



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월21일

(11) 등록번호 10-2771979

(24) 등록일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 35/17* (2025.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/241 (2013.01)
A61K 35/17 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2018-7015353
(22) 출원일자(국제) 2016년10월28일
심사청구일자 2021년10월13일
(85) 번역문제출일자 2018년05월30일
(65) 공개번호 10-2018-0092947
(43) 공개일자 2018년08월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/059444
(87) 국제공개번호 WO 2017/075433
국제공개일자 2017년05월04일
(30) 우선권주장
62/248,685 2015년10월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02013123061 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
더 리전즈 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 캘리포니아주 94607 오클랜드 프랭클린 스트리트 1111 12층
(72) 발명자
천, 이보네 유-슈안
미국, 캘리포니아주 94607-5200, 오클랜드, 프랭클린 스트리트 1111 12층, 더 리전즈 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 내
창, 제난 리
미국, 캘리포니아주 94607-5200, 오클랜드, 프랭클린 스트리트 1111 12층, 더 리전즈 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 내
(74) 대리인
특허법인지평

전체 청구항 수 : 총 17 항

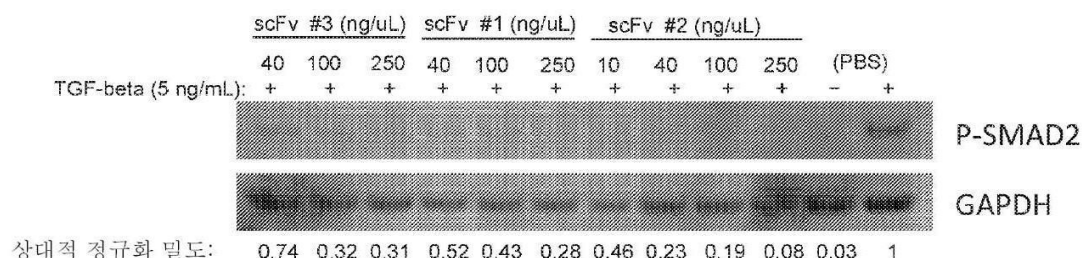
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 형질 전환 성장 인자-베타-반응성 폴리펩티드 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명의 측면들은 신호 펩타이드, TGF- β 에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인, 펩타이드 스페이서, 막관통 도메인, 및 엔도도메인을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이다. 세포에서 발현될 때, 폴리펩타이드는 TGF- β 를 중화시킬 수 있을 뿐만 아니라 TGF- β 의 존재 시에 T-세포 활성화를 특이적으로 유발할 수 있다. T-세포 활성화는 면역 세포를 자극하여 면역자극성 사이토카인을 생산하고 증식하여, TGF- β 를 면역억제성 신호에서 활성 자극으로 전환시킨다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
C12N 5/0636 (2025.01)
C07K 2317/53 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/624 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02005097832 A2*
W02005050200 A2
W02006086469 A2
W02000066631 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

폴리펩타이드로서,

신호 펩타이드, 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL) 영역을 갖는 항-TGF- β 도메인(anti-TGF- β domain), 펩타이드 스페이서, 막관통 도메인, 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 엔도도메인(endodomain)을 포함하고,

상기 TGF- β 는 가용성 TGF- β 를 포함하며,

상기 가용성 TGF- β 에 대한 상기 항-TGF- β 도메인의 결합은 활성화 신호를 T 세포에 전달하되,

여기서:

상기 VH 영역은 서열번호 11 (HCDR1), 서열번호 12 (HCDR2); 및 서열번호 13 (HCDR3)을 포함하고 상기 VL 영역은 서열번호 14 (LCDR1), 서열번호 15 (LCDR2); 및 서열번호 16 (LCDR3)을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 VH 영역은 서열번호 3을 포함하고 상기 VL 영역은 서열번호 4를 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서,

(a) 상기 VH 영역 및 상기 VL 영역은 펩타이드 링커에 의해 분리되거나;

(b) 상기 폴리펩타이드는 S-X-PL-Y-PS-T-E 또는 S-Y-PL-X-PS-T-E 구조를 가지거나, 여기서 S는 상기 신호 펩타이드이고, X는 VH이고, PL은 펩타이드 링커이고, Y는 VL이고, PS는 상기 펩타이드 스페이서이고, T는 상기 막관통 도메인이고, E는 상기 엔도도메인임;

(c) 상기 폴리펩타이드는 보조-자극 영역을 더 포함하며, 상기 보조-자극 영역은 상기 막관통 도메인과 상기 엔도도메인 사이에 있거나;

(d) 상기 막관통 도메인은 CD28의 막관통 도메인을 포함하거나; 또는

(e) 상기 엔도도메인은 CD28 신호전달 도메인 또는 4-1BB 신호전달 도메인을 더 포함하는;

폴리펩타이드.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 펩타이드 링커는 글리신-세린 링커인, 폴리펩타이드.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

- (a) 상기 엔도도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인이거나;
 - (b) 상기 펩타이드 스페이서는: (i) 50개 미만의 아미노산; 또는 (ii) 50개 초과 아미노산을 포함하거나;
 - (c) 상기 펩타이드 스페이서는 IgG 분자의 힌지 영역을 포함하거나;
 - (d) 상기 펩타이드 스페이서는 IgG 분자의 힌지 및 CH₂CH₃ 영역을 포함하거나; 또는
 - (e) 상기 폴리펩타이드는 검출 펩타이드를 더 포함하고, 상기 검출 펩타이드는 FLAG 태그, HA 태그 또는 Myc 태그의 펩타이드인;
- 폴리펩타이드.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

- (a) 상기 신호 펩타이드는 서열번호 18을 포함하거나;
- (b) 상기 폴리펩타이드는 암 분자 특이적인 항원 결합 도메인을 더 포함하며, 상기 암 분자는 Her2, CD19, CD20, GD2, 또는 IL13Ra2를 포함하는;

폴리펩타이드.

청구항 9

제 1 항, 제 3 항 및 제 5 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 10

제 1 항, 제 3 항 및 제 5 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 제 1 항, 제 3 항 및 제 5 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 핵산을 포함하는 세포.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

- (A) (a) 상기 세포는 T 세포 또는 T 조절성 세포이거나; 또는 (b) 상기 세포는 자연 살해 세포이고; 상기 세포는 생체 외에 있거나; 또는
 - (B) 상기 세포는 암-특이적 키메라 항원 수용체 (chimeric antigen receptor, CAR)를 더 포함하고, 상기 암-특이적 CAR은: (i) Her2, (ii) CD19 또는 CD20, (iii) GD2, 또는 (iv) IL-13Ra2에 특이적으로 결합하며, 상기 세포는 면역 세포이거나; 또는
 - (C) 상기 세포는 줄기 세포, 감마-델타 T 세포 및 호중구에서 선택되는,
- 세포.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포인, 세포.

청구항 13

면역 반응을 자극하기 위한 방법에 사용하기 위한 제 10 항의 세포로서, 상기 방법은 제 10 항의 세포를 TGF-β와 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

- (a) (i) 면역 반응을 자극하는 것은 면역 자극 사이토카인 또는 분자의 발현 또는 분비를 증가시키는 것을 포함하며, 상기 면역 자극 사이토카인 또는 분자는 TNF-α, IFN-β, IFN-γ, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-

10, IL-12, IL-18 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 중 하나 이상이거나; 또는 (ii) 면역 반응을 자극하는 것은 면역 세포의 증식을 증가시키는 것을 포함하며, 상기 면역 세포는 T 세포이거나;

(b) 상기 세포는 면역 자극을 필요로 하는 대상체의 **생체** 내에 있고, 상기 TGF- β 는 면역 자극을 필요로 하는 대상체 내에서 생산된 내인성 TGF- β 이며,

여기에서: (i) 상기 인간 대상체는 암, 심유증 또는 열린 상처를 가지거나; (ii) 상기 인간 대상체는 B-세포 악성종양을 가지거나; (c) 상기 인간 대상체는 고형 종양을 갖고;

여기에서: (iii) 상기 방법은 상기 세포를 상기 인간 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하거나; (iv) 상기 방법은 TGF- β 를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하는,

세포.

청구항 15

용액에서 TGF- β 를 검출하기 위한 방법으로, 제 10 항의 세포를 상기 용액과 접촉시키고 면역 자극을 측정하는 단계를 포함하며,

여기에서 상기 면역 자극의 증가는 TGF- β 의 존재를 나타내고, 상기 면역 자극의 증가 없음은 TGF- β 의 부재를 나타내며, 여기에서:

(a) (i) 상기 면역 자극은 면역 자극 사이토카인 또는 분자의 발현을 포함하며, 상기 면역 자극 사이토카인 또는 분자는 TNF- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 중 하나 이상이거나; 또는 (ii) 상기 면역 자극은 면역 세포의 증식 증가를 포함하며, 상기 면역 세포는 T 세포이고; 또는

(b) 상기 세포는 **생체** 외에 있는;

방법.

청구항 16

제 1 항, 제 3 항 및 제 5 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 제조하기 위한 방법으로, 상기 방법은 세포에서 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드를 발현시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

T 세포를 **시험관** 내에서 확장시키기 위한 방법으로, 상기 방법은 **시험관** 내에서 제 10 항의 T 세포를: (a) 1-50 ng/mL의 TGF- β ; 또는 (b) IL-2; 또는 (c) IL-15를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며,

여기에서:

(a) (i) 상기 방법은 상기 세포를 영양 세포와 접촉시키는 단계를 더 포함하며, 상기 영양 세포가 조사(irradiated)되거나; 또는 (ii) 상기 방법은 상기 T 세포를 영양 세포와 접촉시키는 것을 배제하거나; 또는

(b) 상기 T 세포는 조절성 T 세포이며, 상기 확장된 조절성 T 세포는 10% 미만의 비-조절성 T 세포를 포함하는,

방법.

청구항 18

환자에서 질환 또는 병리학적 상태를 치료하기 위한 방법에 사용하기 위한 제 10 항의 세포.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

(a) 상기 세포는 T 조절성 세포이며, 상기 질환은 자가면역 질환이거나; 또는

(b) 상기 질환은 암인;

세포.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2015년 10월 30일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/248,685호의 우선권의 이익을 주장한다. 상기 참조된 개시문헌의 전체 내용은 고지없이 본원에 참고로 원용된다.

[0003] 본 발명은 National Institute of Health가 부여한 그랜트 번호 CA183528 & OD012133 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대하여 소정의 권리를 갖는다.

[0004] 본 발명은 일반적으로 생명공학 및 의학 분야에 관한 것이다. 보다 특이적으로, TGF- β 의 존재 시에 면역 반응을 자극하는데 유용한 폴리펩타이드 및 이 폴리펩타이드를 함유하는 세포에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] TGF- β 는 고형 종양, 섬유증 및 조절되지 않은 상처를 포함한, 다양한 병원성 상태에서 높은 수준으로 발견되는 다면발현성 사이토카인이다. 고형 종양에 대한 치료학적 설계는 종양 미세환경에서 TGF- β 를 중화시키는 것을 지향하고 있다. 많은 항-TGF- β 항체가 존재하지만, 치료제로서 항체는 몇 가지 단점을 가지고 있다. 예를 들어, 항체는 다른 항원 결합 분자와 비교하여 크기가 클 수 있으며 다수 유전자에 의해 암호화된 다중-사슬 단백질이다. 이러한 두 가지 측면 모두 높은 생산 비용을 초래한다. TGF- β 를 억제하는 화학 물질도 확인되었지만, 일반적으로 간에서 대사 부산물로 인한 독성 문제가 있다.

[0006] 우성-음성(dominant-negative) TGF- β 수용체를 발현하는 TGF- β -비감수성 T 세포를 이용한 입양 T-세포 요법을 이용한 전략이 연구되고 있다. 그러나, TGF- β 신호의 단순한 중화만으로는 충분하지 않을 수 있으며, TGF- β 신호를 면역 억제자에서 면역 자극자로 바꾸면 보다 유망한 치료 전략을 제공할 수도 있다.

[0007] 따라서, 당 기술분야에는 TGF- β 의 작용에 대항하며, 보다 비용 효과적인 생산의 이점도 제공하는 보다 효과적인 치료법이 필요하다.

발명의 내용

[0008] 본원에서 설명된 폴리펩타이드는, 세포에서 발현될 때, TGF- β 를 중화시킬 수 있을 뿐만 아니라 TGF- β 의 존재 시에 T-세포 활성화를 특이적으로 유발할 수 있는 폴리펩타이드를 제공하는 것에 의하여 당 기술분야에서의 필요성을 충족시킨다. T-세포 활성화는 면역 세포를 자극하여 면역자극성 사이토카인을 생산하고 증식하여, TGF- β 를 면역억제성 신호에서 활성 자극으로 전환시킨다. 따라서, 본 발명의 측면들은 신호 펩타이드, 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 영역을 갖는 항원 결합 도메인, 펩타이드 스페이서, 막관통 도메인 및 엔도도메인을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며; 여기서 상기 항원 결합 도메인은 TGF- β 에 특이적으로 결합한다.

[0009] 일부 측면에서 본 발명은 신호 펩타이드, 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 영역을 갖는 항원 결합 도메인, 펩타이드 스페이서, 막관통 도메인 및 엔도도메인을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며; 여기서 상기 VH 영역은 서열번호 5 (HCDR1), 서열번호 6 (HCDR2); 및 서열번호 7 (HCDR3)을 포함하고 그리고 상기 VL 영역은 서열번호 8 (LCDR1), 서열번호 9 (LCDR2); 및 서열번호 10 (LCDR3)을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 VH는 서열번호 1을 포함하고 상기 VL은 서열번호 2를 포함한다.

[0010] 일부 측면에서 본 발명은 신호 펩타이드, 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 영역을 갖는 항원 결합 도메인, 펩

타이드 스페이스, 막관통 도메인 및 엔도도메인을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며; 여기서 상기 VH 영역은 서열번호 11 (HCDR1), 서열번호 12 (HCDR2); 및 서열번호 13 (HCDR3)을 포함하고 그리고 상기 VL 영역은 서열번호 14 (LCDR1), 서열번호 15 (LCDR2); 및 서열번호 16 (LCDR3)을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 VH는 서열번호 3을 포함하고 상기 VL은 서열번호 4를 포함한다.

[0011] 일부 측면에서 본 발명은 신호 펩타이드, 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL) 영역을 갖는 항원 결합 도메인, 펩타이드 스페이스, 막관통 도메인 및 엔도도메인을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이며; 여기서 상기 VH 영역은 서열번호 21 (HCDR1), 서열번호 22 (HCDR2); 및 서열번호 23 (HCDR3)을 포함하고 그리고 상기 VL 영역은 서열번호 24 (LCDR1), 서열번호 25 (LCDR2); 및 서열번호 26 (LCDR3)을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 VH는 서열번호 19를 포함하고 상기 VL은 서열번호 20을 포함한다.

[0012] 상기 및 본원에서 설명된 폴리펩타이드는 연속적인 단일 사슬인 폴리펩타이드이다.

[0013] 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 영역 (또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 영역)은 다른 서열에 대해 특정 백분율(예를 들어, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%--또는 거기에서 파생가능한 임의의 범위)의 "서열 동일성" 또는 "상동성"을 가지며, 정렬될 때, 염기 (또는 아미노산)의 백분율이 두 서열을 비교할 때 동일한 것을 의미한다. 이러한 정렬 및 상동성 또는 서열 동일성 %은 당 기술분야에 공지된 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 Ausubel 등 eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology에 설명된 것을 이용하여 결정될 수 있다.

