



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0092285
(43) 공개일자 2019년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0009135
(22) 출원일자 2019년01월24일
심사청구일자 2019년01월24일
(30) 우선권주장
1020180010901 2018년01월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
(주)에스엠티바이오
서울특별시 강남구 논현로114길 5, 2층(논현동, BNM빌딩)
(72) 발명자
정용윤
서울특별시 송파구 잠실로 88, 114동 204호(잠실동, 레이크팰리스)
정인혜
서울특별시 송파구 잠실로 88, 레이크팰리스 114-204
유다경
경기도 고양시 일산동구 일산로 74-17, 대방샤인밸리 616호
(74) 대리인
이재영

전체 청구항 수 : 총 32 항

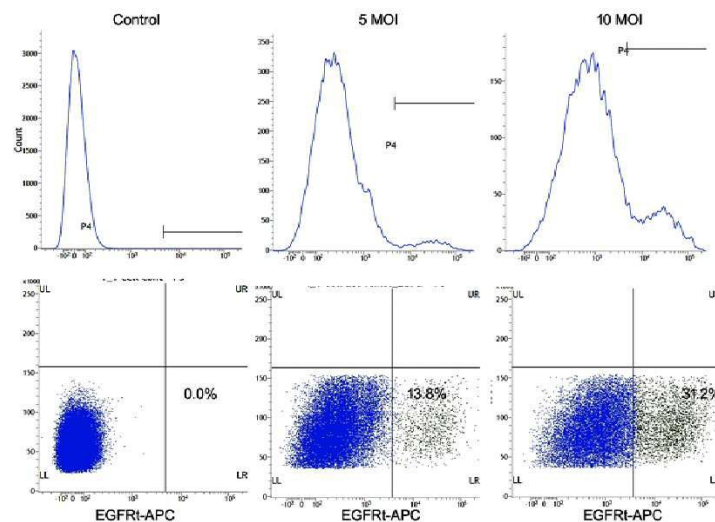
(54) 발명의 명칭 **췌장 또는 담관계암 치료를 위한 키메라 항원 수용체**

(57) 요약

본 발명은 신규한 키메라 항원 수용체와, 이의 용도로 췌장암 또는 담관계암 치료에 관한 것으로, 보다 상세하게는 항원 결합 도메인; 힌지 영역; 및 신호전달 도메인을 포함하며, 상기 항원 결합 도메인은 카보하이드레이트 항원 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9)에 결합하는 것인, 키메라 항원 수용체에 관한 것이다.

본 발명에서 제공하는 키메라 항원 수용체를 발현할 수 있도록 형질 전환된 T 세포 또는 NK세포는 췌장암 또는 담관계암 세포를 특이적으로 인식하고, 그 사멸을 유도하여 최종적으로는 췌장암 또는 담관계암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C07K 14/705 (2013.01)

C07K 14/71 (2013.01)

C12N 5/0637 (2013.01)

C12N 5/0646 (2013.01)

C07K 2317/53 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/50 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항원 결합 도메인; 힌지 영역; 및 신호전달 도메인을 포함하며, 상기 항원 결합 도메인은 카보하이드레이트 항원 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9)에 결합하는 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인은 서열번호 2로 표시되는 VH 도메인 및 서열번호 3으로 표시되는 VL 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 VH 도메인과 VL 도메인은 가요성 링커를 통해 연결되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 가요성 링커는 서열번호 4로 표시되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 신호 펩타이드(signal peptide)를 더 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 신호 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 n-터미널 CD8 α 신호 펩타이드(n-terminal CD8 α signal peptide)인, 키메라 항원 수용체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 힌지 영역은 CD-8 알파, CD28, 4-1BB, OX40, CD3 제타(ζ) 사슬의 전부 또는 일부, T 세포 수용체 α 또는 β 사슬, CD28, CD3 ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 이들의 기능적 유도체 또는 이들의 조합을 포함한 인간 단백질의 힌지 영역인, 키메라 항원 수용체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 힌지 영역은 서열번호 5로 표시되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 신호전달 도메인은 막통과 도메인을 더 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 막통과 도메인은 T 세포 수용체 α 또는 β 사슬, CD3 제타(ζ) 사슬의 전부 또는 일부, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 이들의 기능적 유도체 및 이들의 조합을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 막통과 도메인은 서열번호 6으로 표시되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 신호전달 도메인은 보조자극 도메인을 더 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 보조자극 도메인은 4-1BB (CD137), OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, 자연살해 그룹 2 멤버 C (NKG2C), 자연살해 그룹 2 멤버 (NKG2D), B7-H3, CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 또는 ICOS에 결합하는 리간드, 이들의 활성 단편, 이들의 기능 유도체, 및 이들의 조합을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 보조자극 도메인은 서열번호 7로 표시되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ)의 전부 또는 일부, 공통 FcR 감마 (FcER1G), Fc감마RIIIa, FcR베타 (Fc ϵ 1 β), CD3감마, CD3델타, CD3 ϵ , CD79a, CD79b, DNAX- 활성화 단백질 10 (DAP10), DNAX- 활성화 단백질 12 (DAP12), 이의 활성 단편, 이의 기능적 유도체 또는 이들의 조합을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 신호전달 도메인은 서열번호 8로 표시되는 폴리펩타이드를 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 서열번호 9로 표시되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 10으로 표시되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 20

제18항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 카세트.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 발현 카세트는 프로모터를 더 포함하는, 발현 카세트.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 프로모터는 SFFV 프로모터, 인간연장 인자 11 α (EF) 프로모터 또는 CAG 프로모터인, 발현 카세트.

청구항 23

제20항에 있어서,

상기 발현 카세트는 절단된 EGFR 유전자(EGFRt)를 부가 유전자로 더 포함하는, 발현 카세트.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드와 상기 절단된 EGFR 유전자는 절단 가능한 링커로 연결되는, 발현 카세트.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 절단 가능한 링커는 T2A 리보솜 스킵 요소인, 발현 카세트.

청구항 26

제20항의 발현 카세트를 포함하는, 벡터.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 벡터는 플라스미드, 트랜스포손, 코스미드 또는 바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 28

제26항에 있어서,

상기 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAC) 벡터, 렌티바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 시미안 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 또는 센다이 바이러스 벡터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스(EBV) 벡터 또는 HSV 벡터인, 벡터.

청구항 29

제26항의 벡터가 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 숙주 세포는 T 세포 또는 NK 세포인, 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 31

제29항의 숙주 세포를 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 암은 췌장암 또는 담관계암인, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 키메라 항원 수용체와, 이의 용도로 췌장암 또는 담관계암의 치료에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 췌장암은 췌장에 발생하는 암을 의미한다. 담관계암은 간에서 생성된 담즙이 배출되는 통로인 담관계에 발생하는 암을 총칭하는 것으로 간내담관암 (Intrahepatic cholangiocarcinoma), 간외담관암 (extrahepatic bile duct cancer), 담낭암(gallbladder cancer)과 바터팽대부암 (ampulla of Vater cancer)을 포함한다. 이들 암종은 기전상 암 줄기세포에서 발생하는 것으로 생각된다 (Sell and Dunsford Am J. Pathol. 134:1347-1363, 1989). 세계적으로 췌장담관계암의 발생은 국가와 지역에 따른 차이를 보인다. 췌장암의 경우에는 미주, 유럽 등 서구와 일본에서 보다 빈발하나 담관계암은 서구보다 국내에서 보다 호발한다. 췌장담관계암은 진행된 상태에서 발견되는 경우가 많아 외과적 절제율이 매우 낮고 절제 후에도 높은 재발율을 보이기 때문에 난치성 암종에 포함된다. 더구나, 항암화학요법이나 방사선요법에 대한 반응율이 낮은 특징을 가지며 (Pederson et al Cancer Res. 4325-4332, 1997), 이들 암종의 진단이 쉽지 않아 조기에 발견되는 비율이 낮아 예후가 극히 불량하다

[0003] 췌장담관계암이 발생하는 원인에는 유전적 요인과 후천적 요인이 있다. 유전적 요인은 여러 암발생에 관련된 유전자 변이에 의해 발생위험이 증가되는 경우가 해당하며, 후천적인 요인은 식습관, 만성염증, 발암물질에 대한 노출 등이 관여한다. 췌장담관계암의 발생에 관여하는 세포생물학 및 분자유전학적 기전이 많이 밝혀졌음에도 불구하고 암세포특이적 치료효과를 보일 수 있는 타겟분자는 별로 알려져 있지 않다.

[0004] 한편, 키메라 항원 수용체(이하 본 명세서에서는 이를 「CAR」라 약칭하는 경우가 있다)를 발현하는 T 세포(이하 본 명세서에서는 이를 「CAR-T 세포」라 약칭하는 경우가 있다)는, 암 세포의 표면에 특이적으로 발현되는 암 세포 표면 항원을 인식하는 수용체를 코딩하는 유전자를 T 세포에 도입하여 암 세포를 사멸시킬 수 있도록 유전자가 재조합된 T 세포를 의미한다. 이스라엘의 Weizmann Institute of Science의 화학자이면서 면역학자인 Dr. Zelig Eshhar 등이 암세포에서 특이적으로 발현하는 항원과 결합하는 수용체를 갖는 T세포를 인위적으로 만들면 암세포만 표적하여 면역반응을 일으켜 암세포를 죽일 수 있다는 지견을 도출하여, 키메라 항원 수용체를 장착한 T 세포를 만드는데 성공하였고 1989년 PNAS에 발표한 바 있다.

[0005] 그러나, 초창기에 제조된 CAR-T 세포, 즉 1세대 CAR-T 세포는 신호 전달 도메인으로서 CD3 ζ 만을 이용하였는데, 그 치료 효과가 미미했고, 또한, 지속시간도 짧다는 단점이 있었다. 이에, CAR-T 세포의 반응성을 향상시키기 위한 노력이 행해졌으며, 보조 자극 도메인(CD28 또는 CD137/4-1BB)과 CD3 ζ 를 결합한 2세대 CAR-T 세포가 제조되었는데 1세대 CAR-T 세포와 비교하여 체내에 잔존하는 CAR-T 세포의 수가 현저히 증가하였다. 한편, 2세대 CAR-T 세포는 한 가지의 보조 자극 도메인을 이용하였는데, 두 가지의 보조 자극 도메인을 이용하는 CAR-T 세포를 3세대 CAR-T라 지칭하며, 현재 연구는 2세대 및 3세대 CAR-T 세포에 집중되어 있다.

