A1-A2 도메인 펩타이드를 제공하고, 펩타이드는 서열 번호 30의 위치 40, 54 및/또는 84 중 하나 이상에서 알라닌 또는 글루타민을 포함한다. 다양한 양태에서, 펩타이드는 서열 번호 30의 위치 40 및 54에서 글루타민 잔기를 포함한다. 선택적으로, 펩타이드는 서열 번호 30의 위치 84에서 글루타민 또는 서열 번호 30의 위치 84에서의 알라닌을 포함한다.

[0013] 본 명세서에서 다양한 실시형태가 "포함하는" 언어를 사용하여 제시되어 있지만, 다양한 상황 하에, 관련된 실시형태가 "이루어진" 또는 "본질적으로 이루어진" 언어를 사용하여 또한 기재될 수 있다고 이해되어야 한다. 본 개시내용은 특징으로 "이루어진" 또는 "본질적으로 이루어진" 실시형태를 포함하도록 특징을 "포함하는"으로 기재된 실시형태를 고려한다. "하나" 또는 "한"의 용어는 하나 이상을 지칭한다. 그러므로, "하나"(또는 "한"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. "또는"의 용어는 문맥이 달리 모호하게 요하지 않는 한 대안에서 또는 함께 항목을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0014] 본원에서 값의 범위의 언급은, 달리 본원에 표시되지 않는 한, 범위 및 각각의 종점 내에 해당하는 각각의 별개의 값을 개별적으로 지칭하는 약칭 방법으로 작용하도록 단순히 의도되고, 각각의 별개의 값 및 종점은 본원에 개별적으로 인용된 것처럼 본 명세서로 포함된다. 그러나, 본 설명은 또한 더 낮은 종점 및/또는 더 높은 종점이 배제된 동일한 범위를 고려한다. "약"의 용어가 사용될 때, 이것은 그 언급된 숫자의 플러스 또는 마이너스 5%, 10% 또는 초과의 언급된 숫자를 의미한다. 의도된 실제 변동은 문맥으로부터 구별 가능하다.

[0015] 본원에 기재된 모든 방법은 달리 본원에 표시되지 않는 한 또는 달리 문맥에 의해 명확히 상충되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 및 모든 예, 또는 예시적인 언어(예를 들어, "예컨대")의 사용은 본 개시내용을 더 잘 예시하도록 단순히 의도되고 달리 청구되지 않은 한 본 개시내용의 범위에 대한 제한을 부여하지 않는다. 본 발명에 중요한 것으로 본원에 기재된 오직 이러한 제한은 그대로 바라봐져야

하고; 중요한 것으로 본원에 기재되지 않은 제한이 결여된 본 발명의 변동은 본 발명의 양태로서 의도된다.

[0016] 본 발명의 추가의 특징 및 변동은 도면 및 상세한 설명을 포함하여 본 출원의 전체로부터 당업자에게 자명할 것이고, 모든 이러한 특징은 본 발명의 양태로서 의도된다. 마찬가지로, 본원에 기재된 본 발명의 특징은 특징의 조합이 본 발명의 양태 또는 실시형태로서 기재되는지와 무관하게 본 발명의 양태로서 또한 의도된 추가의 실시형태로 재조합될 수 있다. 전체 문헌은 통합된 개시내용으로서 관련되도록 의도되고, 특징의 조합이 본 문헌의 동일한 문장 또는 문단 또는 부문에서 함께 발견되지 않더라도(별개의 부문에 기재되더라도) 본원에 기재된 특징의 모든 조합이 고려되는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본원에 기재된 다양한 서열을 제공하는 차트이다.

도 2a는 야생형 NKG2D 또는 iNKG2D.YA와의 His 태그화된 단량체성 야생형 MIC 리간드 상호작용에 대한 octet BLI 동역학 결합 데이터를 예시한다. Fc-wtNKG2D 또는 Fc-iNKG2D.YA를 기준선 확립 후 각각의 리간드의 희석 시리즈와 연관된 항인간 IgG Fc 포획(AHC) 바이오센서 팁에 의해 포획하였다(삽입어구 값은 조사된 가장 높은 농도를 나타낸다). ULBP4는 발현되지 않고 단량체로서 정제되지 않아서 이 검정에 포함되지 않았다. 모든 축이 동일한 척도임에 주의한다(결합 - 0 nm, 0.4 nm. 0.8 nm, 1.2 nm(y축); 시간 - 0초, 50초, 100초, 150초, 200초, 250초, 300초, 350초(x축)). 데이터는 단일 실험을 나타낸다.

도 2b는 천연 리간드를 관여시키는 iNKG2D.YA의 불능을 확인시켜 주는 ELISA로부터의 결과를 예시한다. 리간드-Fc 융합체(R&D Biosystems)는 미량역가 플레이트에 코팅되고, 바이오티닐화된 Fc-wtNKG2D(점선) 또는 Fc-iNKG2D.YA(실선)의 적정은 적용되고 스트렙타비딘-HRP에 의해 검출되었다. (ELISA 신호(OD450)(y축); nM 리간드 Fc(x축).)

도 3a-3d: NKG2D Y152A/199F(iNKG2D.AF)(본 개시내용의 NKG2D 엑토도메인)에 선택적 결합하는 직각 U2S3 리간드(A1-A2 도메인). 라이브러리 설계 및 수행된 파지 패닝은 바이오티닐화된 이중-돌연변이체 Fc-iNKG2D.AF가 Fc-wtNKG2D 경쟁자의 증가하는 농도에 대해 선택 회차 동안 사용됨을 제외하고 iNKG2D.YA에 대해 기재된 것과 같았다. 데이터는 Fc-wtNKG2D 또는 Fc-iNKG2D.AF 중 어느 하나에 대한 단량체성 리간드의 상호작용에 대한 단일 실험(도 3a) Octet BLI 결합 데이터를 나타낸다. 데이터는 2개의 실험을 나타낸다. (도 3b) 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 주요 변이체는 리툭시맙 경쇄의 C-말단에 대한 융합 및 Fc-wtNKG2D, Fc-iNKG2D.YA 및 Fc-iNKG2D.AF에 대한 차등적 결합으로서 클로닝되고, ELISA에 의해 정량화되었다. Fc-iNKG2D.YA를 선택적으로 관여시키는 4개의 변이체가 도시되어 있고 다른 2개의 수용체는 도시되어 있지 않다. 도 3b의 선 그래프에서, wtNKG2D는 다이아몬드로 표시되고, iNKG2D는 정사각형으로 표시되고, iNKG2D.AF는 삼각형으로 표시된다. (도 3c) 이것이 선택된 수용체 변이체 - 각각 Fc-iNKG2D.YA 및 Fc-iNKG2D.AF에 결합하는 U2S3 및 U2R 리간드의 배타성을 나타내는 ELISA. U2S3 리간드는 예를 들면 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공보 제2019/0300594호에 추가로 기재되어 있다. (도 3d) iNKG2D.YA-CAR 또는 iNKG2D.AF-CAR 발현 CD8+ T 세포에 의한 20:1의 효과기:표적비(E:T)에서의 라모스(Ramos) 표적 세포에 의한 칼세인 방출 검정 및 리툭시맙.LC-U2S3 또는 리툭시맙.LC-U2R의 적정. 오차 막대는 기술적 반복실험의 ±SD를 나타낸다.

도 4a: wtNKG2D 경쟁자의 증가하는 농도의 존재 하에 3회차 및 4회차의 패닝 후 Fc-iNKG2D.YA 및 Fc-wtNKG2D에 대한 선택된 파지의 상대 결합. 삼각형으로 윤곽이 표시된 그래프의 부분에서의 파지 클론은 추가의 규명을 위해 선택되었다.

도 4b: 3개의 파지 변이체인 S1, S2, S3은 MicAbody로서 항-FGFR3 항체 클론 R3Mab 중쇄의 C-말단에 대한 융합으로서 발현되었고, 야생형 ULBP2 및 R81W 버전과 함께, Fc-wtNKG2D(점선)에 비해 우선적 Fc-iNKG2D.YA 결합(실선)을 보유하는 선택적 변이체의 능력에 대해 시험되었다. 모든 정제된 MicAbody는 인간 FGFR3에 대한 결합을 보유하였다(데이터 비기재).

도 4c: His 태그화된 단량체성 야생형 ULBP2, ULBP2 R81W, 및 Fc-NKG2D 및 Fc-iNKG2D.YA에 결합하는 직각 U2S3 리간드의 결합 분석. Fc-wtNKG2D 또는 Fc-iNKG2D.YA는 항-인간 IgG Fc 포획(AHC) 바이오센서 팁에 의해 포획되고, 이후 리간드의 희석 시리즈와 연관되었다. 데이터는 단일 실험으로부터이다.

도 5: 리툭시맙의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에 융합될 때 U2S3 직각성의 Octet BLI 검증. Fc-wtNKG2D 또는 Fc-iNKG2D.YA는 항-인간 IgG Fc 포획(AHC) 바이오센서 팁에 의해 포획되고, 이후 50 nM에서 시작하는 MicAbody의 2배 희석 시리즈와 연관되었다. 결합 반응에 상응하는 y축은 모든 센소그램에 대해 동일한 척도로 설정되었다.

Kd 값은 오직 기재된 2개의 양성 결합 상호작용에 대해 계산될 수 있었다.

도 6: 왼쪽에서 폴리펩타이드의 N-말단에서 시작하고 성숙 I형 막관통 단백질에서 부재하는 신호 서열(SS)을 포함하는 iNKG2D.YA CAR 수용체의 도식. 밑줄 표시된 서열은 신호 서열에 상응하고, 이탤릭체로 표시된 서열은 iNKG2D 도메인(서열 번호 15)에 상응하고, 평범한 서열은 CD8a 힌지/막관통 도메인(서열 번호 16)에 상응하고, 밑줄 및 이탤릭체로 표시된 서열은 4-1BB 도메인(서열 번호 17)에 상응하고, 볼드체로 표시된 서열은 CD3ζ 도메인(서열 번호 18)에 상응하고, 이중 밑줄 표시된 서열은 링커에 상응하고, 점선 밑줄 표시된 서열은 eGFP(녹색 형광 단백질) 서열에 상응한다.

도 7a-7c: 전환 가능한 CAR 시스템의 요소. (도 7a) 전환 가능한 CAR 시스템으로의 NKG2D-MIC 축의 성분을 전환하기 위한 조작 개관. iNKG2D.YA 및 U2S3은 각각 2세대 CAR 수용체 및 이중특이적 어댑터 분자(MicAbody)의 성분이 되었다. "TAA"는 종양 연관된 항원이다. (도 7b) CD4 또는 CD8 세포로의 iNKG2D.YA-CAR의 고효율 렌티바이러스 형질도입의 대표적인 예. 형질도입 효율은 공여자 사이에 변했지만, 70% 초과의 GFP+ 수율은 변함없이 달성되었다. RITscFv-CAR은 비교를 위해 도시되어 있고, 리툭시맙의 VH/VL 도메인에 기초한 scFv가 iNKG2D.YA 대신에 사용됨을 제외하고는 iNKG2D-CAR과 동일한 구성을 갖는다. (도 7c) iNKG2D.YA-CAR의 표면 발현은 세포를 리툭시맙.LC-U2S3 MicAbody와 항온처리한 후, PE 접합된 마우스-항-인간 카파 사슬 항체 염색에 의해 CD8+ T 세포에서 결정되었다. 비형질도입된 T 세포가 비교를 위해 도시되어 있다.

도 8a-8c: iNKG2D-CAR 발현 CD8+ T 세포의 리간드 의존적 활성화 및 MicAbody 의존적 수용체 내재화. (도 8a) CD8+ T 세포는 수용체 도메인으로서 야생형 NKG2D 또는 iNKG2D.YA로 이루어진 CAR 작제물에 의해 형질도입되었다. 야생형 His 태그화된 단량체성 리간드 또는 His 태그화된 단량체성 U2S3를 10 ug/mL에서 시작하는 1:3 희석 시리즈에서 미량역가 플레이트의 웰에 코팅하였다. $1x10^5$개의 CAR 발현 세포를 외인성 IL2 없이 150 uL 부피에서 웰로 도입하고, 상청액을 24시간 후 수집하고, 제조된 및 방출된 사이토카인의 양을 사이토카인 특이적 ELISA에 의해 정량화하였다. His 태그화된 버전이 발현되고 정제될 수 없으므로 ULBP4는 검정에 포함되지 않았다. (도 8b) iNKG2D-CAR 또는 RITscFv-CAR을 발현하는 CD8+ 세포를 iNKG2D-CAR 세포의 경우에 Rit-S3 MicAbody(nM)의 증가하는 농도와 4:1의 E:T로 라모스 세포와 공동배양하였다. 24시간 후, 배양 상청액을 수확하고 방출된 사이토카인을 ELISA에 의해 정량화하였다. 공동항온처리의 2시간 후 칼세인 방출에 의해 세포용해를 측정하였다. 모든 오차 막대는 기술적 3중 반복실험의 ±SD이다. 단일 실험을 나타내는 모든 데이터. (도 8c) iNKG2D-CD8+ 세포를 5 nM 트라스투주맙.LC-U2S3 MicAbody와 예비항온처리한 후, Her2의 적정에 의해 예비코팅된 웰에 노출시켰다. 2시간 후, 세포를 항-카파-PE 항체와 항온처리하여 표면 접근 가능한 MicAbody를 검출하고 GFP를 조사하여 발현된 iNKG2D-CAR의 총 수준을 찾았다.

도 9a-9d: 접근 가능한 CAR 활성의 시험관내 규명. (도 9a) 라모스 (CD20+) 표적 세포를 5:1의 E:T로 전환 가능한 CAR-CD8 세포에 노출시키고, 리툭시맙 항체(ADCC-결핍), 리툭시맙.LC-U2S3 MicAbody 또는 트라스투주맙.LC-U2S3 MicAbody의 증가하는 농도와 공동배양하였다. 24시간 후, 상청액을 수확하고, IL-2(채워진 막대) 또는 IFNγ(빗금친 막대)를 ELISA에 의해 정량화하였다. Rit-U2S3은 5000 pg/mL 또는 초과에서 사이토카인 방출을 나타낸 유일한 샘플이였다. (도 9b) 전환 가능한 CAR-CD8 세포를 30분 동안 Alexa Fluor 647 접합된 리툭시맙.LC-U2S3의 증가하는 농도와 항온처리하고, 과량을 세척하고, MFI를 유세포분석법에 의해 정량화하였다. 5 nM은 수용체가 최대로 점유된 변곡점을 나타낸다. (도 9c) 전환 가능한 CAR-CD8 세포를 (b)에 기재된 것과 같은 리툭시맙.LC-U2S3의 증가하는 농도에 의해 아밍(arming)한 후, 방출된 칼세인의 양이 정량화된 후 2시간 동안 20:1의 E:T에서 칼세인 로딩된 라모스 세포와 공동항온처리하였다. (도 9d) iNKG2D.YA-CAR CD8+ 세포를 5 nM 리툭시맙.LC-U2S3, 5 nM 트라스투주맙.LC-U2S3 또는 (b)에 기재된 것과 같은 각각의 2.5 nM의 등몰 혼합물에 의해 예비아밍한 후, 2개의 표시된 E:T 비에서 칼세인 로딩된 라모스 또는 CT26-Her2 세포에 노출시켰다. 방출된 칼세인의 양을 2시간 후 정량화하였다. 도 9b를 제외하고, 데이터는 적어도 2개의 독립 실험을 나타내고, 기술적 3중 반복실험의 평균으로서 작도된다.

도 10a-10c: 리툭시맙(ADCC-) 항체에 대한 중쇄 대 경쇄 U2S3 융합체의 비교. (도 10a) 인간 T 세포 또는 종양의 부재 하에 NSG 마우스에서의 100 ug IV 투여 후 혈청 리툭시맙-U2S3 MicAbody 수준의 약동학. 사용된 모든 MicAbody 및 항체 대조군은 ADCC 결핍이였다. 왼쪽에서의 그래프는 경쇄 U2S3 융합체에 대한 모 항체의 비교인 한편, 오른쪽에서의 그래프는 중쇄 U2S3 융합체에 대한 모 항체의 비교이다. 모든 오차 막대는 기술적 3중 반복실험의 ±SD이다. (도 10b) 20:1의 E:T에서의 iNKG2D-CAR CD8+ T 세포 및 라모스 표적 세포와의 공동배양 및 리툭시맙-MicAbody의 적정 2시간 후 시험관내 칼세인 방출 검정. 오차 막대는 실험에 대한 ±SD를 나타내고, 데이터는 다중 실험을 나타낸다. 그래프에서의 상부 선은 리툭시맙.LC-U2S3에 상응하고, 중간 선은 리툭시맙.HC-

U2S3에 상응하고, 하부 선은 리툭시맙에 상응한다. (도 10c) 마우스 NKG2D에 대한 리툭시맙.LC-U2S3의 결합을 나타내는 ELISA. A480 흡광도 값이 도시되어 있다. 마우스 NKG2D에 자연적으로 결합하는 마우스 야생형 Rae1b 리간드를 갖는 트라스투주맙.LC-Rae1b는 양성 대조군으로서 포함되었다.

도 11a-e: NSG 마우스에서의 파종성 라지(Raji) B 세포 림프종의 제어. (도 11a) (도 11b) $5x10^6$개 또는 (도 11c) $15x10^6$개의 총 T 세포를 받은 그룹에 대해 개별 동물 트레이스와 함께 각각의 코호트에 대한 평균 발광 산출 ±SD. (도 11d) 혈액에서의 인간 CD3+ 세포 및 (도 11e) 항-F(ab')2에 의해 검출된 결합된 MicAbody를 조사하는 연구의 과정에 걸친 T 세포 동역학. 코호트 평균 ±SD, n=5가 도시되어 있다.

도 12a-12c: 전환 가능한 CAR-T 세포에 의한 NSG 마우스에서의 피하로 이식된 라지 종양의 제어. (도 12a) 각각의 코호트에 대한 평균 종양 부피, n=5. 오차 막대가 그래프화되지 않도록 종양은 각각의 그룹 내에 크기가 크게 변했다. 역삼각형(7M cCAR-T+60 ug Ritux-S3) 및 정사각형(35M 예비아밍된 cCAR-T)인 2개의 코호트는 중첩하고, 제26일을 넘어 그래프에서 구별될 수 없다. (도 12b) 이식 후 14일, 21일 및 45일에서 혈청 Rit-S3 수준을 예시하는 막대 그래프. 3개의 막대는 각각의 시점에 대해 제공된다 - 35M 예비아밍된 cCAR-T(왼쪽 막대), 7M cCAR-T+60 ug Ritux-S3(중간 막대) 및 35M cCAR-T+60 ug Ritux-S3(오른쪽 막대). 오차 막대는 주어진 코호트에서 마우스로부터의 ±SD 샘플을 나타냈다. (도 12c) 혈액에서의 CD3+ T 세포 동역학 및 표면 회합된 MicAbody F(ab')2 염색을 갖는 T 세포의 백분율의 정량화, ±SD 오차 막대가 기재됨.

도 13a-13f: 보체 매개된 소모를 지시하는 iNKG2D.AF-CAR 세포에 대한 보체 인자 C1q의 표적화된 동원. (도 13a) N-말단 또는 C-말단 융합체로서 발현된 인간 IgG의 Fc 부분에 대한 직각 리간드 융합체의 구조. 야생형 Fc 이외에, C1q 결합을 향상시키는 CH2 도메인에서의 돌연변이의 2개의 세트가 독립적으로 탐구되었다 - S267E/H268F/S324T/G236A/I332E ("EFTAE") 및 K326A/E333A("AA"). (도 13b) 각각의 정제된 융합 단백질에 대한 인간 C1q의 결합을 조사하는 ELISA. Kd의 순위 순서는 융합체의 배향과 무관하게 EFTAE<AA<wt(각각 0.12, 0.35 및 0.67 nM)였다. (도 13c 및 13d) C1q-결합에 대한 보체 의존적 세포독성(CDC) 검정은 Fc-융합체를 향상시킨다. iNKG2D.AF-CAR 또는 비형질도입된 CD8+ T 세포를 죽은 T 세포가 SYTOX Red에 의해 열거되기 전 3시간 동안 각각의 융합 분자 및 10% 정상 인간 혈청 보체의 적정과 항온처리하였다. (도 13e 및 13f) 상기 (도 13c)에 기재된 것과 같이 iNKG2D.YA-CAR 세포에 대해 보체를 지시하기 위한 U2S3 직각 리간드 융합체에 의한 CDC 검정. 모든 오차 막대는 별개의 실험으로서 수행된 iNKG2D-AF 및 iNKG2D-YA에 의한 3중 기술적 측정의 ±SD이다.

도 14a-14e: iNKG2D-CAR CD8+ T 세포에 대한 돌연변이체-IL2 사이토카인의 표적화된 전달. (도 14a) 30 IUe/mL의 사이토카인 또는 사이토카인-U2S2 융합체에 의한 wtNKG2D-CAR(왼쪽 막대) 또는 iNKG2D.YA-CAR(오른쪽 막대) 처리의 3일 후 시험관내 증식. 더 어두운 음영은 선택도를 강조하기 위한 것이다. (도 14b) 저효율(45% GFP+) iNKG2D.YA-CAR 형질도입은 30 IUe/mL의 비선택적 (U2R81W) 또는 iNKG2D.YA 선택적 (U2S2) mutIL2 융합체와 배양되고, 7일 동안 유지되었다. 각각의 집단에서 %GFP+ 세포를 정량화하기 위해 유세포분석법에 의해 세포를 정기적으로 조사하였다. 상부 선은 U2S2-hFc-mutIL2(정사각형) 및 U2S2-mutIL2(원)에 상응하고; 하부 선은 U2R80W-mutIL2(원) 및 U2R80W-hFc-mutIL2(정사각형)에 상응한다. (도 14c) iNKG2D-CAR CD8+ T 세포를 30 IUe/mL의 야생형 IL-2 또는 U2S3-hFc-mutIL2와 배양하고, 이후 리툭시맙.LC-U2S3의 증가하는 농도와 20:1의 E:T에서의 라모스 세포와 공동배양하였다. 방출된 칼세인은 정량화되고, 비형질도입된 CD8+ 세포는 음성 대조군으로서 작용된 rhIL-2에서 유지되었다. (도 14d) 비형질도입된(오른쪽 막대) 또는 iNKG2D-CAR CAR CD8+ T 세포(왼쪽 막대)를 3일 동안 다양한 사이토카인 분자와 항온처리하고, 증식을 정량화하였다. 대조군 분자는 단량체성 U2S3-hFc뿐만 아니라 Rit-S3 MicAbody를 포함하였다. 삽입어구 값은 시험된 IUe/mL 농도이다. 기재된 데이터는 기술적 3중 반복실험의 평균이다. (도 14e) NSG 마우스(N=3)에서의 60 ug의 IP 주사 후 U2S3-hFc-mutIL2의 혈청 PK. 모든 오차 막대는 생물학적 3중 반복실험의 ±SD이다. 데이터는 적어도 2개의 실험을 나타낸다.

도 15a-15b: U2S3-hFc-mutIL2로의 전환 가능한 CAR-T 세포의 생체내 반응. (도 15a) NSG 마우스를 $7x10^6$개의 총 iNKG2D 형질도입된 세포(CD4:CD8 1:1)로 주사하였다. 14일에 T 세포의 수축 후, 마우스를 1주 1회 30 ug의 U2S3-hFc-mutIL2 또는 PBS로 주사하고(삼각형으로 표시됨), T 세포 동역학을 유세포분석법에 의해 모니터링하였다. 말초 혈액에서의 인간 CD3+ T 세포의 %가 기재되어 있고, 각각의 트레이스는 개별 마우스, n=5에 상응한다. (도 15b) CD8+ 세포의 확장뿐만 아니라 U2S3-mutIL2 처리 시 GFP+(CAR 발현) 세포의 비율의 증가에 대한 선도. 선의 상부 클러스터는 CD8+ 세포의 %GFP+에 상응하고, 선의 하부 클러스터는 혈액에서의 %CD8+에 상응한다.

도 16: U2S3-hFc-mutIL2에 대한 인간 PBMC의 반응성. 3명의 공여자로부터의 인간 PBMC를 대조군과 함께 4일 동

안 U2S3-hFc-mutIL2 또는 U2S3-hFc-wtIL2의 증가하는 농도와 항온처리하였다. 각각의 조건 하에 증식성 반응을 모니터링하기 위해 마커 Ki-67에 대해 표지된 세포 유형의 각각을 조사하였다. 공여자 1, 2 및 3의 각각에 대해 11개의 막대가 도시되어 있고; 막대는 각각의 패널에서 왼쪽에서 오른쪽으로 비처리된, 항-CD3[2 ug/ml], IL-2[300 IUe/ml], mutIL2[30 IUe/ml], mutIL2[300 IUe/ml], mutIL2[3000 IUe/ml], mutIL2[30000 IUe/ml], wtIL2[30 IUe/ml], wtIL2[300 IUe/ml], wtIL2[3000 IUe/ml] 및 wtIL2[30000 IUe/ml]를 나타낸다. 오차 막대는 3중 측정의 ±SD이고, 데이터는 단일 실험을 나타낸다.

도 17a-17b는 상이한 링커를 사용하여 상이한 위치에서 부착된 A1-A2 도메인을 갖는 MicAbody를 평가하는 연구를 예시한다. 도 17a는 시험된 작제물을 예시한다. Rit.HCd.S3은 GGGS(서열 번호 14) 링커를 통해 중쇄에 융합된 실시예에 기재된 U2S3 A1-A2 도메인을 포함하는 리툭시맙 항체에 상응한다. Rit.HCd.apts.S3은 APTSSSGGGGS(서열 번호 10) 링커를 통해 중쇄에 융합된 U2S3 A1-A2 도메인을 포함하는 리툭시맙 항체에 상응한다. Rit.HCd.LC.S3은 APTSSSGGGGS(서열 번호 10) 링커를 통해 경쇄에 융합된 U2S3 A1-A2 도메인을 포함하는 리툭시맙 항체에 상응한다. Rit.HCd.LC.gggs.S3은 GGGS(서열 번호 14) 링커를 통해 경쇄에 융합된 U2S3 A1-A2 도메인을 포함하는 리툭시맙 항체에 상응한다. 도 17b는 20:1의 E:T에서의 iNKG2D-CAR CD8+ T 세포 및 라모스 표적 세포와의 공동배양 및 리툭시맙-MicAbody의 적정 2시간 후 시험관내 칼세인 방출 검정에서의 MicAbody의 다양한 농도를 사용하여 달성된 세포용해(% 최대; y축)를 예시하는 막대 그래프이다. 각각의 작제물에 대해, 세포용해의 % 최대는 0 nM(제1 막대), 0.008 nM(제2 막대), 0.04 nM(제3 막대), 0.2 nM(제4 막대), 1 nM(제5 막대) 및 5 nM(제6 막대) MicAbody에 대해 예시된다. Rit.HCd.LC.S3(APTSSSGGGGS(서열 번호 10) 링커에 의해 연결된 경쇄에서 A1-A2 도메인을 포함)은 링커와 무관하게 GGGS(서열 번호 14) 링커를 갖는 버전보다 더 양호하게 그리고 중쇄에 융합된 A1-A2 도메인을 갖는 작제물보다 더 양호하게 수행되었다.

도 18은 항체의 경쇄에 융합된 서열 번호 30(U2S3) 또는 서열 번호 11(U2S3(NQ))의 A1-A2 도메인을 포함하는 리툭시맙 융합 단백질을 사용한 iNKG2D.YA 포획을 예시하는 선 그래프이다. 서열 번호 30과 관련하여 위치 40 및 54에서의 치환을 갖는 A1-A2 도메인은 서열 번호 30의 A1-A2 도메인과 유사하게 수행되었다.