[0014] 본 발명의 폴리펩타이드는 본원에 설명된 아미노산 서열의 전부 또는 일부에 대해 최소한, 최대한, 또는 정확하게 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 동일성 (또는 거기에서 파생가능한 임의의 범위)을 가지는 영역, 도메인, 링커, 스페이스, 등을 가질 수도 있다. 소정의 실시예들에서, 본 발명 전반에 걸쳐 설명된 폴리펩타이드가 단리되며, 이는 세포 환경에서 발견되지 않는 것을 의미한다. 일부 경우에, 폴리펩타이드가 정제되며, 이는 대부분 다른 아미노산 서열 및/또는 화학 식을 가진 폴리펩타이드와 완전히 분리되지는 않는 경우를 의미한다.

[0015] 일부 실시예에서, VH와 VL은 펩타이드 링커에 의해 분리된다. 펩타이드 링커는 본 발명의 폴리펩타이드에서 설명된 임의의 도메인/영역을 분리할 수 있는 것으로 고려된다. 일부 실시예에서, 펩타이드 링커는 단지 글리신과 세린 잔기로만 구성된 펩타이드이다 (글리신-세린 링커). 일부 실시예에서, 펩타이드 링커는 최소한, 최대한, 또는 정확하게 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100, 125, 150, 또는 200개 아미노산 (또는 거기에서 임의의 파생가능한 범위)이다. 일부 실시예에서, 펩타이드 링커는 당 기술분야에 공지되거나 본원에 설명된 것이다.

[0016] 일부 실시예에서, 폴리펩타이드는 S-X-PL-Y-PS-T-E 또는 S-Y-PL-X-PS-T-E 구조를 가지며, 여기서 S는 신호 펩타이드이고, X는 VH이고, PL은 펩타이드 링커이고, Y는 VL이고, PS는 펩타이드 스페이스이고, T는 막관통 도메인이고, E는 엔도도메인이다. 일부 실시예에서, 폴리펩타이드는 하기 구조를 가지고 있다: S-X-Y-PS-T-E 또는 S-Y-X-PS-T-E, 여기서 S, X, Y, PS, T, 및 E는 상기 정의된 바와 같다. 본원에서 펩타이드 및 폴리펩타이드를 참조할 때, 서열 및 구조는 N-말단으로부터 C-말단으로 진행되는 것으로 기재되고 해석되며, 이는 당해 분야의 표준 관행이다.

[0017] 일부 실시예에서, 폴리펩타이드는 보조-자극 영역을 더 포함한다. 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 도메인과 엔도도메인 사이에 있다. 일부 실시예에서, 폴리펩타이드는 최소한, 최대한, 또는 정확하게 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 (또는 거기에서 임의의 파생가능한 범위) 보조-자극 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 당 기술분야에 공지되거나 본원에 설명된 것이다.

[0018] 일부 실시예에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 막관통 도메인은 당 기술분야에 공지되거나 본원에 설명된 막관통 도메인의 전부 또는 일부이다.

[0019] 일부 실시예에서, 엔도도메인은 CD28 또는 CD3-제타 신호전달 도메인 또는 둘 모두를 포함한다. 일부 실시예에서, 엔도도메인은 당 기술분야에 공지되거나 본원에 설명된 엔도도메인의 전부 또는 일부이다. 일부 실시예에서, 엔도도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인이다. 일부 실시예에서, 엔도도메인은 본원에 설명된 적절한 엔도도메인의 하나 이상, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 부분을 포함한다.

[0020] 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이스는 힌지 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 힌지는 IgG 분자의 힌지 영역이다. 일부 실시예에서, 힌지는 당 기술분야에 공지되거나 본원에 설명된 힌지 영역이다. 일부 실시예에서, 펩

타이드 스페이서는 IgG 분자의 CH₂CH₃ 영역을 포함하거나 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 힌지 영역, CH₁, CH₂ 및 CH₃ 영역 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 인간, 마우스, 랫, 개, 당나귀, 염소 또는 토끼로부터의 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM의 힌지, CH₁, CH₂ 및/또는 CH₃ 영역 또는 다른 영역으로부터 유래한다. 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 IgG 분자의 힌지 및 CH₂CH₃ 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, IgG 분자의 CH₂CH₃ 영역은 Fc 수용체 결합을 방지하기 위해 추가적인 L235E/N297Q 또는 L235D/N297Q 돌연변이를 가지고 있다. 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 IgG 분자의 힌지 영역으로 구성된다. 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5 또는 4개 미만의 아미노산이다. 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 225, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 450, 500, 550, 600 또는 700개 보다 적거나, 많거나 또는 정확하게 그 값인 아미노산이다 (또는 거기에서 임의의 과생가능한 범위). 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 50개 미만의 아미노산을 포함한다. 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 50개 초과와 아미노산을 포함한다.

[0021] 일부 실시예에서, 폴리펩타이드는 검출 펩타이드를 더 포함한다. 일부 실시예에서, 검출 펩타이드는 서열번호 17, HA 태그 (서열번호 94) 또는 cMyc 태그 (서열번호 95)의 펩타이드이다. 일부 실시예에서, 검출 펩타이드는 링커의 옆에 있다. 일부 실시예에서, 링커(예, 본원에 설명된 바와 같은 펩타이드 링커)는 검출 펩타이드의 아미노 부분에 존재한다. 일부 실시예에서, 링커(예, 본원에 설명된 바와 같은 펩타이드 링커)는 검출 펩타이드의 카르복시 부분에 존재한다. 일부 실시예에서, 링커는 검출 펩타이드의 아미노 부분과 카르복시 부분에 있다. 일부 실시예에서, 검출 펩타이드는 VH 및 VL 영역의 아미노 부분에 있다. 일부 실시예에서, 검출 펩타이드는 신호 펩타이드와 항원 결합 도메인 사이에 있다.

[0022] 일부 실시예에서, 신호 펩타이드는 서열번호 18을 포함한다. 일부 실시예에서, 신호 펩타이드는 당 기술분야에 공지되거나 여기에 기술되어 있다.

[0023] 일부 실시예에서, 폴리펩타이드는 암-분자-특이적 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 이중특이성 키메라 항원 수용체 (CAR)일 수 있으며, 여기서 폴리펩타이드는 TGF-β에 대한 항원 결합 도메인 및 암 분자 또는 암 항원에 대한 항원 결합 도메인을 포함한다. 항원 결합 도메인은 펩타이드 스페이서/링커에 의해 분리될 수 있다. 일부 실시예에서, 암 분자는 Her2를 포함한다. 일부 실시예에서, 암 분자는 CD19 또는 CD20을 포함한다. 일부 실시예에서, 암 분자 또는 암 항원은 당 기술분야에 공지되거나 본원에 설명된 것이다.

[0024] 일부 실시예에서, 항원 결합 도메인은 가용성 TGF-β에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 폴리펩타이드와 유사한 폴리펩타이드가 가용성 항원에 결합하고 가용성 항원에 반응하여 신호를 전달할 수 있다는 것은 이전에 알려지지 않았다.

[0025] 본원에 설명된 폴리펩타이드는 서열번호 1-95의, 최소한, 또는 최대한 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000개 또는 그 이상의 인접한 아미노산, 또는 거기에서 임의의 과생가능한 범위 내에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100개 또는 그 이상

의 변이체 아미노산을 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 측면들은 본원에 설명된 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 발명은 본원에 설명된 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 세포에 관한 것이다. 일부 실시예에서, 세포는 암-특이적 CAR을 더 포함한다. 일부 실시예에서, 암-특이적 CAR은 TGF- β CAR로부터 분리된 폴리펩타이드이다. 일부 실시예에서, 암-특이적 CAR은 Her2에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 암-특이적 CAR은 CD19 또는 CD20에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 암-특이적 CAR은 당 기술분야에 공지되거나 그리고/또는 본원에 설명된 암 분자 또는 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 세포는 면역 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 기원 세포 또는 줄기 세포이다. 일부 실시예에서, 기원 세포 또는 줄기 세포는 *시험관 내에서* 면역 세포로 분화된다. 일부 실시예에서, 세포는 T 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 자연 살해 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 *생체 외에* 있다. 용어 면역 세포는 감염성 질환과 이물질 둘 다에 대해 신체를 방어하는 것에 관여하는 면역계의 세포를 포함한다. 면역 세포는 예를 들어 호중구, 호산구, 호염구, 자연 살해 세포, B 세포 및 T 세포와 같은 림프구 및 단핵구를 포함할 수 있다. T 세포는 예를 들어, CD4+, CD8+, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 조절성 T 세포, 억제자 T 세포 및 자연 살해 T 세포를 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, T 세포는 조절성 T 세포이다.

[0027] 본 발명의 또 다른 측면들은 본 발명의 세포 (즉, 본원에 설명된 항원 결합 폴리펩타이드를 포함하는 세포)를 TGF- β 와 접촉시키는 것을 포함하는, 면역 반응을 자극하기 위한 방법에 관한 것이다. 일부 실시예에서, 면역 반응을 자극하는 것은 면역 자극 사이토카인 및/또는 분자의 발현 및/또는 분비를 증가시키는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 사이토카인 및/또는 분자는 전-염증성 사이토카인 또는 분자이다. 일부 실시예에서, 면역 자극 사이토카인 및/또는 분자는 TNF- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 중 하나 이상이다. 일부 실시예에서, 면역 반응을 자극하는 것은 면역 세포의 증식을 증가시키는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시예에서, TGF- β 는 면역 자극을 필요로 하는 인간 대상체에서 생산되는 내인성 TGF- β 이다. 일부 실시예에서, 인간 대상체는 암, 섬유증 또는 열린 상처를 가지고 있다. 일부 실시예에서, 인체 대상체는 B-세포 악성종양을 가지고 있다. 일부 실시예에서, 인간 대상체는 고형 종양을 가지고 있다. 고형 종양은 보통 낭종이나 액체 구역을 포함하지 않는 비정상 조직 덩어리이다. 고형 종양은 양성 (암이 아님) 또는 악성 (암)일 수 있다. 다양한 유형의 고형 종양은 그것들을 형성하는 세포 유형에 따라 명명된다. 고형 종양의 예는 육종, 암종, 림프종이다. 일부 실시예에서, 본 방법은 증상을 가진 사람을 치료하기 위한 것이며, 여기서 상기 증상은 병원성 수준의 TGF- β 의 발현을 특징으로 한다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 세포 및 폴리펩타이드는 암, 조절할 수 없는 상처, 섬유증, 열린 상처, 고형 종양 등을 치료하는데 사용될 수 있으며, 이 상태의 병인은, 적어도 부분적으로는 TGF- β 의 발현에 기초한다. 일부 실시예에서, 세포 (즉, 항원 결합 폴리펩타이드를 포함하는 본 발명의 세포)는 면역 자극을 필요로 하는 인간 대상체에 있다. 일부 실시예에서, 본 방법은 본 발명의 폴리펩타이드 또는 핵산을 포함하는 본원에 설명된 세포를 인간 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0028] 추가의 방법 측면들은 본 발명의 세포를 접촉시키고 면역 자극을 측정하는 것을 포함하는, 용액 내의 TGF- β 를 검출하기 위한 방법에 관한 것이며; 여기서 면역 자극의 증가는 TGF- β 의 존재를 나타내고, 면역 자극의 증가 없음은 TGF- β 의 부재를 나타낸다. 일부 실시예에서, 면역 자극은 면역 자극 사이토카인 및/또는 분자의 발현을 포함한다. 일부 실시예에서, 면역 자극 사이토카인 및/또는 분자는 TNF- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 중 하나 이상이다. 일부 실시예에서, 면역 자극은 면역 세포 증식의 증가를 포함한다. 일부 실시예에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 *생체 외에* 있다.

[0029] 본원에 설명된 바와 같은 발현 또는 증식의 증가는 대조군 (미-질환, 비-TGF- β 또는 비-항원 결합 폴리펩타이드 대조군)과 같은 기준선 발현 수준에 비해 최소한, 최대한, 또는 정확하게 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 또는 1000배 증가일 수 있다.

[0030] 본 발명의 또 다른 측면들은 세포에서 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드를 발현시키는 것을 포함하는, 본 발명의 폴리펩타이드를 제조하기 위한 방법에 관한 것이다. 추가의 측면들은 본원에 설명된 폴리펩타이드를 포함하는 배양된 세포, 동결된 세포, 현탁된 세포 또는 부착된 세포에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 측면들은 본 발명의 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 질환 또는 병리학적 상태를 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 일부 실시예에서, 환자는 인간 환자이다.

[0032] 일부 실시예에서, 세포는 T 조절성 세포 (즉, 본원에 설명된 TGF- β -결합 폴리펩타이드를 포함하는 조절성 T 세

포)이다. 일부 실시예에서, 질환은 자가면역 질환이다. 일부 실시예에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염이다. 일부 실시예에서, 자가면역 질환은 본원에 설명된 질환이다.

[0033] 상기 방법 측면들의 일부 실시예에서, 상기 방법은 TGF- β 를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0034] 일부 측면에서, 상기 방법은 시험관 내에서 T 세포의 증식을 확장 및/또는 유도하는 단계를 포함하거나 추가로 포함하며, 상기 방법은 시험관 내에서 본 발명의 T 세포를 TGF- β 를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, T 세포는 조절성 세포이다. 일부 실시예에서, T 세포는 본원에 설명된 T 세포이다. 일부 실시예에서, 확장된 조절성 T 세포는 10% 미만의 비-조절성 T 세포를 포함한다. 일부 실시예에서, 확장된 조절성 T 세포는 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 또는 50% 미만 또는 거기에서 파생가능한 임의의 범위를 포함한다.

[0035] 일부 실시예에서, 조성물은 1-50 ng/mL의 TGF- β 를 포함한다. 일부 실시예에서, 조성물은 최소한, 최대한, 또는 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100 ng/mL의 TGF- β (또는 거기에서 파생가능한 임의의 범위)를 포함한다.

[0036] 일부 실시예에서, 조성물은 IL-2를 더 포함한다. 일부 실시예에서, 조성물은 20-400 U/mL의 IL-2를 포함한다. 일부 실시예에서, 조성물은 최소한, 최대한, 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600 U/mL의 IL-2 (또는 거기에서 파생가능한 임의의 범위)를 포함한다.

[0037] 일부 실시예에서, 상기 방법은 세포를 영양 세포(feeder cell)와 접촉시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시예에서, 영양 세포가 조사된다(irradiated). 영양 세포 또는 지지 세포는 예를 들어, 섬유아세포, 마우스 배아 섬유아세포, JK1 세포, SNL 76/7 세포, 인간 태아 피부 세포, 인간 섬유아세포 및 인간 포피 섬유아세포를 포함할 수 있다.

[0038] 일부 실시예에서, 상기 방법은 T 세포를 영양 세포와 접촉시키는 것을 배제한다. 일부 경우, 배제된 영양 세포는 T 세포와 다른 동물 종에서 유래한다.

[0039] 본원에 설명된 방법들의 일 실시예에서, 대상체는 인간 대상체이다. 본원에서 상호 교환적으로 사용되는 "개체", "대상체", "숙주" 및 "환자"라는 용어는 쥐 (예, 랫, 마우스), 토끼목 (예, 토끼), 비-인간 영장류, 인간, 개과, 고양이과, 유제류 (예, 말, 소, 양, 돼지, 산양) 등을 포함하지만, 이들에만 한정되지 않는 포유류를 지칭한다.

[0040] 본 발명이 더 설명되기 전에, 본 발명은 설명된 특정 실시예들에 한정되지 않으며, 당연히 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이므로, 본원에서 사용된 용어는 특정 실시예들만을 설명하기 위한 것이며, 제한하려는 의도는 아니라는 것을 이해해야 한다.

[0041] 값들의 범위가 제공되는 경우, 각각의 중간 값은, 그 범위의 상한과 하한 사이에, 문맥상 달리 명확하게 언급하지 않는 한, 하한 단위의 10 분의 1까지, 그리고 그 언급된 범위에서의 임의의 다른 언급된 값 또는 중간 값이 본 발명 내에 포함된다는 것을 이해해야 한다. 이들 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 작은 범위에 포함될 수 있으며, 언급된 범위에서 임의의 특정하게 배제된 한계에 따라, 본 발명 내에 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 한계 중 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위도 본 발명에 포함된다.

