



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2018-0021137  
(43) 공개일자 2018년02월28일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C12N 5/0783 (2010.01) C07K 14/705 (2006.01)<br/>C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C12N 5/0636 (2013.01)<br/>C07K 14/7051 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7002389</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년06월24일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2018년01월25일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/039306</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/210293<br/>국제공개일자 2016년12월29일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>62/184,321 2015년06월25일 미국(US)<br/>(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인<br/>아이셀 진 테라퓨틱스 엘엘씨<br/>미국 11794 뉴욕주 스토니 브룩 헬스 사이언스 드라이브 25</p> <p>(72) 발명자<br/>마, 유포<br/>미국 11790 뉴욕주 스토니 브룩 헬스 사이언스 드라이브 25 아이셀 진 테라퓨틱스 엘엘씨<br/>핀즈, 케빈<br/>미국 11790 뉴욕주 스토니 브룩 헬스 사이언스 드라이브 25 아이셀 진 테라퓨틱스 엘엘씨<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>양영준, 이상남</p> |
|---|--|

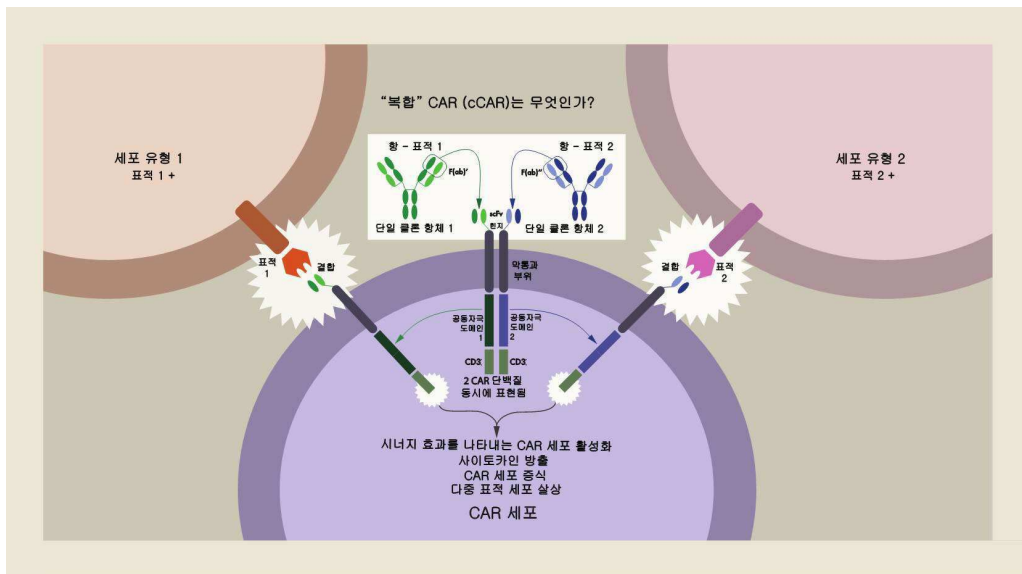
전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 발명의 명칭 **키메라 항원 수용체 (CAR), 조성물 및 이의 사용 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR) 폴리펩타이드에 관련되는 조성물 및 방법 및 이에 연관되는 방법에 관한 것이다. 한 실시 양태에서, 본 발명은 적어도 2개의 표적에 지시되는 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 갖는 조작된 세포에 관한 것이다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 인핸서 모이 어터를 갖는 조작된 세포에 관한 것이다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류

*C07K 14/70517* (2013.01)  
*C07K 14/70521* (2013.01)  
*C07K 14/70578* (2013.01)  
*C07K 16/289* (2013.01)  
*C12N 5/0646* (2013.01)  
*C07K 2319/02* (2013.01)  
*C07K 2319/03* (2013.01)  
*C07K 2319/50* (2013.01)  
*C12N 2510/00* (2013.01)

(30) 우선권주장

62/235,840 2015년10월01일 미국(US)  
62/244,435 2015년10월21일 미국(US)

(72) 발명자

**장, 원**

미국 11790 뉴욕주 스톤 브룩 헬스 사이언시즈  
드라이브 25 아이셀 진 테라퓨틱스 엘엘씨

**와다, 마사유키**

미국 11790 뉴욕주 스톤 브룩 헬스 사이언시즈  
드라이브 25 아이셀 진 테라퓨틱스 엘엘씨

**첸, 케빈**

미국 11790 뉴욕주 스톤 브룩 헬스 사이언시즈  
드라이브 25 아이셀 진 테라퓨틱스 엘엘씨

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(i.) 제1 항원 인식 도메인, 제1 신호 펩타이드, 제1 힌지 영역, 제1 막통과(transmembrane) 도메인, 제1 보조 자극 도메인, 그리고 제1 신호전달 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드; 및

(ii.) 제2 항원 인식 도메인, 제2 신호 펩타이드, 제2 힌지 영역, 제2 막통과 도메인, 제2 보조 자극 도메인, 그리고 제2 신호전달 도메인을 포함하는 제2 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드

를 포함하며, 여기서 제1 항원 인식 도메인 및 제2 항원 인식 도메인은 상이한 것인, 조작된 세포.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 제2 키메라 조작된 폴리펩타이드는 단일 폴리펩타이드 분자 상에 존재하고, 고효율 절단 부위를 포함하는 아미노산 서열은 제1 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드와 제2 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 사이에 배치되는 것인, 조작된 세포.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 고효율 절단 부위는 P2A, T2A, E2A, 및 F2A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 보조-자극 도메인 및 제2 보조-자극 도메인은 상이한 것인, 조작된 세포.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 보조 자극 도메인은 CD28을 포함하고, 제2 보조 자극 도메인은 4-1BB를 포함하는 것인, 조작된 세포.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파 태아단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BCMA, BAFF-R, BCMA, TACI, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파 태아단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BCMA, BAFF-R, BCMA, TACI, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD267 또는 CD269를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CD19, CD38, CD138, CD138 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포.

#### 청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD19를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CD20, CD22, CD33, CD123, CD267, CD269, CD38 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포.

**청구항 9**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD19를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CD20, CD22 및 CD123으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포.

**청구항 10**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD33을 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 LeY 또는 CD123을 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 11**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 BCMA를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CS1, CD19, CD38, CD138 또는 CS1을 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포 또는 자연 살상(Natural Killer) 세포인, 조작된 세포.

**청구항 13**

제12항에 있어서, T 세포는 CD4 T 세포 또는 CD8 T 세포인, 조작된 세포.

**청구항 14**

제12항에 있어서, 자연 살상 세포는 NKT 세포 또는 NK-92 세포인, 조작된 세포.

**청구항 15**

키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 인헨서를 포함하는 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD45 및 CD52로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적에 대해 선택적인 하나의 항원 인식 도메인을 포함하는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적에 대해 선택적인 하나의 항원 인식 도메인을 포함하는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 CD45 항원 인식 도메인을 포함하는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 19**

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인헨서는 PD-1, PD-L1, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, TIGIT, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, 이들의 기능적 단편, 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 20**

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 인헨서 수용체 또는 이의 기능적 단편을 추가로 포함하는 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 인헨서 수용체는 IL-15RA 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 기능적 단편은 스시 (sushi) 도메인을 포함하는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 23**

제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 인헨서는 단일 폴리펩타이드 분자 상에 존재하는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 고효율 절단 부위는 키메라 항원 수용체와 인헨서 사이에 배치되는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 고효율 절단 부위는 P2A, T2A, E2A 및 F2A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 26**

제15항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 CD2, CD4 및 CD19로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적에 대해 선택적인 하나의 항원 인식 도메인을 포함하고, 인헨서는 IL-15 또는 IL-15RA를 포함하는 것인, 조작된 폴리펩타이드.

**청구항 27**

제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 조작된 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 벡터 안에 존재하는 조작된 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 29**

제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 세포.

**청구항 30**

제24항 또는 제25항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조작된 세포.

**청구항 31**

제29항 또는 제30항에 있어서, T 세포 또는 자연 살상 세포를 포함하는 조작된 세포.

**청구항 32**

제31항에 있어서, T 세포 또는 자연 살상 세포인 조작된 세포.

**청구항 33**

제32항에 있어서, T 세포는 CD4 또는 CD8 T 세포인, 조작된 세포.

**청구항 34**

제31항에 있어서, 자연 살상 세포는 NKT 세포 또는 NK-92 세포인, 조작된 세포.

**청구항 35**

제1항 내지 제15항 및 제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포를 B 세포 림프종의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 B 세포 림프종의 치료 방법.

**청구항 36**

제1항 내지 제15항 및 제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포를 T 세포 림프종의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 T 세포 림프종의 치료 방법.

**청구항 37**

제1항 내지 제15항 및 제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포를 다발성 골수종의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 다발성 골수종의 치료 방법.

**청구항 38**

제1항 내지 제15항 및 제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포를 만성 골수성 백혈병의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료 방법이며, 여기서 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD33을 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CD123을 포함하는 것인, 만성 골수성 백혈병의 치료 방법.

**청구항 39**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포를 B-세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL)의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 B-세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL)의 치료 방법이며, 여기서 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD19를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CD123을 포함하는 것인, B-세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL)의 치료 방법.

**청구항 40**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포를 다발성 골수종의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 다발성 골수종의 치료 방법이며, 여기서 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD38, CS1, BCMA, 및 CD38로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CD38, CS1, BCMA, 및 CD38로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 다발성 골수종의 치료 방법.

**청구항 41**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포를 세포 증식성 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 세포 증식성 질환의 치료 방법이며, 여기서 제1 항원 인식 도메인의 표적은 BCMA, TAC1, CS1, 및 BAFF-R로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 BCMA, TAC1, CS1, 및 BAFF-R로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 세포 증식성 질환의 치료 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 세포 증식성 질환은 림프종, 백혈병 및 형질세포종양로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 세포 증식성 질환의 치료 방법.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 형질세포종양은 형질세포성 백혈병, 다발성 골수종, 형질세포종, 아밀로이드증, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 고립성 골 형질세포종, 미확정 단클론 감마글로불린혈증 (MGUS), 그리고 무증상다발성골수종으로부터 선택되는 것인, 세포 증식성 질환의 치료 방법.

**청구항 44**

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포를 세포 증식성 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 세포증식성 질환의 치료 방법.

**청구항 45**

인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파 태아단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BCMA, BAFF-R, TAC1, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15, CD45, CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적에 대해 선택적인 항원 인식 도메인을

갖는 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 세포 및 CAR 증폭제를 세포증식성 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 세포증식성 질환의 치료 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 상기 CAR 증폭제는 면역 체크 포인트 경로, 콜로니자극인자-1 수용체 (CSF1R)의 억제제, PD-1, PD-L1, IL-2, IL-12, IL-15, CSF1R, CTAL-4, TIM-3, 및 TGFR 베타를 표적으로 하는 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 세포증식성 질환의 치료 방법.

**청구항 47**

제13항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 조작된 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 세포를 세포증식성 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 세포증식성 질환의 치료 방법.

**청구항 48**

신호 펩타이드, CD45 항원 인식 도메인, 힌지 영역, 막통과 도메인, 적어도 하나의 보조 자극 도메인, 및 신호 전달 도메인을 포함하는 조작된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 상기 CD45 항원 인식 도메인은 CD45에 대해 선택적인 단클론항체의 결합 부분 또는 가변 영역을 포함하는 것인, 조작된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드.

**청구항 50**

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 CD45 항원 인식 도메인은 CD45 scFv를 포함하는 것인, 조작된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드.

**청구항 51**

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 힌지 영역은 CD-8 알파, CD28, 4-1BB, OX40, CD3-제타, 이들의 기능성 유도체, 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 인간 단백질의 힌지 영역을 포함하는 것인, 조작된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드.

**청구항 52**

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막통과 도메인은 CD-8 알파, CD28, 4-1BB, OX40, CD3-제타, 이들의 기능성 유도체, 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 인간 단백질의 막통과 영역을 포함하는 것인, 조작된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드.

**청구항 53**

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신호전달 도메인은 CD3 제타, 공통 FcR 감마 (FCER1G), Fc 감마 R11a, FcR 베타 (Fc 엡실론 립), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD79a, CD79b, DAP10, DAP12, 이들의 활성 단편 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 신호전달 도메인을 포함하는 것인, 조작된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드.

**청구항 54**

제48항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보조 자극 도메인은 OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, NKG2C, NKG2D, B7-H3; CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS, 및 4-1BB (CD137)에 결합하는 리간드; 이들의 활성 단편; 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 단백질로부터의 보조 자극 도메인을 포함하는 것인, 조작된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드.

**청구항 55**

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 조작된 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 56**

제55항에 있어서, 벡터 안에 존재하는 조작된 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 57**

제55항 또는 제56항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조작된 세포.

**청구항 58**

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 세포.

**청구항 59**

제57항 또는 제58항에 있어서, T 세포 또는 자연 살상 세포인 조작된 세포.

**청구항 60**

제59항에 있어서, T 세포는 CD4 T 세포 또는 CD8 T 세포인, 조작된 세포.

**청구항 61**

제59항에 있어서, 자연 살상 세포는 NKT 세포 또는 NK-92 세포인, 조작된 세포.

**청구항 62**

i. 표적 세포를 제1항 내지 제14항, 제29항 내지 제34항, 및 제57항 내지 제61항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포의 유효량과 접촉시키는 단계; 및

ii. 선택적으로, 상기 세포 수의 감소를 검정하는 단계

를 포함하는, 표적 세포의 수를 줄이는 방법이며, 여기서 상기 표적 세포는 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파 태아단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BCMA, BAFF-R, TACI, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD45, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 표면 항원을 포함하는 것인, 표적 세포의 수를 줄이는 방법.

**청구항 63**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 BCMA를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인은 CS1을 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 64**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD19를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인은 BCMA를 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 65**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD19를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CD22를 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 66**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD19를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인은 CD20을 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 67**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD19를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인은 CD123을 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 68**



제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD33을 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CD123을 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 69**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 인식 도메인의 표적은 CD269를 포함하고, 제2 항원 인식 도메인의 표적은 CS1을 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 70**

제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 인식 도메인의 표적은 CD4를 포함하고, 인헨서는 IL-15RA를 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 71**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, TAC1 항원 인식 도메인은 APRIL 리간드 또는 BAFF 리간드 또는 이의 일부를 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 72**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, BCMA 항원 인식 도메인은 APRIL 리간드 또는 BAFF 리간드 또는 이의 일부를 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 73**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, BAFF-R 항원 인식 도메인은 BAFF 리간드 또는 이의 일부를 포함하는 것인, 조작된 세포.

**청구항 74**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 보조 자극 도메인 및 제2 보조 자극 도메인은 동일한 것인, 조작된 세포.

**청구항 75**

제1항 내지 제6항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 보조 자극 도메인 및 제2 보조 자극 도메인은 4-1BB 보조 자극 도메인을 포함하는 것인, 조작된 세포.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] <관련 출원에 대한 교차-참조>

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제62/184,321호 (2015년 6월 25일자 출원), 62/235,840호 (2015년 10월 1일자 출원), 및 62/244, 435호 (2015년 10월 21일자 출원)으로부터 우선권을 주장하는 국제 PCT 출원이며, 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

**배경 기술**

[0003] 림프구의 일종인 T 세포는 세포 매개 면역에 중심적인 역할을 한다. 그들은 세포 표면의 T 세포 수용체 (TCR)의 존재로 B 세포 및 자연 살상(natural killer) 세포 (NK 세포)와 같은 다른 림프구와 구별된다. CD4 + T 또는 CD4 T 세포라고도 불리는 T 헬퍼 세포는 그의 표면에 CD4 당단백질을 발현한다. 헬퍼 T 세포는 MHC (주조직 적합 복합체) 클래스 II 분자에 의해 제시되는 펩타이드 항원에 노출될 때 활성화된다. 일단 활성화되면, 이들 세포는 급속하게 증식하고 면역 반응을 조절하는 사이토카인을 분비한다. CD8 + T 세포 또는 CD8 T 세포로도 알려진 세포독성 T 세포는 세포 표면에 CD8 당단백질을 발현한다. CD8 + T 세포는 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시되는 펩티드 항원에 노출될 때 활성화된다. T 세포의 하위세트인 기억 T 세포는 장기간 지속되다가 그들의 동족 항원에 반응하므로 면역 시스템에 과거의 감염 및/또는 종양 세포에 대한 "기억"을 제공한다.

[0004] T 세포는 그의 표면 상에 키메라 항원 수용체 (CAR)라고 불리는 특정 수용체를 생산하도록 유전적으로 조작될

수 있다. CAR은 T 세포가 종양 세포의 특정 단백질 (항원)을 인식할 수 있게 해주는 단백질이다. 이러한 조작된 CAR T 세포는 그 다음에 세포 수자가 수십억에 달할 때까지 실험실에서 배양된다. 팽창된 CAR T세포 집단은 그 다음에 환자에게 주입된다.

[0005] 지금까지의 임상 시험들은 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포가 표준화학요법에 내성을 보이는 혈액 악성종양에 있어서 큰 가능성을 가진다는 점을 보여 주었다. 특히, CD19에 특이적인 CAR(CD19CAR) T 세포 요법이 B세포 악성종양을 장기적으로 완화시키는 것을 비롯한 놀라운 결과를 가져왔다 (Kochenderfer, Wilson et al. 2010, Kalos, Levine et al. 2011, Porter, Levine et al. 2011, Davila, Riviere et al. 2013, Grupp, Frey et al. 2013, Grupp, Kalos et al. 2013, Kalos, Nazimuddin et al. 2013, Kochenderfer, Dudley et al. 2013, Kochenderfer, Dudley et al. 2013, Lee, Shah et al. 2013, Park, Riviere et al. 2013, Maude, Frey et al. 2014).

[0006] B세포 백혈병과 림프종에 대한 CAR 요법의 성공에도 불구하고, T 세포 악성종양에 대한 CAR 요법의 적용은 아직 잘 확립되지 않았다. T 세포 악성종양이 B 세포 악성종양과 비교할 때 극적으로 보다 불량한 결과와 연관되는 것을 고려하면 (Abramson, Feldman et al. 2014), CAR 요법은 이 점에서 큰 임상적 수요를 더욱 부각시킬 잠재력을 갖고 있다.

[0007] 지금까지, 현재 노력은 다양한 B-세포 악성 종양에 대한 CAR T-세포 효능을 입증하는 데 집중하고 있다. CD19CAR을 사용하는 B-ALL에서는 약 90%의 초기 완화율이 일반적이지만 이들 대부분은 1년 이내에 재발한다. 재발은 항원 회피로 인해 적어도 부분적으로 발생한다. 따라서, 재발을 방지하기 위한 더욱 효과적인 CAR T 세포 치료방법이 시급히 필요하다. 효과적인 CAR 디자인을 보장하거나 가이드하는 일반적인 규칙이 없기 때문에 표적 발견 및 선택이 초기 단계이다.

[0008] CAR 치료 접근법의 더 광범위한 채택을 저해하는 일부 장애물들이 있다. 가장 일반적인 과제로는 (1) 항원 표적 및 키메라 항원 수용체(들)의 선택; (2) CAR 디자인; (3) 종양 이질성, 특히 종양 항원의 표면 발현에서의 변이이다. 단일 항원을 표적으로 하는 것은 면역 회피의 위험요소를 가지며, 이는 다수의 원하는 항원을 표적으로 함으로써 극복될 수 있다.

[0009] 대부분의 CAR 키메라 항원 수용체는 단클론항체로부터 유래된 scFvs이며, 이들 단클론항체 중 일부는 임상 시험 또는 질환의 치료에 사용되고 있다. 하지만 이들 효과는 제한적이므로 이는 CAR과 같은 대안적이고 더욱 강력한 표적화 접근이 요구된다. scFvs는 CAR에 대해 가장 통상적으로 사용되는 키메라 항원 수용체이다. 하지만, CAR 친화성 결합 및 항원 상의 인식된 에피토프의 위치는 기능에 영향을 줄 수 있다. 또한, T 세포 또는 NK 세포 상의 표면 CAR 발현 수준은 적절한 리더 서열과 프로모터에 의해 영향을 받는다. 더욱이 과발현된 CAR 단백질은 세포에 유독성을 나타낼 수 있다.

[0010] 그러므로, T- 세포 연관 악성 종양에 대한 더욱 효과적이고 안전하며 그리고 효율적인 표적화를 가능하게 하는 개선된 키메라 항원 수용체 - 기반 요법에 대한 필요성이 남아있다.

**발명의 내용**

[0011] 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 제1 항원 인식 도메인, 제1 신호 펩타이드, 제1 힌지 영역, 제1 막통과 (transmembrane) 도메인, 제1 보조 자극 도메인 및 제1 신호전달 도메인을 포함하는 제1 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드와 제2 항원 인식 도메인, 제2 신호 펩타이드, 제2 힌지 영역, 제2 막통과 도메인, 제2 보조 자극 도메인 및 제2 신호전달 도메인을 포함하는 제2 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 가지며, 상기 제1 항원 인식 도메인은 제2 항원 인식 도메인과 상이한 것인 조작된 세포를 제공한다.

[0012] 또 다른 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 키메라 항원 수용체 및 인헨서를 포함하는 조작된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0013] 또 다른 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 인헨서를 포함하는 조작된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0014] 또 다른 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 신호 펩타이드, CD45 항원 인식 도메인, 힌지 영역, 막통과 도메인, 적어도 하나의 보조 자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 조작된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 제공한다. 또 다른 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 전술한 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0015] 또 다른 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 전술한 조작된 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 가지는 조작된 세포를 제공한다.

[0016] 또 다른 하나의 실시양태에서, 본 개시내용은 다음 단계를 포함하는 표적 세포의 수를 감소시키는 방법을 제공한다. (i.) 상기 표적 세포를 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 가지는 조작된 세포의 유효량과 접촉시키는 단계 (다중 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 가지는 조작된 세포에 대해, 각 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 독립적임); 및 (ii.) 선택적으로, 상기 세포의 수의 감소를 분석하는 단계. 표적 세포는 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파 태아단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BAFF-R, BCMA, TACI, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD45, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 표면 항원을 포함한다.

[0017] 또 다른 하나의 실시 양태에서, 본 개시내용은 상기 기술된 임의의 조작된 세포를 이를 필요로 하는 환자에 투여함으로써 B-세포 림프종, T-세포 림프종, 다발성 골수종, 만성 골수성 백혈병, B-세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL) 및 세포증식성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

[0018] 도 1. cCAR 구축물의 도식적 표현 (이하 "다중 CAR 또는 복합 CAR"). 다중 또는 복합 CAR은 다중 항원 (예: 세포 유형1 또는 세포 유형2 또는 동일한 세포 유형)을 표적으로 한다. 다중 또는 cCAR T 세포 면역 요법은 상이한 또는 동일한 항원 인식 도메인, 힌지 영역, 막통과 도메인, 다양한 보조 자극 도메인(들) 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 개개의 구성 요소 CAR을 포함한다.

도 2A. cCAR-T 구축물의 도식적 표현. 상기 구축물은 P2A 펩타이드에 의해 연결된 CAR의 다중 모듈 단위의 발현을 유도하는 SFV 프로모터를 포함한다. 링커가 절단되면, cCAR들은 분리되고 CD33 및/또는 CD123을 발현하는 표적에 결합한다. 새로운 cCAR 구축물로서, 이 구축물의 활성화 도메인은 CD33 CAR 단편 상의 4-1BB 및 CD123 CAR 상의 CD28 영역을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

도 2B. 형질도입된 CD33CD123 cCAR-T 세포의 발현을 도시하는 웨스턴 블롯. 이 도면은 2 개의 상이한 CAR 단백질, 즉, CD33 CAR 및 CD123 CAR의 발현을 도시한다. 링커가 절단되면 CD33 및 CD123 CAR 모두를 발현하는 cCAR-T 세포는 두 개의 명확하고 일관되게 색이 매우 짙은 단백질 밴드를 생성한다. 녹색 형광 단백질 (GFP)은 음성 대조군으로서 포함된다.

도 2C. 형질도입의 효율을 나타내는 유동 세포측정법. 상단 패널은 UCB (제대혈) 및 PB (말초 혈액) T 세포에 사용하기 전 최대 형질 도입 효율을 측정하기 위해 293FT HEK (인간 배아 신장) 세포 상에서 시험된 CD33CD123 cCAR (CD33CD123-2G-CAR라고도 지칭됨)에 대한 렌티바이러스의 역할을 보여준다. 하단 패널은 CD33CD123 cCAR 구축물을 포함하는 렌티바이러스 벡터로 형질 도입된 CD33CD123 cCAR (CD33CD123-2G-CAR 라고도 지칭됨) T-세포, 및 대조군으로서 GFP- 형질 도입된 세포를 보여준다. 노란색 원에 의해 표시되는 백분율은 형질 도입 효율에 대한 프록시이다.

도 3. 고효율 화합물 CAR (cCAR) 생성 방법을 보여주는 도식.

도 4. CD33CD123-2G CAR-T 세포 (cCAR)의 전골수구성 백혈병 세포주 HL60와의 인큐베이션을 나타내는 공동 배양 분석. cCAR-T 세포 (하부 패널)는 대조 GFP 형질 도입된 T 세포 (상부 패널)와 비교된다. 살상의 효능은 약 24 시간 동안 배양한 후에 남겨진 CD33+ 세포의 집단에 의해 측정된다 (노란색 원으로 둘러싸임).

도 5. cCAR-T 세포의 약 100% CD33과 약 50-80% CD123을 발현하는 골수성 백혈병 세포주 KG-1a와의 인큐베이션을 나타내는 공동 배양 분석. cCAR-T 세포 (하부 패널)는 대조 GFP 형질 도입된 T 세포 (상부 패널)와 비교된다. 살상의 효능은 약 24시간 동안 배양한 후에 남겨진 CD33+ 세포의 집단에 의해 측정된다.

도 6. cCAR-T 세포의 AML 환자 샘플 (여기서는 AML-9라고 지칭됨)과의 인큐베이션을 나타내는 공동 배양 분석. 환자 세포는 예를 들어 백혈병 세포, 단핵구 및 다른 유형의 모세포와 같은 혼합된 세포 집단을 포함한다. CD33은 백혈병 세포에 대한 특이적 마커인 CD34와 마찬가지로 CAR-T 작용에 대한 마커로서 또한 작용한다. CAR-T 패널 (우측)은 대조 GFP 형질 도입된 T 세포 (중간)와 비교된다. 살상의 효능은 적어도 24시간 동안 인큐베이션한 후에 남겨진 CD33+/CD34+ 세포의 집단에 의해 측정된다.

도 7. cCAR-T 세포의 B-ALL 환자 샘플 (여기서는 Sp-BM-B6이라고 지칭됨)과의 인큐베이션을 나타내는 공동 배양

분석. 환자 세포는 예를 들어, 백혈병 세포, 단핵구 및 다른 유형의 모세포와 같은 혼합된 세포 집단을 포함한다. CD34는 백혈병 세포에 대한 특이적 마커로서 작용한다. CAR-T 패널 (우측)은 대조 GFP 형질 도입된 T 세포 (중간)와 비교된다. 살상의 효능은 적어도 24시간 동안 인큐베이션한 후에 남겨진 CD34+ 세포 집단에 의해 측정된다.

도 8. NK-92 세포에서의 CD33CD123 cCAR 발현. CD33CD123 cCAR 발현은 염소-항-마우스 항체, F(ab)<sub>2</sub>를 사용하여 검출된다.

도 9. cCAR NK-92 세포의 HL-60과의 인큐베이션을 나타내는 공동 배양 분석. cCAR NK-92 세포는 GFP 형질 도입된 NK-92 세포와 비교된다. 살상의 효능은 약 24시간 동안 인큐베이션한 후 남은 CD33+ 세포의 집단에 의해 측정된다.

도 10. cCAR NK-92 세포의 KG1a와의 인큐베이션을 나타내는 공동 배양 분석. cCAR NK 세포 패널은 GFP 형질 도입된 NK-92 세포와 비교된다. 살상의 효능은 약 24시간 동안 인큐베이션한 후 남은 CD33+ 세포의 집단에 의해 측정된다.

도 11. HL-60 또는 KG1a을 사용한 CD33CD123 cCAR (CAR-CD33/123) NK-92 세포의 용량 반응.

살상의 효능은 약 24시간 동안 인큐베이션한 후 남은 CD33+ 세포의 집단에 의해 측정된다.

도 12. KG11 세포의 두 집단에서의 CD33CD123 cCAR NK-92 세포의 살상 능력과 대조의 비교. CAR-CD33/123 (CD33CD123 cCAR NK-92 세포)와 표적 세포 KG1a의 상이한 비율로 분석을 수행하였다. 살상의 효능은 약 24시간 동안 인큐베이션한 후 남은 CD33+CD123+ 또는 CD33+CD123- 세포의 집단에 의해 측정된다.

도 13. cCAR의 도식적 표현. 구축물은 링커에 의해 연결된 CAR의 다중 모듈 단위의 발현을 유도하는 SFFV 프로모터를 포함한다. 링커가 절단되면, cCAR들은 분리되고 CD19 및/또는 CD20, 및/또는 CD22 및/또는 138의 다양한 표적 항원의 조합을 발현하는 표적에 결합한다. 다중 cCAR은, 예를 들어 4-1BB (4-BB로도 표기함) 및/또는 CD28로 제한하는 것 없이, 동일하거나 또는 상이한 보조 자극 도메인을 이용한다.

도 14 A-C. BCMA-CS1 cCAR 구축물 도식 (BC1cCAR). (A) 구축물은 P2A 펩타이드에 의해 연결된 CAR의 2개의 모듈 단위의 발현을 유도하는 SFFV 프로모터로 구성된다. 이 P2A 펩타이드가 절단되면, cCAR들은 분리되고 BCMA 및/또는 CS1을 발현하는 표적에 결합한다. 2개의 CAR 단위는 동일한 보조 자극 도메인 4-1BB를 사용한다. (B) 벡터 (왼쪽)와 BC1cCAR (오른쪽, 사각형으로 강조됨)에 대한 T 세포 표면에서의 BC1cCAR 발현의 유동 세포측정법 분석이며, BC1cCAR은 F(ab)<sub>2</sub>에 대해 15.3%의 양성을 보임. 동형 대조에 대해 게이팅함. (C) BCMA cDNA (BCMA-K562) (NIH, Kochenderfer로부터 얻음)로 형질 도입된 K562 세포와의 공동 배양으로 BC1cCAR-T 세포의 예비 기능 검증. 막대 그래프는 대조 T 세포에 대한 BCMA-K562 세포주의 용해 그리고 대조에 대한 야생형 K562 (wt-K562)의 용해를 보여준다.

도 14D. 각 단위에 대해 4-1BB 또는 CD28의 2개의 상이한 보조 자극 도메인을 사용하는 BCMA-CS1-2G 구축물. 이 구축물은 P2A 펩타이드에 의해 연결된 CAR의 2개의 모듈 단위의 발현을 유도하는 SFFV 프로모터를 포함한다. 이 P2A 펩타이드가 절단되면, cCAR들은 분리되고 BCMA 및/또는 CS1을 발현하는 표적에 결합한다. 2개의 CAR 단위는 4-1BB 또는 CD28의 서로 다른 보조 자극 도메인을 사용한다. 벡터 (왼쪽)와 BC1cCAR (오른쪽, 사각형으로 강조됨)에 대한 T 세포 표면에서의 BC1cCAR 발현의 유동 세포측정법 분석이며, BC1cCAR은 F(ab)<sub>2</sub>에 대해 희귀한 양성 세포를 보임. 동형 대조에 대해 게이팅함.

도 14E. HEK-293FT 세포에서의 BC1cCAR 및 BCMA-CS1-2G의 단백질 발현. HEK-293FT 세포를 GFP (레인 1), BC1cCAR (레인 2), CD269-CS1-2G (레인 3)를 위한 렌티바이러스 플라스미드로 형질 감염시키고, 형질 감염 48시간 후에 상청액을 제거하고 세포를 또한 분리하였다. 웨스턴 블롯을 위하여 세포를 용해하고 마우스 항-인간 CD3z 항체로 프로브하였다.

도 15A-B. MM1S 세포주 공동배양. 공동배양을 24시간 이내에 수행하고 수집하고 유동 세포측정법을 통해 분석하였다. 표적 MM1S 세포 (골수종 세포)를 Cytotracker (CMTMR) 염료로 표지하여 효과 T 세포로부터 구별하였다. 항 BCMA (CD269) 및 항-CS1 (CD319) 항체로 집단을 게이팅하였다. 도 15A: 공동 배양의 유동 세포측정법 도시. 도 15B: 오른쪽: 용해 대 E:T 비율의 그래프 요약.

도 16A-B. RPMI-8226 세포주 공동 배양. 공동 배양을 24시간 이내에 수행하고 수집하고 유동 세포측정법을 통해 분석하였다. 표적 RPMI-8226 세포를 Cytotracker (CMTMR) 염료로 표지하여 효과 T 세포로부터 구별하였다. 항-BCMA (CD269) 및 항-CS1 (CD319) 항체로 집단을 게이팅하였다. 도 16A: 공동 배양의 유동 세포측정법 묘사. 도

16B: 용해 대 E:T 비율의 그래픽 요약.

도17 A-B. U266 세포주 공동 배양. 공동 배양을 24 시간 이내에 수행하고 수집하고 유동 세포측정법을 통해 분석하였다. 표적 U266 세포를 Cytotracker (CMTMR) 염료로 표지하여 효과 T 세포로부터 구별하였다. 항 BCMA (CD269) 및 항-CS1 (CD319) 항체로 집단을 게이팅하였다. (A) 공동 배양의 유동 세포측정법 도시. (B) 용해 대 E:T 비율의 그래픽 요약.

도 18A-B. MM10-G 원발성 환자 샘플 공동 배양 및 특이적 용해. 공동 배양을 24시간 이내에 수행하고 수집하고 유동세포측정법을 통해 분석하였다. 표적 MM10-G 세포를 Cytotracker (CMTMR) 염료로 표지하여 효과 T 세포로부터 구별하였다. 항 BCMA (CD269) 및 항-CS1 (CD319) 항체로 집단을 게이팅하였다. 특히, 게이팅은 MM10-G가 뚜렷한 BCMA+ 및 CS1+ 집단을 나타냄을 보여준다. 도 18A: 공동 배양의 유동 세포측정법 도시. 도 18B: 용해 대 E:T 비율의 그래픽 요약.

도 19A-B. MM7-G 원발성 환자 샘플 공동 배양 및 특이적 용해. 공동 배양을 24시간 이내에 수행하고 수집하고 유동 세포측정법을 통해 분석하였다. 표적 MM7-G 세포를 Cytotracker (CMTMR) 염료로 표지하여 효과 T 세포로부터 구별하였다. 항-BCMA (CD269) 및 항-CS1 (CD319) 항체로 집단을 게이팅하였다. 도 19A: 공동 배양의 유동 세포측정법 도시. 도 19B: 용해 대 E:T 비율의 그래픽 요약.

도 20A-B. MM11-G 원발성 환자 샘플 공동 배양 및 특이적 용해. 공동 배양을 24 시간 이내에 수행하고 수집하고 유동 세포측정법을 통해 분석하였다. 표적 MM11-G 세포를 Cytotracker (CMTMR) 염료로 표지하여 효과 T 세포로부터 구별하였다. 항-BCMA (CD269) 및 항-CS1 (CD319) 항체로 집단을 게이팅하였다. 도 20A: 공동 배양의 유동 세포측정법 도시. 도 20B: 용해 대 E:T 비율의 그래픽 요약.

도 21. CD269-CS1-BBCAR NK 세포는 생체내에서 항-백혈병 효과를 나타낸다. NSG 마우스에게 준치사적 방사선을 조사하고 다음 날 루시페레이스를 발현하는 MM.1S 다발성 골수종 세포를 정맥내 주사하여 측정 가능한 종양 형성을 유도하였다. 3 일 후, 마우스에게  $8 \times 10^6$  CD269-CS1-BBCAR NK 세포 또는 벡터 대조 NK 대조 세포를 정맥내 주사하였다. 제 3, 6, 및 8 일에 마우스에게 RediJect D-Luciferin을 피하 주사하여 IVIS 영상을 시행하였다. CD269-CS1-BBCAR NK 주사된 마우스에 대해 측정된 평균 광 강도를 벡터 대조 NK 주사된 마우스의 것과 비교하였다.

도 22. 도 21의 연구에 근거하여 마우스의 생존율을 측정하고 두 그룹 사이에서의 마우스의 생존율을 비교하였다.

도 23. CRISPR / Cas9 간섭 시스템. sgRNA 및 Cas9 퓨로마이신의 발현은 U6 및 SFFV 프로모터에 의해 각각 유도된다. Cas9는 E2A 자가절단 서열에 의해 퓨로마이신 내성유전자와 연결되어 있다.

도 24. 혈액 악성 종양을 표적으로하는 CAR T 또는 NK 세포의 생성을 위한 단계의 예를 제공하는 도식.

도 25. CRISPR/Cas9 렌티바이러스 시스템을 사용한 안정된 CD45 녹다운 NK-92 세포의 생성 및 세포 분류. 유동 세포측정법 분석은 NK-92 세포 표면 상에서의 CD45 발현 수준을 나타내었다 (왼쪽 패널). sgCD45B CRISPR을 NK-92 세포에 형질도입한 후, 형질도입된 세포를 퓨로마이신을 함유하는 배지 중에서 수주 동안 배양하였다. CD45 음성 NK-92 세포를 CD45 항체를 사용하여 결정하고 분류하였다. 안정된 NK<sup>45i</sup>-92 (CD45 녹다운) NK-92 세포의 수는 유동 세포측정법 분석에 의해 측정되었다 (오른쪽 패널). 이 데이터는 NK<sup>45i</sup>-92 세포가 성공적으로 생성되고 얻어졌다는 것을 보여 주었다.

도 26. 야생형, GFP 형질도입된 NK-92 또는 NK<sup>45i</sup>-92NK 세포의 세포 성장 곡선. NK-92 세포에서의 CD45- 녹다운 (KD)에 의해 야기된 세포 증식에 대한 효과를 평가하기 위해, 24 웰 플레이트 (well plates)에 시딩한 후 48 시간 및 96 시간에 NK-92 (●), GFP-형질도입된 NK-92 (■) 및 NK<sup>45i</sup>-92 (▲)의 세포 수를 계수하였다. 48시간 시점에 IL-2를 첨가하였다 (n=3회의 독립적인 실험을 반복으로 수행하였다). 데이터는 평균치+/- S.D. 이다. 이들 데이터는 NK-92상의 CD45 수용체의 녹다운이 비형질도입된 NK-92 또는 GFP-형질도입된 NK-92 세포와 비교하여 유사한 세포 성장 곡선을 보인다는 것을 나타냈다.

도 27 A-B. CCRF-CEM (표적: T) 및 GFP NK-92 또는 GFP NK<sup>45i</sup>-92 세포 (효과기: E), 5:1 (E:T) 비율의 공동 배양 분석. 16시간 인큐베이션. (A) CCRF-CEM 단독 (좌측 패널의 파란색 점), CCRF-CEM과 대조 GFP 형질 도입된 NK-92 세포의 공동 배양 (중간 패널) 또는 CCRF-CEM과 GFP NK<sup>45i</sup>-92 세포의 공동 배양 (우측 패널)의 유동 세포

측정법 분석. 모든 패널에서의 파란색 점은 남아있는 표적 CCRF-CEM 세포를 나타내고 빨간색 점은 공동 배양 분석에 의한 효과 세포를 나타낸다. 인큐베이션 시간은 전부 16 시간이었고 효과 T 세포: 표적 세포의 비율은 5:1 이었다. 모든 실험은 반복으로 수행되었다. (B) 막대 그래프는 CCRF-CEM과의 공동 배양 분석에서 GFP 형질도입된 NK<sup>45i</sup>-92 세포에 의한 세포 용해의 백분율을 대조 GFP 형질도입된 NK92 세포와 비교하여 보여준다. 이들 데이터는 시험관내 공동 배양 분석에서 NK-92 세포에서의 CD45의 녹다운이 GFP-대조 NK-92 세포에 비교하여 CCRF-CEM 세포에 대한 살상 활성의 유의한 차이를 나타내지 않는다는 것을 시사한다. 파란색 점은 왼쪽 상단 4분면에 있다.

도 28 A-B. CCRF-CEM (표적: T) 그리고 GFP NK-92, CD5CAR NK-92 또는 CD5CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 (효과기: E)와의 공동 배양 분석. 5: 1 (E: T) 비율. 16 시간 인큐베이션. (A) 오른쪽에서 왼쪽으로, CCRF-CEM 단독 (왼쪽 패널), CCRF-CEM과 대조 GFP NK-92 세포의 공동 배양 (중간 왼쪽 패널), CCRF-CEM과 CD5CAR NK-92 세포의 공동 배양 (중간 오른쪽 패널), CCRF-CEM과 CD5CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포의 공동 배양 (오른쪽 패널)의 유동 세포측정법 분석. 모든 패널의 파란색 점은 남아있는 표적 CCRF-CEM 세포를 나타내고 빨간색 점은 공동 배양 분석에 의한 효과 세포를 나타낸다. 인큐베이션 시간은 전부 16시간이었고 효과 T 세포: 표적 세포의 비율은 5:1이었다. 모든 실험은 반복으로 수행되었다. (B) 막대 그래프는 CCRF-CEM과의 공동 배양 분석에서 CD5CAR NK-92 세포 또는 CD5CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포에 의한 세포 용해의 백분율을 대조 GFP NK92 세포와 비교하여 보여준다. 데이터는 평균치 +/- S.D. 이다. CD5CAR NK 세포 및 CD5CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 모두 대조 GFP NK-92 세포와 비교하여 CD5-양성 CCRF-CEM에 대해 100%에 가까운 세포 살상 활성을 나타낸다. 이들 데이터는 CD5CAR NK 세포 및 CD5CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포가 GFP-대조 NK-92 세포와 비교하여 시험관내 공동 배양 분석에서 CD5를 발현하는 CCRF-CEM 세포를 효과적으로 용해시킬 수 있고, CD45의 녹다운이 NK-92 세포에서의 살상 활성을 위한 세포 기능에 영향을 미치지 않는다는 증거를 제공한다. 파란색 점은 왼쪽으로부터 시작하여 처음 두 패널의 왼쪽 상단 4분면에 있다.

도 29A-B. CD45CAR 구축물의 구성과 그 발현. (A) CD45CAR 렌티바이러스 벡터의 도식적 표시. CD45CAR 구축물은 모듈화된 신호전달 도메인이고 리더 서열, 항-CD45scFv, 힌지 도메인 (H), 막통과 도메인 (TM), 구축물의 제 3세대 CAR로서의 특징인 두 개의 보조 자극 도메인 (CD28 및 4-1BB), 및 세포내 신호전달 도메인 CD3 제타를 포함한다. (B), HEK-293FT 세포를 GFP (라인 1) 및 CD45CAR (라인 2)를 위한 렌티바이러스 플라스미드로 형질 감염시켰다. 형질 감염 48시간 후에 상청액을 제거하고 세포도 분리하였다. 웨스턴 블롯을 위해 세포를 용해시키고 마우스 항-인간 CD3z 항체로 프로브하였다.

도 30 A-B. NK<sup>45i</sup>-92 세포로의 CD45CAR의 형질도입 및 CD45CAR 형질도입된 세포의 세포분류. (A) CD45CAR 렌티바이러스가 NK<sup>45i</sup>-92 세포로 형질도입된 후에 NK<sup>45i</sup>-92상의 CD45CAR의 발현 수준을 유동 세포측정법 분석 (중간 패널에서 파란 동그라미로 표시)으로 NK<sup>45i</sup>-92 세포 (왼쪽 패널)와 비교하여 측정하였다. CD45CAR 발현된 NK<sup>45i</sup>-92 세포를 분류하고 세포 표면 상의 CD45 발현 수준을 유동 세포측정법 분석 (오른쪽 패널)에 의해 측정하였다. (B) 유동 세포측정법 분석에 의해 검출된 세포 표면 상 CD45CAR 발현은 약 87%였다.