도 19는 야생형 NKG2D에 결합하기 위해 항체의 경쇄에 융합된 서열 번호 30(U2S3) 또는 서열 번호 11(U2S3(NQ))의 A1-A2 도메인을 포함하는 리툭시맙("Rit") 융합 단백질의 감소된 능력을 예시하는 선 그래프이다. "Rit.P"는 A1-A2 도메인에 융합되지 않은 리툭시맙 모 항체를 언급한다. "Rit.U2wt"는 야생형 NKG2D에 결합하는 것으로 예상된 야생형 ULBP2 도메인에 융합된 리툭시맙을 언급한다. "Rit.S3" 및 "Trast.S3"은 각각 U2S3 도메인(서열 번호 30)에 융합된 리툭시맙 또는 트라스투주맙을 언급한다. "Rit.NQ"는 U2S3(NQ)(서열 번호 11)에 융합된 리툭시맙을 언급한다. U2S3 도메인으로의 NQ 돌연변이의 도입은 작제물의 직각성에 영향을 미치지 않았고, 야생형 NKG2D의 결합과 관련하여 회귀가 없었다(즉, 작제물은 야생형 NKG2D에 결합하지 않았다).

도 20은 20:1의 E:T에서의 iNKG2D-CAR CD8+ T 세포 및 라모스 표적 세포와의 공동배양 및 리툭시맙-MicAbody의 적정 2시간 후 시험관내 칼세인 방출 검정에서의 MicAbody의 다양한 농도를 사용하여 달성된 세포용해(% 최대; y축)를 예시하는 막대 그래프이다. 각각의 작제물에 대해, 세포용해의 % 최대는 0 nM(제1 막대), 0.008 nM(제2 막대), 0.04 nM(제3 막대), 0.2 nM(제4 막대), 1 nM(제5 막대) 및 5 nM(제6 막대) MicAbody에 대해 예시된다. Rit.S3(서열 번호 30의 A1-A2 도메인을 포함) Rit.S3.NQ(위치 40 및 54에서 글루타민을 포함하는 서열 번호 30의 A1-A2 도메인을 포함), Rit.S3.NQ.AYT(위치 40 및 54에서 글루타민 및 위치 82에서 알라닌을 포함하는 서열 번호 30의 A1-A2 도메인을 포함) 및 Rit.S3.NQ.QYT(위치 40 및 54에서 글루타민 및 위치 82에서 글루타메이트를 포함하는 서열 번호 30의 A1-A2 도메인을 포함)을 시험하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 개시내용은 항체(또는 다른 항원 결합 단백질) 및 비천연 NKG2D 리간드의 A1-A2 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 비천연 NKG2D 리간드는 비천연 NKG2D 수용체에 선택적으로 결합한다. 본 개시내용의 다양한 양태에서, 융합 단백질은 A1-A2 도메인이 결합하는 비천연 NKG2D 수용체를 디스플레이하는 CAR-T 세포와 연결되어 사용되고, 이로써 현재의 CAR-T 세포 기반 치료제의 많은 단점을 극복하는 맞춤화된 CAR-T 세포 치료제를 전달하기 위한 강력한 시스템을 제공한다. 현재 이용 가능한 CAR-T 세포 기반 치료제와 달리, 본 개시내용의 융합 단백질 및 시스템은 T 세포 활성을 선택 항원에 지시하기 위한 유연한 표적화, 항원 손실 관련된 재발에 대한 가능성을 감소시키기 위한 다중화 역량, CAR-T 세포의 차등적 관여를 위한 용량 제어 및 CAR 발현 세포에 대한 조절제의 선택적 전달이 가능하게 한다.

[0019] 본 개시내용은 특히 유리한 특성을 갖는 비천연 NKG2D 리간드의 A1-A2 도메인을 제공한다. NKG2D는 자연 살해(NK) 세포, 일부 골수성 세포 및 소정의 T 세포에서 II형 동종이합체 통합 막 단백질로서 발현된 활성화 수용체

이다. 인간 NKG2D는 다양한 스트레스에 반응하여 세포의 표면에서 상향조절된 8개의 구별되는 자연 MIC 리간드(MICA, MICB, ULBP1 내지 ULBP6)를 갖고, 이들의 차등적 조절은 최소 측부 손상으로 넓은 범위의 응급 신호에 반응하는 수단을 면역계에 제공한다. Groh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 12445-12450 (1996); Zwirner et al., Hum. Immunol. 60, 323-330 (1999); 및 Spies et al., Nat. Immunol. 9, 1013-1015 (2008). NKG2D 엑토도메인, 몇몇 가용성 리간드 및 엑토도메인에 대한 리간드의 결합된 복합체의 구조가 풀려서 달리 이질성인 아미노산 동일성을 갖는 리간드의 구조적으로 보존된 A1-A2 도메인을 관여시키는 동종이합체 계면에서 안장 유사 홈(saddle-like groove)을 밝혀냈다. Li et al., Nat. Immunol. 2, 443-451 (2001); Radaev et al., Immunity 15, 1039-1049 (2001); Zuo et al., Sci Signal 10, (2017); 및 McFarland et al., Immunity 19, 803-812 (2003). 본 개시내용의 "A1-A2 도메인"은 자연 발생 A1-A2 도메인이 아니고, NKG2D 엑토도메인의 돌연변이된 버전에 결합하고 야생형 NKG2D(wtNKG2D)에 결합하지 않는(또는 생체내 생물학적으로 관련되는 방식으로 적어도 wtNKG2D에 결합하지 않는) 아미노산 서열을 포함한다. 실시예에 기재된 U2S3 도메인에 기초한 이직각 A1-A2 도메인(서열 번호 30)은 유리한 특성으로 독특한 글리코실화 패턴을 허용한다. 다양한 양태에서, 본 개시내용은 서열 번호 30과 적어도 95% 동일성(예를 들면, 서열 번호 30과 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 적어도 99% 동일성 또는 100% 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 A1-A2 도메인 펩타이드를 제공하고, 펩타이드는 서열 번호 30의 위치 40, 54 및/또는 84 중 하나 이상에서 알라닌 또는 글루타민을 포함한다. 이 점에서, A1-A2 도메인은 위치 40에서의 글루타민, 위치 40에서의 알라닌, 위치 54에서의 글루타민, 위치 54에서의 알라닌, 위치 40에서의 알라닌 및 위치 54에서의 글루타민(선택적으로 위치 84에서의 글루타민 또는 알라닌에 의해), 위치 40에서의 알라닌 및 위치 54에서의 알라닌(선택적으로 위치 84에서의 글루타민 또는 알라닌에 의해), 위치 40에서의 글루타민 및 위치 54에서의 알라닌(선택적으로 위치 84에서의 글루타민 또는 알라닌에 의해), 위치 40에서의 글루타민 및 위치 54에서의 글루타민(선택적으로 위치 84에서의 글루타민 또는 알라닌에 의해), 위치 40에서의 알라닌 및 위치 84에서의 글루타민, 위치 40에서의 알라닌 및 위치 84에서의 알라닌, 위치 40에서의 글루타민 및 위치 84에서의 알라닌, 위치 40에서의 글루타민 및 위치 84에서의 글루타민, 위치 54에서의 알라닌 및 위치 84에서의 글루타민, 위치 54에서의 알라닌 및 위치 84에서의 알라닌, 위치 54에서의 글루타민 및 위치 84에서의 알라닌 또는 위치 54에서의 글루타민 및 위치 84에서의 글루타민을 포함할 수 있고, 그 위치는 서열 번호 30 내의 아미노산 위치와 관련된다. 예를 들면, 본 개시내용은 서열 번호 30과 적어도 95% 동일성을 갖는 A1-A2 도메인 펩타이드를 제공하고, 펩타이드는 서열 번호 30의 서열과 관련하여 위치 40 및 54에서의 글루타민 잔기를 포함한다. 선택적으로, A1-A2 도메인은 서열 번호 30의 위치 84에서의 글루타민을 포함한다. 대안적으로, A1-A2 도메인은 다양한 양태에서 서열 번호 30의 위치 84에서의 알라닌을 포함할 수 있다. 다양한 양태에서, A1-A2 도메인 펩타이드는 서열 번호 11, 서열 번호 31 또는 서열 번호 32를 포함한다(또는 이들로 이루어진다). 본원에 추가로 설명된 것과 같이, 본 개시내용의 임의의 A1-A2 도메인은 예를 들면 표적 항원 및 돌연변이된 NKG2D 엑토도메인 둘 다에 결합하는 이중특이적 융합 단백질을 생성하기 위해 항체(또는 다른 항원 결합 단백질)의 중쇄 또는 경쇄에 융합될 수 있다. 이 형식(A1-A2 도메인에 융합된 항체)은 "MicAbody"로도 지칭된다.

[0020] 본 개시내용은 (i) 서열 번호 1의 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄 및 (ii) 서열 번호 8의 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 융합 단백질을 제공한다. 경쇄는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 A1-A2 도메인에 C-말단에서 융합된다. 본 항체 융합 단백질의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 CD20에 결합하는 키메라 단일클론 항체(IgG1 카파 면역글로블린)인 리툭시맙의 것이고, 표면 항원은 B 세포에서 디스플레이된다. 리툭시맙은 예를 들면 미국 특허 제5,736,137호; 제5,776,456호; 및 제5,843,439호에 추가로 기재되어 있다. B 세포는 소정의 자가면역 질환 및 암의 발병에서 역할을 하고, 다양한 장애에서 유리한 효과를 달성하도록 B 세포를 표적화하고 사멸하는 데 있어서 효과적이다. 예를 들면, 리툭시맙은 암, 예컨대 백혈병(예를 들면, 모발세포 백혈병(HCL) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)) 및 림프종(예를 들면, 비호지킨 림프종(NHL, 예컨대 미만성 대형 B-세포 림프종(DLBCL), 버킷 림프종(BL), 외투 세포 림프종(MCL) 및 소포성 림프종)을 치료하는 데 있어서 효능을 나타냈다. 리툭시맙은 또한 자가면역 장애, 예컨대 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루프스(SLE), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증 및 자가면역 연관된 빈혈을 치료하는 데 있어서 효능을 입증하였다. 리툭시맙은 또한 육아종증 다발혈관염(GPA)(베게너 육아종증) 및 현미경적 다발혈관염(MPA)의 치료에 대해 허가되었다.

[0021] 본원에 사용된 것과 같은 "항체"의 용어는 전장 중쇄 및 경쇄를 갖는 면역글로불린을 지칭한다. 본 개시내용의 항체는 4개의 고도로 보존된 하위종류(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)를 포함하고, 이의 불변 영역(예를 들면, 힌지 및/또는 CH2 도메인)이 일반적으로 다른 IgG 항체이다. 선택적으로, 본 개시내용의 항체 융합 단백질은 불변 영역이 (예를 들면, D265A/D297A 치환을 Fc 도메인으로 도입함으로써) 항체 의존적 세포 세포융해(ADCC)를 촉발하

는 항체의 능력을 감소시키거나 불활성화하도록 변형될 수 있는 IgG1 항체를 포함한다. 다양한 양태에서, 항체 융합 단백질의 중쇄는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 불변 도메인을 포함한다. 본 개시내용은 또한 중쇄가 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 불변 영역을 포함하는 항체 융합 단백질을 고려한다. 본 개시내용은 또한 중쇄가 서열 번호 3과 적어도 90% 동일한 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열 서열을 포함하지만 서열 번호 3 내의 위치 234, 235 및 329에서의 아미노산이 알라닌인 항체 융합 단백질을 고려한다. 일부 양태에서, 항체 융합 단백질은 서열 번호 7의 중쇄를 포함한다. 이 점에서, 본 개시내용은 서열 번호 21의 경쇄 및 서열 번호 7의 중쇄를 포함하는 항체 융합 단백질을 제공한다. 다른 양태에서, 항체 융합 단백질은 서열 번호 6의 중쇄를 포함한다. 이 점에서, 본 개시내용은 서열 번호 21의 경쇄 및 서열 번호 6의 중쇄를 포함하는 항체 융합 단백질을 고려한다.

[0022] 본 개시내용의 다양한 양태에서, 항체의 경쇄는 서열 번호 8의 가변 영역 서열을 포함한다. 선택적으로, 경쇄는 서열 번호 9의 아미노산 서열(또는 서열 번호 9와 적어도 약 90% 동일한 또는 95% 동일한 서열)을 포함하는 불변 영역을 포함한다. 따라서, 다양한 양태에서, 본 개시내용의 항체 융합 단백질의 경쇄는 서열 번호 8 및 서열 번호 9(서열 번호 21)를 포함한다.

[0023] 경쇄는 선택적으로 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 NKG2D 리간드 A1-A2 도메인에 C-말단에서 융합된다. 하기에 더 자세히 설명된 것처럼, 경쇄 아미노산 서열의 C 말단에 대한 A1-A2 도메인의 융합은 본 개시내용의 항체의 중쇄에서의 A1-A2 도메인의 융합과 비교하여 더 우수한 활성을 생성시켰다. 본원에 기재된 항체 융합 단백질에서의 도메인의 배치의 더 우수한 특성은 실시예에 기재된 연구 전에 예측될 수 없었다.

[0024] 다양한 양태에서, A1-A2 도메인은 링커를 통해 경쇄의 C-말단에 융합되고, 선택적으로 링커는 서열 번호 10을 포함한다(또는 이것으로 이루어진다). 하기에 더 자세히 설명된 것처럼, 서열 번호 10의 링커는 B 세포 세포독성의 면에서 다른 항체 융합 작제물을 예상치 못하게 능가한 MicAbody를 제조하였다. 본 개시내용의 예시적인 양태에서, 본 개시내용의 항체 융합 단백질은 서열 번호 8의 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄 및, 선택적으로 서열 번호 9의 경쇄 불변 영역을 포함하는, 서열 번호 10의 링커 서열을 통해 경쇄의 C-말단에 융합된 서열 번호 11의 A1-A2 도메인을 포함한다. 이 점에서, 본 개시내용의 다양한 양태에서, 항체 융합 단백질의 경쇄는 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함한다.

[0025] 본 개시내용은 서열 번호 13의 경쇄 및 서열 번호 7의 중쇄를 포함하는 항체 융합 단백질을 제공한다. 본 개시내용은 또한 서열 번호 13의 경쇄 및 서열 번호 6의 중쇄를 포함하는 항체 융합 단백질을 제공한다. 항체 및 항체 융합 단백질을 제조하는 방법은 당해 분야에 알려져 있고, 예를 들면, 하기 실시예에 기재되어 있다.

[0026] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 항체 융합 단백질을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 항체 융합 단백질의 적응증 및 용법에 대한 설명서 및 서면 정보를 추가로 포함할 수 있다. 선택적으로 사용을 위한 적합한 설명서와 함께 항체 융합 단백질을 포함하는 주사기, 예를 들면, 단일 사용 또는 프리필드 주사기, 멸균 밀봉 용기, 예를 들면 바이알, 병, 용기 및/또는 키트 또는 패키지가 또한 고려된다. 추가의 양태에서, 본 개시내용은 (a) 본원에 기재된 항체 융합 단백질을 포함하는 물질의 조성물; (b) 상기 조성물을 함유하는 용기; 및 (c) 질환 또는 장애(예를 들면, 암)의 치료에서의 상기 항체 융합 단백질의 사용에 관한 상기 용기에 부착된 라벨 또는 상기 용기에 포함된 패키지 인서트를 포함하는 제조 물품 또는 단위 용량 형태를 제공한다. 항체 융합 단백질(및 다양한 양태에서 본원에 기재된 것과 같은 CAR을 발현하는 포유류 세포) 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 조성물이 본원에 또한 제공된다. 예시적인 양태에서, 조성물은 멸균 조성물이다.

[0027] 본 개시내용은 CD20 디스플레이 세포를 표적화하는 세포 치료 요법의 성분을 포함하는 시스템 또는 키트를 추가로 제공한다. 다양한 양태에서, 제1 성분은 본원에 기재된 항체 융합 단백질, 즉 CD20 및 NKG2D 엑토도메인을 포함하는 CAR 둘 다에 결합하는 이중특이적, 항체 기반 융합 단백질이다. 제2 성분은 자체가 불활성인 키메라 항원 수용체(CAR)(즉, 비아밍된 CAR-T)를 발현하도록 유전 조작된 포유류 세포(예를 들면, 인간 세포)이다. 다양한 양태에서, 포유류 세포는 림프구 또는 대식세포, 예를 들면, 인간 림프구(예컨대, 인간 T 세포) 또는 인간 대식세포이다. 다양한 양태에서, 제2 성분은 인간 NK(자연 살해) 세포(예를 들면, 자가 인간 NK 세포)이고; T 세포와 관련하여 본원에서의 개시내용은 또한 NK 세포에 적용된다. 키트는 CAR을 발현하는 포유류 세포를 포함하는 하나 이상의 용기 및 항체 융합 단백질을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 키트는 본원에 기재된 성분의 적응증 및 용법에 대한 설명서 및 서면 정보를 추가로 포함할 수 있다.

[0028] "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 표적 세포, 예컨대 종양 세포에 의해 발현된 항원을 인식하고 이것에 결합하도록 조작된 인공 면역 세포 수용체를 지칭한다. 일반적으로, CAR은 T 세포에 대해 설계되고, T 세포 수용체

(TCR) 복합체의 신호전달 도메인 및 항원 인식 도메인(예를 들면, 항체의 단일 사슬 단편(scFv) 또는 다른 항체 단편)의 키메라이다. 예를 들면, Enblad et al., Human Gene Therapy. 2015; 26(8):498-505를 참조한다. T 세포 및 NK-세포는 신규의 항원 특이성을 부여하는 이의 표면 막관통 신호전달 수용체에서 직접적으로 그리고 안정하게 발현하는 유전자 운반 기법을 사용하여 변형될 수 있다. 예를 들면, Gill & June, Immunological Reviews 2015. Vol. 263: 68-89; Glienke et al., Front. Pharmacol. doi: 10.3389/fphar.2015.00021을 참조한다. 각각 상이한 성분을 함유하는 CAR의 다양한 형식이 있다. "1세대" CAR은 항원 결합 도메인을 힌지 및 막관통 도메인을 통해 T-세포 수용체의 CD3제타 세포내 신호전달 도메인에 연결시킨다. "2세대" CAR은 공동자극 신호를 공급하도록 추가의 도메인, 예를 들면, CD28, 4-1BB(41BB) 또는 ICOS를 혼입한다. "3세대" CAR은 TCR CD3제타 사슬과 융합된 2개의 공동자극 도메인을 함유한다. 3세대 공동자극 도메인은 예를 들면 CD3제타, CD27, CD28, 4-1BB, ICOS 또는 OX40의 조합을 포함할 수 있다. 이렇게 작제된 CAR은 예를 들면 내인성 T 세포 수용체와 유사한 방식으로 그러나 주요 조직적합성 복합체(MHC)와 독립적으로 표적화된 항원에 결합 시 T 세포 활성화를 촉발할 수 있다.

[0029] 본 개시내용의 키메라 항원 수용체는 자연 리간드를 관여시킬 수 없는 돌연변이된 NKG2D 엑토도메인을 CAR의 "항원 결합 도메인"으로서 포함한다. NKG2D 엑토도메인의 돌연변이는 예를 들면 Culpepper et al., Mol. Immunol. 48, 516-523 (2011) 및 실시예에 추가로 기재되어 있다. 돌연변이된 NKG2D는 본원에서 "iNKG2D"로서 지칭된다. 다양한 양태에서, iNKG2D 도메인은 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함한다. 엑토도메인은 바람직하게는 공동자극 분자(예를 들면, 4-1BB 또는 CD28)의 막관통 도메인, 세포내 도메인 및/또는 T 세포 수용체 세포내 신호전달 도메인과 연관된다. 예를 들면, 본 개시내용의 예시적인 양태에서, iNKG2D 엑토도메인은 CD8a 힌지/막관통 도메인(예를 들면, 서열 번호 16의 서열을 포함하거나 이것으로 이루어짐), 4-1BB 도메인(예를 들면, 서열 번호 17의 서열을 포함하거나 이것으로 이루어짐) 및/또는 CD3 도메인(예를 들면, 서열 번호 18의 서열을 포함하거나 이것으로 이루어짐)에 융합된다. 다양한 양태에서, CAR은 이들 성분(예를 들면, 서열 번호 15-18 또는 서열 번호 19)의 모두를 포함한다.

[0030] CAR이 불활성이므로, CAR은 항원을 디스플레이하는 표적 세포와 생산적 면역학적 시냅스를 오직 형성하고 이것이 이의 수용체에 비공유로 결합된 이의 동족 항체 융합 단백질에 의해 "아밍"될 때 세포용해를 활성화할 수 있다. CAR 발현 세포는 본원에서 "전환 가능한 CAR"로 지칭된다. 상기 시스템의 예는 도 7a에 예시되어 있다. 본원에 기재된 항체 융합 단백질은 오직 CD20을 발현하는 세포의 존재 하에 iNKG2D-CAR 발현 세포(예를 들면, T 세포)를 활성화할 수 있다. 다른 항원(즉, 상이한 세포 표면 항원에 결합하는 상이한 가변 영역을 갖는 항체 융합 단백질)을 표적화하는 추가의 MicAbody와 사용될 때, 전환 가능한 CAR-T 세포는 세포용해를 매개하도록 동시에 또는 순차적으로 상이한 항원으로 표적화될 수 있고; 이 접근법은 다수의 상이한 자가 CAR 세포를 생성하고 확장하고 점적하지 않으면서 표적 항원 소실의 결과로서 예를 들면 종양 저항 및 회피를 해결하는 것을 도울 수 있다. 이 고도의 모듈식 전환 가능한 CAR 시스템은 입양 세포 치료제의 가능성을 확장시키고, 중증 전신 독성, 항원 회피 및 현재의 CAR-T 및 CAR-NK 세포 치료제의 제한된 및 비제어된 지속을 포함하는 기존의 세포 치료제의 많은 단점을 극복한다. 추가적으로, 단일 CAR이 다양한 맥락에서 사용될 수 있으므로(표적화 특이성이 CAR이 아니라 투여된 항체 융합 단백질에 의해 결정되므로), 세포 제조는 단순해지고 덜 비싸다.

[0031] CAR 세포 치료제는 표면에서 특정 CAR(들)을 제조할 수 있도록 조작된 대상체 또는 환자 자체의 면역 세포를 이용하는 면역치료제일 수 있다. 일부 상황에서, 세포(예를 들면, T 세포)는 성분채집술을 통해 대상체 또는 환자의 신체로부터 수집된다. 신체로부터 수집된 세포(예를 들면, T 세포)는 이후 표면에서 특정 키메라 항원 수용체를 제조하도록 유전 조작된다. CAR 발현 세포는 실험실에서의 성장에 의해 확장되고, 이후 대상체 또는 환자, 또는 또 다른 대상체 또는 환자에게 투여된다. CAR 발현 세포는 표면에서 표적화된 항원을 발현하는 세포(예를 들면, 암 세포)를 인식하고 사멸할 것이다. 세포는 치료제의 수혜자인 대상체로부터 단리될 수 있거나 치료제의 궁극적인 수혜자가 아닌 공여자 대상체로부터 단리될 수 있다. 다양한 양태에서, 세포는 자가 CD4+ 및 CD8+ T 세포이다.

[0032] 본 개시내용은 CD20을 발현하는 세포와 연관된 질환 또는 장애, 예컨대 암(CD20-양성 암)을 위해 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 상기 방법은 본원에 기재된 CAR 발현 세포(예를 들면, 본원에 기재된 iNKG2D 기반 CAR을 발현하는 T 세포 또는 NK 세포)를 대상체에게 투여하는 단계 및 본원에 기재된 항체 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 암의 예는 백혈병 및 림프종, 예컨대 모발 세포 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 비호지킨 림프종(예를 들면, 미만성 대형 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 외투 세포 림프종 및 소포성 림프종)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0033] 본원에 사용된 것과 같이, "치료한다"의 용어뿐만 아니라 이것과 관련된 단어는 반드시 100% 또는 완전한 치료

또는 관해를 암시하지는 않는다. 오히려, 당업자가 잠재적인 유리한 또는 치료학적 효과를 갖는 것으로 인식하는 치료의 변하는 정도가 있다. 이 점에서, 질환 또는 장애를 치료하는 방법은 치료의 임의의 양 또는 임의의 수준을 제공할 수 있다. 더욱이, 상기 방법에 의해 제공된 치료는 치료되는 질환의 하나 이상의 상태 또는 증상 또는 징후의 치료를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 개시내용의 치료 방법은 질환의 하나 이상의 증상을 억제할 수 있다. 또한, 본 개시내용의 방법에 의해 제공된 치료는 질환의 진행을 느리게 하는 것을 포함할 수 있다.

[0034] 암에 대한 치료는 임의의 다수의 방식에 의해 결정될 수 있다. 대상체의 웰빙의 개선이 고려된다(예를 들면, 본원에 기재된 임의의 매개변수의 적어도 또는 약 10% 감소, 적어도 또는 약 20% 감소, 적어도 또는 약 30% 감소, 적어도 또는 약 40% 감소, 적어도 또는 약 50% 감소, 적어도 또는 약 60% 감소, 적어도 또는 약 70% 감소, 적어도 또는 약 an 80% 감소, 적어도 또는 약 90% 감소 또는 적어도 또는 약 95% 감소). 예를 들면, 치료학적 반응은 질환에서의 하기 개선 중 하나 이상을 지칭할 것이다: (1) 신생물 세포의 수의 감소; (2) 신생물 세포 사멸의 증가; (3) 신생물 세포 생존의 억제; (5) 종양 성장 또는 새로운 병변의 출현의 억제(즉, 약간의 정도로 느리게 하는 것, 바람직하게는 정지시키는 것); (6) 종양 크기 또는 부담의 감소; (7) 임상적으로 검출 가능한 질환의 부재, (8) 암 마커의 수준의 감소; (9) 증가된 환자 생존율; 및/또는 (10) 질환 또는 병태와 연관된 하나 이상의 증상(예를 들면, 통증)으로부터의 약간의 경감. 게다가, 치료 효능은 또한 다른 면역요법 치료 또는 화학요법에 대한 반응성의 면에서 규정될 수 있다. 다양한 양태에서, 본 개시내용의 방법은 대상체에서 치료를 모니터링하는 것을 추가로 포함한다.

[0035] 대상체는 비제한적인 예로서 쥐목(Rodentia) 목의 포유류, 예컨대 마우스 및 햄스터 및 중치류(Logomorpha) 목의 포유류, 예컨대 토끼, 고양이과(고양이) 및 개과(개)를 포함하는 식육류(Carnivora) 목으로부터의 포유류, 소과(소) 및 돼지과(돼지)를 포함하는 우제류(Artiodactyla) 목으로부터의 포유류 또는 말과(말)를 포함하는 기제류(Perssodactyla) 목의 포유류를 포함하는 포유류이다. 일부 양태에서, 포유류는 영장류 목, 광비원류(Ceboid) 목 또는 원원류(Simoid) 목(원숭이) 또는 유인원(Anthropoid) 목(인간 및 유인원)이다. 일부 양태에서, 포유류는 인간이다. 치료학적 조성물은 비경구, 국소, 경구, 척추강내 또는 국소 투여를 포함하는 임의의 다양한 경로를 사용하여 대상체에게 전달될 수 있다. 실제로, 조성물은 피하로, 피내로, 진피내로, 정맥내로, 동맥내로, 종양내로, 비경구로, 복강내로, 근육내로, 안와내로, 골내로, 경막외로, 경막내로, 종양내로 및 기타에 의해 투여될 수 있다.

[0036] 본 개시내용은 또한 (i) 본원에 기재된 항체 융합 단백질의 경쇄를 암호화하는 핵산 분자(즉, 단리된 핵산) 및 (ii) 본원에 기재된 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 핵산 분자(즉, 단리된 핵산)뿐만 아니라 (i) 및/또는 (ii)를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 A1-A2 도메인 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 제공한다. 본 개시내용의 핵산은 본원에 개시된 임의의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산뿐만 아니라 본 개시내용의 핵산(즉, 서열 목록에 제시된 핵산 서열)과 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 약 90%, 더 바람직하게는 적어도 약 95% 및 가장 바람직하게는 적어도 약 98% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 본 개시내용의 핵산은 본원에 개시된 임의의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산뿐만 아니라 본 개시내용의 아미노산 서열(즉, 서열 목록에 제시된 아미노산 서열)과 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 약 90%, 더 바람직하게는 적어도 약 95% 및 가장 바람직하게는 적어도 약 98% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함한다. 본 개시내용의 핵산은 또한 상보성 핵산을 포함한다. 일부 경우에, 서열은 정렬될 때 완전히 상보성(미스매치 무)일 것이다. 다른 경우에, 서열에서의 약 20% 이하의 미스매치가 있을 것이다. 본 개시내용은 본 개시내용의 항체 융합 단백질의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다.