[0042] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 구체적인 예시들은 본 발명의 바람직한 실시예들을 나타내는 한편, 본 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변화 및 변형이 본 상세한 설명으로부터 당 기술분야의 숙련자들에게 명백하게 될 것이므로, 단지 설명하기 위해서 주어짐을 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0043]

하기 도면들은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 소정의 측면들을 추가로 예시하기 위해 포함된다. 본 발명은 여기에 제시된 특정 실시예들에 대한 상세한 설명과 함께 이 도면들 중 하나 이상을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1은 TGF- β scFv가 인간 TGF- β 를 중화시키는 것을 보여준다. 표시된 양의 TGF- β 및 항-TGF- β scFv를 배양 중의 HepG2 세포에 30분 동안 첨가하였다. TGF- β 의 중화는 웨스턴 블롯으로 검출되는 바와 같이, 포스포-SMAD2 반응에서의 손실로 표시된다.

도 2는 TGF- β CAR가 세포 표면에서 발현되는 것을 보여준다. TGF- β CAR은 scFv#2를 사용하여 생성하였다. 표면 염색 및 유세포 측정법에 의하면 TGF- β CAR가 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 세포 표면에 출현됨을 보여준다. 수용체의 세포외 도메인은 FLAG 에피토프를 함유하고 있다. EGFRt는 세포 형질도입의 표시자인 절단된(truncated) 표피 성장 인자 수용체이다.

도 3a-b는 TGF- β CAR이 CD8+ (a) 및 CD4+ (b) T 세포에서 내인성 TGF- β 신호전달을 차단한다는 것을 보여준다. T 세포에서의 TGF- β CAR 발현은 SMAD 경로를 통한 TGF- β 신호전달을 차단한다. 표시된 수용체를 발현하는 T 세포를 TGF- β 와 함께 30분 동안 인큐베이팅하고, 웨스턴 블롯을 통해 포스포-SMAD2를 위한 프로브로 사용하였다. scFv-less는 임의의 리간드(항원)-결합 scFv 도메인이 부족한 CAR을 지칭하며, EGFRt는 여기에서의 다른 성분들과 무관한 절단된 표피 성장 인자 수용체를 지칭한다.

도 4a-c. (a) TGF- β CAR을 안정적으로 발현하는 Jurkat 세포 및 NFAT 리포터 (NFAT-유도성 프로모터로부터 발현된 EGFP)는 증가하는 TGF- β 농도에 반응하여 증가된 활성화를 보여준다. (b,c) TGF- β CAR을 안정적으로 발현하는 일차 인간 CD4+ T 세포는 TGF- β 자극에 반응하여 (b) CD69 발현 및 (c) Th1 사이토카인 생산을 상향조절한다. CD69 상향조절은 TGF- β 유무에 따라 하루 인큐베이팅한 후 표면 염색으로 모니터링하였다. 사이토카인 생산은 TGF- β 유무에 따라 하루 인큐베이팅한 후 단백질 수송 억제제 Brefeldin A를 적용하고 세포내 염색을 수행함으로써 검출되었다. "모의(Mock)"는 무관한 구조체로 형질도입된 T 세포를 나타낸다. "scFv-less"는 scFv 도메인이 부족해서 TGF- β 에 결합할 수 없다는 점을 제외하고 TGF- β CAR과 일치하는 CAR을 발현하는 T 세포를 나타낸다. "DNR"은 양성-음성 TGF- β 수용체이며, 세포질 신호전달 도메인이 부족한 절단된 TGF- β 수용체 사슬 2이다. 표시된 값들은 ± 1 표준 편차 (s.t.d.)를 나타내는 오차 막대가 있는 3개 값의 평균이다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** * $p \leq 0.0005$.

도 5는 양성-음성 TGF- β 수용체가 사이토카인 생산을 유발할 수 없다는 것을 보여준다. 양성-음성 TGF- β 수용체는 TGF- β 신호전달을 억제하는 것으로도 보고되었지만, TNF- α 생산과 같은 면역자극성 작용을 유발하지는 않는다. T β short와 T β long은 두 가지의 서로 다른 TGF- β CAR이고, Dom-Neg는 양성-음성 TGF- β 수용체를 지칭하며, scFv-less는 임의의 리간드-결합 scFv 도메인이 부족한 CAR을 지칭한다. T β short는 IgG4 힌지 영역만으로 구성된 펩타이드 스페이서가 있는 TGF- β CAR 폴리펩타이드를 지칭한다. T β long은 IgG4 힌지 및 CH₂CH₃ 영역을 포함하는 펩타이드 스페이서가 있는 TGF- β CAR 폴리펩타이드를 지칭한다.

도 6은 TGF- β CAR-T 세포가 TGF- β 에 반응하여 증식하는 것을 예시한다.

도 7은 쥐의 TGF- β /SMAD 신호전달의 억제를 보여준다. 표시된 양의 scFv 및 마우스 TGF- β 1을 NIH3T3 섬유아세포에 30분 동안 첨가하였다. 세포를 용해시키고 SMAD2 인산화를 위해 프로브로 사용하였다.

도 8. TGF- β CAR을 안정적으로 발현하는 Jurkat 세포 및 NFAT 리포터 (NFAT-유도성 프로모터로부터 발현된 EGFP)는 증가하는 쥐 TGF- β 1 투입에 반응하여 증가된 활성화를 보여주며, 인간 TGF- β 를 인식하도록 조작된 TGF- β CAR이 또한 쥐 TGF- β 와 교차 반응한다는 것을 나타낸다.

도 9. TGF- β CAR이 양성-음성 TGF- β 수용체보다 더 효율적으로 세포 표면에 출현한다.

도 10. TGF- β CAR 기능이 보조-자극 도메인 선택에 의해 조정될 수 있다.

도 11. TGF- β 는 다른 공여자로부터의 세포에서 용량-의존 방식으로 TNF- α 생산을 일관되게 유발한다.

도 12. TGF- β CAR의 펩타이드 스페이서 길이가 유발 역치를 조정한다.

도 13. CAR 신호전달이 리간드-매개 CAR 이량체화를 필요로 하지만, 리간드 또는 CAR 자체가 이량체로 미리 존재할 필요는 없다 CD69 표면 염색은 표시된 CAR(들)을 지닌 Jurkat 세포주에서 수행하였다. GFP CAR #1과 GFP CAR #3은 모두 주로 동종이량체로 존재하며, 두 CAR은 EGFP 상의 다른 에피토프에 결합하며, 동시에 단량체 EGFP 분자에 결합할 수 있다. GFP CAR #1과 GFP CAR #2는 EGFP 상의 동일한 에피토프에 결합하지만, CAR #2는

동종이량체가 아닌 단량체로 존재한다.

도 14. 가용성, 이량체 항원 분자는 서로 다른 세포 상에 수용체를 연결하여 신호전달을 유발할 수 있다.

도 15. TGF- β CAR은 세포-세포 접촉-의존적 및 -독립적 방식으로 유발될 수 있다.

도 16. TGF- β CAR-T 세포는 세포-세포 접촉 부재 시 활성화될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 본원에 설명된 폴리펩타이드, 세포 및 방법은 TGF- β 를 중화시키고 특히 TGF- β 의 존재 시에 T-세포 활성화를 유발하는 데 사용될 수 있다.
- [0045] **I. 정의**
- [0046] 본 발명의 펩타이드는 CAR 또는 키메라 항원 수용체를 포함하는 펩타이드에 관한 것이다. CAR은 조작된 수용체로, 임의적인 특이성을 면역 효과기 세포 상에 접목시킨다. 통상적으로, 이들 수용체는 모노클로날 항체의 특이성을 T 세포 상에 접목시키는데 사용된다. 수용체는 서로 다른 출처로부터의 부분으로 구성되어 있기 때문에 키메라라고 부른다.
- [0047] 용어 "단백질", "폴리펩타이드" 및 "펩타이드"는 유전자 산물을 참조할 때 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.
- [0048] "상동성," "동일성" 또는 "유사성"은 두 개의 펩타이드 또는 두 개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 나타낸다. 동일성은 비교를 위해 정렬될 수 있는 각 서열 내의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교된 서열 내의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유되는 경우, 그렇다면 분자들은 그 위치에서 서열 동일성을 공유한다. 서열 간의 동일성 정도는 서열들이 공유한 일치하거나 상동성 위치들의 수의 함수이다. "무관한" 또는 "비-상동성" 서열은 본 개시내용의 서열 중 하나와, 40% 미만 동일성, 또는 25% 미만 동일성을 공유한다.
- [0049] 본원에 사용된 용어 "아미노 부분", "N-말단" 및 "아미노 말단" 등은 폴리펩타이드의 영역들의 순서를 나타내는 데 사용된다. 더욱이, 어떤 것이 한 영역의 N-말단인 경우, 반드시 전체 폴리펩타이드의 말단 (또는 끝단)에 있을 필요는 없으며, 단지 상기 영역 또는 도메인의 말단에 있다. 마찬가지로, 본원에서 사용되는 용어 "카르복시 부분", "C-말단", "카르복시 말단" 등은 폴리펩타이드의 영역의 순서를 참조하는데 사용되며, 어떤 것이 한 영역의 C-말단인 경우, 전체 폴리펩타이드의 말단 (또는 끝단)에 있을 필요는 없으며, 단지 상기 영역 또는 도메인의 말단에 있다.
- [0050] "폴리뉴클레오티드", "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 상호 교환적으로 사용되며, 임의의 길이의 뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 또는 이의 유사체 중 하나의 중합체 형태를 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있으며, 공지된 또는 미공지된, 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 미한정적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편 (예를 들어, 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, dsRNA, siRNA, miRNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체와 같은, 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조의 변형은 폴리뉴클레오티드의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 차단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후, 예컨대 라벨링 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 이 용어는 또한 이중 가닥과 단일 가닥 분자 모두를 지칭한다. 달리 특정되거나 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오티드인 본 발명의 임의의 실시예는 이중 가닥 형태 및 이중 가닥 형태를 구성하는 것으로 공지되거나 예측되는 두 개의 상보적인 단일 가닥 형태의 각각을 포괄한다.
- [0051] "대상체", "개체" 또는 "환자"라는 용어는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 척추 동물, 예를 들어 영장류, 포유류 또는 바람직하게는 인간을 의미한다. 포유류는 말, 개과, 소, 양, 쥐, 랫, 유인원, 인간, 농장 동물, 스포츠 동물 및 애완동물을 포함하지만 이들에만 한정되지 않는다.
- [0052] 용어 "무-이종 (xeno-free, XF)" 또는 "동물성분이 없는 (ACF)" 또는 "동물이 없는"이란, 배지, 세포 외 기질 또는 배양 조건과 관련하여 사용되는 경우, 배지, 세포 외 기질, 또는 본질적으로 이종성 동물 유래 성분이 없는 배양 조건을 나타낸다. 인간 세포를 배양하기 위해, 마우스와 같은 비인간 동물의 임의의 단백질은 이종 성분이 될 것이다. 소정의 측면들에서, 무-이종 기질은 본질적으로 임의의 비인간 동물 유래 성분이 없으며, 따라서 마우스 영양 세포 또는 Matrigel™을 제외한다. Matrigel™은 라미닌(laminin) (주 성분), 콜라겐 IV, 해파

린 설페이트 프로테오글리칸, 엔탁틴(entactin)/니도겐(nidogen)을 포함하도록 세포 외 기질 단백질이 풍부한 중양인, Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 마우스 육종에서 추출한 가용화된 기저 막 제제이다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 조성물 또는 본 발명의 세포는 무-이종 또는 동물 성분이 없는 또는 동물이 없는 배지에서 배양되고/되거나 그 내부/그와 함께 제조된다.

[0053] 세포는 요소(들)이 10% 미만인 경우에는, 소정의 시약 또는 요소, 예컨대 본원에 사용되는, 혈청, 신호전달 억제제, 동물 성분 또는 영양 세포, 외인성 유전자 요소 또는 벡터 요소가 "실질적으로 없으며", 요소(들)이 1% 미만인 경우에는, 소정의 시약 또는 요소가 "본질적으로 없다". 그러나, 전체 세포 집단의 0.5% 미만 또는 0.1% 미만이 외인성 유전자 요소 또는 벡터 요소를 포함하는 세포 집단이 훨씬 더 바람직하다.

[0054] 배양물, 기질 또는 배지 각각이 당 기술분야의 숙련자에게 공지된 통상적인 검출 방법을 사용하여 검출 가능한 수준보다 낮은 이들 시약 수준을 갖거나 이 제제들이 배양물, 기질 또는 매질에 외인성으로 첨가되지 않은 경우에, 배양물, 기질 또는 배지에는 소정의 시약 또는 요소, 예컨대 혈청, 신호전달 억제제, 동물 성분 또는 영양 세포가 "본질적으로 없다". 무-혈청 배지는 본질적으로 혈청이 없을 수 있다.

[0055] 특정 단백질을 "암호화하는" "유전자", "폴리뉴클레오티드", "코딩 영역", "서열", "분절", "단편" 또는 "이식 유전자(transgene)"는, 적절한 조절성 서열의 제어 하에 놓여질 때 시험관 내 또는 생체 내에서 전사되고 선택적으로 유전자 산물, 예를 들어, 폴리펩타이드로 번역되기도 하는 핵산 분자이다. 코딩 영역은 cDNA, 게놈 DNA 또는 RNA 형태 중 하나로 존재할 수 있다. DNA 형태로 존재하는 경우, 핵산 분자는 단일 가닥 (즉, 센스 가닥) 또는 이중 가닥일 수 있다. 코딩 영역의 경계는 5' (아미노) 말단의 개시 코돈 및 3' (카르복시) 말단의 번역 중지 코돈에 의해 결정된다. 유전자는 원핵 또는 진핵 mRNA로부터의 cDNA, 원핵 또는 진핵 DNA로부터의 게놈 DNA 서열, 및 합성 DNA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 전사 종결 서열은 일반적으로 유전자 서열의 3'에 위치할 것이다.

[0056] "세포"라는 용어는 당 기술분야에서 가장 넓은 의미로 사용되며, 다세포 생물의 조직의 구조 단위인 생체를 지칭하며, 그것을 외부와 격리시키는 막 구조로 둘러싸여 있으며, 자기 복제 능력을 가지며, 유전 정보 및 그것을 발현하기 위한 메커니즘을 가지고 있다. 본원에서 사용된 세포는 자연 발생 세포 또는 인위적으로 변형된 세포 (예, 융합 세포, 유전자 변형된 세포 등)일 수 있다.

[0057] 본원에 사용된, 용어 "줄기 세포"는 자가 복제 및 만능성(pluripotency) 또는 다능성(multipotency)을 가질 수 있는 세포를 지칭한다. 일반적으로, 줄기 세포는 손상된 조직을 재생할 수 있다. 본원에서 줄기 세포는 배아 줄기 (ES) 세포, 유도 만능 줄기 세포 또는 조직 줄기 세포 (조직-특이성 줄기 세포 또는 체세포 줄기 세포라고도 함)일 수 있으나, 이들에만 한정되지는 않는다.

[0058] "배아 줄기 (ES) 세포"는 초기 배아에서 유래한 만능 줄기 세포이다. ES 세포는 1981년에 처음으로 성립되었으며 1989년 이후 녹아웃 마우스 생산에도 적용되었다. 1998년에 인간 ES 세포가 성립되었으며, 이것이 현재 재생 의학에서 이용 가능하게 되었다.