도 31A-B. CCRF-CEM (표적: T) 와 GFP NK-92 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 (효과기: E)와의 공동 배양 분석. 5:1 (E:T) 비율. 16 시간 인큐베이션. (A) CCRF-CEM과 대조 GFP 형질도입된 NK-92 세포의 공동 배양 (왼쪽 패널) 또는 CCRF-CEM과 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포의 공동 배양 (오른쪽 패널)의 유동 세포측정법 분석. 모든 패널의 파란색 점은 남아있는 표적 CCRF-CEM 세포를 나타내고 빨간색 점은 공동 배양 분석에 의한 효과기 NK-92 세포를 보여준다. 모든 인큐베이션 시간은 16 시간이었고 효과 T세포: 표적 세포의 비율은 5:1 이다. 모든 실험은 반복으로 수행되었다. (B) 막대 그래프는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포에 의한 세포 용해의 백분율을 CCRF-CEM과의 공동 배양 분석에서의 대조 GFP NK92 세포와 비교하여 보여준다. 데이터는 평균치 +/- S.D. CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 대조 GFP NK-92 세포와 비교하여 CCRF-CEM 세포에 대해 약 70 %의 세포 용해를 보여준다. 이들 데이터는 시험관내 공동 배양 분석에서 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포가 GFP- 대조 NK-92 세포와 비교하여 CD45를 발현하는 CCRF-CEM 세포를 효과적으로 용해시킨다는 것을 시사한다.

도 32 A-C. Jurkat 세포 (표적: T) 와 GFP- 대조 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 (효과기: E)의 공동 배양 분석. 5:1 또는 2:1 (E:T) 비율. 6 시간의 인큐베이션. (A) Jurkat 세포가 CMTMR 세포 추적자 염료에 의해 염색된 후

에 유동 세포측정법 분석이 수행되었다. 이들 데이터는 Jurkat 세포가 CD45 양성이고 (왼쪽 패널) 대부분은 CD56 음성 세포 (오른쪽 패널)임을 보여준다. (B) Jurkat 세포 (표적: T) 와 대조 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 (효과기: E)의 공동 배양 분석의 유동세포측정법 분석. 공동 배양 분석은 5:1 또는 2:1 (E : T) 비율에서 수행되었다. 왼쪽 패널은 5:1 (E:T) 비율에서의 대조 GFP 또는 CD45CAR/CD45KD NK-92 세포와의 공동 배양을 보여주었고 오른쪽 패널은 2:1 (E:T) 비율에서의 대조 GFP 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포와의 공동배양을 나타내었다. 패널에서의 파란색 점은 남아있는 표적 Jurkat 세포를 나타내고 빨간색 점은 공동 배양 분석에 의한 효과기 세포를 나타낸다. 모든 인큐베이션 시간은 6 시간이었다. 모든 실험은 반복으로 수행되었다. (C) 막대 그래프는 5:1 또는 2:1 (E:T) 비율에서의 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포에 의한 세포 용해 백분율을 대조 GFP NK92 세포와 비교하여 보여준다. 데이터는 평균치 +/- S.D. 이다. CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 두 조건 모두에서 대조 GFP NK-92 세포와 비교하여 Jurkat 세포에 대해 약 60%의 세포 용해를 보여준다. 이 데이터는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포가 시험관내 공동 배양 분석에서 GFP- 대조 NK-92 세포와 비교하여 세포 표면 상에서 CD45를 발현하는 Jurkat 세포를 효과적으로 용해시킨다는 것을 시사한다.

도 33A-C. GFP-NK-92 세포 (표적: T) 와 비형질 도입된 NK-92 세포 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 (효과기: E)의 공동 배양 분석. 5:1 또는 2:1 (E:T) 비율. 6 시간의 인큐베이션. (A) GFP 대조 NK-92 세포를 사용하여 유동 세포측정법 분석을 수행하였다. 이들 데이터는 GFP 대조 NK-92 세포가 약 99%의 GFP 양성 세포 (녹색 점들)임을 증명한다. (B) GFP 대조 NK-92 세포 (표적: T) 와 비형질 도입된 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 (효과기: E)의 공동 배양 측정의 유동 세포측정법 분석. 공동 배양 분석은 5:1 또는 2:1 (E:T) 비율에서 수행되었다. 왼쪽 패널은 비형질 도입된 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포와의 5:1 (E:T) 비율에서의 공동 배양을 보여주었고 오른쪽 패널은 비형질도입된 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포와의 2:1 (E:T) 비율에서의 공동배양을 나타냈다. 패널의 녹색 점은 남아있는 표적 GFP NK-92 세포를 나타내고 붉은 점은 공동 배양 분석에 의한 효과기 세포를 나타낸다. 인큐베이션 시간은 6 시간이었다. 모든 실험은 반복으로 수행되었다. (C) 막대 그래프는 5:1 또는 2:1 (E:T) 비율에서의 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포에 의한 GFP NK-92 세포의 세포 용해 백분율을 비형질 도입된 NK-92 세포와 비교하여 보여준다. 데이터는 평균치 +/- S.D. 이다. CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 비형질 도입된 NK-92 세포와 비교하여 GFP NK-92 세포에 대해 2:1 (E:T) 비율에서 약 20 % 세포 용해 및 5:1 (E:T) 비율에서 약 55% 세포 용해를 보여준다. 이 데이터는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포가 시험관내 공동 배양 분석에서 비형질 도입된 NK-92 세포에 비교하여 세포 표면 상에서 CD45를 발현하는 GFP NK-92 세포를 효과적으로 용해시킨다는 것을 시사한다. 녹색 점은 각 패널의 오른쪽 상단 4분면에 있다.

도 33D-E. NK<sup>45i</sup>-92 세포로의 CD45b-BB 또는 CD45b-28의 형질도입 및 CD45b-BB 또는 CD45b-28 형질 도입된 NK<sup>45i</sup>-92 세포의 세포 분류. (D) CD45b-BB 또는 CD45b-28 렌티바이러스의 NK45i-92 세포로의 형질 도입 후, NK<sup>45i</sup>-92 상에서의 CD45b-BB CAR 또는 CD45b-28 CAR의 표면 발현 수준은 유동 세포측정법 분석 (중간 패널에서 청색 동그라미로 표시)에 의하여 NK<sup>45i</sup>-92 세포 (좌측 패널) 와 비교하여 측정되었다. (E) CD45b-BB 또는 CD45b-28 CAR을 발현하는 NK<sup>45i</sup>-92 세포를 유동 세포측정법 분석으로 분류하였다. 세포 표면 상에서 유동 세포측정법 분석에 의해 약 74%의 CD45b-BB CAR 발현 또는 약 82%의 CD45b-28 CAR 발현이 검출되었다.

도 33 F-G. REH 세포 (표적: T) 와 GFP NK-92 세포 또는 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 또는 CD45b-BB NK<sup>45i</sup>-92 세포 또는 CD45b-28 NK<sup>45i</sup>-92 세포 (효과기: E)의 공동 배양 분석. 5:1 (E:T) 비율. 20 시간의 인큐베이션. (F) REH 세포 단독 (왼쪽 패널), REH 세포와 대조 GFP 형질 도입된 NK-92 세포의 공동 배양 (2 번째 왼쪽 패널), REH 세포와 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포의 공동 배양 (중간 패널), REH 세포와 CD45b-BB NK<sup>45i</sup>-92 세포의 공동 배양 (왼쪽에서 4 번째 패널) 또는 REH 세포와 CD45b-28 NK<sup>45i</sup>-92 세포의 공동 배양 (오른쪽 패널)의 유동세포측정법 분석. 모든 패널의 파란색 점은 남아있는 표적 REH 세포를 나타내고 빨간색 점은 공동 배양 분석에 의한 효과기 GFP 또는 CARs-NK-92 세포를 나타낸다. REH는 B 급성 림프모구 세포주이다. 모든 인큐베이션 시간은 20 시간이었고 효과 NK 세포: 표적 세포의 비율은 5:1이다. 모든 실험은 반복으로 수행되었다. (G) 막대 그래프는 REH 세포와의 공동 배양 분석에서의 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포, CD45b-BB NK<sup>45i</sup>-92 세포 또는 CD45b-28 NK<sup>45i</sup>-92 세포에 의한 세포



용해의 백분율을 대조 GFP NK92 세포와 비교하여 보여준다. 데이터는 평균치 +/- S.D. 이다. 대조 GFP NK-92 세포와 비교하여, REH 세포에 대해 CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 약 76%의 세포 용해를 나타내고 CD45b-BB NK<sup>45i</sup>-92 세포는 약 79%의 세포 용해를 나타내며 그리고 CD45b-28 NK<sup>45i</sup>-92는 100 % 세포 용해를 나타낸다. 이들 데이터는 세 종류의 CD45CAR 모두가 REH 세포를 효과적으로 용해시킨다는 것을 시사한다.

도 34 A-B. 구축물 및 T 또는 NK 세포에서의 그의 발현을 설명하기 위한 개략도. (A) CAR (제3 세대), 스시 (sushi)/ IL-15의 조합물은 발현 벡터 상에 조립되고 또 그들의 발현은 SFFV 프로모터에 의해 유도된다. CAR은 스시 (sushi)/IL-15와 함께 P2A 절단 서열과 연결되어 있다. 스시 (sushi)/IL-15 부분은 스시 (sushi) 도메인에 융합된 IL-2 신호 펩타이드로 구성되고 26-아미노산 폴리-프롤린 링커를 통해 IL-5에 연결된다. (B) CAR 및 스시 (sushi)/IL15는 T 또는 NK 세포 상에 존재한다.

도 35 A-B. CD4IL15RA-CAR 발현. (A) HEK-293FT 세포를 GFP (라인 1) 및 CD4IL15RA CAR (라인 2) 및 양성 대조, CD4CAR (라인 3)을 위한 렌티바이러스 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염 48 시간 후, 상청액을 제거하였고 마우스 항-인간 CD3z 항체와의 웨스턴 블롯을 위해 세포를 또한 분리하였다. (B) HEK-293 세포를 형질감염된 HEK-293FT 세포 유래의 GFP (왼쪽) 또는 CD4IL15RA-CAR (오른쪽) 바이러스 상청액으로 형질도입시켰다. 3일 동안 인큐베이션한 후, 세포를 수거하고 염소-항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub>로 염색하고 유동 세포측정법으로 분석하였다.

도 36. NK 세포의 CD4IL15RACAR로의 형질도입. NK-92 세포를 형질 감염된 HEK-293FT 세포 유래의 GFP (왼쪽) 또는 CD4IL15RACAR (오른쪽) 바이러스 상청액으로 형질도입시켰다. 두번째 형질도입은 첫번째 형질도입 24시간 후에 수행되었다. 두번째 형질도입 24시간 후에, 세포를 수거하고, 세척하고, 신선한 배지 및 IL-2를 포함하는 조직 배양 플레이트로 옮겼다. 3일 동안 인큐베이션한 후, 세포를 수거하고 염소-항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub> 항체 또는 염소 IgG (대조)로 1:250에서 30 분 동안 염색하였다. 세포를 세척하고 스트렙타비딘(streptavidin)-PE 접합체로 1: 500에서 염색하고, 세척하고, 2% 포르말린에 현탁시키고, 유동 세포측정법으로 분석하였다.

도 37. CD4IL15RACAR을 이용한 T 세포의 형질도입. 왼쪽은 웨스턴 블롯이다. HEK-293FT 세포를 GFP (라인 1) 및 CD4IL15RA-CAR (라인 2)을 위한 렌티바이러스 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후에, 상청액을 제거하고 그리고 마우스 항-인간 CD3 제타 항체와의 웨스턴 블롯을 위해 세포를 또한 수집하였다. 오른쪽은 CD4IL15RACAR 발현이다. 제대혈 백혈구연구층으로부터의 활성화된 T 세포를 형질감염 된 HEK-293FT 세포 유래의 GFP (왼쪽) 또는 CD4IL15RACAR (오른쪽) 바이러스 상청액으로 형질도입하였다. 두번째 형질도입은 첫번째 형질도입 24 시간 후에 수행되었다. 두번째 형질도입 24시간 후에, 세포를 수거하고, 세척하고, 신선한 배지 및 IL-2를 포함하는 조직 배양 플레이트에 옮겼다. 3일 동안 인큐베이션한 후, 세포를 수거하고 염소-항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub> 또는 동형 대조로 30분 동안 염색하였다. GFP (왼쪽) 또는 CD4IL15RA (오른쪽)로 형질 도입되었다. 세포를 세척하고 스트렙타비딘-PE 접합체로 1:250에서 염색하고, 세척하고, 2% 포르말린에 현탁시키고, 유동 세포측정법으로 분석하였다.

도 38 A-B. CD4CAR NK-92 세포와 CD4IL15RA CAR NK-92 세포는 공동 배양에서 KARPAS 299 T 백혈병 세포를 제거한다. (A) GFP 대조 (오른쪽 위), CD4CAR (왼쪽 아래) 또는 CD4IL15RA (오른쪽 아래) 렌티바이러스 상청액으로 형질 도입된 NK-92 세포를 KARPAS 299 세포와 함께 5:1의 비율로 배양하였다. 4시간의 공동 배양 후 세포를 마우스-항-인간 CD4 (APC) 및 CD3 (PerCp) 항체로 염색하고 유동세포측정법 (N = 2)으로 분석하였다. 왼쪽 상단 패널은 표지된 Karpas 299 세포만 보여준다. (B) 용해된 표적 세포의 백분율을 그래프로 나타냈다.

도 39. CD4CAR NK-92 세포 및 CD4IL15RA CAR NK-92 세포는 공동 배양에서 CD4를 발현하는 MOLT4 T 백혈병 세포를 제거한다. GFP 대조 (왼쪽), CD4CAR (가운데), 또는 CD4IL15RA (오른쪽에서 두 번째) 렌티바이러스 상청액으로 형질 도입된 NK-92 세포를 MOLT4 세포와 함께 1:1 또는 2:1의 효과기: 표적 비율로 배양하였다. 하룻밤 동안 공동 배양한 후, 세포를 마우스-항-인간 CD4 (APC) 및 CD56 (PerCp) 항체로 염색하고 유동 세포측정법 (N=2)으로 분석하였다. 오른쪽 상단 패널은 표지된 MOLT4 세포만 보여준다. 용해된 표적 세포의 백분율이 그래프에 표시된다.

도40. CD4IL15RACAR T 세포는 CD4CAR보다 생체 내에서 더 강력한 항-백혈병 효과를 나타낸다. NSG 마우스를 준치사적으로 방사선 조사하고 다음날 루시페레이스-발현하는 MOLM13 세포를 정맥내 (꼬리 정맥) 주사하여 측정 가능한 종양 형성을 유도하였다. 3 일 후, 마우스에게  $8 \times 10^6$ 의 CD4CAR, 또는 CD4IL15RACAR T 세포 또는 벡터 대조 T 대조 세포를 정맥내로 한번 주사하였다. 제3, 6, 9 및 11 일째에 마우스에게 RediJect D-Luciferin을 피



하 주사하여 IVIS 영상을 시행했다.

도 41. 마우스에서의 종양 감소 백분율을 측정하고 도 40으로부터의 연구에 기초하여 세 그룹간을 비교하였다. CD4CAR 및 CD4IL15RACAR T 주사된 마우스에 대해 측정된 평균 광 강도를 백터 대조 T 주사된 마우스의 것과 비교하였고, 잔류 종양 부담과 관련시켰다. 두개의 각 세트에서 CD4CAR T가 왼쪽에 있고 CD4IL15RA CAR T가 오른쪽에 있다.

도 42. HEK 293 세포를 6웰 조직 배양 플레이트에 10% FBS를 함유하는 DMEM 중에서, 표시된 용량을 사용하여 EF1-GFP 또는 SFFV-GFP 바이러스 상청액으로 형질 도입시켰다. 배양 배지는 다음날 아침에 바꿨다. 48시간 후, 형질 도입된 세포를 EVOS 형광 현미경상에서 GFP를 사용하여 10배로 시각화하였다.

도 43. 이전 도면으로부터의 용량을 사용하여 EF1-GFP 또는 SFFV-GFP 바이러스 상청액으로 형질 도입된 HEK 293 세포를 트립신처리하고 포르말린에 현탁시키고, GFP+ 세포의 백분율을 측정하기 위해 FITC 채널을 사용하여 유동 세포측정법 분석을 하였다.

도 44 A-B. EF1-GFP 또는 SFFV-GFP의 바이러스 상청액으로 형질 도입된 활성화된 제대혈 백혈구연층 T 세포를 적은 또는 많은 양의 바이러스 상청액과 함께 트립신처리하고, 포르말린에 현탁시키고, 형질 도입 후의 제 7, 14, 21 및 28 일째의 GFP+ 세포의 비율을 측정하기 위해 FITC 채널을 사용하여 유동 세포측정법 분석을 하였다. (A) 적은 또는 많은 양의 상청액으로 형질 도입된 세포에 대한 GFP+ T 세포 백분율. (B) 보다 적은 양의 SFFV-GFP 상청액으로 형질 도입된 T 세포에서의 GFP+ 세포 백분율과 비교한 높은 양의 EF1-GFP 상청액으로 형질 도입된 GFP+ T 세포의 백분율. (50  $\mu$ L의 SFFV-GFP 및 1 mL의 EF1-GFP 상청액을 사용하였다). (N=2).

도 45. 악성 형질 세포에서의 리간드 수용체 상호 작용. APRIL 리간드는 TAC1 또는 BCMA와 결합한다. BAFF 리간드는 TAC1, BCMA 또는 BAFF-R와 결합한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0019] 본 개시내용은 키메라 항원 수용체 (CAR)의 조성물, 이의 제조 및 사용 방법을 제공한다.
- [0020] 키메라 항원 수용체 (CAR) 폴리펩타이드는 신호 펩타이드, 항원 인식 도메인, 힌지 영역, 막통과 도메인, 적어도 하나의 보조 자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0021] 제1세대 CAR은 CD3z를 세포내 신호전달 도메인으로서 포함하는 반면, 제2세대 CAR은 다양한 단백질에서 유래된 적어도 하나의 단일 보조 자극 도메인을 포함한다. 보조 자극 도메인의 예는 CD28, CD2, 4-1BB (CD137, "4-BB"라고도 지칭됨) 및 OX-40 (CD124)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 제3세대 CAR은 두 가지 보조 자극 도메인, 예를 들어, 제한없이 CD28, 4-1BB, CD134 (OX-40), CD2 및/또는 CD137 (4-1BB)을 포함한다.
- [0022] 본원에 사용된 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용되며, 펩타이드 결합에 의해 공유 연결된 아미노산 잔기를 갖는 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩타이드는 적어도 2 개의 아미노산을 포함해야 하며, 단백질 또는 펩타이드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에 제한을 두지 않는다. 폴리펩타이드는 펩타이드 결합에 의해 서로 결합된 2개 이상의 아미노산을 갖는 임의의 펩타이드 또는 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 상기 용어는, 예를 들어 통상적으로 당 업계에서 펩타이드, 올리고펩타이드 및 올리고머로도 지칭되는 단쇄뿐만 아니라 일반적으로 당 업계에서 단백질로 지칭되며 많은 종류가 존재하는 장쇄도 지칭한다. "폴리펩타이드"는 예를 들어 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동 폴리펩타이드, 올리고펩타이드, 동종이합체, 이질이합체, 폴리펩타이드의 변이체, 변형된 폴리펩타이드, 유도체, 유사체, 융합단백질 등을 포함한다. 폴리펩타이드는 천연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0023] 하나의 "신호 펩타이드"는 하나의 펩타이드 서열을 포함하는 데 이는 펩타이드 및 임의의 세포 내의 부착된 폴리펩타이드의, 예를 들어 특정 세포소기관 (예를 들어, 소포체) 및/또는 세포 표면으로의 수송과 배치를 지시한다.
- [0024] 신호 펩타이드는 임의의 분비된 또는 막통과 단백질의 펩타이드인데 그것은 본 개시내용의 폴리펩타이드의 세포막 및 세포 표면으로의 수송을 지시하고, 본 개시내용의 폴리펩타이드의 정확한 배치를 제공한다. 특히, 본 개시내용의 신호 펩타이드는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 세포막으로 향하게 하며, 여기서 폴리펩타이드의 세포 외 부분은 세포 표면 상에 드러나 있고, 막통과 부분은 원형질 막에 걸쳐 있고, 활성 도메인은 세포질 부분에, 또는 세포의 내부에 있다.
- [0025] 하나의 실시양태에서, 신호 펩타이드는 소포체 (ER)를 통과한 후에 절단되는, 즉 절단 가능한 신호 펩타이드이

다. 한 실시양태에서, 신호 펩타이드는 유형 I, II, III 또는 IV의 인간 단백질이다. 한 실시양태에서, 신호 펩타이드는 면역글로불린 중쇄 신호 펩타이드를 포함한다.

- [0026] "항원 인식 도메인"은 표적의 항원, 수용체, 펩타이드 리간드 또는 단백질 리간드에 대해 선택적이거나 또는 표적하는 폴리펩타이드 또는 표적의 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0027] 항원 인식 도메인은 리간드 결합 및/또는 신호 전달과 연관된 임의의 매우 다양한 세포의 도메인 또는 분비된 단백질로부터 얻을 수 있다. 항원 인식 도메인은 Ig 경쇄 일부와 연결된 Ig 중쇄 부분을 포함할 수 있고 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 단편 변이체 (scFv)를 구성할 수 있다. 항체는 단클론항체 또는 다클론 항체이거나 또는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 임의의 유형일 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 항원 인식 도메인은 수용체 또는 리간드일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 표적 항원은 특정 질환 상태에 특이적이고 질환 상태는 화합물 CAR 아키텍처에 존재하는 키메라 수용체 구축물 중 적어도 하나에 의해 인지될 수 있는 세포 표면 항원을 갖는 한 임의의 종류일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 키메라 수용체는 특정 단클론 항체 또는 다클론 항체가 존재하거나 생성될 수 있는 임의의 암을 위한 것일 수 있다. 특히, 신경모세포종, 소세포폐암, 흑색종, 난소암, 신장세포암종, 대장암, 호지킨림프종 및 소아 급성 림프모구성백혈병과 같은 암은 키메라 수용체에 특이적인 항원을 갖는다.
- [0028] 표적 특이적 항원 인식 도메인은 바람직하게도, 표적 항원에 대한 항체, 또는 표적 항원에 결합하는 펩타이드, 또는 표적 항원에 결합하는 항체에 결합하는 펩타이드 또는 단백질, 또는 표적 상 수용체에 결합하는 펩타이드 또는 단백질 리간드 (성장 인자, 사이토카인 또는 호르몬을 포함하나 이에 한정되지는 않음)로부터 유래된 항원 결합 도메인을 포함하거나, 또는 표적상의 펩타이드 또는 단백질 리간드에 결합하는 수용체 (성장 인자 수용체, 사이토카인 수용체 또는 호르몬 수용체를 포함하나 이에 한정되지는 않음)로부터 유래된 도메인을 포함한다.
- [0029] 하나의 실시양태에서, 항원 인식 도메인은 표적에 대해 (선택적으로) 지시된 단클론항체 또는 다클론항체의 결합 부분 또는 가변 영역을 포함한다.
- [0030] 또 다른 실시 양태에서, 항원 인식 도메인은 낙타류 단일 도메인 항체 또는 이의 일부를 포함한다. 하나의 실시 양태에서, 낙타류 단일 도메인 항체는 낙타류에서 발견되는 중쇄 항체 또는 VHH 항체를 포함한다. 낙타 동물 (예: 낙타, 단봉낙타, 라마 및 알파카)의 VHH 항체는 낙타류 단일 사슬 항체의 가변 단편을 말하며 (Nguyen et al, 2001; Muyldermans, 2001 참조), 또한 낙타류의 단리된 VHH 항체, 낙타류의 재조합 VHH 항체, 또는 낙타류의 합성 VHH 항체를 포함한다.
- [0031] 또 다른 실시 양태에서, 항원 인식 도메인은 그들의 동족 수용체와 결합하는 리간드를 포함한다. 예로서, APRIL은 TAC1 수용체 또는 BCMA 수용체에 결합하는 리간드이다. 본원에 개시된 발명에 따르면, 항원 인식 도메인은 APRIL 또는 이의 단편을 포함한다. 추가의 예로서, BAFF는 BAFF-R 수용체 또는 BCMA 수용체에 결합하는 리간드이다. 본원에 개시된 발명에 따르면, 항원 인식 도메인은 BAFF 또는 이의 단편을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 항원 인식 도메인은 인간화된다.
- [0032] 항원 인식 도메인은 그의 서열 내에 약간의 가변성을 포함할 수 있고, 본원에 개시된 표적에 대해 여전히 선택적인 것으로 이해된다. 따라서, 항원 인식 도메인의 폴리펩타이드는 본원에 개시된 항원 인식 도메인 폴리펩타이드와 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 80%, 또는 적어도 70% 동일할 수 있으며, 여기에 설명된 표적에 대해 여전히 선택적이고, 본 개시내용의 범위 내에 있다는 것이 고려된다.
- [0033] 표적은 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파 태아단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BCMA, BAFF-R, TAC1, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15 CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, CS1, CD45, ROR1, PSMA, MAGE A3, 당지질, 글리피칸 3, F77, GD-2, WT1, CEA, HER-2/neu, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE- 6, 알파태아단백, CA 19-9, CA 72-4, NY-ESO, FAP, ErbB, c-Met, MART-1, CD30, EGFRvIII, 면역 글로블린 카파 및 람다, CD38, CD52, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD2, 및 CD138을 포함한다.
- [0034] 또 다른 실시 양태에서, 표적은 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파태아단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BCMA, BAFF-R, TAC1, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15 CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, CS1, CD45, TAC1, ROR1, PSMA, MAGE A3, 당지질, 글리피칸 3, F77, GD-2, WT1, CEA, HER-2/neu, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE- 6, 알파태아단백, CA 19-9, CA 72-4, NY-ESO, FAP, ErbB, c-Met, MART-1, CD30, EGFRvIII, 면역 글로블린 카파 및 람다, CD38, CD52, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD2, 및 CD138의 임의의 부분을 포함한다.

- [0035] 하나의 실시 양태에서, 표적은 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파태아단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BCMA, BAFF-R, TACI, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15 CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, CS1, CD45, TACI, ROR1, PSMA, MAGE A3, 당지질, 글리피칸 3, F77, GD-2, WT1, CEA, HER-2/neu, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE- 6, 알파태아단백, CA 19-9, CA 72-4, NY-ESO, FAP, ErbB, c-Met, MART-1, CD30, EGFRvIII, 면역 글로블린 카파 및 람다, CD38, CD52, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD2, 및 CD138 폴리펩타이드의 표면 노출된 부분을 포함한다.
- [0036] 또 다른 실시 양태에서, 표적 항원은 인간 유두종 바이러스 (HPV) 또는 EBV (엡스타인-바 바이러스) 항원으로부터의 E6 및 E7과 같은 바이러스 또는 곰팡이 항원; 이의 일부; 또는 이의 표면 노출된 영역을 포함한다.
- [0037] 하나의 실시 양태에서, TACI 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 24를 포함한다.
- [0038] 하나의 실시 양태에서, BCMA 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 25를 포함한다.
- [0039] 하나의 실시 양태에서, CS1 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 26를 포함한다.
- [0040] 하나의 실시 양태에서, BAFF-R 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 27를 포함한다.
- [0041] 하나의 실시 양태에서, CD33 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 28를 포함한다.
- [0042] 하나의 실시 양태에서, CD123 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 29를 포함한다.
- [0043] 하나의 실시 양태에서, CD19 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 30를 포함한다.
- [0044] 하나의 실시 양태에서, CD20 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 31를 포함한다. 또 다른 하나의 실시 양태에서, CD20 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 32를 포함한다.
- [0045] 하나의 실시 양태에서, CD22 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 33를 포함한다.
- [0046] 하나의 실시 양태에서, CD45 항원 인식 도메인은 SEQ ID NO. 34를 포함한다.
- [0047] 힌지 영역은 예를 들어, 키메라 항원 수용체 그리고 적어도 하나의 보조 자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하나 이에 한정되지는 않는 사이에 위치한 서열이다. 힌지 서열은 예를 들어 인간 또는 그 일부를 포함하는 임의의 속으로부터의 임의의 적합한 서열로부터 포함하여 얻어질 수 있다. 이러한 힌지 영역은 당 업계에 공지되어있다. 하나의 실시양태에서, 힌지 영역은 CD-8 알파, CD28, 4-1BB, OX40, CD3-제타, T 세포 수용체  $\alpha$  또는  $\beta$  사슬, CD3 제타 사슬, CD28, CD3  $\epsilon$ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD8a, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 이들의 기능적 유도체 그리고 이들의 조합을 포함하는 인간 단백질의 힌지 영역을 포함한다.
- [0048] 하나의 실시 양태에서 힌지 영역은 CD8 힌지 영역을 포함한다.
- [0049] 일부 실시 양태에서, 힌지 영역은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 면역글로블린 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgD)으로부터 선택되는 하나를 포함한다.
- [0050] 막통과 도메인은 세포막에 걸치는 소수성 폴리펩타이드를 포함한다. 특히, 막통과 도메인은 세포막의 한면 (세포외)에서 세포막의 다른면 (세포내 또는 세포질)을 통하여 걸쳐있다.
- [0051] 막통과 도메인은 알파 나선 또는 베타 배럴, 또는 이들의 조합의 형태일 수 있다. 막통과 도메인은 다수의 막통과 절편, 각 알파-나선형, 베타 시트, 또는 이들의 조합을 갖는 다원(polytopic) 단백질을 포함할 수 있다.
- [0052] 하나의 실시 양태에서, CAR에서의 도메인 중 하나와 자연적으로 회합되는 막통과 도메인이 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 막통과 도메인은 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형되어, 동일한 또는 상이한 표면 막 단백질의 막통과 도메인에 이러한 도메인이 결합하는 것을 막고 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호 작용을 최소화한다.
- [0053] 예를 들어, 막통과 도메인은 T-세포 수용체  $\alpha$  또는  $\beta$  쇄, CD3 제타 쇄, CD28, CD3  $\epsilon$ , CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD68, CD134, CD137, ICOS, CD41, CD154, 이들의 기능적 유도체 및 이들의 조합물의 막통과 도메인을 포함한다.
- [0054] 하나의 실시 양태에서, 막통과 도메인은 도메인의 아미노산 잔기의 25 % 초과, 50 % 초과 또는 75 % 초과가 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기가 되도록 인위적으로 설계된다. 하나의 실시 양태에서, 페닐알라닌, 트립토판

및 발린의 삼중체는 합성 막통과 도메인의 각 말단에서 발견된다.

- [0055] 하나의 실시 양태에서, 막통과 도메인은 CD8 막통과 도메인이다. 또 다른 실시 양태에서, 막통과 도메인은 CD28 막통과 도메인이다. 이러한 막통과 도메인은 당 업계에 공지되어있다.
- [0056] 신호전달 도메인 및 보조 자극 도메인은 면역세포 신호전달 경로의 적어도 일부 면을 자극 또는 활성화시키기 위한 면역세포의 활성화를 제공하는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0057] 하나의 실시양태에서, 신호전달 도메인은 CD3 제타, 공통 FcR 감마 (FCER1G), Fc감마RIIIa, FcR베타 (Fc 엡실론 립), CD3감마, CD3델타, CD3 엡실론, CD79a, CD79b, DNAX- 활성화 단백질 10 (DAP10), DNAX- 활성화 단백질 12 (DAP12), 이들의 활성 단편, 이들의 기능적 유도체 및 이들의 조합물의 기능적 신호전달 도메인의 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 신호전달 도메인은 당 업계에 공지되어있다.
- [0058] 하나의 실시 양태에서, CAR 폴리펩타이드는 하나 이상의 보조 자극 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시 양태에서, 보조 자극 도메인은 OX40; CD27; CD28; CD30; CD40; PD-1; CD2; CD7; CD258; 자연살상 그룹 2 멤버 C (NKG2C); 자연살상 그룹 2 멤버 (NKG2D); B7-H3; CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS 및 4-1BB (CD137) 중 적어도 하나에 결합하는 리간드, CDS; ICAM-1; LFA-1 (CD1a/CD18); CD40; CD27; CD7; B7-H3; NKG2C; PD-1; ICOS; 이들의 활성 단편, 이들의 기능 유도체, 및 이들의 조합을 포함하는 단백질로부터 유래한 기능 신호전달 도메인이다.
- [0059] 본원에 사용된 바와 같이, 적어도 하나의 보조 자극 도메인 및 신호전달 도메인은 세포내 도메인으로서 총체적으로 지칭될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 힌지 영역과 항원 인식은 세포의 도메인으로서 총체적으로 지칭될 수 있다.
- [0060] 본 개시내용은 상기 기술된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 제공한다.
- [0061] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 사슬로서 정의된다. 폴리뉴클레오타이드는 DNA 및 RNA를 포함한다. 더욱이, 핵산은 뉴클레오타이드의 중합체이다. 따라서, 본원에 사용된 핵산 및 폴리뉴클레오타이드는 상호 교환 가능하다. 당업계의 통상의 기술자는 핵산이 폴리뉴클레오타이드고 이것이 단량체 "뉴클레오타이드"로 가수 분해될 수 있다는 일반적인 지식을 갖는다. 단량체 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드로 가수 분해될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 폴리뉴클레오타이드는 통상적인 클로닝 기술 및 중합 효소 연쇄 반응 (PCR) 등을 사용하는 재조합 수단들, 즉 재조합 라이브러리 또는 세포 유전체로부터의 핵산 서열 클로닝을 포함하나 이에 제한되는 않는, 당업계에서 이용 가능한 임의의 수단, 및 합성 수단에 의해 획득되는 모든 핵산 서열을 포함하나 그것에 국한되는 것은 아니다.
- [0062] CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 임의의 통상적인 방법에 의해 특정 CAR의 아미노산 서열로부터 용이하게 제조된다. 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열은 전술한 각 도메인의 아미노산 서열에 대한 전술된 NCBI RefSeq ID 또는 GenBank의 수탁번호로부터 얻을 수 있으며, 본 개시내용의 핵산은 표준 분자 생물학적 및/또는 화학적 절차를 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 염기 서열에 기초하여 폴리뉴클레오타이드를 합성할 수 있고, 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)을 이용하여 cDNA 라이브러리로부터 얻어지는 DNA 단편을 조합하는 것에 의해 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드를 제조할 수 있다.
- [0063] 하나의 실시 양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드는 유전자, 또는 발현 또는 클로닝 카세트의 일부이다.
- [0064] 상기 기재된 폴리뉴클레오타이드는 벡터로 클로닝될 수 있다. "벡터"는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하고 단리된 폴리뉴클레오타이드를 세포의 내부로 전달하는데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온 또는 양친매성 화합물과 회합된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 파지미드, 코스미드 및 바이러스를 포함하는 많은 벡터가 당 업계에 공지되어 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바이러스는 파지, 파지 유도체를 포함한다. 따라서, 용어 "벡터"는 자율적으로 복제하는 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한 예를 들어, 폴리라이신 화합물, 리포솜 등과 같은, 세포로의 핵산의 전달을 용이하게 하는 비플라스미드 및 비바이러스 화합물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 하나의 실시 양태에서, 벡터는 클로닝 벡터, 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 통합 벡터, 그리고 시퀀싱 벡터를 포함한다.



- [0065] 하나의 실시 양태에서, 벡터는 바이러스 벡터다. 하나의 실시 양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터다. 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 바이러스에 의해 형질도입되어 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현한다.
- [0066] 많은 바이러스 기반 시스템이 포유동물 세포로의 유전자 전달을 위해 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 벡터에 삽입되고 레트로바이러스 입자 내에 패키징될 수 있다. 이어서, 재조합 바이러스는 단리되고 생체내 또는 생체외에서 환자 세포로 전달될 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 당 업계에 공지되어 있다. 일부 실시 양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 당 업계에 공지되어 있다. 하나의 실시 양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0067] 바이러스 벡터 기술은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어 Sambrook 등 (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), 그리고 기타 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기술되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 및 렌티바이러스를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선택 마커를 포함한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 U.S. Pat. No. 6,326,193).
- [0068] 렌티바이러스 벡터는 유전자를 인간 T 세포에 높은 효율로 전달하는 능력으로 잘 알려져 있지만 벡터-코딩된 유전자의 발현은 그들의 발현을 유도하는 내부 프로모터에 의존한다. 증가된 CAR 바디 사이즈가 동일한 수준의 발현을 보장하지 못하기 때문에 강력한 프로모터는 추가적인 보조 자극 도메인 또는 증식성 사이토카인을 코딩하는 유전자를 보유하는 제3세대 또는 4세대 CAR에 특히 중요하다. 상이한 강도와 세포 유형 특이성을 갖는 광범위한 프로모터가 존재한다. CAR T 세포를 이용하는 유전자 요법은 충분한 CAR 바디를 발현하고 장기간에 걸쳐 발현을 유지하는 T 세포의 능력에 의존한다. EF-1 $\alpha$  프로모터가 CAR 발현을 위해 통상적으로 선택되었다.
- [0069] 본 발명은 T 세포 또는 NK 세포에서의 높은 수준의 유전자 발현을 위한 강력한 프로모터를 함유하는 발현 벡터에 관한 것이다. 추가의 실시 양태에서, 발명자는 T 세포 또는 NK 세포에서 CAR의 고수준 발현에 유용한 강력한 프로모터를 개시한다. 특정 실시 양태에서, 강한 프로모터는 T 세포 또는 NK 세포에서 높은 수준의 발현을 얻고 장시간 동안 발현을 유지하기 위해 발현 벡터에 선택적으로 도입되는 SFFV 프로모터에 관한 것이다. 발현된 유전자는 면역 요법에 사용되는 CAR, T 세포 보조 자극 인자 및 사이토 카인을 선호한다.
- [0070] 적합한 프로모터의 한 예는 극초기 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 그에 작동 가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 다른 예는 신장 성장 인자-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )이다. 그러나, 원숭이바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터뿐만 아니라, 예컨대 비제한적으로 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 혈색소 프로모터, 및 크레아틴 키나아제 프로모터인 인간 유전자 프로모터를 포함하나 이에 한정되지는 않는 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다. 또한, 본 개시내용은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되지 않아야 하며, 유도성 프로모터도 본 개시내용의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 발현이 요구될 때 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 작동시킬 수 있거나 발현이 요구되지 않을 때 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예로는 메탈로티오네인 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로그스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0071] 키메라 항원 수용체 폴리뉴클레오타이드의 발현은 예를 들어, 적어도 하나의 SFFV (비장-포커스 형성 바이러스) (예를 들어, SEQ ID NO. 23) 또는 인간 신장 인자 11 $\alpha$  (EF) 프로모터, CAG (CMV 인핸서를 갖는 닭 베타-액틴 프로모터) 프로모터, 인간 신장 인자 1 $\alpha$  (EF) 프로모터를 포함하나 이에 한정되지는 않는 발현 벡터를 사용하여 달성될 수 있다. 이용된 덜 강력한/저 발현 프로모터의 예는 원숭이바이러스40 (SV40) 초기 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 프로모터, 유비퀴틴 C (UBC) 프로모터 및 포스포글리세레이트키나제 1 (PGK) 프로모터 또는 이들의 일부를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 키메라 항원 수용체의 유도성 발현은 예를 들어, TRE3GV (모든 세대 및 바람직하게는 제 3 세대를 비롯한 Tet-반응 요소), 유도성 프로모터 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA), 또는 이들의 일부 또는 조합을 포함하나 이에 한정되지는 않는 테트라사이클린 반응성 프로모터를 사용하여 달성될 수 있다.
- [0072] 바람직한 실시 양태에서, 프로모터는 SFFV 프로모터 또는 이의 유도체이다. 본 개시내용에 준하여 SFFV 프로모

터가 본 개시내용에 따른 형질 도입된 세포에서 더 강한 발현 및 더 큰 지속성을 제공한다는 사실이 예상치 못하게 밝혀졌다.

- [0073] "발현 벡터"는 발현된 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 말한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작용 요소를 포함한다; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템 내에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 코스미드, 플라스미드 (예를 들어, 네이키드 또는 리포솜 내에 함유됨) 및 바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)와 같은 당 업계에 공지된 모든 것들을 포함한다. 발현 벡터는 바이시스트론 (bicistronic) 또는 멀티시스트론 (multicistronic) 발현 벡터일 수 있다. 바이시스트론 (bicistronic) 또는 멀티시스트론 (multicistronic) 발현 벡터는 (1) 각각의 오픈 리딩 프레임에 융합된 다수의 프로모터; (2) 유전자들 사이에 스플라이싱 신호 삽입; 발현이 단일 프로모터에 의해 유도되는 유전자의 융합; (3) 유전자들 사이에 단백질분해 절단 부위의 삽입 (자가 절단 펩타이드); 및 (iv) 유전자들 사이에 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)의 삽입.
- [0074] 하나의 실시 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 갖는 조작된 세포를 제공한다.
- [0075] "조작된 세포"는 유전자, DNA 또는 RNA 서열, 또는 단백질 또는 폴리펩타이드의 첨가 또는 변형에 의해 변형, 형질전환 또는 조작된 임의의 유기체의 임의의 세포를 의미한다. 본 개시내용의 단리된 세포, 숙주 세포 및 유전적으로 조작된 세포는 키메라 항원 수용체 또는 키메라 항원 수용체 복합체를 코딩하는 DNA 또는 RNA 서열을 함유하는 NK세포 및 T세포와 같은 단리된 면역 세포를 포함하고, 세포 표면에서 키메라 수용체를 발현한다. 단리된 숙주 세포 및 조작된 세포는 예를 들어, NK 세포 활성화 또는 T 림프구 활성화의 증진, 암 치료, 및 감염질환 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0076] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 면역조절 세포를 포함한다. 면역조절 세포에는 CD4 T세포 (헬퍼T세포), CD8T세포 (세포독성T세포, CTL), 및 기억T세포 또는 기억 줄기세포T세포와 같은 T세포가 포함된다. 또 다른 실시 양태에서, T세포는 자연 살상 T세포 (NK T세포)를 포함한다.
- [0077] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 자연 살상 세포를 포함한다. 자연 살상 세포는 당 업계에 잘 알려져 있다. 하나의 실시 양태에서, 자연 살상 세포는 NK-92 세포와 같은 세포주를 포함한다. NK 세포주의 추가 예는 NKG, YT, NK-YS, HANK-1, YTS 세포 및 NKL 세포를 포함한다.
- [0078] NK 세포는 GvHD의 위험없이 항종양 효과를 증개하고 T 세포에 비해 수명이 짧다. 그러므로, 암세포를 파괴한 직후 NK세포는 소진되고, 이는 변형된 세포를 제거할 수 있는 CAR 구축물 상의 유도성 자살 유전자에 대한 필요를 감소시킬 것이다.
- [0079] 본 개시내용에 따르면, 놀랍게도, NK 세포가 본원에 개시된 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 함유하고 발현 하도록 조작된 용이하게 이용가능한 세포를 제공한다는 것이 놀랍게 밝혀졌다.
- [0080] 동종이계 또는 자가 NK 세포는 빠른 면역 반응을 유도하지만 그들의 제한된 수명으로 인해 혈액순환으로부터 상대적으로 빠르게 사라진다. 따라서, 본 출원인들은 놀랍게도 CAR 세포 기반 요법을 사용하면 부작용 지속의 우려가 감소된다는 것을 발견했다.
- [0081] 본 개시내용은 cCAR을 생성하는 방법을 포함한다. 일부 실시 양태에서, cCAR은 T 세포를 사용하여 생성된다. 다른 실시 양태에서, cCAR은 질환 또는 암을 가진 임의의 포유동물에게 "기성품(off-the-shelf)"으로 투여되도록 말초 혈액 또는 제대혈 및 NK-92 세포로부터 단리된 1차 NK 세포를 사용한다.
- [0082] 본 발명의 한 양태에 따르면, NK 세포는 본 발명에 따라 팽창되고 CAR 폴리뉴클레오타이드로 형질 감염될 수 있다. NK 세포는 제대혈, 말초 혈액, iPS 세포 및 배아 줄기 세포에서 유래될 수 있다. 본 발명의 한 양태에 따르면, NK-92 세포는 팽창되고 CAR로 형질 감염될 수 있다. NK-92는 자연 살상 세포 (NK 세포)의 특색과 특징을 가진 지속적으로 성장하는 세포주이다 (Arai, Meagher et al., 2008). NK-92 세포주는 IL-2 의존적이며 안전하고 (Arai, Meagher 등, 2008) 실현가능한 것으로 입증되었다. CAR 발현하는 NK-92 세포는 무혈청-배지에서 피더 세포와 공동 배양하거나 공동 배양하지 않는 것으로 팽창될 수 있다. 관심 CAR을 운반하는 NK-92의 순수한 집단은 분류에 의해 얻을 수 있다.
- [0083] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 공여자로부터 얻은, MHC 인식에 관여하는 TCR (T 세포 수용체)의 성분을 불활성화하도록 변형된, 동종이계 T 세포를 포함한다. 결과적으로, TCR 결핍 T 세포는 이식편 대 숙주 질환

(GVHD)을 유발하지 않을 것이다.