[0037] 본 개시내용의 핵산은 부착된 서열 또는 요소의 복제를 불러오도록 또 다른 유전 서열 또는 요소(DNA 또는 RNA 중 어느 하나)가 삽입될 수 있는 발현 벡터, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 백미드(bacmid), 파지, 인공 염색체(BAC, YAC) 또는 바이러스로 클로닝될 수 있다. 일부 실시형태에서, 발현 벡터는 구성적으로 활성인 프로모터 분절(예컨대, 비제한적인 예로서 CMV, SV40, 연장 인자 또는 LTR 서열) 또는 유도성 프로모터 서열, 예컨대 스테로이드 유도성 pIND 벡터(Invitrogen)를 함유하고, 여기서 핵산의 발현이 조절될 수 있다. 본 개시내용의 발현 벡터는 조절 서열, 예를 들면, 내부 리보솜 진입 부위를 추가로 포함할 수 있다. 세포로부터의 관심 있는 폴리펩타이드의 더 손쉬운 단리를 위해 발현된 폴리펩타이드가 재조합 숙주 세포에 의해 분비될 수 있도록 분비 신호 펩타이드 서열은 또한 선택적으로 발현 벡터에 의해 암호화될 수 있다. 발현 벡터는 예를 들면 형질주입에 의해 세포로 도입될 수 있다.

[0038] (선택적으로 발현 벡터에 함유된) 핵산 분자를 포함하는 재조합 숙주 세포가 또한 제공된다. 재조합 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들면 이. 콜라이 세포 또는 진핵 세포, 예를 들면 포유류 세포 또는 효모 세포일 수 있다.

효모 세포는 예를 들면 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포를 포함한다. 포유류 세포는 예를 들면 VERO, HeLa, 중국 햄스터 난소(CHO), W138, 베이비 햄스터 신장(BHK), COS-7, MDCK, 인간 배아 신장 계통 293, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 및 COS 세포를 포함한다. 본 개시내용의 재조합 단백질 생성 세포는 또한 예를 들면 스포돕테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포와 같은 알려진 임의의 곤충 발현 세포 계통을 포함한다. 일 실시형태에서, 세포는 포유류 세포, 예컨대 CHO 세포이다.

[0039] 항체 융합 단백질을 제조하는 방법은 본 개시내용에 의해 추가로 제공된다. 상기 방법은 항체 융합 단백질의 경쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자 및 항체 융합 단백질의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 세포(단리된 숙주 세포)를 배양하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 항체 융합 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 A1-A2 도메인 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 A1-A2 도메인 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 세포(단리된 숙주 세포)를 배양하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 (선택적으로 또 다른 펩타이드에 융합된) 도메인 펩타이드를 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 재조합 단백질, 예컨대 항체 단백질을 생성하기 위한 배양 조건 및 방법은 당해 분야에 알려져 있다. 유사하게, 단백질 정제 방법은 당해 분야에 알려져 있고, 세포 배양 배지로부터의 재조합 단백질의 회수를 위해 본원에 이용된다. 일부 양태에서, 단백질 및 항체 정제를 위한 방법은 여과, 친화도 칼럼 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 및 농축을 포함한다. 선택적으로, 상기 방법은 항체 융합 단백질 또는 A1-A2 도메인 펩타이드를 제형화하는 단계를 포함한다.

[0040] 상기에서 본 개시내용이 다양한 양태에서 A1-A2 도메인 펩타이드에 대한 융합 파트너로서 항-CD20 항체에 집중하지만, 본 개시내용의 A1-A2 도메인 펩타이드가 다른 항원 결합 펩타이드, 예컨대 다른 항체를 포함하는 다른 펩타이드에 융합될 수 있다고 이해될 것이다. 상기에서 본 개시내용은 항-CD20 항체의 구조와 관련하여 또한 다른 항원 결합 단백질 및 항체(즉, 다른 표적에 결합하는 항체)에 적용된다. 항체는 단일클론 항체 또는 다중특이적 항체(예를 들면, 이중특이적 항체)일 수 있다. A1-A2 도메인 펩타이드는 항체의 항원 결합 단편에 융합될 수 있다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편을 포함한다. 다른 항원 결합 단백질은 디아바디, 선형 항체, 단일-사슬 항체 분자 및 기타를 포함한다. 항원 결합 단백질은 임의의 적합한 항원, 예컨대 암 세포의 표면에서 발현된 항원을 표적화할 수 있다. 항원의 예는 CD19, BMCA, HER2, EGFR, EpCAM, CEA, BCMA, PSMA, CD19, CD20, CD22, CD33, CD37, CD38, CD123, CD276(B7-H3), GPC2, GPC3, GPRC5D, WT-1, NY-ESO-1, CLDN4, CLDN6, CLDN18.2, PSCA 및 TSPAN8을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 개시내용은 질환 또는 장애(예를 들면, 암)를 위해 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 상기 방법은 본원에 기재된 CAR 발현 세포(예를 들면, 본원에 기재된 iNKG2D 기반 CAR을 발현하는 T 세포 또는 NK 세포)를 대상체에게 투여하는 단계 및 본원에 기재된 A1-A2 도메인 펩타이드를 포함하는 항원-결합 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 암 등의 예는 상기에 기술되어 있고, 본 개시내용의 이 양태에 적용된다.

[0041] 하기 실시예는 본 발명을 예시하고 이의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하지 않도록 단지 주어진다.

[0042] 실시예

[0043] 본 실시예는 본 개시내용의 항체 융합 단백질 및 NKG2D 엑토도메인 포함 CAR-T 세포를 제조하는 예시적인 방법을 기재한다. 실시예는 서열 번호 15-18의 아미노산 서열을 포함하는 CAR-T 세포에 선택적으로 결합하는 리툭시맙으로부터의 가변 영역 서열 및 경쇄의 C-말단에 융합된 A1-A2 도메인을 포함하는 항체 융합 단백질의 능력 및 생체내 CD20 보유 암 세포를 사멸하는 항체 융합 단백질 및 CAR-T 세포 조합의 능력을 추가로 입증한다.

[0044] 재료 및 방법

[0045] *클로닝, 발현 및 정제:* NKG2D의 야생형 엑토도메인(UniProtKB P26718, 잔기 78-216; https://www.uniprot.org)은 짧은 인자 Xa 인식 가능한 Ile-Glu-Gly-Arg 링커(Fc-wtNKG2D)를 통한 인간 IgG1 Fc의 C-말단에 대한 융합으로서 발현되었다. 단일 Y152A 치환(iNKG2D.YA) 또는 이중 Y152A/Y199A 치환(iNKG2D.AF)을 포함하는 불활성 NKG2D 변이체는 PCR 매개된 돌연변이유발에 의해 생성되거나 합성된다(gBlocks, IDT). Fc-NKG2D 분자에 대한 DNA 작제물은 Expi293TM 세포(Thermo Fisher Scientific)에서 발현되고, 이합체성 분비된 단백질은 단백질 A 친화도 크로마토그래피(Pierce™ #20334, Thermo Fisher)에 의해 정제되었다. 용리된 재료를 규명하고, Superdex 200 칼럼(GE Life Sciences)을 사용하여 AKTA Pure 시스템에서 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 추가로 정제하였다. 정확하게 조립된, 크기 적절한 단량체성 재료를 인산염 완충 식염수(PBS)로 분별화하였

다.

[0046] 인간 MICA*001(UniProtKB Q29983, 잔기 24-205), MICB(UniProtKB Q29980.1, 24-205), ULBP1(UniProtKB Q9BZM6, 29-212), ULBP2(UniProtKB Q9BZM5, 29-212), ULBP3(UniProtKB Q9BZM4, 30-212), ULBP5(NCBI 수탁 NP_001001788.2, 29-212) 및 ULBP6(UniProtKB, 29-212)의 A1-A2 도메인을 C-말단 6x-His 태그에 의해 클로닝하였다. 단량체성 단백질을 Expi293TM 상청액 Ni-NTA 수지(HisPur™, Thermo Fisher)로부터 정제하고, 용리된 재료를 PD-10 Desalting Columns(GE Life Sciences)에서의 Sephadex G-25와 PBS로 교환하였다.

[0047] MIC 리간드 및 직각 변이체를 각각 APTSSSGGGGS 또는 GGGS 링커 중 어느 하나를 통해 인간 IgG1 항체의 카파 경쇄 또는 중쇄의 C-말단에 대한 융합으로서 결찰 독립적 어셈블리(HiFi DNA Assembly Master Mix, NEB #E2621)에 의해 클로닝하였다. 추가적으로, D265A/N297A(카밧 넘버링) 돌연변이를 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC) 기능을 제거하기 위해 모든 항체 및 MicAbody 클론의 중쇄의 CH2 도메인으로 도입하였다. 주어진 항체 클론에 대해 (포유류 발현 벡터 pD2610-V12(ATUM)에서) 중쇄 및 경쇄 플라스미드 DNA를 Expi293TM 세포로 공동형질주입하고 단백질 A에 의해 정제하였다. 임의의 생성된 단일클론 항체 융합에 대해, 적절한 VL 또는 VH 도메인을 카파 경쇄 또는 ADCC 결핍 IgG1 중쇄로 스와핑하였다.

[0048] *불활성 NKG2D 및 직각 리간드 조작:* ForteBio Octet 시스템(Pall ForteBio LLC)에 의한 생물층 간섭계(BLI)를 iNKG2D에 의해 야생형 MIC 리간드 결합의 소실을 검증하도록 실행하였다. Fc-wtNKG2D, Fc-iNKG2D.YA 또는 Fc-iNKG2D.AF를 항-인간 IgG Fc 포획(AHC) 바이오센서 팁에서 포획하고, 결합/해리 동역학을 단량체성 MIC-His 리간드의 적정 시리즈에서 모니터링하였다. 추가적으로, ELISA(효소 결합 면역흡착 검정) 결합 검정을 미량역가 플레이트에 코팅된 MICA-Fc, MICB-Fc, ULBP1-Fc, ULBP2-Fc, ULBP3-Fc 또는 ULBP4-Fc(R&D Systems), 바이오티닐화된 Fc-wtNKG2D 또는 Fc-iNKG2D.YA의 적정에 의해 수행하고, 스트렙타비딘-HRP(R&D Systems #DY998)에 의해 검출하고, 1-Step Ultra TMB ELISA(Thermo Fisher #34208)에 의해 전개시켰다.

[0049] iNKG2D.YA 또는 iNKG2D.AF 중 어느 하나에 대한 배타적 결합을 나타낸 직각 ULBP2 A1-A2 변이체를 확인하기 위해 파지 디스플레이를 이용하였다. 결합된 상태에서 자연 NKG2D 수용체45에서 Y152 위치에 밀접하게 가깝게 배치된 나선 2(잔기 74-78, 성숙 단백질에 기초한 넘버링) 또는 나선 4(잔기 156-160)의 코돈을 표적화하는, 합성 NNK(여기서, N = A/C/G/T 및 K = G/T, 중단 코돈 없이 모든 20개의 아미노산의 표시를 생성시킴) DNA 라이브러리를 생성하였다. Muller et al., PLoS Pathog. 6, e1000723 (2010). 나선 2 단독, 나선 4 단독 또는 조합을 탐구하는 라이브러리를 M13 파지의 pIII 소형 코트 단백질에 대한 융합으로서 클로닝하고, 돌연변이유발된 A1-A2 도메인 변이체를 디스플레이하는 파지 입자를 표준 방법에 따라 SS320 이. 콜라이 세포에서 제조하였다. 이들 A1-A2 파지 디스플레이를 바이오티닐화된 Fc-iNKG2D.YA 또는 Fc-iNKG2D.AF 단백질(EZ-Link™ NHS-Biotin Kit, Thermo Fisher #20217)에 의해 포획하고, 비바이오티닐화된 Fc-wtNKG2D 경쟁자의 증가하는 농도로 선택의 4회차를 통해 순환시킴으로써 농후화하였다. 양성 파지 클론은 스팟 ELISA에 의해 Fc-wtNKG2D에 대한 플레이트 결합된 Fc-iNKG2D.YA 또는 Fc-iNKG2D.AF에 대한 우선적 결합에 의해 검증되고, 결합된 파지는 바이오티닐화된 M13 파지 코트 단백질 단일클론 항체 E1(Thermo Fisher # MA1-34468)에 의해 검출된 후, 스트렙타비딘-HRP와 항온처리되었다.

[0050] 파지 변이체를 서열분석하고, 이후 추가의 검증을 위해 인간 IgG1 단일클론 항체 융합으로서 클로닝하였다. 직각 변이체의 선택도가 2가 MicAbody 형식에서 유지되는지를 확인하기 위해, ELISA 웰을 1 μg/mL의 Fc-wtNKG2D, Fc-iNKG2D.YA 또는 Fc-iNKG2D.AF로 코팅하고, 결합된 MicAbody를 HRP 접합된 마우스-항-인간 카파 사슬 항체(Abcam #ab79115)에 의해 검출하였다. 단량체성 및 항체 융합된 ULBP2 변이체 둘 다의 친화도는 또한 상기에 기재된 것과 같은 Octet 분석에 의해 결정되었다.

[0051] *전환 가능한 CAR-T 세포의 생성:* CD8α-사슬 신호 서열, NKG2D 변이체, CD8α 힌지 및 막관통 도메인, 4-1BB, CD3ζ 및 eGFP를 포함하는 인간 코돈 최적화된 DNA(GeneArt, Thermo Fisher)를 패키징 플라스미드 pCMVdR8.91 및 pMD2.G48과 함께 2세대 범열대적(Pantropic) VSV-G 위형화된 렌티바이러스 제조를 위해 클로닝하였다. $(GGGGS)_3$ 링커에 의해 분리된 리툭시맙의 VH 및 VL 도메인은 리툭시맙 scFv 기반 CAR(RITscFv-CAR)을 생성하기 위해 NKG2D 모듈에 대해 치환되었다. 제조된 렌티바이러스의 각각의 뱃지에 대해, $6x10^6$개의 Lenti-X 293T(Takara Bio #632180) 세포를 형질주입 전일에 10 cm 디시에 시딩하였다. 이후, 12.9 μg의 pCMVdR8.91, 2.5 μg의 pMD2.G 및 7.2 μg의 pHR-PGK-CAR 작제물을 720 μl의 Opti-MEMTM(Thermo Fisher #31985062)와 합하고, 이후 67.5 μl의 Fugene HD(Promega Corp. E2311)와 혼합하고, 짧게 와류시키고, 세포의 디시에 첨가 전에 10분 동안 실온에서 항온처리하였다. 2일 후, 상청액을 원심분리에 의해 수집하고, 0.22 μm 필터를 통해 통과시켰다. 5배 농축된 PEG-6000 및 NaCl을 8.5% PEG-6000(Hampton Research #HR2-533) 및 0.3 M NaCl의 최종 농

도를 달성하도록 첨가하고, 2시간 동안 얼음에서 항온처리하고, 이후 4℃에서 20분 동안 원심분리하였다. 농축된 바이러스 입자를 PBS의 0.01 부피에 재현탁시키고 -80℃에서 동결 저장하였다.

[0052] 1차 인간 T 세포 단리를 위해, 익명의 공여자로부터의 Human Peripheral Blood Leuko Pak(Stemcell Technologies #70500.1)를 PBS + 2% FBS의 동일 부피로 희석하고, 이후 실온에서 10분 동안 500 x g에서 원심분리하였다. 세포를 세포의 ml당 50 μl의 단리 칵테일을 첨가하고 실온에서 5분 동안 항온처리함으로써 PBS + 2% FBS 및 음성 선택(Stemcell EasySep™ Human CD4 T Cell Isolation Kit #17952 또는 EasySep Human CD8 T Cell Isolation Kit #17953)에 의해 농후화된 CD4+ 또는 CD8+ 세포 중에 $5x10^7$개의 세포/ml에서 재현탁시켰다. 후속하여, 50 μl의 RapidSpheres™를 세포의 ml당 첨가하고, 샘플을 (각각의 21 mL의 세포, 14 mL의 PBS에) 토핑하였다. 세포를 10분 동안 EasySEP™ 자석에 의해 단리한 후, 자기장을 유지시키면서 완충액을 제거하였다. 농후화된 세포를 새로운 완충액을 갖는 새로운 관으로 옮기고, 자석을 2회차의 농후화에 대해 재적용하고, 이후 세포를 재현탁시키고, 계수하고, 10-15$x10^6$개의 세포/초저온바이알(RPMI-1640, Corning #15-040-CV; 20% 인간 AB 혈청, Valley Biomedical #HP1022; 10% DMSO, Alfa Aesar #42780)에서 초저온보존하였다.

[0053] CAR-T 세포를 생성하기 위해, 초저온보존된 세포의 하나의 바이알을 해동하고, 세포에 대한 첨가의 시간에 첨가된 10 ml의 T 세포 배지 "TCM"(TexMACS 배지, Miltenyi 130-097-196; 5% 인간 AB 혈청, Valley Biomedical #HP1022; 10 mM 중화된 N-아세틸-L-시스테인; 1X 2-머캅토에탄올, Thermo Fisher #21985023, 1000X; 45 IUe/ml 인간 IL-2 IS "rhIL-2", Miltenyi #130-097-746)에 첨가하였다. 세포를 5분 동안 400 x g에서 원심분리하고, 이후 10 ml의 TCM에 재현탁시키고, 1$x10^6$/ml로 조정하고, 24웰 플레이트에서 1 ml/웰로 플레이팅하였다. 밤샘 휴식 후 20 μL의 Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28(Thermo Fisher #1131D)을 웰당 첨가하고, 24시간 동안 항온처리하였다. 농축된 렌티바이러스 입자(50 μL)를 웰당 첨가하고, 세포를 밤새 배양하고, 이후 첨가된 6 ml의 TCM을 갖는 T25 플라스크로 옮겼다. 확장의 3일 후, Dynabead를 제거하고(MagCellect 자석, R&D Systems MAG997), 형질도입 효율을 GFP에 대한 유세포분석법에 의해 평가하고, 5$x10^5$개의 세포/mL로 역희석하고, 세포 밀도를 이들이 4$x10^6$개의 세포/ml를 초과하지 않는 것을 보장하도록 매일 모니터링하였다. 필요할 때, iNKG2D의 표면 발현은 MicAbody를 사용하여 그리고 PE-항-인간 카파 사슬(Abcam #ab79113)로 검출하여 또는 리툭시맙-MicAbody를 Alexa Fluor 647(Alexa Fluor Protein Labeling Kit #A20173, Thermo Fisher)에 직접 접합함으로써 GFP 발현과 상관되었다. 전환 가능한 CAR-CD8 세포의 표면에서의 iNKG2D의 양은 Alexa Fluor 647 접합된 리툭시맙-MicAbody를 사용하여 정량화되고, 중앙치 형광 강도는 Quantum™ MESF 647 비드(Bangs Laboratories #647)와 상관되었다. 모든 유세포분석법을 Bio-Rad S3e Cell Sorter 또는 Miltenyi MACSQuant Analyzer 10 장치에서 수행하였다.

[0054] *세포주 및 시험관내 검정:* 라모스 인간 B 세포 림프종 세포(ATCC #CRL-1596)를 20 mM HEPES 및 10% FBS가 보충된 RPMI에서 배양하였다. 인간 Her2를 발현하도록 형질주입된 마우스 결장 암종 계통 CT26을 또한 사용하였다. 표적 항원이 발현된다는 것을 유세포분석법에 의해 검증하는 것을 제외하고 추가의 마이코플라스마 시험도 입증도 수행되지 않았다.

[0055] 칼세인 방출 검정을 위해, 종양 세포를 원심분리하고, 37℃에서 1시간 동안 1-2$x10^6$개의 세포/ml에서 T 세포 배지에서 4 mM 프로베네시드(MP Biomedicals #156370) + 25 μM 칼세인-AM(Thermo Fisher #C1430)에 재현탁시키고, 1회 세척하고, 8$x10^5$개의 세포/ml로 조정하였다. CD8+ CAR-T 세포를 펠릿화하고, 4$x10^6$개의 세포/mL에서 TCM 중의 60 IUe/ml IL-2와 4 mM 프로베네시드에 재현탁시키고, 이후 원하는 효과기:표적 비(형질도입 효율에 대해 비조정됨)에 따라 조정하였다. 25 μL의 표적 세포를 플레이팅한 후, 25 μL의 배지 또는 희석된 MicAbody를 플레이팅하였다. 이후, 100 μL의 배지(최소 용해), 배지 + 3% Triton-X 100(최대 용해) 또는 CAR-T 세포를 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 37℃에서 항온처리하였다. 세포를 펠릿화하고, 75 μL의 상청액을 검정 투명 바닥 플레이트로 옮기고, 형광(여기 485 nm, 방출 컷오프 495 nm, 방출 530 nm, 판독당 6개의 플래시)을 Spectramax M2e 플레이트 판독기(Molecular Devices)에서 획득하였다. 아밍된 전환 가능한 CAR-CD8+에 의한 실험을 위해, T 세포를 30분 동안 포화(5 nM) 또는 MicAbody의 적정으로 37℃에서 예비항온처리한 후 비결합된 MicAbody를 제거하기 위해 세척하고 칼세인 로딩된 표적 세포와 공동배양하였다.

[0056] T-세포의 표적 의존적 활성화를 정량화하기 위해, 칼세인 예비로딩이 생략됨을 제외하고 상기에 기재된 것처럼 실험을 설정하고, 검정을 IL-2 보충 없이 T 세포 배지에서 설정하였다. 24시간 공동배양 후, 상청액을

수확하고, 방출된 사이토카인의 양이 ELISA MAXTM 인간 IL-2 또는 인간 IFN-g 검출 키트(BioLegend #431801 및 #430101)에 의해 정량화될 때까지 -80℃에서 저장하였다.

[0057] MicAbody 결합 곡선 데이터를 ProMab Biotechnologies, Inc.(캘리포니아주 리치몬드)에 의해 생성하였다. $3x10^5$개의 전환 가능한 CAR-CD8+ 세포를 96웰 V-바닥 플레이트에서 플레이팅하고, 표지된 Alexa Fluor 647 표지된 리툭시맙.LC-U2S3 MicAbody와 200 nM에서 출발하는 적정 곡선으로 100 μL의 RPMI + 1% FBS의 최종 부피에서 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 이후, 세포를 세정하고, 중앙치 형광 강도를 유세포분석법에 의해 각각의 적정 점에 대해 결정하였다.

[0058] *동물 연구*: MicAbody의 혈청 수준의 PK 분석을 위해, 6주령 암컷 NSG 마우스(NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/SzJ, Jackson Laboratory # 005557)를 100 μg의 모 리툭시맙 항체(ADCC-결함), 리툭시맙의 중쇄 U2S3 융합체(리툭시맙.HC-U2S3) 또는 경쇄 융합체(리툭시맙.LC-U2S3)로 정맥내로(IV) 주사하였다. 수집된 혈청을 인간 항-리툭시맙 이디오타입 항체(HCA186, Bio-Rad Laboratories)에 의해 포획함으로써 ELISA로 처리하고, 래트-항-리툭시맙-HRP 항체(MCA2260P, Bio-Rad)로 검출하고, 혈청 수준을 리툭시맙 또는 Ritxumab-U2S3 표준 곡선을 사용하여 내삽하였다. U2S3-hFc-mutIL2의 PK 분석을 60 μg의 IP 주사에 의해 NSG 마우스에서 수행한 후, 정기적인 혈청 수집하였다. 샘플을 Fc-iNKG2D에 의해 포획하고 바이오티닐화된 래트-항-인간 IL-2 다중클론 항체(Peprotech #500-P22BT)에 의해 검출하여 ELISA에 의해 조사한 후, 스트렙타비딘-HRP와 항온처리하였다. 반감기를 비선형 회귀 분석을 사용하여 곡선의 β-단계에 기초하여 GraphPad Prism에서 계산하고, 플래토를 갖는 지수적 1단계 감쇄는 0으로 구속되었다.

[0059] 파종성 라지 B 세포 림프종 연구를 위해, 6주령 암컷 NSG 마우스를 루시올라 이탈리카(Luciola italica)(Perkin Elmer RediFect Red-FLuc-GFP #CLS960003)로부터 루시퍼라제를 구성적으로 발현하도록 안정하게 형질주입된 라지 세포(ATCC #CCL-86)로 IV 이식하였다. 치료 투여의 개시는 각각의 생체내 연구 도면에 자세히 기재되어 있다. 모든 실험에 대해, CD4 및 CD8 1차 인간 T 세포를 독립적으로 형질도입하고, 세포 유형 또는 CAR 작제물 사이의 형질주입 효율에 대해 정규화하지 않으면서 CD4:CD8 세포의 1:1 혼합물에서 확장 후 조합하고, 혼합물을 IV 주사 전 유세포분석법에 의해 검증하였다. MicAbody 또는 대조군 항체의 투여는 달리 규정되지 않는 한 복강내(IP) 경로에 의하고, 생물발광에 대한 생체내 영상화를 Xenogen IVIS 시스템(Perkin Elmer)에 의해 수행하였다. 동물을 APC 항-인간 CD3(클론 OKT3, #20-0037-T100, Tonbo Biosciences)에 의해 염색하고, GFP를 모니터링하고, 바이오티닐화된 항-인간 F(ab')2(#109-066-097, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)에 의해 세포 연관된 MicAbody 수준을 조사하여 유세포분석법에 의해 인간 T 세포 역학을 모니터링하기 위해 정기적으로 육종한 후, 스트렙타비딘-PE 검출(BD #554061)하였다. MicAbody 수준을 모니터링하기 위한 혈청 ELISA를 상기에 기재된 것처럼 수행하였다.

[0060] 피하 종양 연구를 위해 $1x10^6$개의 라지 세포를 6주령 암컷 NSG 마우스의 오른쪽 옆구리에서 마트리겔에서 이식하고, 종양이 70-100 mm^3에 도달할 때 치료를 개시하였다. 아밍된 전환 가능한 CAR-T 세포를 받은 코호트에 대해, 세포를 실온에서 30분 동안 생체외 5 nM 리툭시맙.LC-U2S3 MicAbody와 항온처리한 후, 세척하고 원하는 1:1 CD4:CD8 비 및 세포 농축을 달성하기 위해 최종 혼합하였다. 바이오티닐화된 항-인간 $F(ab')_2$ 항체에 의해 유세포분석법에 의해 아밍이 확인되고, GFP와 $F(ab')_2$ MFI 사이의 강한 상관관계를 밝혀냈다. 이들 마우스는 별개의 MicAbody 투여를 받지 않았다. 종양 부피(L x W x W x 0.5 = mm^3)를 추정하도록 캘리퍼 측정을 정기적으로 취하고, 말단 종양 질량을 칭량하였다.

[0061] *iNKG2D.AF-CAR 세포의 보체 매개된 절제:* 향상된 보체 결합 및 iNKG2D.AF를 발현하는 T 세포에 대한 표적화된 전달을 갖는 Fc 시약을 생성하기 위해, 직각 리간드를 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc를 갖는 GGGS 링커를 통해 인간 IgG1 Fc의 N-말단(U2R-Fc) 또는 C-말단(Fc-U2R) 중 어느 하나에 대한 융합체로서 클로닝하였다. 야생형 Fc 이외에, K326A/E333A21(카밧 넘버링, "AA") 및 S267E/H268F/S324T/G236A/I332E20("EFTAE") C1q-향상된 결합 돌연변이 세트를 탐구하였다. 모두를 Expi293T 세포에서 발현하고, 정제하고 상기에 기재된 것처럼 분별화하였다. Fc-NKG2D.AF에 의해 포획한 후, 1 μg/mL 농도에서의 U2R/Fc-변이체 융합체에 결합시키고, 인간-C1q 단백질(Abcam #ab96363)에서 적정하고, 이후 다중클론 양-항-C1q-HRP 항체(Abcam #ab46191)에 의해 검출함으로써 확증적 ELISA를 수행하였다. 보체 의존적 세포독성(CDC) 검정을 iQ Biosciences(캘리포니아주 버클리)에 의해 수행하였다. 간단히, NKG2D.AF-CAR 형질도입으로부터의 $5x10^4$개의 CD8+ 세포를 96웰 플레이트에서 플레이팅하고, 10%(v/v)의 최종 농도에서 정상 인간 혈청 보체(Quidel Corporation)의 존재 하에 3중으로 각각의

U2R/Fc-변이체 융합체의 연속 희석으로 3시간 동안 항온처리하였다. 이후, 세포를 수확하고, 5 μg/mL의 최종 농도에서 SYTOXTM Red 죽은 세포 염색(Thermo Fisher)에 의해 재현탁시키고, 유세포분석법에 의해 분석하였다. 세포독성에 대한 EC50 값은 비선형 회귀 곡선으로 일치화된 GraphPad 프리즘에서 계산되었다.