[0006] CAR-T 세포를 이용해서 암을 치료하는 방법과 관련하여, 3명의 말기 만성림프성백혈병(CCL, chronic lymphoid leukemia) 환자에게 CD19를 인지할 수 있도록 변형된 세포독성 T세포(Cytotoxic T cell)를 주사했더니, 그 중 2명에서 백혈병이 완전히 치료되었고, 그 상태가 10개월 정도 지속되었다는 보고가 있고, (N. Engl J Med 2011; 365:725-733 August 25, 2011, Sic. Transl. Med 2011 Aug 10;3(95):95ra73) 여기에서 사용된 CAR-T 세포는 2세대에 해당되는 것으로서 보조 자극 도메인으로서 4-1BB를, 신호 전달 도메인으로서 CD3 ζ 를 이용한 것이다. 상기 CAR-T 세포의 항원 결합 도메인은 백혈병 암세포의 표면에서 발견되는 CD19를 항원으로 인식한다.

[0007] 또한, 급성 백혈병 환자에게 CTL019를 투여하여 치료하였더니, 환자 30명중 27명이 완전 관해를 경험하였고, 전체 환자의 67%가 2년동안 완전 관해, 78%가 2년간 생존하였다는 보고가 있으며, 대상 환자가 재발성 혹은 불응성 환자였음을 고려한다면, 이는 매우 놀라운 것이다.(N Engl J Med 2014; 371:1507-1517, October 16, 2014)

[0008] 현재, 다양한 CAR-T 세포를 이용한 치료법에 대하여 lymphoma, myeloma 등 다양한 암을 대상으로 임상시험이 진

행중에 있고, 사용가능한 의약품으로서의 CAR-T 세포가 시장에 등장할 것으로 예상된다. CAR-T 세포를 이용한 암치료는 자가 유래 방식이어서 대량생산되는 제품은 아니지만, 환자 맞춤형으로서 그 치료효과가 기존의 항암제와 비교할 수 없을 정도로 높다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 일 목적은 췌장암 또는 담관계암의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 키메라 항원 수용체를 제공하고자 한다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 췌장암 또는 담관계의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 것으로 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포 또는 NK 세포를 제공하고자 한다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 T 세포 또는 NK 세포를 이용하여 췌장암 또는 담관계암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 항원 결합 도메인; 힌지 영역; 및 신호전달 도메인을 포함하며, 상기 항원 결합 도메인은 카보하이드레이트 항원 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9)에 결합하는 것인, 키메라 항원 수용체에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에서 상기 항원 결합 도메인은 서열번호 2로 표시되는 VH 도메인 및 서열번호 3으로 표시되는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 VH 도메인과 VL 도메인은 가요성 링커를 통해 연결될 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 가요성 링커는 서열번호 4로 표시될 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 키메라 항원 수용체는 신호 펩타이드(signal peptide)를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 신호 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 n-터미널 CD8 α 신호 펩타이드(n-terminal CD8 α signal peptide)일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 힌지 영역은 CD-8 알파, CD28, 4-1BB, OX40, CD3 제타(*?) 사슬의 전부 또는 일부, T 세포 수용체 α 또는 \hat{a} 사슬, CD28, CD3 ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 이들의 기능적 유도체 또는 이들의 조합을 포함한 인간 단백질의 힌지 영역일 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 힌지 영역은 서열번호 5로 표시될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 신호전달 도메인은 막통과 도메인을 더 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 막통과 도메인은 T 세포 수용체 α 또는 β 사슬, CD3 제타(\downarrow) 사슬의 전부 또는 일부, CD28, CD3 ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 이들의 기능적 유도체 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 막통과 도메인은 서열번호 6으로 표시될 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 상기 신호전달 도메인은 보조자극 도메인을 더 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 상기 보조자극 도메인은 4-1BB (CD137), OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, 자연살해 그룹 2 멤버 C (NKG2C), 자연살해 그룹 2 멤버 (NKG2D), B7-H3, CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 또는 ICOS에 결합하는 리간드, 이들의 활성 단편, 이들의 기능 유도체, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 보조자극 도메인은 서열번호 7로 표시될 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ)의 전부 또는 일부, 공통 FcR 감마 (FcER1G), Fc감마RIIIa,

FcR베타 (Fc ϵ 실론립), CD3감마, CD3델타, CD3 ϵ 실론, CD79a, CD79b, DNAX- 활성화 단백질 10 (DAP10), DNAX- 활성화 단백질 12 (DAP12), 이의 활성 단편, 이의 기능적 유도체 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 상기 신호전달 도메인은 서열번호 8로 표시되는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 키메라 항원 수용체는 서열번호 9로 표시될 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0032] 본 발명에서 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 10으로 표시될 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 카세트에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에서 상기 발현 카세트는 프로모터를 더 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 상기 프로모터는 SFFV 프로모터, 인간연장 인자 11 α (EF) 프로모터 또는 CAG 프로모터일 수 있다.

[0037] 본 발명에서 상기 발현 카세트는 절단된 EGFR 유전자(EGFRt)를 부가 유전자로 더 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 상기 폴리뉴클레오타이드와 상기 절단된 EGFR 유전자는 절단 가능한 링커로 연결될 수 있다.

[0039] 본 발명에서 상기 절단 가능한 링커는 T2A 리보솜 스킵 요소일 수 있다.

[0041] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 발현 카세트를 포함하는, 벡터에 관한 것이다.

[0042] 본 발명에서 상기 벡터는 플라스미드, 트랜스포손, 코스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있다.

[0043] 본 발명에서 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAC) 벡터, 렌티바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 시미안 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 또는 센다이 바이러스 벡터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스(EBV) 벡터 또는 HSV 벡터일 수 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 벡터가 형질 전환된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0046] 본 발명에서 상기 숙주 세포는 T 세포 또는 NK 세포일 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 숙주 세포를 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0049] 본 발명에서 상기 암은 췌장암 또는 담관계암일 수 있다.

발명의 효과

[0050] 본 발명에서 제공하는 키메라 항원 수용체를 발현할 수 있도록 형질 전환된 T 세포 또는 NK 세포는 췌장암 또는 담관계암 세포를 특이적으로 인식하고, 그 사멸을 유도하여 최종적으로는 췌장암 또는 담관계암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 키메라 항원 수용체의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 키메라 항원 수용체 카세트의 구조를 나타낸 것으로 개략적 구조와 췌장암 도암 세포막 특이 항원인 CA19-9을 타겟하기 위하여 제작된 CAR 콘스트럭트를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 실시예 1에서 벡터에 제한 효소 처리 후 전기 영동하여 제작 삽입된 키메라 항원 수용체 카세트

트를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 2에서 본 발명의 키메라 항원 수용체가 타겟하고자 하는 CA 19-9 세포막 항원이 체장 담도암 조직 세포주에서 발현되는 지 여부를 면역형광염색을 이용하여 분석한 것으로서, 여러 체장 담도암 조직 세포주에서 제작된 키메라 항원 수용체 카세트가 타겟하는 CA 19-9 항원에서의 발현을 나타내는 결과이다.

도 5는 본 발명의 실시예 3에서 유세포 분석기를 이용하여 말초혈액에서 분리한 T 세포의 순도를 확인한 결과를 나타낸 것이다. T 세포의 순도는 97~98% 로 확인되었다.

도 6은 본 발명의 실시예 3에서 유세포 분석기를 이용하여 말초혈액에서 분리한 활성화된 T 세포의 현미경 사진을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실시예 3에서 렌티바이러스(lentivirus)를 이용하여 제작된 키메라 항원 수용체 카세트가 T 세포에 안정적으로 형질 전환(transfection) 되었음을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 본 발명에서 달리 정의되지 않은 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 흔히 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 시험을 위해 실행 시 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본 명세서에 기재된다. 본 발명의 기재 및 청구 시, 하기 정의가 이용될 것이다. 본 명세서에서 사용된 전문용어는 제한인 것으로 의도되지 않고, 오히려 특정한 실시형태를 기술할 목적을 위해 본 명세서에서 사용되는 것으로 또한 이해될 것이다. 관사 "하나" 및 "일"은 관사의 문법상 목적어의 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나 또는 하나 이상)를 의미하도록 본 명세서에서 사용된다.
- [0053] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 항원 결합 도메인; 힌지 영역 (또는 스페이서); 및 신호전달 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명에서 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"이란 세포의 항원 결합 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 조작된 수용체를 의미한다. CAR의 가장 흔한 유형이 CD3 ζ 사슬과 같은 T 세포 동시수용체의 막통과 및 세포내 도메인에 융합된 단일 클론 항체로부터 유래된 단쇄 가변 단편(scFv)을 포함하지만, 본 명세서에 기재된 본 발명은 이들 도메인으로 제한되지 않는다. 오히려, 본 명세서에 사용된 바와 같은 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 임의의 세포 내 신호전달 분자를 발현하도록 조작된 임의의 수용체 및 이들에 융합되거나 연결된 세포의 항원 결합 도메인을 의미한다.
- [0055] 본 발명의 키메라 항원 수용체에서 상기 항원 결합 도메인의 다른 일 말단에 신호 펩타이드(signal peptide)를 더 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 상기 "신호 펩타이드"는 펩타이드 서열을 포함하는 데, 이는 임의의 분비된 또는 막통과 단백질의 일종 펩타이드로, 본 발명의 키메라 항원 수용체를 세포막 및 세포 표면으로의 수송을 지시하고, 본 발명의 키메라 항원 수용체의 정확한 위치 선정을 제공할 수 있다. 특히, 본 발명에서 상기 신호 펩타이드는 본 발명의 키메라 항원 수용체를 세포막에 지시시키고, 그 점에서 상기 키메라 항원 수용체의 세포 외 부분이 세포 표면 상에 표시되며, 막통과 부분이 원형질 막에 걸쳐 있고, 활성 도메인은 세포질 부분, 또는 세포의 내부에 있게 된다.
- [0057] 본 발명에서 상기 신호 펩타이드로는 상기의 기능을 하는 펩타이드라면 제한없이 사용될 수 있지만, 예를 들면, 서열번호 1로 표시되는 n-터미널 CD8 α 신호 펩타이드(n-terminal CD8 α signal peptide)일 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 상기 항원 결합 도메인은 카보하이드레이트 항원 19-9(carbohydrate antigen 19-9)을 특이적으로 인식할 수 있는 단쇄 가변 단편(scFv)를 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 상기 "단쇄 가변 단편" 또는 "scFv"란, VL과 VH 사이의 펩타이드 링커에 의한, 항체의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)의 융합 단백질을 의미한다.
- [0060] 본 발명에서 상기 항원 결합 도메인은 서열번호 2로 표시되는 VH 도메인 및 서열번호 3으로 표시되는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0061] 또한, 본 발명에서 상기 VH 도메인과 VL 도메인은 가요성 링커를 통해 연결될 수 있다. 본 발명에서 상기 가요성 링커는 약 10개 내지 30개의 아미노산(예를 들어, 30개, 25개, 20개, 19개, 18개, 17개, 16개, 15개, 14개,

13개, 12개, 11개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개 또는 5개의 아미노산)의 글라이신/세린 링커일 수 있고, 바람직하게는 15개의 아미노산 길이일 수 있다. 본 발명에서 상기 링커 길이는 키메라 항원 수용체의 중요한 결정부위로 작용할 수 있어, 상기 범위보다 더 짧은 링커는 친화도를 증대시킬 수 있지만, 또한 세포내 다합체 형성을 발생시켜 CAR의 발현을 손상시킬 수 있는 반면, 상기 범위보다 더 긴 링커는 VL 및 VH CDR을 공간상 더 멀리 이동시킴으로써 항원 친화도를 감소시킬 수 있다.