[0059] ES 세포와 달리, 조직 줄기 세포는 제한된 분화능을 가지고 있다. 조직 줄기 세포는 조직 내 특정 위치에 존재하며 미분화된 세포 내 구조를 가지고 있다. 따라서, 조직 줄기 세포의 만능성은 통상적으로 낮다. 조직 줄기 세포는 핵/세포질 비율이 더 높고 세포 내 소기관이 거의 없다. 대부분의 조직 줄기 세포는 낮은 만능성, 긴 세포주기, 그리고 개체의 수명을 넘는 증식 능력이 있다. 조직 줄기 세포는 피부 조직, 소화 조직, 골수 조직, 신경 조직 등과 같이, 세포가 유래되는 부위에 따라 카테고리 분류된다. 피부 조직의 조직 줄기 세포는 표피 줄기 세포, 모낭 줄기 세포 등을 포함한다. 소화 조직의 조직 줄기 세포는 위장 (공용) 줄기 세포, 간 줄기 세포 등을 포함한다. 골수 조직의 조직 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 간엽 줄기 세포 등을 포함한다. 신경 조직의 조직 줄기 세포는 신경 줄기 세포, 망막 줄기 세포 등을 포함한다.

[0060] 일반적으로 iPS 세포 또는 iPSC로 약칭되는, "유도 만능 줄기 세포"는, 재프로그래밍 인자라고 하는 소정의 인자를 도입함으로써, 비-만능 세포, 통상적으로 성인 체세포로부터 인위적으로 제조된 일종의 만능 줄기 세포, 또는 말단 분화 세포, 예컨대 섬유아세포, 조혈 모세포, 근육 세포, 뉴런, 표피 세포 등을 지칭한다.

[0061] "만능성"이란 하나 이상의 조직 또는 기관을 구성하는 모든 세포, 또는 특히, 세 가지 배엽 중 어느 하나: 내배엽 (내부 위 내벽, 위장관, 폐), 중배엽 (근육, 뼈, 혈액, 비뇨생식기) 또는 외배엽 (표피 조직 및 신경 조직)으로 분화할 수 있는 줄기 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 "만능 줄기 세포"는 세 가지 배엽 중 어느 하나에서 유래된 세포로 분화할 수 있는 세포, 예를 들어, 전능(totipotent) 세포 또는 유도 만능 세포의 직접적인 자손을 지칭한다.

- [0062] 본원에 사용된, 용어 "치료", "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미한다. 상기 효과는 질환 또는 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 관점에서 예방적일 수 있고 그리고/또는 질환 및/또는 질환으로 인한 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 "치료"는 포유류, 예를 들어 사람에서의 질환의 임의의 치료를 커버하며, 다음을 포함한다: (a) 질환에 걸릴 가능성이 있지만 아직 질환을 가진 것으로 진단받은 적이 없는 대상체에서 질환이 발생하는 것을 방지하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉 발달을 억류하는 것; 그리고 (c) 질환을 경감시키는 것, 즉, 질환의 퇴행을 야기하는 것.
- [0063] 일부 실시예에서, 상기 방법은 고형 종양의 크기 및/또는 세포 수를 감소시키는 데 유용하다. 일부 실시예에서, 본 발명의 방법은 대상체에서 고형 종양과 같은 종양의 성장을 억제하는 데 유용하다.
- [0064] "항원"이란 용어는 면역계가 그것에 대항하여 항체를 생산하게 하거나, T 세포가 반응하는 임의의 물질을 지칭한다. 일부 실시예에서, 항원은 길이가 5-50 아미노산이거나 또는 최소한, 최대한, 또는 정확하게 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 250 또는 300 아미노산, 또는 거기에서 파생가능한 임의의 범위인 펩타이드이다.
- [0065] "항체"란 용어는 인간, 마우스, 인간화, 키메라 또는 다른 종에서 유래된 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 이량체, 다량체, 다중특이성 항체 및 항체 단편을 포함한다. "모노클로날 항체"는 특이적인 항원 부위에 대해 유도되는 실질적으로 동종성 항체의 집단으로부터 얻어진 항원이다.
- [0066] "항체 또는 그 기능적 단편"은 특정 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하거나 이들과 면역 반응성을 가진 면역글로불린 분자를 의미하며, 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체를 모두 포함한다. 항체라는 용어는 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 인간화 항체 및 이종접합체 항체 (예, 이종특이성 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디)와 같은, 유전자 조작되거나 이와 달리 변형된 형태의 면역글로불린을 포함한다. 기능적 항체 단편이라는 용어는 예를 들어, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rlgG 및 scFv 단편을 포함한, 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 용어 scFv는 전통적인 2 사슬 항체의 중쇄의 가변 도메인과 경쇄의 가변 도메인이 결합되어 하나의 사슬을 형성하는, 단일 사슬 Fv 항체를 지칭한다.
- [0067] 단일 사슬 가변 단편 (scFv)의 사용이 특히 관심사이다. scFvs는 항원 결합 도메인을 암호화하는 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 가변 영역들이 단일 폴리펩타이드로 조작되는 재조합 분자이다. 일반적으로, V_H 및 V_L 서열은 링커 서열에 의해 연결된다. 예를 들어, 본원에 참고로 구체적으로 인용되는, Ahmad (2012) Clinical and Developmental Immunology Article ID 980250를 참조한다.
- [0068] "치료학적 유효량" 또는 "유효량"은 질환을 치료하기 위해 포유류 또는 다른 대상체에게 투여될 때, 그러한 질환 치료에 효과를 갖기에 충분한, 제제의 양, 또는 두 가지 제제의 조합된 양을 지칭한다. "치료학적 유효량"은 제제(들), 질환 및 그 중증도 및 치료할 대상체의 연령, 체중 등에 따라 달라질 것이다.
- [0069] 여기에 본 명세서에 사용된 바와 같이, "a" 또는 "an"은 하나 이상을 의미할 수 있다. 여기에 청구항(들)에서 사용된 바와 같이, "포함하는"이라는 단어와 함께 사용될 때, 단어 "a" 또는 "an"은 하나 또는 하나 보다 많음을 의미할 수 있다.
- [0070] 청구항들에서 "또는"이라는 용어의 사용은 대안 만을 지칭하는 것으로 명시적으로 표시되거나 대안이 상호 배타적인 경우가 없는 한 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용되지만, 본 발명은 대안 만을 지칭하고 "및/또는"을 지칭하는 정의를 지지한다. 본원에 사용된 "또 다른"은 적어도 제2 또는 그 이상을 의미할 수 있다.
- [0071] 본 출원 전반에 걸쳐서, 용어 "약"은 값이 디바이스에 대한 고유한 오차의 변화, (상기 방법이 값을 결정하기 위해 사용됨), 또는 연구 대상체들 사이에 존재하는 변화를 포함하는 것으로 나타내는데 사용된다.
- [0072] **II. 폴리펩타이드**
- [0073] **A. 신호 펩타이드**
- [0074] "신호 펩타이드"는 소정의 세포 소기관 (예컨대 소포체) 및/또는 세포 표면으로, 세포 내에서의 단백질의 수송과 국소화를 지시하는 펩타이드 서열을 지칭한다. 신호 펩타이드는 초기 단백질을 소포체로 향하게 한다. 이는 수용체가 당질화되고 세포막에 고정되어야 하는 경우에 필수적이다. 일반적으로, 아미노 말단 대부분의 성분에 본래 결합된 신호 펩타이드가 사용된다 (예를 들어, 경쇄 - 링커 - 중쇄의 배향을 갖는 scFv에서, 경쇄의 본래 신호가 사용됨). 일부 실시예에서 신호 펩타이드는 서열번호 18이다.

- [0075] 일부 실시예에서, 신호 펩타이드는 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)의 통과 후에 절단되며, 즉 절단 가능한 신호 펩타이드이다. 일부 실시예에서, 제한효소 자리는 절단을 촉진하기 위하여 신호 펩타이드의 카르복시 말단에 있다.
- [0076] **B. 항원 결합 도메인**
- [0077] 항원 결합 도메인은 TGF- β 항체에 기반한 단일 사슬 가변 단편 (scFv)이다. "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재한다. 일부 실시예에서, 항원 결합 도메인은 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는, 펩타이드 링커를 V_H 와 V_L 도메인 사이에 추가로 포함한다.
- [0078] 본 발명의 폴리펩타이드의 항원 결합 도메인의 가변 영역은 V_H 및/또는 V_L CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기들을 돌연변이시켜 항체의 하나 이상의 결합 특성 (예, 친화도)를 개선시킴으로써 변형될 수 있다. 용어 "CDR"은 B 세포와 T 세포 각각에 의해 생성되는, 면역글로불린 (항체) 및 T-세포 수용체의 가변 사슬의 일부를 기본으로 하는 상보성 결정 영역을 의미하며, 이때 이 분자들은 그들의 특이적 항원에 결합한다. 면역글로불린 및 T-세포 수용체와 관련된 대부분의 서열 변화가 CDR에서 발견되기 때문에, 이들 영역은 때때로 초가변 영역으로 지칭된다. 돌연변이는 자리-유도 돌연변이 유발 또는 PCR-매개 돌연변이 유발에 의해 도입될 수 있으며, 항체 결합에 대한 영향 또는 다른 관심있는 기능적 특성은 적절한 시험관 내 또는 생체 내 분석에서 평가될 수 있다. 바람직하게는 보존적 변형이 도입되고 통상적으로 CDR 영역 내의 단지 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 잔기가 변경된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결실일 수 있다.
- [0079] 프레임워크 변형은 예를 들어, 하나 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 생식계열 서열(germline sequence)에 "복귀돌연변이(backmutating)"시킴으로써, 면역원성을 감소시키도록 항체에 일어날 수 있다.
- [0080] 또한 항원 결합 도메인은 항원 결합 도메인을 동일한 항원 (다가, multi-valent) 또는 상이한 항원 (다중-특이성)에 결합하는 V_H 및 V_L 영역 쌍으로 다량체화함으로써 다중특이성 또는 다가일 수 있다.
- [0081] 본원에서 사용된, 용어 "친화도"는 2개의 제제의 가역적 결합에 대한 평형 상수를 지칭하고, 해리 상수 (K_d)로서 표현된다. 친화도는 무관한 아미노산 서열에 대한 항체의 친화도보다, 적어도 1-배 이상, 적어도 2-배 이상, 적어도 3-배 이상, 적어도 4-배 이상, 적어도 5-배 이상, 적어도 6-배 이상, 적어도 7-배 이상, 적어도 8-배 이상, 적어도 9-배 이상, 적어도 10-배 이상, 적어도 20-배 이상, 적어도 30-배 이상, 적어도 40-배 이상, 적어도 50-배 이상, 적어도 60-배 이상, 적어도 70-배 이상, 적어도 80-배 이상, 적어도 90-배 이상, 적어도 100-배 이상, 또는 적어도 1000-배 이상, 또는 그 이상 (또는 거기에서 파생가능한 임의의 범위)일 수 있다. 본원에 사용된, 용어 "결합활성(avidity)"은 회식 후 분해에 대한 2개 이상의 제제의 복합체의 내성을 지칭한다. 용어 "면역 반응성이 있는" 및 "우선적으로 결합하다"란 항체 및/또는 항원 결합 단편과 관련하여 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.
- [0082] "결합"이라는 용어는 예를 들어, 공유, 정전기, 소수성 및 이온 및/또는 수소-결합 상호작용 (예, 염 브릿지 및 수소 브릿지 같은 상호작용을 포함함)으로 인한, 두 분자 사이의 직접적인 결합을 의미한다.
- [0083] **C. 펩타이드 스페이스**
- [0084] 스페이스 영역은 항원 결합 도메인을 막관통 도메인에 연결한다. 그것은 항원 결합 도메인이 항원 인식을 용이하게 하기 위해 다른 방향으로 향하게 할 수 있을 만큼 충분히 유연해야 한다. 가장 간단한 형태는 IgG 유래의 힌지 영역이다. 대안으로는 면역글로불린의 CH_2CH_3 영역 및 CD3의 부분들이 있다. 일부 실시예에서, CH_2CH_3 영역은 L235E/N297Q 또는 L235D/N297Q 변형, 또는 CH_2CH_3 영역의 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 대부분의 scFv 기반 구조체의 경우, IgG 힌지가 충분하다. 그러나 최선의 스페이스는 종종 실험적으로 결정되어야 한다. 일부 실시예에서, 스페이스는 IgG4에서 유래한다.
- [0085] 본원에서 사용된, 용어 "힌지"는 폴리펩타이드 영역의 측면에 구조적 유연성 및 간격을 제공하는 유연성 폴리펩타이드 커넥터 영역 (본원에서 "힌지 영역" 또는 "스페이스"로도 지칭됨)을 지칭하며, 천연 또는 합성 폴리펩타이드로 구성될 수 있다. 면역글로불린 (예를 들어, IgG1)으로부터 유래된 "힌지"는 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216에서 Pro230으로의 스트레칭으로 정의된다 (Burton (1985) Molec. Immunol., 22: 161-206). 다른 IgG 동종형의 힌지 영역은 중쇄-간 이황화물 (S-S) 결합을 형성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치

에 묶으로써 IgG1 서열과 정렬될 수 있다. 힌지 영역은 미국특허 제5,677,425호에 설명된 바와 같은 변경된 힌지 영역을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 자연 발생 또는 비-자연 발생인 것일 수 있다. 힌지 영역은 CH₁ 도메인과 다른 클래스 또는 서브클래스의 항체로부터 유래된 완전한 힌지 영역을 포함할 수 있다. "힌지"라는 용어는 CD8 및 기타 수용체로부터 유래된 영역을 포함할 수 있으며, 이는 측면 영역들에 유연성 및 간격을 제공함에 있어서 유사한 기능을 제공한다.

[0086] 펩타이드 스페이서는 최소한, 최대한, 또는 정확하게 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 325, 350, 또는 400 아미노산 (또는 거기에서 파생가능한 임의의 범위)의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 펩타이드 스페이서는 면역글로불린으로부터의 힌지 영역으로 구성되거나 이를 포함한다. 면역글로불린 힌지 영역 아미노산 서열은 당 기술분야에 공지되어 있으며; 예를 들어, Tan 등 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 162; 및 Huck 등 (1986) Nucl. Acids Res.을 참조한다.

[0087] 펩타이드 스페이서의 길이는 TGF- β 및/또는 확장 특성에 대한 반응에 영향을 줄 수 있다. 일부 실시예에서, 50, 45, 40, 30, 35, 30, 25, 20, 15 또는 10 미만 아미노산과 같이 스페이서가 짧을수록 효과적인 활성화 반응에 필요한 TGF- β 농도의 감소의 이점을 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 적어도 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 260, 270, 280 또는 290 아미노산과 같이 스페이서가 길수록 생체 내 또는 시험관 내에서 증가된 확장의 이점을 가질 수 있다.

[0088] 비-한정적인 예로서, 면역글로불린 힌지 영역은 하기 아미노산 서열 중 하나를 포함할 수 있다: DKTHT (서열번호 27); CPPC (서열번호 28); CPEPKSCDTPPPCPR (서열번호 29); ELKTPLGDTTHT (서열번호 30); KSCDKTHTCP (서열번호 31); KCCVDCP (서열번호 32); KYGPPCP (서열번호 33); EPKSCDKTHTCPPCP (서열번호 34) (인간 IgG1 힌지); ERKCCVECP (서열번호 35) (인간 IgG2 힌지); ELKTPLGDTTHTCP (서열번호 36) (인간 IgG3 힌지); SPNMVPHAHHAQ (서열번호 37); ESKYGPPCPPCP (서열번호 98) 또는 ESKYGPPCPSCP (서열번호 99) (인간 IgG4 힌지-기반) 등. 일부 실시예에서, 힌지는 서열번호 98 또는 서열번호 99이다. 일부 실시예에서, 힌지는 서열번호 99이다.

[0089] 힌지 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 힌지 영역은 야생형 (자연 발생) 힌지 영역에 비해 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 IgG1 힌지의 His229는 Tyr로 치환될 수 있어서, 힌지 영역은 서열 EPKSCDKTYTCPPCP (서열번호 38)를 포함한다.

[0090] 힌지 영역은 인간 CD8 유래의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며; 예를 들어, 힌지 영역은 하기 아미노산 서열: TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열번호 39), 또는 그 변이체를 포함할 수 있다.