[0062] *iNKG2D-CAR을 발현하는 T 세포에 대한 돌연변이체-IL2의 전달:* U2S3 리간드에 단량체성인 시약을 생성하기 위해, IL-2Rα(mutIL2, R38A/F42K)의 결합의 불능을 갖는 돌연변이체 IL-2에 대한 단량체성(Heaton et al., Cancer Res. 53, 2597-2602 (1993); Sauve et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 4636-4640 (1991))은 여전히 혈청 안정성을 보유하고, 이종이합체성 Fc 전략이 이용되었다. Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285, 19637-19646 (2010). U2S3은 K392D/K409D(카밧 넘버링) 돌연변이를 갖는 하나의 사슬의 Fc-힌지의 N-말단에 융합되는 한편, mutIL2는 E356K/D399K 돌연변이를 보유한 제2 Fc-사슬의 C-말단에 융합되었다. 추가적으로, D265A/N297A 돌연변이는 Fc 사슬 둘 다에서 도입되어서 Fc가 ADCC 결핍이게 한다. Expi293T 세포에서의 발현 및 정제는 상기에 기재된 것과 같았다. 적절하게 조립된 U2S3-hFc-mutIL2 재료를 SEC에 의해 분별화하고, 개별 크기 적절 폴리펩타이드의 존재는 변성 SDS-PAGE에 의해 확인되었다. 글리신-세린 연결, FLAG 태그 및 6xHis 태그를 포함하는 링커에 의해 단일 폴리펩타이드로서 발현된 직각 리간드와 mutIL2 사이의 직접적인 융합체는 또한 생성되고 Ni-NTA 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. Ghasemi et al., Nat Commun 7, 12878 (2016). IUe 활성 당가의 결정은 야생형 IL-2의 4.4 μM 용액이 1000 IU/μL의 당가를 갖는다는 계산에 기초하였다. IL-15Rα에 대한 결합을 감소시켰지만 생물활성을 보유한 V49D 돌연변이를 갖는 IL-15는 U2S3과 유사하게 포맷팅되었다. Bernard et al., J. Biol. Chem. 279, 24313-24322 (2004).

[0063] 다양한 사이토카인 또는 U2S3-사이토카인 융합체에 반응한 CAR-T 세포 증식은 WST-1 Cell Proliferation Reagent(Millipore Sigma #5015944001)에 의해 정량화되었다. 간단히, CAR-T 세포를 펠릿화하고, IL-2가 없는 T 세포 배지에서 재현탁시키고, 96웰 플레이트로 $4x10^4$개의 세포/웰로 분배하고, 웰당 100 μL의 최종 검정 부피에서 필요한 바대로 30 IUe/mL 또는 더 높은 농도를 달성하도록 희석된 U2S3-사이토카인 융합체의 적절한 양을 첨가하였다. 재조합-인간 IL2 및 IL15(Peprotech #200-02 및 #200-15)는 대조군으로서 포함되었다. 37℃에서의 3일 동안 항온처리 후, 10 μL의 WST-1을 각각의 웰에 첨가하고, 30분 내지 60분 동안 항온처리하도록 허용한 후 플레이트 판독기에서 색상 전개의 강도를 정량화하였다. U2S3-사이토카인 융합체에 반응한 GFP+ CAR 발현 세포의 비율의 변경은 유세포분석법에 의해 모니터링되었다. 사이토카인-융합체 관여 시 STAT3 또는 STAT5의 활성화를 모니터링하기 위해 세포를 IL-2 보충이 없는 TCM 배지에서 밤새 휴지시키고, 이후 2시간 동안 150 IUe/mL의 IL-2, IL-15, U2S3-hFc-mutIL2 또는 U2S3-hFc-mutIL15로 처리한 후, 세포내 포스포-STAT3(Biolegend PE 항-STAT3 Tyr705 클론 13A3-1) 및 -STAT5(BD Alexa Fluor 647 항-STAT5 pY694 클론 47)에 대해 고정하고 염색하였다. 시간 반응을 모니터링하기 위해, 처리된 전환 가능한 CAR-CD8 T 세포를 사이토카인 또는 U2S3-hFc-사이토카인 융합체에 대한 노출 후 0분, 30분, 60분 및 120분에서 고정하고, 이후 염색하였다.

[0064] 인간 PBMC 자극 및 면역 표현형분석 연구를 수행하였다. 간단히, 3명의 공여자로부터의 정상 PBMC를 96웰 플레이트에서 $1x10^5$개의 세포/웰로 시딩하고, 5% CO_2로 37℃에서 4시간 동안 U2S3-hFc-mutIL2 또는 U2S3-hFc-wtIL2(야생형 IL2)의 10배 희석 시리즈에 노출시켰다. 양성 대조군은 2 μg/mL에서의 항-인간 CD3(OKT2) 및 300 IUe/mL에서의 rhIL-2로 코팅된 웰을 포함하였다. 항온처리 후, 세포를 TruStain FcX 블록(BioLegend #422301)으로 처리한 후, T 세포(CD8 클론 RPA-T8 #301050, CD4 클론 OKT4 #317410, CD3 클론 OKT3 #300430, KI-67 #350514) 및 Treg 세포(Fox3 클론 206D #320106, CD4 클론 OKT4, CD3 클론 OKT3, KI-67)를 증식시키기 위해 BioLegend 항체 패널에 의해 염색하였다.

[0065] 결과

[0066] *직각 NKG2D-리간드 상호작용의 조작:* 각각의 NKG2D 단량체에서의 2개의 중앙 티로신 잔기는 수용체-리간드 상호작용을 유발하는 데 있어서 중요한 역할을 갖는다. Culpepper et al., Mol. Immunol. 48, 516-523 (2011). 이들 잔기에서의 돌연변이는 아주 많이 탐구되었고, Y152A 돌연변이체("iNKG2D.YA") 및 Y152A/Y199F 이중 돌연변이체("iNKG2D.AF")는 추가의 연구를 위해 선택되고 모든 자연 발생 인간 리간드에 대한 결합을 소실한 것으로 생물층 간섭계(BLI)(도 2a 및 도 3a) 및 ELISA(도 2b)에 의해 확인되었다. ULBP2 A1A2 도메인은 이것이 다형성이 아니므로 iNKG2D의 각각에 대한 높은 친화도 결합으로 돌연변이체의 파지 디스플레이 기반 선택에 대해 선택되었다. 나선 2 및 나선 4에 대해 정보를 얻은 NNK 라이브러리는 오직 나선 4 변이체를 그리고 심지어 이후 자발적 R81W 돌연변이의 맥락에서 오직 돌려주고, 이는 아마도 ULBP2 A1A2 도메인에 대한 안정화 역할을 갖는다. wtNKG2D의 증가하는 농도의 회차에 의한 경쟁적 선택(도 4a)은 항-FGFR3 항체 클론 R3Mab의 IgG1 중쇄의 C-말단에 대한 융합체로서 재포맷팅될 때에도(도 4b) iNKG2D.YA에 배타적으로 재현 가능하게 결합된 U2S1, U2S2 및

U2S3인 3개의 변이체를 생성하였다. R81W 돌연변이 단독이 wtNKG2D 및 iNKG2D.YA 둘 다를 향한 친화도를 향상시켰지만(도 4b 및 도 4c), iNKG2D 선택적 변이체에서의 이의 존재는 야생형 잔기로의 이의 복귀가 iNKG2D.YA에 대한 결합의 소실을 발생시키므로 필수적인 것으로 여겨졌다. U2S3이 더 큰 결합 차이를 일관되게 나타내므로, 이것은 더 철저히 규명되었고 wtNKG2D에 대해 야생형 ULBP2보다 iNKG2D.YA에 대한 10배 더 높은 친화도를 갖는 단량체로서 나타났다(도 4c). 서열 번호 11의 A1-A2 도메인은 U2S3 리간드(서열 번호 30)에 기초한다. iNKG2D.YA에 대한 피코몰 결합은 2가 리툭시맙 항체 융합체에 의해 측정되었고, 직각성은 경쇄(LC) 및 중쇄(HC) 융합 구성 둘 다에 의해 보유되었다(도 5).

[0067] 후보 직각 변이체는 iNKG2D.AF에 대해 유사하게 확인되었고, 리툭시맙-LC 융합체를 Fc-wtNKG2D, Fc-iNKG2D.YA 및 Fc-iNKG2D.AF와 비교하는 ELISA는 iNKG2D.AF에 오직 선택적으로 결합된 4개의 변이체를 확인하였고(도 3b), U2R 변이체는 가장 선택적이다. 리툭시맙.LC-U2S3 및 리툭시맙.LC-U2R의 iNKG2D.YA 및 iNKG2D.AF 둘 다에 대한 결합을 비교하는 ELISA는 이들 2개의 독립적으로 선택된 직각 리간드가 이것이 진전된 불활성 NKG2D 변이체를 배타적으로 관여시킨다는 것을 확인시켜 주었다(도 3c).

[0068] *키메라 항원 수용체로서의 iNKG2D.YA의 발현*: 1차 인간 T 세포로의 4-1BB, CD3ζ 및 eGFP에 융합된 iNKG2D.YA의 렌티바이러스 형질도입은 동일한 힌지, 막관통 및 세포내 구성을 갖는 리툭시맙-scFv 기반 CAR 작제물(RITscFv-CAR)과 동등한 강력한 전이유전자 발현으로 전환 가능한 CAR-T 세포를 효과적으로 생성하였다(도 2b 및 도 6). 리툭시맙.LC-U2S3 MicAbody에 의한 iNKG2D.YA의 표면 염색은 GFP 발현과 강하게 상관되어서, CAR 발현의 효율과 T 세포 표면에 대한 iNKG2D의 제시 사이의 직접적인 관계를 제시한다(도 7c). Alexa Fluor 647 접합된 리툭시맙.LC-U2S3 MicAbody 및 표준 정량화 비드의 유세포분석법을 사용하여, 표면에서 발현된 iNKG2D.YA의 중앙치 양은 21,000개의 분자인 것으로 추정되었다. 야생형 또는 U2S3 리간드로 코팅된 미량역가 플레이트에 대한 전환 가능한 CAR-CD8+ 세포의 항온처리에 의한 iNKG2D.YA-CAR 수용체의 직접적인 관여는 오직 U2S3에 의해 IL-2 및 IFNɣ의 활성화 및 방출을 생성시킨 한편, wtNKG2D-CAR 보유 세포는 야생형 리간드에 오직 반응하여서, T 세포의 맥락에서 직각 상호작용의 선택도를 확인시켜 준다(도 8a). 더욱이, 전환 가능한 CAR-T 세포 기능의 활성화는 적절한 동족 ULBP2 변이체의 존재에 따라 달라졌다. iNKG2D.YA 발현 또는 iNKG2D.AF 발현 T 세포는 이의 각각의 직각 리간드, 즉 U2S3 또는 U2R을 보유하는 MicAbody에 의해 아밍될 때 라모스(CD20+) 표적 세포를 오직 용해시켰다(도 3d). 라모스 세포 단독의 공동배양은 전환 가능한 CAR-CD8+ 세포의 활성화를 유발하기에 충분하지 않았다. 대신에 적절한 항원-표적화 MicAbody는 리툭시맙 항체도 트라스투주맙.LC-U2S3도 CAR 세포를 활성화하지 않으므로 필요한 반면, 리툭시맙.LC-U2S3은 32-160 pM 범위에서 최대 사이토카인 방출을 촉발하였다. 추가적으로, 리툭시맙.LC-U2S3 MicAbody를 갖는 전환 가능한 CAR-T 세포에 의한 사이토카인 방출은 RITscFv-CAR 세포의 것을 초과하였다(도 8b). 이 데이터는 T 세포 기능의 강력한 활성화를 유발하기 위해 표적과 전환 가능한 CAR-T 세포 사이에 scFv-CARs19에 대해 규명된 것과 아마도 유사하게 연접부를 형성하기 위해 적절한 항원-표적화 MicAbody가 필요하다는 것을 입증하였다(도 9a).

[0069] 형광 표지된 리툭시맙.LC-U2S3 MicAbody에 의한 전환 가능한 CAR-CD8+ 세포의 염색은 5 nM에서의 총 iNKG2D.YA-CAR 수용체의 포화를 밝혀냈다(도 9b). 그러나, 전환 가능한 CAR-CD8+ 세포가 리툭시맙.LC-U2S3의 감소하는 양에 의해 아밍된 공동배양 사멸 실험에서, 라모스 표적 세포 용해 활성은 수용체의 완전 점유도에 필요한 것보다 2차수 낮은 30 pM에서의 포화 반응에 도달하였다(도 9c). 이 결과는 과량의 비점유된 iNKG2D.YA-CAR 수용체가 다수의 표적에 대한 활성을 동시에 지시하기 위해 이종성 MicAbody에 의해 아밍될 수 있다는 것을 제시한다. 이를 직접적으로 시험하기 위해, 전환 가능한 CAR-CD8+ 세포를 리툭시맙.LC-U2S3, 트라스투주맙.LC-U2S3(표적화 Her2) 또는 2개의 MicAbody의 등몰 혼합물에 의해 아밍하고, 라모스 세포 또는 CT26-Her2 중 어느 하나에 노출시켰다. 단일 MicAbody에 의해 아밍된 CAR 세포가 동족 항원을 발현하는 유일한 종양 세포에 대한 용해를 지시하였지만, 이중 아밍된 CAR은 용해 효력의 어떠한 손상 없이 종양 세포주 둘 다를 표적화하였다(도 9d).

[0070] *전환 가능한 CAR-T 세포는 파종성 B-세포 림프종을 억제한다*: NSG 마우스에서의 HC 및 LC 리툭시맙-U2S3 MicAbody 둘 다의 약동학(도 10a)은 MicAbody의 더 가파른 α-단계에 의해 모 항체와 평행한 β-단계가 내인성 마우스 야생형 NKG2D에 대한 U2S3 결합의 보유에 기여한다는 것을 밝혀냈다(도 10c). LC-U2S3 융합체(즉, A1-A2 도메인이 항체의 경쇄에 융합된 항체 융합 단백질)는 HC 융합된 MicAbody(즉, A1-A2 도메인이 항체의 중쇄에 융합된 항체 융합 단백질)보다 더 긴 말단 반감기를 가졌다. LC-U2S3 융합체는 또한 라모스 표적 세포에 의한 시험관내 사멸 검정에서 HC 융합체를 능가하였고(도 10b), NSG 마우스에서의 라지 B 세포 림프종 확장을 억제하는 데 있어서 이른 시점에서 더 효과적인 것으로 나타났다. 요약하면, 항체의 경쇄의 N-말단에 융합된 A1-A2 도메인을 포함하는 항체 융합 단백질은 놀랍게도 A1-A2 도메인이 중쇄에 융합된 항체 작제물을 능가하였다.

[0071] 리툭시맙.LC-U2S3(Rit-S3; U2S3 A1-A2 도메인이 항체의 경쇄에 융합된 항체 융합 단백질)은 림프종 제어를 위한 투약 매개변수를 탐구하는 추가의 실험에 배치되었다. 고용량이 CAR 세포에서의 수용체 및 종양 세포에서의 항원의 과포화를 발생시킬 수 있어서 생산적 관여를 방해하므로 20 μg의 중간 Rit-S3 용량은 가장 효과적인 것으로 나타났다. 추가적으로, 4일마다에 대한 2일마다의 Rit-S3 투여의 더 높은 빈도는 종양 성장의 가장 높은 억제를 생성시킨 전환 가능한 CAR-T 세포의 더 높은 용량($10x10^6$)과 맞춰졌다. Rit-S3 단독은 종양 제어에서 비효과적인 한편, 이식편 대 종양 효과는 비형질도입된 것 및 전환 가능한 CAR 단독 코호트 둘 다에서 일관되게 관찰되었다. Rit-S3은 연구의 과정에 걸쳐 마우스의 혈청에서 검출 가능하였고, 피크 수준은 더 빈번한 투약으로 일찍 나타났다.

[0072] 최적화된 전환 가능한 CAR-T 투약을 갖는 라지 파종성 림프종 모델은 $5x10^6$(5M)개 내지 $15x10^6$(15M)개의 전환 가능한 CAR-T 세포를 비교하여 2일마다 20 μg의 Rit-S3에 의해 수행되었다. 양성 대조군으로서, 전환 가능한 CAR-T 세포와 필적하는 시험관내 라모스 사멸 효력을 갖는 RITscFv-CAR 세포가 또한 포함되었다(도 8b). 5M 총 T 세포에서, RITscFv-CAR 및 전환 가능한 CARs+Rit-S3 둘 다는 종양을 제어하는 데 있어서 효과적이였다. 평균 종양 생물발광 신호가 RITscFv-CAR 코호트에 대해 낮고(도 11a), 그 코호트에서의 5마리 중 4마리의 마우스는 제거된 종양 조직을 갖는 것으로 보였지만, 전환 가능한 CAR+Rit-S3 코호트에서의 5마리 중 3마리가 제거된 것으로 보였다(도 11b). 총 점적된 CAR-T 세포 용량이 15M 세포로 증가할 때, RITscFv-CAR 및 전환 가능한 CAR+Rit-S3 둘 다는 종양 확장을 완전히 차단할 수 있었다(도 11a 및 도 11b). 모든 연구에서, 말초 인간 CD3+ T 세포의 피크 수준은 14일에 대부분의 마우스와 관여된 scFv-CAR 및 전환 가능한 CAR-T 세포 둘 다에 의한 점적 후 대략 7일에 일관되게 나타났다(도 11d). 이식편 대 종양 반응의 발생 및 아마도 특정 반응성 클론의 확장의 결과와 동시인 비형질도입된 것 및 전환 가능한 CAR 단독 코호트에서의 CD3+ 세포의 지연된 확장이 있었다. MicAbody 연관된 전환 가능한 CAR-T 세포는 전환 가능한 CAR+Rit-S3 코호트에서의 마우스의 혈액에서 관찰되었다(도 11e).

[0073] *전환 가능한 CAR-T 세포는 피하 림프종을 억제한다*: 고형 종양 덩어리의 성장을 억제하는 전환 가능한 CAR 시스템의 능력을 평가하도록 라지 B-세포를 피하로 이식하였다. 종양이 10일에 확립되면, $7x10^6$(7M)개 또는 $35x10^6$(35M)개의 전환 가능한 CAR-T를 60 μg의 Rit-S3의 단일 IV 용량 후 투여하였다. 추가적으로, 1개의 코호트는 투여 전 Rit-S3의 포화 농도에 의해 예비아밍된 35M 세포를 받았지만, 추가의 MicAbody는 주사를 도입하지 않았다. Rit-S3과 함께 7M 전환 가능한 CAR-T 세포(7M+Rit-S3)의 투여는 전환 가능한 CAR-T 세포 단독에 비해 종양 크기를 감소시켰다(도 12a). 더욱이, 35M+Rit-S3 코호트에서, 종양 성장은 완전히 억제되었다. 35M 예비아밍된 세포를 받은 코호트에서의 종양 성장이 또한 억제되었다. 점적 후 2일에, 예비아밍된 전환 가능한 CAR-T 세포는 아마도 활성화 유도된 세포 증식 및 턴오버 아밍된 수용체의 조합으로 인한 탈아밍의 결과로서 검출 가능한 표면 연관된 Rit-S3 MicAbody를 갖지 않았다(도 12c). Rit-S3의 혈청 수준은 연구에 걸쳐 CAR-T 세포 용량 둘 다에서 필적하였고, 이것이 아밍된 말초 CAR 세포의 높은 수준(도 12c)에 상응하는 대략 600 ng/mL(3.2 nM)(도 12b)에서 검출될 때 제21일에 걸쳐 지속되었다. 연구의 제45일에, 35M+Rit-S3을 받은 코호트는 비교적 높은 CD3+ T 세포 수를 유지시켰지만, MicAbody에 의해 잘 아밍되지 않은 한편, 7M+Rit-S3 코호트는 표면 연관된 MicAbody를 유지시킨 세포를 갖지 않았다. 이는 MicAbody 수준이 혈장에서의 검출 가능한 한계 아래로 떨어지면서 CAR 아밍이 높은 CAR-T 세포 수준에서 유지될 수 없다는 것을 제시한다. 대안적인 가능성은 35M+Rit-S3 코호트에서의 더 높은 CD3+ 세포 수가 CAR 작제물을 발현하지 않는 세포의 이식편 대 종양 하위집단의 확장을 반영한다는 것이다. 그러나, 상승된 CD3+ 세포 수는 35M 예비아밍된 코호트에서 보이지 않아서, 이것이 사실이 아니라는 것을 제시한다. 요약하면, 예비아밍된 전환 가능한 CAR-T는 종양 확장을 억제한 강력한 항종양 반응을 발휘할 수 있었다. 더욱이, 전환 가능한 CAR-T는 전환 가능한 CAR-T 세포 아밍의 적절한 생체내 수준이 유지될 때 고형 림프종을 효과적으로 제어할 수 있었다.

[0074] *전환 가능한 CAR-T 세포로의 생물분자의 선택적 전달*: iNKG2D 변이체와 이의 직각 리간드 사이의 특수 상호작용은 단순히 페이로드로서 이들을 직각 리간드 자체에 융합함으로써 iNKG2D-CAR 발현 세포에 대한 제제의 선택적 전달이 가능하게 한다. 이 특징의 이용성을 입증하기 위해 2개의 이질적인 분야가 탐구되었다: 보체 시스템을 이용하는 표적화된 절제 및 활성화 사이토카인의 선택적 전달. 제1 분야에서, U2R 변이체는 야생형 인간 IgG1 Fc-도메인의 N-말단 또는 C-말단 또는 C1q 결합을 향상시키는 것으로 이전에 기재된 돌연변이체 Fc 도메인 -S267E/H268F/S324T/G236A/I332E("EFTAE") 및 K326A/E333A("AA")에 융합되었다(도 13a). 에피토프 태그화된 CAR 세포를 표적화하는 완전한 치료학적 항체와 반대로 바로 Fc-부분을 사용하는 것은 비-iNKG2D 발현 세포의 옵소닌화로부터의 부수적 효과를 피한다. 향상된 C1q 결합은 EFTAE<AA<wt로서 Kd의 상대 차수로 ELISA에 의해 확인

되었다(도 13b). iNKG2D.AF-CAR 세포가 농도 및 C1q 친화도(도 13c 및 도 13d) 둘 다에 의존적인 방식으로 인간 보체에 의한 사멸이 되기 쉽고, 비형질도입된 세포가 영향을 받지 않았다. 흥미롭게도, U2R 융합체의 배향은 기능에 중요하고, Fc를 항체와 일치하는 방식으로 배향시킨 N-말단 융합체는 훨씬 더 효과적이였다. U2S3 및 iNKG2D.YA 페어링에 의해 유사한 결과가 얻어졌다(도 13e 및 도 13f).

[0075] iNKG2D-CAR 발현 세포에 사이토카인을 선택적으로 전달하는 직각 리간드의 잠재적인 능력은 이의 확장을 촉진할 뿐만 아니라 T 세포 표현형 및 기능을 제어하기 위해 차등적 사이토카인 신호전달을 잠재적으로 이용하는 이점을 갖는다. 일반적인 설계 원칙으로, 자연 수용체 복합체에 대한 감소된 결합을 갖는 돌연변이체 사이토카인은 CAR을 발현하지 않는 면역 세포에 의한 관여를 감소시키기 위해 그리고 야생형 사이토카인과 연관된 독성을 최소화하기 위해 이용되었다. 추가적으로, 사이토카인 융합체는 결합도 향상된 결합 및 신호전달을 제거하도록 1가로 유지되었다. 이를 위해, IL-2에서의 R38A/F42K 돌연변이(mutIL2)25 및 IL-15에서의 V49D 돌연변이(mutIL15)는 IL-2Rβ/γ 보체 관여를 유지시키면서 각각의 사이토카인의 각각의 Rα 하위단위에 대한 결합을 극적으로 감소시킨다. mutIL2 또는 mutIL15 중 어느 하나에 융합된 iNKG2D.YA 직각 변이체 U2S2를 사용한 초기 연구는 wtNKG2D-CAR을 발현하는 세포가 아니라 iNKG2D.YA-CAR 발현 세포의 증식을 촉진하였다(도 14a). 세포 집단 둘 다는 ULBP2.R81W 변이체의 존재 하에 확장되었고, 이는 wtNKG2D와 iNKG2D.YA 사이를 구별하지 않는다. 리간드에 대한 또는 이종이합체 Fc 연결(예를 들면, U2S2-hFc-mutIL2)을 통한 직접적인 융합은 존재하는 비형질도입된 세포를 초과하는 밀도로 GFP+ 전환 가능한 CAR-T 세포의 확장을 촉진하였고(도 14b), 이 확장된 전환 가능한 CAR-T 세포는 이의 세포용해 역량을 유지시켰다(도 14c). MicAbody인 1가 U2S3-hFc(사이토카인 페이로드가 없음) 또는 mutIL2 단독에 의한 iNKG2D.YA의 관여는 전환 가능한 CAR-CD8 세포의 증식을 유발하기에 불충분하였다(도 14a 및 도 14d). STAT3 및 STAT5 인산화(pSTAT3 및 pSTAT5)의 유세포분석법 규명은 야생형 IL-2 또는 IL-15에 대한 노출이 비형질도입된 것뿐만 아니라 전환 가능한 CAR-CD8 세포 둘 다에서 pSTAT3 및 pSTAT5를 증가시켰다는 것을 밝혀냈다. U2S3-hFc-mutIL2에 의한 비형질도입된 세포의 처리는 IL-2Rβ/γc 결합의 mutIL2의 보유와 일치하는 사이토카인 무 대조군에 비해 pSTAT5에서의 오직 최소 이동을 생성시켰다. 전환 가능한 CAR-CD8 세포는 JAK3의 γ-사슬 활성화를 통해 pSTAT5 수준의 증가로 U2S3-hFc-mutIL2 및 U2S3-hFc-mutIL15 둘 다에 반응하였다. 야생형 사이토카인과 달리, pSTAT3 신호에서의 증가 없음이 관찰되어서, 이는 Rα 결합의 파괴의 결과로서 시나리오 둘 다에서의 IL-2Rβ28을 통한 JAK1 활성화의 감소를 나타내고, 가정은 IL-2Rβ에 대한 IL-15의 친화도를 증가시키는 데 있어서 IL-15Rα에 의해 뒷받침된다. 반응 U2S3-hFc-mutIL2 및 U2S3-hFc-mutIL15의 동역학은 거의 동일하여서, 이의 돌연변이체 형태에서의 기능적 중복성을 나타낸다.

[0076] U2S3-hFc-mutIL2는 몇일의 생체내 PK 반감기를 갖는 것으로 나타났다(도 14e). 종양의 부재 하에 NSG 마우스에 투여된 전환 가능한 CAR-T 세포는 3일에 피크인 항상성 확장을 겪은 후 수축하였다. 1주 간격 떨어져 생긴 U2S3-hFc-mutIL2의 3개의 주사는 말초 혈액에서의 인간 T 세포의 극적인 확장을 생성시켰고(도 15a), T 세포 수는 확장의 벌크를 유발하는 CD8+ T 세포에 의한 U2S3-hFc-mutIL2 지지의 중단 후 수축되었다. 확장과 평행하여, GFP+ CD8+ T 세포의 비율은 100%로 증가하여서, 비형질도입된 세포가 아니라 iNKG2D-CAR 발현 세포의 선택적 확장을 입증한다(도 15b).