- [0084] 일부 실시 양태에서, 조작된 세포는 세포 표면 항원의 발현을 방지하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 조작된 세포는 천연 CD45 유전자를 제거하도록 유전적으로 변형되어 이들의 발현 및 세포 표면 디스플레이를 방지할 수 있다.
- [0085] 일부 실시 양태에서, 조작된 세포는 유도성 자살 유전자 ("안전 스위치") 또는 안전 스위치들의 조합을 포함하며, 이는 비제한적으로 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 플라스미드와 같은 벡터 상에서 조립될 수 있다. "안전 스위치"의 도입은 안전 프로필을 크게 증가시키고 화합물 CAR의 온-표적 (on-target) 또는 오프-종양(off-tumor) 독성을 제한한다. "안전 스위치"는 비제한적으로 카스파제 9 유전자, 티미딘키나아제, 시토신데아미나제 (CD) 또는 시토크롬 P450과 같은 유도성 자살 유전자일 수 있다. 원하지 않는 변형된 T 세포를 제거하기 위한 다른 안전 스위치는 T 세포에서의 CD20 또는 CD19의 발현 또는 말단절단된 표피 성장 인자 수용체를 포함한다. 본 발명에서는 가능한 모든 안전 스위치가 고려되고 실시된다.
- [0086] 일부 실시 양태에서, 자살 유전자는 조작된 세포 유전체 내로 통합된다.
- [0087] 하나의 실시 양태에서, 본 개시내용은 CD45 키메라 항원 수용체 폴리뉴클레오타이드를 갖는 조작된 세포를 제공한다. 하나의 실시 양태에서, CD45 CAR 폴리펩타이드는 SEQ ID NO.13 및 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열 SEQ ID NO. 14를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, CD45 CAR 폴리펩타이드는 SEQ ID NO. 15 및 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열 SEQ ID NO. 16을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, CD45 CAR 폴리펩타이드는 SEQ ID NO. 17 및 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열 SEQ ID NO. 18을 포함한다.
- [0088] **다중 CAR 단위**
- [0089] 본 개시내용은 적어도 2 개의 별개의 CAR 폴리펩타이드를 갖는 조작된 세포를 제공한다.
- [0090] 본원에서 사용된 바와 같이, 화합물 CAR (cCAR) 또는 다중 CAR은 적어도 2개의 별개의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 갖는 조작된 세포를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "별개의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드"는 고유한 항원 인식 도메인, 신호 펩타이드, 힌지 영역, 막통과 도메인, 적어도 하나의 보조 자극 도메인 및 신호전달 도메인을 갖는다. 따라서, 두 개의 고유한 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 상이한 항원 인식 도메인을 가질 것이다. 신호 펩타이드, 힌지 영역, 막통과 도메인, 적어도 하나의 보조 자극 도메인 및 신호전달 도메인은 2개의 별개의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 사이에서 동일하거나 상이할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 키메라 항원 수용체 (CAR) 단위는 별개의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0091] 본원에 사용된 바와 같이, 고유한 항원 인식 도메인은 단일 표적에 대해 특이적이거나 또는 단일 표적을 표적으로 하는 것이거나 또는 표적의 단일 에피토프이다.
- [0092] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 동일한 항원을 표적으로 한다. 예를 들어, cCAR은 단일 항원의 상이한 에피토프 또는 부분을 표적으로 한다. 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR에 존재하는 각각의 CAR 단위는 질환 상태에 의해 야기되는 동일한 또는 상이한 질환 상태 또는 부작용에 대해 특이적인 상이한 항원을 표적으로 한다.
- [0093] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 두 개의 상이한 항원을 표적으로 한다.
- [0094] 상이한 CAR 단위를 지닌 화합물 CAR의 생성은 상당히 어려울 수 있다: (1) CAR-CAR 상호 작용은 해로운 효과가 있을 수 있으며 적절한 CAR 설계가 이 효과를 상쇄하는 키이다; (2) 단일 구축물 내의 화합물 CAR은 발현 카세트의 길이를 증가시킬 수 있고, 이는 바이러스 역가와 단백질 발현 수준의 감소를 일으킬 수 있다; (3) 특히 다중 CAR을 단일 벡터에서 발현시키는 전략을 선택하기 위해 다양한 CAR 바디 요소를 포함하는 적절한 설계가 필요하다; (4) 강력한 프로모터는 CAR의 추가 단위를 지니고 있는 화합물 CAR에 대해 특히 중요하다; (5) CAR 내의 힌지 영역은 각 CAR 단위 사이의 힌지 영역의 상호 작용이 바람직하게 방지되게 설계될 필요가 있다; (6) 세포 내에서 발현하는 CAR의 2 개 이상의 단위는 독성 효과를 일으킬 수 있다 (CAR-CAR 상호 작용). 본 출원인은 이러한 장애물을 극복하기 위해 신규하고 놀라운 CAR 조성물 및 방법을 본원에서 제공한다.
- [0095] 하나의 실시 양태에서, 본 개시내용은 다중 CAR 단위를 갖는 조작된 세포를 제공한다. 이는 단일 조작된 세포가 다수 항원을 표적으로 할 수 있게 허락한다. 다중 CAR 단위를 이용하여 다수 표면 마커 또는 항원을 동시에 표적으로 삼는 것은 내성 클론의 선택을 방지하고 종양의 재발을 줄인다. 다양한 도메인과 활성 부위를 포함하는 각 개별 구성요소 CAR를 이용하는 다중 CAR T세포 면역요법은 아직 어떤 악성 종양에 대해서도 개발되지 않

았다.

- [0096] 본 발명의 한 측면에서, cCAR은 다중 CAR 단위를 포함한다. 일부 실시 양태에서, cCAR은 적어도 2개의 CAR 단위를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, cCAR은 적어도 3개의 CAR 단위를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, cCAR은 적어도 4 개의 단위를 포함한다.
- [0097] 하나의 실시 양태에서, 본 개시내용은 각각 상이한 항원 인식 도메인을 갖는, 적어도 2 개의 별개의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 갖는 조작된 세포를 제공한다.
- [0098] 바람직한 실시 양태에서, 적어도 2개의 별개의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 갖는 조작된 세포는 말초 혈액 또는 체대혈 및 NK-92 세포로부터 단리된 1차 NK 세포이며, 이로 인해 이들은 질환이나 암을 가진 임의의 포유동물에게 "기성품"으로 투여된다.
- [0099] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 (i.) 제1항원 인식 도메인, 제1신호 펩타이드, 제1힌지 영역, 제1막통과 도메인, 제1 보조 자극 도메인 및 제1신호전달 도메인을 포함하는 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드; 및 (ii.) 제2항원 인식 도메인, 제2신호 펩타이드, 제2힌지 영역, 제2막통과 도메인, 제2보조 자극 도메인 및 제2신호전달 도메인을 포함하는 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함한다. 제1항원 인식 도메인은 제2항원 인식 도메인과 다르다.
- [0100] 바람직한 실시 양태에서, 각각의 조작된 CAR 단위 폴리뉴클레오타이드는 상동 제조함을 피하기 위해 상이한 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [0101] 하나의 실시 양태에서, 제1항원 인식 도메인의 표적은 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파 태아 단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BAFF-R, BCMA, TACI, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15 CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 제2인식 도메인의 표적은 인터루킨 6 수용체, NY-ESO-1, 알파 태아 단백 (AFP), 글리피칸-3 (GPC3), BAFF-R, BCMA, TACI, LeY, CD5, CD13, CD14, CD15 CD19, CD20, CD22, CD33, CD41, CD61, CD64, CD68, CD117, CD123, CD138, CD267, CD269, CD38, Flt3 수용체, 및 CS1로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0102] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 CD19 항원 인식 도메인을 갖는 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 CD20 인식 도메인을 갖는 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 실시 양태에서, 이러한 조작된 세포는 SEQ ID NO. 3의 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO. 4의 상응하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0103] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 CD19 항원 인식 도메인을 갖는 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 CD22 항원 인식 도메인을 갖는 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 실시 양태에서, 이러한 조작된 세포는 SEQ ID NO. 5의 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO. 6의 상응하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0104] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 CD19 항원 인식 도메인을 갖는 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 CD123 항원 인식 도메인을 갖는 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 실시 양태에서, 이러한 조작된 세포는 SEQ ID NO. 7의 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO. 8의 상응하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0105] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 CD33 항원 인식 도메인을 갖는 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 CD123 항원 인식 도메인을 갖는 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 실시 양태에서, 이러한 조작된 세포는 SEQ ID NO. 9의 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO. 10의 상응하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 이 조작된 세포는 SEQ ID NO. 11의 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO. 12의 상응하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0106] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 BAFF-R 항원 인식 도메인을 갖는 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 CS1 항원 인식 도메인을 갖는 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0107] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 CD269 항원 인식 도메인을 갖는 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 CS1 항원 인식 도메인을 갖는 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 SEQ ID NO. 19의 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO. 20의 상응하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 SEQ ID NO. 21의 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO. 22의 상응하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0108] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 CD33 항원 인식 도메인을 갖는 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 CD123 항원 인식 도메인을 갖는 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 포함한다.



- [0109] 하나의 실시 양태에서, 각 CAR 단위는 동일하거나 상이한 힌지 영역을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 각 CAR 단위는 동일하거나 상이한 막통과 영역을 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 각 CAR 단위는 동일하거나 상이한 세포내 도메인을 포함한다.
- [0110] 하나의 실시 양태에서, 각 CAR 단위는 CD3 제타 쇠 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0111] 하나의 실시 양태에서, 각 별개의 CAR 단위는 상호 작용을 피하기 위해 상이한 보조 자극 도메인을 포함한다. 예를 들어, 제1키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 4-BB 보조- 자극 도메인을 포함하고; 제2키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 CD28 보조- 자극 도메인을 포함한다.
- [0112] 또 다른 실시 양태에서, 힌지 영역은 원치 않는 분자내 또는 분자간 상호 작용을 일으킬 수 있는 아미노산을 배제하도록 설계된다. 예를 들어, 힌지 영역은 디설피드 결합의 형성을 방지하기 위해 시스테인 잔기를 배제하거나 최소화하도록 설계될 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 힌지 영역은 원하지 않는 소수성 상호 작용을 방지하기 위해 소수성 잔기를 배제하거나 최소화하도록 설계될 수 있다.
- [0113] 화합물 CAR은 독립적으로 또는 조합하여 살상을 수행할 수 있다. 다중 또는 화합물 CAR은 동일하거나 상이한 힌지 영역, 동일하거나 상이한 막통과, 동일하거나 상이한 보조- 자극 및 동일하거나 상이한 세포내 도메인들을 포함한다. 바람직하게는, 힌지 영역은 상호 작용 부위를 피하도록 선택된다.
- [0114] 본 발명의 화합물 CAR은 T 또는 NK 세포에서 동일하거나 상이한 종양 집단을 표적화할 수 있다. 제1 CAR은 예를 들어, 벌크 종양 집단을 표적으로 할 수 있으며 다음 또는 제2 CAR은 예를 들어, 암 또는 백혈병 줄기 세포를 근절하여 암 재발을 피할 수 있다.
- [0115] 본 발명에 따르면, 놀랍게도 상이한 또는 동일한 종양 집단을 표적으로 하는 T 또는 NK 세포에서의 화합물 CAR은 암세포가 CAR 살상 활성화에 저항성이 되도록 하여 암세포 표면으로부터의 표적 항원의 하향 조절을 생성하는 종양 인자를 퇴치한다는 것이 발견되었다. "항원 회피"로 불리는 것이 암세포를 CAR 요법으로부터 "숨겨지도록" 할 수 있다는 것과 서로 다른 종양 세포가 별개의 표면 항원 발현 프로파일을 보일 수 있게 하는 종양 이질성이 또한 놀랍게도 발견되었다.
- [0116] **CAR 폴리펩타이드 및 인헨서를 갖는 조작된 세포**
- [0117] 또 다른 실시 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 인헨서를 갖는 조작된 세포를 제공한다.
- [0118] 하나의 실시 양태에서, 본 개시내용은 적어도 2개의 별개의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 인헨서를 갖는 조작된 세포를 제공한다.
- [0119] 본원에 사용된 바와 같이, 인헨서는 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드를 갖는 조작된 세포의 활성을 촉진하거나 증진시키는 생물학적 분자를 포함한다. 인헨서에는 사이토카인이 포함된다. 또 다른 실시 양태에서, 인헨서는 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, PD-1, PD-L1, CSF1R, CTAL-4, TIM-3 및 TGF $\beta$  베타, 동일 수용체, 그리고 이들의 기능적 단편을 포함한다.
- [0120] 인헨서는 본원에 기술된 조작된 세포에 의해 발현될 수 있고, 조작된 세포의 표면 상에 디스플레이될 수 있거나, 또는 인헨서는 조작된 세포에 의해 주변 세포의 공간으로 분비될 수 있다. 표면 디스플레이 및 분비의 방법들은 당 업계에 잘 알려져있다. 예를 들어, 인헨서는 표면 디스플레이 또는 세포의 공간으로의 분비를 제공하는 펩타이드와의 융합 단백질일 수 있다.
- [0121] 인헨서의 효과는 인헨서 수용체 및 이의 기능적 단편과 같은 추가적인 인자에 의해 보완될 수 있다. 추가적인 인자는 융합 단백질로서 인헨서와 함께 공동 발현되거나 또는 별도의 펩타이드로 발현되어 세포의 공간으로 분비될 수 있다.
- [0122] 하나의 실시 양태에서, 인헨서는 IL-15이다. 이 경우, 추가적인 인자는 IL-15 수용체 및 이의 기능적 단편이다. 기능적 단편은 IL-15 수용체, IL-15RA 및 IL-15RA의 스시 도메인을 포함한다. 적합한 스시 도메인의 하나의 예는 SEQ ID NO. 35를 포함한다. 본 개시내용에 따라, 본원에 개시된 임의의 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드는 인간 인터루킨 2 신호 펩타이드 SEQ ID NO. 36을 갖는 인간 인터루킨 15를 포함한다.
- [0123] 인터루킨-15와 그것의 특이적인 수용체 사슬인 IL-15R $\alpha$  (IL-15-RA)는 NK와 CD8 T 세포를 포함하여 다양한 효과기 세포에서 중요한 기능적 역할을 한다. CD8 + T 세포는 생체내 전이 후에 생존을 유지하기 위해, IL-2, IL-7, IL21 또는 IL-15를 포함하나 이에 한정되지는 않는 자가분비 성장 인자를 발현하도록 변형될 수 있다. 이룬

에 얽매는 것을 원하지는 않지만, IL-15는 CD4 결핍을 극복하여 1차 CD8T 세포를 유도하고 기억 CD8 T 세포를 소환할 수 있다고 믿어진다. CD8 T 세포 상에서의 IL-15-RA 또는 IL-15 IL-RA 융합의 과발현은 생체내 및 시험관내에서 그의 생존 및 증식을 유의적으로 증진시킨다. 일부 실시 양태에서, CD4CAR 또는 임의의 CAR은 CAR T 또는 NK의 생존 또는 증식을 증진시키고, 기억 CAR CD8 + T 세포의 팽창을 개선시키기 위해, 모이어티, IL-15, IL15RA 및 IL-15/IL-15R 또는 IL15-RA/IL-15, 또는 이들의 일부 또는 조합 중의 임의의 하나 이상을 발현하는 것을 포함할 수 있다.

[0124] 환자에서의 암 치료를 위한 CAR T 또는 NK의 생존 또는 지속성 또는 증식을 증진시키기 위해, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 CAR 및 IL-15, IL15RA 및 IL-15/IL-15R 또는 IL15-RA/IL-15, 또는 이의 일부 또는 조합의 모이어티 중 임의의 하나 이상을 갖는 조작된 세포에 관한 것이다.

[0125] 하나의 실시 양태에서, 조작된 세포는 CD4 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 IL-15RA (SEQ ID NO. 1), 및 상응하는 폴리뉴클레오타이드 (SEQ ID NO. 2)를 포함한다.

[0126] **조작된 세포를 생성하는 방법들**

[0127] 본원에 개시된 임의의 폴리뉴클레오타이드는 조작된 세포 내로 당 업계에 공지된 임의의 방법에 의해 도입될 수 있다.

[0128] 하나의 실시 양태에서, CAR 폴리뉴클레오타이드는 조작된 세포로 본원에 개시된 임의의 바이러스 벡터에 의해 전달된다.

[0129] 하나의 실시 양태에서, 증진된 안전성 프로파일 또는 치료 지수를 달성하기 위해, 본원에 개시된 임의의 조작된 세포는 일시적 RNA-변형된 "생물분해성" 버전 또는 이의 유도체 또는 이들의 조합물로서 구축될 수 있다. 본 발명의 RNA-변형된 CAR은 T 세포 또는 NK 세포 내로 전기 천공될 수 있다. 화합물 CAR의 발현은 며칠 동안 지나면서 점차적으로 감소될 수 있다.

[0130] 본 발명의 일부 실시 양태에서, 본원에 개시된 임의의 조작된 세포는 바이러스 벡터없이 CAR DNA를 숙주 유전체로 통합시키는 트랜스포슨 시스템 ("슬리핑 뷰티"라고도 함) 내에서 구축될 수 있다.

[0131] **다중 CAR 단위를 갖는 조작된 세포를 생성하는 방법들**

[0132] 또 다른 실시 양태에서, 본 개시내용은 적어도 2 개의 CAR 단위를 갖는 조작된 세포를 만드는 방법을 제공한다.

[0133] 일부 실시 양태에서, 다중 CAR 단위는 바이시스트론 (bicistronic) 또는 멀티시스트론 (multicistronic) 발현 벡터를 사용하여 T 또는 NK 세포 내에서 발현된다. 바이시스트론 또는 멀티시스트론 벡터를 구축하기 위해 사용될 수 있는 몇 가지 전략은 비제한적으로, (1) CAR의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)에 융합된 다중 프로모터; (2) CAR 단위들 사이의 스플라이싱 신호의 삽입; 그의 발현이 단일 프로모터에 의해 유도되는 CAR의 융합; (3) CAR의 단위들 사이에 단백질분해 절단 부위의 삽입 (자기 절단 펩타이드); 및 (iv) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)의 삽입을 포함한다.

[0134] 바람직한 실시 양태에서, 다중 CAR 단위는 단일 오픈 리딩 프레임 (ORF) 내에서 발현되어, 이로 인해 다중 CAR 단위를 갖는 하나의 단일 폴리펩타이드를 생성한다. 이 실시 양태에서, 고효율 절단 부위를 함유하는 아미노산 서열 또는 링커가 각각의 CAR 단위 사이에 배치된다.

[0135] 본원에 사용된 바와 같이, 높은 절단 효율은 번역된 단백질의 50% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 또는 90% 초과가 절단되는 것으로 정의된다. 절단 효율은 Kim 2011에 의해 기술된 바와 같이, 웨스턴 블롯 분석으로 측정될 수 있다.

[0136] 또한, 바람직한 실시 양태에서, 웨스턴 블롯 분석에 도시된 바와 같이 동일한 양의 절단 산물이 존재한다.

[0137] 고효율 절단 부위의 예는 돼지 테스코바이러스-1 2A (P2A), FMDV 2A (여기에서 F2A로 약칭됨); 에퀴 리니티스A 바이러스(equine rhinitis A virus) (ERAV) 2A (E2A); 및 토세아아시그나 바이러스(Thoseaasigna virus) 2A (T2A), 세포질 다각체병 바이러스(cytoplasmic polyhedrosis virus) 2A (BmCPV2A) 및 플라세리바이러스 (flacherie Virus) 2A (BmIFV2A), 또는 이들의 조합을 포함한다. 바람직한 실시 양태에서, 고효율 절단 부위는 P2A이다. 고효율 절단 부위는 Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park H-J, Park J-H, Lee KY, et al. (2011) High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. PLoS ONE 6(4): e18556에 기술되어 있고, 그 내용은 본원에 참조로 포함된다.

- [0138] 다중 CAR 단위가 단일 오픈 리딩 프레임 (ORF)에서 발현되는 실시 양태들에서, 발현은 강력한 프로모터의 제어 하에 있다. 강력한 프로모터들의 예는 SFFV 프로모터 및 이의 유도체를 포함한다.
- [0139] **CAR 폴리펩타이드 및 인헨서를 갖는 조작된 세포**
- [0140] 또 다른 실시 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 CAR 단위 및 인헨서를 발현하는 조작된 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0141] 일부 실시 양태에서, 적어도 하나의 CAR 단위 및 인헨서는 바이시스트론 (bicistronic) 또는 멀티시스트론 (multicistronic) 발현 벡터를 사용하여 T 또는 NK 세포 내에서 발현된다. 바이시스트론 또는 멀티시스트론 벡터를 구축하기 위해 사용될 수 있는 몇 가지 전략은, 이에 제한되는 것은 아니지만, (1) CAR의 오픈 리딩 프레임에 융합된 다중 프로모터; (2) CAR 단위들 사이에 스플라이싱 신호 삽입; 그의 발현이 단일 프로모터에 의해 유도되는 CAR의 융합; (3) CAR의 단위들 사이에 단백질분해의 절단 부위의 삽입 (자기 절단 펩타이드); 및 (4) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)의 삽입을 포함한다.
- [0142] 바람직한 실시 양태에서, 적어도 하나의 CAR 단위 및 인헨서가 단일 오픈 리딩 프레임 (ORF)에서 발현되어, 이에 의해 적어도 하나의 CAR 단위 및 인헨서를 갖는 단일 폴리펩타이드를 생성한다. 이 실시 양태에서, 고효율 절단 부위를 함유하는 아미노산 서열 또는 링커는 각 CAR 단위 사이 및 CAR 단위와 인헨서 사이에 배치된다. 이 실시 양태에서, ORF는 강력한 프로모터의 제어하에 있다. 강력한 프로모터의 예는 SFFV 프로모터 및 이의 유도체를 포함한다.
- [0143] 또한, 바람직한 실시 양태에서, 웨스턴 블롯 분석에 도시된 바와 같이, 동일한 양의 절단 산물이 존재한다.
- [0144] **본원에 개시된 조성물을 사용하는 치료 방법**
- [0145] 또 다른 실시 양태에서, 본 발명은 암 치료에서 동종이계 이식 이전에 조건화 (conditioning)를 위해 CD45를 표적화하는 방법을 제공한다. CD45는 백혈구 공통 항원 (LCA)으로도 알려져 있으며 적혈구와 혈소판을 제외한 사 실상 모든 조혈 기원 세포에서 발현되는 티로신 포스파타제이다. 대부분의 혈액 악성 종양은 CD45를 발현한다. 예를 들어, 85% 내지 90%의 급성 림프성 및 골수성 백혈병은 CD45를 발현한다. CD45는 비조혈 기원에서는 발견 되지 않는다. 또한, CD45는 악성 세포 및 백혈구에서 세포 당 약 200,000 분자의 고밀도 평균 카피수로 발현된다. CD45는 다양한 혈액 악성 종양에 대해 이상적인 표적을 제시한다. 그러나, CAR T 및 NK 세포는 또한 CD45를 발현한다. 내인성 CD45의 불활성화가 없다면, CD45를 표적으로 하는 CAR로 무장한 CAR T 또는 NK 세포는 자가-살상을 일으킬 수 있다.
- [0146] TCR 복합체와의 CD45의 회합은 항원에 반응하여 T 세포 활성화를 조절하는 것에 필수적이다. CD45 결핍 T 세포가 항원을 제시할 수 없다는 것은 T 세포 수용체 (TCR)를 통한 감소된 신호전달 때문이다. TCR은 항원 제시에 반응하는 T 세포의 활성화에 필수적인 역할을 하는 세포 표면 수용체이다. TCR은 일반적으로 두 개의 사슬, 알파 및 베타로부터 제조되는 데 그들은 형질도입 하위단위인 CD3와 회합되어 세포 표면에 존재하는 T 세포 수용체 복합체를 형성한다.
- [0147] 본 발명의 다중 CAR (화합물 CAR, cCAR)은 암세포가 CAR 활성화에 저항하는 주요 메커니즘 즉, 암세포 표면으로부터의 표적 항원의 하향조절 또는 이중 발현을 퇴치한다는 것이 놀랍게도, 발견되었다. 이 메커니즘은 암세포가 CAR 치료법으로부터 "숨겨 지도록"하는 데 이 현상을 '항원 회피'라고 한다. 본 개시내용은 종양을 신속하게 제거하기 위해 2개 이상의 항원의 조합을 인식함으로써 암 항원 회피를 미연에 방지한다.
- [0148] 본 발명은 cCAR을 이용한 다수 항원의 동시 표적화 방법을 제공하여 표적 항원 손실 또는 하향 조절에 기초한 종양 선택의 가능성을 최소화함으로써 개선된 종양 제어의 결과를 낳는다.
- [0149] 개시된 본 발명은 종양 세포에 존재하는 상이한 또는 동일한 표면 항원을 표적으로 하는 T 또는 NK 세포에서의 화합물 (다중 또는 화합물) cCAR을 포함한다. 본 발명의 화합물 키메라 항원 수용체는 링커에 의해 연결된 적어도 다수의 키메라 수용체 구축물을 포함하고 동일하거나 상이한 항원을 표적으로 한다. 예를 들어, 화합물 CAR (cCAR) 구축물에 존재하는 CAR 구축물 각각은 항원 인식 도메인, 세포외 도메인, 막통과 도메인 및/또는 세포질 도메인을 포함한다. 세포외 도메인 및 막통과 도메인은 이러한 도메인에 대한 임의의 목적하는 공급원으로부터 유래될 수 있다. 다중 CAR 구축물은 링커에 의해 연결된다. 화합물 CAR 구축물의 발현은 프로모터에 의해 유도된다. 링커는 단백질 또는 펩타이드가 생성된 후에 자가 분해되는 펩타이드 또는 단백질의 일부일 수 있다 (자체-절단되는 펩타이드라고도 불림).
- [0150] 하나의 실시 양태에서, 본 발명의 화합물 CAR은 골수이형성증후군 및 급성 골수성 백혈병 (AML) 집단을 표적으로

로 한다. 골수이형성증후군 (MDS)은 고령자 중에서 가장 흔히 발생하는 난치성 조혈 줄기 세포 악성 종양이고 미국에서 매년 약 14,000 건의 새로운 케이스를 갖는다. MDS 케이스의 약 30-40 %가 AML로 진행된다. MDS의 발생은 우리의 인구 고령화에 따라 계속하여 증가하고 있다. 비록 MDS와 AML이 열심히 연구되고 있지만, 만족할만한 치료법은 개발되어 있지 않다.

- [0151] 본 발명의 조성물 및 방법은 암치료, 특히 폐암, 흑색종, 유방암, 전립선암, 대장 암, 신장세포암종, 난소암, 뇌암, 육종, 백혈병 및 림프종 치료에서의 면역 요법에 사용하기 위한 1차 및 보조 자극 신호 모두를 전달하는 T 림프구 또는 NK 세포 집단을 생성하는 데 사용될 수 있다.
- [0152] 면역 요법은 일반적으로 면역 효과기 세포 및 분자의 사용에 의존하여 암세포를 표적화하고 파괴한다. 효과기는 직접 또는 간접적으로 종양 세포 표적과 상호 작용하는 표면 분자를 가지는 림프구일 수 있다. 다양한 효과기 세포는 세포독성 T 세포, NK 세포 및 NK-92 세포를 포함한다. 본 발명에서 기술된 조성물 및 방법은 화학 요법, 수술, 방사선, 유전자 요법 등과 같은 다른 유형의 암 요법과 함께 이용될 수 있다. 본 발명에서 기술된 조성물 및 방법은 염증, 면역 질환 및 감염성 질환과 같은 면역 반응에 의존하는 다른 질환 상태에 이용될 수 있다.
- [0153] 일부 실시 양태에서, 본 발명의 화합물 CAR은 최소 잔류 질환을 갖고 더 이상 화학 요법에 더 이상 반응하지 않는 환자에 대한 완전한 완화를 달성함으로써 골수 이식에 대한 가교 역할을 할 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 화합물 CAR은 백혈병 세포를 제거하고, 이어서 백혈구 감소증을 지원하기 위해 골수 줄기 세포를 구출한다.
- [0154] 일부 실시 양태에서, 본 개시내용의 화합물 CAR은 표적 항원의 하향 조절에 의해 암세포가 CAR 활성화에 저항하는 주요 메커니즘을 퇴치할 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 화합물 CAR은 또한 표준 CAR T/NK 세포 요법에서 상당한 어려움을 발생시키는 암세포의 이질성을 퇴치할 수 있다. 추가의 실시 양태에서, 개시된 화합물 CAR은 제1 CAR이 벌크 종양 집단을 표적으로 하고 또 다른 CAR이 암 재발을 피하기 위해 암 또는 백혈병 줄기 세포를 근절시키도록 설계된다.
- [0155] 하나의 실시 양태에서, 본 개시내용은 CD33 항원 또는 CD123 항원, 또는 둘 다를 갖는, CD33 항원 인식 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 및 CD123 항원 인식 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체 폴리펩타이드 중에서 적어도 하나를 가지는 조작된 세포와 접촉시킴으로써 상기 세포를 제거하는 방법을 제공한다.
- [0156] CD33 항원 및 CD123 항원 중 적어도 하나를 갖는 세포는 급성 골수성 백혈병, 전구체 급성 림프모구성 백혈병, 만성 골수증식성 신생물, 만성 골수성 백혈병, 골수이형성증후군, 모세포성 형질세포양 수지상 신생물 (BPDCN), 호지킨 림프종, 비만 세포종 및 모발상세포 백혈병 세포를 포함한다.
- [0157] 또 다른 실시 양태에서, 본 개시내용은 조혈 줄기 세포 이식을 위한 골수절제 조건화 요법 (myeloablative conditioning regimens)을 제공하는 방법을 제공한다. 이 실시 양태에서, CD33 단위 및 CD123 단위를 갖는 조작된 T 또는 NK 세포는 이를 필요로 하는 환자에게 투여된다.
- [0158] 추가의 실시 양태에서, 본 개시내용은 CD123 또는 CD33, 또는 이들 모두를 발현하는 백혈병 줄기 세포 (LSC) 또는 벌크 백혈병 세포를 근절 또는 살상시키는 방법을 제공한다. 이 실시 양태에서, CD33 단위 및 CD123 단위를 갖는 조작된 T 또는 NK 세포는 이를 필요로 하는 환자에게 투여된다.
- [0159] 추가의 실시 양태에서, T 또는 NK 세포에서의 화합물 CAR은 CD34+ CD38- 백혈병 줄기 세포 또는 CD123 또는 CD33 또는 이들 모두를 발현하는 벌크 백혈병 세포를 근절시키거나 살상시키는데 사용될 수 있다.
- [0160] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 CD19 또는 CD20 항원 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시 양태에서, 화합물 CAR은 CD19 또는 CD22 항원 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 표적화 세포는 비제한적으로 B 세포 림프종 또는 백혈병과 같은 암 세포일 수 있다. 추가의 실시 양태에서, 표적 항원은 ROR1, PSMA, MAGE A3, 당지질, 글리피칸 3, F77, GD-2, WT1, CEA, HER-2/neu, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, 알파태아단백, CA 19-9, CA 72-4, NY-ESO, FAP, ErbB, c-Met, MART-1, CD30, EGFRvIII, 면역글로불린 카파 및 람다, CD38, CD52, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD2, 및 CD138의 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있지만 이에 국한되지는 않는다. 표적 항원은 또한 인간 유두종 바이러스 (HPV) 또는 EBV (엡스타인 바 바이러스) 항원으로부터의 E6 및 E7과 같은 바이러스 또는 진균 항원을 포함할 수 있다.
- [0161] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 CD19 또는 CD123 항원 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 표적화 세포는 비제한적으로 B 세포 림프종 또는 백혈병과 같은 암세포이다.
- [0162] 추가의 실시 양태에서, 화합물 CAR은 CS1 및/또는 B 세포 성숙 항원 (BCMA) 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적



으로 한다. 또 다른 실시 양태에서, 표적화 세포는 비제한적으로 다발성 골수종과 같은 악성 형질 세포이다.

- [0163] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 CS1, BCMA, CD267, BAFF-R, CD38, CD138, CD52, CD19, CD20, 인터루킨 6 수용체 및 NY-ESO-1 항원을 포함하나 이에 한정되지는 않는 다수의 항원을 발현하는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시 양태에서, 표적화 세포는 비제한적으로 다발성 골수종과 같은 악성 형질 세포이다.
- [0164] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 알파 태아단백 (AFP) 및 글리피칸-3 (GPC3)을 포함하나 이에 한정되지 않는 다수의 항원을 발현하는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시 양태에서, 표적화 세포는 간세포 암종, 섬유육종 암종, 간모세포종, 간의 미분화 배아 육종 및 간엽성 과오증, 폐-편평 세포 암종, 고환 비정상피종성 생식세포 종양, 지방육종, 난소 및 생식샘의 난황낭종, 난소 용모막암종, 기형종, 난소 투명세포 암종 및 태반 부위 용모성 종양이다.
- [0165] 본 발명에 따르면, 상이한 또는 동일한 항원을 표적으로 하는 화합물 CAR을 포함하는 T 또는 NK 세포는 종양 회피를 상쇄시키고 종양 세포의 동시 표적화를 가능하게 한다.
- [0166] 본원에 개시된 화합물 CAR을 포함하는 T 또는 NK 숙주 세포는 본 개시내용에서 실시된다. 화합물 CAR의 뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 구축물, 서열, 숙주 세포, 벡터는 본 개시내용의 일부로 간주되고 본원에서 실시된다.
- [0167] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 현재 개발되고 있거나 또는 시장에서 이용가능한 임의의 화학 요법제와 조합하여 투여된다. 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 혈액 악성종양, 암, 비혈액 악성종양, 염증성 질환, HIV 및 HTLV와 같은 감염성 질환 및 기타를 포함하나 이에 한정되지는 않는 질환에 대한 1차 치료로서 투여된다. 하나의 실시 양태에서, 화합물 CAR을 발현하는 T 세포는 적응 면역요법으로서 동일하거나 상이한 화합물 CAR을 발현하는 NK 세포와 함께 공동투여된다. 화합물 CAR NK 세포는 세포를 표적화하는 신속한 선천성 활성을 제공하는 반면 화합물 T 세포는 상대적으로 오래 지속되는 적응 면역 활성을 제공한다.
- [0168] 하나의 실시 양태에서, 화합물 CAR을 발현하는 세포는 포유동물, 예를 들어, 화학 요법에 내성이 있고 골수 줄기 세포 이식에 적합하지 않은 환자를 위한 골수 줄기 이식의 가교로서 투여된다.
- [0169] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 트랜스진을 공동발현시키고, 표적화 종양 병변에서의 IL-12와 같은 트랜스진 생성물을 방출하고 종양 미세환경을 추가로 조절한다.
- [0170] 한 실시 양태에서, 화합물 CAR을 발현하는 세포는 질환에 대한 치료의 일부로서 골수 골수성 제거를 위해 포유동물에 투여된다.
- [0171] 특정 실시 양태에서, 화합물 CAR을 발현하는 세포는 포유동물, 예를 들어, 인간에게 투여되는 T 세포 또는 NK 세포일 수 있다. 본 개시내용은 화합물 CAR의 투여에 의해 장애 또는 질환을 갖는 포유동물을 치료하는 방법을 포함한다. 표적화 세포는 암세포, 또는 감염성 질환, 염증 및 자가면역 장애와 같은 임의의 다른 질환 상태에 의해 영향을 받은 세포일 수 있다.
- [0172] 본 발명은 화합물 CAR의 단편, 돌연변이 또는 변이체 (예를 들어, 변형된 형태) 또는 T/NK 세포의 자극 및 증식을 유도하는 능력을 보유하는 항원의 용도를 포함하는 것으로 의도된다. "단백질의 형태"는 적어도 하나의 CAR 또는 항원과 유의한 상동성을 공유하고 T/NK 세포의 자극 및 증식을 일으킬 수 있는 단백질을 의미하는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 용어 "생물학적 활성" 또는 "단백질의 생물학적 활성 형태"는 세포의 항종양 활성을 일으킬 수 있는 단백질 또는 변종의 형태를 포함하는 것을 의미한다.
- [0173] 본 발명의 조성물 및 방법은 암치료, 특히 폐암, 흑색종, 유방암, 전립선암, 대장암, 신장세포암종, 난소암, 신경모세포종, 횡문근육종, 백혈병 및 림프종 치료에서의 면역 요법에 사용하기 위한 1차 및 보조 자극 신호 둘 다를 전달하는 T/NK 세포 집단을 생성하는 데 사용될 수 있다. 본 발명에서 기술된 조성물 및 방법은 화학 요법, 수술, 방사선, 유전자 요법 등과 같은 다른 유형의 암 요법과 함께 이용될 수 있다.
- [0174] 일부 실시 양태에서, 본 발명은 CAR 또는 화합물 CAR T 세포 또는 NK 세포를 자가면역 질병을 가진 환자에게 투여하는 것에 의해 자가면역 질환을 가진 환자에서의 B 세포, 미성숙 B 세포, 기억 B 세포, 형질모세포, 오래 생존한 형질세포, 또는 형질세포를 고갈시키는 방법을 개시한다. CAR 표적화 세포는 항원 BCMA, TACI 및 BAFF-R 중 하나 또는 둘 또는 둘 또는 전부를 발현하는 B 또는 형질 세포이다. 자가면역 질환은 전신피부경화증, 다발경화증, 건선, 피부염, 염증성 장질환 (예컨대, 크론병 및 궤양성 결장염), 전신 홍반성 루푸스, 혈관염, 류마티스관절염, 쇼그렌증후군, 다발성근육염, 육아종증 및 혈관염, 애디슨병, 항원-항체 복합체 매개 질환 그리고 항사구체

기저막 질환을 포함한다.

- [0175] 다수 세포의 세포 마커는 종양-연관 항원으로서의 가치, 및 이에 따라 CAR T/NK 세포 요법을 위한 잠재적 표적으로서 지금 연구되고 있다. 그러나, 온-표적 (on-target), 오프-종양 (off-tumor) 유해사건을 야기하는 건강한 조직상에서의 이들 항원의 발현은 오프-표적 독성 이외에 주요 안전 문제로 남아있다. 또한, CAR T/NK 세포 요법의 주요 한계는 종양발생에 필수적이지 않은 분자를 표적으로 할 때 항원 회피 변이체에 대해 선택할 가능성에 있다. 따라서, 표적 항원의 발현이 거의 또는 전혀 없는 상태를 지속하는 악성 세포는 CAR T/NK 세포의 높은 친화성 작용에도 불구하고 그들의 세포를 회피할 수 있다.
- [0176] 본 발명에 따르면, 자연 살상 세포 (NK 세포)는 CAR 유도된 살상에 대한 대체 세포독성 효과기를 나타낸다. T 세포와 달리, NK 세포는 사전 활성화를 필요로 하지 않으며 본질적으로 세포용해 기능을 나타낸다. NK 세포에서의 cCAR의 추가 발현은 NK 세포가 암, 특히 NK 세포 치료에 저항성인 암세포를 효과적으로 살상할 수 있게 한다.
- [0177] 또한, NK 세포는 이식편-대-숙주 질환 (GvHD)을 유도하는 위험없이 항암 효과를 매개하는 것으로 알려져있다.
- [0178] 연구에 의하면 CD34+ CD38-AML 세포상에서 CD123의 비정상적인 과발현이 나타난 반면, 정상 골수 대응부 CD34+ CD38-에서는 CD123이 발현되지 않았다 (Jordan, Upchurch 등, 2000). 이들 CD123 +, CD34+ CD38- 집단은 이들 세포가 백혈병 과정을 면역결핍 마우스에서 개시하고 이를 유지할 수 있기 때문에 LSC로 간주되어 왔다.
- [0179] CD34+ /CD38- /CD123 + LSC의 수는 AML 환자의 임상 결과를 예측하는 데 사용될 수 있다. AML 환자 중에서 15% 초과 CD34+ / CD38- /CD123+ 세포는 완전 완화의 결여 및 바람직하지 않은 세포유전학적 프로파일과 관련이 있다. 또한, 1% 초과 CD34+ /CD38- /CD123+ 세포의 존재는 무질환 생존 및 전반적인 생존에 부정적인 영향을 줄 수 있었다.
- [0180] 현재, MDS와 AML을 위한 요법은 백혈병 모세포에 초점을 맞추고 있는데 이는 이들이 매우 풍부하고 환자에 대한 가장 직접적인 문제를 명확하게 나타내기 때문이다. 중요하게도, 백혈병 줄기 세포 (LSC)는 대부분의 다른 백혈병 세포 ("모"세포)와 다소 다르며, 그들은 드문 하위 집단을 구성한다. 모세포를 살상하는 것은 단기적인 완화를 제공할 수 있지만, LSC가 만약 파괴되지 않으면 항상 다시 자라나서 환자의 재발을 초래할 것이다. MDS 질환에 대한 내구성 있는 치료를 달성하기 위해서는 LSC가 반드시 파괴되어야 한다. 불행하게도, 표준 약물 요법은 MDS 또는 AML LSC에 효과적이지 않다. 따라서 백혈병 줄기 세포 집단과 벌크 백혈병 집단 모두를 특이적으로 표적으로 할 수 있는 새로운 요법을 개발하는 것이 중요하다. 본 발명에서 개시된 화합물 CAR은 이들 집단 모두를 표적으로 하며, 본원에서 실시된다.
- [0181] 본 발명에 따르면, 놀랍게도, 치료를 위한 동종이계 생성물로서 사용될 수 있는 기성품을 NK 세포가 제공한다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 따르면, cCAR 세포 요법은 현재의 최신 기술이 요구하는 바와 같이 환자 특이적 기반상에서 수행되는 것이 필요하다. 본 발명의 출원인은 효과적인 CAR 세포 기반 요법을 위해 환자의 림프구 또는 종양 침윤된 림프구가 단리될 필요가 없는 새로운 면역 요법을 발견하였다.
- [0182] 동종이계 또는 자가 NK 세포는 빠른 면역 반응을 유도하는 것으로 예상되지만 그들의 제한된 수명으로 인해 혈액순환으로부터 상대적으로 빠르게 사라진다. 따라서, 본 출원인은 cCAR 세포 기반 요법을 사용하여 지속되는 부작용에 대한 우려가 감소됨을 놀랍게도 발견했다.
- [0183] 본 발명의 한 양태에 따르면, NK 세포는 팽창되고 본 발명에 따른 cCAR로 형질 감염될 수 있다. NK 세포는 제대혈, 말초 혈액, iPSC 세포 및 배아 줄기 세포로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 한 양태에 따르면, NK-92 세포는 팽창되고 cCAR로 형질 감염될 수 있다. NK-92는 자연 살상 세포 (NK 세포)의 특색과 특징을 지닌 지속적으로 성장하는 세포주이다. NK-92 세포주는 IL-2 의존적이며 안전하고 실행 가능한 것으로 입증되었다. cCAR 발현 NK-92 세포는 피더세포 (feeder cell)와의 공동 배양 유무와 관계없이 무혈청- 배지에서 팽창될 수 있다. 관심 cCAR을 운반하는 NK-92의 순수한 집단은 분류에 의해 얻을 수 있다.
- [0184] 적절한 표면 표적 항원의 식별은 적응 면역 요법에서 CAR T/NK 세포를 발생시키기 위한 전제 조건이다.
- [0185] 본 발명의 한 양태에서, CD123 항원은 cCAR 요법의 표적 중 하나이다. 인터루킨 3 수용체의 알파 사슬인 CD123은 급성 골수성 백혈병 (AML), B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 모발상세포 백혈병 및 모세포성 형질세포양 수지상 신생물을 비롯한 다양한 혈액 악성 종양에서 과발현된다. CD123은 정상 조혈 줄기 세포에서 부재하거나 최소한으로 발현된다. 더 중요하게, CD123은 백혈병 줄기 세포 (LSC)와 관련된 백혈병 세포의 하위세트 상

에서 발현되며, 이것의 제거는 질환의 불응성 및 재발을 방지하는 데 필수적이다.