[0091] D. 막관통 도메인

[0092] 막관통 도메인은 막에 뻗어 있는 소수성 알파 나선이다. 일반적으로, 엔도도메인의 가장 막 근위 성분인 막관통 도메인이 사용된다. 다른 막관통 도메인은 다른 수용체 안정성을 야기한다.

[0093] 막관통 도메인은 펩타이드 스페이서와 엔도도메인 사이에 개재되어 있다. 일부 실시예에서, 막관통 도메인은 펩타이드 스페이서와 보조-자극 영역 사이에 개재되어 있다. 일부 실시예에서, 링커가 막관통 도메인과 보조-자극 영역 또는 엔도도메인 사이에 있다.

[0094] 진핵성 (예, 포유류) 세포의 세포막에 폴리펩타이드를 삽입시키는 어떠한 막관통 도메인도 사용하기에 적합하다. 하나의 비-한정적인 예로서, 막관통 서열 IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (서열번호 48)가 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 막관통 도메인은 CD8 베타 유래: LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (서열번호 49); CD4 유래: ALIVLVGGVAGLLFLGIGIFCVR (서열번호 50); CD3 제타 유래: LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (서열번호 51); CD28 유래: WVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (서열번호 52); CD134 (OX40) 유래: VAAILGLVLGLLGLPLAILLALYLL (서열번호 53); 또는 CD7 유래: ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (서열번호 54)이다.

[0095] E. 엔도도메인

- [0096] 항원 인식 후, 수용체들이 결합하고 신호가 엔도도메인 및/또는 보조-자극 도메인을 통해 세포로 전달된다. 일부 실시예에서, 본원에 설명된 보조-자극 도메인은 엔도도메인의 일부이다. 가장 일반적으로 사용되는 엔도도메인 성분은 CD3-제타로, 3개의 ITAM을 함유하고 있다. 이는 항원이 결합된 후 활성화 신호를 T 세포로 전송한다. CD3-제타는 완전히 경쟁력있는 활성화 신호를 제공하지 않을 수 있으며 추가적인 보조-자극 신호전달이 필요하다. 예를 들어, 키메라 CD28 및 OX40은 CD3-제타와 함께 사용되어 증식/생존 신호를 전달하거나, 3가지를 모두 함께 사용할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 또 다른 엔도도메인은 항원 결합 도메인에 대한 항원의 결합에 의한 활성화에 반응하여 별개의 검출 가능한 신호(예, 세포에 의한 하나 이상의 사이토카인 생산 증가; 타겟 유전자의 전사 변화; 단백질 활성 변화; 세포 거동 변화, 예를 들어 세포 사멸; 세포 증식; 세포 분화; 세포 생존; 세포 신호전달 반응의 조절; 등)를 제공하는 임의의 바람직한 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 엔도도메인은 본원에 설명된 바와 같이 적어도 하나의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6 등) ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시예에서, 엔도도메인은 DAP10/CD28 형 신호전달 사슬을 포함한다.
- [0098] 본 발명의 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 엔도도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)-함유 세포내 신호전달 폴리펩타이드를 포함한다. ITAM 모티프는 $YX_1X_2(L/I)$ 이고, 이때 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산 (서열번호 64)이다. 일부 경우에, 엔도도메인은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 경우에, ITAM 모티프는 엔도도메인에서 두 번 반복되며, 이때 ITAM 모티프의 첫 번째와 두 번째 인스턴스는 6 내지 8개 아미노산, 예를 들어, $(YX_1X_2(L/I))(X_3)_n(YX_1X_2(L/I))$ 에 의해 서로 분리되어 있으며, 이때 n 은 6 내지 8의 정수이고, 상기 6-8 X_3 각각은 임의의 아미노산 (서열번호 65)일 수 있다.
- [0099] 적합한 엔도도메인은 ITAM 모티프를 함유하는 폴리펩타이드로부터 유래된 모티프-함유 부분일 수 있다. 예를 들어, 적합한 엔도도메인은 임의의 ITAM 모티프-함유 단백질로부터의 ITAM 모티프-함유 도메인일 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인은 그것이 유도되는 전체 단백질의 전체 서열을 함유할 필요는 없다. 적합한 ITAM 모티프-함유 폴리펩타이드의 예는 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: DAP12; FCER1G (Fc 엡실론 수용체 I 감마 사슬); CD3D (CD3 텔타); CD3E (CD3 엡실론); CD3G (CD3 감마); CD3Z (CD3 제타); 및 CD79A (항원 수용체 복합체-연관 단백질 알파 사슬).
- [0100] 일부 경우에, 엔도도메인은 DAP12에서 유래한다 (TYROBP; TYRO 단백질 티로신 키나아제 결합 단백질; KARAP; PLOSL; DN AX- 활성화 단백질 12; KAR-결합 단백질; TYRO 단백질 티로신 키나아제-결합 단백질; 킬러 활성화 수용체 연관 단백질; 킬러-활성화 수용체-연관 단백질; 등으로도 알려져 있음). 예를 들어, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 66);
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 67);
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 68); 또는
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 69)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0101] 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 전장 DAP12 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 ESPYOELGORSVDVYSDLNTQ (서열번호 70)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0102] 일부 실시예에서, 엔도도메인은 FCER1G에서 유래한다 (FCRG; Fc 엡실론 수용체 I 감마 사슬; Fc 수용체 감마-사슬; fc-엡실론 R1-감마; fcR감마; fcERI 감마; 고 친화도 면역글로불린 엡실론 수용체 서브유닛 감마; 면역글로불린 E 수용체, 고 친화도, 감마 사슬; 등으로도 알려져 있음). 예를 들어, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 MIPAVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGI VLTLLYCRKLIQVRKAAITSYEKSDGVYTG LSTRNQET YETLKH EKP PQ (서열번호 71)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0103] 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 전장 FCER1G 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 DGVYTGLSTRNOETYETLKHE (서열번호 72)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0104] 일부 실시예에서, 엔도도메인은 T-세포 표면 당단백질 CD3 델타 사슬에서 유래한다 (CD3D; CD3-델타; T3D; CD3 항원, 델타 서브유닛; CD3 델타; CD3d 항원, 델타 폴리펩타이드 (TiT3 복합체); OKT3, 델타 사슬; T-세포 수용체 T3 델타 사슬; T-세포 표면 당단백질 CD3 델타 사슬; 등으로도 알려져 있음). 예를 들어, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열 (2 동종형) 중 어느 하나의, 약 100 아미노산 내지 약 110 아미노산 (aa), 약 110 aa 내지 약 115 aa, 약 115 aa 내지 약 120 aa, 약 120 aa 내지 약 130 aa, 약 130 aa 내지 약 140 aa, 약 140 aa 내지 약 150 aa, 또는 약 150 aa 내지 약 170 aa의 인접한 스트레치(contiguous stretch)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다:
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKPIEELED RVFVNCNTSITWVEGTG TLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPA TVAGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETGR LSGAADTOALLRNDVOYOP LDRDDAOYSHLGGNWARNK (서열번호 73) 또는 MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKPIEELED RVFVNCNTSITWVEGTG TLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVOVHYRTADTOALLRND VOYOP LDRDDAQYSHLGGNWARNK (서열번호 74).
- [0105] 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 전장 CD3 델타 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 DOVYOPLRDRDDAOYSHLGGN (서열번호 75)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0106] 일부 실시예에서, 엔도도메인은 T-세포 표면 당단백질 CD3 엡실론 사슬에서 유래한다 (CD3e, T-세포 표면 항원 T3/Leu-4 엡실론 사슬, T-세포 표면 당단백질 CD3 엡실론 사슬, AI504783, CD3, CD3엡실론, T3e 등으로도 알려져 있음). 예를 들어, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열의, 약 100 아미노산 내지 약 110 아미노산 (aa), 약 110 aa 내지 약 115 aa, 약 115 aa 내지 약 120 aa, 약 120 aa 내지 약 130 aa, 약 130 aa 내지 약 140 aa, 약 140 aa 내지 약 150 aa, 또는 약 150 aa 내지 약 205 aa의 인접한 스트레치(contiguous stretch)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다:
MQSGTHWRVLGLCLLSVG VWGQDGN EEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYVVCYPRG SKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMVSATIVIVDICTGGLLLLVYYSKNNKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPVPNPDIYPIRKQGRDLYSGLNQRRI (서열번호 76).
- [0107] 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 전장 CD3 엡실론 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 NPDYPIRKQGRDLYSGLNQR (서열번호 77)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0108] 일부 실시예에서, 엔도도메인은 T-세포 표면 당단백질 CD3 감마 사슬에서 유래한다 (CD3G, T-세포 수용체 T3 감마 사슬, CD3-GAMMA, T3G, 감마 폴리펩타이드 (TiT3 복합체), 등으로도 알려져 있음). 예를 들어, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열의, 약 100 아미노산 내지 약 110 아미노산 (aa), 약 110 aa 내지 약 115 aa, 약 115 aa 내지 약 120 aa, 약 120 aa 내지 약 130 aa, 약 130 aa 내지 약 140 aa, 약 140 aa 내지 약 150 aa, 또는 약 150 aa 내지 약 180 aa의 인접한 스트레치(contiguous stretch)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다:
MEQKGGLAVLILAIILLQGT LAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGM YQCKGSQNKSKPLQVYIRM CQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGODGVROSASDKOTLLPNDOYOP LKDRDDQYSHLQGNQLRRN (서열번호 78).
- [0109] 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 전장 CD3 감마 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 DOLYOPLKDRDDOYSHLOGN (서열번호 79)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0110] 일부 실시예에서, 엔도도메인은 T-세포 표면 당단백질 CD3 제타 사슬에서 유래한다 (CD3Z, T-세포 수용체 T3 제

타 사슬, CD247, CD3-제타, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ, 등으로도 알려져 있음). 예를 들어, 적합한 세포내 신호전달 도메인 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열 (2 동종형) 중 어느 하나의, 약 100 아미노산 내지 약 110 아미노산 (aa), 약 110 aa 내지 약 115 aa, 약 115 aa 내지 약 120 aa, 약 120 aa 내지 약 130 aa, 약 130 aa 내지 약 140 aa, 약 140 aa 내지 약 150 aa, 또는 약 150 aa 내지 약 160 aa의 인접한 스트레치(contiguous stretch)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다:
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRR
KNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 80) 또는
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKQPR
RKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYDALHMQALPPR(서열번호 81).

[0111] 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 전장 CD3 제타 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열들 중 어느 하나와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다:
RVKFSRSADAPAYQOGNOLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPOEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR (서열번호 82); NOLYNELNLGRREEYDVLDKR (서열번호 83); EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK (서열번호 84); 또는
DGLYOGGLSTATKDTYDALHMO (서열번호 85).

[0112] 일부 실시예에서, 엔도도메인은 CD79A에서 유래한다 (B-세포 항원 수용체 복합체-연관 단백질 알파 사슬; CD79a 항원 (면역글로불린-연관 알파); MB-1 막 당단백질; ig-알파; 막- 결합 면역글로불린-연관 단백질; 표면 IgM-연관 단백질; 등으로도 알려져 있음). 예를 들어, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열 (2 동종형) 중 어느 하나의, 약 100 아미노산 내지 약 110 아미노산 (aa), 약 110 aa 내지 약 115 aa, 약 115 aa 내지 약 120 aa, 약 120 aa 내지 약 130 aa, 약 130 aa 내지 약 150 aa, 약 150 aa 내지 약 200 aa, 또는 약 200 aa 내지 약 220 aa의 인접한 스트레치(contiguous stretch)와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다:
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPSNNSNANVTWVRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGG
IYVCRVQEGNESYQQSCGYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVPGTLLFRKRWONEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISR
GLOGTYQDVGSLNIGDVQLEKP (서열번호 86); 또는
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPSNNSNANVTWVRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGT
KNRIITAEGIILLFCAVPGTLLFRKRWONEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYE DISRGLQGYQDVGSLNIGDVQLEKP (서열번호 87).

[0113] 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 전장 CD79A 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 엔도도메인 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다: ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG (서열번호 88).

[0114] 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인은 DAP10/CD28 타입 신호전달 사슬을 포함할 수 있다. DAP 10 신호전달 사슬의 한 예는 하기 아미노산 서열이다: RPRRSPAQDGKVIYNMPGRG (서열번호 89). 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인은 아미노산 서열 RPRRSPAQDGKVIYNMPGRG (서열번호 90)의 전체 길이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0115] CD28 신호전달 사슬의 한 예는 하기 아미노산 서열
FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열번호 91)이다. 일부 실시예에서, 적합한 엔도도메인은 아미노산 서열
FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열번호 92)의 전체 길이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0116] 본 발명의 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 추가의 엔도도메인은 ZAP70 폴리펩타이드, 예를 들어 하기 아미노산 서열의, 약 300 아미노산 내지 약 400 아미노산, 약 400 아미노산 내지 약 500 아미노산, 약 500 아미노산 내지 619 아미노산의 인접한 스트레치(contiguous stretch)와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다:
MPDPAHLPPFFYGSIS

RAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAAGGAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVFDCL
RDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKL IATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSLYGKTVYHYLISQDKAGK
YCIPEGTKFDLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAPTLPAPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDP
EELKDKKFLKRDNL IADIELGCGNFGSVRQGVYMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAIIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGLHK
FLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTARSAGKWPLKWAPECFINFRKFSSRSDDVWSYG
VTMWEALSYGQKPYKKMGPEVMAFIEQGKRMECPPECPPELYALMSDCWIKWEDRPDFTLVEQRMACYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA (서열번
호 93).

[0117] **F. 검출 펩타이드**

[0118] 적절한 검출 펩타이드는 혈구응집소(hemagglutinin) (HA; 예, YPYDVPDYA (서열번호 94), FLAG (예, DYKDDDDK (서열번호 17), c-myc (예, EQKLISEEDL; 서열번호 95) 등을 포함한다. 다른 적절한 검출 펩타이드는 당 기술분야에 공지되어 있다.

[0119] **G. 펩타이드 링커**

[0120] 일부 실시예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 펩타이드 링커 (때때로 링커라고도 함)를 포함한다. 펩타이드 링커는 본원에 설명된 펩타이드 도메인/영역 중 임의의 것을 분리할 수 있다. 한 예로, 링커는 신호 펩타이드와 항원 결합 도메인 사이, 항원 결합 도메인의 VH와 VL 사이, 항원 결합 도메인과 펩타이드 스페이서 사이, 보조-자극 영역의 측부에 있거나 보조-자극 영역의 N- 또는 C- 영역 상의, 펩타이드 스페이서와 막관통 도메인 사이, 및/또는 막관통 도메인과 엔도도메인 사이에 위치할 수 있다. 펩타이드 링커는 다양한 아미노산 서열 중 임의의 것을 가질 수 있다. 다른 화학 결합이 배제되지는 않지만, 도메인과 영역은 일반적으로 유연한 성질을 갖는 펩타이드 링커에 의해 연결될 수 있다. 링커는 약 6 내지 약 40아미노산 길이, 또는 약 6 내지 약 25 아미노산 길이인 펩타이드일 수 있다. 이들 링커는 합성, 링커-암호화 올리고뉴클레오티드를 이용하여 단백질을 결합시킴으로써 생산될 수 있다.

[0121] 어느 정도의 유연성이 있는 펩타이드 링커를 사용할 수 있다. 펩타이드 링커는 적합한 펩타이드 링커가 일반적으로 유연성 펩타이드를 생성하는 서열을 가질 것이라는 점을 염두에 두면서, 사실상 어떠한 아미노산 서열도 가질 수 있다. 글리신과 알라닌과 같은 소형 아미노산의 사용은 유연성 펩타이드를 만드는데 사용된다. 그러한 서열의 생성은 당 기술분야의 숙련자에게는 일상적이다.