[0077] 3명의 공여자로부터의 정상 인간 PBMC에서의 U2S3-hFc-mutIL2의 효과는 4일 동안 제제의 증가하는 농도에 대한 노출에 의해 시험관내 탐구된 후, 증식성 마커 Ki-67에 대해 양성인 세포의 흐름 기반 정량화가 이어졌다(도 16). -mutIL2 융합체 이외에, 야생형 IL2 융합체(U2S3-hFc-wtIL2)는 mutIL2 생물활성의 감소가 융합체 형식 자체가 아니라 사용된 돌연변이의 결과라는 것을 직접 입증하도록 포함되었다. CD4+ 및 CD8+ T 세포는 항-CD3 및 야생형 IL-2 양성 대조군 둘 다뿐만 아니라 U2S3-hFc-wtIL2의 가장 낮은 용량에 강력히 반응하였다. U2S3-hFc-mutIL2에 대한 증식성 반응은 30,000 IUe/mL까지 IL-2 양성 대조군의 것과 필적하는 수준을 달성하지 않으면서 300 IUe/mL 초과의 수준에서 공여자에 걸쳐 관찰된 확장으로 용량 의존적 방식으로 발생했다. Treg 반응은 다른 공여자보다 더 낮은 농도에서 U2S3-hFc-mutIL2에 반응한 (항-CD3 자극에 낮은 반응을 추가적으로 가진) 1명의 공여자로부터의 세포를 배제하고 CD4+ 및 CD8+ 세포의 것과 필적하였다. 종합하면, 이 데이터는 정상 인간 PBMC가 독성 및 Treg 활성화를 최소화하면서 전환 가능한 CAR 세포에 대한 리간드 융합된 mutIL2의 선택적 전달을 위한 넓은 투약 윈도우를 잠재적으로 제공하는 초생리학적 수준에서를 제외하고 U2S3-hFc-mutIL2에 반응하지 않는다는 가설을 뒷받침한다.

[0078] *A1-A2 도메인 위치 및 링커의 비교*: 상기 연구 이외에, 항체 중쇄 또는 경쇄를 A1-A2 도메인에 연결하는 상이한 링커를 포함하는 작제물이 연구되었다. 도 17a를 참조한다. GGGS(서열 번호 14) 링커(Ritux.HCd.S3) 또는 APTSSSGGGS(서열 번호 10) 링커(Ritux.HCd.apts.S3)를 통해 중쇄에 부착된 U2S3 기반 A1-A2 도메인을 포함하는 리툭시맙 항체(Ritux.HCd)가 생성되었다. 유사한 작제물이 생성되었고, 여기서 A1-A2 도메인은 동일한 링커

(Ritux.HCd.LC.S3(APTSSSGGGGS 링커(서열 번호 10)) 및 Ritux.HCd.LOC.gggs.S3(GGGS 링커(서열 번호 14)))를 통해 리툭시맙 항체의 경쇄에 융합되었다. 작제물은 도 10b와 연결되어 본원에 기재된 방법을 이용하여 조사되었다. 그 결과는 도 17b에 예시되어 있다. 서열 번호 1의 가변 영역 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 8의 가변 영역 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 융합 작제물(여기서, 경쇄는 A1-A2 도메인에 C-말단에서 융합됨)은 종양 세포를 사멸하는 데 있어서 A1-A2 도메인이 중쇄에 부착된 작제물을 능가하였다. 추가적으로, A1-A2 도메인이 APTSSSGGGGS 링커(서열 번호 10)를 통해 경쇄에 융합된 작제물은 거의 모든 농도(0.04 nM, 0.2 nM, 1 nM 및 5 nM)에서 시험된 모든 작제물을 놀랍게도 능가하였다.

[0079] *글리코실화에 영향을 미치는 돌연변이*: 단백질 치료학적 제조 동안 도입된 글리코실화는 최종 생성물에서 바람직하지 않은 이질성으로 이어질 수 있다. 서열 번호 30 내의 위치 40 및 54에서의 잔기는 치환을 통해 알라닌 또는 글루타민을 도입하도록 돌연변이되었다. 이 치환은 펩타이드가 HEK 293 세포에서 발현될 때 N-글리코실화를 감소시켰다. 놀랍게도, 펩타이드가 CHO 세포에서 제조될 때, N-글리코실화가 돌연변이체 A1-A2 도메인 펩타이드에서 관찰되었다. 치환을 통해 알라닌 또는 글루타민을 도입하기 위해 위치 84에서의 서열에서 추가의 돌연변이를 도입하였다.

[0080] 위치 40, 54 및/또는 84에서의 치환을 포함하는 돌연변이체 A1-A2 도메인의 활성은 리툭시맙에 융합된 U2R 리간드의 맥락에서 확인되었다. (1) A1-A2 도메인의 위치 40 및 54에서의 알라닌 또는 (2) A1-A2 도메인의 위치 40 및 54에서의 글루타민을 포함하는 U2R 리간드를 포함하는 리툭시맙 융합 단백질은 CD20+ve 라모스 세포에 대한 iNKG2D.AF-CAR 세포에 의해 사멸 검정에서 시험되었다. 돌연변이체 A1-A2 도메인을 포함하는 융합체는 (위치 40 및 54에서의 치환이 없는) 모 A1-A2 도메인을 갖는 융합체와 유사하게 수행되었다.

[0081] 치환은 또한 서열 번호 30의 위치 40 및 54(U2S3(NQ))에서 수행되었고, 리툭시맙의 경쇄에 융합된 돌연변이된 A1-A2 도메인을 포함하는 융합 단백질이 생성되었다. SDS-PAGE는 돌연변이체 A1-A2 도메인 융합체가 Expi-293 세포에서 발현될 때 감소된 N-글리코실화를 나타낸다는 것을 확인시켜 주었다. CHO 세포에서 유사한 결과가 관찰되었다. ELISA 검정은 상기에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 수행되었고, 이는 U2S3(NQ) 도메인을 포함하는 항체가 서열 번호 30의 비변형된 U2S3 도메인을 포함하는 항체와 유사하게 iNKG2D.YA에 결합된다는 것을 확인시켜 준다. 도 18을 참조한다. 야생형 NKG2D에 대한 결합이 또한 시험되었다. 도 19를 참조한다. U2S3 및 U2S3(NQ)을 포함하는 MicAbody는 야생형 NKG2D에 대한 실질적으로 감소된 결합을 입증하였고, 위치 40 및 54에서 글루타민을 도입하는 것이 야생형 NKG2D 결합에 대해 놀랍게도 훨씬 더 불활성인 융합체를 생성시키는 것으로 관찰되었다(즉, 치환을 포함하는 A1-A2 도메인은 치환이 없는 모 도메인과 동일한 정도로 iNKG2D.YA에 결합되었지만, 야생형 NKG2D에 대한 훨씬 추가로 감소된 결합을 입증하였다).

[0082] U2S3(NQ) 도메인이 CHO 세포에서 발현될 때, N-글리코실화가 HEK 293 세포에서 발현이 수행될 때 실제로 부재하는 것으로 보인다는 사실에도 불구하고 N-글리코실화가 관찰되었다. U2S3(NQ) A1-A2 도메인의 추가의 치환은 위치 84에서의 알라닌(U2S3(AYT)) 또는 글루타민(U2S3(QYT))을 도입하도록 수행되었다. Octet 결합 실험은 리툭시맙-MicAbody의 맥락에서 이 추가의 돌연변이에 의해 수행되었다. 알라닌 또는 글루타민에 의한 위치 84에서의 치환은 iNKG2D.YA에 대한 결합을 변경하지 않았다. 세포독성이 또한 확인되었다. 도 20을 참조한다. 라모스 표적 세포를 칼세인으로 로딩하고, 각각의 시험된 MicAbody(U2S3, U2S3(NQ), U2S3(AYT) 및 U2S3(QYT)에 융합된 리툭시맙)의 증가하는 nM 농도의 존재 하에 20:1의 E:T 비로 2시간 동안 iNKG2D-CAR CD8+ T 세포와 공동배양하였다. 방출된 칼세인의 양을 정량화하였다. 모든 MicAbody는 세포독성의 필적하는 수준을 매개하였고, 이는 (a) CD20 관여가 손상되지 않는다 그리고 (b) iNKG2D 관여가 본원에 기재된 치환에 의해 손상되지 않는다는 것을 나타낸다. 따라서, 본원에 기재된 A1-A2 도메인은 감소된 글리코실화를 입증하였고, iNKG2D-CAR을 사용하여 표적 세포 결합 및 세포독성의 필적하는 수준을 매개하였고, 야생형 NKG2D에 대한 추가의 감소된 결합을 입증하였다.

[0083] 논의

[0084] 본 개시내용은 다목적 및 광범위하게 제어 가능한 플랫폼을 생성시키는 고도로 적응 가능한 CAR에 대한 인간 성분으로 이루어진 특수 수용체-리간드(iNKG2D.YA 및 U2S3) 페어링의 조작을 기재한다. iNKG2D.YA-CAR 수용체 자체는 T 세포에서 불변으로 보유되고, CAR 기능은 적절한 항원 인식 항체에 직각 리간드를 부착시킴으로써 잠재적으로 관심 있는 임의의 항원에 용이하게 지시된다. 이러한 방식으로, 예를 들면 원래의 종양 항원이 치료의 과정 동안 하향조절되면 필요한 것처럼 동일한 전환 가능한 CAR-T 세포는 재표적화될 수 있다. 이 표적화 유연성은 항원의 순차적인 관여로 제한되지 않고, 항원 소실에 의한 종양 회피의 가능성을 감소시키기 위해 하나 초과의 항원에 대해 T 세포를 동시에 지시하도록 또한 다중화될 수 있거나, 종양내 항원 발현의 이종성의 문제를 해결하거나, 종양 및 종양 미세환경의 억제성 세포 성분을 동시에 표적화한다. 전통적인 scFv-CAR 세포는 일반

적으로 비정상 세포에 대해 건강한 세포에 존재하는 항원 수준 사이를 구별하는 이의 능력을 감소시키는 수용체의 고정된 발현 수준에 전념한다. 전환 가능한 CAR-T 세포를 갖는 MicAbody와 같이 전환/어댑터 전략의 사용은 심각한 부작용의 위험을 감소시키는 치료학적 지수를 달성하기 위해 CAR-T를 차등적으로 관여시키는 기회를 제공할 수 있다.

[0085] 추가의 세포 조작이 없이 특이적으로 iNKG2D 보유 세포에 대한 페이로드의 전달을 위한 특수 수용체-리간드 상호작용의 사용은 또 다른 이점이다. 확장 및 활성화를 유발하는 인터류킨 기능을 이용하는 역량은 소진을 방지하거나 제어된 및 표적화된 방식으로 억제를 심지어 촉진하고 효능 및 안전성을 위한 유리한 결과를 가질 수 있었다. CAR 제조 동안 사이토카인-리간드 융합체의 도입은 환자 T 세포의 정성적 및 정량적 제한을 해결할 수 있었고, 이의 CAR 점적 후 투여는 CAR-T 세포의 수 및 이의 지속성을 확장시킬 수 있었고, 이는 CD19-CAR 치료제에 의해 반응 속도와 양으로 상관된다. 대부분의 CAR 치료제는 CAR 세포의 생착 및 확장을 촉진하는 프리컨디셔닝 림프고갈 요법을 요하고, 하나의 이유는 이것이 CAR이 확장하는 더 파릇파릇한 면역학적 설정을 제공하는 것이다. 환자에서의 강력한 및 제어 가능한 전환 가능한 CAR-T 확장은 림프고갈에 대한 필요를 대신할 수 있어서, 초기 전환 가능한 CAR 매개된 항종양 활성을 뒷받침하기 위해 완전히 유능한 내인성 면역 기능의 보유를 허용한다. 또 다른 임상 전략은 T 세포 소진을 감소시키고 기억 T 세포의 유지를 촉진하기 위해 가능하게는 사이클링 요법에 의해 전환 가능한 CAR-T 기능을 강화하기 위해 사이토카인-리간드 융합체를 전달하는 것일 것이다. 그리고 마지막으로, CAR이 점적 후 여러해 동안 인간에서 지속하는 것으로 나타나면서, CAR 세포의 새로운 뱃지를 재조작하거나 생성해야함이 없이 (원래의 표적화 MicAbody 또는 상이한 것에 의해) 1차 또는 2차 악성종양을 공격하는 거주 전환 가능한 CAR-T를 회상하는 능력이 고도로 유리해야 한다. CAR이 사이토카인을 구성적으로 발현하도록 조작된 시나리오와 달리, 배타적으로 사이토카인의 전환 가능한 CAR-T 세포로의 전달은 제조 또는 임상 필요 시 조절될 수 있다.

[0086] 설계에 의해, 전환 가능한 CAR 시스템의 2개의 성분인 iNKG2D 기반 CAR 수용체 및 MicAbody(ADCC 결핍임)는 그 자체가 기능적으로 불활성이다. 이는 특히 전통적인 scFv 기반 CAR이 동족살해제(fratricide)로 인해 확장 장애물을 마주치는 T 세포 악성종양과 같은 적응증의 맥락에서 제조 동안 이점을 갖는다. 추가적으로, 이것은 처리 동안 CAR 기능의 향상된 제어를 제공한다. 본 개시내용은 전환 가능한 CAR-T 세포가 전통적인 scFv-CAR과 동등한 항종양 활성의 초기 폭발을 제공하도록 투여 전에 MicAbody에 의해 아밍될 수 있다는 것을 입증한다. 활성화 유도된 복제 이외에, 이들 세포는 또한 다른 4-1BB/CD3zeta scFv-CAR에 의해 관찰된 것과 일치하는 방식으로 이의 관여된 CAR 수용체를 내재화한다. 이들 2개의 과정의 결과로서, 전환 가능한 CAR-T 세포는 초기 확장 및 표적 관여 후 신속히 탈아밍할 것이고, 이는 이후 MicAbody 투약에 의해 제어된 방식으로 재아밍하고 재관여하는 기회를 제공한다.

[0087] ULBP2에 기초한 iNKG2D-U2S3 페어링 이외에, 본 개시내용은 이의 아미노산 조성에서 나선 4 도메인을 통해 비중복인 iNKG2D.YA에 대한 고친화도 직각 MicA 및 ULBP3을 확인한다. 추가적으로, 완전히 독립적인 iNKG2D.AF 및 U2R 페어링이 기재되어 있다. 상호 배타적인 수용체-리간드 쌍을 갖는 것은 필요한 대로 이들을 차등적으로 관여시키기 위해, 예를 들면, 구별되는 세포 집단(예를 들면, CD4 및 CD8 T-세포)으로의 이의 도입이 가능하게 한다. 더욱이, 동일한 세포 내에, 2개의 iNKG2D 변이체는 온-종양 선택도(on-tumor selectivity)를 향상시키기 위해 이중 항원 의존적 활성화를 제공하도록 분할 세포내 신호전달 도메인에 의해 발현될 수 있었다. 대안적으로, 2개의 iNKG2D 변이체는 각각 종양 또는 건강한 조직 사이에 T 세포의 구분 힘을 향상시키기 위해 활성화 도메인 또는 면역억제 도메인에 차등적으로 연결될 수 있었다.

[0088] 요약하면, 본원에 기재된 시스템은 상이한 세포-표면 항원에 용이하게 표적화될 수 있을 뿐만 아니라 세포 확장을 유발하도록 내인성으로 선택적으로 관여될 수 있는 역량을 입증하였다. 개발된 특수 수용체-리간드 상호작용은 세포 유형에 아그노스틱(agnostic)이고, 세포 적절한 신호전달 도메인이 제공되는 한 관심 있는 임의의 세포로 조작될 수 있다. 추가적으로, 입양 세포 치료 분야는 더 일관된, 용이하게 접근 가능한 생성물을 제조하기 위해 제조의 시간, 복잡성 및 비용을 감소시키는 동종이계 세포의 개발을 공격적으로 추구한다. 고도로 적응 가능한 CAR 시스템은 동종이계 노력으로 강력하게 상승적일 것이고, 일단 진정하게 보편적인 동종이계 CAR 시스템이 검증되면, 치료학적 분야는 이후 개인화된 선택이 이루어질 수 있는 어댑터 분자의 라이브러리를 개발하고 실행하는 상대적 용이에 의해 특징지어질 수 있다. 이 전략은 또한 표적화 가능한 표면 항원에 의한 임의의 병원성 세포에 대한 잠재적인 적용 분야를 확장시킨다.

[0089] 본원에 인용된 공보, 특허 출원 및 특허를 포함하는 모든 참고문헌은, 각각의 참고문헌이 참고로 포함된 것으로 개별적으로 및 구체적으로 표시되고 본원에 그 전체가 기재된 것처럼 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

도면

도면1a

서열 번호	설명	서열
1	중쇄 가변 영역	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIG AIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY GGDWYFNVWGAGTTVTVSAA
2	중쇄 불변 영역- 옵션 1	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
3	중쇄 불변 영역- 옵션 2	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
4	신호를 갖는 중쇄, 전장 서열- 옵션 1	MMRPIVLVLLFATSALA*QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAA*STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
5	신호를 갖는 중쇄, 전장 서열- 옵션 2	MMRPIVLVLLFATSALA*QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAA*STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

도면1b

서열 번호	설명	서열
6	중쇄, 전장 서열-옵션 1	*QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIG AIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY GGDWYFNVWGAGTTVTVSAA*STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	중쇄, 전장 서열-옵션 2	*QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIG AIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY GGDWYFNVWGAGTTVTVSAA*STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	경쇄 가변 영역	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNL ASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
9	경쇄 불변 영역	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
10	링커	APTSSSGGGGS
11	A1-A2 도메인 (NQ)	EPHSLSYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTFLHYDCGQKTVTPVSPLGKK LQVTTAWKAQNPVLREVVDILTEQLWDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKA EGHSSGSWQFSFDGQIFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKVVAT KLYLWSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPS
12	신호를 갖는 경쇄, 전장 융합 서열	MMRPIVLVLLFATSALA**QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWTSNPPTFGGGTKLEIK***RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC***APTSSSGGGGS***EPHSLSYDITVIPKFRPGP RWCAVQGQVDEKTFLHYDCGQKTVTPVSPLGKKLQVTTAWKAQNPVLREV VDILTEQLWDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSFDGQIFL LFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKVVATKLYLWSMGDCIGWLEDFL MGMDSTLEPS

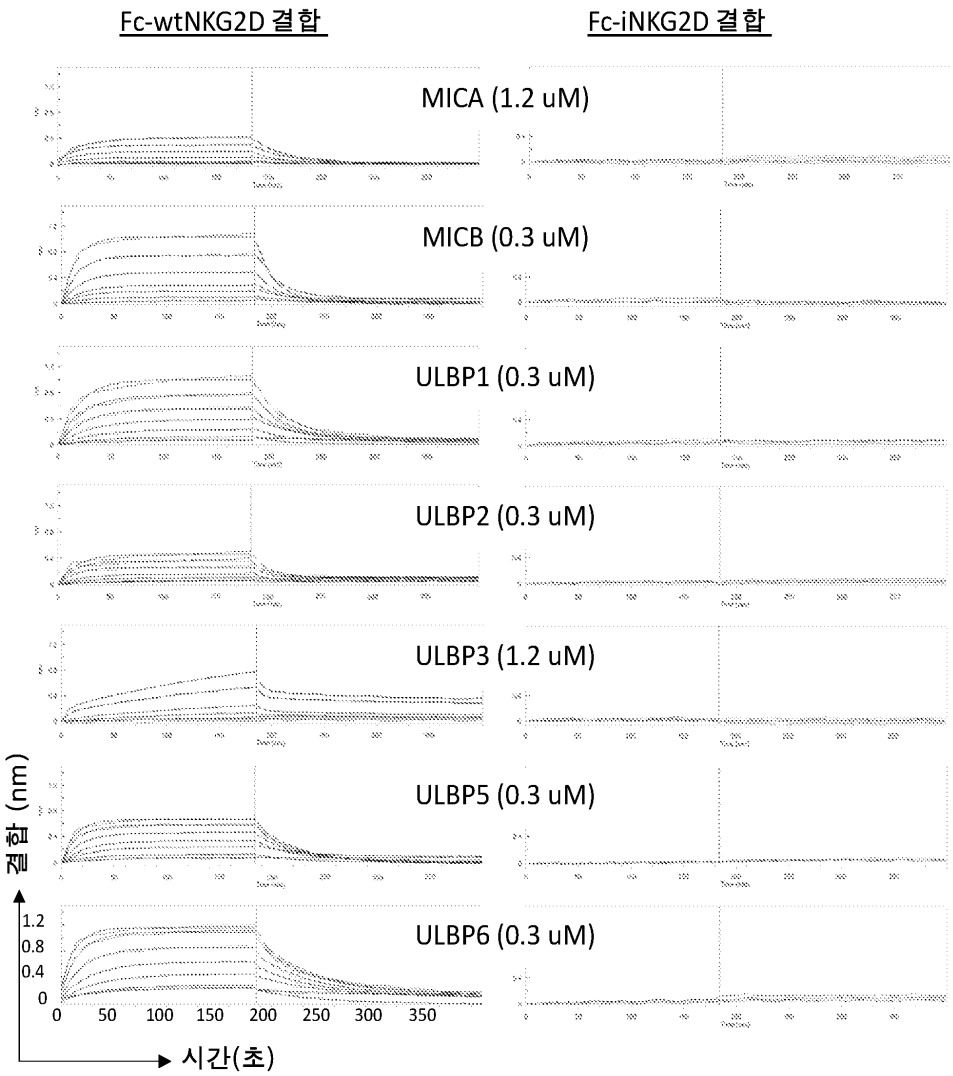
도면1c

서열 번호	설명	서열
13	A1-A2 도메인 및 링커를 갖는 경쇄, 전장 융합 서열	**QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATS NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIK***RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC***APTSSSGGGGS**EPHSLSYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTFLHY DCGQKTVTPVSPLGKKLQVTTAWKAQNPVLREVVDILTEQLWDIQLENYTP KEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSFDGQIFLLFDSEKRMWTTVHPGA RKMKEKWENDKVVATKLYLWSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPS
14	링커	GGGS
15	iNKG2D 도메인	*LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNA SLLKVYSKEDQDLLKLVKSAHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEM QKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV*
16	CD8a 힌지/tm 도메인	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCSL
17	4-1BB 도메인	*KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL*
18	CD3ζ 도메인	**RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR**
19	iNKG2D 도메인 + CD8a 힌지/tm 도메인 + 4-1BB 도메인 + CD3ζ 도메인	*LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNA SLLKVYSKEDQDLLKLVKSAHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEM QKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV*TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCSL*KRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL***RVKFSRSADAPAYK QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR***
20	신호 서열 + iNKG2D 도메인 + CD8a 힌지/tm 도메인 + 4-1BB 도메인 + CD3ζ 도메인 + 링커 + eGFP	MALPVTALLLPLALLLHAARP*LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQF FDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSAHWMGLVHIPTN GSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV*TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCSL*KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCEL***RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR***SGSGSGSGSMVSKGEELFTGVVPILVELDG DVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFS RYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRI ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIEDGS VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTA AGITLGMDELYK

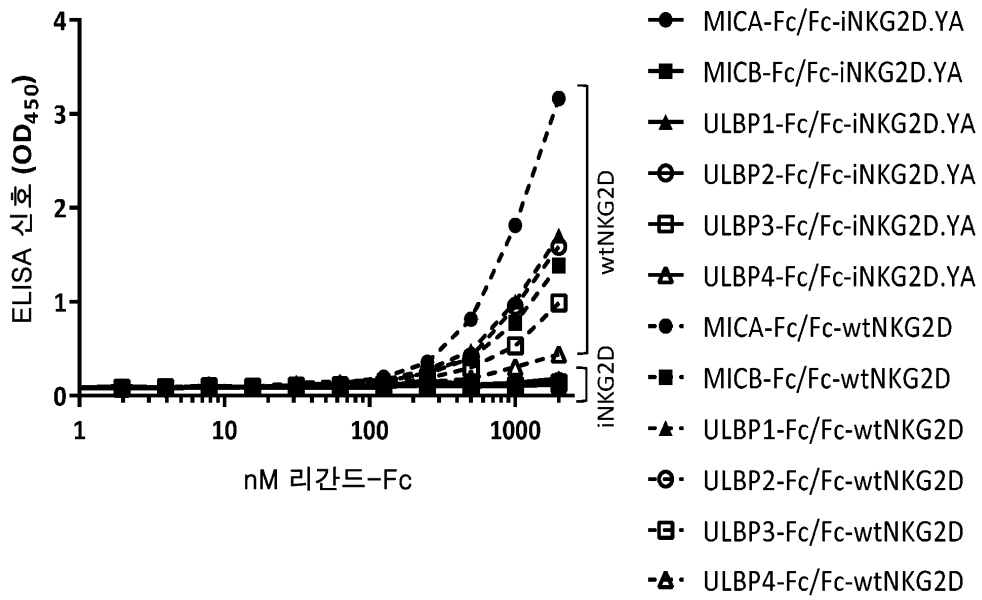
도면1d

서열 번호	설명	서열
21	경쇄, 전장	**QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATS NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIK***RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC*
30	A1-A2 도메인	EPHSLSYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTFLHYDCGNKTVTPVSPLGKK LNVTTAWKAQNPVLREVVDILTEQLWDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKA EGHSSGSWQFSFDGQIFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKVVAT KLYLWSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPS
31	A1-A2 도메인 (AYT)	EPHSLSYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTFLHYDCGQKTVTPVSPLGKK LQVTTAWKAQNPVLREVVDILTEQLWDIQLEAYTPKEPLTLQARMSCEQKA EGHSSGSWQFSFDGQIFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKVVAT KLYLWSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPS
32	A1-A2 도메인 (QYT)	EPHSLSYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTFLHYDCGQKTVTPVSPLGKK LQVTTAWKAQNPVLREVVDILTEQLWDIQLEQYTPKEPLTLQARMSCEQKA EGHSSGSWQFSFDGQIFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKVVAT KLYLWSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPS

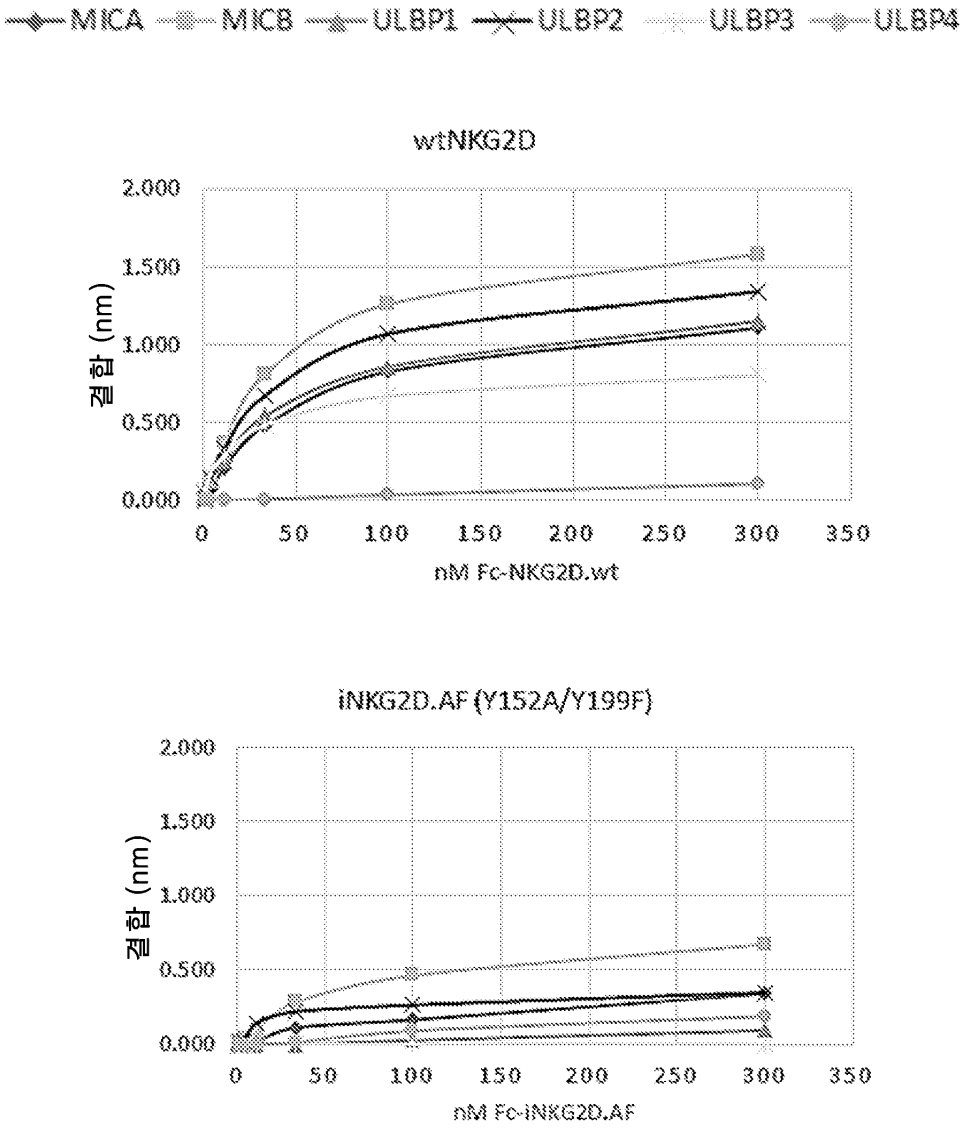
도면2a


Fc-wtNKG2D 결합
Fc-iNKG2D 결합
MICA (1.2 uM)
MICB (0.3 uM)
ULBP1 (0.3 uM)
ULBP2 (0.3 uM)
ULBP3 (1.2 uM)
ULBP5 (0.3 uM)
ULBP6 (0.3 uM)
결합 (nm)
1.2
0.8
0.4
0
0
50
100
150
200
250
300
350
시간(초)