- [0062] 본 발명에서 상기 가요성 링커는 서열번호 4로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명에서 상기 힌지 영역은 항원 결합 도메인과 막통과 도메인을 연결하는 부분으로 '스페이서'라고도 불리우는데, T 세포막 또는 NK 세포막으로부터 항원 결합 도메인을 확장하기 위한 목적을 갖는다.
- [0064] 본 발명에서 상기 힌지 영역은 예를 들어 인간 또는 그의 일부를 포함하는 임의의 속으로부터의 임의의 적합한 서열로부터 얻어질 수 있으며, 혹은 본 기술분야에서 통상적으로 사용하는 CD-8 알파, CD28, 4-1BB, OX40, CD3 제타(ζ) 사슬의 전부 또는 일부, T 세포 수용체 α 또는 β 사슬, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 이들의 기능적 유도체 또는 이들의 조합을 포함한 인간 단백질의 힌지 영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 또한, 본 발명에서 상기 힌지 영역은 면역글로불린에 제한하지 않으면서 면역글로불린 (예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgD)으로부터 선택되는 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 본 발명에서 상기 힌지 영역은 서열번호 5로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 본 발명에서 상기 신호전달 도메인은 T 세포 내부에서 발견되거나 발견되도록 조작된 키메라 항원 수용체의 부분을 의미한다. 본 발명에서 상기 신호전달 도메인은 T 세포의 혈장 막에서 키메라 항원 수용체를 고정하는 역할을 하는 막통과 도메인을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 상기 막통과 도메인과 상기 신호전달 도메인은 동일한 단백질(예를 들어, CD3 ζ)로부터 유래할 수 있고, 혹은 상기 막통과 도메인과 상기 신호전달 도메인은 상이한 단백질(예를 들어, CD28의 막관통 도메인 및 CD3 ζ 분자의 세포내 신호전달 도메인, 또는 그 반대)로부터 유래할 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 상기 막통과 도메인은 세포막에 걸친 소수성 폴리펩타이드를 포함한다. 특히, 막통과 도메인은 세포막의 한면 (세포 외)에서 세포막의 다른면 (세포 내 또는 세포질)을 통하여 걸쳐 있을 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 상기 막통과 도메인은 알파 나선 또는 베타 배럴, 또는 이들의 조합의 형태일 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 막통과 도메인은 다수의 막통과 조각, 각 알파-나선형, 베타 시트, 또는 이들의 조합을 갖는 다원 단백질을 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 상기 막통과 도메인으로서는, 예를 들면 T 세포 수용체 α 또는 β 사슬, CD3 제타(ζ) 사슬의 전부 또는 일부, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 이들의 기능적 유도체 및 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 본 발명에서 상기 막통과 도메인으로 예를 들어 인공적으로 설계된 것은 주로 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체는 합성 막 변이 도메인의 각 말단에서 발견될 수 있다.
- [0073] 본 발명에서 상기 막통과 도메인은 서열번호 6으로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명에서 상기 막통과 도메인과 상기 신호전달 도메인 사이에 적어도 하나의 보조자극 도메인을 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 보조자극 도메인은 보조자극 신호가 전달되는 부위로서 항원 결합 도메인과 결합한 특정 항원을 인식한 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포가 면역반응을 일으키며 자가 증식을 돕고, 체내에 잔존하는 시간을 늘리도록 신호를 전달하는 역할을 할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 보조자극 도메인은 4-1BB (CD137), OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, 자연살해 그룹 2 멤버 C (NKG2C), 자연살해 그룹 2 멤버 (NKG2D), B7-H3, CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) 또는 ICOS에 결합하는 리간드, 이들의 활성 단편, 이들의 기능 유도체, 및 이들의 조합을 포함하는 폴리펩타이드로부터 유래한 기능 신호전달 도메인을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명에서 상기 보조자극 도메인은 서열번호 7로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명에서 상기 신호전달 도메인은 면역세포 신호전달 경로의 적어도 일부 면을 자극 또는 활성화시키기 위해

면역세포의 활성화를 제공하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

- [0078] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ)의 전부 또는 일부, 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), 이의 활성 단편, 이의 기능적 유도체 및 이들의 조합을 포함하는 폴리펩타이드로부터 유래한 기능 신호전달 도메인을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 이러한 신호 전달 도메인은 당업계에 공지되어 있다.
- [0079] 본 발명에서 상기 신호전달 도메인은 서열번호 8로 표시되는 폴리펩타이드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 키메라 항원 수용체의 구조를 개략적으로 나타낸 것으로, 상기 키메라 항원 수용체는 서열번호 9로 표시되는 폴리펩타이드로, n-터미널 CD8 α 신호 펩타이드(signal peptide)-CA 19-9 특이적 단쇄 가변 단편(scFv)-CD8 힌지-CD28 막통과 도메인-4-1BB-CD3 ζ 로 구성될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명에서 상기 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리 뉴클레오타이드는 임의의 재래적인 방법에 의해 특정된 키메라 항원 수용체의 아미노산 서열로부터 용이하게 제조된다. 아미노산 서열을 부호화하는 염기 서열은 앞서 말한 NCBI RefSeq ID 또는 GenBank의 가입 번호로부터 각 도메인의 아미노산 서열에 대해 얻을 수 있으며, 본 공개의 핵산은 표준 분자 생물학적 및/또는 화학적 절차를 사용하여 제작될 수 있다. 예를 들어, 염기 서열에 기초한 폴리 뉴클레오타이드는 합성될 수 있고, 중합효소연쇄반응 (PCR)을 이용하여 cDNA 라이브러리로부터 얻은 DNA 단편을 조합하는 것을 통해 본 공개의 폴리뉴클레오타이드를 제조할 수 있다.
- [0083] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 유전자 또는 발현 또는 클로닝 카세트의 일부일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0084] 본 발명에서 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 사슬로서 정의된다. 폴리뉴클레오타이드는 DNA 및 RNA를 포함한다. 더욱이, 핵산은 뉴클레오타이드의 중합체이다. 따라서, 여기서 사용된 핵산 및 폴리 뉴클레오타이드는 상호 교환 가능하다. 당업계의 기술자는 핵산이 폴리뉴클레오타이드이고 이것이 단량체 "뉴클레오타이드"로 가수 분해될 수 있다는 일반적인 지식을 갖는다. 단량체 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드로 가수 분해될 수 있다. 여기서 사용된 폴리뉴클레오타이드는 제한없는 제조법 수단, 즉 통상적인 클로닝 기술 및 중합 효소 연쇄 반응 (PCR) 등을 사용한 제조법 라이브러리 또는 세포유전체로부터의 핵산 서열 클로닝을 포함하는 당업계에서 이용 가능한 임의의 수단 그리고 합성 수단에 의해 획득된 모든 핵산 서열을 포함 하나 그것에 국한되는 것이 아니다.
- [0085] 본 발명에서 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 10으로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0087] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 카세트 (cassette)에 관한 것이다.
- [0088] 본 발명의 발현 카세트는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절할 수 있는 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결요소 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 등과 같은 발현 제어 서열을 포함할 수 있다.
- [0089] 본 발명에서 상기 프로모터로는 예를 들어, SFFV 프로모터, 인간간장 인자 11 α (EF) 프로모터 또는 CAG (CMV 증강인자를 갖는 닭 베타-액틴 프로모터) 프로모터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0090] 본 발명의 발현 카세트는 그 발현을 모니터링하는 데 유용한 추가 서열로, 절단된 EGFR 유전자(EGFRt)를 부가 유전자로 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 EGFRt는 비-면역성 선별 툴(tool)로, 예를 들면, 비오티닐화된 세톡시맵(biotinylated cetuximab)과 항-비오티딘 마이크로비드를 이용한 면역자기 선별(immunomagnetic selection) 시 EGFRt-를 포함하는 카세트가 형질 전환된 T 세포 또는 NK 세포를 선별하는 데에 활용될 수 있을 뿐만 아니라, T 세포 또는 NK 세포 추적을 위한 유세포 분석 시 추적 마커로 사용할 수 있으며, 세톡시맵/얼비투스® 중재 항체 의존적 세포 상해 활성(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 경로를 통한 자살 유전자로 활용될 수 있다.
- [0091] 본 발명에서 상기 절단된 EGFRt는 서열번호 11로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0092] 또한, 본 발명에서 상기 절단된 EGFRt과 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 신호전달 도메인의 일 말단과 절단 가능한 링커인 리보솜 스킵 요소에 의해 연결될 수 있다.
- [0093] 본 발명에서 상기 "리보솜 스킵"이란 특이적 펩타이드가 새로운 삽입된 아미노산을 공유로 연결하는 것으로부터 세포의 리보솜을 막고, 대신에 이것이 계속해서 번역되는 것을 허용하여서 폴리단백질의 동시번역 절단을 생성시키는, 번역의 대안적인 기전을 의미한다. 이 과정은 "2A 리보솜 스킵" 요소 또는 시스 작용 하이드롤라제 요소(예를 들어, CHYSEL 서열)에 의해 유도된다. 몇몇 실시형태에서, 이 서열은 강한 알파 나선 경향을 가지는 비보존적 아미노산 서열, 이어서 공통 서열 -D(V/I)ExNPG P(여기서, x는 임의의 아미노산임)를 포함한다. G와 P 사이에 명확한 절단이 발생한다. 본 발명에서 상기 리보솜 스킵 요소는 2A 리보솜 스킵 요소일 수 있고, 바람직하게는 5' T2A 리보솜 스킵 요소일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명에서 상기 절단 가능한 링커는 서열번호 12로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 키메라 항원 수용체 카세트의 구조를 개략적으로 나타낸 것으로, 상기 키메라 항원 수용체 카세트는 서열번호 13으로 표시되는 폴리뉴클레오타이드로, EF-1 α 프로모터-n-터미널 CD8 α 신호 펩타이드(signal peptide)-CA 19-9 특이적 단쇄 가변 단편(scFv)-CD8 힌지-CD28 막통과 도메인-4-1BB-CD3 ζ -T2A를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 구성될 수 있고, 혹은 서열번호 14로 표시되는 폴리뉴클레오타이드로, EF-1 α 프로모터-n-터미널 CD8 α 신호 펩타이드(signal peptide)-CA 19-9 특이적 단쇄 가변 단편(scFv)-CD8 힌지-CD28 막통과 도메인-4-1BB-CD3 ζ -T2A-EGFRt를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 구성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0096]
- [0097] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 발현 카세트를 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0098] 본 발명에서 상기 벡터로는 예를 들어, 플라스미드, 트랜스포손, 코스미드 또는 바이러스 벡터(예를 들면, 파아지, 레트로바이러스, 렌티바이러스 또는 아데노바이러스)를 사용할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터(온코레트로바이러스(oncoretrovirus) 벡터, 렌티바이러스 벡터, 및 슈도 타입 벡터 포함), 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAC) 벡터, 렌티바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 시미안 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 또는 센다이 바이러스 벡터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스(EBV) 벡터 또는 HSV 벡터를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0101] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 벡터가 형질 전환된 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0102] 본 발명에서 용어 "숙주 세포"란 발현 벡터를 함유할 수 있는 임의의 유형의 세포를 말한다. 숙주 세포는 진핵 생물 세포(예를 들면, 식물, 동물, 진균 또는 조류(algae)), 원핵생물 세포(예를 들면, 세균 또는 원생동물) 또는 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 또는 "기성 제품(off-the-shelf)" 세포 또는 1차 세포(즉, 대상체로부터 직접 분리됨)일 수 있다. 숙주 세포는 부착성 세포 또는 현탁된 세포, 즉, 현탁액 중에서 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면, DH5 α 이. 콜라이(E. coli) 세포, 차이니스 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, 및 HEK293 세포 등이 포함된다. 재조합 발현 벡터를 증폭시키거나 복제할 목적을 위해, 숙주 세포는 원핵 생물 세포, 예를 들면, DH5 α 세포일 수 있다. 또한, 본 발명에서는 재조합체 CAR을 생산할 목적을 위해, 상기 숙주 세포는 포유동물 세포, 바람직하게는 인간 세포일 수 있다. 본 발명에서 상기 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있고, 임의의 유형의 조직으로부터 유래될 수 있고, 임의의 발달 단계의 것으로, 예를 들면, 체액, 조직 또는 기관, 예를 들면, 혈액(말초혈, 제대혈 등) 또는 골수로부터 수집되거나, 분리되거나, 정제되거나, 또는 유도된 세포를 사용할 수 있다.
- [0103] 본 발명에서 상기 숙주 세포로는 면역 세포[T 세포, 수지상 세포, B 세포, 조혈 줄기세포, 대식세포, 단핵구, NK 세포 또는 조혈 세포(호중구, 호염구)], 말초혈액단핵구(PBMC), 제대혈 단핵구 세포, 섬유아세포, 전구체 지방세포, 간세포, 피부 각질세포, 간염성 줄기세포, 지방 줄기세포, 또는 각종 암 세포주를 사용할 수 있고, 바람직하게는 T 세포, 보다 바람직하게는 CD4+, CD8+ T 세포, 및 이펙터 T 세포, 기억 T 세포, 또는 조절 T 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 포유동물 숙주 세포를 선택하는 방법 및 세포의 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝 및 정제 방법은 당업계에 공지되어 있다.