[0122] 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있고, 4 아미노산 내지 10 아미노산, 5 아미노산 내지 9 아미노산, 6 아미노산 내지 8 아미노산, 또는 7 아미노산 내지 8 아미노산을 비롯하여, 1 아미노산 (예, Gly) 내지 20 아미노산, 2 아미노산 내지 15 아미노산, 3 아미노산 내지 12 아미노산과 같이, 다양한 길이의 적합한 것 중 어느 하나를 가질 수 있으며, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 아미노산일 수 있다.

[0123] 예시적인 유연성 링커는 글리신 중합체 (G)_n, 글리신-세린 중합체 (예를 들어, (GS)_n, (GSGGS)_n (서열번호 40) 및 (GGGS)_n (서열번호 41)을 포함함, 이때 n은 적어도 하나의 정수임), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 본 기술분야에 공지된 다른 유연성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체가 사용될 수 있다; Gly와 Ser는 둘 다 비교적 비구조적이며, 따라서 성분들 사이의 중립적인 연결고리 역할을 할 수 있다. 글리신 중합체가 사용될 수 있다; 글리신은 심지어 알라닌보다 훨씬 더 많은 파이-프사이(phi-psi) 공간에 접근하며, 보다 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한을 받는다. 예시적인 스페이서는 GSGG (서열번호 42), GGSGG (서열번호 43), GSGSG (서열번호 44), GSGGG (서열번호 45), GGGSG (서열번호 46), GSSSG (서열번호 47) 등을 포함하지만, 이들에만 한정되지 않는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0124] **H. 보조-자극 영역**

[0125] 적합한 보조-자극 영역의 비-제한적인 예는 4-1BB (CD137), CD28, ICOS, OX-40, BTLA, CD27, CD30, GITR 및 HVEM로부터의 폴리펩타이드를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0126] 보조-자극 영역은 길이가 최소한, 최대한, 또는 정확하게 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 또는 300 아미노산 또는 여기에서 파생가능한 임의의 범위를 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 4-1BB (TNFRSF9; CD137; 4-1BB; CDw137; ILA; 등으로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들어, 적합한 보조-자극 영역은 KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열번호 55)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0127] 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 CD28 (Tp44으로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들면, 적합한 보조-자극 영역은 FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열번호 56)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0128] 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 ICOS (AILIM, CD278, 및 CVID1으로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들면, 적합한 보조-자극 영역은 TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (서열번호 57)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0129] 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 OX-40 (TNFRSF4, RP5-902P8.3, ACT35, CD134, OX40, TXGP1L으로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들면, 적합한 보조-자극 영역은 RRDQRLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKI (서열번호 58)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0130] 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 BTLA (BTLA1 및 CD272로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들면, 적합한 보조-자극 영역은 CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSGVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (서열번호 59)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0131] 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 CD27 (S 152, T14, TNFRSF7 및 Tp55로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들면, 적합한 보조-자극 영역은 HQRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (서열번호 60)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0132] 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 CD30 (TNFRSF8, D1S166E 및 Ki-1로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들면, 적합한 보조-자극 영역은 RRACRRIRQKHLHCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEKGKEDPLPTAASGK (서열번호 61)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0133] 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 GITR (TNFRSF18, RP5-902P8.2, AITR, CD357 및 GITR-D로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들면, 적합한 보조-자극 영역은 HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRGLDLWV (서열번호 62)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0134] 일부 실시예에서, 보조-자극 영역은 막관통 단백질 HVEM (TNFRSF14, RP3-395M20.6, ATAR, CD270, HVEA, HVEM, LIGHTR 및 TR2로도 알려짐)의 세포내 부분으로부터 유도된다. 예를 들면, 적합한 보조-자극 영역은 CVKRRKPRGDDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH (서열번호 63)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0135] **I. 부가적인 변형**
- [0136] 부가적으로, 본 발명의 폴리펩타이드는 화학적으로 변형될 수 있다. 폴리펩타이드의 당질화는 예를 들어, 항원에 대한 폴리펩타이드의 친화도를 증가시키기 위해 폴리펩타이드 서열 내의 하나 이상의 당질화 자리를 변형시킴으로써, 변경될 수 있다 (미국 특허 제5,714,350호 및 제6,350,861호).
- [0137] 본 발명의 폴리펩타이드는, 하나 이상의 PEG 기가 폴리펩타이드에 부착되는 조건 하에, 폴리펩타이드를 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응시킴으로써 생물학적 반감기를 증가시키도록 PEG화될 수 있다. 폴리펩타이드 PEG화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용해성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응에 의해 수행될 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 모노

(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드와 같은, 다른 단백질을 유도체화하는 데 사용된 임의의 PEG 형태를 포괄하는 것으로 의도된다. 단백질을 폐길화하는 방법은 당 기술분야에 공지되어 있으며 본 발명의 폴리펩타이드에 적용될 수 있다 (EP 0 154 316 및 EP 0 401 384).

[0138] 부가적으로, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드를 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민에 접합하거나 융합시켜서, 생성된 분자의 반감기를 증가시킴으로써 화학적으로 변형될 수도 있다. 이러한 접근법은 예를 들어 EP 0322094 및 EP 0 486 525에 기재되어 있다.

[0139] 본 발명의 폴리펩타이드는 진단제 또는 치료제에 접합될 수도 있고, 예를 들어, 질환의 발달 또는 진행을 모니터링하고 주어진 치료 요법의 효능을 결정하기 위해 진단학적으로 사용될 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 폴리펩타이드의 면역 자극 효과와 함께 치료제를 제공하기 위해 치료제에 접합될 수도 있다. 진단제의 예는 효소, 보색기, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자 방출 단층 촬영을 이용한 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 검출 가능한 물질은 당 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 폴리펩타이드에 직접적으로, 또는 링커를 통해 간접적으로 연결되거나 접합될 수 있다. 적합한 효소의 예로는 양고추냉이 과산화효소, 알칼라인 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라아제를 포함한다. 적합한 보색기 복합체의 예로는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함한다. 적합한 형광 물질의 예로는 움벨리페론(umbelliferone), 플루오레세인(fluorescein), 플루오레세인 이소시아네이트, 로다민(rhodamine), 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인(dichlorotriazinylamine fluorescein), 단실 염화물(dansyl chloride) 또는 피코에리트린(phycoerythrin)을 포함한다. 발광 물질의 예로는 루미놀(luminol)을 포함한다. 생물 발광 물질의 예로는 루시페라제(luciferase), 루시페린(luciferin), 및 에퀴린(aequorin)을 포함한다. 적합한 방사성 물질의 예로는 .sup.125I, .sup.131I, 인듐-111, 루테튬-171, 비스무스-212, 비스무스-213, 아스타틴-211, 구리-62, 구리-64, 구리-67, 이트륨-90, 요오드-125, 요오드-131, 인-32, 인-33, 스칸듐-47, 은-111, 갈륨-67, 프라세오디뮴-142, 사마륨-153, 테르븀-161, 디스프로슘-166, 홀름-166, 레늄-186, 이테늄-188, 레늄-189, 납-212, 라듐-223, 악티늄-225, 철-59, 셀레늄-75, 비소-77, 스트론튬-89, 몰리브덴-99, 로듐-1105, 팔라듐-109, 프라세오디뮴-143, 프로메튬-149, 어븀-169, 이리듐-194, 금-198, 금-199 및 납-211을 포함한다. 킬레이트화제는 침묵 (Meares 등, 1984 Anal. Biochem. 142: 68-78); 아미노산 잔기들의 설프하이드랄기 (Koyama 1994 Chem. Abstr. 120: 217262t) 및 탄수화물 작용기 (Rodwell 등 1986 PNAS USA 83: 2632-2636; Quadri 등 1993 Nucl. Med. Biol. 20: 559-570)를 통해 부착될 수 있다.

[0140] 폴리펩타이드는 또한 폴리펩타이드의 면역 자극 효과와 함께 치료제를 제공하기 위해 치료제에 접합될 수도 있다.

[0141] 부가적인 적합한 접합된 분자는 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 안티센스 핵산, siRNA 분자와 같은 억제성 RNA 분자, 면역자극성 핵산, 앵타머, 리보자임, 삼중체 형성 분자 및 외부 가이드 서열을 포함한다. 앵타머는 스텐-루프 또는 G-과르텟과 같은, 정의된 이차 및 삼차 구조로 접히는 길이가 15-50 염기 범위인 소형 핵산이며, ATP(미국 특허 제5,631,146호) 및 테오픈린 (미국 특허 제5,580,737호)와 같은 소형 분자 뿐만 아니라, 역전사 효소 (미국 특허 제5,786,462호) 및 트롬빈 (미국 특허 제5,543,293호)과 같은 대형 분자에 결합할 수 있다. 리보자임은 분자 내 또는 분자 간에, 화학 반응을 촉매할 수 있는 핵산 분자이다. 리보자임은 통상적으로 타겟 기질의 인식 및 결합을 통해 핵산 기질을 절단하여 후속적으로 절단시킨다. 삼중체 형성 기능 핵산 분자는 3개의 DNA 가닥이 왓슨 크릭(Watson-Crick) 및 후그스틴(Hoogsteen) 염기쌍 형성에 의존하여 복합체를 형성하는, 삼중체를 형성함으로써 이중 가닥 또는 단일 가닥 핵산과 상호 작용할 수 있다. 삼중체 분자는 높은 친화도와 특이성으로 타겟 영역에 결합할 수 있다.

[0142] 기능성 핵산 분자는 타겟 분자가 보유한 특이적 활성의 효과기, 억제자, 조절자 및 자극제로서 작용할 수 있거나, 기능성 핵산 분자는 다른 어떤 분자들과도 독립적으로 새로운(de novo) 활성을 보유할 수 있다.

[0143] J. 암-특이적 키메라 항원 수용체

[0144] 일부 실시예에서, 세포는 암-특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)를 더 포함할 수 있다. CAR의 맥락에서 용어 "암-특이적"은 암-특이적 항원과 같은, 암-특이적 분자에 대한 항원 결합 특이성을 갖는 CAR을 의미한다. 일부 실시예에서, 암-특이적 CAR은 TGF- β CAR이 있는 세포에 있다. 일부 실시예에서, 암-특이적 CAR, TGF- β 치료는 별도의 폴리펩타이드에 있다. 일부 실시예에서, CAR는 암-특이적 분자와 TGF- β 에 대한 항원 결합을 가지는 이중 특이성 CAR이다. 예를 들어, 이중특이성 CAR는 신호전달 펩타이드, 암 분자-특이적 scFv, 선택적으로 펩타이드 링커/스페이서, 이어서 TGF- β scFv, 이어서 스페이서, 막관통 도메인, 및 보조 자극성 도메인을 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 이중특이성 CAR은 본원에 설명된 하나 이상의 부가적인 펩타이드 분절을 포함한다.

- [0145] 일부 실시예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 CD20 scFv를 포함할 수 있다. 예시적인 CD20 scFv는 하기를 포함한다:
DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWSFNPPTFGGGTLKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGSSSEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHVWVKTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVGAGTTVTVSS (서열번호 100).
- [0146] 일부 실시예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 CD19 scFv를 포함할 수 있다. 예시적인 CD19 scFv는 하기를 포함한다:
DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTLKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTGKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGSTVTVSS (서열번호 101)
- [0147] 다른 암-특이적 분자 (CD19와 CD20 이외)로는 CAIX, CD33, CD44v7/8, CEA, EGP-2, EGP-40, erb-B2, erb-B3, erb-B4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, GD2, GD3, Her2/neu, IL-13R-a2, KDR, k-경쇄, LeY, L1 세포 접착 분자, MAGE-A1, 메소텔린, MUC1, NKG2D 리간드, 종양태아성 항원 (h5T4), PSCA, PSMA, mAb IgE가 타겟으로 하는 TAA, TAG-72 및 VEGF-R2를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 암-특이적 분자는 Her2를 포함한다.
- [0148] **III. 세포**
- [0149] 소정의 실시예들은 본 발명의 폴리펩타이드 또는 핵산을 포함하는 세포에 관한 것이다. 일부 실시예에서 세포는 면역 세포 또는 T 세포이다. "T 세포"는 T-헬퍼 세포 (CD4⁺ 세포), 세포독성 T-세포 (CD8⁺ 세포), T-조절성 세포 (Treg) 및 감마-델타 T 세포를 비롯한 CD3를 발현하는 모든 유형의 면역 세포를 포함한다. "세포독성 세포"는 세포독성 반응을 매개할 수 있는, CD8⁺ T 세포, 자연 살해 세포 (NK) 및 호중구가 포함된다.
- [0150] 적합한 포유류 세포는 일차 세포(primary cell)와 불멸화 세포주를 포함한다. 적합한 포유류 세포는 인간 세포주, 비인간 영장류 세포주, 설치류 (예를 들어, 마우스, 랫) 세포주 등을 포함한다. 적합한 포유류 세포주는 HeLa 세포 (예, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection, ATCC) No. CCL-2), CHO 세포 (예, ATCC No. CRL9618, CCL61, CRL9096), 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포 (예, ATCC No. CRL-1573), Vero 세포, NIH 3T3 세포 (예, ATCC No. CRL-1658), Huh-7 세포, BHK 세포 (예, ATCC No. CCL10), PC12 세포 (ATCC No. CRL1721), COS 세포, COS-7 세포 (ATCC No. CRL1651), RAT1 세포, 마우스 L 세포 (ATCC No. CCL1.3), HLHepG2 세포, Hut-78, Jurkat, HL-60, NK 세포주 (예, NKL, NK92, YTS) 등을 포함하지만, 이들에만 한정되지 않는다.
- [0151] 일부 경우에, 세포는 불멸화 세포가 아니지만, 그 대신 개체로부터 얻어진 세포 (예를 들어, 일차 세포)이다. 예를 들어, 일부 경우에, 세포는 개체로부터 얻어진 면역 세포이다. 한 예로서, 세포는 개체로부터 얻어진 T 림프구이다. 다른 예로서, 세포는 개체로부터 얻어진 세포독성 세포이다. 다른 예로서, 세포는 개체로부터 얻어진 줄기 세포 또는 기원 세포이다.
- [0152] **IV. 방법**
- [0153] 본 발명의 측면들은 면역 반응을 자극하기 위한 방법에 관한 것이다. 면역 반응 자극은 *시험관 내*, *생체 내*, 또는 *생체 외*에서 수행될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 TGF-β의 존재 시에 면역 반응을 자극할 수 있는 세포에 관한 것이다. 상기 방법은 일반적으로, 발현 벡터, 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, RNA (예를 들어, 시험관 내 전사된 RNA)로 포유류 세포를 유전적으로 변형시키거나 또는 폴리펩타이드를 세포에 직접 전달하는 것을 포함한다. 세포는 면역 세포 (예를 들어, T 림프구 또는 NK 세포), 줄기 세포, 기원 세포 등일 수 있다. 일부 실시예에서, 세포는 본원에 설명된 세포이다.
- [0154] 일부 실시예에서, 유전자 변형이 *생체 외*에서 수행된다. 예를 들어, T 림프구, 줄기 세포, 또는 NK 세포 (또는 본원에 설명된 세포)는 개체로부터 수득되며; 개체로부터 수득된 세포는 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하도록 유전적으로 변형된다. 일부 경우에, 유전적으로 변형된 세포가 *생체 외* 활성화된다 (즉, TGF-β는 *생체 외*에서 세포와 접촉됨). 다른 경우에, 유전적으로 변형된 세포는 개체 (예를 들어, 세포가 수득된 개체)에 도입되며; 유전적으로 변형된 세포는 *생체 내* 활성화된다 (즉, 내생적으로 생산된 TGF-β에 의해).
- [0155] 일부 실시예에서, 상기 방법은 이중특이성 T 세포 결합제 (BITE)와 같은, 추가적인 치료제의 투여를 더 포함한다. 이러한 치료제는 펩타이드 형태로 환자에게 투여되거나 TGF-β CAR을 포함하는 것과 같은 본 발명의 세포에서 발현될 수 있다. BITE는 당 기술분야에 공지되고 그리고/또는 본원에 설명된 암 항원/암 분자에 대한 항원

특이성을 가질 수 있으며 CD3와 같은 T 세포 분자에 대한 항원 특이성을 가질 수도 있다.