- [0186] 본 발명의 한 양태에서, CD33 항원은 cCAR 요법을 위한 표적 중 하나이다. CD33은 급성 골수성 백혈병에서 90%의 악성 세포에서 발현되는 막통과 수용체이다. 따라서, 본 발명에 의하면, CD123 및 CD33 표적 항원은 특히 안전의 관점에서 매력적이다.
- [0187] 본 발명에 따라서, 화합물 CD33CD123 CAR은 만성 골수성 백혈병 (CML) 집단의 치유적 치료에 매우 효과적일 수 있다. 만성 골수성 백혈병 (CML)에는 CD34+CD38-인 세포의 드문 하위세트가 있다. 이 집단은 LSC로 구성된다고 간주된다. 증가된 수의 LSC는 질환의 진행과 관련이 있다. 소분자 Bcr-Ab1 티로신 키나아제 억제제 (TKI)는 CP-CML 환자의 전반적인 생존을 상당히 개선시키는 것으로 나타난다. 그렇지만, LSC는 TKI 요법에 저항성이 있는 것으로 생각된다. CML 저항성 LSC를 표적으로 하는 새로운 요법은 CML 치료에 시급히 필요하며 본 발명에 개시된 화합물 CD33CD123 CAR에서 새로운 요법이 실시된다. CD123은 CD34+CD38- 집단에서 높게 발현된다. 본 발명에 따라서, 화합물 CD33CD123 CAR은 이 집단의 치유적 치료에 대해 매우 효과적이다.
- [0188] 본 발명의 하나의 실시 양태에서, cCAR에서의 CD123 및 CD33 둘 모두를 발현하는 백혈병 세포가 치유적 치료로서 사용된다. CD33은 골수계, 골수성 백혈병 모세포 및 성숙 단핵구의 세포 상에서 발현되지만 정상 다능성 조혈 줄기 세포에서는 발현되지 않는다 (Griffin, Linch 등, 1984). CD33은 CML, 골수 증식성 신생물 및 MDS에서의 백혈병 세포에서 광범위하게 발현된다.
- [0189] 급성 골수성 백혈병 (AML) 환자의 상당수가 표준 화학치료 요법에 불응성이거나, 치료 후 질환 재발을 경험함에 따라 (Burnett 2012), AML에 대한 CAR T 세포 면역 요법의 개발은 상당한 임상적 필요성을 해결할 잠재력을 가진다. 이들 환자의 대다수에서, 백혈병 세포는 CD123 및 CD33 둘 모두를 발현하며, 본원에 개시된 화합물 CD33CD123 CAR에 광범위한 임상적 적용성을 부여한다. 따라서, 본 발명은 다수 백혈병-연관 항원을 표적으로 하는 다중 CAR을 포함하는 새로운 다중 cCAR T/NK 세포 구축물을 개시하여, 항원 회피 메커니즘을 상쇄시키고 보조 자극 도메인 활성화의 상승작용적 효과에 의해 백혈병 줄기 세포를 비롯한 백혈병 세포를 표적으로 하여, 보다 강력하고 안전하며 효과적인 요법을 제공한다.
- [0190] 본 발명은 표적 항원을 공동 발현하는 세포에 대한 항-종양 활성의 증진된 효력을 지니면서도 한개 항원만을 발현하는 종양 세포에 대한 감수성을 보유하는 화합물 CAR 구축물을 추가로 개시한다. 또한, 화합물 CAR의 각 CAR은 1개 또는 2개의 보조 자극 도메인 및 특정 표적의 존재 하에서의 강력한 살상 능력을 포함한다.
- [0191] 유방암과 상피성 난소암을 포함하는 고형 종양을 표적으로 하는, 트랜스-시그널링 (trans-signaling) CAR의 이중특이성(dual specificity)에 대한 전임상 연구에서 CD3 $\zeta$  세포내 신호전달 도메인은 제2세대 CAR 유래의 보조 자극 도메인으로부터 분리되어 있다. 바꿔 말하면, 하나의 CAR은 보조 자극 도메인이 없는 제1세대 CAR을 포함하고 또다른 CAR는 CD3제타 세포내 도메인이 없다. 따라서 T 세포 활성화와 강력한 살상을 위해서는 표적 항원 둘 다의 존재가 요구된다. 따라서, 이들은 감수성을 감소시키는 대신에, 표적 특이성을 증가시키면서, 2개의 표적 항원 중 1개의 건강한 조직 발현에 의해 유발되는 오프-종양 독성을 감소시키는 방법으로서 제안되었다. 하나의 실시 양태에서, 화합물 CAR은 화합물 CD123CD19 CAR이다. 집단의 하위세트에서 90% 초과인 B-ALL이 CD123을 발현한다는 것이 밝혀졌다. AML 및 MDS와 마찬가지로, 희귀한 LSC 집단이 B-ALL에 존재하는 것으로 간주되었다. 따라서, 본 발명에 따라 백혈병 줄기 세포 및 벌크 백혈병 집단 둘 다를 표적으로 하는 것은 B-ALL에 적용될 수 있다. 본 발명대로, CD19가 B-세포 림프구 집단의 상이한 단계에서 광범위하게 발현됨에 따라 B-ALL에서 발현되는 CD123 및 CD19 표면 항원은 표적이 될 수 있다.
- [0192] 다발성 골수종 (MM)은 미국에서 두 번째로 제일 흔한 혈액 악성 종양이며 골수 또는 골수의 부위에 축적된 클론형질세포로부터 유래한다. MM은 약 4.5 년의 중앙 생존 기간을 갖는 난치병이다 (Kumar, Rajkumar 등. 2008). 전임상 개발에 있어서 항-골수종 CAR이 개발되었고 CAR 표적은 CD38, CS1, B 세포 성숙 항원 (BCMA) 및 CD38을 포함한다. 그러나, 표면 항원 발현의 이질성은 통상적으로 악성 형질 세포에서 발생하며 (Ruiz-Arguelles 및 San Miguel 1994), 이는 CAR에 대한 어려운 표적이 되게 한다. 악성 형질 세포는 또한 낮은 수준의 CD19를 발현한다. 이전에, 골수종 줄기 세포도 CD19를 포함하는 일부 B 세포 마커를 발현한다는 것이 밝혀졌다. 이 집단을 표적으로 하는 것은 표준 및 다른 골수종 CAR 요법과 함께 골수종 치료에 효과적일 수 있다.
- [0193] 다발성 골수종 (MM)은 형질 세포의 클론 팽창을 갖는 혈액 악성 종양이다. 치료에서의 중요한 진전에도 불구하고, 골수종은 여전히 난치병으로 남아 있다; 따라서 새로운 치료적 접근이 시급히 필요하다.
- [0194] CS1 (CD319 또는 SLAMF7이라고도 함)은 SLAMF7 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. 표면 항원 CS1은 정상적인 형질 세포 및 골수종 세포 (악성 형질 세포)에 대한 강한 마커이다.

- [0195] B 세포 성숙 항원 (BCMA) 또는 CD269라고도 지칭되는 종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리의 멤버 17 (TNFRSF17) 은 형질 세포 및 악성 형질 세포의 말기에서 거의 독점적으로 발현된다. 그의 발현은 다른 조직에는 나타나지 않으며, 이는 CAR T 또는 NK 세포를 위한 표적으로서의 가능성을 나타낸다.
- [0196] 악성 형질 세포는 CD269 및 CS1에 대해 다양한 정도의 항원 이질성을 나타낸다. CD269 또는 CS1을 표적으로 하는 단일 CAR 단위 제품은 벌크 종양에서의 대다수 세포를 표적으로 할 수 있어서 초기 강한 항-종양 반응을 초래한다. 이어서, 잔존하는 희귀한 비-표적화 세포는 팽창되고 질환 재발을 일으킨다. 다발성 골수종은 특히 이 질적이지만 이 현상은 다른 백혈병이나 종양에도 확실하게 적용될 수 있다. BCMA CAR T 세포를 이용한 NIH에서의 최근 임상 시험은 다발성 골수종을 가진 일부 환자에서 완전한 반응을 보이는 유망한 결과를 보여주었다. 그러나, 이들 환자는 17주 후에 재발했는데 이는 항원 회피 때문일 수 있다. 항원 회피는 CD19 CAR 및 NY-ESO1 CAR T 세포 치료에서도 나타난다. 따라서, 재발을 막기 위해서는 더욱 효과적인 CAR T 세포 치료가 긴급히 필요하다.
- [0197] 본 발명의 한 양태에서, BCMA 및 CS1은 BCMACS1 CAR 요법의 표적이다.
- [0198] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 BCMA 또는 CS1 항원 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 표적화 세포는 비제한적으로 림프종, 또는 백혈병 또는 형질 세포 신생물과 같은 암세포일 수 있다. 추가의 실시 양태에서, 형질 세포 신생물은 형질 세포 백혈병, 다발성 골수종, 형질 세포종, 중쇄 질환, 아밀로이드증, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 고립성 골 형질세포종, 미확정 단클론 감마글로불린혈증(MGUS) 및 무증상 다발성 골수종으로부터 선택된다.
- [0199] BAFF (B 세포 활성화 인자) 및 APRIL (증식-유도성 리간드)은 고친화도로 TACI (TNFRSF1 3B 또는 CD267이라고도 함) 및 BCMA와 특이적으로 결합하는 두 개의 TNF 동족체이다. BAFF (BLyS라고도 공지됨)는 BAFF-R에 결합하고 B 세포의 후기 단계의 생존 및 증식을 증진시키는 데 기능적으로 관여한다. BAFF는 일부 자가면역 장애를 동반하는 것으로 나타났다. APRIL은 항체 클래스 전환의 증진에 중요한 역할을 한다. BAFF와 APRIL 둘 다는 악성 형질 세포에 대한 성장 및 생존 인자로서 연루되어왔다.
- [0200] 악성 형질 세포에서의 리간드-수용체 상호 작용은 도 45에서 설명된다.
- [0201] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 TACI 또는 CS1 항원 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시 양태에서, 화합물 CAR은 TACI 또는 CS1 항원 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 표적화 세포는 비제한적으로 림프종, 또는 백혈병 또는 형질 세포 신생물과 같은 암세포일 수 있다. 추가의 실시 양태에서, 형질 세포 신생물은 형질 세포 백혈병, 다발성 골수종, 형질 세포종, 중쇄 질환, 아밀로이드증, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 고립성 골 형질세포종, 미확정 단클론 감마글로불린혈증(MGUS) 및 무증상 다발성 골수종으로부터 선택된다. 표적 세포는 또한 B 세포 중 1개 또는 2개 또는 다수의 상이한 세포 유형, 미성숙 B 세포, 나이브 B 세포, 중심 모세포, 중심 세포, 기억 B 세포, 형질 모세포, 오래 생존한 형질 세포, 형질 세포일 수 있다. 이들 세포는 전신피부경화증, 다발성경화증, 건선, 피부염, 염증성 장질환 (예컨대, 크론 병 및 궤양성 결장염), 전신 홍반성 루푸스, 혈관염, 류마티스 관절염, 쇼그렌증후군, 다발성근육염, 육아종증 및 혈관염, 애디슨 병, 항원 - 항체 복합체 매개 질환, 및 항 - 사구체 기저막 질환을 포함하는 자가 면역 질환과 연관된다.
- [0202] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR은 BAFF-R 또는 CS1 항원 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시 양태에서, 화합물 CAR은 BAFF-R 또는 CS1 항원 또는 둘 다를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 표적화 세포는 림프종, 또는 백혈병 또는 형질 세포 종양과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 암세포일 수 있다. 추가의 실시 양태에서, 형질 세포 종양은 형질 세포 백혈병, 다발성 골수종, 형질 세포종, 중쇄 질환, 아밀로이드증, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 고립성 골 형질세포종, 미확정 단클론 감마글로불린혈증(MGUS) 및 무증상 다발성 골수종으로부터 선택된다.
- [0203] 일부 실시 양태에서, 화합물 CAR (cCAR)은 BAFF-R, BCMA, TACI 및 CS1 항원 중 1개 또는 2개 또는 모두를 발현하는 세포를 표적으로 한다.
- [0204] 일부 실시 양태에서, cCAR에서의 CAR의 단위는 1) BAFF-R, BCMA, TACI 및 CS1 중 어느 하나에 대한 scFv; 2) 힌지 영역; 3) 보조 자극 도메인(들) 및 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0205] 일부 실시 양태에서, cCAR에서의 CAR의 단위는 1) BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R 결합 도메인, 또는 APRIL 결합 도메인; 2) 힌지 영역; 3) 보조 자극 도메인(들) 및 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.



- [0206] 추가의 실시 양태에서, BCMA 또는 TAC1 또는 BAFF-R 결합 도메인은 APRIL 및 BAFF 분자의 일부 또는 전부일 수 있다.
- [0207] 일부 실시 양태에서, cCAR에서의 CAR의 단위는 1) BCMA 또는 CS1에 대한 scFv; 2) 힌지 영역; 3) 보조 자극 도메인(들) 및 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0208] 추가의 실시 양태에서, cCAR은 CAR의 1개 또는 2개 또는 다수의 단위를 포함할 수 있다. 각 단위 CAR은 동일하거나 상이한 힌지 영역 및 보조 자극 도메인을 지닐 수 있다.
- [0209] 추가의 실시 양태에서, 표적 항원은 ROR1, PSMA, MAGE A3, 당지질, 글리피칸 3, F77, GD-2, WT1, CEA, HER-2/neu, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE- 6, 알파태아단백, CA-19-9, CA-72-4, NY-ESO, FAP, ErbB, c-Met, MART-1, CD30, EGFRvIII, 면역글로불린 카파 및 람다, CD38, CD52, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD2 및 CD138의 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 표적 항원은 또한 인간 유두종 바이러스 (HPV) 또는 EBV (엡스타인 바 바이러스) 항원으로부터의 E6 및 E7과 같은 바이러스 또는 진균 항원을 포함할 수 있다.
- [0210] 일부 실시 양태에서, cCAR은 CD19 또는 CD20 항원 또는 이들 모두를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 또 다른 실시 양태에서, cCAR은 CD19 또는 CD22 항원 또는 이들 모두를 발현하는 세포를 표적으로 한다. 표적 세포는 B 세포 림프종 또는 백혈병과 같은 암세포이다.
- [0211] 급성 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)은 동종이계 조혈 줄기 세포 이식 후의 이환율 및 사망률의 가장 중요한 원인으로 남아있다. GVHD의 효과기 단계에서, 알파 및 베타 사슬의 이질이합체인 T 세포 수용체 (TCR)는 T 세포 표면에 발현되며, TCR은 숙주 세포 상 HLA 분자 상의 일부 항원을 인식하고 T 세포 증식을 증진시키고 숙주 세포에 손상을 일으키는 세포 독성제를 방출한다. TCR 유전자 불활성화는 잠재적 이식편-대-숙주 반응을 방지하는데 효율적이다. TCR의 불활성화는 동종항원 및 따라서 GVHD의 TCR 인식의 방지를 야기할 수 있다.
- [0212] NK 세포 상 CD45의 역할은 T 세포의 그것과 다소 다르다. CD45-결핍 마우스로부터 유래된 NK 세포는 원형 종양 세포주인 Yac-1에 대해 정상적인 세포독성 활성을 갖는다. 또한, CD45-결핍 NK 세포는 정상적으로 증식하고 IL15 및 IL-21에 반응한다. 따라서, CD45 파괴 또는 제거는 NK 세포의 살상 및 증식에 영향을 주지 않을 것이다. 본 개시내용은 T 또는 NK 세포에서의 CD45를 영구적으로 제거하고, 이어서 CD45-특이적 CAR을 안정적으로 도입하는 방법을 포함한다. 결과적으로, 조작된 T 세포는 항원 제시에 대한 자가-살상 및 반응을 일으키는 것이 없이 CD45에 대한 재시도된 특이성의 목적하는 성질을 나타낸다. 추가의 실시 양태에서, 조작된 T 세포는 악성 종양 또는 다른 질환을 치료하기 위한 기성품 요법으로서의 효능을 가질 수 있다.
- [0213] 본 개시내용은 내인성 CD45의 불활성화 또는 제거를 통해 TCR 신호전달이 감소되거나 손실될 때 증식이 허용되도록 T- 세포가 조작되는 방법에 관한 것이다. TCR 신호전달의 감소 또는 손실은 GVHD를 방지하는 결과를 낳을 수 있다.
- [0214] 추가의 실시 양태에서, CD45의 불활성화에 의해 TCR 신호전달을 감소시키거나 손실 하는 T 세포는 "기성품(off the shelf)"치료 제품으로서 사용될 수 있다.
- [0215] 본 개시내용은 T 또는 NK 세포를 변형하는 방법을 포함하며, 이 방법은 (a) CD45를 불활성화시키는 것에 의해 T 또는 NK 세포를 변형시키는 것; (b) 이들 변형된 세포를 팽창시키는 것; (c) CD45를 발현하지 않는 변형된 T 또는 NK 세포를 분류하는 것; (d) CD45CAR을 도입하는 것을 포함한다.
- [0216] 실시 양태에서, CD45CAR 유전자는 항원 인식 도메인, 힌지 영역, 막통과 도메인 및 T 세포 활성화 도메인 중 적어도 하나를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하며, 항원 인식 도메인은 세포 상 존재하는 CD45 표면 항원에 대비해 재시도된다. 항원 인식 도메인은 CD45 항원에 대해 지시된 단클론 항체 또는 다클론 항체를 포함한다. 항원 인식 도메인은 단클론 또는 다클론 항체의 결합 부분 또는 가변 영역을 포함한다.
- [0217] 일부 실시 양태에서, 변형된 T 세포는 동종이계 공여자로부터 얻어지고 '기성품 제품 (off-the-shelf product)'으로서 사용된다.
- [0218] CAR T 또는 NK 세포를 사용하여 CD45를 표적으로 하는 것은, T 및 NK 세포가 이러한 표면 항원을 발현시키기 때문에 자가 살상을 일으킬 수 있다. 이 결점을 극복하기 위해, 본 발명자는 조작된 CRISPR/Cas9 시스템, 징크핑거뉴클레아제(ZFN) 및 TALE 뉴클레아제(TALEN) 및 메가뉴클레아제를 사용하여 CD45 유전자를 불활성화시키는 것을 제안한다. T 또는 NK 세포에서의 CD45의 손실은 CD45를 발현하는 신생물을 표적으로 하는 CAR에 추가로 형질

도입된다.

- [0219] 본 개시내용은 골수, 혈액 및 기관에서 비정상 세포 또는 악성 세포를 제거 또는 감소시키는 방법을 포함한다. 일부 실시 양태에서, CD45를 발현하는 악성 세포는 급성 백혈병, 만성 백혈병, B 및 T 세포 림프종, 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 림프종 또는 백혈병, 원발성 삼출성 림프종, 망상조직세포종, 다운 증후군의 일과성 골수증식성 장애, 림프구우세 호지킨 림프종, 골수성 백혈병 또는 육종, 가지세포종, 조직구성 육종, 건막 거대세포종, 수지양 수지상세포육종, 이식 후 림프 증식성 장애 등을 가진 환자에서 존재한다.
- [0220] 일부 실시 양태에서, CD45CAR 세포는, 조혈 세포를 제거하는 동시에, 이식 거부 가능한 백혈병/림프종 세포 또는 면역 세포를 제거함으로써 골수에서 골수 줄기 세포 이식을 위한 골수에서 공간을 형성하는데 사용될 수 있다.
- [0221] 추가의 실시 양태에서, CD45CAR 세포는 줄기 세포를 받기 위한 골수 이식을 받기 전에 환자의 예비치리에 사용될 수 있다. 추가의 실시 양태에서, CD45CAR은 조혈 줄기세포 이식을 위한 골수절제 조건화 요법으로서 사용될 수 있다.
- [0222] 일부 실시 양태에서, CD45CAR 세포는 줄기 세포 이식 및/또는 화학요법 후의 잔류 질환을 치료 또는 방지하는데 이용된다.
- [0223] 일부 실시 양태에서, CD45CAR은 발현하는 유전자 또는 카세트의 일부이다. 바람직한 실시 양태에서, 발현하는 유전자 또는 카세트는 CD45CAR 이외에 보조 유전자 또는 태그 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 보조 유전자는 카스파제 9유전자, 티미딘 키나아제, 시토신테아미나제(CD) 또는 시토크롬 P450을 포함하나 이에 한정되지는 않는 유도성 자살 유전자 또는 이의 일부일 수 있다. "자살 유전자" 제거 접근법은 유전자 요법의 안전성을 개선시키고 특정 화합물이나 또는 분자에 의해 활성화되는 경우에만 세포를 살상시킨다. 일부 실시 양태에서, 자살 유전자는 유도성이고 이합체화의 특정 화학적 유도제 (CID)를 사용하여 활성화된다.
- [0224] 일부 실시 양태에서, 안전 스위치는 c-myc 태그, CD20, CD52 (Campath), 말단절단된 EGFR 유전자 (EGFRt) 또는 이의 부분 또는 조합인 보조 태그를 포함할 수 있다. 보조 태그는 비면역원성 선택 도구로서 또는 마커를 추적하기 위해 사용될 수 있다.
- [0225] 일부 실시 양태에서, 안전 스위치는 RSV F 당단백질 A2 균주 (NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN)의 잔기 254-277에 상응하는 24-잔기 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0226] 일부 실시 양태에서, 안전 스위치는 단클론 항-TNF α 약물에 의해 결합된 TNF α의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0227] 본원에 기술된 임의의 조작된 세포의 투여는 CAR 증폭제의 공동 투여로 보충될 수 있다. CAR 증폭제의 예로는 비제한적으로, 더 좋은 치료 결과를 위해 면역 체크포인트 경로를 표적으로 하는 작용제, 콜로니자극인자-1 수용체 (CSF1R)의 억제제와 같은, CAR 활성을 증진시키는 면역 조절 약물이 포함된다. 면역 체크포인트 경로를 표적으로 하는 작용제는 억제성 면역수용체 CTLA-4, PD-1, 및 PD-L1에 결합하여 CTLA-4 및 PD-1 / PD-L1 차단을 초래하는 소분자, 단백질, 또는 항체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 증폭제는 위에서 기술한 바와 같은 인핸서를 포함한다.
- [0228] 본원에 사용된 바와 같이, "환자"는 포유동물을 포함한다. 본원에 언급된 포유동물은 임의의 포유동물일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포유동물"은 마우스 및 햄스터와 같은 설치목 포유동물, 및 토끼와 같은 토끼목 포유동물을 포함하나 이에 한정되지는 않는 임의의 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 고양이과(고양이) 및 개과(개)를 포함하는 식육목(order Carnivora)으로부터 유래한 것일 수 있다. 포유동물은 소과(소) 및 돼지과(돼지)를 포함하는 우제목(order Artiodactyla), 또는 말과(말)를 포함하는 기제목(order Perssodactyla)으로부터 유래한 것일 수 있다. 포유동물은 영장목(order Primates), 세보이드(Ceboids) 목, 또는 시모이드(Simoids) 목 (원숭이)에 속하거나 유인원 목 (order Anthropoids)(인간 및 유인원)에 속할 수 있다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다. 환자는 대상체를 포함한다.
- [0229] 특정 실시 양태에서, 환자는 0-6개월, 6-12개월, 1-5세, 5-10세, 5-12세, 10-15세, 15-20세, 13-19세, 20-25세, 25-30세, 20-65세, 30-35세, 35-40세, 40-45세, 45-50세, 50-55세 55-60세, 60-65세, 65-70세, 70-75세, 75-80세, 80-85세, 85-90세, 90-95세, 또는 95-100세의 인간이다.
- [0230] 본원에 사용된 바와 같이, 조작된 세포의 "유효량" 및 "치료 유효량"이란 용어는 목적하는 치료적 또는 생리학 적 효과 또는 결과를 제공하기 위한 충분한 양의 조작된 세포를 의미한다. 이러한, 효과 또는 결과는 세포 질환

의 증상 감소 또는 개선을 포함한다. 목적하지 않는 효과, 예를 들어 부작용은 때로는 목적하는 치료 효과와 함께 나타난다; 그러므로, 진료의는 잠재적 위험과 잠재적 이익 사이에 균형을 잡아서 적절한 "유효량"이 무엇인지 결정한다. 요구되는 정확한 양은 환자의 종, 연령 및 일반적인 상태, 투여 방식 등에 따라 환자마다 다를 것이다. 따라서, 정확한 '유효량'을 명시하는 것은 불가능할 수 있다. 그러나, 임의의 개별 케이스에서의 적절한 "유효량"은 상용 실험만을 사용하여 해당 업계 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 조작된 세포는 표적 세포의 증식을 감소시키기에 충분한 양 및 조건으로 투여된다.

- [0231] 임의 치료, 억제 또는 방지를 위한 전달 시스템을 투여한 후에, 숙련된 진료의에게 잘 알려진 다양한 방법으로 치료적 조작된 세포의 효능을 평가할 수 있다. 예를 들어, 치료적 조작된 세포가 암세포 부하를 감소시키거나 암세포 부하의 추가적 증가를 방지하는 것을 관찰함으로써 화학보조제와 함께 전달되는 치료적 조작된 세포가 환자에서 암을 치료 또는 억제하는 데 효과적이라는 것을 해당 업계 통상의 기술자는 이해할 것이다. 암세포 부하는 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응 분석을 사용하여 특정 암세포 핵산의 존재 또는 혈액 중 특정 암세포 마커의 식별을 검출하는 것, 예를 들어, 항체 검정을 사용하여 대상체 또는 환자로부터의 샘플 (예를 들어, 비제한적으로, 혈액)에서의 마커의 존재를 검출하는 것, 또는 환자에서의 혈액순환중 암세포 항체 수준을 측정하는 것으로 측정될 수 있다.
- [0232] 본원 명세서 전반에 걸쳐, 양은 범위 및 범위의 상한 및 하한에 의해 정의된다. 각 하한은 각 상한과 조합하여 범위를 정의할 수 있다. 하한과 상한은 각각이 별도의 요소로 고려되어야 한다.
- [0233] 본원 명세서 전반에서 "하나의 실시 양태", "일 실시 양태", "하나의 예" 또는 "일례"에 대한 언급은 실시 양태 또는 예와 관련하여 설명된 특정한 특색, 구조 또는 특징이 본 실시 양태들의 적어도 하나의 실시 양태에 포함 된다는 것을 의미한다. 따라서, 본원 명세서 전반에 걸쳐 다양한 곳에서 "하나의 실시 양태에서", "일 실시 양태에서", "하나의 예" 또는 "일례"라는 문구의 출현이 반드시 모두 동일한 실시 양태 또는 예를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 특정한 특색, 구조 또는 특징은 하나 이상의 실시 양태 또는 예에서 임의의 적합한 조합 및/또는 하위조합으로 조합될 수 있다. 추가로, 본원에 제공되는 도면은 해당 업계 통상의 기술자를 위한 설명의 목적을 위한 것이고 도면은 반드시 일정한 비율로 그려진 것이 아님이 이해된다.
- [0234] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "구성한다", "구성하는", "포함하다", "포함하는", "가지다", "가지고 있는" 또는 임의의 이들의 다른 변형은 비배타적인 포함을 커버하도록 의도된다. 예를 들어, 요소들의 리스트를 포함하는 프로세스, 물품 또는 장치는 반드시 이들 요소에만 한정되는 것은 아니며, 명확하게 열거되지 않거나 이러한 프로세스, 물품 또는 장치에 내재적인 다른 요소를 포함할 수 있다.
- [0235] 또한, 달리 명백하게 언급되지 않는 한, "또는"은 포괄적인 "또는"을 지칭하고 배타적인 "또는"을 지칭하지 않는다. 예를 들어, 조건 A 또는 B는 다음 중 임의의 하나에 의해 만족된다: A가 참이고(또는 존재하고) B가 거짓이고(또는 존재하지 않고), A가 거짓이고(또는 존재하지 않고) B가 참이고(또는 존재하고), 그리고 A와 B가 모두 참이다(또는 존재한다).
- [0236] 또한, 본원에 주어진 임의의 예 또는 예시는 그들과 같이 사용되는 임의의 용어 또는 용어들의 어떠한 구속으로도 간주되지 않거나, 그러한 것으로 제한하는 것으로 간주되지 않거나, 그 정의를 표현하는 것으로 간주되지 않는다. 대신에, 이러한 예들 또는 예시들은 하나의 특정 실시 양태와 관련하여 설명되는 것으로, 그리고 오직 예시적인 것으로 간주되어야 한다. 이들 예들 또는 예시들과 같이 사용되는 임의의 용어 또는 용어들은, 함께 또는 명세서 내의 다른 곳에서 주어지거나 주어지지 않았을 수 있는 다른 실시 양태들을 포괄할 것이고, 이러한 모든 실시 양태들은 해당 용어 또는 용어들의 범위 내에 포함되도록 의도된다는 것임을 해당 업계 통상의 기술자는 이해할 것이다. 그러한 비제한적 예 및 예시를 나타내는 언어는 "예를 들어", "예컨대", "예" 및 "하나의 실시 양태에서"를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.
- [0237] 이 명세서에서는 다수의 멤버를 포함하는 다양한 매개 변수 그룹이 기재된다. 매개 변수의 한 그룹 내에서, 각 멤버는 다른 멤버 중 1개 이상과 조합하여 추가 하위 그룹을 만들 수 있다. 예를 들어, 만약에 한 그룹의 멤버가 a, b, c, d 및 e이면, 구체적으로 고려되는 추가 하위 그룹은 멤버 중 임의의 1개, 2개, 3개 또는 4개를 포함하며, 예를 들어, a 및 c; a, d 및 e; b, c, d 및 e; 등을 포함한다.
- [0238] 본원에 사용된 바와 같이, XXXX 항원 인식 도메인은 XXXX에 대해 선택적인 폴리펩타이드이다. 따라서 XXXX가 표적이다. 예를 들어, CD38 항원 인식 도메인은 CD38에 특이적인 폴리펩타이드이다.
- [0239] 본원에 사용된 바와 같이, CDXCAR은 CDX 항원 인식 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체를 가리킨다.
- [0240] 본 개시내용은 아래에 제시되는 예를 참조하여 더 잘 이해될 수 있다. 다음의 예는 본원에 청구된 화합물, 조성

물, 제품, 장치 및/또는 방법이 어떻게 제조되고 평가되는지에 대한 완전한 개시 및 설명을 해당 업계 통상의 기술자에게 제공하기 위해 제시되며, 순수하게 예시적인 것으로 의도되며, 본 개시내용을 제한하려는 것은 아니다.

[0241] 실시예

[0242] 화합물 CAR (cCAR)의 생성

[0243] CD33CD123 cCAR의 구축물은 도 1A의 도식을 따른다. 여기에는 2개의 상이한 CAR 단위를 갖는 기능성 화합물 CAR (cCAR)의 발현을 유도하는 SFV (비장 포커스 형성 바이러스, spleen focus-forming virus) 프로모터가 포함된다. 항원 수용체 맨 윗부분은 항-CD33 및 항-CD123의 scFv (단일-사슬 가변 단편) 뉴클레오타이드 서열이다. 피코르나바이러스로부터 유래된 P2A 펩타이드는 바이시스트론성 (bicistronic) 유전자 구축물에 대한 그의 자가-절단 역학의 고 효율적인 메카니즘 때문에 이용된다. 자가-절단 P2A 펩타이드는 발현동안 CAR, CD33CAR, 및 CD123CAR의 2개의 독립적인 단위를 함께 연결시키는 역할을 한다. 문헌에서 통상적으로 사용되는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)에 대한 이 접근법의 장점은 2A 펩타이드의 상류와 하류의 두 단위 단백질 사이의 작은 크기 및 고 절단 효율을 포함한다. 또한, 자가 절단 P2A 펩타이드의 사용은 IRES가 적용될 때 IRES 전후의 유전자 사이의 발현 수준의 차이의 문제를 피할 수 있다.

[0244] 모듈 단위인 CD33CAR은 CD33 scFv 도메인, CD8a 힌지 영역, CD8a 막통과 도메인, 4-BB 보조-자극 도메인 및 CD3 제타 사슬의 세포내 도메인을 포함한다. 제2 모듈 CAR인, CD123CAR은 CD33CAR과 같은 힌지, 막통과 및 세포내 신호전달 도메인을 가지고 있지만 상이한 scFv 및 보조 자극 도메인을 가지고 있다. CD33 CAR는 그에 상응하는 항원을 인식하고 CD123 CAR는 그에 상응하는 항원과 결합한다. 힌지 영역을 디설피드 상호 작용을 피하는 서열이 되도록 설계하였다. 상이한 보조 자극 도메인, 4-BB 및 CD28을 사용하였다. CD33CD123 화합물 CAR을 렌티 바이러스 플라스미드로 서브클로닝하였다.

[0245] 고효율 화합물 CAR (cCAR)의 생성

[0246] 화합물 CAR 렌티바이러스를, 도 2에 도시된 바와 같이 역가를 증가시키기 위해, 삽입하기에 큰 사이즈로 인해 2배의 벡터 DNA를 제외하고는, 제조업체의 지시에 따라 리포펙타민(Lipofectamine) 2000으로 HEK-293 FT 세포를 형질 감염시킴으로써 생성하였다. 약 12-16시간의 인큐베이션 후에, 리포펙타민을 함유하는 배지를 제거하고 10% FBS, 20mM HEPES, 1mM 피루브산 나트륨 및 1mM 부티르산 나트륨을 함유하는 DMEM으로 교체하였다. 약 24시간 후, 상청액을 채취하고 냉장시키고, 신선한 배지로 교체하였다. 또 다른 약 24 시간 후에, 이를 수집하여 이전의 상청액과 혼합하고 0.45 μM 필터 디스크를 통해 여과하였다. 상청액을 분취량으로 나누어 액체질소로 급속 냉동시키고 -80°C에서 보관하였다. HEK-293 FT 세포를 채취하고, 냉동 보관하고, 후속의 전기영동 및 웨스턴 블롯을 위해 용해시켰다.

[0247] PB (말초 혈액) 또는 CB (인간 제대혈) 백혈구연층 세포를 항-CD3 항체 및 IL-2로 2일간 활성화시켰다. cCAR 렌티바이러스 상청액을 레트로벡틴(RetroNectin)으로 코팅된 멀티웰 플레이트(multiwell plate) 위에 스피노콜레이션(sp inoculation)하였다. 활성화된 T 세포는 형질도입 효율을 증가시키기 위해 약 0.3 x 10<sup>6</sup> 세포/mL의 저농도에서 렌티바이러스 상청액으로 다수의 웰에서 형질 도입시켰다 (도 2).

[0248] 첫 번째의 밤샘 형질 도입에 이어, 세포가 건강하지 않게 보이지 않는 한, 세척 없이 두 번째 형질도입을 위해 제2 바이러스-코팅된 플레이트에 세포를 직접 첨가하였다. 두 번째의 밤샘 형질도입에 이어, 세포를 세척하고, 조합하고, 조직 배양 처리된 플레이트에서 인큐베이션하였다. CAR T 세포를 공동 배양 살상 분석 전에 최대 약 5일간 팽창하도록 허용하였다. 약 3일간의 인큐베이션 후, 세포를 바이오틴과 접합된 염소 항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub> 또는 염소 IgG (동형) 항체와 함께 인큐베이션하고, 세척하고, 이어서 스트렙타비딘-PE (streptavidin-PE) 및 접합된 항-인간 CD3와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고 2% 포르말린에 현탁한 후, 이어서 유동 세포측정법으로 분석하여 형질도입 효율의 백분율을 결정하였다.

[0249] CD33CD123 cCAR의 특징화

[0250] 화합물 구축물을 확인하기 위해 형질 감염된 CD33CD123 cCAR HEK293T 세포를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 항-CD3 ζ 단클론 항체를 갖는 면역블롯은 화합물 CAR CD3 ζ 융합 단백질에 대한 예측된 크기의 밴드를 나타내었다 (도 1B). 중요하게, 비슷한 강도의 두 개의 별개의 밴드가 블롯 상에서 관찰되었으며, 이는 예상한 바와 같은 P2A 펩타이드의 성공적인 고 절단 작용을 시사한다. 예상한 대로 GFP 대조 벡터에 대해 CD3 ζ 발현은 나타나지 않았다. scFv의 표면 발현을 또한 HEK 293 세포 (도 1C) 및 1차 T 세포 (도 1C) 상에서 시험하였다.



- [0251] 화합물 CD33CD23CAR 렌티바이러스를 HEK293 세포주에서 형질 도입 효율에 대해 시험하고 유동 세포측정법으로 분석하였다 (Beckman Coulter) (도 1C). 유동 세포측정법은 HEK 세포의 약 67%가 CD33CD123 CAR를 발현한다는 것을 보여 주었다. 인간 말초 혈액 (PB)은 자가 T 세포 요법에 자주 사용된다. 인간 PB 백혈구 연층 세포를 항-CD3 항체와 IL-2로 활성화하고, CD4CAR 또는 대조 (GFP) 렌티바이러스로 형질도입시켰다. 형질 도입 후, 유동 세포측정법 분석은 T 세포의 약 22%가 CD33CD123CAR을 발현한다는 것을 보여 주었다 (도 1C).
- [0252] **결과**
- [0253] **체대혈(UCB) 및 말초 혈액(PB)에서 유래한 CD33CD123 cCAR T 세포는 CD33-발현 중양 세포를 특이적으로 살상한다**
- [0254] CD33CD123 cCAR T 세포 또는 GFP T 세포 (대조)를 표적 세포와 0.5:1 내지 50:1, 바람직하게는 약 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 50:1의 범위의 비율로, 각각 약 100,000, 200,000, 500,000, 약 1백만, 또는 2백만 개의 효과기 세포 대 약 50,000, 100,000, 200,000 개의 표적 세포로, 약 1-2 mL T 세포 배양 배지에서, IL-2 없이 약 24시간 동안 인큐베이션하였다. 표적 세포는 백혈병 환자로부터의 백혈병 세포주 및 백혈병 세포였다. 약 24시간의 공동 배양 후, 세포를 마우스 항-인간 CD33, CD123, CD34 및 CD3 항체로 염색하였다.
- [0255] CD33 CAR 및 CD123 CAR를 발현하는 CD33CD123 cCAR T 세포를 생성하고 HL60 및 KG-1a 세포주를 사용하여 항-백혈병 기능에 대해 시험하였다. HL60 세포주는 CD33이 매우 풍부한 전골수구성세포백혈병 세포주이다. 이의 세포 집단의 약 100%가 CD33+이고 이의 작은 하위세트(<10%)가 희미한 CD123+이다. 배양에서, CD33CD123 CAR의 유효성을 측정하기 위해 CD33-발현 백혈병 세포를 표적화하는 것에 중점을 두고 이 세포주를 시험하였다. 또한, HL60에서의 CD33의 강력한 발현때문에, CD33CD123 cCAR 효과는 엄청날 수 있다. 실제로, 다양한 비율의 효과기 세포 대 표적 세포를 포함하는, 24시간의 공동 배양 조건에서, CD33CD123 cCAR은 유의한 백혈병 세포 살상 특성을 나타내었다 (도 4). CB-유래 CD33CD123 CAR T 세포를 HL60 세포를 살상하는 그의 능력에 대해 먼저 시험하였다. 약 24 시간 인큐베이션 및 약 0.5:1 내지 50:1, 바람직하게는 1:1 내지 약 5:1, 더 바람직하게는 약 2:1 내지 4:1 범위의 낮은 효과기 대 표적 (E:T) 비율에서, CD33CD123 CAR 세포는 GFP 대조와 비교할 때 약 55%의 CD33 발현 HL60 세포를 제거하였다. 약 5:1의 비율에서, 살상 작용은 약 82%까지 상승하였다.
- [0256] 골수성 백혈병 세포주 KG1a와 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)로부터 유래된 CD33CD123 CAR를 공동 배양하였는데, 이는 또한 HL60 및 50-80% CD123과 비교하여 적절한 수준에서 약 100% CD33을 발현하였다. 따라서 KG1a는 CD33CD123 CAR가 표적으로 하는 항원에 대해 이중 양성인, 상대적으로 이중적인 표적 세포 집단이다. 약 24시간의 인큐베이션 및 약 0.5:1 내지 50:1 범위의 낮은 효과기:표적 (E:T) 비율을 사용하였다. 약 2:1의 낮은 E:T 비율에도 불구하고, CD33CD123 CAR은 약 26%의 보통의 항백혈병 활성을 나타내었고, E:T 비율을 10:1까지 증가시켰을 때 GFP 대조와 비교하여 약 62%의 KG1a 살상을 초래하였으며 (도 5), 이는 KG1a보다 강하게 CAR 작용을 나타내고 이를 이용하는 HL60을 사용하면 CD33 마커의 강도가 살상의 효능에 대한 지표가 될 수 있다는 것을 시사한다. 이러한 실험은 관련 항원 제시 세포 집단에 대한 전체 CD33CD123 CAR의 기능에 대한 증거를 제공한다.
- [0257] 추가 화합물 CAR, CD33CD123-BB cCAR을 생성하였다. 이 화합물 CAR은 CAR의 2개의 독립 단위, CD33 및 CD123을 포함한다. 제1 CAR은 CD33에 결합하는 scFv를 포함하고, 제2 CAR은 CD123을 인식하는 상이한 scFv를 갖는다. 두 CAR 모두 동일한 힌지 영역, 막통과, 보조 자극 및 세포내 도메인을 포함한다. CD33CD123-BB cCAR 렌티바이러스를 생산하고 그들의 살상 능력을 KG-1a 세포에서 시험하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, 약 10:1의 비율에서 실질적인 살상이 있었지만, 그것은 CD33CD123 cCAR의 것 보다 덜 강력하다.
- [0258] **CD33CD123 cCAR은 CD33 및/또는 CD123을 발현하는 환자 샘플에 대하여 활성을 가지고 있다**
- [0259] 세포주 실험 이외에, 각 개개의 CAR 단위의 기능을 시험하기 위해 환자 샘플에 대한 연구도 수행하였다. 공격성 급성 골수성 백혈병(AML)인 AML-9를 CD33CD123 cCAR의 효능을 시험하는 데 사용하였다. AML-9 샘플에서의 다수의 세포 유형을 포함하는 환자 세포 집단의 이질성 때문에, 백혈병 모세포를 CD34 및 CD33으로 게이팅하였는데, 이는 백혈병 모세포가 이들 두 마커에 대해 양성이었기 때문이다. 이 백혈병 세포의 CD33+ CD34+ 집단의 고갈은 CAR T 세포: 표적 세포의 비율에서 GFP 대조와 비교했을 때 48%인 것으로 관찰되었다 (도 6).
- [0260] CD123 양성 및 CD33 음성인 백혈병 세포도 시험하였다. 이 목적을 위해 인간 B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL) 샘플인 Sp-BM-B6을 선택했다. 이 샘플의 모든 백혈병 모세포는 CD34+ CD33-이고, CD123에 대해 약 50% 초과 양성이었다. CD33CD123 cCAR T 세포에 의한 CD34+ 백혈병 세포 집단의 고갈은 GFP 대조의 것과 비교했을 때 약 86%였다(도 7). 세포주 및 인간 샘플 연구에 기반하여, 우리의 데이터는 화합물 CD33CD123 CAR이 CD33 또는 CD123 또는 이들 모두를 발현하는 백혈병 세포를 표적화할 수 있음을 강력히 시사한다.