- [0105] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 형질 전환된 숙주 세포로부터 발현되는 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0106] 본 발명에서 상기 숙주 세포로부터 발현되는 폴리펩티드는 서열번호 15로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0108] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 형질 전환된 숙주 세포를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0109] 본 발명에서 제공하는 형질 전환된 숙주 세포, 바람직하게는 형질 전환된 T 세포 또는 NK 세포를 사용하는 경우 암 세포 중에서도 특히, 췌장암 또는 담관계암 세포를 특이적으로 인식 및 사멸시켜, 췌장암 또는 담관계암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0110] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0111] 본 발명에서 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 증상이 호전 또는 이렇게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0112] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학 조성물로 제제화할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술 분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 약학 조성물은 액제, 현탁제, 분산액, 유제, 겔제, 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있으며, 바람직하게는 주사제가 될 수 있다.
- [0114] 본 발명의 약학 조성물을 주사제로 제제화하는 경우, 주사제 처방의 유통에 따른 제품 안정성을 확보하기 위하여 주사제로 사용 가능한 산수용액 또는 인산염 등의 완충용액을 사용하여 pH를 조절함으로써 물리적으로나 화학적으로 매우 안정한 주사제로 제조될 수 있다.
- [0115] 보다 구체적으로, 상기 주사제는 안정화제 또는 용해 보조제와 함께 주사용수에 용해시킨 후, 멸균처리, 특히 고온감압멸균법 또는 무균여과법에 의해 멸균처리하여 제조될 수 있다. 상기 주사용수로는 주사용 증류수 또는 주사용 완충용액, 예를 들어 pH 3.5 내지 7.5 범위의 인산염 완충용액 또는 인산이수소나트륨(NaH_2PO_4)-구연산 완충용액을 사용할 수 있다. 사용되는 인산염은 나트륨염 또는 칼륨염 형태이거나 무수물 또는 수화물 형태이어도 무방하고, 구연산 또는 무수물 또는 수화물 형태이어도 무방하다.
- [0116] 또한, 본 발명에서 사용되는 안정화제는 나트륨 피로설파이트(sodium pyrosulfite), 중아황산나트륨(NaHSO_3), 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid)을 포함하고, 용해 보조제는 수산화나트륨(NaOH), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(NaCO_3) 또는 수산화칼륨(KOH)과 같은 염기, 또는 염산(HCl) 또는 아세트산(CH_3COOH)과 같은 산을 포함한다.
- [0117] 본 발명에 따른 주사제는 생체흡수성, 생체 분해성, 생체적합성으로 제형화될 수 있다. 생체흡수성이라 함은 주사제가 체내에서, 분산된 주사제의 분해 또는 분해 없이, 초기 적용에서 사라질 수 있음을 의미하는 것이다. 생체 분해성은 가수분해 또는 효소 분해에 의해 주사제가 체내에서 과쇄 또는 분해될 수 있음을 의미한다. 생체적합성은 성분 모두가 체내에서 무독성임을 의미한다.
- [0118] 본 발명에 따른 주사제는 통상의 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 계면활성제 등의 희석제, 또는 부형제 등을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0119] 본 발명의 조성물 또는 유효성분은 목적에 따라 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 피하,

자궁내 경막, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로 등을 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 정맥내로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물 또는 유효성분은 주사 또는 카테터로 투여될 수 있다.

[0120] 본 발명의 조성물에 있어서, 유효성분의 투여량은 체중 60 kg 성인기준으로 상기 약학 조성물 내에 포함되는 형질 전환된 숙주 세포가 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{50}$ 개/ kg, 바람직하게는 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{30}$ 개/ kg, 보다 바람직하게는 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{20}$ 개/ kg, 가장 바람직하게는 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 개/ kg의 범위 내로 투여될 수 있도록 조절할 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0121] 본 발명의 약학 조성물에 있어서 유효성분은, 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량%로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.

[0122] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 1종 이상의 항암제를 더 포함할 수 있다.

[0123] 본 발명에서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조밂, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쿰알부, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투맙류세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르파, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레타민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0125] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0127] 실시예

[0129] [실시예 1] Lenti-K030517S-EGFRt-AT-Free의 제작

[0130] 서열번호 13으로 표시되는 EF-1 알파 프로모터-신호 펩타이드-CA19-9 결합 도메인(scFv)-CD8 힌지 영역-CD28 막 통과 도메인-4-1BB-CD3 ζ-T2A-EGFRt로 구성되는 1665bp 크기의 키메라 항원 수용체 카세트를 제작한 뒤, 이를 pCAR-EGFRt 렌티바이러스 벡터의 EcoRI/SmaI 위치에 삽입시켰다.

[0131] 이후 상기 키메라 항원 수용체 카세트가 벡터 내에 제대로 삽입되었는 지 확인하기 위하여, 상기 벡터에 EcoRI/BamHI 제한 효소를 처리한 뒤 겔 전기영동한 후 실시예 1에서 제작 삽입된 키메라 항원 수용체 카세트를 확인한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0132] 도 3에서 보는 바와 같이, pCAR-EGFRt 렌티바이러스 벡터의 EcoRI/SmaI 위치에 키메라 항원 수용체 카세트를 삽입하였으나, 삽입 후 SmaI 사이트(site)가 소멸되어 EcoRI//BamHI으로 확인한 결과를 볼 수 있었다.