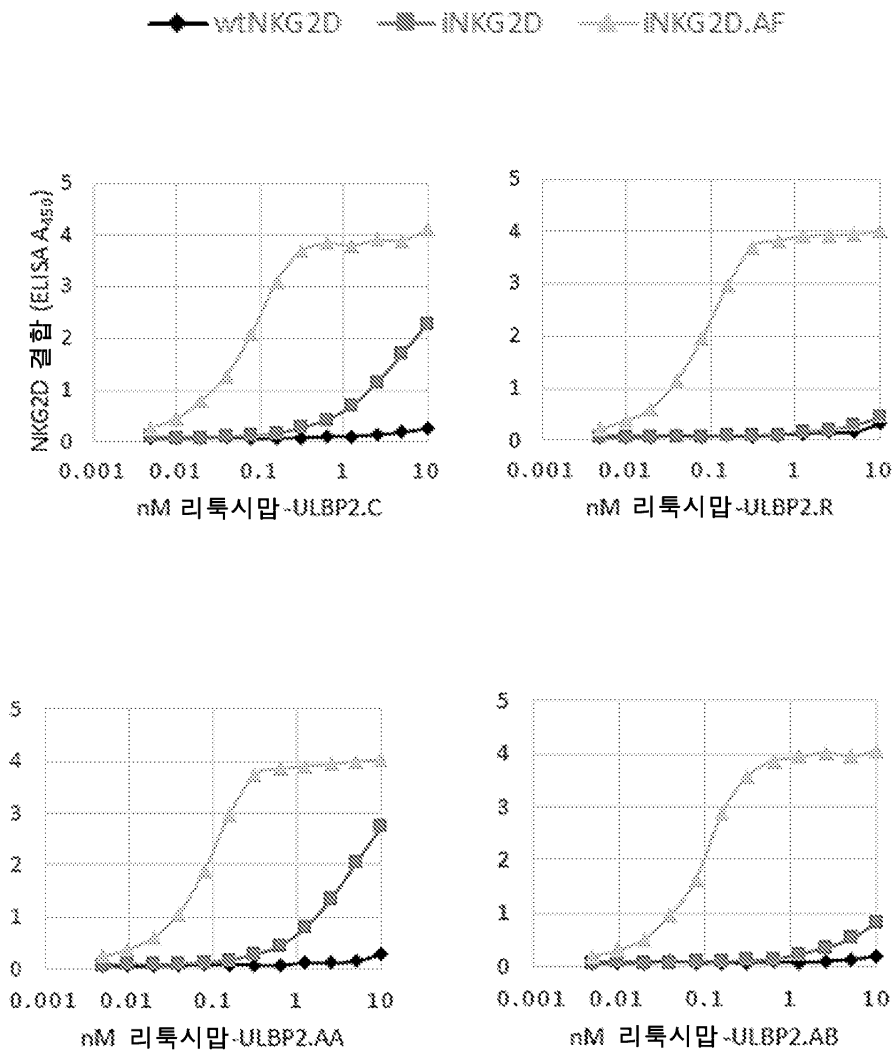
도면2b


ELISA 신호 (OD450)
4
3
2
1
0
1
10
100
1000
nM 리간드-Fc
wtNKG2D
iNKG2D
MICA-Fc/Fc-iNKG2D.YA
MICB-Fc/Fc-iNKG2D.YA
ULBP1-Fc/Fc-iNKG2D.YA
ULBP2-Fc/Fc-iNKG2D.YA
ULBP3-Fc/Fc-iNKG2D.YA
ULBP4-Fc/Fc-iNKG2D.YA
MICA-Fc/Fc-wtNKG2D
MICB-Fc/Fc-wtNKG2D
ULBP1-Fc/Fc-wtNKG2D
ULBP2-Fc/Fc-wtNKG2D
ULBP3-Fc/Fc-wtNKG2D
ULBP4-Fc/Fc-wtNKG2D

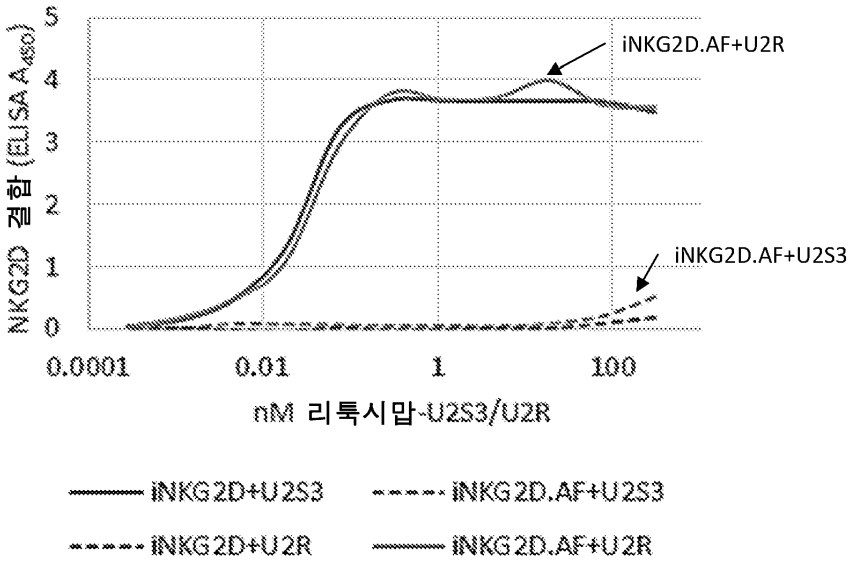
도면3a


MICA
MICB
ULBP1
ULBP2
ULBP3
ULBP4
wtNKG2D
결합 (nm)
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
0
50
100
150
200
250
300
350
nM Fc-NKG2D.wt
iNKG2D.AF (Y152A/Y199F)
결합 (nm)
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
0
50
100
150
200
250
300
350
nM Fc-iNKG2D.AF

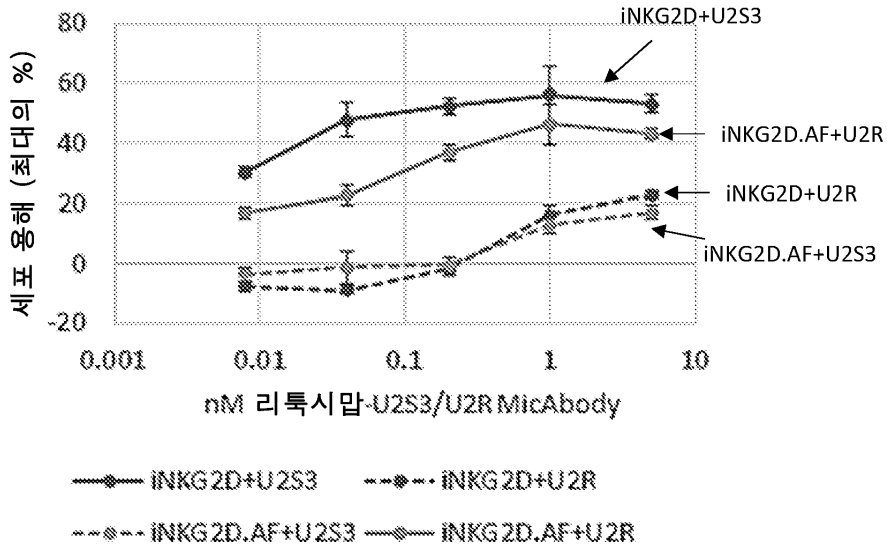
도면3b


wtNKG2D
iNKG2D
iNKG2D.AF
NKG2D 결합 (ELISA A450)
0
1
2
3
4
5
0.001
0.01
0.1
1
10
nM 리툭시맙-ULBP2.C
nM 리툭시맙-ULBP2.R
nM 리툭시맙-ULBP2.AA
nM 리툭시맙-ULBP2.AB

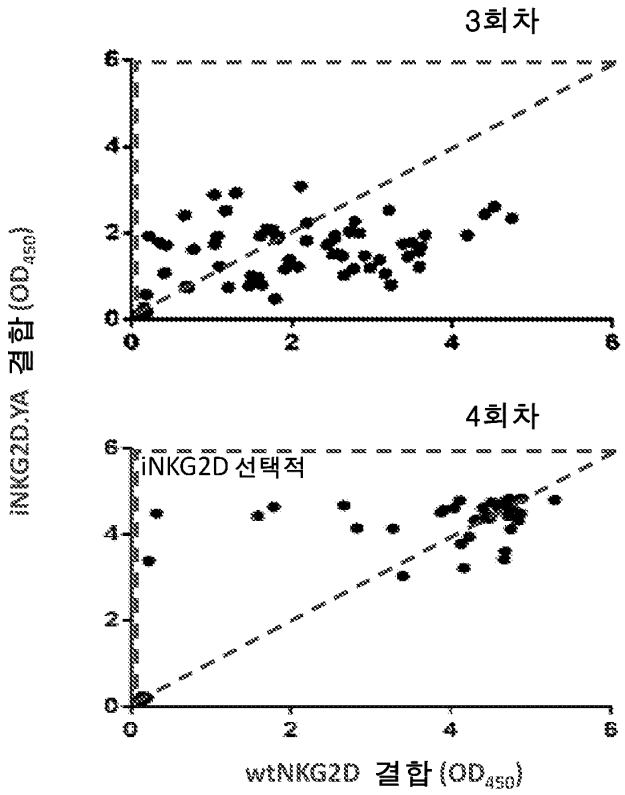
도면3c


NKG2D 결합 (ELISA A450)
0
1
2
3
4
5
0.0001
0.01
1
100
nM 리툭시맙-U2S3/U2R
iNKG2D.AF+U2R
iNKG2D.AF+U2S3
iNKG2D+U2S3
iNKG2D.AF+U2S3
iNKG2D+U2R
iNKG2D.AF+U2R

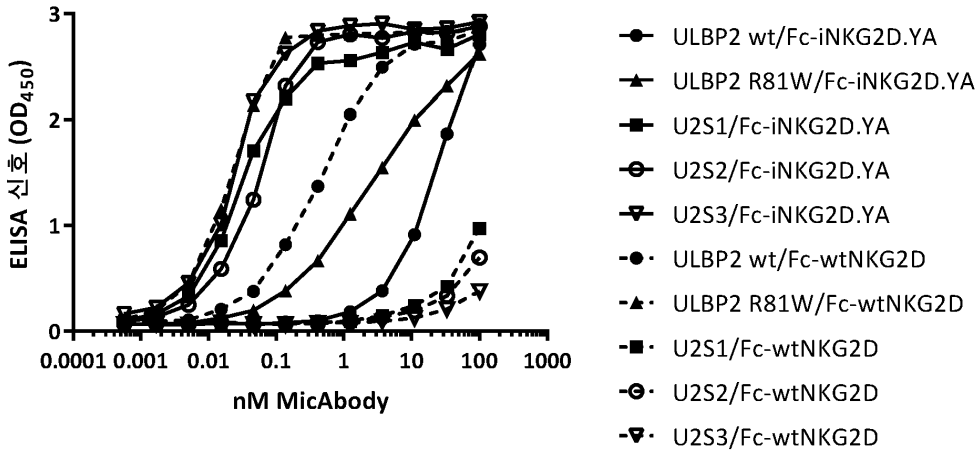
도면3d


iNKG2D+U2S3
iNKG2D.AF+U2R
iNKG2D+U2R
iNKG2D.AF+U2S3
세포 용해 (최대의 %)
80
60
40
20
0
-20
0.001
0.01
0.1
1
10
nM 리툭시맙-U2S3/U2R MicAbody
iNKG2D+U2S3
iNKG2D+U2R
iNKG2D.AF+U2S3
iNKG2D.AF+U2R

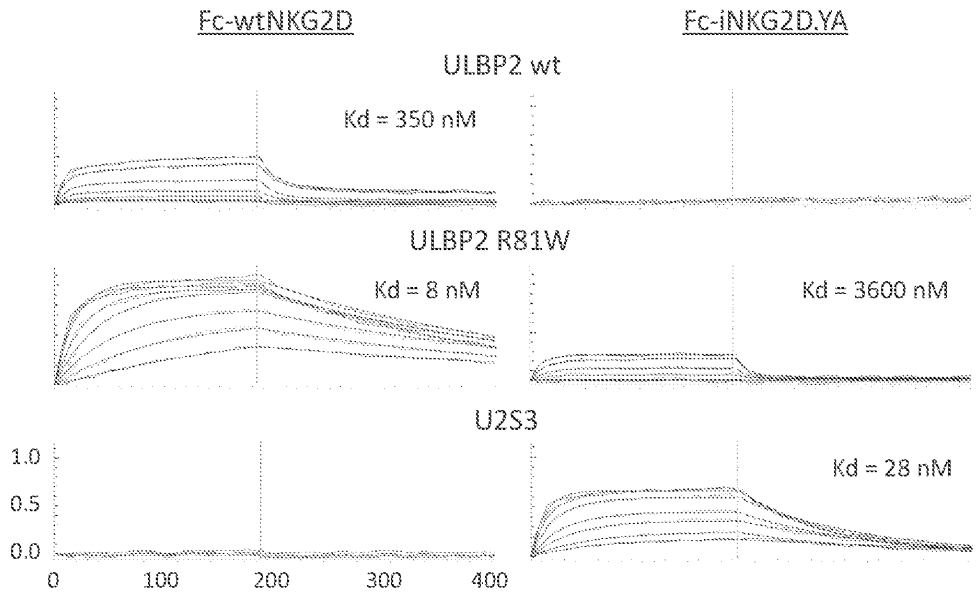
도면4a


3회차
4회차
iNKG2D 선택적
iNKG2D.YA 결합 (OD450)
wtNKG2D 결합 (OD450)
0
2
4
6

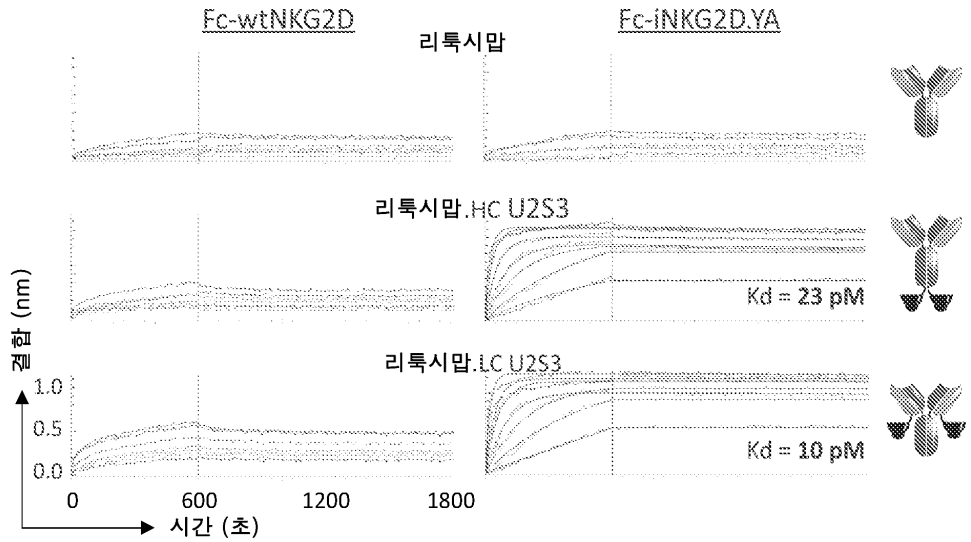
도면4b


ELISA 신호 (OD450)
3
2
1
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
nM MicAbody
ULBP2 wt/Fc-iNKG2D.YA
ULBP2 R81W/Fc-iNKG2D.YA
U2S1/Fc-iNKG2D.YA
U2S2/Fc-iNKG2D.YA
U2S3/Fc-iNKG2D.YA
ULBP2 wt/Fc-wtNKG2D
ULBP2 R81W/Fc-wtNKG2D
U2S1/Fc-wtNKG2D
U2S2/Fc-wtNKG2D
U2S3/Fc-wtNKG2D

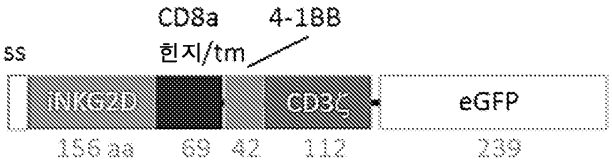
도면4c


Fc-wtNKG2D
Fc-iNKG2D.YA
ULBP2 wt
Kd = 350 nM
ULBP2 R81W
Kd = 8 nM
Kd = 3600 nM
U2S3
Kd = 28 nM
1.0
0.5
0.0
0
100
200
300
400

도면5

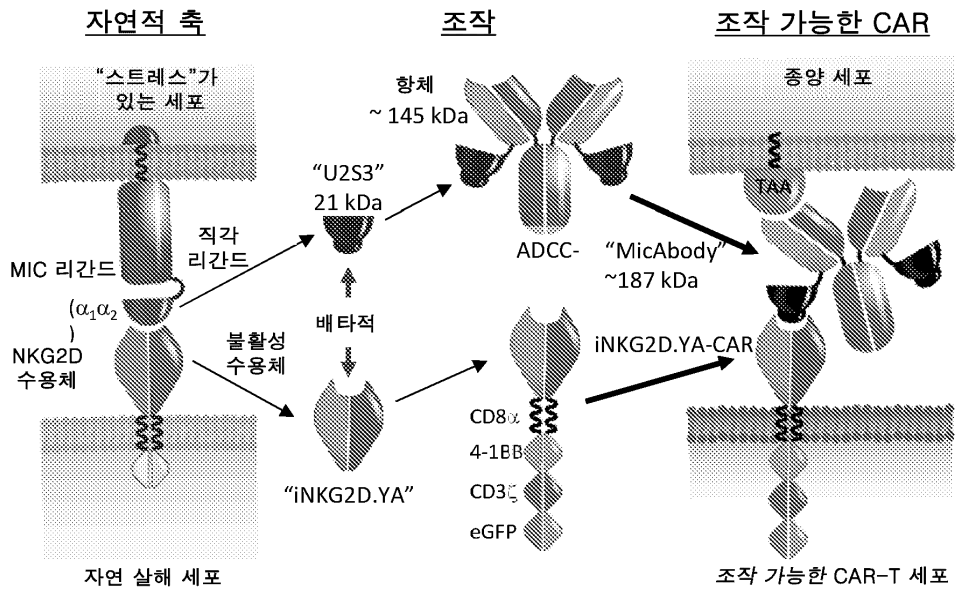


도면6

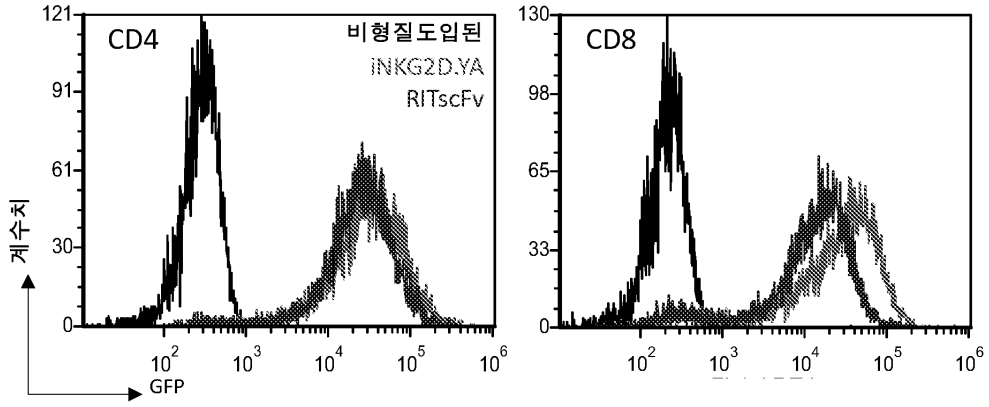


MALPVTALLLPLALLLHAARP*LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQAS CMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSAHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCA LYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV*TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCSL*KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CEL**RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**SGSGSGSGS MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTY GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFK EDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLL PDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK (서열 번호 : 20)

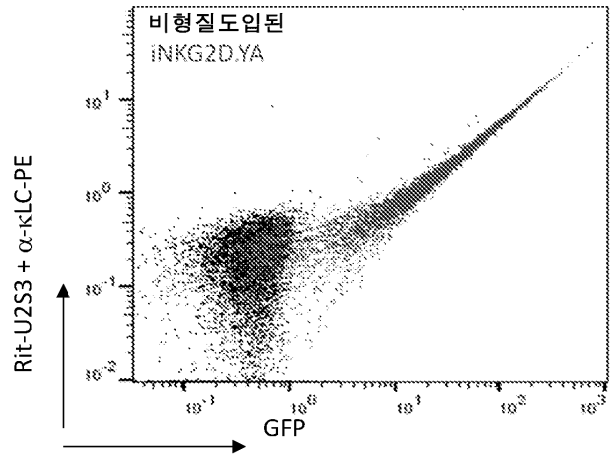
도면7a



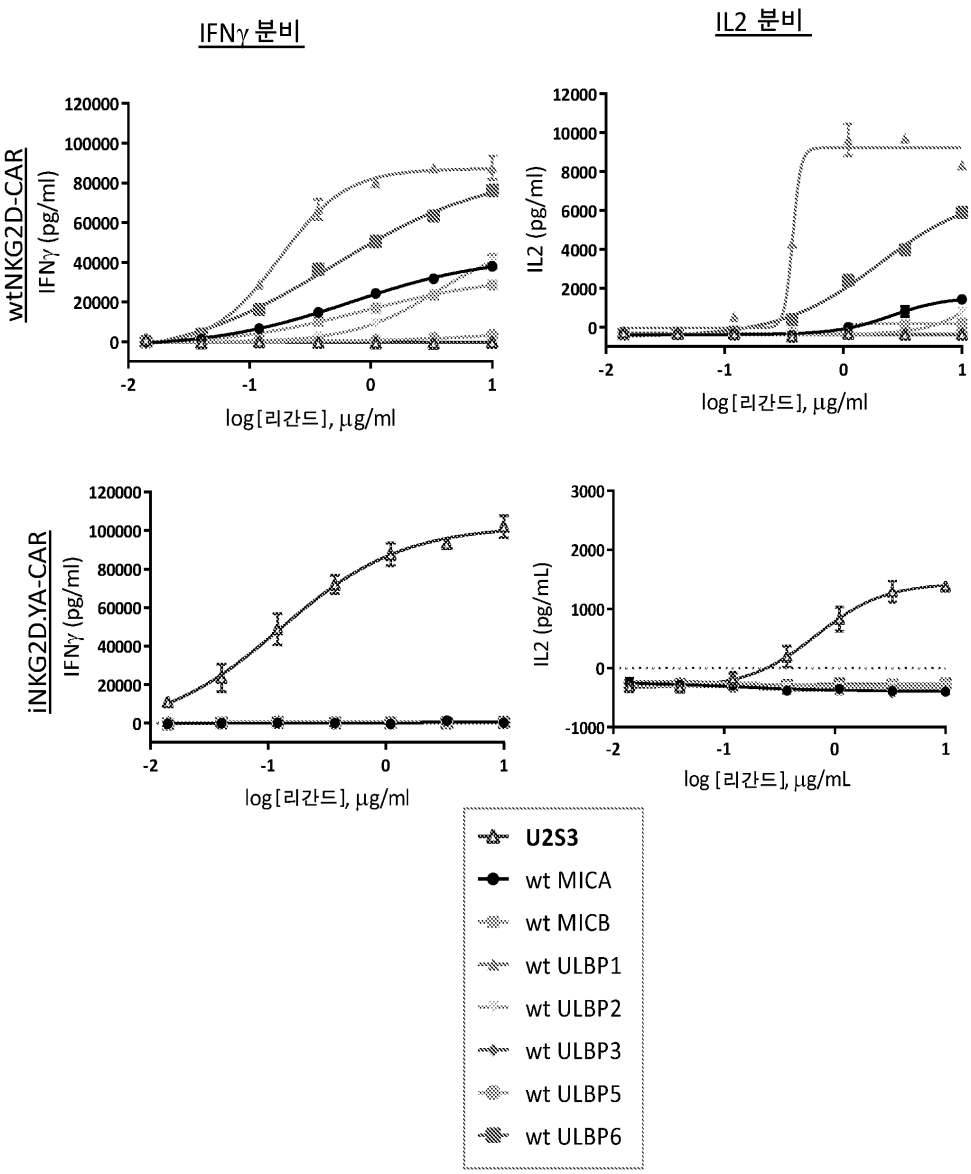
도면7b



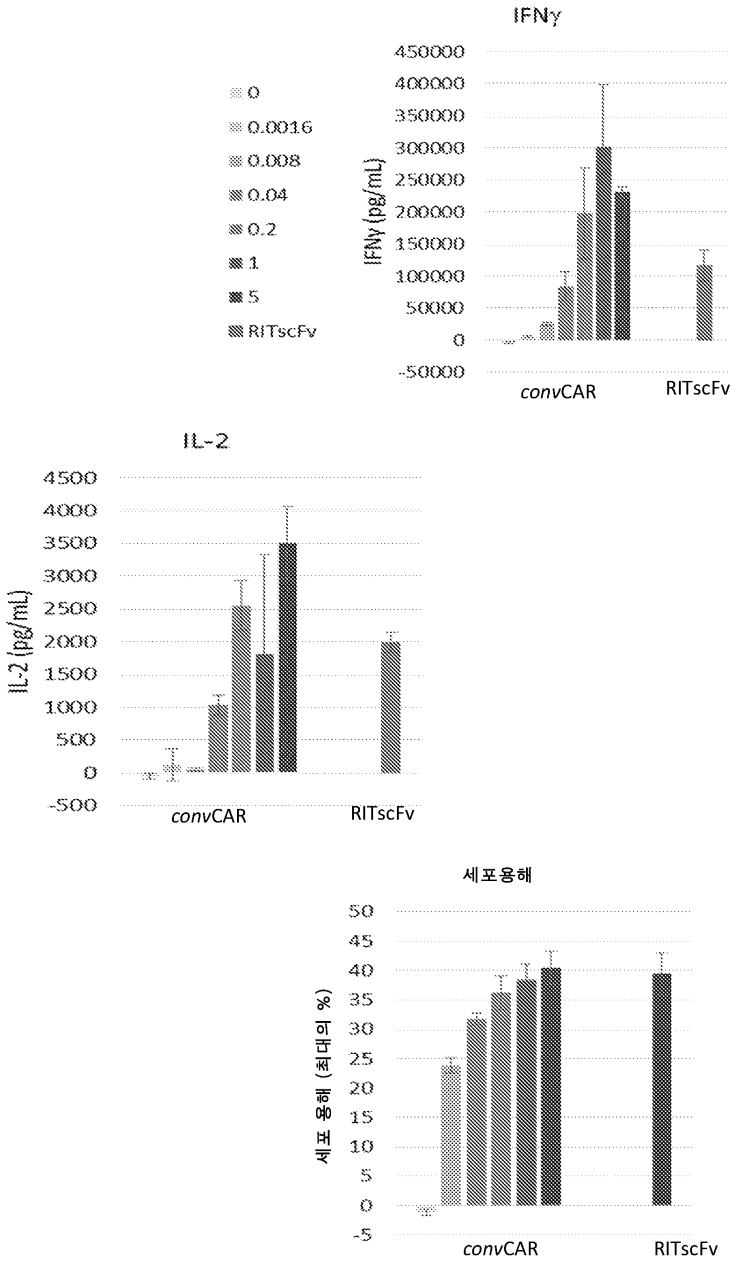
도면7c



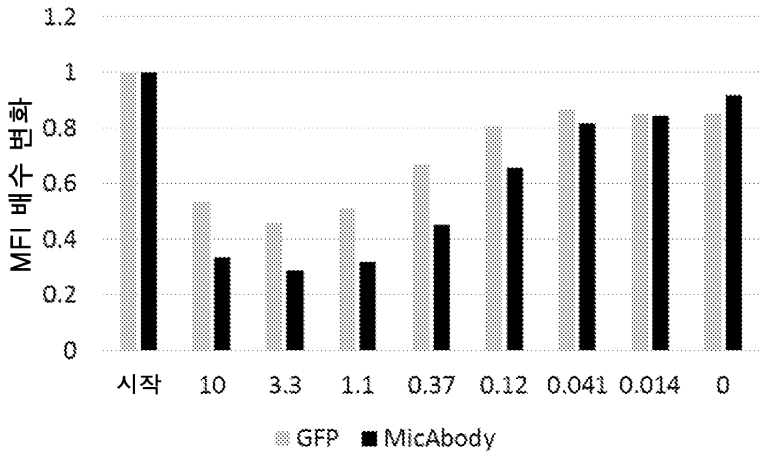
도면8a


IFNγ 분비
IL2 분비
wtNKG2D-CAR
IFNγ (pg/ml)
IL2 (pg/ml)
log[리간드], μg/ml
iNKG2D.YA-CAR
IFNγ (pg/ml)
IL2 (pg/mL)
log [리간드], μg/mL
U2S3
wt MICA
wt MICB
wt ULBP1
wt ULBP2
wt ULBP3
wt ULBP5
wt ULBP6