[0156]

일부 실시예에서, 본 방법은 암 치료를 위해 본원에 설명된 세포 또는 펩타이드를 투여하거나 또는 암 환자에게 투여하는 것에 관한 것이다. 일부 실시예에서 암은 부신암, 항문암, 담도암, 방광암, 골암, 소아 또는 성인의 뇌/CNS 종양, 유방암, 자궁경부암, 결장암/직장암, 자궁내막암, 식도암, 유잉(ewing) 종양 군, 안암, 담낭암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 기질 종양(gastrointestinal stromal tumor, GIST), 임신성 용모 질환(gestation testobrophic disease), 호지킨 질환, 카포시 육종, 신장암, 후두 및 하인두 암, 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수모구성 백혈병, 간암, 폐암, 비-소세포 폐암, 소세포 폐암, 폐 카르시노이드 종양, 림프종, 악성 중피종, 다발성 골수종, 골수형성이상 증후군, 비강 및 부비동 부암, 비인두암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 구강 또는 구인두 암, 골육종, 난소암, 췌장암, 음경암, 뇌하수체 종양, 전립선암, 망막 모세포종, 횡문근 육종, 타액선 암, 피부암, 육종, 기저 피부암, 편평세포 피부암, 흑색종, 메르켈 세포 피부암, 소장암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 자궁 육종, 질암, 외음부암, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(waldenstrom macroglobulinemia), 또는 윌름스 종양(wilms tumor)이다.

[0157]

실시예들은 다수의 면역 매개 염증성, 또는 예를 들면, 알러지, 천식, 당뇨병 (예를 들어, 1 형 당뇨병), 이식 거부 등의, 자가면역-염증성 질환을 치료 또는 개선하는데 사용될 수 있다. 또한 그러한 질환 또는 장애의 예로는 관절염 (류마티스 관절염, 예컨대 급성 관절염, 만성 류마티스 관절염, 통풍 또는 통풍성 관절염, 급성 통풍성 관절염, 급성 면역학적 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, II형 콜라겐-유도 관절염, 감염성 관절염, 라임(Lyme) 관절염, 증식성 관절염, 건선 관절염, 스틸(Still) 질환, 척추 관절염, 및 전신성 소아 발병 류마티스 관절염, 골관절염, 만성 진행성 관절염, 관절염 변형증, 다발성 관절염 프리마리아, 반응성 관절염 및 강직성 척추염), 염증성 과다증식성 피부 질환, 건선, 예컨대 판상 건선, 반점성 건선, 농포성 건선 및 손발톱 건선, 건초열 및 욱(Job) 증후군과 같은 아토피 질환을 포함한 아토피 피부염, 접촉 피부염, 만성 접촉 피부염, 박리성 피부염, 알레르기성 피부염, 알레르기성 접촉 피부염, 포진성 피부염, 화폐상 피부염, 지루성 피부염, 비-특이성 피부염, 원발 자극성 접촉 피부염, 및 아토피 피부염을 포함한 피부염, x-연관 고 IgM 증후군, 알레르기성 안구내 염증성 질환, 만성 두드러기, 예컨대 알레르기성 두드러기 및 만성 특발성 두드러기 (만성 자가면역 두드러기 포함), 근염, 다발성 근염/피부근염, 소아 피부근염, 독성 표피 괴사, 경피증 (전신성 경피증 포함), 경화증, 예컨대 전신성 경화증, 다발성 경화증 (MS), 예컨대 척수-시각 MS, 원발성 진행형 MS (PPMS) 및 재발-완화 반복성 MS (RRMS), 진행성 전신 경화증, 즉상동맥경화증, 동맥경화증, 경화증 파종증, 실조성 경화증, 시신경 척수염 (NMO), 염증성 장 질환 (IBD) (예, 크론병, 자가면역-매개 위장 질환, 대장염, 예컨대 궤양성 대장염, 대장 궤양, 현미경적 대장염, 콜라겐성 대장염, 폴리포사 대장염, 괴사성 장염 및 통벽성 대장염 및 자가면역 염증성 장 질환), 장 염증, 괴저성 농피증, 결절성 홍반, 원발 경화성 담관염, 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)을 포함한 호흡 곤란 증후군, 수막염, 홍채의 전부 또는 일부 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액학적 장애, 류마티스성 척추염, 류마티스성 활액막염, 유전성 혈관부종, 수막염에서와 같은 뇌신경 손상, 임신 포진, 임신 천포창, 음낭 소양증, 자가면역 조기 난소 부전증, 자가면역 상태에 의한 갑작스러운 청력 상실, IgE-매개 질환, 예컨대 과민증 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염(encephalitis), 예컨대 라스무센(Rasmussen) 뇌염 및 변연계 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예컨대 전방 포도막염, 급성 전방 포도막염, 육아종성 포도막염, 비-육아종성 포도막염, 과코항원성 포도막염, 후방 포도막염 또는 자가면역 포도막염, 신증후군을 갖거나 없는 사구체신염(glomerulonephritis; GN), 예컨대 만성 또는 급성 사구체신염, 예컨대 원발성 GN, 면역-매개 GN, 막성 GN (membranous nephropathy), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신증, I형 및 II형을 포함한 막- 또는 막 증식성 GN (MPGN), 및 급속한 진행성 GN, 증식성 신장염, 자가면역 다발생식신 내분비선 부전, 국한성 형질세포 귀두염을 포함한 귀두염, 귀두포피염, 원심성 윤상 홍반, 지속성 색소이상 홍반, 다형 홍반, 원형 육아종, 광택 태선, 경화 위축성 편평 태선, 만성 단순 태선, 충만성 비늘증, 표피박리 각화과다증, 전암성 각화증, 괴저성 농피증, 알러지 질환 및 반응, 알레르기성 작용, 알레르기성 또는 아토피성 습진, 건성 습진, 이한성 습진 및 소수포성 손발바닥 습진을 포함한 습진, 천식, 예컨대 소기관지 천식, 기관지 천식 및 자가면역 천식, T 세포 침투 및 만성적 염증반응과 관련된 상태, 임신 중 태아 A-B-O 혈액형과 같은 외래 항원에 대한 면역 반응, 만성 폐염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍증, 루푸스 신염, 루푸스 뇌염, 소아 루푸스, 비신장 루푸스, 신장의 루푸스, 반상 루푸스 및 반상 루푸스 홍반을 포함한, 루푸스, 탈모성 루푸스, 전신적 홍반성 루푸스 (SLE), 예컨대 피부 SLE 또는 아급성 피부 SLE, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 및 홍반성 루푸스 낭창, 소아 인슐린-의존성 당뇨병 (IDDM)을 포함한 유아 발병 (I 형) 당뇨병, 및 성인 발병 당뇨병 (II 형), 및 자가면역 당뇨병을 포함하지만, 이들에만 한정되지 않는다. 사이토카인 및 T 림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연된 과민성과 관련된 면역 반응, 사코이도시스(sarcoidosis), 림프종모양 육아종증(lymphomatoid

granulomatosis)을 포함한 육아종증, 웨그너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 무과립구증(agranulocytosis), 혈관염, 거대혈관 혈관염 (다발근육통(polymyalgia rheumatica) 및 거대세포 (Takayasu's) 동맥염 포함), 중간혈관 혈관염 (카와사키 질환 및 결절 다발 동맥염/결절 동맥주위염 포함), 마이크로스코픽 다발동맥염, 면역혈관염, CNS 혈관염, 피부성 혈관염, 과민성 혈관염, 괴사성 혈관염, 예컨대 전신 괴사성 혈관염, 및 척-스트라우스 혈관염(Churg-Strauss vasculitis) 또는 증후군 (CSS)와 같은 ANCA-연관 혈관염) 및 ANCA-연관 소혈관 혈관염을 포함한, 혈관염, 측두 동맥염(temporal arteritis), 재생불량성 빈혈(aplastic anemia), 자가면역 재생불량성 빈혈, 콤스(coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙판 빈혈(Diamond Blackfan anemia), 용혈성 빈혈 또는 자가면역 용혈성 빈혈 (AIHA)을 포함한, 면역 용혈성 빈혈, 에디슨 병, 자가면역 호중구 감소증, 범혈구 감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 침윤과 관련된 질환, CNS 염증성 질환, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다기관 손상 증후군(multiple organ injury syndrome), 예컨대 패혈증, 외상 또는 출혈에 이차적인 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 안티-글로머룰러 기저막 질환(anti-glomerular basement membrane disease), 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염(allergic neuritis), 베체트 병/증후군, 캐슬만 증후군, 굿파스처 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐스-존슨 증후군, 천포창, 예컨대 수포성 천포창 및 피부 천포창, (심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 구강 점막 유사천포창 및 홍반 천포창 포함한) 천포창, 자가면역 다발성 내분비병증(autoimmune polyendocrinopathies), 라이트 질환 또는 증후군, 열 손상, 자간전증(preeclampsia), 면역 복합체 신염 같은 면역 복합체 장애, 항체-매개 신염, 다발성 신경병증, 만성 신경병증, 예컨대 IgM 다발성 신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 자가면역 또는 면역-매개 혈소판감소증, 예컨대 만성 또는 급성 ITP를 포함한, 특발성 혈소판감소성 자반병 (ITP), 공막염(scleritis), 예컨대 특발성 강-공막염, 상공막염, 자가면역 고환염 및 난청염을 포함한, 정소 및 난소의 자가면역 질환, 원발성 갑상선기능 저하증, 부갑상선 기능 저하증, 갑상선염, 예컨대 자가면역 갑상선염, 하시모토병(Hashimoto's disease), 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염) 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선 기능저하증, 그레이브스병, 다발생식선 증후군, 예컨대 자가면역 다발생식선 증후군 (또는 다발생식선 내분비 증후군), 신경학적 부신생물 증후군, 예컨대 램버트-이튼 근무력 증후군 또는 이튼-램버트 증후군을 포함한, 부신생물 증후군, 강직 인간 증후군(stiff-man or stiff-person syndrome), 뇌척수염, 예컨대 알레르기성 뇌척수염 또는 뇌척수염 알러지 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 실험적 자가면역 뇌척수염, 중증 근무력증, 예컨대 흥선-연관 중증 근무력증, 소뇌 변성, 신경근 긴장증, 안구간대경련 또는 안구간대경련 근간대경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다초점 운동 신경병증, 쉬한 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루푸스양 간염, 거대 세포 간염, 만성 활동성 간염, 림프성 간질성 폐렴(LIP), 폐쇄성 세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 버거병 (IgA 신증), 특발성 IgA 신증, 선형 IgA 피부증, 급성 발열성 호중구성 피부증, 각질하 농포성 피부증, 일과성 극세포해리 피부증, 간경변, 예컨대 원발성 담즙성 간경변 및 폐렴성 간경변, 자가면역 장병증 증후군, 셀리악병, 셀리악 스프루 (글루텐 장병증), 난치성 스프루, 특발성 스프루, 저온글로불린혈증, 근위축성 측색 경화증 (ALS; 루게릭병), 관상동맥 질환, 자가면역 귀 질환, 예컨대 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 청력 손실, 다발연골염, 예컨대 난치성 또는 재발된 또는 재발성 다발연골염, 폐포 단백질증, 코간 증후군/비매독성 간질 각막염, 벨 마비(Bell's palsy), 스위트 병/증후군, 주사(rosacea) 자가면역, 대상 포진-관련 통증, 아밀로이드증, 비암성 림프구증(non-cancerous lymphocytosis), 모노클로날 B 세포 림프구증 (예, 양성 모노클로날 감마병증 및 결정되지 않은 유의성의 모노클로날 감마글로불린혈증 (monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS)을 포함하는, 원발성 림프구증(primary lymphocytosis), 말초 신경병증(peripheral neuropathy), 부신생물 증후군(paraneoplastic syndrome), 채널병증(channelopathies), 예컨대 간질(epilepsy), 편두통(migraine), 부정맥(arrhythmia), 근육 장애, 난청(deafness), 실명(blindness), 주기성 근육마비(periodic paralysis) 및 CNS의 채널병증, 자폐증(autism), 염증성 근육병(inflammatory myopathy), 초점성 또는 분절성 또는 초점 분절성 사구체경화증 (FSGS), 내분비 안구병증(endocrine ophthalmopathy), 유베오레티니티스(uveoretinitis), 맥락망막염(chorioretinitis), 자가면역 간질환(autoimmune hepatological disorder), 근육섬유통(fibromyalgia), 다수 내분비 실패(multiple endocrine failure), 슈미트 증후군(Schmidt's syndrome), 부신염(adrenitis), 위장 근무력증(gastric atrophy), 초로기 치매(presenile dementia), 탈수초 질환, 예컨대 자가면역 탈수초 질환 및 만성 염증성 탈수초 다발신경병증, 드레스러 증후군(Dressler's syndrome), 알로페시아 그리타(alopecia greata), CREST 증후군 (석회증(calcinosis), 레이나우드 증후군(Raynaud's phenomenon), 식도 운동장애(esophageal dysmotility), 수지경화증(sclerodactyl)), 및 모세혈관확장증(telangiectasia)), 예를 들어, 항-정자 항체로 인한, 수컷 및 암컷 자가면역 불임, 혼합된 연결조직 질환, 샤가스 질환(Chagas' disease), 류마티스 열병, 재발성 유산, 농부폐병(farmer's lung), 다형 홍반, 심장절개후 증후군, 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 새-팬시어 폐(bird-fancier's lung), 알레르기성 육아성 혈관염, 양성 림프구성 혈관염, 알포트 증후군(Alport's syndrome), 치조골막염, 예컨대 알레르기성 치조골막염