- [0134] [실시예 2] 췌장암 세포주에서 상기 키메라 항원 수용체 카세트가 타겟하는 CA 19-9의 발현 분석
- [0135] 인체 유래 췌장암 세포주 BxPC3, Capan2, Cfpac, Hpac1, Miapaca2 및 Panc1에서 상기 실시예 1에서 제작된 키메라 항원 수용체가 타겟하는 CA 19-9 세포막 항원이 발현되는 지 확인하기 위하여 이하의 실험을 수행하였다. 1 X 2 cm 챔버 슬라이드(chamber slide)에 상기 각각의 췌장암 세포주를 1×10^4 씩 분주하여 챔버 바닥에 부착을 유도한 후 면역 형광 염색(immunofluorescence stain)을 수행하였다. 이때, CA 19-9 특이 항체는 Abcam 항-루이스 A 항체(anti-Lewis a antibody)를 이용하여 1:500의 희석배율로 실험하였다. PBS 용액으로 3회 세척 후 FITC-컨쥬게이트 항체(FITC-conjugated antibody) (1:500)를 2차 항체로 하여 1차 항체와 결합을 유도한 후 형광 현미경으로 관찰하여 그 사진을 도 4에 나타내었다.
- [0136] 그 결과 도 4에서 보는 바와 같이, 상기 키메라 항원 수용체 카세트가 타겟하는 CA 19-9의 세포막 항원은 상기 췌장 담도암 조직 세포주의 대략 70%에서 발현하는 결과를 보였다.
- [0137] 이로부터 본 발명에 따른 상기 키메라 항원 수용체 카세트가 삽입된 T 세포가 이들 암 세포주를 공격할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0139] [실시예 3] CA 19-9 세포막 항원을 타겟하는 키메라 항원 수용체가 발현된 T 세포(Anti CA19-9 CAR-T cell)
- [0140] 형질 도입(transduction)을 위해 사용할 렌티바이러스(lentivirus)의 생성을 위해 가장 수율이 높은 Lenti-X 293 FT 세포 (1×10^6)를 접종하여 밤새(overnight) 배양하였다. 배양 후 리포펙타민 3000 형질 도입 키트(lipofectamine 3000 transduction kit)를 이용하여 상기 실시예 1에서 제작한 Lenti-K030517S-EGFRt-AT-Free 플라스미드(plasmid)로 형질 전환을 시행하고 48 시간 동안 배양하여 293 FT 세포에서 렌티바이러스가 생성되도록 하였다.
- [0141] 한편, 말초 혈액에서 T 세포를 분리하여 유세포 분석기를 이용해 상기 T 세포의 순도를 확인하였고, 그 결과 도 5에 나타내었다. 분리된 T 세포를 CD3/CD28 macs 비드(bead)를 이용하여 활성화하여 24 시간을 배양하였고, 활성화 전, 후의 T 세포를 현미경으로 저배율(좌측)과 고배율(우측)로 관찰하여 그 결과는 도 6에 나타내었다.
- [0142] 도 5에서 보는 바와 같이 T 세포의 순도는 97~98% 로 확인되었으며, 도 6의 아랫 배열 현미경 사진에서 나타난 바와 같이, 많은 양의 활성화된 T 세포 (activated T cells)가 콜로니 (colony) 상태로 보이면서(갈색 부분) 성장하고 있음이 확인되었다.
- [0143] 상기와 같이 활성화되어 배양된 T 세포에서 얻어진 3×10^5 개의 T 세포에 렌티바이러스 입자를 각각 5 또는 10 MOI의 양으로 양성율을 비교하여 형질 도입을 수행하였다. 형질 도입의 수행 후 키메라 항원 수용체 카세트에 탑재된 EGFR 발현에 대한 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하여 EGFRt를 발현하는 세포 분획을 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0144] 도 7에서 보는 바와 같이 EGFRt 염색으로 형질 전환된 T 세포의 분석상 5 MOI에서는 13.8%, 10 MOI에서는 31.2%의 발현율을 보임으로써 CA19-9를 타겟하는 CAR-T 세포가 안정적으로 생성된 것을 확인할 수 있었다.
- [0145] 이를 통하여 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체가 높은 순도의 T 세포에서 안정적으로 삽입되어 상기 제작된 키메라 항원 수용체가 발현되고 있음을 알 수 있었다.
- [0146] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0148] [서열목록]
- [0149] 서열번호 1:
- [0150] MALPVTALLLPLALLHAARP
- [0151] 서열번호 2:
- [0152] QVQLVESGGGVQPGSLRLSCEASGFTFEAYAMHWVRQPPGKGLEWVSSINWNSGRIAYADSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRLEDTAIFYCAKDIRR

FSTGGAEFEYWGQGLTVTVSS

[0153] 서열번호 3:

[0154] QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNFVYWYQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCAAWDDSLGGHYVF
GTGTVTVL

[0155] 서열번호 4:

[0156] SGGSGGGSGGGGS

[0157] 서열번호 5:

[0158] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0159] 서열번호 6:

[0160] FWWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0161] 서열번호 7:

[0162] QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNFVYWYQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCAAWDDSLGGHYVF
GTGTVTVL

[0163] 서열번호 8:

[0164] RVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

[0165] 서열번호 9:

[0166] MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVESGGGSVQGRSLRLSCEASGFTFEAYAMHWVRQPPGKLEWVSSINWNSGRIAYADSVKGRFTISRDNARNLSLYL
QMNSLRLEDFAFYCAKDIRRFSTGGAEFEYWGQGLTVTVSSSSGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNFVYWYQLPGTAP
KLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCAAWDDSLGGHYVFGTGTGTVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDFWWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSS
SSNIGSNFVYWYQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCAAWDDSLGGHYVFGTGTGTVTVLRVKFSRSADAPAYKQ
QNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0167] 서열번호 10:

[0168] ATGGCCTTACAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCCGCAGGCCGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATCTGTGCAG
CCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGAAGCCTCCGGCTTACCTTTGAGGCCTACGCCATGCACTGGGTCCGACAGCCACCTGGCAAAGGCCTTGAATGG
GTGTCCAGCATCAACTGGAACAGCGCAGAAATCGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACGCCAGAAACAGCCTGTACCTG
CAGATGAACAGCCTGCGGCTGGAAGATACCGCCTTCTACTACTGCGCCAAGGACATCAGACGGTTTACGACAGGCGGAGCCGAGTTTGTAGTATTGGGGCCAG
GGAACCTGGTCACTGTTCTAGCGGCGGAGGTGAAGCGGAGCGGAGGTAGTGGTGGTGGCGGATCTCAGTCTGTGCTGACACAGCCTCCAAGCGCCTCT
GGAACACCTGGCCAGAGAGTGACCATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCAACATCGGCAGCAACTTCTGTACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGCACAGCCCT
AAACTGCTGATCTACCGAACAACAGCGGCTAGCGGCTGCCAGATAGATTTTCTGGCAGCAGAAGCGGCACCTCTGCCAGCCTGGCTATCTCTGGCCTG
AGAAGCGAGGACGAGGCCGACTATTATGCGCCGCTGGGATGATTCTCTCGGCGGCCACTATGTGTTTGGCACCGGCACCAAAGTGACCGTGCTTACCAG
ACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCTCGCAGCCCCGTGTCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGAC
ACGAGGGGGCTGACTTCGCTGTGATTTCTGGGTGCTGGTCTGTGGGCGGCGTGCTGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTT
TGGGTGAGGAGCAAGCGGAGCAGACTGTGCACAGCAGTACATGAACATGACCCCCGAGGCCTGGCCCCACCGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCT
CCCAGGGATTTCGCGCCTACCGGAGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCTGTATATATCAAAACAACATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA
GATGGCTGTAGTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGTGTAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGG
AAGAACCCTCAGGAAGCCTGTACAATGAATGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCGGAGGGGAAGGGG
CACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCATATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGAGGGCAGAGGCAGCCTGCTG
ACATGTGGCGACGTGAAGAGAACCCTGGCCCCATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCTGCAGCATCTCT

[0169] 서열번호 11:

[0170] ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTCGCAAAGTGTGTAACGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCC

ATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACT
CCTCCTCTGGATCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGTGATTAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCAT
GCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCC
CTAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAG
AAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCCTTGTGTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCCGAGCCC
AGGGACTGCGTCTCTTGGCGGAATGTACGCCGAGGCAGGAATGCGTGGACAAGTGAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAG
TGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCTGCCCTAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAAGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGC
CCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGCAGGAGTCATGGGAGAAAAACAACCCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCA
AACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTG
CTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG

[0171] 서열번호 12:

[0172] GAGGGCAGAGGCAGCCTGCTGACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGCCCC

[0173] 서열번호 13:

[0174] GAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAACGTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCC
CCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGA
AGTTGGGGGGAGGGGTTCGCAATTGAACCGGTGCCAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTATGTGCTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGG
GTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG
GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTAATTCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGT
GGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCCGCGTGCAGTATCGTTGG
CACCTTCGCGCCTGTCTCGTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAT
GCGGGCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGCGCGACGGGGCCGTGCGTCCAGCGCACATGTTCCGCGAGGCGGGCCCTGCGA
GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG
CTGGCCCGGTTCGGCACAGTTCGCTGAGCGGAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCG
GGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCTCAGCCGTGCTTATGTGACTCCACGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC
TCGAGCTTTTGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGG
CACTTGATGTAATTCCTTGAATTTGCCCTTTTGTAGTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAG
GTGTCGTGATTGCAATTCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCTGCGCTGGCCTTGCTGTCCACGCCGCCAGGCCGAGGTGCAGTGGTTGAATCT
GGCGGAGGATCTGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGAAGCCTCCGGCTTACCTTTGAGGCCTACGCCATGCAGTGGTCCGACAGCCACCT
GGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCAGCATCAACTGGAACAGCGCGAGAATCGCTACGCCACTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACGCC
AGAAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCTGGAAGATACCGCCTTCTACTACTGCGCAAGGACATCAGACGGTTCAGACAGGGCGAGCCGAG
TTTGAGTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTTTCTAGCGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGAGGTAGTGGTGGTGGCGGATCTCAGTCTGTGCTGACA
CAGCCTCAAGCGCCTCTGGAACACCTGGCCAGAGAGTGACCATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATCGGCAGCAACTTCGTGTACTGGTATCAGCAG
CTGCCCGGCACAGCCCCTAACTGTGTATCTACCGAACAACCAGCGCCTAGCGCGGTGCCAGATAGATTTTCTGGCAGCAGAAGCGGCACCTCTGCCAGC
CTGGCTATCTCTGGCCTGAGAAGCGAGGACGAGGCCGACTATTATGCGCCGCTGGGATGATTCTCTCGCGGCCACTATGTGTTTGGCACCGGCACCAAA
GTGACCGTGCTTACCACGACGCCAGCGCGGACCACCAACACCGCGCGCCACCATCGCTGCGAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCG
GCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGGTGCTGGTCTGTGGGCGGCGTGTGGCCTGCTACAGCCTGTGGTGACA
GTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAGGAGCAAGCGGAGCAGACTGTGTCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCGAGGCCTGGCCCCACCCGAAGCAC
TACCAGCCCTACGCCCCCTCCAGGGATTTGCGCCCTACCGAGCAAACGGGCGAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACAGTA
CAAATACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGTGTGAAGTGAAGTTTACGAGGAGCGCAGACGCCCCC
GCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAGGCGGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGCTCTAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCTGCCCCCTCGCGAG
GGCAGAGGCAGCCTGCTGACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGCCCC

[0175] 서열번호 14:

[0176] GAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAACGTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCC
CCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGA
AGTTGGGGGGAGGGGTTCGCAATTGAACCGGTGCCAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTATGTGCTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGG
GTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG

GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGT
GGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCCGCGTGCAGTATCGTGG
CACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTGTGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAT
GCGGGCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTGGGGCCGCGGCGGACGGGGCCGTGCGTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGA
GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG
CTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGACGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCG
GGTGAGTCAACACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGCTCCTCAGCCGTGCTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC
TCGAGCTTTTGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGG
CACTTGATGTAATCTCCTTGAATTTGCCCTTTTGAGTTTGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAG
GTGTCGTGATTGCAATTCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCCGCAGGCCGAGGTGCAGTGGTTGAATCT
GGCGGAGGATCTGTGCAGCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGAAGCCTCCGGCTTACCTTTGAGGCTACGCCATGCACTGGGTCCGACAGCCACCT
GGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCAGCATCAACTGGAACAGCGCAGAATCGCTACGCCACTCTGTGAAGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACGCC
AGAAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCTGGAAGATACCGCCTTCTACTACTGCGCAAGGACATCAGACGGTTCAGCACAGGCGGAGCCGAG
TTTGAGTATTGGGGCCAGGAACCTGGTCACCGTTTCTAGCGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGAGGTAGTGGTGGTGGCGGATCTCAGTCTGTGCTGACA
CAGCCTCCAAGCGCTCTGGAACACCTGGCCAGAGAGTGACCATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATCGGCAGCAACTTCGTGTACTGGTATCAGCAG
CTGCCCGGCACAGCCCTAACTGCTGATCTACCGAACAACCAGCGGCTAGCGCGGTGCCAGATAGATTTTCTGGCAGCAGAAGCGGCACCTTGCCAGC
CTGGCTATCTCTGGCCTGAGAAGCGAGGACGAGGCCGACTATTATTGCGCCGCTGGGATGATTCTCTCGCGGCCACTATGTGTTTGGCACCGGCACCAAA
GTGACCGTGCTTACCACGACGCCAGCGCGGACCAACACCGCGCGCCACCATCGCTGCGAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTCCCGGCCAGCG
GCGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGGTGCTGGTCTGTGGGCGCGTGTGGCCTGCTACAGCCTGTGGTGAACA
GTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAGGAGCAAGCGGAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCGAGGCCTGGCCCCACCCGAAGCAC
TACCAGCCCTACGCCCCCTCCAGGGATTTGCGCCCTACCGAGCAAACGGGCGAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACAGTA
CAAATACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGTGCAGATTTCAGAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC
GCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAAGTTGGGATGAAGGCGAG
CGCCGAGGGGCAAGGGGCAGATGGCCTTACCAGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGAGGCCTGCCCCCTCGCGAG
GGCAGAGGCAGCCTGCTGACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGCCCCATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCTGCAGCATCTCT
GAGGGCAGAGGCAGCCTGCTGACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGCCCCATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCTGCAGCATC
TCTCGCAAAGTGTGTAACGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAAAGTGCACCTCCATCAGT
GGCGATCTCCACATCTGCGGTGGCATTAGGGGTGACTCTTACACATACTCTCTCTGGATCCACAGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAA
ATCACAGGGTTTTTGTGATTAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATAACGGCAGGACCAAGCAACATGGT
CAGTTTTCTCTTGCACTGCTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTATGGAGATGTGATAATTTAGGAAACAAAAAT
TTGTGCTATGCAATACAATAAACTGAAAAAACTGTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACA
GGCCAGGTCTGCCATGCCTTGCTGCTCCCCGAGGGCTGTGGGGCCCGAGCCAGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTACGCCGAGGACAGGGAATGCGTG
GACAAGTGAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAAGTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATACC
TGCACAGGACGGGGACAGACAAGTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGCAGGAGTATGGGAGAAAAACAAC
ACCCTGGTCTGGAAGTACGACAGCGCCGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACG
AATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGCCCTCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG

[0177] 서열번호 15:

[0178] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGSVQPRSLRLSCEASGFTFEAYAMHWVRQPPGKLEWVSSIWNNSGRIAYADSVKGRFTISRDNARNSLYL
QMNSLRLEDFAFYCAKDIRRFSTGGAEFEYWGQGLTVLSSSSGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNFVYQQLPGTAP
KLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCAAWDDSLGGHYVFGTGKVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDFVWL VVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRPGPTRKHQYPYAPPRDFAAYRSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGS
SSNIGSNFVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCAAWDDSLGGHYVFGTGKVTVLRVKFSRSADAPAYKQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRDPEMGGKPRRNKPEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPREGRSL
LTCGDVEENPGPMWLQSLLLGTVACSIRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKFHNCTSI SGLDLHLPVAFRGDSFHTPLDPQLDILKTVEITGFL
IQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHA
LCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKY
ADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

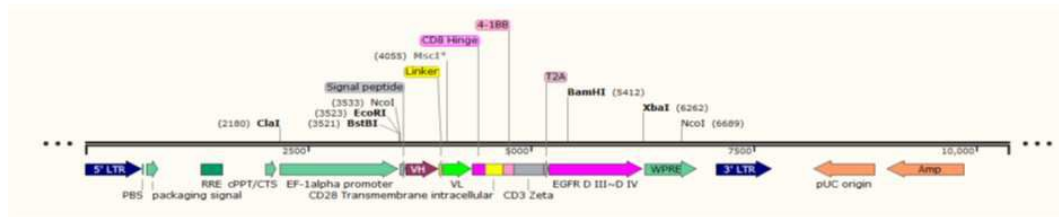
도면

도면1

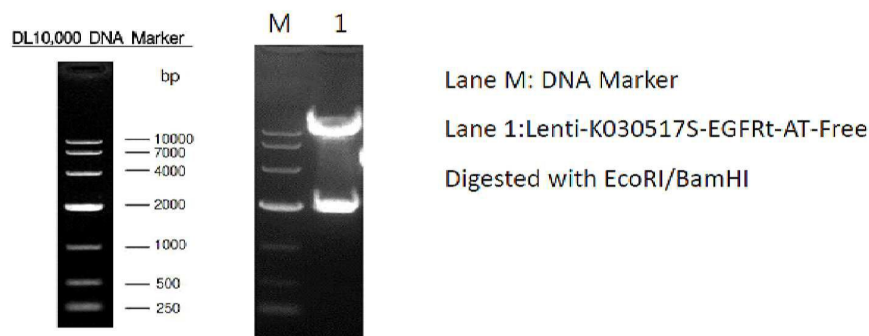
Signal peptide-scFv-CD8 hinge-CD28TM-4-1BB-CD3zeta

도면2

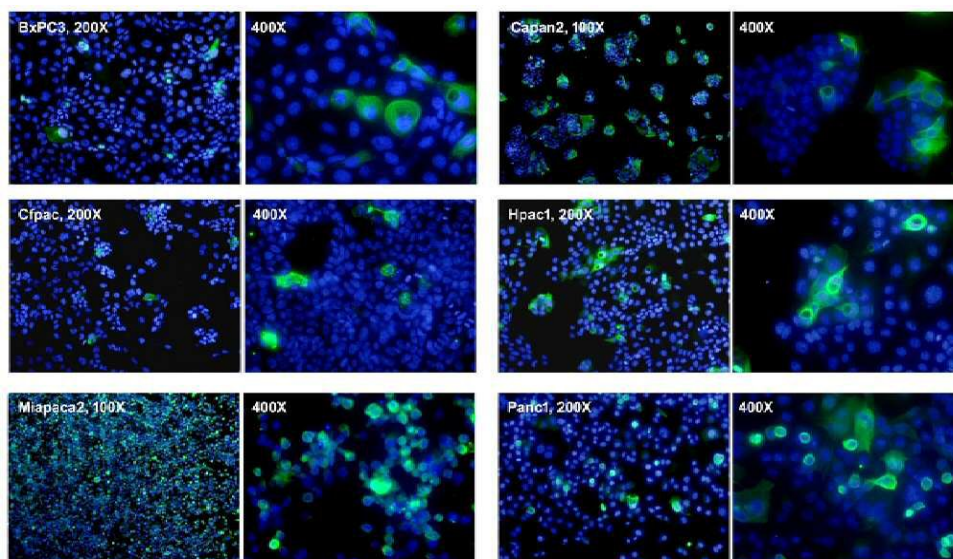
EF-1alpha promoter-signal peptide-scFv-CD8 hinge-CD28TM-4-1BB-CD3zeta-T2A-EGFRt