- [0261] **CD33 또는 CD123 또는 이들 모두를 발현하는 백혈병 세포를 표적으로 하는 CD33CD123 cCAR NK 세포**
- [0262] 자연 살상 (NK) 세포는 CD56+CD3-이며 CD8+ T 세포처럼 감염된 및 종양 세포를 효과적으로 살상할 수 있다. CD8+ T 세포와는 달리, NK 세포는 세포를 살상하는 것에 대한 활성화 요구 없이 종양에 대해 세포 독성을 개시한다. NK 세포는 사이토카인 폭풍의 잠재적으로 치명적인 합병증을 피할 수 있기 때문에, 보다 안전한 효과기 세포이다. 그러나, 백혈병을 살상하는 데 CD33 또는 CD123 또는 둘 다를 사용하는 것은 완전히 연구되지 않았다.
- [0263] **CD33CD123 cCAR NK 세포의 생산**
- [0264] 2번의 연속적 밤샘 형질 도입으로 NK-92 세포를 CD33CD123 CAR 렌티바이러스 상청액으로 형질 도입시키고 중간에 레트로넥틴 (retroectin) 및 바이러스가 코팅된 플레이트로 바꾸었다. 형질 도입된 세포를 3일 또는 4일 동안 팽창시킨 후, CAR 발현을 위해 유동 세포측정법으로 분석하였다. 세포를 채취하고 염소 항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub>와 함께 약 1:250으로 약 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고, 현탁시키고, 스트렙타비딘-PE(streptavidin-PE)로 약 30분 동안 염색하였다. 세포를 세척하고 2% 포르말린에 현탁시키고, 유동 세포측정법으로 분석하였다. 이어서, CD33CD123 cCAR을 발현하는 NK-92 세포를 상기와 같이 표지하고, FACS Aria 상에서 분류하여 F(Ab')<sub>2</sub>-발현 세포의 상위 0.2%를 수집하고 배양하였다. 분류되고 팽창된 세포의 후속 표지는 NK-92 세포의 약 89%가 항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub>에 대해 양성임을 나타냈다 (도 8).
- [0265] **CD33CD123 cCAR NK 세포는 백혈병 세포를 효율적으로 용해하거나 제거한다**
- [0266] 우선, 공동 배양에서의 HL-60 암 세포주를 살상하는 CD33CD123 cCAR NK-92 세포의 능력을 평가함으로써 CD33CD123 cCAR NK-92 세포의 기능을 시험하였다. 사실상 모든 HL-60 세포는 CD33을 고도로 발현하지만 이 세포주에서의 CD123 발현은 단지 10% (약한) 미만이다. 그러므로, CD33CD123cCAR의 살상 능력은 CD33을 적절하게 표적화할 수 있는 cCAR의 능력에 의존할 가능성이 높다.
- [0267] CD33CD123 cCAR NK-92 세포를 IL-2 없이 NK 세포 배지에서 약 24시간 동안 HL-60 세포와 공동 배양하였다. 인큐베이션 후, CD33CD123 cCAR NK-92 세포를 표지하고, 비-CAR, GFP NK-92 세포의 대조와 비교하였다. CD33CD123 cCAR NK-92 세포에 의한 HL-60 세포의 극적인 살상을 대조, GFP NK-92 세포와 비교하여 관찰하였다. 더욱이, CD33CD123 cCAR NK-92 세포의 살상 능력은 대조와 비교하여 약 10대1 비율에서 약 100%로 용량-의존적이었다 (도 9 및 도 11).
- [0268] 골수성 백혈병 세포주를 이용한 두 번째 공동 배양 실험을, 모든 세포에서 CD33을 발현하는 KG1a를 사용하여 수행하였지만, HL-60의 것에 비해 보통 수준이었다. CD123 항원은 KG1a 세포의 약 50-80%에서 발현된다. 실험 디자인은 상기 기재된 HL-60 살상 분석의 첫 번째 실험과 유사하게 동일한 인큐베이션 시간, 효과기:암세포 비율 및 GFP NK-92 세포 대조를 사용하였다. 결과는 GFP NK-92 세포 대조와 비교할 때 용량-의존적 방식의 CD33CD123 cCAR NK-92 세포에 의한 현저한 KG1a 세포 살상을 보여준다. 10:1 효과기:표적의 비율에서, CD33CD123 cCAR NK-92 세포에 의한 KG1a 세포 살상은 GFP 대조의 것과 비교하여 약 85%였다 (도 10 및 11).
- [0269] KG1a 세포의 분석은 2개의 상이한 집단, CD33+CD123- 및 CD33+CD123+을 보여주었다. 도 12은 세포 살상에 있어서 두 집단 모두에서 나타난 용량-의존적 증가를 나타낸다. 놀랍게도, 이중 양성 집단은 각 증가된 비율에 대해 더 높은 효율적인 살상을 나타냈고, 이는 CD33 및 CD123의 두 개의 모듈 CAR의 가능한 상승작용적 효과를 시사한다 (도 12).
- [0270] **CD19CD20, CD19CD22, CD19CD138 cAR의 생성**
- [0271] 위에서 설명된 CD33CD123 cCAR의 것과 유사한 전략을 사용하여 3개의 Ccar을 생성하였다 (도 13).
- [0272] **다발성 골수종 치료를 위한 BCMA CS1 cCAR 및 BCMA CD19 cCAR를 포함하는 cCAR의 생성**
- [0273] CD38, CS1, CD138, B 세포 성숙 항원 (BCMA) 및 CD38을 포함하는 표면 항원을 표적화하기 위한 cCAR에 대한 전임상 연구를 진행하였다. CD19 CAR은 1상 임상 시험에서 다발성 골수종 치료에 약간의 효능을 나타냈다. 그러나 표적 항원 발현의 이질성이 악성 형질 세포에서 통상적으로 발생한다는 점을 고려하면 (Ruiz-Arguelles and San Miguel 1994), 단일 표적이 이 질환을 제거하기에 충분할 가능성은 낮다. BCMA CS1 cCAR, BCMA CD19 cCAR, BCMA CD38 cCAR 및 BCMA CD138 cCAR을 생성하였고, 실험 디자인은 위에서 설명된 바와 같이 CD33CD123 cCAR의 것과 유사하였다.
- [0274] **다발성 골수종 치료를 위한 BCMA CS1 cCAR (BC1cCAR)을 포함하는 cCAR 생성**

**[0275] BCMA-CS1 cCAR (BC1cCAR) 구축물의 생성 및 특징화**

**[0276]** BC1cCAR의 모듈 디자인은 자가 절단 P2A 펩타이드에 의해 항-CD319 (CS1) scFv에 융합된 항-CD269 (BCMA, B 세포 성숙 항원) 단일사슬 가변 단편 (scFv) 영역, CD8-유래된 힌지(H) 및 막통과(TM) 영역, 및 CD3 $\zeta$  신호전달 도메인에 연결된 직렬(tandem) 4-1BB 공동-활성화 도메인으로 구성된다 (도 14A). 강력한 비장 포커스 형성 바이러스 프로모터 (SFFV) 및 CD8 리더 서열을 T 세포 표면 상에서의 BC1cCAR 분자의 효율적인 발현을 위해 사용하였다. 두 단위의 CAR은 같은 보조 자극 도메인, 4-1BB를 사용하였다. 형질 감염된 BC1cCAR HEK293T 세포를 화합물 구축물을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석에 적용하였다. 항-CD3 $\zeta$  단클론 항체를 사용한 면역블롯은 화합물 CAR CD3 $\zeta$  융합 단백질에 대한 예측된 크기의 밴드를 나타내었다 (도 14E). 중요하게, 비슷한 강도의 2개의 별개의 밴드가 블롯 상 관찰되었으며, 이는 예상한 바와 같은 P2A 펩타이드의 성공적인 고 절단 작용을 시사한다. 예상한대로 GFP 대조 벡터에 대해 CD3 $\zeta$  발현은 나타나지 않았다.

**[0277] BC1cCAR (cCAR) T 세포의 생성**

**[0278]** 제대혈 (UCB) 백혈구연층으로부터 단리된 T 세포를 2일의 활성화 후에 BC1cCAR 렌티바이러스로 형질도입시켰다. 두 단위의 CAR은 같은 보조 자극 도메인, 4-1BB를 사용했다. BC1cCAR의 형질 도입 효율은 유동 세포측정법에 의해 측정시 약 15%로 결정되었다 (도 14B). BC1cCAR T 세포를 먼저 골수종 마커, BCMA 및 CS1에 대해 음성인 CML (만성 골수성 백혈병) 세포주에서 시험했다. 예상한 바와 같이, 야생형 K562에 대한 대조 T-세포 또는 BC1cCAR T-세포로부터 용해는 일어나지 않았다 (도 14C). BCMA-K562 (Kochenderfer, NIH)는 80% 이상의 세포 집단에서 BCMA를 발현하게 하려고 BCMA 발현 cDNA로 형질 도입된 K562 세포였다. BC1cCAR T 세포를 이 세포주와 2:1 및 5:1의 E:T 비율에서 공동 배양하여, 대조 (검출 불가능)와 비교했을 때 30% 이상의 용해를 나타냈다 (도 14C). 이런 결과는 CS1CAR T-세포와 같은 다른 CAR에 대해 항원-형질 도입된 세포주에서 수행된 다른 배양과 부합한다.

**[0279]** 그러나, BCMA-CS1-2G (cCAR 일종)가 각 단위에 대해 상이한 보조 자극 도메인, 4-BB 또는 CD28을 사용한 경우, 희귀한 표면 CAR 발현이 검출되었는데, 이는 보조 자극 도메인의 적절한 선택이 T 세포 상에서의 표면 CAR 발현을 보장하는데 중요하다는 것을 나타낸다(도 14D). 비록 단백질을 HEK 세포에서 웨스턴 블롯팅에 의해 검출했지만 (도 14E), CD269-CS1-2G 렌티바이러스 상청액으로 형질 도입된 활성화된 T 세포에서는 표면 발현을 검출할 수 없었다. 이것은 발현된 단백질을 세포막으로 내보낼 수 없기 때문일 수 있다. 앞으로, 우리는 더욱 큰 세포 표면 발현을 가능하게 하기 위해 이 구축물의 서열을 최적화할 필요가 있을 수 있다.

**[0280] BC1cCAR T 세포는 BCMA<sup>+</sup> 및 CS1<sup>+</sup> 세포주를 특이적으로 용해시킨다**

**[0281]** BC1cCAR T 세포의 세포 독성 능력을 평가하기 위해, MM1S (BCMA<sup>+</sup> CS1<sup>+</sup>), RPMI-8226 (BCMA<sup>+</sup> CS1<sup>-</sup>), 및 U266 (BCMA<sup>+</sup> CS1<sup>dim</sup>)의 골수종 세포주와의 공동 배양 분석을 수행했다. 표적 세포를 용해시키는 BC1cCAR T 세포의 능력을 유동 세포 측정법 분석으로 정량화하였고 표적 세포를 사이토타커(Cytotracker) 염료 (CMTMR)로 염색하였다. 24시간의 공동 배양에서, 2:1의 E:T 비율에서의 표적 세포의 90% 이상 고갈 및 5:1의 E:T에서의 95% 이상 고갈로 BC1cCAR은 MM1S 세포의 사실상 완전한 용해를 나타냈다 (도 15). RPMI-8226 세포에서, BC1cCAR은 2:1의 E:T 비율에서 70% 이상의 BCMA<sup>+</sup> 표적 세포 및 5:1의 E:T에서 75% 이상 용해시켰다 (도 16). U266 표적 세포와의 24시간 공동 배양에서, BC1cCAR은 E:T 비율 2:1에서 BCMA<sup>+</sup> U266 세포 80%를 용해해 포화 상태에 도달하였다 (도 17).

**[0282] BC1cCAR T 세포는 원발성 환자 골수종 샘플에서 BCMA<sup>+</sup> 및 CS1<sup>+</sup> 집단을 특이적으로 표적화한다**

**[0283]** MM10-G 환자 샘플의 유동 세포측정법 분석은 뚜렷하고 일관된 BCMA<sup>+</sup> 및 CS1<sup>+</sup> 집단 하위세트를 보여준다 (도 18). MM7-G 샘플은 완전한 BCMA<sup>+</sup> CS1<sup>+</sup> 표현형을 나타내지만, MM11-G는 아마도 골수 흡인물인 그의 특성에 기인하는 노이즈 BCMA<sup>dim</sup> CS1<sup>dim</sup> 표현형을 보여준다. 24시간 후, BC1cCAR T 세포는 5:1의 E:T 비율에서 75% 이상인 MM7-G 원발성 환자 샘플의 강한 제거를 나타내고, 10:1에서는 85% 이상으로 증가한다 (도 19). MM11-G (도 20)에 대하여, BC1cCAR T 세포는 10:1의 E:T에서 BCMA<sup>+</sup>CS1<sup>+</sup> 집단의 45% 이상을 용해시킬 수 있었다.

**[0284]** BC1cCAR은 24시간에 걸쳐 MM10-G 공동 배양에서 BCMA<sup>+</sup>CS1<sup>+</sup> 및 BCMA<sup>-</sup>CS1<sup>+</sup> 집단 하위세트 둘 모두를 유의하게 제거함으로써 표적화된 및 특이적 용해 능력을 보여준다. 2:1의 E:T 비율에서, BC1cCAR T 세포는 BCMA<sup>+</sup>CS1<sup>+</sup> 집단의

60% 이상 및 오직 CS1<sup>+</sup>뿐인 집단의 70%를 제거한다. 5:1의 E:T 비율에서, 오직 CS1<sup>+</sup>뿐인 집단의 제거는 80%로 증가한다 (도 18).

[0285] **BC1cCAR T 세포는 생체내에서 종양의 유의적인 억제 및 감소를 나타낸다**

[0286] BC1cCAR T 세포의 생체내 항종양 활성을 평가하기 위해, NSG 마우스를 사용하여 측정 가능한 종양 형성을 유도하기 위해, 치사량에 가깝게 조사하고 다발성 골수종 세포주인, 루시페레이스-발현 MM1S 세포를 정맥내 주사하여 이중 마우스 모델을 개발하였다. 종양 세포 주입 3일 후, 마우스에 8x10<sup>6</sup> BC1cCAR T 세포 또는 벡터 대조 세포를 1회 용량으로 정맥내 주사하였다. 3, 6, 및 8일째에 마우스에 RediJect D-Luciferin (Perkin Elmer)을 피하 주사하고 종양의 부하를 측정하려고 IVIS 영상을 시행하였다 (도 21). 대조 마우스에 대한 처리된 마우스에서의 종양 세포의 백분율을 측정하기 위해, BC1cCAR T 세포를 주사한 마우스에 대해 측정된 평균 광 강도를 벡터 대조 주입 마우스의 것과 비교하였다 (도 21 및 22). 독립표본 T 검정 분석은 대조와 비교시 BC1cCAR T 세포를 주입한 그룹에서 8일까지 더 적은 광 강도, 따라서 더 적은 종양 부하를 가지는 것으로 두 그룹 간에 극도로 유의한 차이 (P = 0.0001)를 보여주었다 (p < 0.0001). 1일째, 그리고 후에 격일마다, 종양 크기 범위를 측정하고 두 그룹 간의 평균 종양 크기를 비교하였다 (도 21). 요약하면, 이런 생체내 데이터는 벡터 대조 NK 대조 세포와 비교할 때 CD269-CS1-BBCAR T 세포가 MM1S 주입된 NSG 마우스에서 종양 부하를 유의하게 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0287] **CD45 CAR 요법**

[0288] 3쌍의 sgRNA를 관심 유전자를 표적으로 하도록 CHOPCHOP로 디자인한다. 유전자-특이적 sgRNA는 이어서 E2A 자가 절단 링커와 연결된 인간 Cas9 및 퓨로마이신 내성 유전자를 발현하는 렌티바이러스 벡터 (Lenti U6-sgRNA-SFFV-Cas9-puro-wpre)로 클로닝하였다. U6-sgRNA 카세트는 Cas9 요소 앞에 있다. sgRNA 및 Cas9puro의 발현은 각각 U6 프로모터 및 SFFV 프로모터에 의해 유도된다 (도 23).

[0289] 이하의 유전자-특이적 sgRNA 서열을 사용하고 구축했다.

[0290] 본 발명의 비제한적인 실시 양태에서, 예시적인 유전자-특이적 sgRNA를 아래에 설명된 바와 같이 디자인하고 구축하였다:

[0291] CD45 sgRNA 구축물::

[0292] Lenti-U6-sgCD45a-SFFV-Cas9-puro GTGGTGTGAGTAGGTAA

[0293] Lenti-U6-sgCD45b-SFFV-Cas9-puro GAGTTTTGCATTGGCGG

[0294] Lenti-U6-sgCD45c-SFFV-Cas9-puro GAGGGTGGTTGCAATG

[0295] 도 24는 혈액 악성 종양을 표적으로 하는 CD45 CAR T 또는 NK 세포의 생성 단계를 보여준다.

[0296] **NK 세포 상 CD45를 표적으로 하는 CRISPR/Cas 뉴클레아제**

[0297] 유전자-특이적 sgRNA를 운반하는 렌티바이러스를 사용하여 NK-92 세포를 형질 도입시켰다. NK-92 세포 상에서의 CD45 발현의 손실은 유동 세포측정법 분석에 의해 측정하였다. NK-92 세포의 CD45 음성 집단을 분류하고 팽창시켰다 (도 25). 분류 및 팽창된 CD45 음성 NK-92 세포를 사용하여 CD45CAR NK 세포를 생성하였다. 얻어진 CD45CAR NK 세포를 사용하여 CD45+ 세포를 살상하는 그의 능력을 시험하였다.

[0298] **CRISPR/Cas 뉴클레아제 표적 후 CD45 불활성화 NK-92 세포 (NK<sup>45i</sup>-92)의 기능적 특징화**

[0299] CD45의 CRISPR/Cas 뉴클레아제 불활성화 후, NK<sup>45i</sup>-92 세포의 성장이 야생 NK-92 세포의 것과 유사하다는 것을 입증하였다 (도 26). CD45의 불활성화는 NK-92의 세포 증식에 유의한 영향을 미치지 않았다. 또한, 세포를 백혈병 세포인 CCRF와 공동 배양했을 때 NK<sup>45i</sup>-92 세포의 용해 능력이 야생형 NK-92의 것과 양립할 수 있다는 것을 밝혔다 (도 27).

[0300] CD45-불활성화된 NK-92가 CAR 용해와 양립할 수 있었다는 것을 입증하기 위해, NK<sup>45i</sup>-92 세포 및 그들의 야생형 NK-92를 CD5CAR 또는 GFP를 발현하는 렌티바이러스로 형질 도입시켰다. 얻어진 CD5CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 및 GFP NK<sup>45i</sup>-92를 FACS로 분류하여 표적화 세포를 살상하는 그의 능력을 비교하는 데 사용했다. CD5CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 CCRF-CEM 세포와 공동 배양하였을 때, 비율 (E:T), 2:1 및 5:1에서 CD5 표적 백혈병 세포를 강하게 살상하는 능



력을 보여주었다. CD5CAR NK<sup>45i</sup>-92와 CD5 CAR NK-92 세포 사이에 시험관내 CCRF-CEM 세포의 제거의 유사한 효능이 있는 것으로 나타났다 (도 28). 이것은 CD45 발현의 손실이 CAR NK-세포의 항 종양 활성을 감소시키지 않는다는 것을 시사한다.

[0301] **CD45CAR 구축물의 생성**

[0302] 다음으로 NK<sup>45i</sup>-92 세포에서의 CD45CAR이 백혈병 세포에서의 CD45 항원에 반응하는 것을 조사한다. 우리는 CD45CAR을 생성했다. CD45CAR은 항-CD45 단일 사슬 가변 단편 (scFv) 영역, CD8-유래 힌지 (H) 및 막통과 (TM) 영역, 및 CD3 $\zeta$  신호전달 도메인에 연결된 직열 CD28 및 4-1BB 공동-활성화 도메인으로 구성된다 (도 29A). 강력한 비장 포커스 형성 바이러스 프로모터 (SFFV) 및 CD8 리더 서열을 사용하였다. CD45CAR 단백질을 적절한 벡터 대조를 가진 CD45CAR 렌티바이러스 플라스미드로 형질감염된 HEK293-FT 세포의 웨스턴 블롯에 의해 특징화하였다. 추가적으로, 항-CD3제타 단클론 항체 면역 블롯은 CD45CAR 단백질에 대한 예측된 크기의 밴드를 나타내었고 벡터 대조에서는 밴드가 관찰되지 않았다 (도 29B).

[0303] **CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 NK 세포**

[0304] NK<sup>45i</sup>-92 세포를 풍부화하기 위한 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 후, CD45CAR NK-92 형질 도입 효율은 분류 후의 유동 세포측정법에 의해 결정된 바와 같이 87%인 것으로 결정되었다 (도 30). NK<sup>45i</sup>-92 세포의 FACS 수집 후, CD45CAR 발현 수준은 적어도 10 회의 계대 동안 일관되게 안정적으로 유지되었다.

[0305] **CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 CD45+ 백혈병 세포를 특이적으로 용해시킨다**

[0306] CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 항-백혈병 활성을 평가하기 위해, T-ALL 세포주, CCRF-CEM 및 Jurkat, 및 NK 세포주 및 NK-92 세포를, 이들 모두가 CD45를 발현하기 때문에, 사용하여 공동 배양 분석을 수행하였다 (도 31, 32 및 33). CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포가 백혈병 세포의 강력한 용해를 일관되게 나타냈다는 것을 입증했다. 낮은 효과기 대 표적 세포 (E:T 비율 5:1)에서의 6시간 인큐베이션 후, CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 60% 초과 CCRF-CEM 세포를 효과적으로 용해시켰다 (도 31). 6 시간 공동 배양 후, CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 또한 2:1 또는 5:1의 E:T 비율에서 약 60% Jurkat 세포를 제거할 수 있었다 (도 32). 6 시간의 공동 배양 후, CD45CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 2:1의 E:T 비율에서 20% CD45 양성 NK-92 세포를 효율적으로 용해시켰고 5:1의 E:T 비율에서 60% 가까이 용해시켰다 (도 33A-33C).

[0307] 혈액 악성 종양에 대한 CD45 표적을 추가로 분석하기 위해, 또한 추가의 두 개 CAR: CD45-28 및 CD45-BB를 생성하였고, 그리고 CD45-28 또는 CD45-BB CAR를 발현하는 렌티바이러스를 사용하여 NK45i-92 세포를 형질 도입시켰다. CD45-28 및 CD45-BB CAR에는 위에서 설명한 CD45CAR의 그것과 다른 새로운 항-CD45 scFv가 포함되어 있다. CD45-28 CAR은 CD28 보조 자극 도메인을 사용하지만 CD45-BB는 4-BB 보조 자극 도메인을 가지고 있다. 두 CAR 모두 CD8 유래 힌지 (H), 막통과 (TM) 영역 및 CD3 $\zeta$  신호전달 도메인을 사용한다. CD45CAR은 B 급성 림프모구 성 세포주, REH의 강력한 용해를 나타낸다. CD45CAR NK45i-92 세포는 약 76%의 REH 세포를 용해시켰다. CD45b-BB CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포 및 CD45b-28 CAR NK<sup>45i</sup>-92 세포는 대조 GFP NK-92 세포와 비교하여 각각 REH 세포의 약 79% 및 100% 용해를 나타냈다 (도 33D-G). CD45b-28 CAR NK45i-92 세포는 REH 세포의 최고의 용해 능력을 나타냈다.

[0308] **CAR T 및 NK 세포 기능을 증진시키는 데 있어서의 IL15 및 이의 수용체**

[0309] 최근 연구는 T 세포의 지속성이 CAR T 세포 치료 효과와 잘 연관되어 있음을 입증하였다. 최근의 시험은 주입된 소량의 CAR T 세포에 의해 강력하고 지속적인 항종양 활성이 생성될 수 있음을 입증하며, 이는 주입된 제품의 양보다는 품질이 항종양 활성에 기여하는 데 더 중요하다는 것을 나타낸다.

[0310] 인터루킨 (IL)-15는 림프구의 발생 및 지혈을 촉진시키는 사이토킨이다. IL-15의 증가된 수준은 T 세포 증식을 촉진시키고 T 세포 효과기 반응을 증진시킨다. 최근의 연구로부터의 자료는 IL-15가 항암 활성과 관련된 주요 인자들 중 하나인 기억 CD8 T 세포의 생성과 유지에 중요하다는 것을 보여주었다. IL-15는 T 세포 생존, 증식 및 기억 T 세포 생성과 같은 IL-15 매개 효과에 기여하는 IL-15 수용체 알파 사슬 (IL15RA 또는 RA라고도 함)에 결합한다.

- [0311] IL-15RA는 T 세포 표면에서의  $\beta \gamma$  복합체에 결합하고 IL15는 T 세포 및 다른 유형의 세포의 표면에서의 이러한 IL-15RA/ $\beta \gamma$  복합체와 결합함으로써 신호전달한다.
- [0312] 최근의 데이터는 IL-15 단독의 형질 감염이 T 세포 기능에 현저한 영향을 주지는 않지만 IL-15/IL-15RA의 형질 감염이 T 세포가 생존하고 자가적으로 증식하는 것을 가능하게 함을 보여 주었다.
- [0313] IL-15 단독 투여의 효능은 유리 IL-15RA의 이용 가능성과 그것의 짧은 반감기에 의해 제한될 수 있다. 가용성 IL-15/RA 복합체의 투여는 생체내에서의 IL-15 반감기 및 생체 이용률을 크게 향상시켰다. 따라서 IL-15 단독이 아닌 이 복합체로의 마우스의 처리는 기억 CD8 T 세포 및 NK 세포의 강력한 증식과 유지를 일으킨다. 최근의 연구는 스시 도메인 (sushi)이라고 불리는 IL-15RA의 세포의 영역의 일부가 그의 IL15와의 결합에 필요하다는 것을 보여주었다 (WEI 외, J. Immunol., vol.167(1), p:277-282, 2001). 링커를 함유하는 IL-15/RA 융합 단백질 또는 IL-15/스시(sushi) 융합 단백질은 IL-15 및 가용성 IL-15RA 단독보다 더 강력하다. IL-15/RA 또는 IL-15/스시(sushi)의 조합은 IL-15 활성을 최대화할 수 있다. 그러나, 삽입 서열 길이가 형질 감염 효율 및 유전자 발현 수준에 영향을 미칠 수 있기 때문에, CAR 및 IL-15/RA 또는 IL-15/스시(sushi) 둘 다를 같은 구축물에 통합시킨 디자인이 T 또는 NK 세포에서 그의 목적하는 생물학적 특성을 유지하는지에 대해서는 확실하지 않다.
- [0314] 본 개시내용은 단일 구축물 내에 CAR 및 IL-15/RA 또는 IL-15/스시 (sushi) 둘 모두를 갖는 조작된 세포를 제공한다. 일부 실시 양태에서, 본 개시내용은 더욱 높은 바이러스 역가를 생성하고 더욱 강력한 프로모터를 사용하여 CAR 및 IL-15/RA 또는 IL-15/스시(sushi) 둘 모두를 유도하는 방법들을 포함한다.
- [0315] 일부 실시 양태에서, 본 개시내용은 (1) CD4, CD2, CD3, CD7, CD5, CD45, CD20, CD19, CD33, CD123, CS1, 및 B-세포 성숙 항원 (BCMA)을 포함하나 이에 한정되지 않는 항원을 표적으로 하는 CAR; 및 (2) IL-15; (3) IL-15RA (RA) 또는 스시 (sushi)를 갖는 조작된 세포를 제공한다. 추가의 실시 양태에서, CAR은 키메라 항원 수용체, CD28, CD2, 4-1BB 및 OX40과 같은 보조 자극 엔도 도메인 중 하나 이상 및 CD3 제타 사슬의 세포내 도메인을 포함한다. 추가의 실시 양태에서, 강력한 프로모터는 SFFV 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. CAR, IL-15/RA 또는 스시 및 유도성 자살 유전자 ("안전 스위치"), 또는 조합물은 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터와 같은 벡터 또는 플라스미드 상에 조립될 수 있다. "안전 스위치"의 도입은 안전 프로파일을 현저하게 증가시킬 수 있으며 CAR의 온-표적 또는 오프-종양 독성을 제한할 수 있다.
- [0316] **CD4IL15RA-CAR의 특징화**
- [0317] CD4IL15RA-CAR을 생성하였으며 이는 IL15RA에 연결된 제3세대 CD4CAR을 포함한다 (도 34). CAR, (3세대), 스시/IL-15의 조합물은 발현 벡터 상에서 조립되며, 이들의 발현은 SFFV 프로모터에 의해 유도된다 (도 34). 스시/IL-15와 함께 CAR은 P2A 절단 서열과 연결되어 있다. 스시/IL-15 부분은 스시 도메인에 융합된 IL-2 신호 펩타이드로 구성되어 있으며 26-아미노산 폴리-프롤린 링커를 통해 IL-5에 연결된다 (도 34).
- [0318] CD4IL15RA 구축물을 검증하기 위해, HEK293FT 세포를 GFP (대조) 또는 CD4IL15RA를 위한 렌티바이러스 플라스미드로 형질 감염시켰다. 형질 감염으로부터 약 60시간 후에, HEK-293FT 세포와 상청액 둘 모두를 수집하였다. 세포를 단백질분해효소 억제제 각테일을 함유하는 RIPA 완충액에서 용해시키고 전기 영동하였다. 겔을 이모빌론 (Immobilon) FL 블로팅 막에 옮기고, 차단하고, 마우스 항-인간 CD3z 항체로 1:500으로 프로빙하였다. 세척 후, 막을 염소 항-마우스 HRP 접합체로 프로빙하고, 세척하고, HyGlo HRP 기질로 처리한 후 필름에 노출시켰다. CD4IL15RA-CAR은 레인 3 (화살표)에서의 제조할 IL-15 단백질 옆에 도시된 바와 같이, HEK 293 세포 (레인 2, 도 35a)에서 성공적으로 발현되었다. 신선한 HEK-293 세포의 형질 도입으로CD4IL15RA-CAR 렌티바이러스 상청액을 추가로 검사하였다 (도 35a). GFP 또는 형질 감염된 HEK-293FT 세포로부터의 CD4IL15RA-CAR 바이러스 상청액으로 HEK-293 세포를 형질 도입시켰다. 폴리브렌을 4 uL/mL까지 첨가하였다. 16시간 후에 배지를 바꾸고 바이러스 상청액 또는 폴리브렌을 함유하지 않은 배지로 교체하였다. 형질 도입 3일 후에, 세포를 채취하고 염소-항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub> 항체로 1:250에서 30분 동안 염색하였다. 세포를 세척하고 스트렙타비딘-PE (streptavidin-PE) 접합체로 1:500에서 염색하고, 세척하고, 2% 포르말린에 현탁시키고, 유동 세포측정법으로 분석하였다. 도 35b는 CD4IL15RA-CAR 렌티바이러스로 형질 도입된 HEK-293 세포가 F(Ab)<sub>2</sub>-PE에 대해 80% 양성이었지만 (동그라미로 표시됨, 도 35b) GFP 대조 렌티바이러스로의 형질 도입은 F(Ab)<sub>2</sub>-PE에 대해 최소였다 (도 35b, 왼쪽).
- [0319] **CD4IL15RA-CAR NK 세포의 생산**
- [0320] NK-92 세포를 CD4IL15RA-CAR 렌티바이러스 상청액으로 형질 도입시켰다. 5일간 인큐베이션 후에, 세포를 채취하고 염소 항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub>와 1:250에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고, 현탁시키고, 스트렙타비딘-PE (streptavidin-PE) 로 30분 동안 염색하였다. 세포를 세척하고 2% 포르말린에 현탁시키고, 유동 세포측

정법으로 분석하여, 형질 도입된 세포의 거의 70%가 CD4IL15RA-CAR을 발현하는 결과를 얻었다 (동그라미로 표시됨, 도 36). CD4IL15RA-CAR에 대한 추가 실험 검사는 시험관 내 및 생체내에서의 백혈병/림프종 살상 분석, 및 CD4CAR로 형질 도입된 세포와의 표적 살상 및 증식 속도의 비교를 포함할 것이다. 본 발명자는 또한 CD19IL15RA-CAR을 생성하기 위해 위에서 설명한 같은 전략을 사용하였다.

**[0321] CD4IL15RA-CAR T 세포의 생산**

**[0322]** 인간 제대 백혈구연층 세포를 CD4IL15RA-CAR 렌티바이러스 상청액으로 형질 도입시켰다. 5일간 인큐베이션 후에, 세포를 채취하고 염소 항-마우스 F(Ab')<sub>2</sub>와 1:250에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고, 현탁시키고, 스트렙타비딘-PE (streptavidin-PE)로 30분 동안 염색하였다. 세포를 세척하고 2% 포르말린에 현탁시키고, 유동 세포측정법으로 분석하여, 형질 도입된 세포의 63%가 CD4IL15RA-CAR을 발현하는 결과를 얻었다 (동그라미로 표시됨, 도 37). CD4IL15RA-CAR에 대한 추가 실험 검사는 시험관 내 및 생체내에서의 백혈병/림프종 살상 분석, 및 CD4CAR로 형질 도입된 세포와의 표적 살상 및 증식 속도의 비교를 포함할 것이다.

**[0323] CD4IL15RACAR NK 세포를 이하 CD4 양성 세포주: Karpas 299 및 MOLT4와 공동 배양하는 것에 의해 시험관 내에서 CD4CAR NK 세포와 비교하여 항-백혈병 활성을 검사하였다.**

**[0324]** Karpas 299 세포주는 역형성 거대 T 세포 림프종을 가진 환자로부터 유래되었다. CD4를 발현하는 MOLT4 세포주는 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL)을 가진 19세 환자의 말초 혈액으로부터 확립되었다. 4시간의 공동 배양 실험동안, CD4IL15RA CAR NK 세포는 효과기:표적의 5:1 비율에서, Karpas 299 세포를 CD4CAR NK 세포의 것 (82%, 도 38)보다 더 높은 비율로 엄청난 살상을 나타냈다 (95%). 유사하게, MOLT4 세포와 1:1로 공동 배양하였을 때, CD4IL15RA CAR NK 세포는 밤샘 분석에서 CD4CAR NK 세포보다 높은 비율 (84% 대 65%)로 표적 세포를 용해시켰다 (도 39). 이런 결과는 CD4IL15 CAR NK 세포가 적어도 CD4CAR NK 세포뿐만 아니라 적어도 종양 세포를 제거할 수 있음을 보여준다.

**[0325] CD4CAR 및 CD4IL15RA CAR T 세포는 CD4CAR보다 생체내에서 더 강력한 항-종양 활성을 나타낸다**

**[0326]** CD4CAR 및 CD4IL15RACAR T 세포의 생체내 항종양 활성을 평가하고, CD4CAR T 세포와 비교하여 CD4IL15RA CAR T 세포 지속성에 있어서 가능한 증가를 결정하기 위해, NSG 마우스를 사용하여 측정 가능한 종양 형성을 유도하기 위해, 치사량에 가까운 방사선 조사하고 100% CD4인 급성 골수성 백혈병 세포주 (M5)인 루시페레이스-발현 MOLM13 세포를 정맥내 주사하여 이중 마우스 모델을 개발하였다. 종양 세포 주사 3일 후, 6마리의 마우스 각각에게  $8 \times 10^6$  CD4CAR, CD4IL15RACAR T 세포 또는 벡터 대조 T 세포를 정맥내 주사하였다. 제3, 6, 9 및 11일째에, 마우스에게 RediJect D-Luciferin (Perkin Elmer)을 피하 주사하고 IVIS 영상을 시행하여 종양 부하를 측정했다 (도 40). CD4CAR T 세포-처리된 마우스는 6일째에 대조에 비해 52%의 낮은 종양 부하를 가진 반면, CD4IL15RA CAR T 세포-처리된 마우스는 74%의 낮은 종양 부하를 가졌다 (도 41). 11일째, 거의 모든 종양 세포가 이 두 그룹 모두에서 용해되었다. 독립표본 T 검정 분석은 대조와 비교시 CD4CAR 및 CD4IL15RACAR T 세포 처리 그룹에서 9일까지 더 적은 광 강도, 따라서 더 적은 종양 부하를 가지는 것으로 두 그룹 사이에 매우 유의한 차이 (P=0.0045)를 드러냈다.

**[0327] GFP 리포터를 이용한 프로모터 테스트**

**[0328]** HEK293FT 세포를 SFFV, EF1 또는 CAG 프로모터 하에서 GFP를 발현하는 렌티바이러스 플라스미드로 형질 감염시켰다. 형질 감염 대략 60시간 후에 각각으로부터 상청액을 수집하였다. 상대적인 바이러스 역가를 먼저 3개 프로모터 각각으로부터의 상청액으로 HEK293 세포를 형질 도입하는 것에 의해 측정하였다. HEK-293 세포를 3개 형질 감염된 HEK-293FT 세포 각각으로부터의 GFP 바이러스 상청액으로 형질 도입시켰다. 폴리브렌을 4 uL/mL까지 첨가하였다. 16시간 후에 배지를 바꾸고 바이러스 상청액 또는 폴리브렌을 함유하고 있지 않은 배지로 교체하였다. 형질 도입 3일 후, 세포를 채취하고 세척하고, 2% 포르말린에 현탁시키고, GFP 발현 (FITC)에 대해 유동 세포측정법으로 분석하였다. GFP 발현은 각 샘플에서 나타났지만, SFFV 프로모터를 사용하여 만든 바이러스로 형질 도입된 세포에서 가장 높았다.

**[0329]** 활성화된 인간 제대 백혈구연층 세포를 각 프로모터로부터의 GFP 렌티바이러스 상청액 (HEK293 형질 도입 효율의 결과에 기초한 양)으로 형질 도입시켰다. 인큐베이션 5일 후, 세포를 채취하고, 세척하고 2% 포르말린에서 현탁시키고, GFP 발현에 대해 유동 세포측정법으로 분석하였다. 43%의 세포가 높은 수준 ( $>10^3$ )으로 GFP를 발현한 반면, 프로모터 EF1를 사용하여 바이러스로 형질 도입된 세포에 대한 GFP 발현 (15%) 및 CAG를 사용하여 바이러스로 형질 도입된 세포에 대한 GFP 발현 (3%)은 상당히 낮았다. 5일 후, 같은 방법으로 분석된 세포는 각각

에 대해 거의 동일한 백분율을 나타냈다 (각기 46%, 15% 및 3%; 도 43). 이런 결과는 SFFV 프로모터가 EF1 또는 CAG 프로모터보다 더 강한 발현을 일으키고, 발현이 형질 도입 후 적어도 10일 동안 높게 유지된다는 것을 나타낸다. 추가적인 실험 테스트는 형질 도입된 세포에 대한 10일 윈도우 이상으로 더 긴 인큐베이션 시간을 포함할 것이다.

- [0330] T 항원 인식 모이어티 (CD4, CD8, CD3, CD5, CD7, 및 CD2 중 적어도 하나, 또는 이들의 일부 또는 이들의 조합), 힌지 영역 및 T 세포 활성화 도메인 중 적어도 하나를 포함하는 CAR 유전자를 생성하는 방법들이 제공된다.
- [0331] CD33, CD123, CD19, CD20, CD22, CD269, CS1, CD38, CD52, ROR1, PSMA, CD138, 및 GPC3 중 적어도 하나 또는 하나의 힌지 영역 및 T 세포 활성화 도메인들의 일부 또는 조합을 포함하는 항원(들)을 표적으로 하는 CAR (cCAR)의 다중 단위를 생성하는 방법들이 제공된다. 본원에 인용 및/또는 개시된 모든 참고 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0332] 제공된 방법은 또한 1) 백혈병 및 림프종을 발현하는 CD45를 표적화하고 자가 살상을 회피하는 CAR T 또는 NK 세포의 생성; 2) 억제 중앙 미세환경을 극복하고 증진된 항종양 활성 및 장기적 지속을 나타내도록 설계된 "갑옷을 입은" CAR T 또는 NK 세포의 생성을 포함한다. 본 발명은 위에서 설명되고 예시된 실시 양태들로 제한되지는 않으나, 첨부된 청구항들의 범위 내에서 변형 및 수정을 할 수 있다. 특히, 공개된 출원, 기술적 논문 및 학술 자료를 비롯한 다양한 공개가 본 명세서 전반에 걸쳐 인용된다. 각각의 인용된 공개는 모든 목적을 위해 그 전체가 여기에 참고로 포함된다. 본 발명의 양태와 관련되는 다양한 용어는 본 명세서 및 청구항의 전반에 걸쳐 사용된다. 이러한 용어는 달리 나타내지 않는 한 당해 기술 분야에서의 통상적인 그들의 의미가 제공되어야 한다. 다른 특별히 정의된 용어는 본원에 제공된 정의와 일치하는 방식으로 해석되어야 한다.
- [0333] **상청액에서의 바이러스 벡터 입자의 기능적 역가 (유동 세포측정법으로 측정된 바와 같은 % GFP 세포는 더 높은 역가 바이러스가 더 많은 세포에 침투하여 더 높은 % GFP 세포 집단을 초래하기 때문에 프록시 바이러스 역가 조정을 가능케 한다).**
- [0334] 상청액 각각에서의 바이러스 벡터 입자의 기능적인 역가를 측정하기 위해, HEK 293 세포를 12 웰(well) 조직-배양 처리된 플레이트의 웰 (well)당 30  $\mu$ L (저용량), 125  $\mu$ L (중간용량), 또는 500  $\mu$ L (고용량)의 EF1-GFP 또는 SFFV-GFP 바이러스 상청액으로 형질 도입시켰다. 다음날 아침, 배양 배지를 DMEM+10% FBS로 바꾸었다.
- [0335] 이어서, 형질 도입된 세포를 트립신처리하고, 세척하고, 포르말린에 현탁시키고, 유동 세포측정법 분석에 맡겼다. 각 조건에서의 GFP+ 세포의 백분율을 FITC 채널을 사용하여 유동 세포측정법에 의해 측정하였다 (도 43). 각각의 경우에, GFP+의 백분율은 상응하는 용량의 EF1-GFP 바이러스 상청액으로 형질 도입된 세포보다 SFFV-GFP로 형질 도입된 세포에서 더 높았다(저용량의 경우 50% 대 18%, 중간용량의 경우 80% 대 40%, 및 고용량의 경우 82% 대 70%). 이것으로부터, 역가의 측면에서, 최고 분량의 EF1-프로모터 바이러스를 사용하는 것이 최저 분량의 SFFV-프로모터 바이러스를 사용하는 것에 필적하고, 후속 형질 도입 실험에 대한 상대적 프로모터 강도의 비교를 가능케 할 것임을 알아냈다.
- [0336] 형질 도입된 세포를 또한 각 웰 (well)에 대해 같은 노출 조건에서 GFP를 사용하여 20x에서 EVOS 형광 현미경으로 시각화시켰다 (도 42). SFFV-GFP 바이러스 상청액으로 형질 도입된 세포는 EF1-GFP로 형질 도입된 세포보다 획기적으로 더 밝았다. 또한, 높은 바이러스 용량 부하 하에서의 EF1-프로모터 이미지와 낮은 바이러스 용량 부하를 사용한 SFFV-프로모터 이미지의 비교는 유사한 형광 강도를 보여준다. 이것은 SFFV 프로모터가 유전자 발현의 더 강력한 유도체임을 시사한다.
- [0337] **1차 T 세포에서의 표면 발현 및 상이한 프로모터의 지속성 비교 (T 세포 형질 도입에 대한 유동 세포측정법으로 측정된 %GFP 세포는 HEK293 세포에 관한 이전 실험으로부터 기대되는 바와 같이 GFP 세포 집단에서의 기대되는 차이를 나타낸다)**
- [0338] 1차 T 세포에서 프로모터 형질 도입 효율 및 표면 발현의 지속성을 측정하기 위해, 레트로넵텐(Clontech)으로 미리 코팅된 12-웰 (well) 조직 배양 처리된 플레이트에서, 활성화된 제대혈 백혈구연충 T 세포를 50  $\mu$ L SFFV-GFP 또는 1 mL EF1-GFP 바이러스 상청액으로 형질 도입시켰다. 두 번의 밤샘 형질 도입 후, 세포를 300 IU/mL IL-2 (Peprotech)를 함유하는 T 세포 배지에서 배양하고 1.0-4.0 x 10<sup>6</sup>/mL로 유지했다. 세포를 세척하고, 포르말린에 현탁시키고, 형질 도입 후 7, 14, 21 및 28일에 FITC 채널을 사용하여 유동 세포측정법 분석을 수행하여 GFP+ 세포의 백분율을 측정하였다. 전체 GFP+ 세포의 백분율이 이 기간에 걸쳐 감소하더라도, GFP+ 세포의 백분율은 EF1-GFP-형질 도입된 T 세포와 비교하여 SFFV-GFP로 형질 도입된 T 세포에 대해 지속해서 더 높았다 (도



44A). 추가 비교는 더 많은 양 (1mL)의 EF1-GFP 상정액으로 형질 도입된 T 세포의 백분율은 사실상 더 적은 양 (50  $\mu$ L, 또는 20배 적은)의 SFFV-GFP로 형질 도입된 GFP+ 세포의 백분율에 비해 제7일 내지 제28일에 60% 이상에서 40% 이하로 감소하였음을 나타냈다 (도 44B). 이것은 SFFV 프로모터를 이용한 형질 도입이 형질 도입된 세포의 더 오랜 지속성을 초래한다는 것을 시사한다.