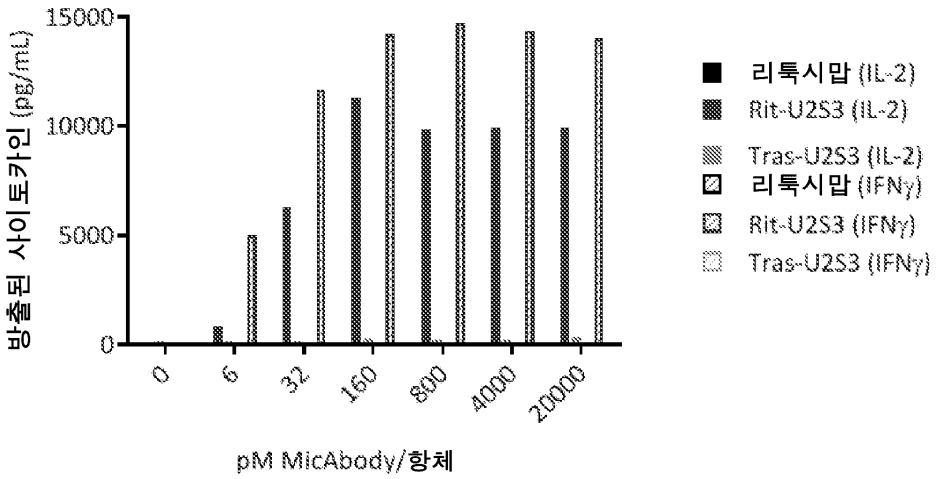
도면8b


IFNγ
0
0.0016
0.008
0.04
0.2
1
5
RITscFv
IFNγ (pg/mL)
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
-50000
convCAR
RITscFv
IL-2
IL-2 (pg/mL)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
convCAR
RITscFv
세포용해
세포 용해 (최대의 %)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
convCAR
RITscFv