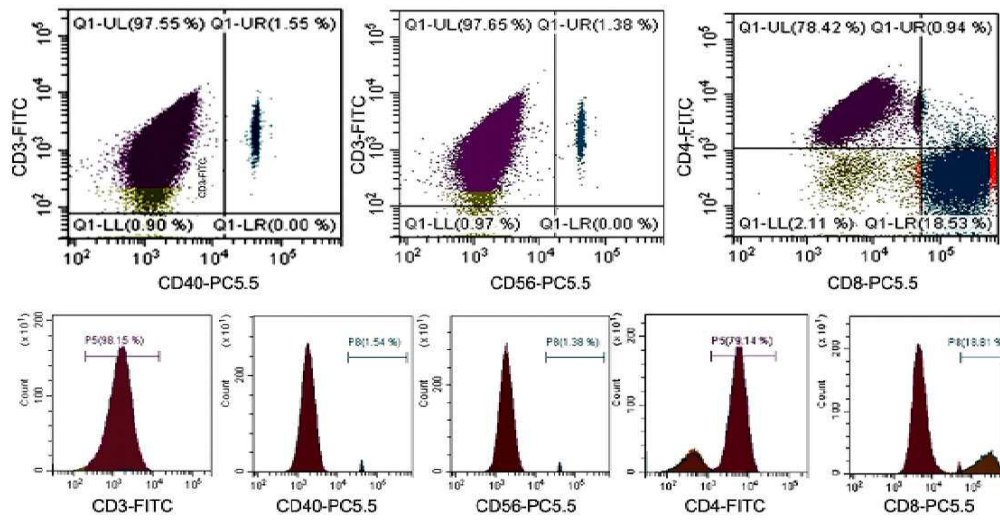
도면3



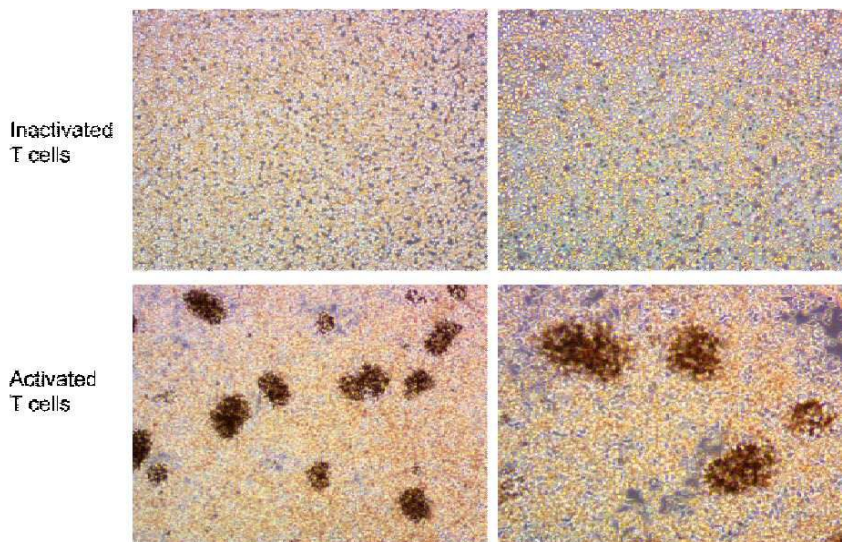
도면4



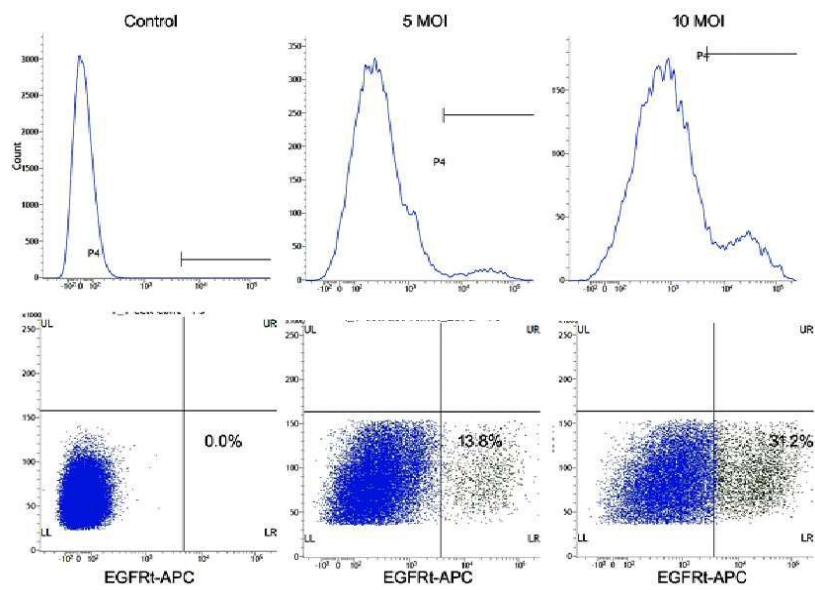
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> SMT bio
- <120> Chimera antigen receptors for treating pancreatic cancer or biliary tract cancer
- <130> DPB174278k01
- <150> KR 10-2018-0010901
- <151> 2018-01-29
- <160> 15
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> n-terminal CD8-alpha signal peptide
- <400> 1

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH domain

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Asn Trp Asn Ser Gly Arg Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL domain

<400> 3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Phe Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65

70

75

80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85

90

95

Gly Gly His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100

105

110

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

linker

<400> 4

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

1

5

10

15

<210> 5

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hinge region

<400> 5

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

<210> 6

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> transmembrane domain

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ala Tyr Arg Ser

65

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> co-stimulatory domain

<400> 7

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Phe Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Gly Gly His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105 110

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> signal transduction domain

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 9

<211> 606

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chimeric antigen receptor

<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 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50

55

60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Trp Asn Ser Gly Arg Ile Ala

65

70

75

80

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

85

90

95

Arg Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr

100

105

110

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

115

120

125

Ala Glu Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Phe

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser

225

230

235

240

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Gly

245

250

255

Gly His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Thr Thr

260

265

270

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln

275

280

285

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

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

 340 345 350
 Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His
 355 360 365
 Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln
 370 375 380
 Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg
 385 390 395 400
 Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Phe
 405 410 415

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

 485 490 495
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
 500 505 510
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 515 520 525
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 530 535 540
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

545	550	555	560
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg			
	565	570	575
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys			
	580	585	590
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	595	600	605
<210>	10		
<211>	1716		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	chimeric antigen receptor		
<400>	10		
atggccttac cagtaccgc cttgctctg ccgctggcct tgctgtcca cgccgccagg			60
ccgcagggtgc agctgggtga atctggcgga ggatctgtgc agcctggcag aagcctgaga			120
ctgagctgtg aagcctccgg cttcaccttt gaggcctacg ccatgcactg ggtccgacag			180
ccacctggca aaggccttga atgggtgtcc agcatcaact ggaacagcgg cagaatcgcc			240
tacgccgact ctgtgaaggg cagattcacc atcagccggg acaacgccag aaacagcctg			300
tacctgcaga tgaacagcct gcggctggaa gataccgct tctactactg cgccaaggac			360
atcagacggt tcagcacagg cggagccgag tttagattt ggggccaggg aaccctggtc			420
accgtttcta gcggcggagg tggaagcgga ggcggaggta gtggtggtgg cggatctcag			480
tctgtgctga cacagcctcc aagcgctct ggaacacctg gccagagagt gaccatcagc			540
tgtagcggca gcagcagcaa catcggcagc aacttcgtgt actggtatca gcagctgccc			600
ggcacagccc ctaaactgct gatctaccgg aacaaccagc ggcctagcgg cgtgccagat			660
agattttctg gcagcagaag cggcacctct gccagcctgg ctatctctgg cctgagaagc			720
gaggacgagg ccgactatta ttgcgccgc tgggatgatt ctctcgccgg ccactatgtg			780
tttggcaccg gcaccaaagt gaccgtgctt accacgacgc cagcgcgcg accaccaaca			840
ccggcgccca ccatcgctc gcagccctg tcctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg			900
gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgcct gtgatttctg ggtgctggtc			960
gttgtggcg gcgtgctggc ctgctacagc ctgctggtga cagtggcctt catcatcttt			1020
tgggtgagga gcaagcggag cagactgctg cacagcgact acatgaacat gaccccccg			1080

aggcctggcc ccacccggaa gcactaccag ccctacgccc ctcccaggga ttctgcccgc 1140
taccggagca aacggggcag aaagaaactc ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga 1200
ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa 1260
ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc aggagcgagc acgccccgcg gtacaagcag 1320
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 1380
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag 1440
gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 1500
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttaccagggt tctcagtaca 1560
gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg cgagggcaga 1620
ggcagcctgc tgacatgtgg cgacgtggaa gagaacctg gccccatgtg gctgcagagc 1680
ctgctgctct tgggcactgt ggctgcagc atctct 1716

<210> 11
<211> 1056
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFRt
<400> 11

atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tcgcaaagtg 60
tgtaacggaa taggtattgg tgaatttaaa gactcactct ccataaatgc tacgaatatt 120
aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt ggcatctcc acatcctgcc ggtggcattt 180
aggggtgact ccttcacaca tactctcct ctggatccac aggaactgga tattctgaaa 240
accgtaaagg aaatcacagg gtttttctg attcaggctt ggctgaaaa caggacggac 300
ctccatgctt ttgagaacct agaaatcata cgcggcagga ccaagcaaca tggtcagttt 360
tctcttgcag tcgtcagcct gaacataaca tccttgggat tacgtccct caaggagata 420
agtgatggag atgtgataat ttcaggaaac aaaaatttgt gctatgcaa tacaataaac 480
tggaaaaaac tgtttgggac ctccggtcag aaacacaaa ttataagcaa cagaggtgaa 540
aacagctgca aggccacagg ccaggtctgc catgccttgt gctccccga gggctgctgg 600
ggccccgagc ccagggactg cgtctcttgc cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg 660
gacaagtgca accttctgga ggggtgagcca agggagtgtg tggagaactc tgagtgcata 720
cagtgccacc cagagtgcct gcctcaggcc atgaacatca cctgcacagg acggggacca 780
gacaactgta tccagtgtgc ccactacatt gacggcccc actgcgtcaa gacctgcccc 840

gcaggagtca tgggagaaaa caacaccctg gtctggaagt acgcagacgc cggccatgtg	900
tgccacctgt gccatccaaa ctgcacctac ggatgactg ggccaggtct tgaaggctgt	960
ccaacgaatg ggcctaagat cccgtccatc gccactggga tggtaggggc cctcctcttg	1020
ctgctggtgg tggccctggg gatcggcctc ttcattg	1056
<210> 12	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> T2A linker	
<400> 12	
gagggcagag gcagcctgct gacatgtggc gacgtggaag agaaccctgg cccc	54
<210> 13	
<211> 3009	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> chimeric antigen receptor cassette	
<400> 13	
gagtaattca taaaaagga ctgccccctg ccttggggaa tcccaggac cgtcgttaaa	60
ctcccactaa cgtagaacct agagatcgct gcgttccgc cccctcacc gcccgctctc	120
gtcatcactg aggtggagaa gagcatgctg gaggtccgg tgcccgctcag tgggcagagc	180
gcacatcgcc cacagtcccc gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga accggtgcct	240
agagaaggtg gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgccttttc	300
ccgaggggtg gggagaaccg tatataagt cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca	360
acgggtttgc cgccagaaca caggttaagt ccgtgtgtg ttcccgcggg cctggcctct	420
ttacgggtta tggcccttgc gtgccttgaa ttacttcac gcccttggt gcagtacgtg	480
attcttgatc ccgagcttcg ggttggaagt gggtagggaga gttcaggcc ttgcgcttaa	540
ggagccctt cgcctcgtgc ttgagttgag gcctggcttg ggcgctggg ccgccgcgtg	600
cgaatctggt ggcaccttcg gcctgtctc gctgcttctg ataagtctct agccatttaa	660
aatttttgat gacctgtgc gacgttttt tcttggaag atagtcctgt aaatgcgggc	720
caagatctgc aactggtat ttcggttttt ggggccgagg gcggcgacgg ggcctgtgcg	780
tcccagcgca catgttcggc gaggcggggc ctgcgagcgc ggccaccgag aatcggacgg	840
gggtagtctc aagctggcgc gcctgtctg gtgcctggcc tcgcgccgc gtgtatcgcc	900