[0339] BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R CAR 항원 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 표적으로 하는 BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R CAR NK 세포 혹은 T 세포

[0340] BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R 중 적어도 하나를 표적으로 하는 CAR NK 세포 혹은 T 세포의 세포독성 능력을 평가하기 위해, BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R 중 적어도 하나를 발현하는 세포주 또는 1차 인간 세포로 공동 배양 분석을 수행한다. 표적 세포를 용해시키는 상기 언급된 CAR NK 세포 또는 T 세포의 능력을 유동 세포측정법 분석으로 정량화하고 표적 세포를 사이토포트랙터 염료 (CMTMR)로 염색하였다. 24 시간의 긴 배양에서 용해를 관찰한다.

[0341] BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R 항원 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 표적으로 하는 BAFF 또는 APRIL CAR NK 또는 T 세포.

[0342] CAR에서의 키메라 항원 수용체는 BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R의 리간드이다.

[0343] BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R 중 적어도 하나를 표적으로 하는 CAR NK 또는 T 세포의 세포독성 능력을 평가하기 위해, BCMA 또는 TACI 또는 BAFF-R 중 적어도 하나를 발현하는 세포주 또는 1차 인간 세포로 공동 배양 분석을 수행한다. 표적 세포를 용해시키는 상기 언급된 CAR NK 또는 T 세포의 능력을 유동 세포측정법 분석으로 정량화하고 표적 세포를 사이토포트랙터 염료 (CMTMR)로 염색하였다. 24 시간의 긴 배양에서 용해를 관찰한다.

[0344] 참고문헌

Arai, S., R. Meagher, M. Swearingen, H. Myint, E. Rich, J. Martinson and H. Klingemann (2008). "Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial." *Cytotherapy* **10**(6): 625-632.

Boissel, L., M. Betancur-Boissel, W. Lu, D. S. Krause, R. A. Van Etten, W. S. Wels and H. Klingemann (2013). "Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity." *Oncoimmunology* **2**(10): e26527.

Burnett, A. K. (2012). "Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress?" *Hematology-American Society Hematology Education Program*: 1-6.

Chu, J., Y. Deng, D. M. Benson, S. He, T. Hughes, J. Zhang, Y. Peng, H. Mao, L. Yi, K. Ghoshal, X. He, S. M. Devine, X. Zhang, M. A. Caligiuri, C. C. Hofmeister and J. Yu (2014). "CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma." *Leukemia* **28**(4): 917-927.

Corbin, A. S., A. Agarwal, M. Loriaux, J. Cortes, M. W. Deininger and B. J. Druker (2011). "Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity." *J Clin Invest* **121**(1): 396-409.

Dinndorf, P. A., R. G. Andrews, D. Benjamin, D. Ridgway, L. Wolff and I. D. Bernstein (1986). "Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells." *Blood* **67**(4): 1048-1053.

[0345]

Djokic, M., E. Bjorklund, E. Blennow, J. Mazur, S. Soderhall and A. Porwit (2009). "Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia." *Haematologica* **94**(7): 1016-1019.

Ehninger, A., M. Kramer, C. Rollig, C. Thiede, M. Bornhauser, M. von Bonin, M. Wermke, A. Feldmann, M. Bachmann, G. Ehninger and U. Oelschlagel (2014). "Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia." *Blood Cancer J* **4**: e218.

Firor, A. E., A. Jares and Y. Ma (2015). "From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy." *Exp Biol Med (Maywood)*.

Garfall, A. L., M. V. Maus, W. T. Hwang, S. F. Lacey, Y. D. Mahnke, J. J. Melenhorst, Z. Zheng, D. T. Vogl, A. D. Cohen, B. M. Weiss, K. Dengel, N. D. Kerr, A. Bagg, B. L. Levine, C. H. June and E. A. Stadtmauer (2015). "Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma." *N Engl J Med* **373**(11): 1040-1047.

Ghosh, N. and W. Matsui (2009). "Cancer stem cells in multiple myeloma." *Cancer Lett* **277**(1): 1-7.

Griffin, J. D., D. Linch, K. Sabbath, P. Larcom and S. F. Schlossman (1984). "A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells." *Leuk Res* **8**(4): 521-534.

Jilani, I., E. Estey, Y. Huh, Y. Joe, T. Manshouri, M. Yared, F. Giles, H. Kantarjian, J. Cortes, D. Thomas, M. Keating, E. Freireich and M. Albitar (2002). "Differences in CD33 intensity between various myeloid neoplasms." *Am J Clin Pathol* **118**(4): 560-566.

Jordan, C. T., D. Upehurch, S. J. Szilvassy, M. L. Guzman, D. S. Howard, A. L. Pettigrew, T. Meyerrose, R. Rossi, B. Grimes, D. A. Rizzieri, S. M. Luger and G. L. Phillips (2000). "The

interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells." *Leukemia* **14**(10): 1777-1784.

Klingemann, H. (2014). "Are natural killer cells superior CAR drivers?" *Oncoimmunology* **3**: e28147.

Kumar, S. K., S. V. Rajkumar, A. Dispenzieri, M. Q. Lacy, S. R. Hayman, F. K. Buadi, S. R. Zeldenrust, D. Dingli, S. J. Russell, J. A. Lust, P. R. Greipp, R. A. Kyle and M. A. Gertz (2008). "Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies." *Blood* **111**(5): 2516-2520.

Lang, S., N. L. Vujanovic, B. Wollenberg and T. L. Whiteside (1998). "Absence of B7.1-CD28/CTLA-4-mediated co-stimulation in human NK cells." *Eur J Immunol* **28**(3): 780-786.

Lanitis, E., M. Poussin, A. W. Klattenhoff, D. Song, R. Sandaltzopoulos, C. H. June and D. J. Powell, Jr. (2013). "Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo." *Cancer Immunol Res* **1**(1): 43-53.

Loke, J., J. N. Khan, J. S. Wilson, C. Craddock and K. Wheatley (2015). "Mylotarg has potent anti-leukaemic effect: a systematic review and meta-analysis of anti-CD33 antibody treatment in acute myeloid leukaemia." *Annals of Hematology* **94**(3): 361-373.

Maus, M. V., J. A. Fraietta, B. L. Levine, M. Kalos, Y. Zhao and C. H. June (2014). "Adoptive immunotherapy for cancer or viruses." *Annu Rev Immunol* **32**: 189-225.

Olson, J. A., D. B. Leveson-Gower, S. Gill, J. Baker, A. Beilhack and R. S. Negrin (2010). "NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects." *Blood* **115**(21): 4293-4301.

Ruiz-Arguelles, G. J. and J. F. San Miguel (1994). "Cell surface markers in multiple myeloma." *Mayo Clin Proc* **69**(7): 684-690.

Testa, U., E. Pelosi and A. Frankel (2014). "CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies." *Biomark Res* **2**(1): 4.

Vergez, F., A. S. Green, J. Tamburini, J. E. Sarry, B. Gaillard, P. Cornillet-Lefebvre, M. Pannetier, A. Neyret, N. Chapuis, N. Ifrah, F. Dreyfus, S. Manenti, C. Demur, E. Delabesse, C. Lacombe, P. Mayeux, D. Bouscary, C. Recher and V. Bardet (2011). "High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study." *Haematologica* **96**(12): 1792-1798.

Wilkie, S., M. C. van Schalkwyk, S. Hobbs, D. M. Davies, S. J. van der Stegen, A. C. Pereira, S. E. Burbridge, C. Box, S. A. Eccles and J. Maher (2012). "Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling." *J Clin Immunol* **32**(5): 1059-1070.

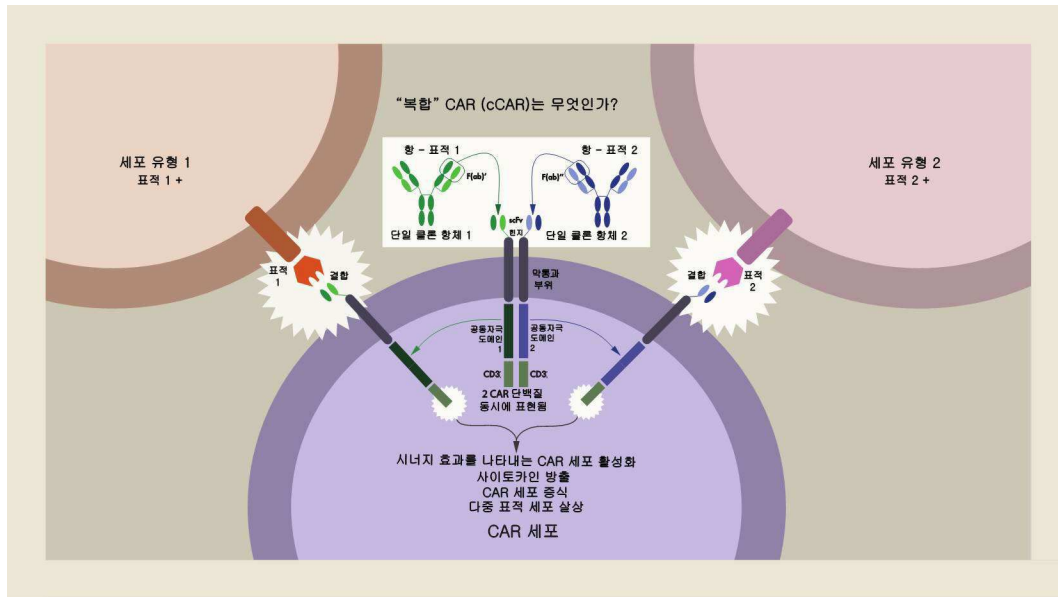
#### [0347] 서열 목록의 포함

[0348] 본 출원을 위한 서열 목록(Sequence Listing)은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 서열 목록(Sequence Listing)은 2016년 6월 24일에 작성된 "sequence\_listing.txt"라는 제목의 컴퓨터 판독 가능한 ASCII 텍스트

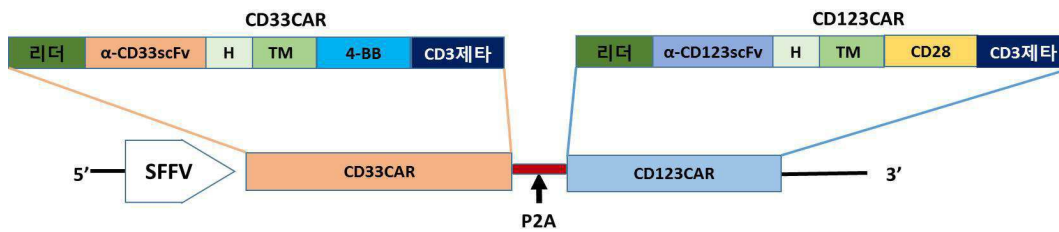
파일에 게시된다. sequence-listing.txt 파일은 크기가 140KB이다.

도면

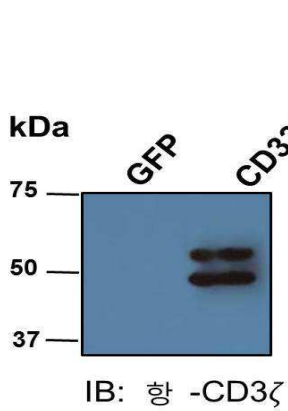
도면1



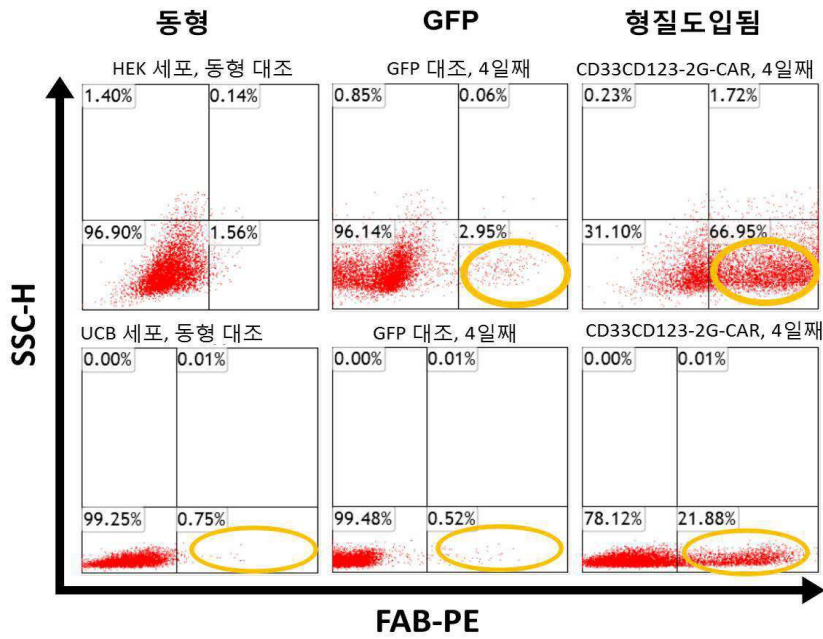
도면2a



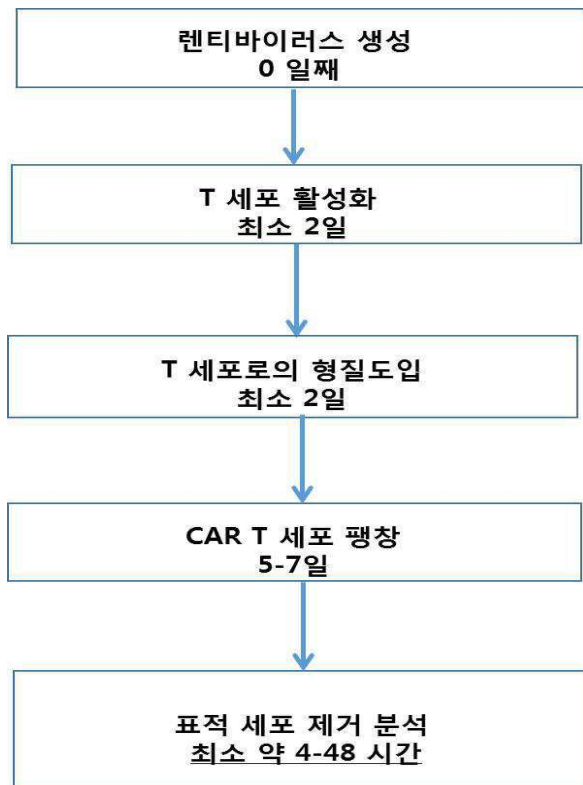
도면2b



도면2c

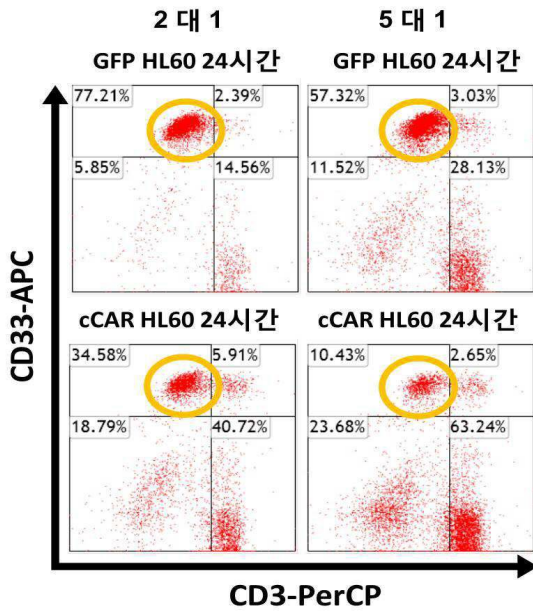


도면3

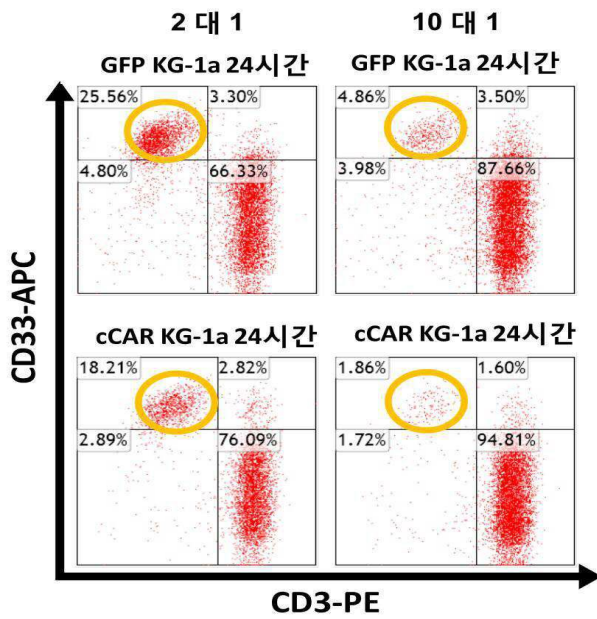




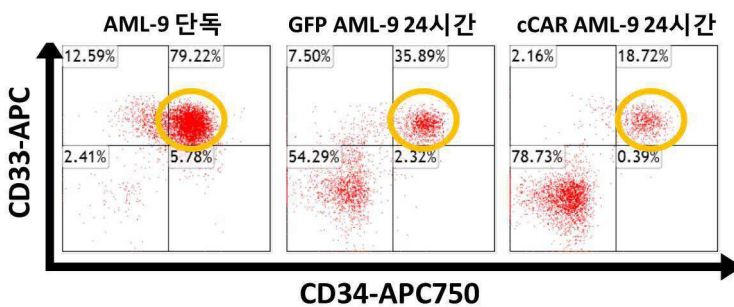
도면4



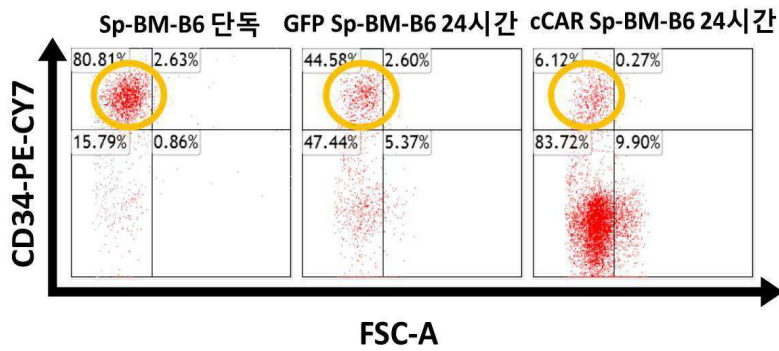
도면5



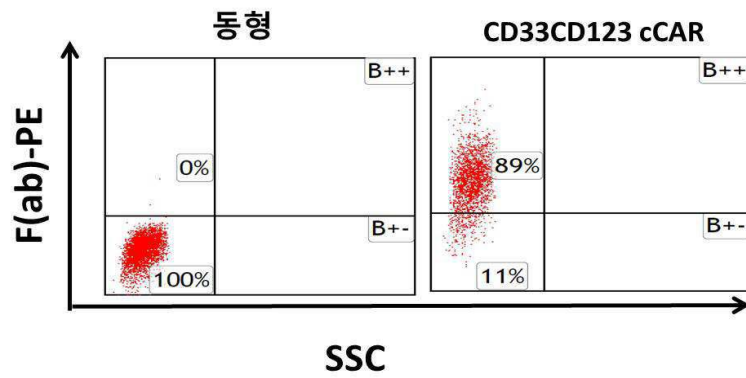
도면6



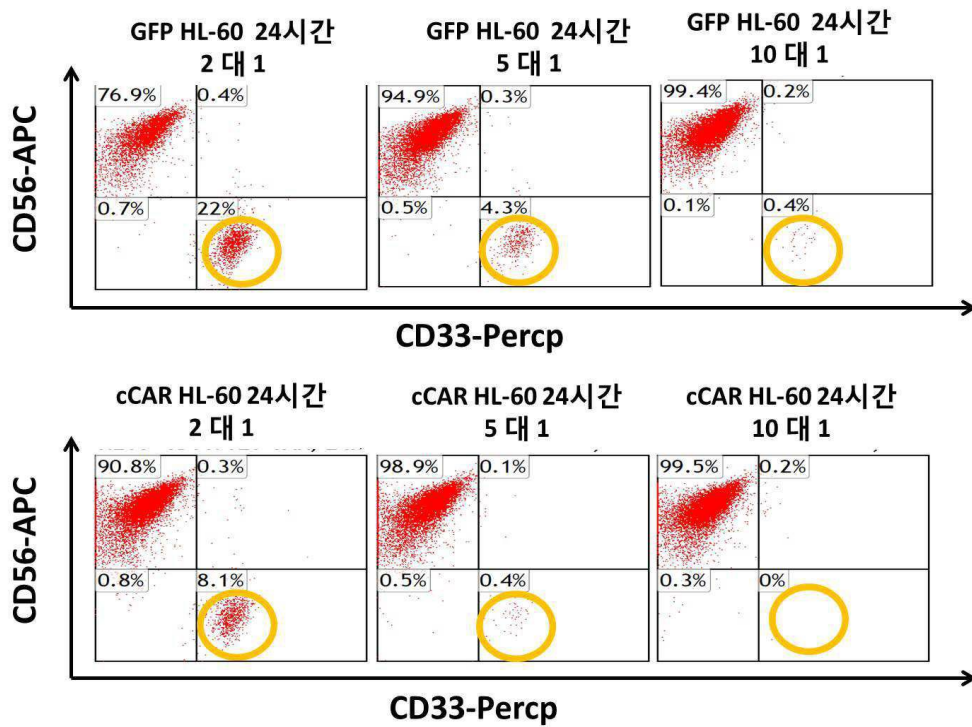
도면7



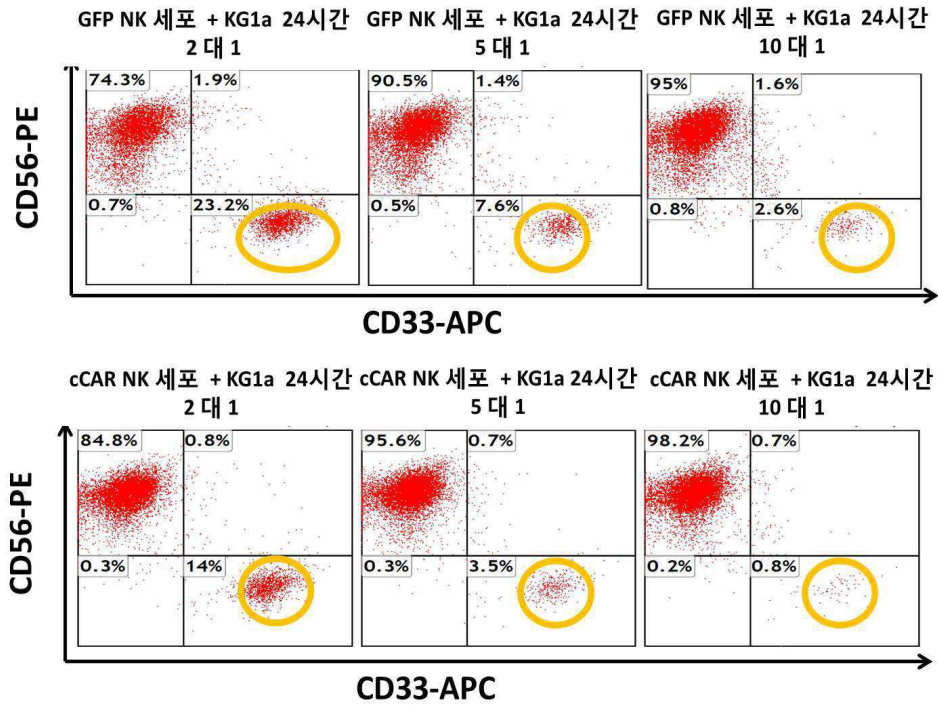
도면8



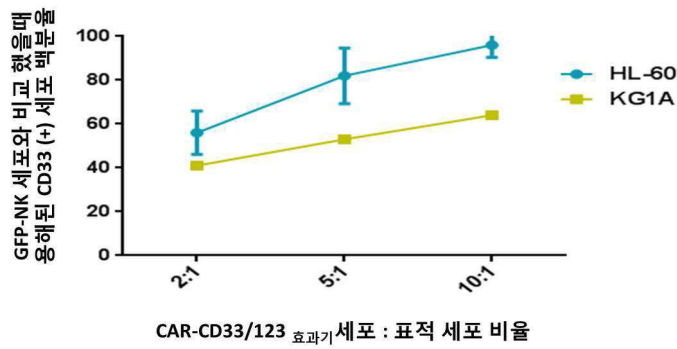
도면9



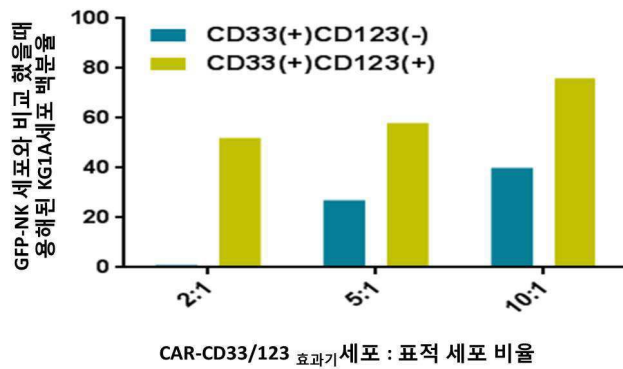
도면10



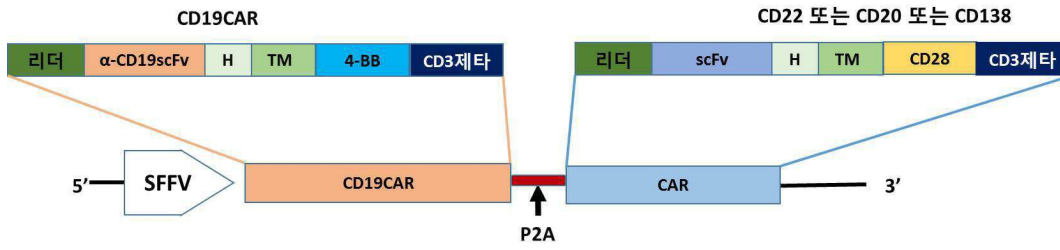
도면11



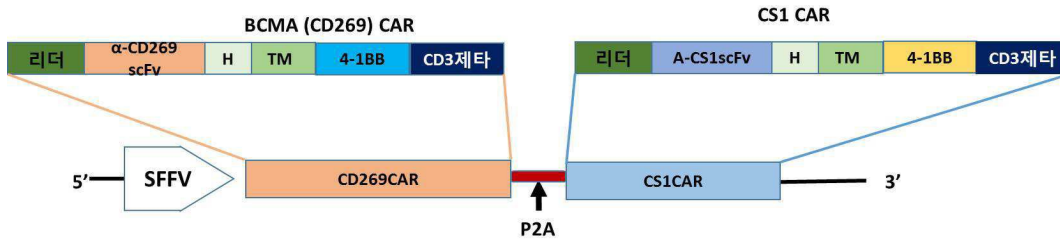
도면12



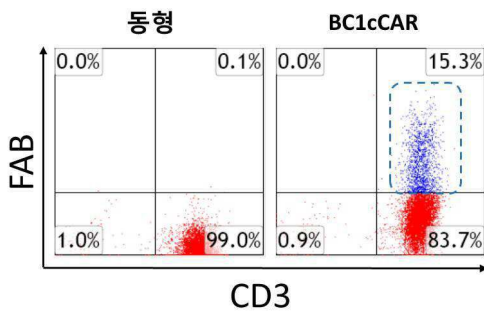
도면13



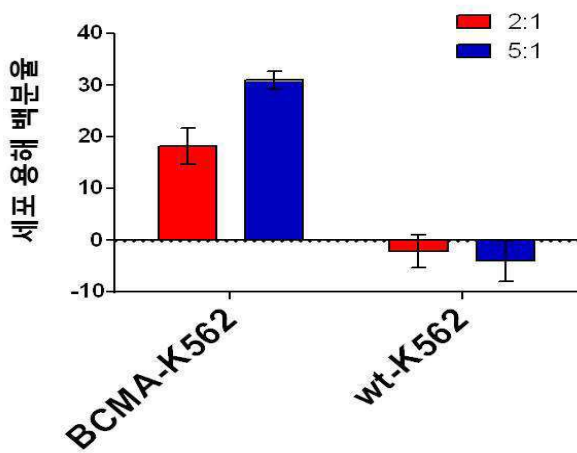
도면14a



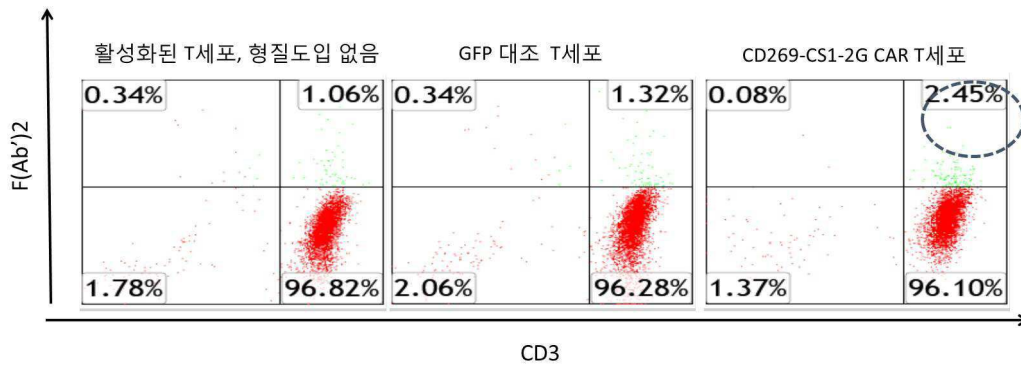
도면14b



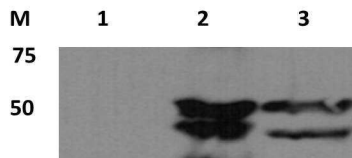
도면14c



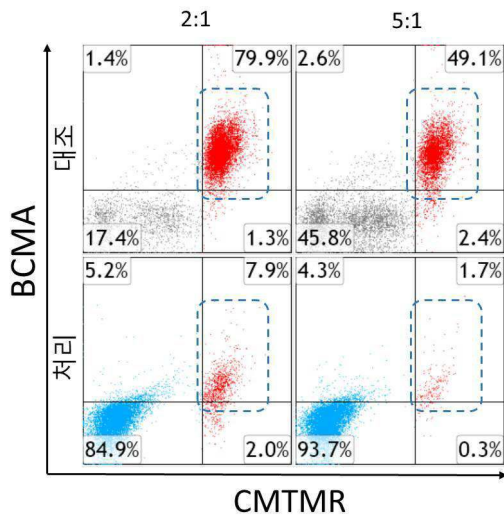
도면14d



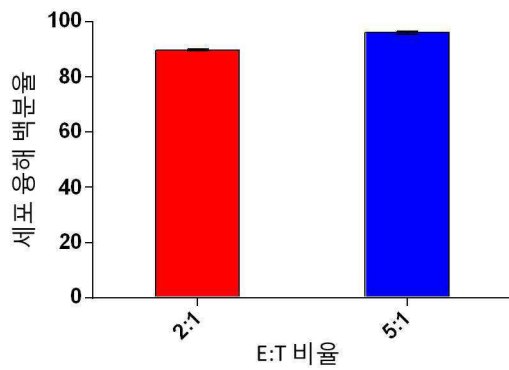
도면14e



도면15a

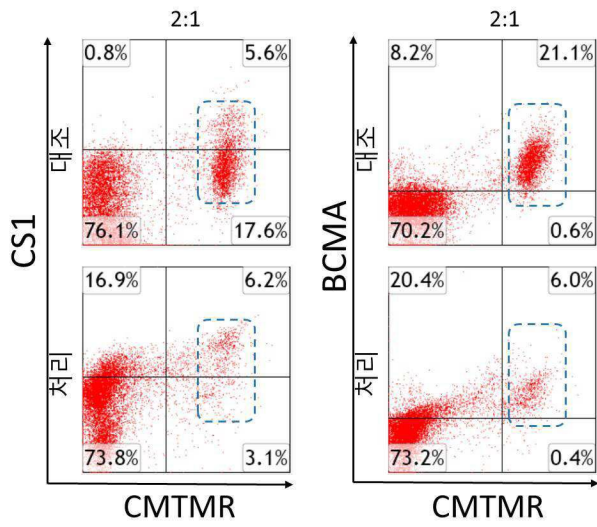


도면15b

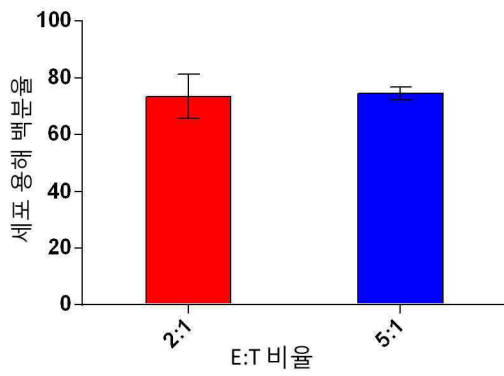




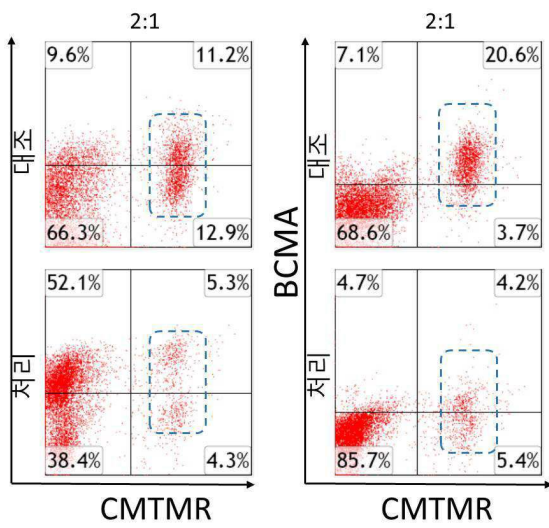
도면16a



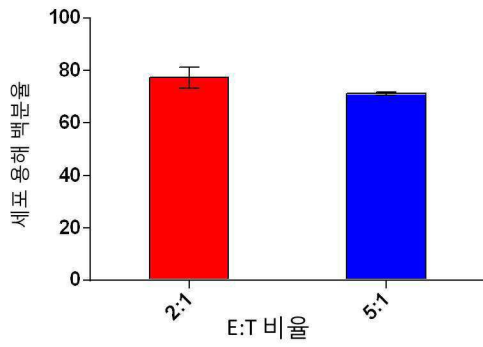
도면16b



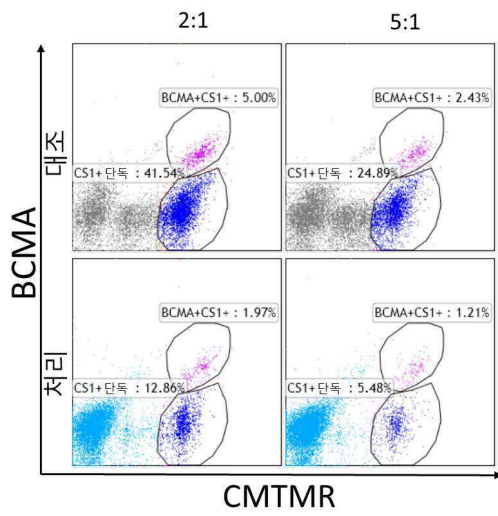
도면17a



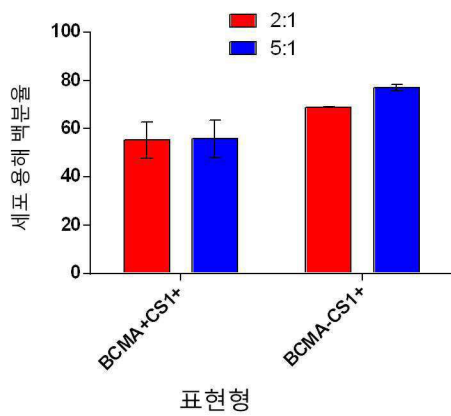
도면17b



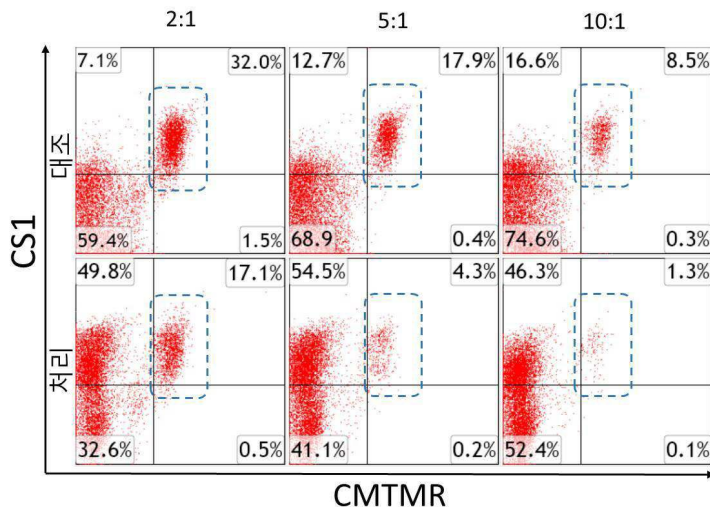
도면18a



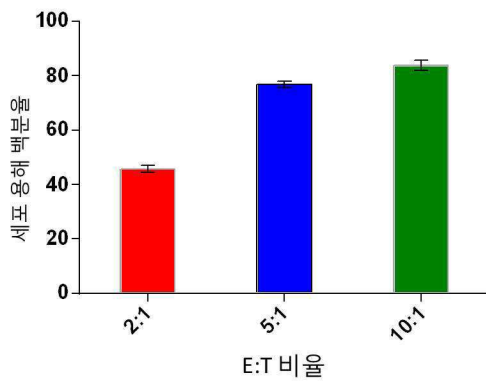
도면18b



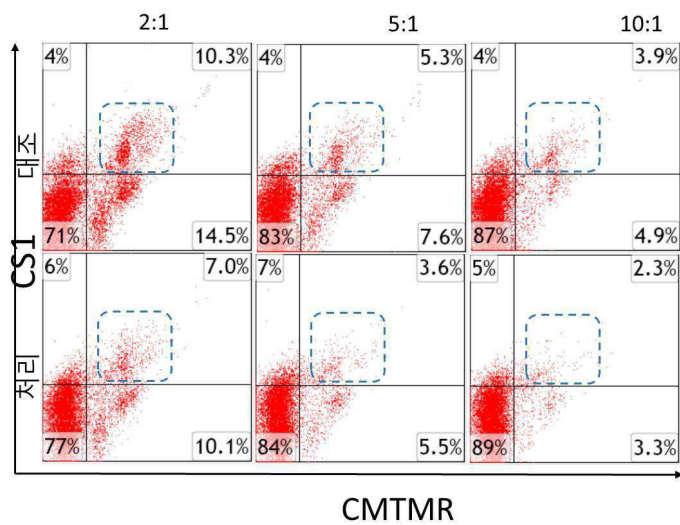
도면19a



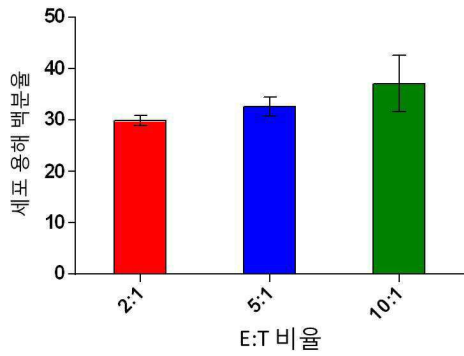
도면19b



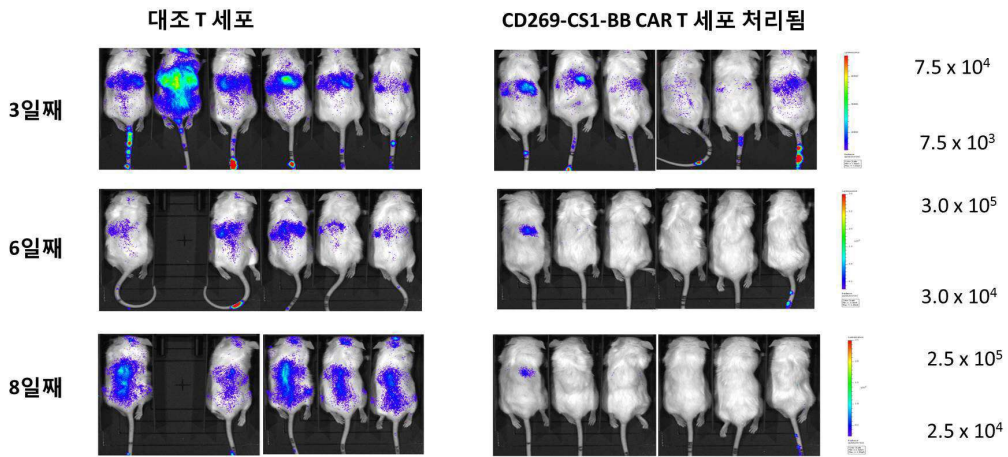
도면20a



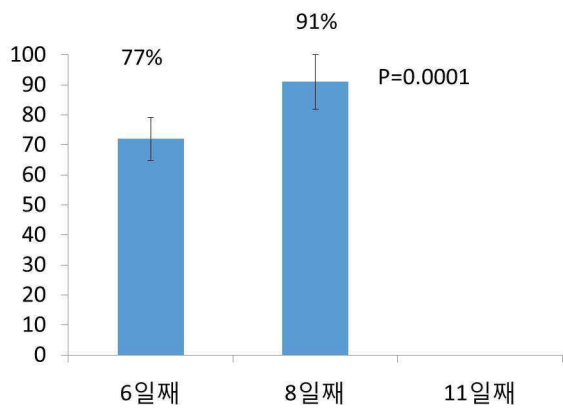
도면20b



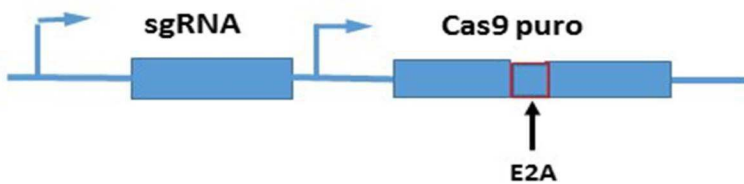
도면21



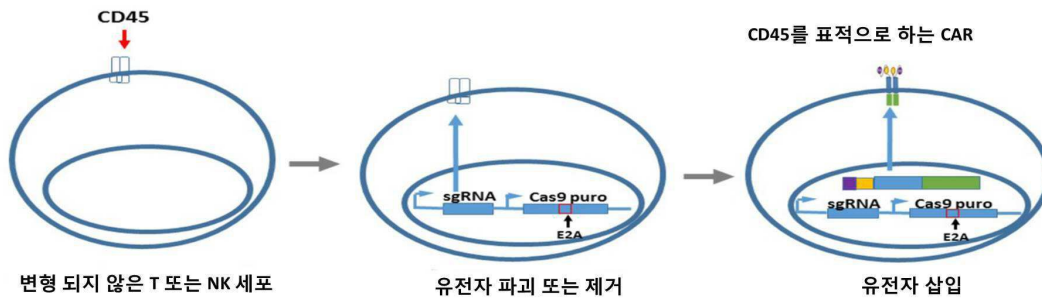
도면22



도면23

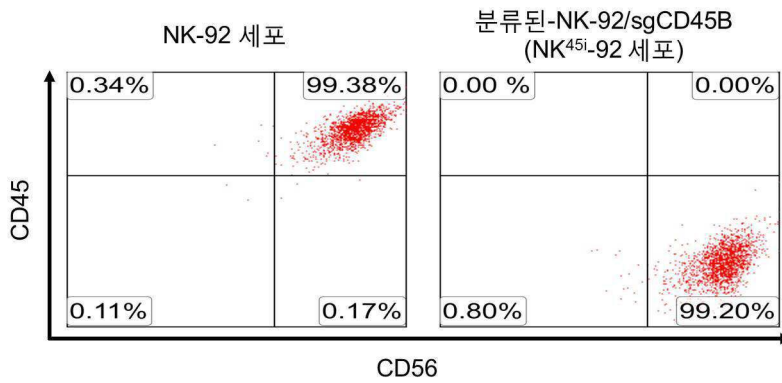


도면24

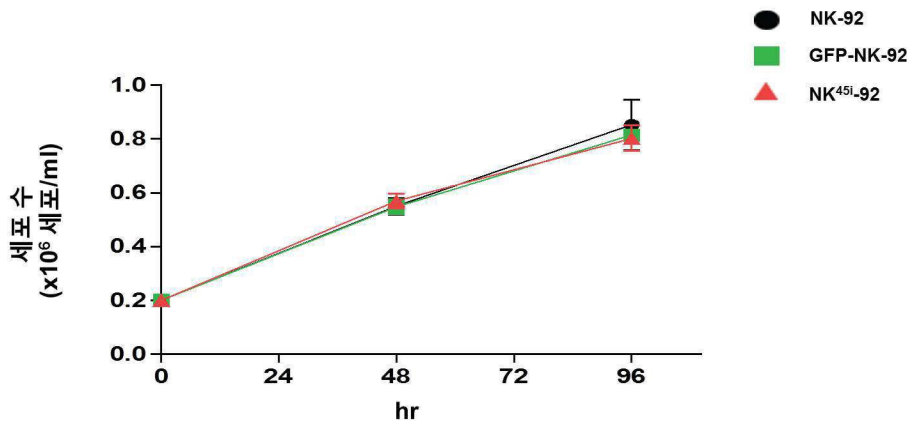


단계: T 또는 NK 세포는 CARs로 무장하여 혈액학적 악성 종양세포를 표적한다.  
 1. 기증자 T 세포 또는 NK 세포  
 2. 유전자 CD45 파괴 또는 제거  
 3. CD45를 표적으로 하는 scFv CAR 삽입