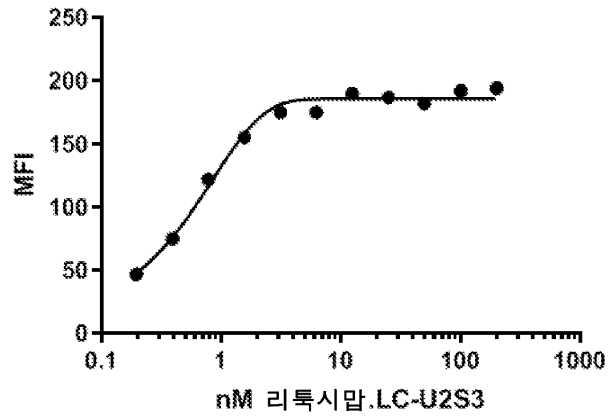
도면8c



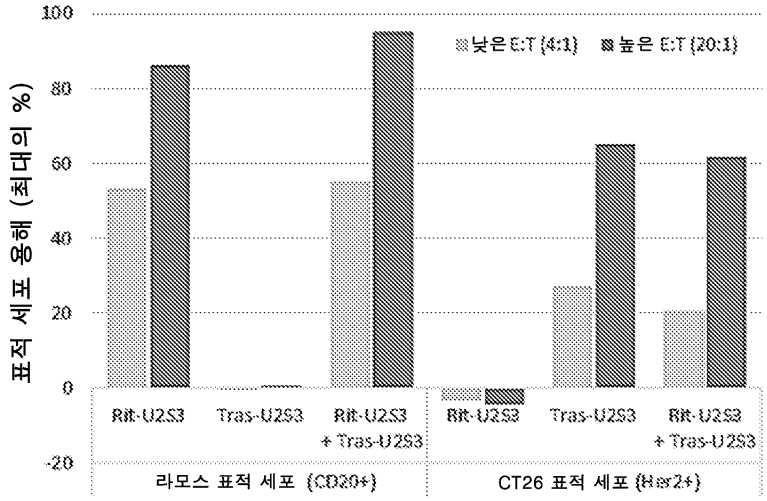
도면9a



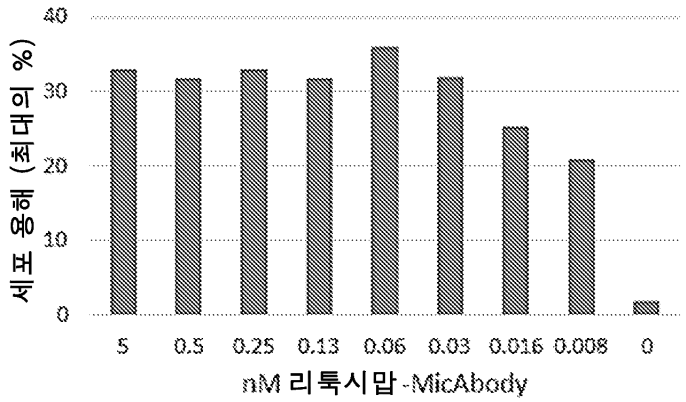
도면9b



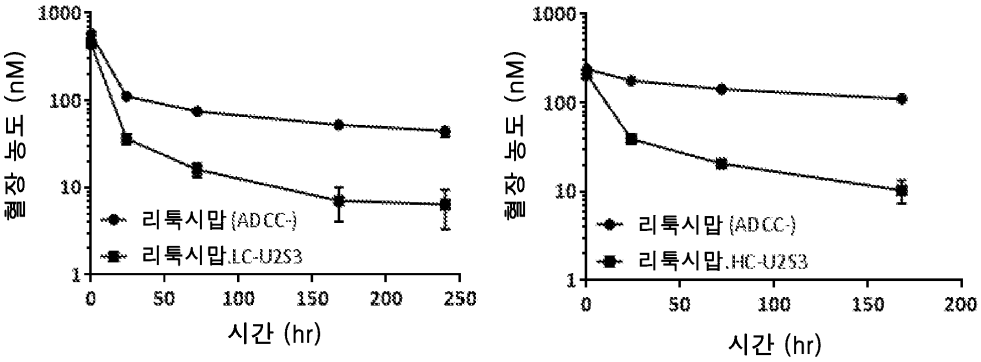
도면9c



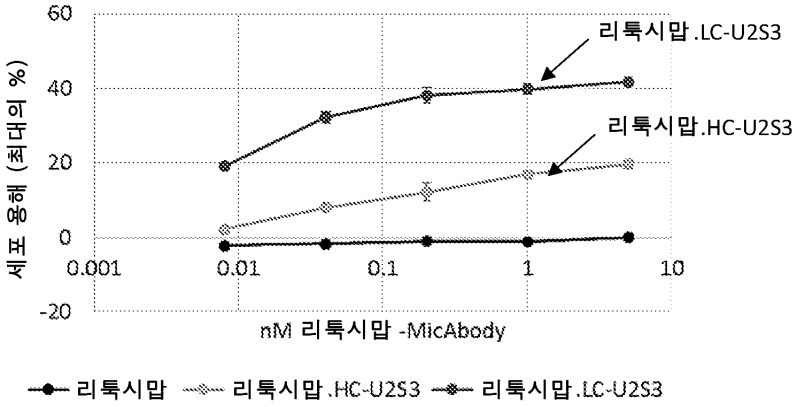
도면9d



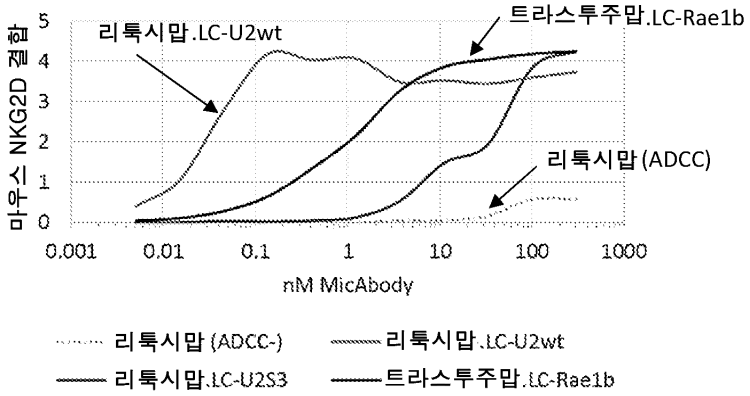
도면10a



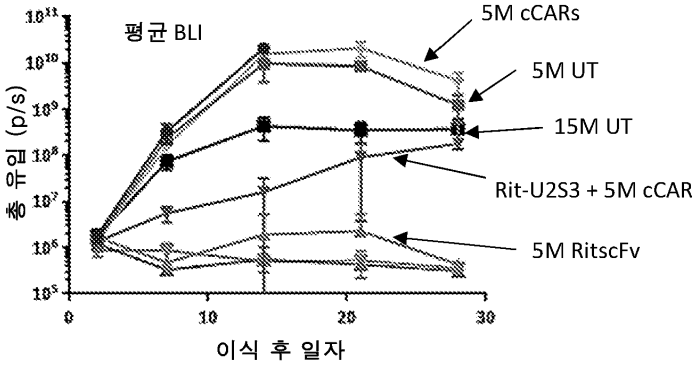
도면10b



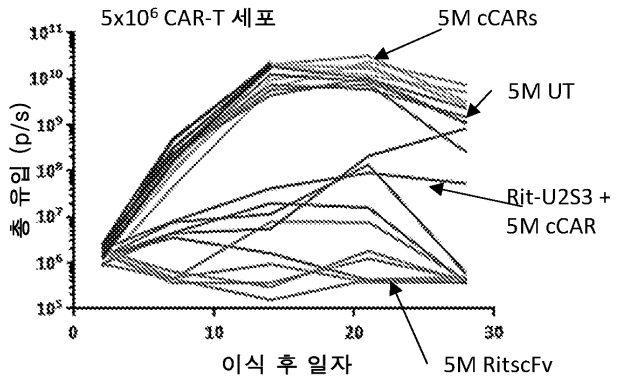
도면10c



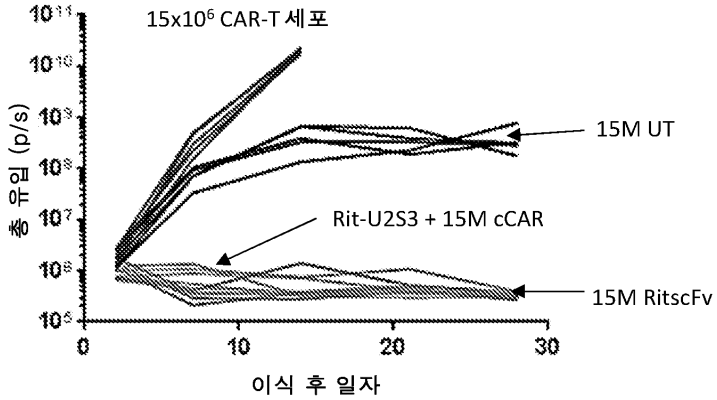
도면11a



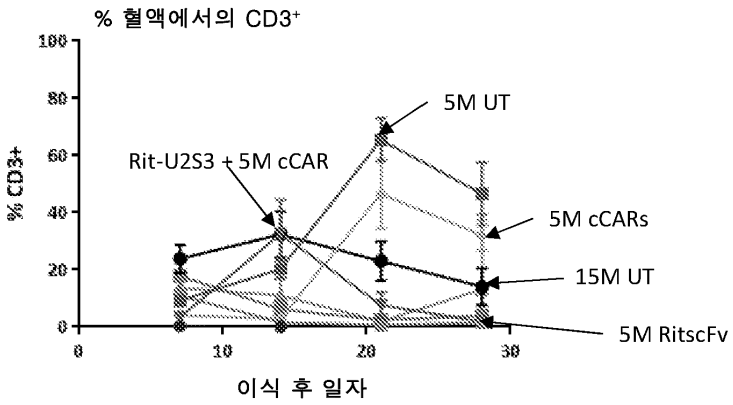
도면11b



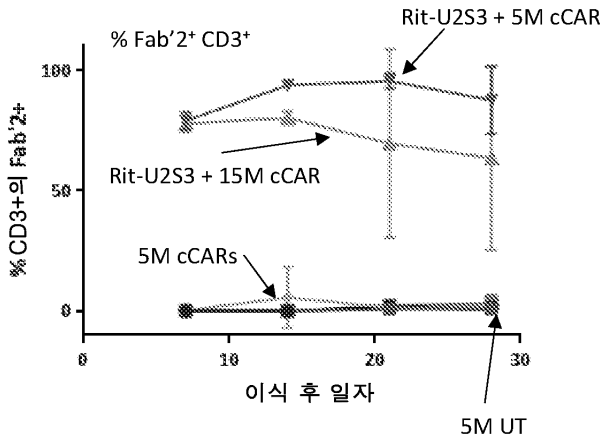
도면11c



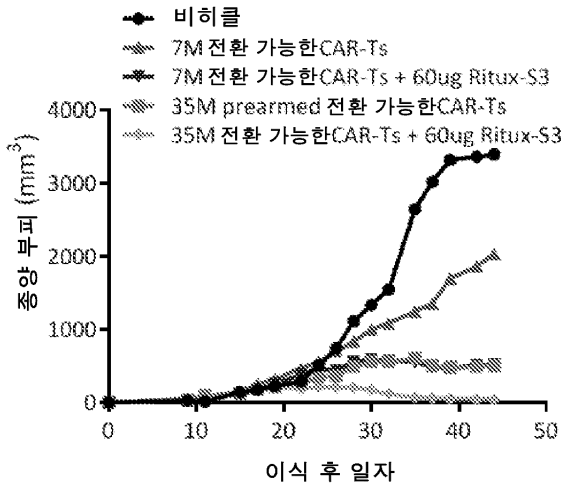
도면11d



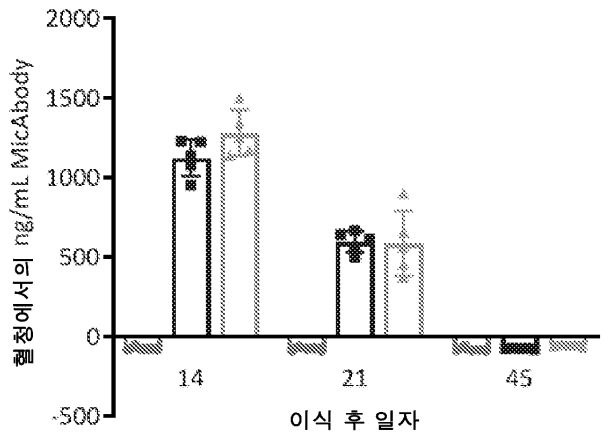
도면11e



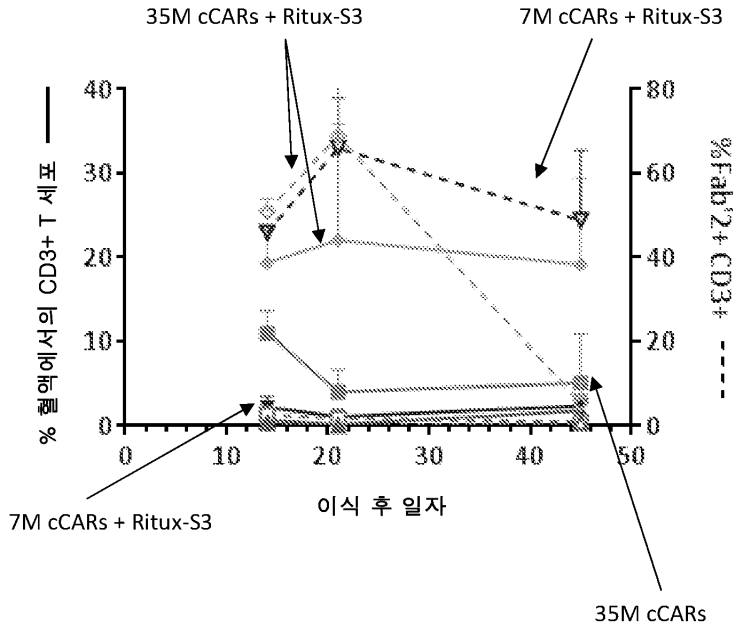
도면12a



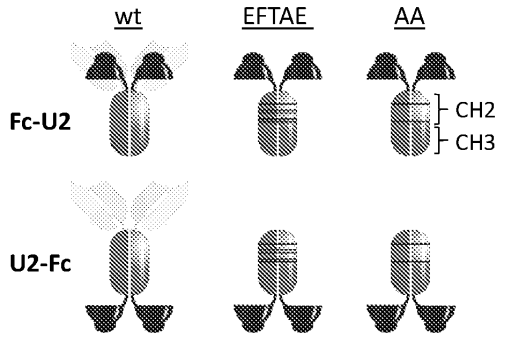
도면12b



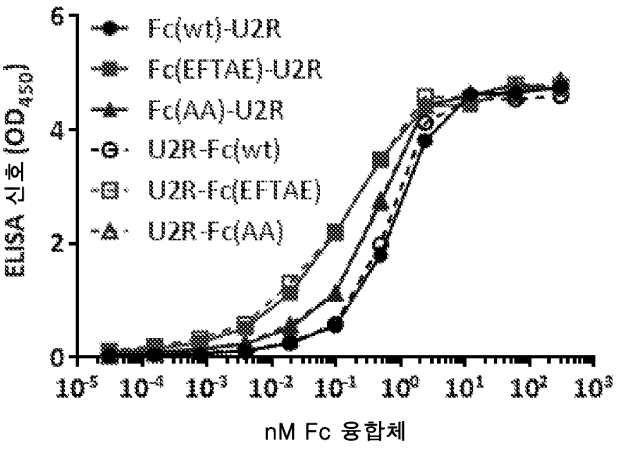
도면12c



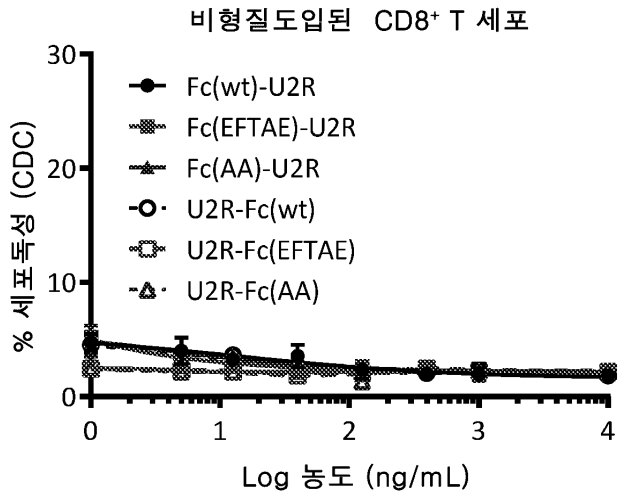
도면13a



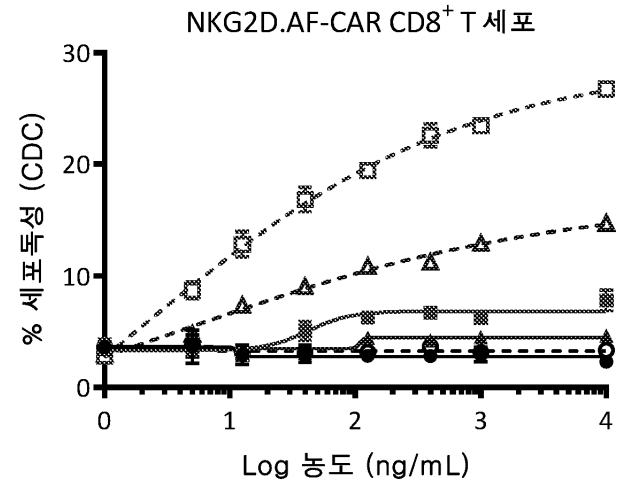
도면13b



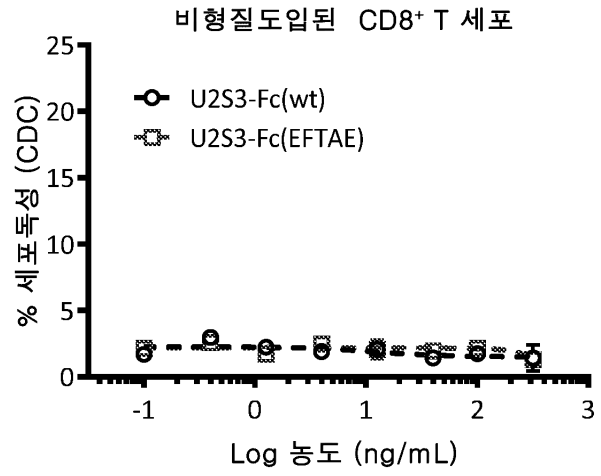
도면13c



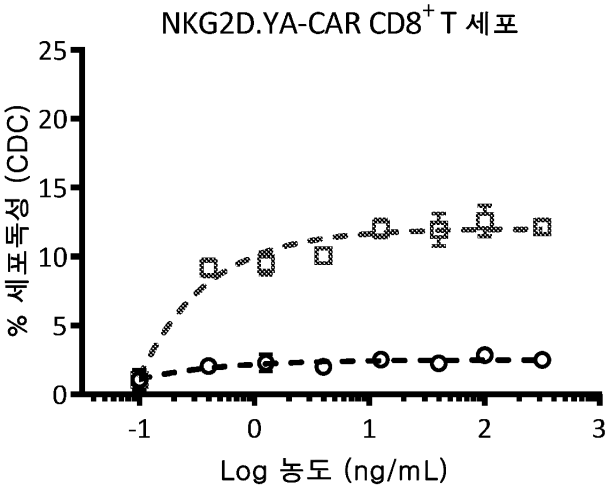
도면13d



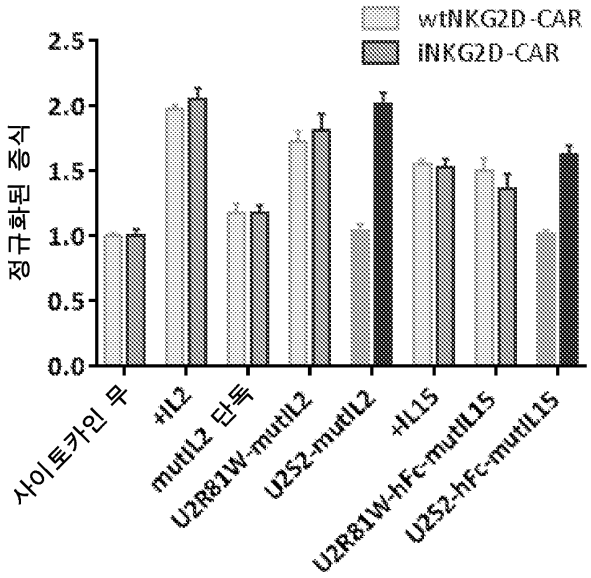
도면13e



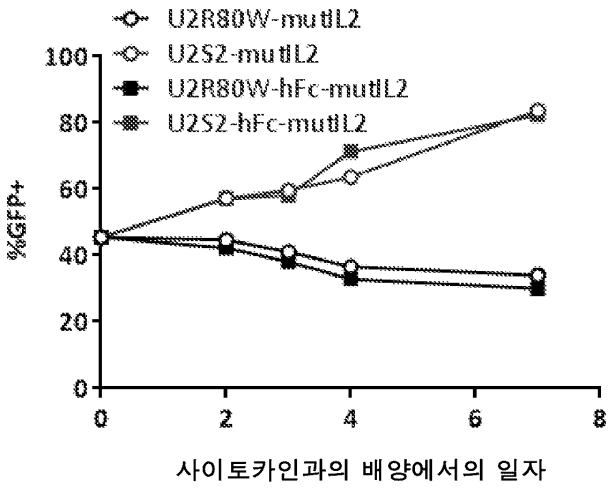
도면13f



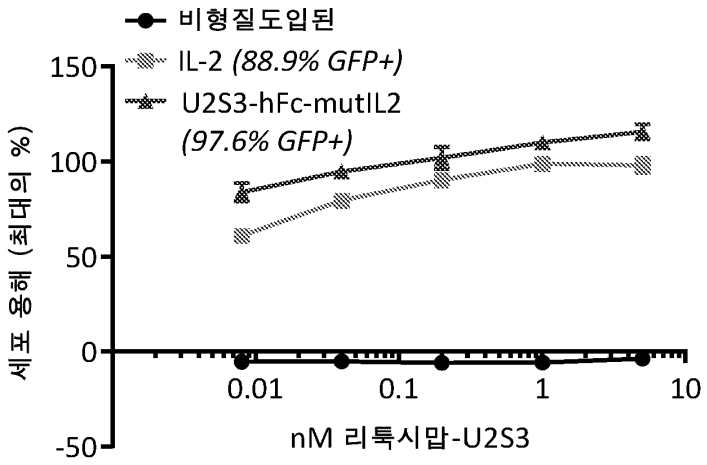
도면14a



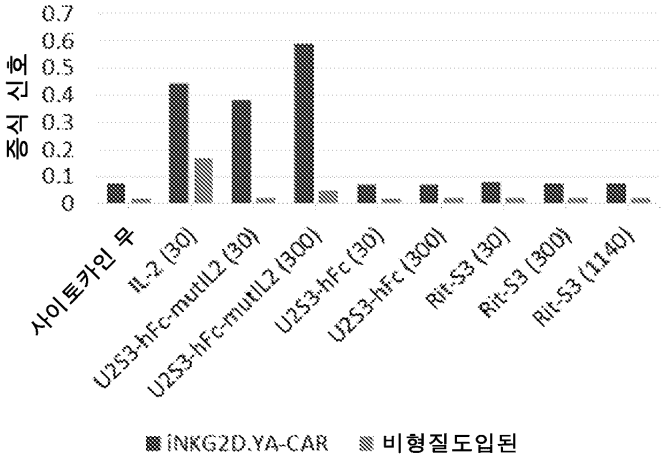
도면14b



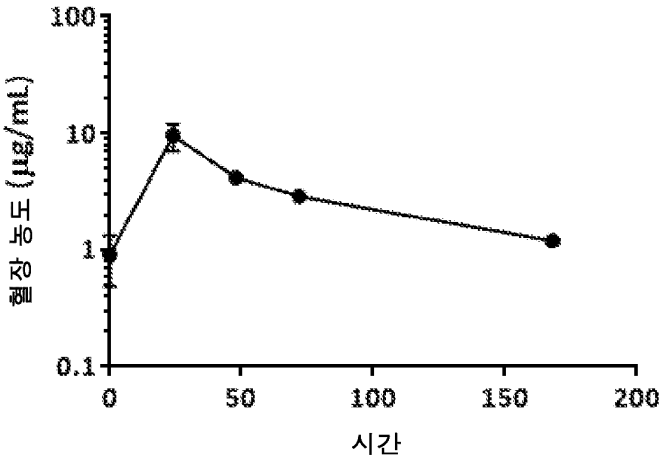
도면14c



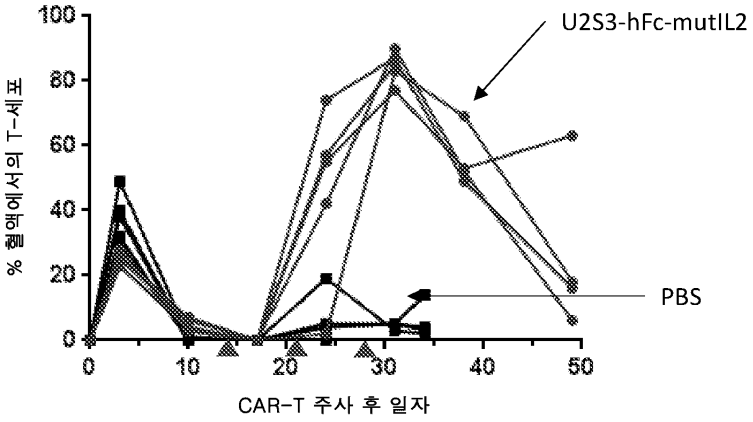
도면14d



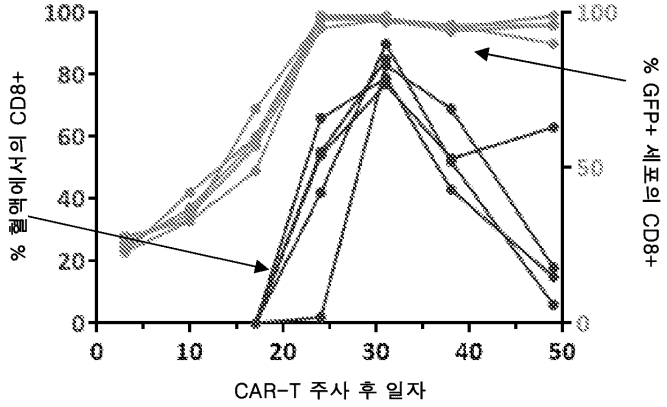
도면14e



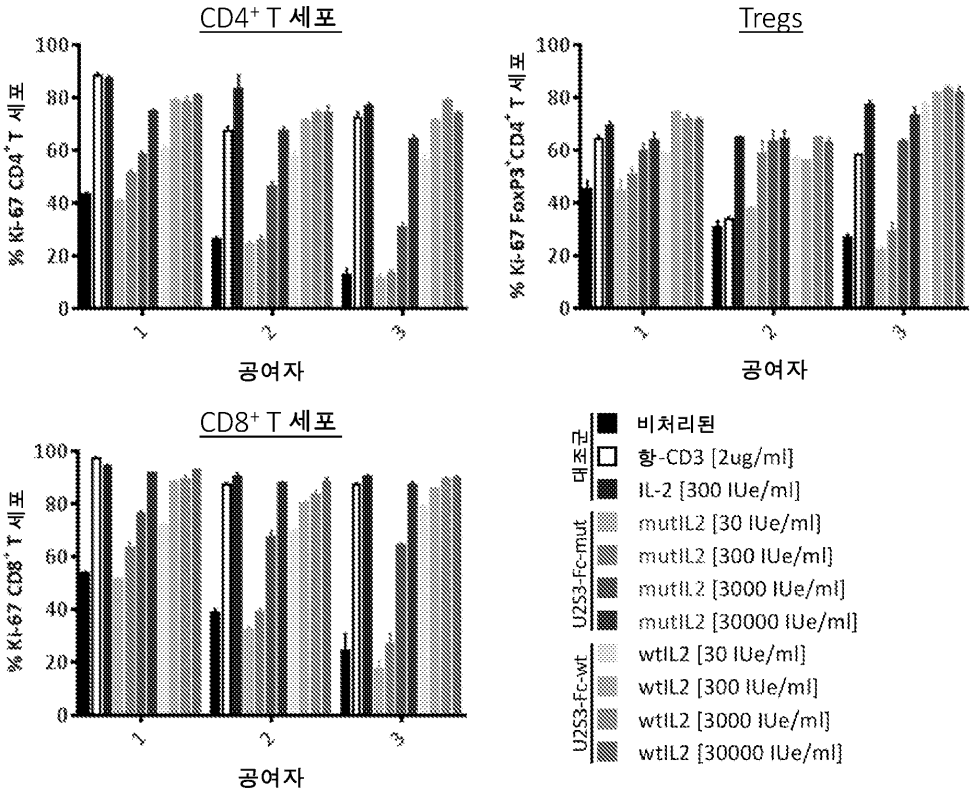
도면15a


U2S3-hFc-mutIL2
PBS
% 혈액에서의 T-세포
CAR-T 주사 후 일자

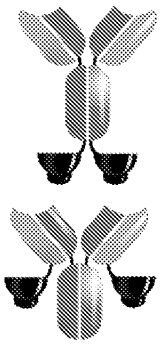
도면15b


% 혈액에서의 CD8+
% GFP+ 세포의 CD8+
CAR-T 주사 후 일자

도면16

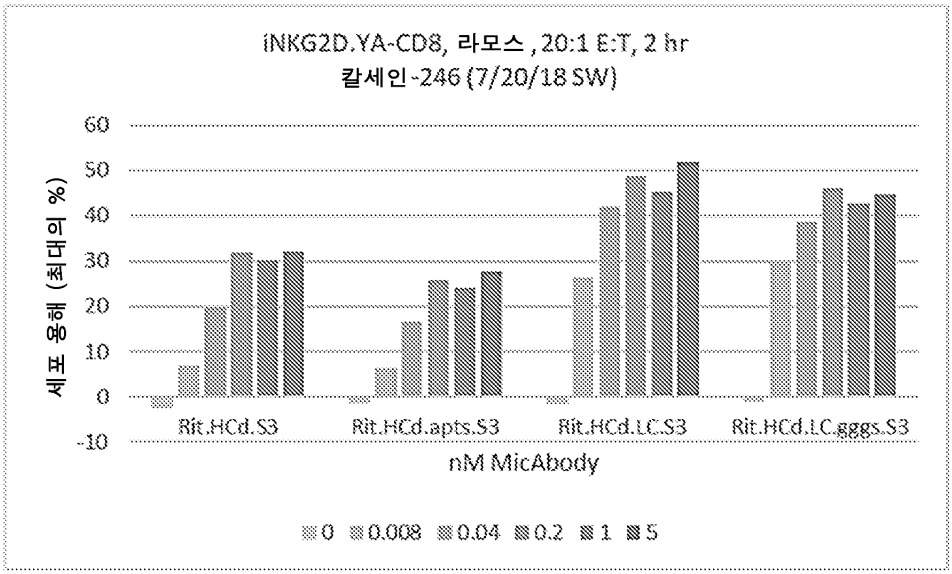


도면17a

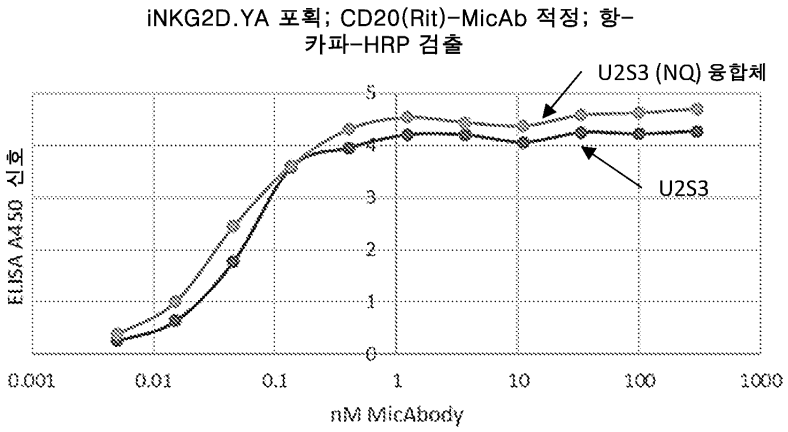


표지	U2S3 리간드 융합체
Ritux.HCd.S3	GGGs (서열 번호 14) 링커를 통한 중쇄의 C-말단에 대한 융합체
Ritux.HCd.apts.S3	APTSSSGGGGs (서열 번호 10) 링커를 통한 중쇄의 C-말단에 대한 융합체
Ritux.HCd.LC.S3	APTSSSGGGGs (서열 번호 10) 링커를 통한 경쇄의 C-말단에 대한 융합체
Ritux.HCd.LC.gggs.S3	GGGs (서열 번호 14) 링커를 통한 경쇄의 C-말단에 대한 융합체

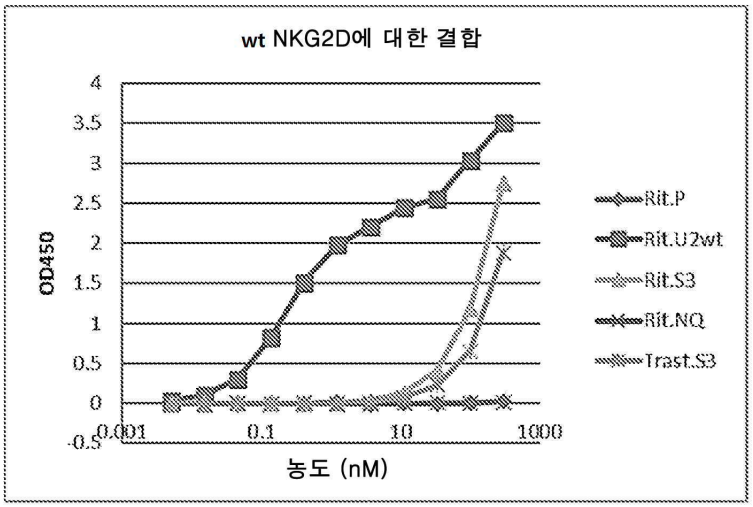
도면17b



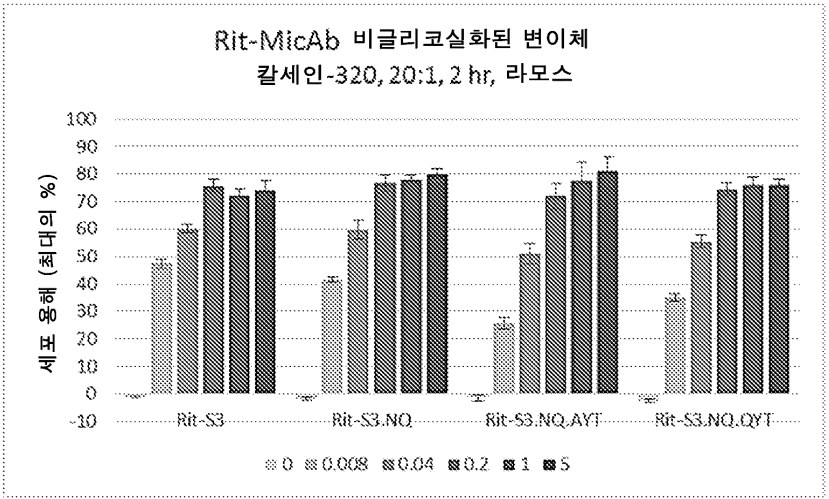
도면18



도면19



도면20



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> XYPHOS BIOSCIENCES INC.

<120> ANTIBODY-NKG2D LIGAND DOMAIN FUSION PROTEIN

<130> 33149/56867A/PC

<150> US 63/208,407

<151> 2021-06-08

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

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

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

20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala
115 120

<210> 2
<211> 329
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 2
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
1 5 10 15

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

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

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

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

<210> 3
<211> 329
<212> PRT
<
213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
1 5 10 15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
50 55 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

260 265 270

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

275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 4

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Met Met Arg Pro Ile Val Leu Val Leu Leu Phe Ala Thr Ser Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp

50 55 60

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys

65 70 75 80

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

85 90 95

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

100 105 110

Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp

115 120 125

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser

275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr

305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

355 360 365

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

370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

405 410 415

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

420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

450 455 460

Ser Pro Gly Lys

465

<210> 5

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Met Met Arg Pro Ile Val Leu Val Leu Leu Phe Ala Thr Ser Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp

50 55 60

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys

65 70 75 80

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

85 90 95

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

100 105 110

Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp

115 120 125

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala

245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro

340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

355 360 365

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

370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

405 410 415

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

420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

450 455 460

Ser Pro Gly Lys

465

<210> 6

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

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

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 7

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

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

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<

400> 11

Glu Pro His Ser Leu Ser Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Leu His Tyr Asp Cys Gly Gln Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro

35 40 45

Leu Gly Lys Lys Leu Gln Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro

50 55 60

Val Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Trp Asp Ile

65 70 75 80

Gln Leu Glu Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg

85 90 95

Met Ser Cys Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln

100 105 110

Phe Ser Phe Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg

115 120 125

Met Trp Thr Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp

130 135 140

Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Thr Lys Leu Tyr Leu Trp Ser Met Gly

145 150 155 160

Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr

165 170 175

Leu Glu Pro Ser

180

<210> 12

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Met Met Arg Pro Ile Val Leu Val Leu Leu Phe Ala Thr Ser Ala Leu

1 5 10 15

Ala Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro

20 25 30

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr

35 40 45

Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

180 185 190

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

195 200 205

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

210 215 220

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ala Pro Thr Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Glu Pro His Ser Leu Ser Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe

245 250 255

Arg Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys

260 265 270

Thr Phe Leu His Tyr Asp Cys Gly Gln Lys Thr Val Thr Pro Val Ser

275 280 285

Pro Leu Gly Lys Lys Leu Gln Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn

290 295 300

Pro Val Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Trp Asp

305 310 315 320

Ile Gln Leu Glu Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala

325 330 335

Arg Met Ser Cys Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp

340 345 350

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

355 360 365

Arg Met Trp Thr Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys

370 375 380

Trp Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Thr Lys Leu Tyr Leu Trp Ser Met

385 390 395 400

Gly Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser
405 410 415
Thr Leu Glu Pro Ser
420

<210> 13
<211> 404
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 13

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

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

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

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

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

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

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

Leu Glu Pro Ser

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 15

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Gly
1 5 10 15

Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln Phe
20 25 30

Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met Ser
35 40 45

Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp Leu
50 55 60

Leu Lys Leu Val Lys Ser Ala His Trp Met Gly Leu Val His Ile Pro
65 70 75 80

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

Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr Ala
100 105 110

Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr Tyr
115 120 125

Ile Cys Met Gln Arg Thr Val
130 135

<210> 16

<211> 71

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

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

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

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

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
50 55 60

Ile Thr Leu Tyr Cys Ser Leu
65 70

<210> 17

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

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> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr 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> 19

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

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

1 5 10 15

Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln Phe

20 25 30

Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met Ser

35 40 45

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

50 55 60

Leu Lys Leu Val Lys Ser Ala His Trp Met Gly Leu Val His Ile Pro

65 70 75 80

Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro Asn

85 90 95

Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr Ala

100 105 110

Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr Tyr

115 120 125

Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
340 345 350

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360

<210> 20

<211> 629

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

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 Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
20 25 30

Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
35 40 45

Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
50 55 60

Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
65 70 75 80

Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Ala His Trp Met Gly
85 90 95

Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
115 120 125

Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
130 135 140

Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
145 150 155 160

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
165 170 175

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
180 185 190

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
195 200 205

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
210 215 220

Cys Ser Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
225 230 235 240

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
245 250 255

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
260 265 270

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln
275 280 285

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
290 295 300

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
305 310 315 320

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
325 330 335

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
340 345 350

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
355 360 365

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ser Gly Ser
370 375 380

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr
385 390 395 400

Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His
405 410 415

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

420 425 430

Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp
435 440 445

Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg
450 455 460

Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro
465 470 475 480

Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn
485 490 495

Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn
500 505 510

Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu
515 520 525

Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met
530 535 540

Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His
545 550 555 560

Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
565 570 575

Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
580 585 590

Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
595 600 605

Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
610 615 620

Asp Glu Leu Tyr Lys
625

<210> 21

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Ala Ala Thr Tyr
85

<210> 22

<211> 1410

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Synthetic

<400> 22

atgatgcggc caattgtcct cgtgctcctt ttcgccacct ccgccctcgc tcaagttcag 60

cttcagcagc cgggggctga gttggtgaaa cccggggcca gtgtgaagat gagctgtaaa 120

gcgagcggct acaccttcac ttcttataat atgcattggg ttaagcaaac gccaggaagg 180

gggctggagt ggatcggcgc tatttaccca ggtaacggtg acacatcata taaccaaaag 240

tttaagggaa aggcaaccct cacagcggac aagagtagct caaccgcata catgcaactg 300

tcaagcctta cctccgaaga cagcgcagtg tactactgcg ccagaagcac ctactatggg 360

ggtgattggt acttcaacgt ctgggggggct ggcaccacag tgactgtaag cgcagcgtcg 420

accaagggcc cgtcagtgtt cccgctggcc ccgtcatcca agtccacgtc tgggggcaca 480

gcagccctgg gatgcttggt caaggactac ttccccgagc ccgtgactgt gtcctggaac 540

tccggagcac tgacctccgg agtgcacacc tttcccgcgg tgctgcagtc ctccggactg 600

tactccctgt cgtcggtcgt gaccgtgccg agctcctcgc tcggaaccca gacctacatc 660

tgcaacgtga accacaagcc ctcgaacacc aaagtggaca agaaggtcga gcccaaaagc 720

tgcgacaaga ctcacacttg tccgccgtgc cccgcccccg aactgctggg tggcccctcc 780

gtgttcctgt tcccgcctaa gcctaaggac acccttatga tcagccgcac ccctgaagtg 840

acctgtgtcg tcgtggcagt gtcacacgag gacccggagg tcaagttcaa ttggtacgtg 900

gacggcgtgg aagtgcataa cgcaaagacc aagcctcggg aggaacagta cgcctcgacc 960

taccgcgtgg tgtcagtcct gactgtgctg caccaggact ggctgaacgg gaaggagtac 1020

aagtgcaaag tgtcgaacaa ggccctgccg gctccaattg aaaagaccat cagcaaggcc 1080

aagggccagc caagggaacc acaggtgtac accctccctc cttcccggga cgagctgacc 1140

aaaaaccaag tgtccctgac ttgccttgtg aaggggttct acccttctga cattgccgtc 1200

gaatgggaat cgaacggaca gcctgaaaac aactataaga ctaccccgcc cgtgctggat 1260

tccgacggaa gcttcttcct gtactccaag ctgaccgtgg acaagtcgag atggcagcag 1320

ggaaatgtgt tcagctgctc cgtgatgcat gaggcgctgc acaaccacta cacccagaag 1380

tcactgagcc tctccccgg aaagtagtga 1410

<210> 23

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

caagttcagc ttcagcagcc gggggctgag ttggtgaaac ccggggccag tgtgaagatg 60

agctgtaaag cgagcggcta caccttcact tcttataata tgcattgggt taagcaaacg 120

ccaggaaggg ggctggagtg gatcggcgct atttacccag gtaacggtga cacatcatat 180

aaccaaaagt ttaagggaaa ggcaaccctc acagcggaca agagtagctc aaccgcatac 240

atgcaactgt caagccttac ctccgaagac agcgcagtgt actactgcgc cagaagcacc 300

tactatgggg gtgattggta cttcaacgtc tgggggggctg gcaccacagt gactgtaagc 360

gca 363

<210> 24

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

gcgtcgacca agggcccgtc agtgttcccg ctggccccgt catccaagtc cacgtctggg 60

ggcacagcag ccctgggatg cttggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gactgtgtcc 120

tggaactccg gagcactgac ctccggagtg cacacctttc ccgcggtgct gcagtcctcc 180
ggactgtact ccctgtcgtc ggtcgtgacc gtgccgagct cctcgctcgg aacccagacc 240
tacatctgca acgtgaacca caagccctcg aacaccaaag tggacaagaa ggtcgagccc 300
aaaagctgcg acaagactca cacttgtccg ccgtgccccg cccccgaact gctgggtggc 360
ccctccgtgt tcctgttccc gcctaagcct aaggacaccc ttatgatcag ccgcacccct 420
gaagtgacct gtgtcgtcgt ggcagtgtca cacgaggacc cggaggtcaa gttcaattgg 480
tacgtggacg gcgtggaagt gcataacgca aagaccaagc ctcgggagga acagtacgcc 540

tcgacctacc gcgtggtgtc agtcctgact gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 600
gagtacaagt gcaaagtgtc gaacaaggcc ctgccggctc caattgaaaa gaccatcagc 660
aaggccaagg gccagccaag ggaaccacag gtgtacaccc tccctccttc ccgggacgag 720
ctgaccaaaa accaagtgtc cctgacttgc cttgtgaagg ggttctaccc ttctgacatt 780
gccgtcgaat gggaatcgaa cggacagcct gaaaacaact ataagactac cccgcccgtg 840
ctggattccg acggaagctt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcgagatgg 900
cagcagggaa atgtgttcag ctgctccgtg atgcatgagg cgctgcacaa ccactacacc 960

cagaagtcac tgagcctctc ccccggaaag 990

<210> 25
<211> 1269
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 25

atgatgcgcc ccatcgtgct cgtgctcctt ttcgctacct ccgccctcgc ccagatcgtg 60
ttgtcccaat cacccgcaat tctctctgcg agcccagggg agaaggtgac catgacttgc 120
cgcgcttcaa gttccgtatc ctacattcac tggttccagc agaagcccgg aagttccgct 180
aagccctgga tctatgctac atccaatctg gcaagcggtg ttcccgttag attttccgga 240
agcgggtctg gaaccagtta cagtctgact atttccaggg tcgaggccga agatgcggct 300

acttattatt gccaacagtg gacctctaac ccacccacat tcggcggcgg cactaagttg 360
gaaattaagc ggaccgtggc cgccccgagc gtgttcattt tccctccctc cgacgagcag 420
ttgaaatcgg gcaccgctag cgtggtctgc cttctcaaca atttctatcc acgggaagcc 480
aaagtgcagt ggaaggtcga caacgcgctc caatccggga actcacagga atccgtgact 540

gagcaggatt ccaaggactc gacctactcc ctgtcatcca cgctgaccct gagcaaggca 600

gactacgaga agcacaaggt ctacgcctgc gaagtgacac accagggact gtccagcccc 660

gtgaccaaga gcttcaacag aggagaatgc gcacctacct caagctctgg aggaggtggc 720

agcgagcccc atagtctgag ctacgacatc acagttattc ccaagttcag gcccggaccg 780

cgctggtgtg ccgtgcaagg acaagtcgac gaaaaaacct ttcttcatta cgattgcgga 840

cagaagactg taacgccagt ctctccttta ggtaagaagt tacaggtcac tacggcgtgg 900

aaggcacaaa accccgtcct gcgcgaggtc gtcgacatcc tgactgaaca attgtgggac 960

atccagctcg agaattacac tccaaaggag cctcttaccc tgcaggctag aatgtcttgc 1020

gagcaaaagg cagagggcca ctcctccggc agctggcagt tcagtttcga cggacaaatc 1080

tttctgttat tcgattcaga gaagagaatg tggactacag ttcaccccgg tgcccgtaaa 1140

atgaaggaga agtgggaaaa cgacaaagtg gtggcgacta agctttatct ttggtcgatg 1200

ggagactgca tcggttggct ggaagatttc ctcatgggta tggactccac tttggagcca 1260

tcgtagtga 1269

<210> 26

<211> 317

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

agatcgtgtt gtcccaatca cccgcaattc tctctgcgag cccaggggag aaggtgacca 60

tgacttgccg cgcttcaagt tccgtatcct acattcactg gttccagcag aagcccggaa 120

gttcccctaa gccctggatc tatgctacat ccaatctggc aagcggtgtt cccgttagat 180

tttccggaag cgggtctgga accagttaca gtctgactat ttccagggtc gaggccgaag 240

atgcggctac ttattattgc caacagtgga cctctaaccc acccacattc ggcggcggca 300

ctaagttgga aattaag 317

<210> 27

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

cggaccgtgg ccgccccgag cgtgttcatt ttccctccct ccgacgagca gttgaaatcg 60

ggcaccgcta gcgtggtctg ccttctcaac aatttctatc cacgggaagc caaagtgcag 120

tggaaggtcg acaacgcgct ccaatccggg aactcacagg aatccgtgac tgagcaggat 180

tccaaggact cgacctactc cctgtcatcc acgctgaccc tgagcaaggc agactacgag 240

aagcacaagg tctacgcctg cgaagtgaca caccagggac tgtccagccc cgtgaccaag 300

agcttcaaca gaggagaatg c 321

<210> 28

<211> 540

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

gagccccata gtctgagcta cgacatcaca gttattccca agttcaggcc cggaccgcgc 60

tggtgtgccg tgcaaggaca agtcgacgaa aaaacctttc ttcattacga ttgcggacag 120

aagactgtaa cgccagtctc tcctttaggt aagaagttac aggtcactac ggcgtggaag 180

gcacaaaacc ccgtcctgcg cgaggtcgtc gacatcctga ctgaacaatt gtgggacatc 240

cagctcgaga attacactcc aaaggagcct cttaccctgc aggctagaat gtcttgcgag 300

caaaaggcag agggccactc ctccggcagc tggcagttca gtttcgacgg acaaatcttt 360

ctgttattcg attcagagaa gagaatgtgg actacagttc accccggtgc ccgtaaaatg 420

aaggagaagt gggaaaacga caaagtggtg gcgactaagc tttatctttg gtcgatggga 480

gactgcatcg gttggctgga agatttcctc atgggtatgg actccacttt ggagccatcg 540

<210> 29

<211> 404

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

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

Phe Leu His Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro
260 265 270
Leu Gly Lys Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro
275 280 285
Val Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Trp Asp Ile

290 295 300

Gln Leu Glu Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg
305 310 315 320

Met Ser Cys Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln
325 330 335

Phe Ser Phe Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg
340 345 350

Met Trp Thr Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp
355 360 365

Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Thr Lys Leu Tyr Leu Trp Ser Met Gly
370 375 380

Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr
385 390 395 400

Leu Glu Pro Ser

<210> 30
<211> 179
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 30

Glu Pro His Ser Leu Ser Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg
1 5 10 15

Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr
20 25 30

Phe Leu His Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro
35 40 45

Leu Gly Lys Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro
50 55 60

Val Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Trp Asp Ile
65 70 75 80

Gln Leu Glu Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg

85 90 95

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

Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr
165 170 175
Leu Glu Pro

<210> 31
<211> 179
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 31
Glu Pro His Ser Leu Ser Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg
1 5 10 15
Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr
20 25 30

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

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

Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr
165 170 175
Leu Glu Pro

<210> 32
<211> 179
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 32
Glu Pro His Ser Leu Ser Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg
1 5 10 15
Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr
20 25 30

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

Met Ser Cys Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln
100 105 110

Phe Ser Phe Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg
115 120 125

Met Trp Thr Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp
130 135 140

Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Thr Lys Leu Tyr Leu Trp Ser Met Gly
145 150 155 160

Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr
165 170 175

Leu Glu Pro