ccgccctggg cggcaaggct ggcccggctcg gcaccagttg cgtgagcgga aagatggccg	960
cttcccggcc ctgctgcagg gagctcaaaa tggaggacgc ggcgctcggg agagcgggcg	1020
ggtgagtcac ccacacaaag gaaaagggcc ttccgctcct cagccgtcgc ttcattgtac	1080
tccacggagt accgggcgcc gtccaggcac ctcgattagt tctcgagctt ttggagtacg	1140
tcgtcttttag gttgggggga ggggttttat gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg	1200
gagactgaag ttaggccagc ttggcacttg atgtaattct ccttgaatt tgcccttttt	1260
gagtttggat ctiggttcat tctcaagcct cagacagtgg ttcaaagttt ttttcttcca	1320
tttcaggtgt cgtgattcga attcatggcc ttaccagtga ccgcttgct cctgccgtg	1380
gccttgctgc tccacgcgc caggccgcag gtgcagctgg ttgaatctgg cggaggatct	1440
gtgcagcctg gcagaagcct gagactgagc tgtgaagcct ccggttcac ctttgaggcc	1500
tacgccatgc actgggtccg acagccacct ggcaaaggcc ttgaatgggt gtccagcatc	1560
aactggaaca gcggcagaat cgcctacgcc gactctgtga agggcagatt caccatcagc	1620
cgggacaacg ccagaaacag cctgtacctg cagatgaaca gcctgcggct ggaagatacc	1680
gccttctact actgcgcaa ggacatcaga cggttcagca caggcggagc cgagtttgag	1740
tattggggcc agggaacct ggtcacctt tctagcggcg gaggtggaag cggaggcggga	1800
ggtagtggtg gtggcggatc tcagtctgtg ctgacacagc ctccaagcgc ctctggaaca	1860
cctggccaga gattgacct cagctgtagc ggcagcagca gcaacatcgg cagcaacttc	1920
gtgtactggt atcagcagct gcccggcaca gccctaacc tgctgatcta ccggaacaac	1980
cagcggccta gcggcgtgcc agatagattt tctggcagca gaagcggcac ctctgccagc	2040
ctggctatct ctggcctgag aagcaggac gaggccgact attattgcgc cgcctgggat	2100
gattctctcg gcggccacta tgtgtttggc accggcacca aagtaccgt gcttaccacg	2160
acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgagcc cctgtccctg	2220
cggccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc	2280
gcctgtgatt tctgggtgct ggtcgttgtg ggcggcgtgc tggcctgcta cagcctgtg	2340
gtgacagtgg ctttcatcat cttttgggtg aggagcaagc ggagcagact gctgcacagc	2400
gactacatga acatgacccc ccggaggcct ggccccaccc ggaagcacta ccagccctac	2460
gccccccca gggatttcgc cgcctaccgg agcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat	2520
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc	2580
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc	2640
gcagacgccc ccgctacaa gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga	2700
cgaagagagg agtaccatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga	2760

aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataaatg 2820

gcggaggcct acagtgaatg tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 2880

ggcctttacc aggggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcctt tcacatgcag 2940

gccctgcccc ctgcgagggg cagaggcagc ctgctgacat gtggcgacgt ggaagagaac 3000

cctggcccc 3009

<210> 14

<211> 4170

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chimeric antigen receptor cassette

<400> 14

gagtaattca taaaaagga ctgccccctg ccttggggaa tcccaggac cgtcgttaaa 60

ctccactaa cgtagaaccc agagatcgct gcgttcccg cccctcacc gcccgctctc 120

gtcatcactg aggtggagaa gagcatgcgt gaggtccgg tgcccgctcag tgggcagagc 180

gcacatcgcc cacagtcccc gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga accggtgcct 240

agagaaggtg gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgcctttttc 300

ccgaggggtg gggagaaccg tatataagt cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca 360

acgggtttgc cgccagaaca caggtaagt cctgtgtgtg ttcccgcggt cctggcctct 420

ttacgggtta tggcccttgc gtgccttgaa ttacttccac gcccttggt gcagtacgtg 480

attcttgatc ccgagcttcg gggttgaagt gggtgggaga gttcgaggcc ttgcgcttaa 540

ggagccctt cgcctcgtgc ttgagttgag gcctggcttg ggcgtgggg ccgccgcgtg 600

cgaatctggt ggcaccttcg cgcctgtctc gctgctttcg ataagttct agccatttaa 660

aatttttgat gacctgtgc gacgttttt ttctggcaag atagtcctgt aaatgcgggc 720

caagatctgc aacttggtat ttcggttttt ggggccgcgg gcggcgacgg ggcctgtgcg 780

tcccagcgca catgttcggc gaggcggggc ctgcgagcgc ggccaccgag aatcggacgg 840

gggtagtctc aagctggcgg gcctgctctg gtgcctggcc tcgcgccgcc gtgtatcgcc 900

ccgccttggg cggcaaggct ggcccgttcg gcaccagttg cgtgagcgga aagatggccg 960

cttcccgccc ctgctgcagg gagtcaaaa tggaggacgc ggcgtcggg agagcgggcg 1020

ggtgagtcac ccacacaaag gaaaagggcc ttccgtcct cagccgtcgc ttcattgtac 1080

tccacggagt accgggcgcc gtccaggcac ctgattagt tctcagctt ttggagtacg 1140

tcgtctttag gtgggggga ggggttttat gcgatggagt ttcccccac tgagtgggtg 1200

gagactgaag ttaggccagc ttggcacttg atgtaattct ccttgggaatt tgcccttttt	1260
gagtttggat cttaggttcat tctcaagcct cagacagtgg ttcaaagttt ttttttcca	1320
tttcagggtg cgtgattcga attcatggcc ttaccagtga ccgcttgcct cctgccgctg	1380
gccttgctgc tccacgccgc caggccgcag gtgcagctgg ttgaatctgg cggaggatct	1440
gtgcagcctg gcagaagcct gagactgagc tgtgaagcct ccggtttcac ctttgaggcc	1500
tacgccatgc actgggtccg acagccacct ggcaaaggcc ttgaatgggt gtccagcatc	1560
aactggaaca gcggcagaat cgcctacgcc gactctgtga agggcagatt caccatcagc	1620
cgggacaacg ccagaaacag cctgtacctg cagatgaaca gcctgcggct ggaagatacc	1680
gccttctact actgcgcaa ggacatcaga cggttcagca caggcggagc cgagtttgag	1740
tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtt tctagcggcg gagtggaag cggaggcggga	1800
ggtagtggtg gtggcggatc tcagtctgtg ctgacacagc ctccaagcgc ctctggaaca	1860
cctggccaga gagtgacct cagctgtagc ggacagcagc gcaacatcgg cagcaacttc	1920
gtgtactggt atcagcagct gcccggcaca gccctaaac tgctgatcta ccggaacaac	1980
cagcggccta gcggcggtgc agatagattt tctggcagca gaagcggcac ctctgccagc	2040
ctggctatct ctggcctgag aagcaggagc gagggcgact attattgcgc cgcctgggat	2100
gattctctcg gcggccacta tgtgtttggc accggcacca aagtaccgt gcttaccacg	2160
acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg ccacacatcg cgtcgcagcc cctgtccctg	2220
cgcacagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgagtgac acacaggagg gctggacttc	2280
gcctgtgatt tctgggtgct ggtcgtttgt ggcggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg	2340
gtgacagtgg ccttcatcat cttttgggtg aggagcaagc ggagcagact gctgcacagc	2400
gactacatga acatgacccc ccggaggcct ggccccaccc ggaagcacta ccagccctac	2460
gccccccca gggatttcgc cgcctaccgg agcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat	2520
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc	2580
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc	2640
gcagacgccc ccgctataca gcagggccag aaccagctct ataacagct caatctagga	2700
cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga	2760
aagccagaaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg	2820
gcggaggcct acagtgaagt tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat	2880
ggcctttacc aggttctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcct tcacatgcag	2940

gccctgcccc ctgcgaggg cagaggcagc ctgctgacat gtggcgacgt ggaagagaac 3000

cttgccccca tgtggctgca gagcctgctg ctcttgggca ctgtggcctg cagcatctct 3060

gagggcagag gcagcctgct gacatgtggc gacgtggaag agaaccctgg ccccatgtgg 3120

ctgcagagcc tgctgctctt gggcactgtg gcctgcagca tctctcgca agtgtgtaac 3180

ggaataggta ttggtgaatt taaagactca ctctccataa atgctacgaa tattaaacac 3240

ttcaaaaact gcacctccat cagtggcgat ctccacatcc tgccggtggc atttaggggt 3300

gactccttca cacatactcc tctctggat ccacaggaac tggatattct gaaaaccgta 3360

aaggaaatca cagggttttt gctgattcag gcttggcctg aaaacaggac ggacctccat 3420

gcctttgaga acctagaaat catacgcggc aggaccaagc aacatggtca gttttctctt 3480

gcagtcgtca gcctgaacat aacatccttg ggattacgct ccctcaagga gataagtgat 3540

ggagatgtga taatttcagg aaacaaaaat ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa 3600

aaactgtttg ggacctcgg tcagaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaaacagc 3660

tgcaaggcca caggccaggt ctgccatgcc ttgtgctccc ccgagggtg ctggggcccc 3720

gagcccaggg actgcgtctc ttgccggaat gtcagccgag gcagggaatg cgtggacaag 3780

tgcaaccttc tggagggtga gccaaaggag ttgtggaga actctgagtg catacagtgc 3840

caccagagt gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca caggacgggg accagacaac 3900

tgtatccagt gtgcccacta cattgacggc cccactgcg tcaagacctg cccggcagga 3960

gtcatgggag aaaacaacac cctggtcttg aagtacgag acgccggcca tgtgtgccac 4020

ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actgggccag gtcttgaagg ctgtccaacg 4080

aatgggccta agatcccgtc catcgccact ggcatggtgg gggccctcct ctgtctgtg 4140

gtggtggccc tggggatcgg cctcttcatg 4170

<210> 15

<211> 976

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

20 25 30

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe
35 40 45

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

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Trp Asn Ser Gly Arg Ile Ala
65 70 75 80

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

Arg Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Arg Phe Ser Thr Gly Gly
115 120 125

Ala Glu Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
145 150 155 160

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

Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Phe
180 185 190

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

195 200 205

Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
210 215 220

Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser
225 230 235 240

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Gly
245 250 255

Gly His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Thr Thr
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln

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

 340 345 350
 Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His
 355 360 365
 Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln
 370 375 380
 Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg
 385 390 395 400
 Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Phe
 405 410 415

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

 485 490 495
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
 500 505 510
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 515 520 525
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg

530 535 540
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 545 550 555 560

 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 565 570 575
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 580 585 590
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Glu Gly
 595 600 605
 Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 610 615 620
 Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

 625 630 635 640
 Ser Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser
 645 650 655
 Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
 660 665 670
 Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
 675 680 685
 Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
 690 695 700

 Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
 705 710 715 720
 Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
 725 730 735
 Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
 740 745 750
 Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
 755 760 765
 Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn

 770 775 780

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
 785 790 795 800
 Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
 805 810 815
 Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val
 820 825 830
 Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
 835 840 845

 Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
 850 855 860
 Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr
 865 870 875 880
 Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
 885 890 895
 Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
 900 905 910
 Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys

 915 920 925
 His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
 930 935 940
 Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
 945 950 955 960
 Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
 965 970 975