도면25



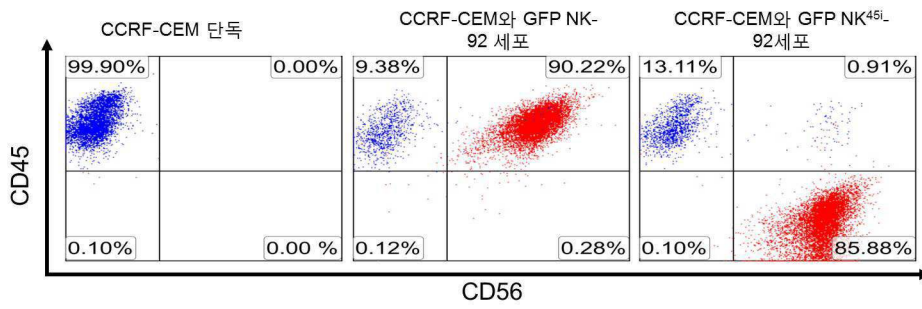
도면26



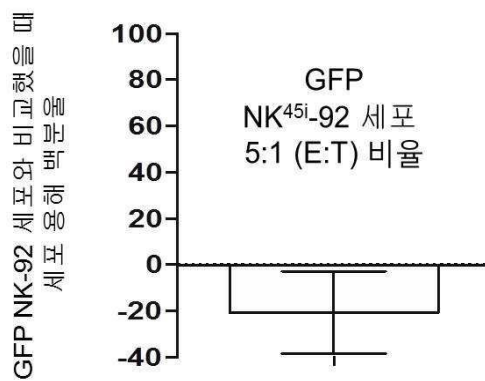
24 웰, 중복, n=3  
 48시간 지점에 IL-2 첨가



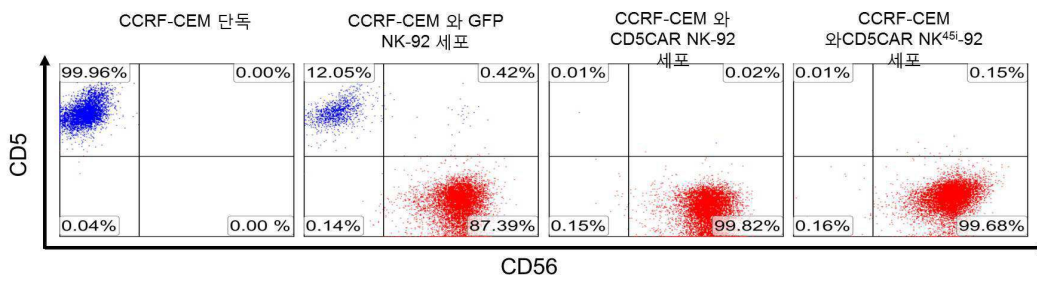
도면27a



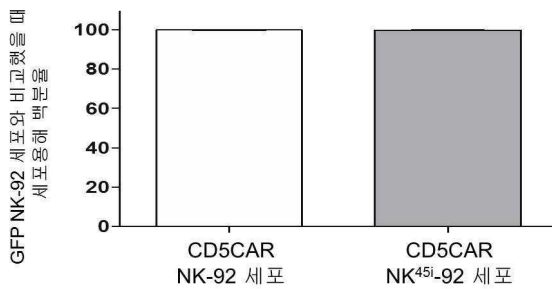
도면27b



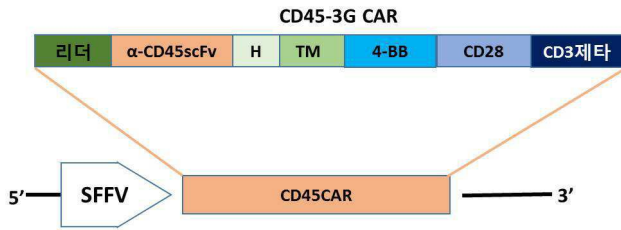
도면28a



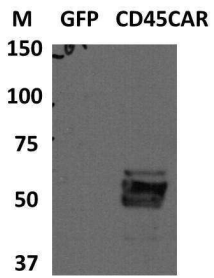
도면28b



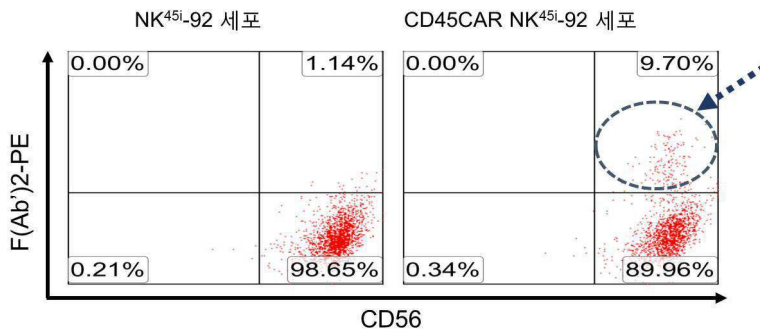
도면29a



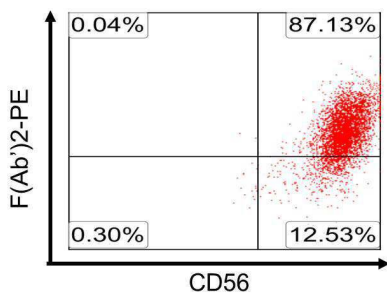
도면29b



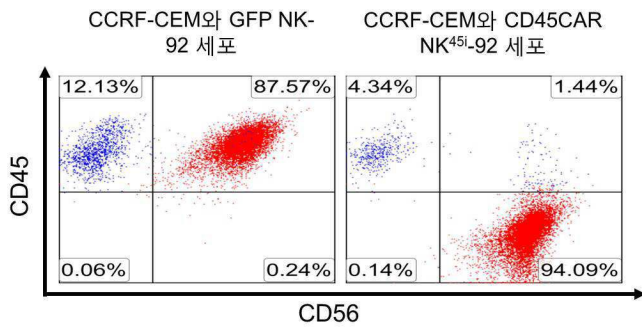
도면30a



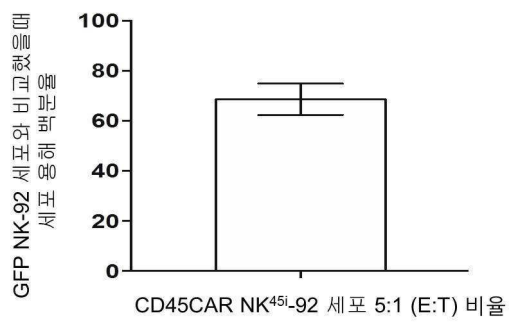
도면30b



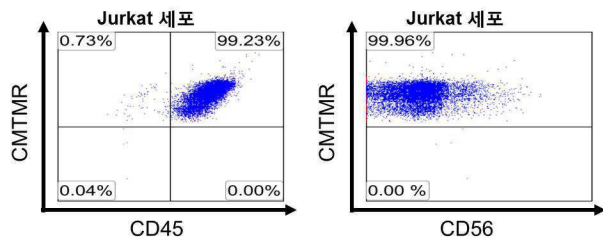
도면31a



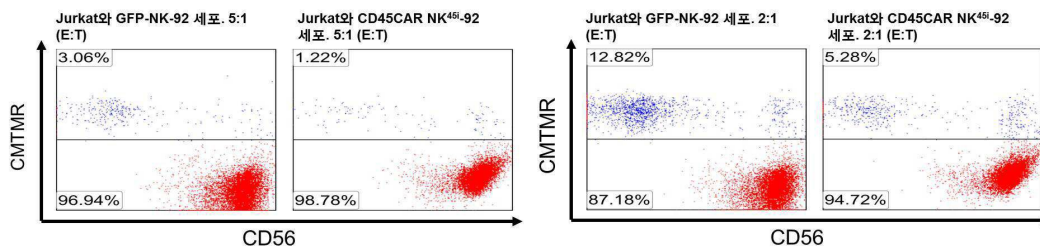
도면31b



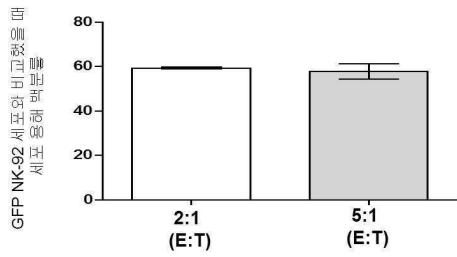
도면32a



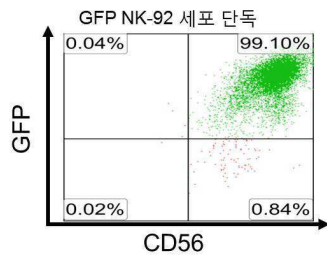
도면32b



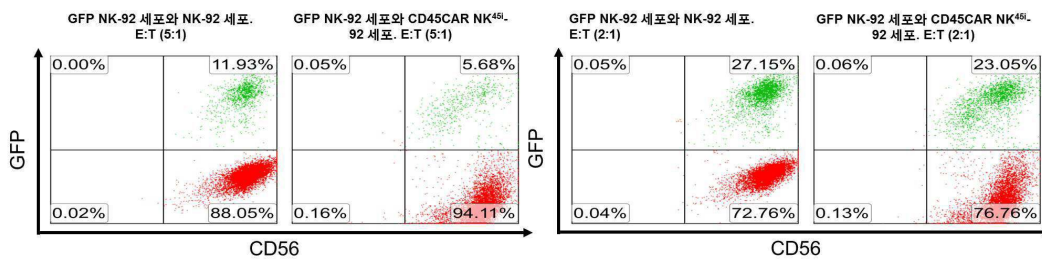
도면32c



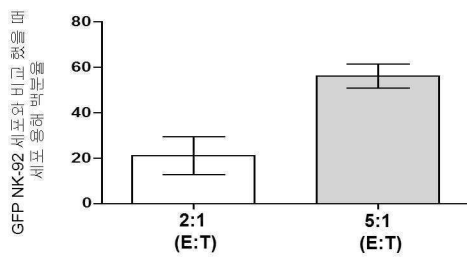
도면33a



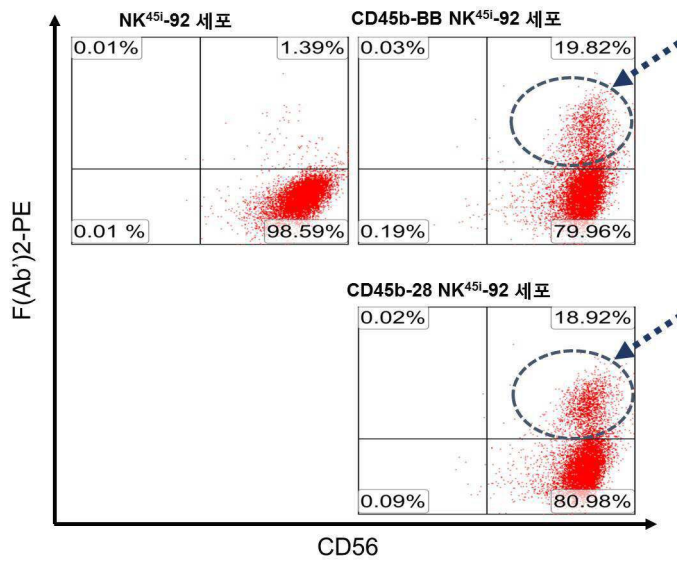
도면33b



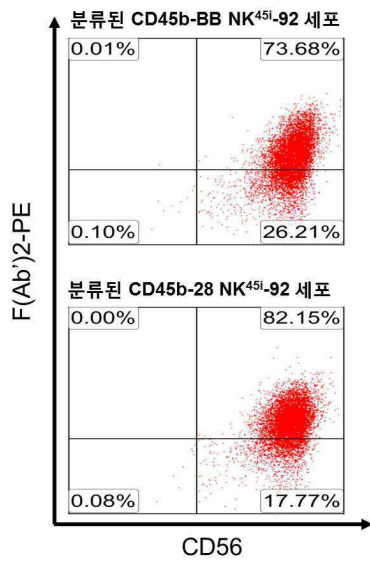
도면33c



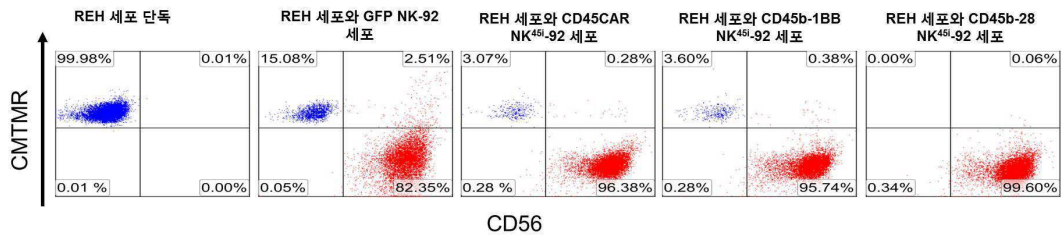
도면33d



도면33e

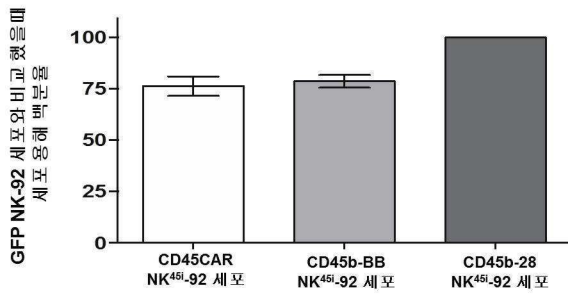


도면33f

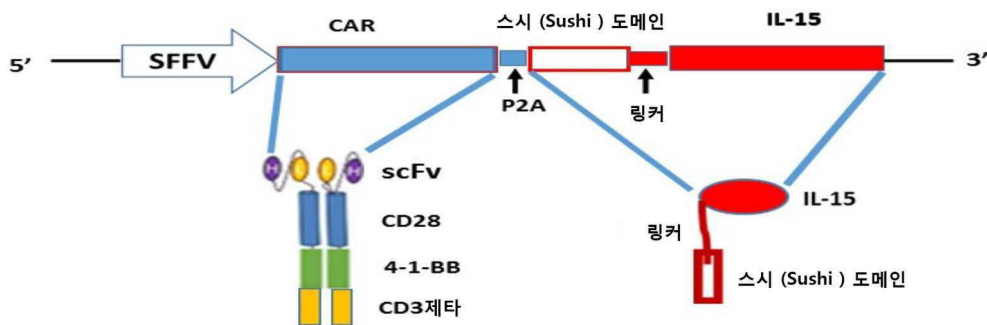




도면33g



도면34a

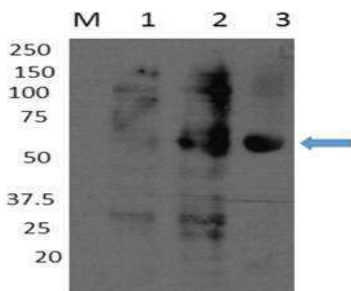


도면34b

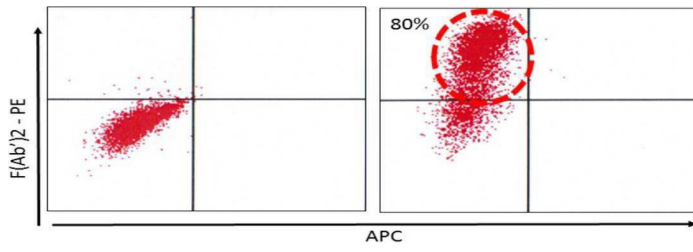


도면35a

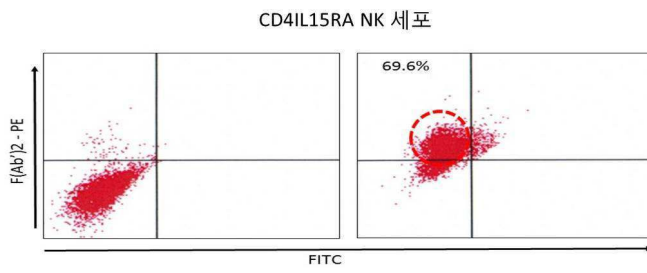
HEK CD4IL15RA



도면35b

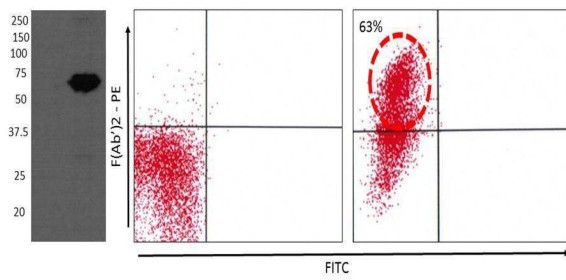


도면36

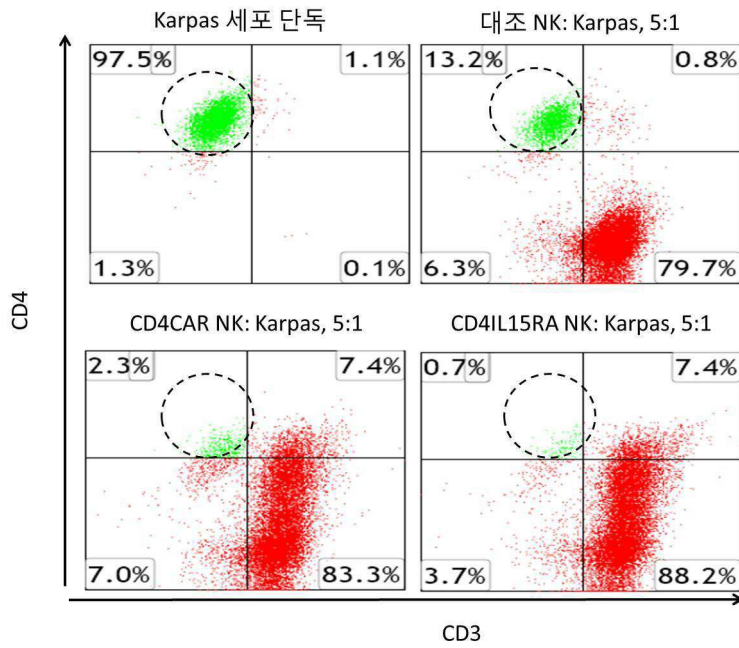


도면37

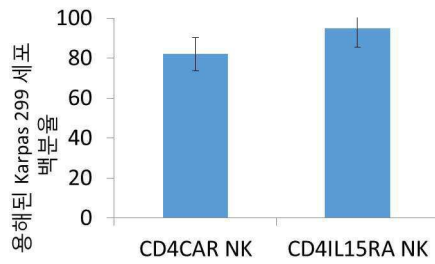
CD4IL15RA T 세포



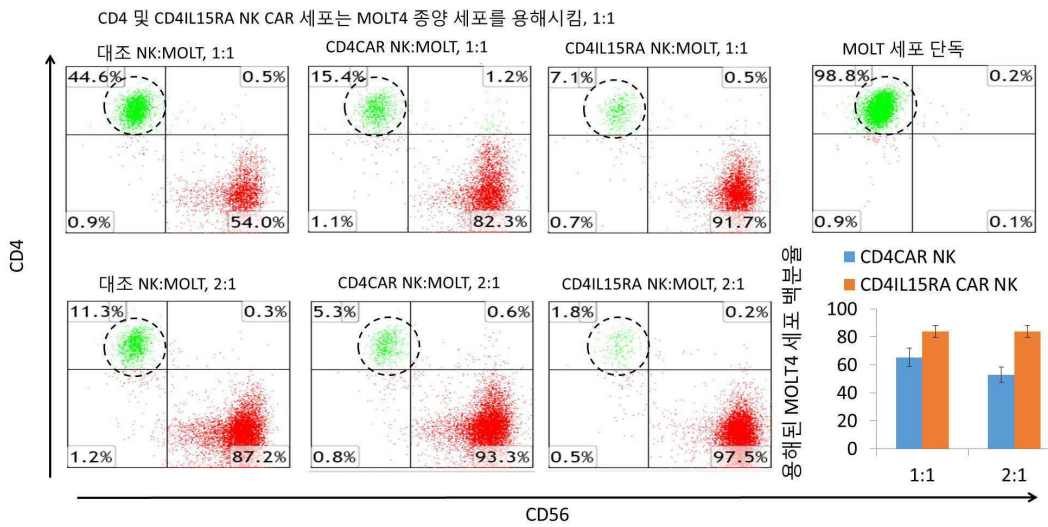
도면38a



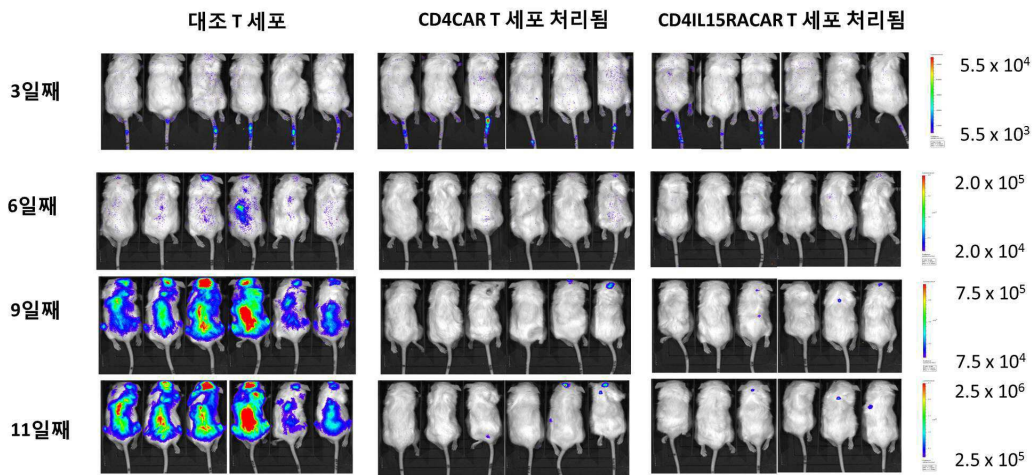
도면38b



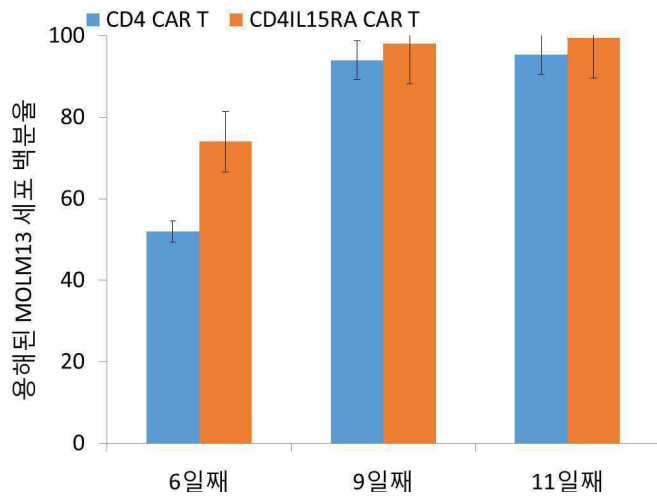
도면39



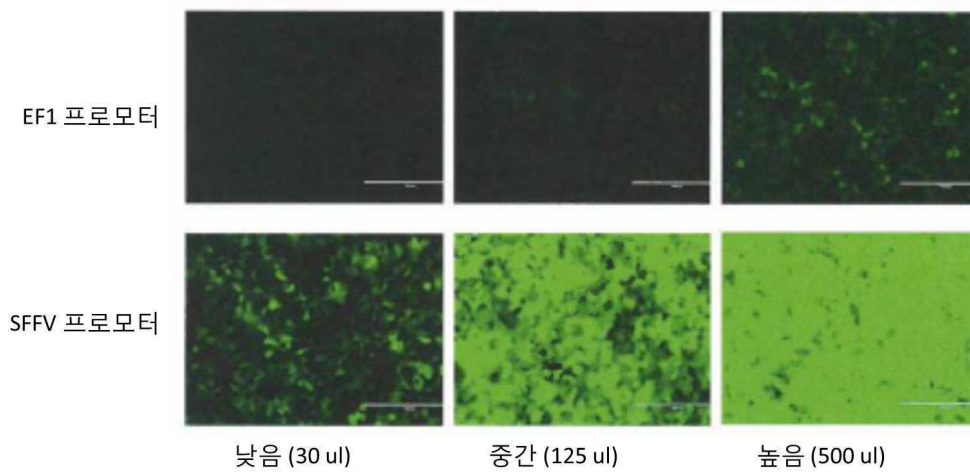
도면40



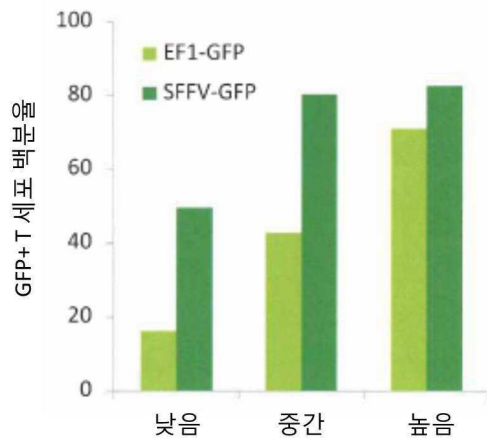
도면41



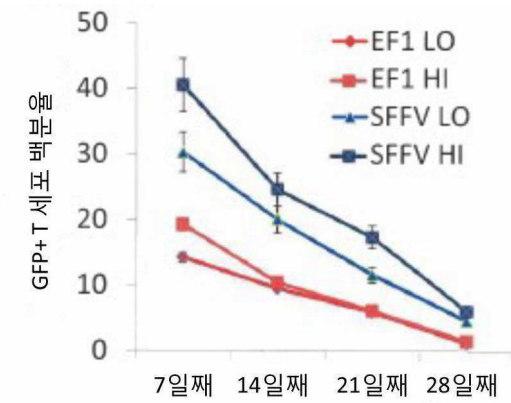
도면42



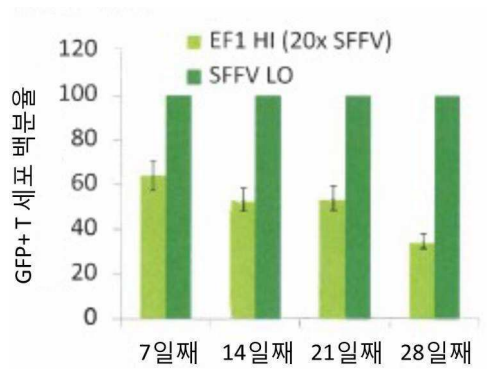
도면43



도면44a

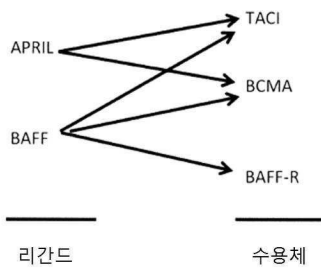


도면44b





도면45



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> iCell Gene Therapeutics LLC

<120> Chimeric Antigen Receptors (CARs), Compositions and  
Methods of Use

<130> 2541-3 PCT

<140> 0000000

<141> 2016-06-24

<150> 62/184,321

<151> 2015-06-25

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 830

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 1

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln

35                    40                    45

Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln

50                    55                    60





Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn  
 565 570 575

Ser Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro  
 580 585 590

Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile  
 595 600 605

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu  
 610 615 620

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu  
 625 630 635 640

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His  
 645 650 655

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser  
 660 665 670

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu  
 675 680 685

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln  
 690 695 700

Met Phe Ile Asn Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 705 710 715 720

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln  
 725 730 735

Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala Leu  
 740 745 750

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr Cys  
 755 760 765

Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr  
 770 775 780

Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg  
 785 790 795 800

Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr

	805	810	815	
	Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg			
	820	825	830	
<210>	2			
<211>	2509			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	synthetic sequence			
<400>	2			
	gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg			60
	ccgccaggcc ggacatcgtg atgacccaaa gccccgacag cctggccgtg agcctgggcg			120
	agagggtgac catgaactgc aaaagcagcc agtccctgct gtactccacc aaccagaaga			180
	actacctggc ttggtatcaa cagaagcccg gacagagccc caagctgctg atctattggg			240
	ccagcactag ggaaagcggc gtgcccgata ggttcagcgg cagcgggagc ggcacagact			300
	tcactctgac cattagcagc gtgcaggctg aggatgtggc cgtctactac tgccagcagt			360
	actacagcta caggaccttt gggggcggaa ctaagctgga gatcaaggga ggggggggat			420
	ccgggggagg aggctccggc ggaggcggaa gccaagtga actgcagcag agcggcccag			480
	aggtgtgcaa acctggggca agcgtgaaga tgagctgcaa ggctagcggc tataccttca			540
	ccagctatgt gatccactgg gtgaggcaga aaccaggaca gggcctggac tggatcggct			600
	acatcaacce ctacaatgac ggcaccgatt atgacgaaaa attcaagggg aaggccacce			660
	tgaccagcga caccagcaca agcaccgcct acatggagct gtccagcctg aggtccgagg			720
	acaccgccgt gtattactgt gccagggaga aggacaatta cgccaccggc gcttggttcg			780
	cctactgggg ccagggcaca ctggtgacag tgagcagcac cacgaccca gcgcccgac			840
	caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agccccctgc cctgcgcca gaggcgtgcc			900
	ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt gatatctaca			960
	tctgggcgcc ctiggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt atcaccttt			1020
	actgcaggag taagaggagc aggtcctgc acagtgacta catgaacatg actccccgcc			1080
	gccccgggc caccgcaag cattaccagc cctatgcccc accacgagc ttcgcagcct			1140
	atcgctcaa acggggcaga aagaactcc tgtatatatt caaacaacca ttatgagac			1200
	cagtacaac tactcaagag gaagatggct gtagctgccg atttcagaa gaagaagaag			1260
	gaggatgtga actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgccccgcg taccagcagg			1320



gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg 1380  
 acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc 1440  
 aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg 1500  
 ggatgaaagg cgagcgcggg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta 1560  
 cagccaccaa ggacacctac gacgccttc acatgcaggc cctgccccct cgcggaagcg 1620  
 gagccaccaa cttcagcctg ctgaagcagg ccggcgacgt ggaggagaac cccggcccca 1680  
 tgtacagaat gcagctgctg agctgcatcg cctgagcct ggccctggtg accaacagcg 1740

gcatccacgt gttcatcctg ggctgcttca gcgccggcct gccaagacc gaggccaact 1800  
 gggatgaact gatcagcgac ctgaagaaga tcgaggacct gatccagagc atgcacatcg 1860  
 acgccacct gtacaccgag agcgacgtgc accccagctg caagtgacc gccatgaagt 1920  
 gcttcctgct ggagctgagc gtgatcagcc tggagagcgg cgacgccagc atccacgaca 1980  
 ccgtggagaa cctgatcctc ctggccaaca acagcctgag cagcaacggc aacgtgaccg 2040  
 agagcggctg caaggagtgc gaggagctgg aggagaagaa catcaaggag ttctgcaga 2100  
 gcttcgtgca catcgtgagc atgttcatca acaccagctc cggcggcggc tccggcggcg 2160

gcggctccgg cggcggcggc tccggcggcg gcggctccgg cggcggtcc ctgcaggccc 2220  
 ccagaagagc cagaggctgc agaaccctgg gcctgcccgc cctgctgctg ctgctgctgc 2280  
 tgagaccccc cgccaccaga ggcatcacct gcccccccc catgagcgtg gagcacgceg 2340  
 acatctgggt gaagagctac agcctgtaca gcagagagag atacatctgc aacagcggct 2400  
 tcaagagaaa ggccggcacc agcagcctga ccgagtgcgt gctgaacaag gccaccaacg 2460  
 tgcccactg gaccaccccc agcctgaagt gcatcagata agtttaaac 2509

<210> 3

<211> 995

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 3

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

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
 50 55 60  
  
 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95  
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110  
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
 115 120 125  
  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 130 135 140  
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 165 170 175  
 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
 180 185 190  
  
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
 195 200 205  
 Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
 210 215 220  
 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 225 230 235 240  
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 245 250 255  
  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
 260 265 270  
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
 275 280 285  
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

290                      295                      300  
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
 305                      310                      315                      320  
  
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg  
                                  325                      330                      335  
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln  
                                  340                      345                      350  
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu  
                                  355                      360                      365  
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
                                  370                      375                      380  
  
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
                                  405                      410                      415  
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly  
                                  420                      425                      430  
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu  
                                  435                      440                      445  
  
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
                                  450                      455                      460  
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
 465                      470                      475                      480  
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu  
                                  485                      490                      495  
 Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu  
                                  500                      505                      510  
  
 Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala  
                                  515                      520                      525  
 Arg Pro Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser  
                                  530                      535                      540







<400> 4

gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60  
 ccgccaggcc ggacatccag atgacacaga ctacatcctc cctgtctgcc tctctgggag 120  
  
 acagagtcac catcagttgc agggcaagtc aggacattag taaatattta aattggtatc 180  
 agcagaaacc agatggaact gttaaactcc tgatctacca tacatcaaga ttacactcag 240  
 gagtcccatc aaggttcagt ggcagtgggt ctggaacaga ttattctctc accattagca 300  
 acctggagca agaagatatt gccacttact ttgccaaca gggtaatagc cttccgtaca 360  
 cgttcggagg ggggaccaag ctggagatca caggtggcgg tggctcgggc ggtggtgggt 420  
 cgggtggcgg cggatctgag gtgaaactgc aggagttagg acctggcctg gtggcgcctt 480  
 cacagagcct gtccgtcaca tgactgtct caggggtctc attacccgac tatggtgtaa 540  
  
 gctggattcg ccagcctcca cgaaagggtc tggagtggct gggagtaata tgggtagtg 600  
 aaaccacata ctataattca gctctcaaat ccagactgac catcatcaag gacaactcca 660  
 agagccaagt tttcttaaaa atgaacagtc tgcaaaactga tgacacagcc atttactact 720  
 tgccaaaca ttattactac ggtgtagct atgctatgga ctactggggc caaggaacct 780  
 cagtcaccgt ctctcaacc acgacgccag cgcgcgacc accaacaccg gcgccacca 840  
 tcgctgcga gccctgtcc ctgcgccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag 900  
 tgcacacgag ggggctggac ttcgectgtg atatctacat ctgggcgccc ttggccggga 960  
  
 cttgtggggt ctttctctg tcaactggtta tcaccttta ctgcaaacgg ggcagaaaga 1020  
 aactcctgta tatattcaa caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag 1080  
 atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt 1140  
 tcagcaggag cgcagacgcc cccgctacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc 1200  
 tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc cgggacctg 1260  
 agatgggggg aaagccgag agaaggaaga acctcagga aggcctgtac aatgaactgc 1320  
 agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg 1380  
  
 gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg 1440  
 cccttcacat gcaggccctg cccctcgcg gaagcggagc caccaacttc agcctgctga 1500  
 agcaggccgg cgactggag gagaaccccg gcccattggc cttaccagt accgcttgc 1560  
 tcttccgct ggcttctctg ctccacgcc ccaggccgca gatcgtgctg agccagagcc 1620  
 ctgccatcct gtccgcaagc ccaggcgaga aggtgacat gacctgtagg gccagcagct 1680  
 ccgtgagcta catccaactg tttcagcaga agcctggaag cagccctaag ccttggatct 1740

acgccacaag caatctggct agcggcgtgc ccgtgaggtt cagcggcagc gggagcggga 1800

ccagctacag cctgactatc agcaggggtg aggccgagga cgccgccaca tactactgcc 1860

aacagtggac ctccaacca cccacctttg gaggagggac aaaactggag atcaaagggg 1920

gcbgaggggtc cggagggcggc ggaagcgggg gagggggaag ccaggtccaa ctgcaacagc 1980

ccggagcaga actgggtcaaa ccagcgcgca gctgaagat gagctgcaag gccagcgggt 2040

acaccttcac ttctataac atgcaactggg tgaagcagac cccaggaagg ggcctggagt 2100

ggatcggggc aatctatccc ggcaacggcg acacaagcta caaccagaag ttcaagggga 2160

aagccactct gaccgccgac aagtcagct ccaccgcta catgcagctg agtcctctga 2220

ccagcagga cagcggcgtg tactattgcg ccagaagcac ttattacga ggggactggt 2280

acttcaacgt gtggggggca gggaccaccg tgaccgtgc cgccaccagc acgccagcgc 2340

cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgagcc cctgtccctg cgcccagagg 2400

cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gccttgata 2460

tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt gtgggtcct tctcctgtca ctggttatca 2520

ccctttactg caggagtaag aggagcagc tctgcacag tgaactacatg aacatgactc 2580

cccgcgccc cgggcccacc cgcaagcatt accagccta tgccccacca cgcgacttcg 2640

cagcctatcg ctccagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg taccagcagg 2700

gccagaacca gctctataac gagtcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttg 2760

acaagagacg tgccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gcagagaagg aagaacctc 2820

aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg 2880

ggatgaaagg cgagcggcgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta 2940

cagccaccaa ggacacctac gacgccttc acatgcagc cctgccccct cgtaagttt 3000

aaac 3004

<210> 5

<211> 1001

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 5

Asp Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15

Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser

20 25 30  
 Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala  
 35 40 45  
 Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp  
 50 55 60  
 Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu  
 85 90 95  
 Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln  
 100 105 110  
 Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125  
 Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp  
 165 170 175  
 Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu  
 195 200 205  
 Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe  
 210 215 220  
 Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 225 230 235 240  
 Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 245 250 255  
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
 260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
 275 280 285  
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 290 295 300  
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr  
 305 310 315 320  
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg  
 325 330 335  
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro  
 340 345 350  
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu  
 355 360 365  
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
 370 375 380  
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
 385 390 395 400  
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
 405 410 415  
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu  
 420 425 430  
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser  
 435 440 445  
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly  
 450 455 460  
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu  
 465 470 475 480  
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser  
 485 490 495  
 Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala  
 500 505 510  
 Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala





Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro  
 770 775 780

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu  
 785 790 795 800

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg  
 805 810 815

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly  
 820 825 830

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys  
 835 840 845

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg  
 850 855 860

Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro  
 865 870 875 880

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser  
 885 890 895

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu  
 900 905 910

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg  
 915 920 925

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln  
 930 935 940

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr  
 945 950 955 960

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp  
 965 970 975

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala  
 980 985 990

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 995 1000

<210> 6

<211> 3016

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400

> 6

```

gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgct tgcctctgcc gctggccttg ctgctccacg      60
ccgccaggcc ggacatccag atgacacaga ctacatctc cctgtctgcc tetctgggag      120
acagagtcac catcagttgc agggcaagtc aggacattag taaatattta aattggtatc      180
agcagaaacc agatggaact gttaaactcc tgatctacca tacatcaaga ttacactcag      240
gagtcccatc aaggttcagt ggcagtgggt ctggaacaga ttattctctc accattagca      300
acctggagca agaagatatt gccacttact ttgccaaca gggtaatagc cttccgtaca      360
cgttcggagg ggggaccaag ctggagatca caggtggcgg tggctcgggc ggtggtgggt      420

cgggtggcgg cggatctgag gtgaaactgc aggagttag accctggcctg gtggcgcct      480
cacagagcct gtccgtcaca tgcactgtct caggggtctc attacccgac tatggtgtaa      540
gctggattcg ccagcctcca cgaaagggtc tggagtggct gggagtaata tggggtagtg      600
aaaccacata ctataattca gctctcaaat ccagactgac catcatcaag gacaactcca      660
agagccaagt tttcttaaaa atgaacagtc tgcaaaactga tgacacagcc atttactact      720
gtgccaacaa ttattactac ggtggttagct atgctatgga ctactggggc caaggaacct      780
cagtcaccgt ctctcaacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgccacca      840

tcgctgcga gccctgtcc ctgcgccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgag      900
tgacacagag ggggctggac ttgcctgtg atatctacat ctgggcgccc ttggccggga      960
cttgtggggt cttctctctg tcaactggtta tcaccttta ctgcaaacgg ggcagaaaga      1020
aactcctgta tatattcaa caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag      1080
atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt      1140
tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggccca gaaccagctc tataacgagc      1200
tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc cgggaccctg      1260

agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga      1320
aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca      1380
aggggcacga tggcctttac caggttctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc      1440
ttcacatgca ggcctgtccc cctcgcggaa gcggagccac caacttcagc ctgctgaagc      1500
aggccggcga cgtggaggag aaccccggcc ccatggcctt accagtgacc gccttgctec      1560
tgccgctggc cttgctgctc cagcgcgcca ggccggatat ccagatgacc cagagcccca      1620

```

gctccctgtc cgcatccgtg ggcgacagag tgacaattac ctgtagaagc agccaaagca 1680

tcgtgcatag cgtcggcaac acttttctgg agtggatatca acagaagccc gggaaggccc 1740

ccaaactgct gatctacaag gtgagcaaca gattcagcgg ggtcccaagc agattctcgg 1800

gcagcggctc cgggactgac ttcacacctga ccattagcag cctgcagcca gaggacttcg 1860

ccacatacta ctgcttccaa gggagccagt tccctacac cttcggccaa ggcactaagg 1920

tggagatcaa agggggggga ggaagcggcg gaggaggag cggagcggg ggatccgaag 1980

tgcaactggt cgaatccgga ggggggctgg tccagcctgg agggtcctg agactgagct 2040

gcgccgaag cggctacgag ttctccaggt cctggatgaa ctgggtgagg caggccccag 2100

gaaaaggct ggaatgggtg ggcaggatct accctggcga cggcgatacc aactactccg 2160

gaaagttaa ggcaggttc actatcagcg cggacactag caagaatacc gcctacctgc 2220

agatgaatag cctgagggcc gaggacaccg ccgtgtatta ctgctgtaga gacggcagca 2280

gctgggattg gtacttcgac gtgtggggcc agggcactct ggtgactgtg agcagcacca 2340

cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cggccaccat cgcgtcgag ccctgtccc 2400

tgcgccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact 2460

tcgcctgtga tatctacatc tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc cttctcctgt 2520

cactggttat caccctttac tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac 2580

aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc 2640

cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgcc 2700

ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg 2760

agtacgatgt ttiggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa 2820

ggaagaacce tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct 2880

acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc 2940

agggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcct tcacatgcag gcctgcccc 3000

ctcgctaagt ttaaac 3016

<210> 7

<211> 990

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 7

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

1                    5                    10                    15  
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
                          20                    25                    30  
  
 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
                          35                    40                    45  
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
                          50                    55                    60  
 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
                          85                    90                    95  
  
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
                          100                    105                    110  
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
                          115                    120                    125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
                          130                    135                    140  
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
 145                    150                    155                    160  
  
 Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
                          165                    170                    175  
 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
                          180                    185                    190  
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
                          195                    200                    205  
 Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
                          210                    215                    220  
  
 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 225                    230                    235                    240  
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                          245                    250                    255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
 260 265 270  
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
 275 280 285  
  
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
 290 295 300  
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
 305 310 315 320  
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg  
 325 330 335  
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln  
 340 345 350  
  
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu  
 355 360 365  
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
 370 375 380  
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
 405 410 415  
  
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly  
 420 425 430  
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu  
 435 440 445  
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
 450 455 460  
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
 465 470 475 480  
  
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu  
 485 490 495  
 Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu





Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Thr  
 755 760 765

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser  
 770 775 780

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly  
 785 790 795 800

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp  
 805 810 815

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile  
 820 825 830

Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr  
 835 840 845

Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln  
 850 855 860

Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys  
 865 870 875 880

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln  
 885 890 895

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu  
 900 905 910

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg  
 915 920 925

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys  
 930 935 940

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg  
 945 950 955 960

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys  
 965 970 975

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 980 985 990

<211> 2989

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 8

```

gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgct tgcctctgcc gctggccttg ctgctccacg      60
ccgccaggcc ggacatccag atgacacaga ctacatcttc cctgtctgcc tctctgggag      120
acagagtcac catcagttgc agggcaagtc aggacattag taaatattta aattggtatc      180
agcagaaacc agatggaact gttaaactcc tgatctacca tacatcaaga ttacactcag      240
gagtcccatc aaggttcagt ggacagtggg ctggaacaga ttattctctc accattagca      300
acctggagca agaagatatt gccacttact ttgccaaca gggaataacg cttccgtaca      360

cgttcggagg ggggaccaag ctggagatca cagggtggcgg tggctcgggc ggtggtgggt      420
cgggtggcgg cggatctgag gtgaaactgc aggagtcagg acctggcctg gtggcgcctt      480
cacagagcct gtccgtcaca tgcactgtct caggggtctc attaccgcac tatggtgtaa      540
gctggattcg ccagcctcca cgaaagggtc tggagtggct gggagtaata tggggtagtg      600
aaaccacata ctataattca gctctcaa atccagactgac catcatcaag gacaactcca      660
agagccaagt tttcttaaaa atgaacagtc tgcaaaactga tgacacagcc atttactact      720
gtgccaacaa ttattactac ggtggtagct atgctatgga ctactggggc caaggaacct      780

cagtcaccgt ctctcaacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca      840
tcgcgtcgca gccctgtcc ctgcgccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag      900
tgcacacgag ggggctggac ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc ttggccggga      960
cttgtggggg ctttctcctg tcaactggtta tcaccttta ctgcaaacgg ggcagaaaga      1020
aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag      1080
atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt      1140
tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc      1200

tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc cgggaccctg      1260
agatgggggg aaagccgcag agaaggaaga accctcagga aggctgtac aatgaactgc      1320
agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg      1380
gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg      1440
cccttcatat gcaggccctg cccctctcgc gaagcggagc caccaacttc agcctgctga      1500
agcaggccgg cgacgtggag gagaaccccg gcccctatggc cttaccagtg accgccttgc      1560

```

tcttgccgct ggcccttgctg ctccacgccg ccaggccgga cgtgcagatc acccagagcc 1620

ccagctacct ggccgccagc cccggcgaga ccatcaccat caactgcaga gccagcaaga 1680

gcatcagcaa ggacctggcc tggtagcagg agaagcccgg caagaccaac aagctgctga 1740

tctacagcgg cagcacctg cagagcggca tccccagcag attcagcggc agcggcagcg 1800

gcaccgactt caccctgacc atcagcagcc tggagcccga ggacttcgcc atgtactact 1860

gccagcagca caacaagtac ccctacacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaagg 1920

gagggggggg atccggggga ggaggctccg gcggaggcgg aagccaggtg cagctgcagc 1980

agcccggcgc cgagctggtg agaccggcgc ccagcgtgaa gctgagctgc aaggccagcg 2040

gctacacctt caccagctac tggatgaact gggatgaagca gagaccgac cagggcctgg 2100

agtggatcgg cagaatcgac ccctacgaca gcgagacca ctacaaccag aagttcaagg 2160

acaagccat cctgaccgtg gacaagagca gcagcaccgc ctacatgcag ctgagcagcc 2220

tgaccagcga ggacagcgc gtgtactact gcgccagagg caactgggac gactactggg 2280

gccagggcac caccctgacc gtgagcagca ccacgacgcc agcggccgca ccaccaaac 2340

cggcgcccaac catcgctcg cagcccctgt cctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg 2400

cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgctg tgatatctac atctgggcgc 2460

ccttgccggg gacttgtggg gtccctctcc tgtcactggt taccacctt tactgcagga 2520

gtaagaggag caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgccccgggc 2580

ccaccgcaa gcattaccg ccctatgcc caccacgcga cttcgcagcc tatcgtcca 2640

gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccggtacca gcaggccag aaccagctct 2700

ataacagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc 2760

gggacctga gatgggggga aagccgcaga gaaggaagaa ccctcaggaa ggccgtgaca 2820

atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc 2880

gccggagggg caaggggcac gatgacctt accagggtct cagtacagcc accaaggaca 2940

cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta agtttaaac 2989

<210> 9

<211> 1066

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 9

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

1                    5                    10                    15  
 His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
                          20                    25                    30  
  
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
                          35                    40                    45  
 Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro  
                          50                    55                    60  
 Lys Leu Trp Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
                          85                    90                    95  
  
 Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser  
                          100                    105                    110  
 Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly  
                          115                    120                    125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val  
                          130                    135                    140  
 Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala Ser Val  
 145                    150                    155                    160  
  
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Arg Met  
                          165                    170                    175  
 His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr  
                          180                    185                    190  
 Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp  
                          195                    200                    205  
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln  
                          210                    215                    220  
  
 Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 225                    230                    235                    240  
 Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
                          245                    250                    255

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

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

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

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser  
 305 310 315 320

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

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys  
 340 345 350

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
 355 360 365

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 370 375 380

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
 385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg  
 405 410 415

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
 420 425 430

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
 435 440 445

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro  
 450 455 460

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala  
 465 470 475 480

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His  
 485 490 495

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





Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met  
 755 760 765  
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 770 775 780  
 Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 785 790 795 800  
  
 Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr  
 805 810 815  
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala  
 820 825 830  
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile  
 835 840 845  
 Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser  
 850 855 860  
  
 Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His  
 865 870 875 880  
 Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys  
 885 890 895  
 His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
 900 905 910  
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 915 920 925  
  
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
 930 935 940  
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg  
 945 950 955 960  
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
 965 970 975  
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
 980 985 990  
  
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro

995	1000	1005	
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu			
1010	1015	1020	
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys			
1025	1030	1035	
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp			
1040	1045	1050	
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
1055	1060	1065	
<210> 10			
<211> 3217			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> synthetic sequence			
<400> 10			
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg	60		
ccgccaggcc gcagatcgtg ctgaccaga gccccccat catgagcgcc agccccggcg	120		
agaaggtgac catcacctgc agcgccagca gcagcatcag ctacatgcac tggttccagc	180		
agaagccccg caccagcccc aagctgtgga tctacaccac cagcaacctg gccagcggcg	240		
tgcccgcag attcagcggc agcggcagcg gcaccagcta cagcctgacc atcagcagaa	300		
tggaggccga ggacgcccc acctactact gccaccagag aagcacctac ccctgacct	360		
tcggcagcgg caccaagctg gagctgaagg gagggggggg atccggggga ggaggtccg	420		
gcggaggcgg aagccaggtg cagctgcagc agagcggcgc cgagctggcc aagccccggc	480		
ccagcgtgaa gatgagctgc aagccagcg gctacacctt caccagctac agaatgact	540		
gggtgaagca gagaccggc caggcctgg agtggatcgg ctacatcaac cccagcaccg	600		
gctacaccga gtacaaccag aagttcaagg acaaggccac cctgaccgcc gacaagagca	660		
gcagcaccgc ctacatgcag ctgagcagcc tgaccttoga ggacagcgcc gtgtactact	720		
gcgccagagg cggcggcgtg ttcgactact ggggccaggg caccaccctg accgtgagca	780		
gcaccacgac gccagcgccg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgagcccc	840		
tgtccctgcg cccagagggc tgccggccag cggcgggggg cgagtgcaac acgagggggc	900		
tggacttcgc ctgtgatata tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc	960		
tcctgtcact ggttatcacc ctttactgca ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg	1020		

actacatgaa catgactccc cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg 1080

ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct ccaaacgggg cagaaagaaa ctctgtata 1140

tattcaaaaa accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct 1200

gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc agcaggagcg 1260

cagacgcccc cgctacaag cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac 1320

gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa 1380

agccgagaag gaagaacct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg 1440

cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg 1500

gcctttacca gggctctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg 1560

ccctgcccc tcgcggaagc ggagctacta acttcagcct gctgaagcag gctggagacg 1620

tggaggagaa ccttggaact atggccttac cagtgaccgc cttgtctctg ccgctggcct 1680

tgctgtcca cgccgccagg ccggacgtgc agatcaccca gagccccagc tacctggccc 1740

ccagccccgg cgagaccatc accatcaact gcagagccag caagagcatc agcaaggacc 1800

tggcctggta ccaggagaag cccggcaaga ccaacaagct gctgatctac agcggcagca 1860

ccctgcagag cggcatcccc agcagattca gcggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc 1920

tgaccatcag cagcctggag cccgaggact tcgccaatga ctactgccag cagcacaaca 1980

agtacccta caccttcggc ggccgaccca agctggagat caagggaggg gggggatccg 2040

ggggaggagg ctccggcgga ggccgaagcc aggtgcagct gcagcagccc ggcgccgagc 2100

tggatgagacc cggccagc gtgaagctga gctgcaagcc cagcggctac accttcacca 2160

gctactggat gaactgggtg aagcagagac ccgaccaggg cctggagtgg atcggcagaa 2220

tcgacccta cgacagcgag acccaactaca accagaagtt caaggacaag gccatcctga 2280

ccgtggacaa gagcagcagc accgectaca tgcagctgag cagcctgacc agcaggagaa 2340

gcgccgtgta ctactgcgcc agaggcaact gggacgacta ctggggccag ggcaccacc 2400

tgaccgtgag cagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg 2460

cgctgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc 2520

acacaggggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt 2580

gtgggtctct tctctgtca ctggttatca cctttactg caggagtaag aggagcagcc 2640

tctgcacag tgactacatg aacatgactc cccgccccc cgggccacc cgcaagcatt 2700

accagccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctccaacgg ggcagaaaga 2760

aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag 2820  
atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt 2880  
tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggccca gaaccagctc tataacgagc 2940  
tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggacacctg 3000  
agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat gaactgcaga 3060  
aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca 3120  
aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc 3180

ttcacatgca ggccttgccc cctcgctaag tttaaac 3217

<210> 11

<211> 985

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser

35 40 45

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

50 55 60

Lys Leu Trp Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser

100 105 110

Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val

130 135 140

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala Ser Val  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Arg Met  
                                  165                      170                      175  
 His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr  
                                  180                      185                      190  
 Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp  
                                  195                      200                      205  
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln  
                                  210                      215                      220  
 Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                                  225                      230                      235                      240  
 Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
                                  245                      250                      255  
 Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr  
                                  260                      265                      270  
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala  
                                  275                      280                      285  
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile  
                                  290                      295                      300  
 Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser  
 305                      310                      315                      320  
 Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr  
                                  325                      330                      335  
 Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu  
                                  340                      345                      350  
 Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu  
                                  355                      360                      365  
 Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln  
                                  370                      375                      380  
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu

385                    390                    395                    400  
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly  
                           405                    410                    415  
 Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu  
  
                           420                    425                    430  
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly  
                           435                    440                    445  
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
                           450                    455                    460  
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro  
 465                    470                    475                    480  
 Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly  
  
                           485                    490                    495  
 Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu  
                           500                    505                    510  
 Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Val Gln  
                           515                    520                    525  
 Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile  
                           530                    535                    540  
 Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Asp Leu Ala Trp  
  
 545                    550                    555                    560  
 Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly  
                           565                    570                    575  
 Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
                           580                    585                    590  
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe  
                           595                    600                    605  
 Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly  
  
                           610                    615                    620  
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 625                    630                    635                    640



Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala  
 645 650 655  
 Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
 660 665 670  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro  
 675 680 685  
 Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu  
 690 695 700  
 Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp  
 705 710 715 720  
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu  
 725 730 735  
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp  
 740 745 750  
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro  
 755 760 765  
 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu  
 770 775 780  
 Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg  
 785 790 795 800  
 Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly  
 805 810 815  
 Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg  
 820 825 830  
 Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro  
 835 840 845  
 Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro  
 850 855 860  
 Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
 865 870 875 880  
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu

885 890 895  
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
 900 905 910  
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln  
 915 920 925  
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr  
 930 935 940  
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp  
 945 950 955 960  
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala  
 965 970 975  
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 980 985

<210> 12

<211> 2974

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400

> 12

gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgetcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60  
 ccgccaggcc gcagatcgtg ctgaccaga gccccgccat catgagcgcc agccccggcg 120  
 agaaggtgac catcacctgc agcgcagca gcagcatcag ctacatgcac tggttccagc 180  
 agaagcccgg caccagcccc aagctgtgga tctacaccac cagcaacctg gccagcggcg 240  
 tgcccgcag attcagcggc agcggcagcg gcaccagcta cagcctgacc atcagcagaa 300  
 tggaggccga ggacgccgc acctactact gccaccagag aagcacctac cccctgacct 360  
 tcggcagcgg caccaagctg gagctgaagg gagggggggg atccggggga ggaggctccg 420  
  
 gcggaggcgg aagccaggtg cagctgcagc agagcggcgc cgagctggcc aagccccggcg 480  
 ccagcgtgaa gatgagctgc aagccagcgc gctacacctt caccagctac agaatgcaact 540  
 gggatgaagca gagaccggc caggcctgg agtggatcgg ctacatcaac cccagcaccg 600  
 gctacaccga gtacaaccag aagttcaagg acaaggccac cctgaccgcc gacaagagca 660  
 gcagcaccgc ctacatgcag ctgagcagcc tgaccttca ggacagcggc gtgtactact 720  
 gcgccagagg cggcggcgtg ttcgactact gggccaggg caccacctg accgtgagca 780

gcaccacgac gccagcgccg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgagcccc 840

tgtccctgcg cccagaggcg tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc 900

tggacttcgc ctgtgatata tacatctggg cgcctctggc cgggacttgt ggggtccttc 960

tctgtcact ggttatcacc ctttactgca aacggggcag aaagaaactc ctgtatata 1020

tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc ttagctgcc 1080

gatttcaga agaagaaga ggagatgtg aactgagagt gaagttcagc aggagcgag 1140

acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa 1200

gagaggagta cgatgtttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg ggggaaagc 1260

cgcagagaag gaagaacct caggaaggcc tglacaatga actgcagaaa gataagatgg 1320

cggagccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg gagggcaag gggcacgatg 1380

gcctttacca ggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg 1440

ccctgcccc tcgcggaagc ggagctacta acttcagcct gctgaagcag gctggagacg 1500

tggaggagaa ccctggacct atggccttac cagtaccgc cttgctctg ccgctggcct 1560

tgctctcca cgccgccagg ccggacgtgc agatcacca gagccccagc tacctggcgc 1620

ccagccccgg cgagaccatc accatcaact gcagagccag caagagcatc agcaaggacc 1680

tggcctgta ccaggagaag cccgcaaga ccaacaagct gctgatctac agcggcagca 1740

ccctgcagag cggcatcccc agcagattca gcggcagcgg cagcggcacc gacttcacc 1800

tgaccatcag cagcctggag cccgaggact tcgcatgta ctactgccag cagcacaaca 1860

agtacccta caccttcggc ggcggcacca agctggagat caaggagagg ggggatccg 1920

gggaggagg ctccggcga ggcggaagcc aggtgcagct gcagcagccc ggcgccgagc 1980

tggtagacc cgccgccagc gtgaagctga gctgcaagc cagcggctac accttacca 2040

gctactggat gaactgggtg aagcagagac ccgaccaggg cctggagtgg atcggcagaa 2100

tcgacccta cgacagcgag acccactaca accagaagtt caaggacaag gccatcctga 2160

ccgtggacaa gagcagcagc accgctaca tgcagctgag cagcctgacc agcaggagaca 2220

gcgccgtgta ctactgcccc agaggcaact gggacgacta ctggggccag ggcaccacc 2280

tgaccgtgag cagcaccag acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg 2340

cgtcgagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc 2400

acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt 2460

gtgggtcct tctcctgca ctggtatca ccctttactg caggagtaag aggagcagc 2520

tctctcacag tgactacatg aacatgactc cccgccgccc cgggccacc cgcaagcatt 2580  
 accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctccagagtg aagttcagca 2640  
 ggagcgcaga cgcccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc 2700  
 taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg 2760  
 ggggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag 2820  
 ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcggcgg aggggcaagg 2880  
 ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccacca ggacacctac gacgccttc 2940

acatgcagge cctgccccct cgctaagttt aaac 2974

<210> 13

<211> 546

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 13

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 Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

100                    105                    110

Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr

115                    120                    125

Lys Leu Glu Ile Lys Lys Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

130                    135                    140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
  
                          165                      170                      175  
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg  
                          180                      185                      190  
 Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
                          195                      200                      205  
 Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr Pro Ser  
                          210                      215                      220  
 Leu Lys Asp Lys Val Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu  
  
 225                      230                      235                      240  
 Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
                          245                      250                      255  
 Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp  
                          260                      265                      270  
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
                          275                      280                      285  
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
  
                          290                      295                      300  
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 305                      310                      315                      320  
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr  
                          325                      330                      335  
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser  
                          340                      345                      350  
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg  
  
                          355                      360                      365  
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg  
                          370                      375                      380  
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr

385                    390                    395                    400  
 Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu  
                          405                    410                    415  
 Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu  
  
                          420                    425                    430  
 Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln  
                          435                    440                    445  
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu  
                          450                    455                    460  
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly  
 465                    470                    475                    480  
 Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu  
  
                          485                    490                    495  
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly  
                          500                    505                    510  
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
                          515                    520                    525  
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro  
                          530                    535                    540  
 Pro Arg

545

<210> 14

<211> 1657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 14

gcatcgcat ggccttacca gtgaccgct tgetcctgcc gctggccttg ctgctccacg            60  
 ccgccaggcc gagcgacatc gtgctgacc agagccccgc cagcctggcc gtgagcctgg            120  
 gccagagagc caccatcagc tgcagagcca gcaagagcgt gagcaccagc ggctacagct            180  
 acctgcactg gtaccagcag aagcccggcc agcccccaa gctgctgac tacctggcca            240  
 gcaacctgga gagcggcgtg cccgccagat tcagcggcag cggcagcggc accgacttca            300

ccctgaacat ccaccccggtg gaggaggagg acgccgccac ctactactgc cagcacagca 360

gagagctgcc cttcaccttc ggcagcggca ccaagctgga gatcaagaag atcagcggcg 420

gcggcggcag cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag cggcggcggc ggcagcggcg 480

gcggcggcag ccaggtgcag ctggtggaga gcggcggcgg cctggtgcag cccggcggca 540

gcctgaagct gagctgcgcc gccagcggct tcgacttcag cagatactgg atgagctggg 600

tgagacagge ccccggaag ggcctggagt ggatcggcga gatcaacccc accagcagca 660

ccatcaactt cacccccagc ctgaaggaca aggtgttcat cagcagagac aacgccaaga 720

acacctgta cctgcagatg agcaaggtga gaagcgagga caccgccctg tactactgcg 780

ccagaggcaa ctactacaga tacggcgacg ccatggacta ctggggccag ggcaccagcg 840

tgaccgtgag caccacgacg ccagcggcgc gaccaccaac accggcggcc accatcgcgt 900

cgagcccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggccggggggc gcagtgcaca 960

cgagggggct ggacttcgcc tgtgatctt acatctgggc gcccttggcc gggacttgtg 1020

gggtccttct cctgtcactg gttatcacc tttactgcag gagtaagagg agcaggtcc 1080

tgacacagtg ctacatgaac atgaactccc gccgccccgg gccaccgcc aagcattacc 1140

agccctatgc cccaccagc gacttcgcag cctatcgtc caaacggggc agaaagaaac 1200

tctgtatat attcaaaca ccatattatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg 1260

gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga gtgaagtcca 1320

gcaggagcgc agaccccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca 1380

atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga 1440

tggggggaaa gccgcagaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga 1500

aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca 1560

aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc 1620

ttcacatgca ggcctgccc cctcgctaag tttaaac 1657

<210> 15

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 15

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

1 5 10 15



His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu  
 20 25 30  
 Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys  
 35 40 45  
 Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys  
 50 55 60  
 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 85 90 95  
 Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr  
 100 105 110  
 Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe  
 165 170 175  
 Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 180 185 190  
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr  
 195 200 205  
 Pro Ser Leu Lys Asp Lys Val Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 210 215 220  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp  
 245 250 255  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Thr Thr Thr Pro Ala

260 265 270  
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser  
 275 280 285  
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr  
  
 290 295 300  
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
 325 330 335  
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
 340 345 350  
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
  
 355 360 365  
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser  
 370 375 380  
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu  
 385 390 395 400  
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg  
 405 410 415  
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro  
  
 420 425 430  
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala  
 435 440 445  
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His  
 450 455 460  
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp  
 465 470 475 480  
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 485 490

<210> 16

<211> 1489

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 16

```

gcatcgcat ggccttacca gtgaccgct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg      60
ccgccaggcc ggacatcgtg ctgaccaga gccccgccag cctggcctg agcctgggcc      120
agaggccac catcagctgc agggccagca agagcgtgag caccagcggc tacagctacc      180
tgactggta ccagcagaag cccgccagc ccccaagct gctgatctac ctggccagca      240
acctggagag cggcgtgcc gccaggttca gcggcagcgg cagcggcacc gacttcacc      300
tgaacatcca cccgtggag gaggaggacg ccgccaccta ctactgccag cacagcaggg      360

agctgcctt caccttcggc agcggcacca agctggagat caagggaggg ggggatccg      420
ggggaggagg ctccggcga ggcgaagcc aggtgcagct ggtggagagc ggcggcggcc      480
tggtgcagcc cggcggcagc ctgaagctga gctgcgccg cagcggcttc gacttcagca      540
ggtactggat gagctgggtg aggcagccc ccgcaaggg cctggagtgg atcggcgaga      600
tcaacccac cagcagcacc atcaacttca cccccagcct gaaggacaag gtgttcatca      660
gcagggaaa cgcaagaac accctgtacc tgcagatgag caagtgagg agcaggaca      720
ccgcctgta ctactgcgc aggggcaact actacagta cggcgacgcc atggactact      780

ggggccaggg caccagcgtg accgtgagca ccacgacgc agcggcgcga ccaccaacac      840
cggcggccac catcgcgtg cagcccctgt ccttgcgcc agaggcgtgc cggccagcgg      900
cggggggcgc agtgcacag agggggctgg acttgcctg tgatatctac atctggcgc      960
ccttggccgg gacttgtggg gtcttctcc tgtcactggt taccacctt tactgcagga      1020
gtaagaggag caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cggccgggc      1080
ccaccgcaa gcattaccag ccctatgcc caccacgca cttgcagcc tatcgtcca      1140
gagtgaagt cagcaggagc gcagacgcc ccgcgtacca gcaggccag aaccagctct      1200

ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc      1260
gggacctga gatgggggga aagccgcaga gaaggaagaa ccctcaggaa gcctgtaca      1320
atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc      1380
gccggagggg caagggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca      1440
cctacagcgc cctcacatg caggcctgc ccctcgcta agtttaaac      1489

```

<210> 17

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 17

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

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

                  20                    25                    30  
Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys

                  35                    40                    45  
Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys

                  50                    55                    60  
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu

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

                  85                    90                    95  
Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

                  100                    105                    110  
Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys

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

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

145                    150                    155                    160  
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe

                  165                    170                    175  
Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

                  180                    185                    190  
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr

                  195                    200                    205  
Pro Ser Leu Lys Asp Lys Val Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

                  210                    215                    220





acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg 1380

agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg 1440

acacctacga cgccttcac atgcaggecc tgcccctcg ctaagttaa ac 1492

<210> 19

<211> 997

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 19

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met

20 25 30

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

35 40 45

Asp Val Asn Thr Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His

100 105 110

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175



Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met Ala  
 180 185 190

Trp Ile Asn Thr Thr Arg Tyr Thr Gly Glu Ser Tyr Phe Ala Asp Asp  
 195 200 205

Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Val Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala  
 210 215 220

Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe  
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Gly Glu Ile Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Gly Phe Ala Tyr  
 245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Thr Thr Pro Ala  
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg  
 370 375 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
 385 390 395 400

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
 405 410 415

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



Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp  
 675 680 685  
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 690 695 700  
 Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys  
 705 710 715 720  
 Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
 725 730 735  
  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 740 745 750  
 Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
 755 760 765  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr  
 770 775 780  
 Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala  
 785 790 795 800  
  
 Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe  
 805 810 815  
 Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val  
 820 825 830  
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser  
 835 840 845  
 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly  
 850 855 860  
  
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala  
 865 870 875 880  
 Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala  
 885 890 895  
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg  
 900 905 910  
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu



accatcgct cgagcccct gtccttgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggccgggggc 900  
 gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgatattt acatctgggc gcccttggcc 960  
 gggacttgtg gggctcttct cctgtcactg gttatcacc tttactgcaa acggggcaga 1020  
 aagaaactcc tgiatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag 1080  
 gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 1140  
  
 aagttcagca ggagcgcaga cgccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac 1200  
 gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac 1260  
 cctgagatgg ggggaaaacc cgacagaagg aagaacctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320  
 ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcggcgg 1380  
 aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440  
 gagcgccttc acatgcaggc cctgccccct cgcggaagcg gagccaccaa cttcagcctg 1500  
 ctgaagcagg ccggcgactg ggaggagaac cccggccccg ccttaccagt gaccgccttg 1560  
  
 ctctgccgc tggccttget gctccacgcc gccaggccgg atattcagat gaccagagc 1620  
 ccgagcagcc tgagcgcgag cgtgggcgat cgcgtgacca ttacctgcaa agcagaccag 1680  
 gatgtgggca ttgcggtggc gtggatcag cagaaaccgg gcaaagtgcc gaaactgctg 1740  
 atttattggg cgagcaccgc ccataccggc gtgccggatc gctttagcgg cagcggcagc 1800  
 ggaccgatt ttacctgac cattagcagc ctgcagccgg aagatgtggc gacctattat 1860  
 tgccagcagt atagcagcta tccgtatac tttggccagg gcaccaaagt gaaaattaaa 1920  
 ggaggggggg gatccggggg aggaggctcc ggcggaggcg gaagcgaagt gcagctggtg 1980  
  
 gaaagcggcg gcggcctggt gcagccgggc ggcagcctgc gcctgagctg cgcggcgagc 2040  
 ggctttgatt ttagccgcta ttggatgagc tgggtgcgcc aggcgccggg caaaggcctg 2100  
 gaatggattg gcgaaattaa cccgatagc agcaccatta actatgcgcc gaccctgaaa 2160  
 gataaattta ttattagccg cgataacgcg aaaaacagcc tgtatctgca gatgaacagc 2220  
 ctgcgcgagg aagataccgc ggtgtattat tgcgcgcgcc cggatggcaa ctattggtat 2280  
 tttgatgtgt ggggcccagg caccctggtg accgtgagca gcaccacgac gccagcgcg 2340  
 cgaccaccaa caccggcgc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccttgcg cccagaggcg 2400  
  
 tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc tggacttcgc ctgtgatata 2460  
 tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc tcctgtcact ggttatcacc 2520  
 ctttactgca ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc 2580  
 cgccgccccg ggcccccccg caagcattac cagccctatg ccccaccagc cgacttcgca 2640  
 gcctatcgct ccagagttaa gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc 2700

cagaaccagc tctataacga gctcaatctt ggacgaagag aggagtacga tgttttgac 2760  
aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccgc agagaaggaa gaaccctcag 2820

gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 2880  
atgaaagcgc agcggcggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 2940  
gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgcccctcgc ctaa 2994

<210> 21  
<211> 997  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic sequence  
<400> 21

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1                    5                    10                    15  
His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met

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

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

145                    150                    155                    160

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe Gly  
 165 170 175

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met Ala  
 180 185 190

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Tyr Phe Ala Asp Asp Phe Lys  
 195 200 205

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Val Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr Leu  
 210 215 220

Gln Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
 225 230 235 240

Arg Gly Glu Ile Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly  
 245 250 255

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

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

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 290 295 300

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

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

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

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

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
 370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
 385 390 395 400

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





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

660 665 670

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met

675 680 685

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

690 695 700

Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asp

705 710 715 720

Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

725 730 735

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

740 745 750

Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

755 760 765

Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910  
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu

915 920 925  
 Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr

930 935 940  
 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly

945 950 955 960  
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln

965 970 975  
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln

980 985 990  
 Ala Leu Pro Pro Arg

995

<210> 22

<211> 3009

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 22

cgatcgcgatg gccttaccag tgaccgcctt gtcctgccg ctggccttgc tgctccacgc 60

cgccaggccg gatgtggtga tgaccagag ccatcgcttt atgagcacca gcgtgggaga 120

tcgagtgagc attacctgcc ggcgagcca ggatgtgaac accgcggtga gctggtatca 180

gcagaaaccg ggccagagcc cgaaactgct gatttttagc gcgagctatc gctataccgg 240

cgtgccggat cgctttaccg gcagcggcag cggcgcggat tttaccctga ccattagcag 300

cgatgcaggcg gaagatctgg cgggtgatta ttgccagcag cattatagca ccccgtggac 360

ctttggcggc ggcaccaaac tggatattaa aggagggggg ggatccgggg gaggaggctc 420

cggcggaggc ggaagccaga ttcagctggt gcagagcggc ccggatctga aaaaaccggg 480

cgaaaccgtg aaactgagct gcaaagcgag cggctatacc tttaccaact ttggcatgaa 540

ctgggtgaaa caggcggcgg gcaaaggcct taaatggatg gcgtggatta acacctatac 600

cggcgaagc tattttgagg atgattttaa aggccgcttt gcgttttagc tggaaaccag 660

cgcgaccacc gcgtatctgc agattaacaa cctgaaaacc gaagataccg cgacctattt 720

ttgcgcgcgc ggcgaaatth attatggctia tgatggcggc tttgcgtatt ggggccaggg 780  
 caccctgggt accgtgagcg cgaccacgac gccagcggcg cgaccaccaa caccggcgcc 840  
 caccatcgcg tcgacgcccc tgtccctgcg cccagaggcg tgccggccag cggcgggggg 900  
 cgcagtgcac acgagggggc tggacttcgc ctgtgatatc tacatctggg cgcccttggc 960  
 cgggacttgt ggggtccttc tcctgtcact ggttatcacc ctttactgca aacggggcag 1020  
 aaagaaactc ctgtatatah tcaagcaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga 1080  
  
 ggaagatggc tglagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgagagt 1140  
 gaagttcagc aggagcgagc acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa 1200  
 cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga 1260  
 ccctgagatg gggggaaagc cgcagagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga 1320  
 actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg 1380  
 gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca ggttctcagt acagccacca aggacaccta 1440  
 cgacgccctt cacatgcagg ccctgcccc tcgcggaagc ggagccacca acttcagcct 1500  
  
 gctgaagcag gccggcgagc tggaggagaa cccccgccc atggccttac cagtgaccgc 1560  
 cttgctcctg ccgtggcct tgctgtcca cgccgccagg ccgatattc agatgacca 1620  
 gagccccgagc agcctgagcg cgagcgtggg cgaccgctg accattacct gcaaagcgag 1680  
 ccaggatgtg ggcattgagg tggcgtggta tcagcagaaa ccgggcaaag tgccgaaact 1740  
 gctgatttat tggcgagca cccgccatac cggcgtgccg gatcgttta gcggcagcgg 1800  
 cagcggcacc gatthtacc tgaccattag cagcctgcag ccggaagatg tggcgaccta 1860  
 ttattgccag cagtatagca gctatccgta tacctttggc cagggcacca aagtggaaat 1920  
  
 taaaggaggg ggggatccg ggggaggagg ctccggcgga ggcggaagcg aagtgcagct 1980  
 ggtggaagc ggcggcgcc tggtgcagcc gggcggcagc ctgcacctga getgcgggc 2040  
 gagcggcttt gatthtagcc gctattggat gagctgggtg cgccaggcgc ggggcaaagg 2100  
 cctggaatgg attggcgaat ttaaccgga tagcagcacc attaactatg cgccagcct 2160  
 gaaagataaa thtattaita gccgcgataa cgcgaaaaac agcctgtatc tgcagatgaa 2220  
 cagcctgcgc gcggaagata ccgcggtgta ttattgcgcg cgcccggatg gcaactattg 2280  
 gtatthtgat gtgtggggcc agggcacct ggtgacctg agcagcacca cgacgccagc 2340  
  
 gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgcccaga 2400  
 ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact tcgctgtga 2460  
 tatctacatc tgggcgccc tggccgggac ttgtggggtc cttctcctgt cactggttat 2520  
 caccctttac tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaagc aaccattht 2580

gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga 2640  
 agaaggagga tgtgaactga gagtgaagt cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca 2700  
 gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt 2760

tttgacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgcaga gaaggaagaa 2820  
 ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga 2880  
 gattgggatg aaagcgcagc gccggagggg caaggggcac gatgccttt accagggtct 2940  
 cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc ccctcgcta 3000  
 agtttaaac 3009

<210> 23

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 23

agctagctgc agtaacgcca ttttcaagg catggaaaaa taccaaacca agaatagaga 60

agttcagatc aagggcgggt acatgaaaat agctaacgtt gggccaaaca ggatatctgc 120  
 ggtgagcagt ttcggccccg gcccggggcc aagaacagat ggtcaccgca gtttcggccc 180  
 cggcccaggg ccaagaacag atggccccca gatatggccc aacctcagc agtttcttaa 240  
 gacctatcag atgtttccag gctcccccaa ggacctgaaa tgacctgcg cttatttga 300  
 attaaccaat cagcctgett ctgcttctg ttcgcgcgct tctgcttccc gagctetata 360  
 aaagactca caaccctca ctgcgcgcgc cagtctccg acagactgag tcgcccgggt 420  
 acc 423

<210> 24

<211> 165

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 24

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met  
 35 40 45

Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala  
 50 55 60

Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp  
 65 70 75 80

His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His  
 85 90 95

Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val  
 100 105 110

Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn  
 115 120 125

Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser  
 130 135 140

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

Ala Leu Val Tyr Ser  
 165

<210> 25  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic sequence  
 <400> 25

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser  
 1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr  
 20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser  
 35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala  
 50

<210> 26

<211> 204

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 26

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

1                    5                    10                    15  
Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val Asp Ser Ile Val Trp Thr

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

                  35                    40                    45  
Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Arg Glu Arg Val Asp Phe Pro Asp Gly

                  50                    55                    60  
Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys Lys Asn Asp Ser Gly Ile

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

                  85                    90                    95  
Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu Ser Lys Pro Lys Val Thr

                  100                    105                    110  
Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr Cys Val Thr Asn Leu Thr

                  115                    120                    125  
Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val Ile Tyr Thr Trp Lys Ala

                  130                    135                    140  
Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn Gly Ser Ile Leu Pro Ile

145                    150                    155                    160  
Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr Phe Ile Cys Val Ala Arg

                  165                    170                    175  
Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro Ile Leu Ala Arg Lys Leu

                  180                    185                    190  
Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser Ser Met

195 200

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 27

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu

1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro

20 25 30

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys

35 40 45

<210> 28

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 28

Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu

1 5 10 15

Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro Tyr

20 25 30

Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn

85 90 95

Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr

100 105 110

Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro

115 120 125

Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu

130 135 140

Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe

145 150 155 160

Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His

165 170 175

Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn

180 185 190

Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Val His

<210> 29

<211> 287

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 29

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr Asp Ile

20 25 30

Glu Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn Asn Ser

35 40 45

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





<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 30

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val  
 1                    5                    10                    15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr  
                   20                    25                    30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly  
                   35                    40                    45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe  
                   50                    55                    60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro  
 65                    70                    75                    80

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val  
                   85                    90                    95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly  
                   100                    105                    110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro  
                   115                    120                    125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg  
                   130                    135                    140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser  
 145                    150                    155                    160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr  
                   165                    170                    175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro  
                   180                    185                    190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser  
                   195                    200                    205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu  
                   210                    215                    220

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

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 31

Pro Ile Cys Val Thr Val

1                      5

<210> 32

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 32

Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala

1                      5                      10                      15

His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser

                                 20                      25                      30

Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser

                                 35                      40                      45

<210> 33

<211> 480

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 33

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

1                    5                    10                    15  
 Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly  
                          20                    25                    30  
 Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn  
                          35                    40                    45  
 Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly  
                          50                    55                    60  
 Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn  
 65                    70                    75                    80  
 Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly  
                          85                    90                    95  
 Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg  
                          100                    105                    110  
 Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu  
                          115                    120                    125  
 Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu  
                          130                    135                    140  
 Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu  
 145                    150                    155                    160  
 Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile  
                          165                    170                    175  
 Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser  
                          180                    185                    190  
 His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys  
                          195                    200                    205  
 Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys  
                          210                    215                    220  
 Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp  
                          225                    230                    235                    240  
 Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr  
                          245                    250                    255

Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr  
 260 265 270  
 Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr  
 275 280 285  
 Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val  
 290 295 300  
 Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu  
 305 310 315 320  
 His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser  
 325 330 335  
 Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys  
 340 345 350  
 Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu  
 355 360 365  
 Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly  
 370 375 380  
 Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly  
 405 410 415  
 Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val  
 420 425 430  
 Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu  
 435 440 445  
 Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala  
 450 455 460  
 Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu  
 465 470 475 480  
 <210> 34  
 <211> 480  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 34

Gln Ser Pro Thr Pro Ser Pro Thr Gly Leu Thr Thr Ala Lys Met Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Pro Leu Ser Ser Asp Pro Leu Pro Thr His Thr Thr Ala Phe  
                   20                    25                    30  
 Ser Pro Ala Ser Thr Phe Glu Arg Glu Asn Asp Phe Ser Glu Thr Thr  
                   35                    40                    45  
 Thr Ser Leu Ser Pro Asp Asn Thr Ser Thr Gln Val Ser Pro Asp Ser  
                   50                    55                    60  
  
 Leu Asp Asn Ala Ser Ala Phe Asn Thr Thr Gly Val Ser Ser Val Gln  
 65                    70                    75                    80  
 Thr Pro His Leu Pro Thr His Ala Asp Ser Gln Thr Pro Ser Ala Gly  
                   85                    90                    95  
 Thr Asp Thr Gln Thr Phe Ser Gly Ser Ala Ala Asn Ala Lys Leu Asn  
                   100                    105                    110  
 Pro Thr Pro Gly Ser Asn Ala Ile Ser Asp Val Pro Gly Glu Arg Ser  
                   115                    120                    125  
  
 Thr Ala Ser Thr Phe Pro Thr Asp Pro Val Ser Pro Leu Thr Thr Thr  
                   130                    135                    140  
 Leu Ser Leu Ala His His Ser Ser Ala Ala Leu Pro Ala Arg Thr Ser  
 145                    150                    155                    160  
 Asn Thr Thr Ile Thr Ala Asn Thr Ser Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Ser  
                   165                    170                    175  
 Glu Thr Thr Thr Leu Ser Pro Ser Gly Ser Ala Val Ile Ser Thr Thr  
                   180                    185                    190  
  
 Thr Ile Ala Thr Thr Pro Ser Lys Pro Thr Cys Asp Glu Lys Tyr Ala  
                   195                    200                    205  
 Asn Ile Thr Val Asp Tyr Leu Tyr Asn Lys Glu Thr Lys Leu Phe Thr  
                   210                    215                    220

Ala Lys Leu Asn Val Asn Glu Asn Val Glu Cys Gly Asn Asn Thr Cys  
 225                      230                      235                      240

Thr Asn Asn Glu Val His Asn Leu Thr Glu Cys Lys Asn Ala Ser Val  
                                  245                      250                      255

Ser Ile Ser His Asn Ser Cys Thr Ala Pro Asp Lys Thr Leu Ile Leu  
                                  260                      265                      270

Asp Val Pro Pro Gly Val Glu Lys Phe Gln Leu His Asp Cys Thr Gln  
                                  275                      280                      285

Val Glu Lys Ala Asp Thr Thr Ile Cys Leu Lys Trp Lys Asn Ile Glu  
                                  290                      295                      300

Thr Phe Thr Cys Asp Thr Gln Asn Ile Thr Tyr Arg Phe Gln Cys Gly  
 305                      310                      315                      320

Asn Met Ile Phe Asp Asn Lys Glu Ile Lys Leu Glu Asn Leu Glu Pro  
                                  325                      330                      335

Glu His Glu Tyr Lys Cys Asp Ser Glu Ile Leu Tyr Asn Asn His Lys  
                                  340                      345                      350

Phe Thr Asn Ala Ser Lys Ile Ile Lys Thr Asp Phe Gly Ser Pro Gly  
                                  355                      360                      365

Glu Pro Gln Ile Ile Phe Cys Arg Ser Glu Ala Ala His Gln Gly Val  
                                  370                      375                      380

Ile Thr Trp Asn Pro Pro Gln Arg Ser Phe His Asn Phe Thr Leu Cys  
 385                      390                      395                      400

Tyr Ile Lys Glu Thr Glu Lys Asp Cys Leu Asn Leu Asp Lys Asn Leu  
                                  405                      410                      415

Ile Lys Tyr Asp Leu Gln Asn Leu Lys Pro Tyr Thr Lys Tyr Val Leu  
                                  420                      425                      430

Ser Leu His Ala Tyr Ile Ile Ala Lys Val Gln Arg Asn Gly Ser Ala  
                                  435                      440                      445

Ala Met Cys His Phe Thr Thr Lys Ser Ala Pro Pro Ser Gln Val Trp  
                                  450                      455                      460

Asn Met Thr Val Ser Met Thr Ser Asp Asn Ser Met His Val Lys Cys