및 섬유성 골막염, 간질성 폐질환, 수혈반응, 나병(leprosy), 말라리아, 기생충 질환, 예컨대 리슈만편모충증(leishmaniasis), 키파노소미아시스(kypanosomiasis), 주혈흡충증(schistosomiasis), 회충증(ascariasis), 아스퍼길루스증, 삼터 증후군(Sampter's syndrome), 카플란 증후군(Caplan's syndrome), 탕기, 심내막염, 심내막 심근섬유증, 미만성 간질성 폐섬유증, 간질성 폐섬유증, 폐섬유증, 특발성 폐섬유증, 낭성 섬유증, 내안구염, 장기 용기성 홍반(erythema elevatum et diutinum), 태아 적아구증(erythroblastosis fetalis), 호산구증가 태아증(eosinophilic facitis), 술만 증후군(Shulman's syndrome), 펠티 증후군(Felty's syndrome), 사상충증(flariasis), 섬모체염, 예컨대 만성 섬모체염, 이중만성적 섬모체염, 홍채섬모체염(iridocyclitis) (급성 또는 만성), 또는 푸치 섬모체염(Fuch's cyclitis), 헤노흐-셴라인 자반증(Henoch-Schonlein purpura), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, SCID, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 에코바이러스 감염, 패혈증, 내독소혈증, 체장염, 갑상선중독증, 파보바이러스 감염(parvovirus infection), 루벨라 바이러스 감염(rubella virus infection), 백신후 증후군(post-vaccination syndromes), 선천적 루볼라 감염, 엡스타인-바 바이러스 감염(Epstein-Barr virus infection), 이하선염(mumps), 이반 증후군(Evan's syndrome), 자가면역 성선부전증(autoimmune gonadal failure), 시든햄 무도증(Sydenham's chorea), 연쇄상구균감염후 신염(post-streptococcal nephritis), 폐색성 혈전혈관염(thromboangitis obliterans), 갑상선중독증(thyrotoxicosis), 척수매독(tabs dorsalis), 맥락막염(chorioiditis), 거대세포 다발근육통(giant cell polymyalgia), 만성 과민성 폐렴(chronic hypersensitivity pneumonitis), 건성각결막염(keratoconjunctivitis sicca), 유행성 각결막염, 특발성 신염 증후군(idiopathic nephritic syndrome), 최소 변화 신장병증(minimal change nephropathy), 양성 가족성 및 허혈성 재관류 손상, 이식 기관 재관류, 레티날 자가면역(retinal autoimmunity), 관절 염증(joint inflammation), 기관지염, 만성 폐쇄성 기도/폐 질환, 규폐증(silicosis), 아프타(aphthae), 아프타성 궤양(aphthous stomatitis), 동맥경화 질환(arteriosclerotic disorders), 아스페니오게니스(asperniogenese), 자가면역 용혈증(autoimmune hemolysis), 보에크 질환(Boeck's disease), 저온글로불린혈증, 듀푸트렌 구축(Dupuytren's contracture), 수정체과민성 안외염(endophthalmia phacoanaphylactica), 알레르기성 소장염(enteritis allergica), 나병 결절 홍반, 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 류마티스 열(febris rheumatic), 함만-리치병(Hamman-Rich's disease), 감각신경 난청, 발작성 혈색소뇨증(haemoglobinuria paroxysmatica), 생식샘 기능저하증, 국한 회장염(ileitis regionalis), 백혈구감소증, 전염 단핵구증(mononucleosis infectiosa), 횡단성 척수염(traverse myelitis), 원발 특발성 점액부종(primary idiopathic myxedema), 신장증, 교감눈염증(ophthalmia sympathica), 육아종성 고환염(orchitis granulomatosa), 체장염, 급성 다발신경근염(polyradiculitis acuta), 괴저화농 피부증, 드퀘르뱅 갑상선염(Quervain's thyroiditis), 후천성 비장 위축증(acquired splenic atrophy), 양성 흉선종, 백반증, 독소충격 증후군, 식중독, T 세포의 침윤을 포함하는 상태, 백혈구부착 결핍, 사이토카인과 T-림프구에 의해 매개되는 급성 또는 지연 과민과 연관된 면역 반응, 백혈구 누출을 포함하는 질환, 다수 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체 매개 질환들, 항사구체 기저막 질환, 알레르기성 신경염, 자가면역 다발성 내분비 장애, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역 위축성 위염, 교감 안염증, 류마티스 질환, 혼합 연결조직 질환, 롱팔 증후군, 체도염, 다내분비선 부전, I형 자가면역 다발생식선 증후군, 성년 발병 특발성 부갑상선기능저하증(AOIH), 심근병증, 예컨대 확장 심근병증, 후천성 표피 수포증(EBA), 혈색소증, 심근염, 롱팔 증후군, 원발 경화성 담관염, 화농성 또는 비화농성 동염, 급성 또는 만성 동염, 벌집뼈, 전두, 상악, 또는 접형골 동염, 호산구 관련 이상, 예컨대 호산구증가증, 호산구증가성 폐침윤, 호산구증가-근육통 증후군, 괴플러 증후군(Löffler's syndrome), 만성 호산구증가 폐렴, 열대성 폐호산구증가증, 기관지폐렴성 아스퍼길루스증, 아스퍼길루스증, 또는 호산구를 포함하는 육아종, 과민증, 혈청음성 척추관절염, 다내분비선 자가면역 질환, 경화 담관염, 공막, 상공막, 만성 점막피부 캔디다증, 브루톤 증후군(Bruton's syndrome), 영아 일과성 감마글로불린저혈증, 비스코트-알드리치 증후군(Wiskott-Aldrich syndrome), 모세혈관확장성 운동실조 증후군, 혈관확장증(angiectasis), 콜라겐증과 연관된 자가면역 이상, 류마티즘, 신경학적 질환, 림프절염, 혈압반응 감소, 혈관 기능장애, 조직 손상, 심장혈관 허혈, 통각과민증, 신허혈, 대뇌 허혈, 맥관신생을 수반하는 질환, 알레르기성 민감증, 사구체 신염(glomerulonephritides), 재관류 손상, 허혈 재관류 이상, 심장근육 또는 다른 조직의 재관류 손상, 림프종성 기관지기관지염(lymphomatous tracheobronchitis), 염증성 피부병(inflammatory dermatoses), 급성 염증 요인에 의한 피부병, 다수 기관 부전, 수포성 질환(bullous diseases), 신장피질 괴사, 급성 화농성 수막염 또는 다른 중추신경계 염증성 이상, 안구와 안와 염증성 이상, 과립구 수혈관련 증후군(granulocyte transfusion-associated syndromes), 사이토카인-유도 독성(cytokine-induced toxicity), 기면증, 급성 중증 염증(acute serious inflammation), 만성 난치성 염증, 신우염, 동맥말단 과형성(endarterial hyperplasia), 소화성 궤양, 관막염, 이식편대 숙주 질환, 접촉 과민증, 천식 기도 과반응증, 및 자궁내막증을 포함하지만, 이들에만 한정되지 않는다.

- [0158] **V. 약제학적 조성물**
- [0159] 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 조절하기 위한 방법을 포함한다. 본 발명은 면역 반응을 유도하거나 조절하는 데 사용될 수 있는 약제학적 조성물의 형태일 수 있는 세포를 포함한다.
- [0160] 본 발명에 따른 조성물의 투여는 통상적으로 임의의 통상적인 경로를 통해 이루어질 것이다. 여기에는 비경구, 정위, 피내, 피하, 근육내, 복강내, 비강내 또는 정맥내 주사가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.
- [0161] 통상적으로, 본 발명의 조성물은 투여량 제제와 양립 가능한 방식으로, 치료적으로 유효하고 면역 조절성인 양으로, 투여된다. 투여할 양은 치료될 대상체에 따라 달라진다. 투여하는 데 요구되는 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 따라 달라진다.
- [0162] 적용 방식은 매우 다양할 수 있다. 세포 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 투여를 위한 임의의 종래의 방법이 적용 가능하다. 약제학적 조성물의 투여량은 투여 경로에 따라 달라지며 대상체의 크기와 건강에 따라 달라질 것이다.
- [0163] 많은 경우에, 최대한 약 또는 최소한 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 다중 투여를 갖는 것이 바람직할 것이다. 투여는 2일에서 12주 간격, 보다 일반적으로는 1주에서 2주 간격으로 다양할 수 있다. 투여 코스에는 동종이식(alloreactive) 면역 반응 및 T 세포 활성화에 대한 검사가 뒤따를 수 있다.
- [0164] "약제학적으로 허용가능한" 또는 "약리학적으로 허용가능한"이라는 문구는 동물 또는 인간에게 투여될 때 부정적 작용, 알레르기성 작용, 또는 다른 부작용을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 본원에 사용된, "약제학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장액 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 그러한 매질 및 제제의 사용은 당 기술분야에 주지되어 있다. 임의의 종래의 매질 또는 제제가 활성 성분과 양립불가능한 경우를 제외하면, 면역원성 및 치료 조성물에서의 그 용도가 고려된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 조성물이다.
- [0165] 본 발명의 조성물은 비경구 투여를 위해 제형화, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피하 또는 심지어 복강내 경로를 통한 주사를 위해 제형화될 수 있다. 통상적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서의, 주사용 제제; 주사 전에 액체의 첨가 시 용액 또는 현탁액을 제조하는 데 사용하기에 적합한 고체 형태 또한 제조될 수 있으며; 그리고, 제제는 유효될 수도 있다.
- [0166] 주사용 용도에 적합한 약제학적 형태는 멸균 수용액 또는 분산액; 참기름, 땅콩유 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제형을 포함한다. 또한 제조 및 저장 조건 하에서 안정적이어야 하며 세균 및 진균 같은, 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다.
- [0167] 멸균 주사용 용액은 요구되는 양의 활성 성분 (즉, 본 발명의 세포)을, 필요에 따라, 상기 열거한 다양한 다른 성분으로 적절한 용매에 혼입시킨 후, 여과 멸균함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성 성분을, 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들 중에서 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입시킴으로써 제조된다.
- [0168] 조성물의 유효량은 의도된 목표에 따라 결정된다. "단위 용량" 또는 "투여량"이란 용어는 대상체에서 사용하기에 적합한 물리적으로 별개의 단위를 의미하며, 각각의 단위는 투여와 관련하여 본원에서 논의된 바람직한 반응, 즉 적절한 경로 및 요법을 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 조성물을 함유한다. 치료 횟수 및 단위 투여량 모두에 따라, 투여될 양은 원하는 결과 및/또는 보호에 따라 달라진다. 정확한 양의 조성물은 또한 의사의 판단에 따라 달라지며 각각의 개체마다 다르다. 용량에 영향을 미치는 요인에는 대상체의 물리적 및 임상적 상태, 투여 경로, 의도된 치료 목적 (증상 대 치료의 완화), 및 특정 조성물의 효능, 안정성 및 독성이 포함된다. 제형화 시, 용액은 투여량 제제와 양립 가능한 방식으로, 그리고 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 양으로 투여될 것이다. 제형은 상기 설명된 주사용 용액의 유형과 같은, 다양한 투여량 형태로 용이하게 투여된다.
- [0169] **VI. 서열**
- [0170] 본 발명의 항원 결합 도메인은 하기 VH (가변 중쇄) 및 VL (가변 경쇄) 영역을 포함한다:
- [0171] scFv#1 VH:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWVGVINPGSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGGF
YFDYWQGQTLVTSSASTKGPS (서열번호 1)
- [0172] scFv#1 VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYLSSDT
FGQGTKVEIKRTVA (서열번호 2)

[0173] scFv#2 VH:
QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFGKGRVTITADESTSTYMELSSLRSEDTAVYYCALPRAF
VLDAMDYWGQGTLLTVSS (서열번호 3)

[0174] scFv#2 VL:
ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYADSPITFGQG
TRLEIK (서열번호 4)

[0175] scFv#3 VH:
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEY
SGYDTPQYSWGQGTITVTVSS (서열번호 19)

[0176] scFv#3 VL:
EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGT
RLEIK (서열번호 20)

[0177] scFv #1의 VH 및 VL 영역의 상응하는 CDR은 하기 아미노산 서열이다: scFv#1 HCDR1: GYAFTNYLIE (서열번호 5);
scFv#1 HCDR2: VINPGSGGSNYNEKFKG (서열번호 6); scFv#1 HCDR3: SGGFYFDY (서열번호 7); scFv#1 LCDR1:
RASQSVLYSSNQKNYLA (서열번호 8); scFv#1 LCDR2: WASTRES (서열번호 9); scFv#1 LCDR3: HQYLSSDT (서열번호
10).

[0178] scFv #2의 VH 및 VL 영역의 상응하는 CDR은 하기 아미노산 서열이다: scFv#2 HCDR1: SNVIS (서열번호 11);
scFv#2 HCDR2: GVIPIVDIANYAQRFGK (서열번호 12); scFv#2 HCDR3: PRAFVLDAMDY (서열번호 13); scFv#2 LCDR1:
RASQSLGSSYLA (서열번호 14); scFv#2 LCDR2: GASSRAP (서열번호 15); 및 scFv#2 LCDR3: QQYADSPIT (서열번호
16)

[0179] scFv #3의 VH 및 VL 영역의 상응하는 CDR은 하기 아미노산 서열이다: scFv#3 HCDR1: SYGMH (서열번호 21);
scFv#3 HCDR2: VISYDGSIKYYADSVKG (서열번호 22); scFv#3 HCDR3: TGEYSGYDTPQYS (서열번호 23); scFv#3
LCDR1: RSSQIGDDL (서열번호 24); scFv#3 LCDR2: GTSTLQS (서열번호 25); 및 scFv#3 LCDR3: LQDSNYPLT (서열
번호 26).

[0180] 본 발명의 검출 펩타이드는 하기를 포함할 수 있다, 예를 들어, HA: YPYDVPDYA (서열번호 94); FLAG: DYKDDDDK
(서열번호 17); 및 c-myc: EQKLISEEDL; 서열번호 95).

[0181] 예시적인 신호 펩타이드는 하기를 포함한다: METDTLLLWVLLWVPGSTG (서열번호 18). 다른 예시적인 신호 펩타이
드는 하기를 포함한다: MLLVTSLLLCELPHPAFLIPDT (서열번호 94) 또는 MGTSLLCWMALCLLGADHADG (서열번호 95).

[0182] 예시적인 펩타이드 스페이서 힌지 영역은 하기를 포함한다: DKHTH (서열번호 27), CPPC (서열번호 28),
CPEPKSCDTPPPCP (서열번호 29), ELKTPLGDTHTH (서열번호 30), KSCDKHTTCP (서열번호 31), KCCVDCP (서열번호
32), KYGPPCP (서열번호 33), EPKSCDKHTCPCP (서열번호 34; 인간 IgG1 힌지), ERKCCVECP (서열번호 35;
인간 IgG2 힌지), ELKTPLGDTHTCPCP (서열번호 36; 인간 IgG3 힌지), SPNMVPHAHHAQ (서열번호 37);
ESKYGPPCPCP (서열번호 98), ESKYGPPCPCP (서열번호 99) (인간 IgG4 힌지-기반), EPKSCDKTYTCPCP (서열번호
38), 및 TTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열번호 39)

[0183] 예시적인 펩타이드 링커는 하기를 포함한다, 예를 들어, (GSGGS)_n (서열번호 40); (GGGS)_n (서열번호 41); GSGS
(서열번호 42); GSGSG (서열번호 43); GSGSG (서열번호 44); GSGGG (서열번호 45); GGGSG (서열번호 46); 및
GSSSG (서열번호 47).

[0184] 예시적인 막관통 도메인은 하기를 포함한다, IYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYC (서열번호 48), CD8 베타 유래:
LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (서열번호 49), CD4 유래: ALIVLGGVAGLLFLIGLIGFCVRC (서열번호 50), CD3 제타
유래: LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (서열번호 51), CD28 유래: WVLVVVGVVLACYSLLVTAFIIFWV (서열번호 52), CD134
(OX40) 유래: VAAAILGLVLGLLPLAILLALYLL (서열번호 53), 및 CD7 유래: ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (서열번호
54).

[0185] 예시적인 보조-자극 영역은 하기를 포함한다: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열번호 55),

FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열번호 56), TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (서열번호 57), RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (서열번호 58), CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSGVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (서열번호 59), HQRKYSRNSKGESPEVAEPCRYSCPREEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (서열번호 60), RRACRKRIRQKLHLCPYVQTSQPKLELVDSRPRSSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLPLQDASPAGGSPSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK (서열번호 61), HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLVV (서열번호 62), 및 CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTVAVEETIPSTGRSPNH (서열번호 63).

[0186] 예시적인 엔도도메인은 ITAM 모티프를 포함한다. ITAM 모티프는 $YX_1X_2(L/I)$ 이고, 이때 X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산 (서열번호 64)이다. 일부 경우에, ITAM 모티프는 엔도도메인에서 두 번 반복되며, 이때 ITAM 모티프의 첫 번째와 두 번째 인스턴스는 6 내지 8개 아미노산, 예를 들어, $(YX_1X_2(L/I))(X_3)_nYX_1X_2(L/I)$ 에 의해서 분리되어 있으며, 이때 n 은 6 내지 8의 정수이고, 상기 6-8 X_3 각각은 임의의 아미노산 (서열번호 65)일 수 있다.

[0187] 예시적인 엔도도메인은 하기로부터의 폴리펩타이드를 포함한다:
 MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 66),
 MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 67);
 MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 68);
 MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 69); ESPYOELGORSVDVYSDLNTQ (서열번호 70);
 MIPAVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIIVTLTYCRKLIQVRKAAITSYEKSDGVYTGSTRNQETETLKHEKPPQ (서열번호 71);
 DGVYTGSTRNQETETLKHE (서열번호 72);
 MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTGTLLSDITRLDLGKRILDPGRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPA TVAGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTOALLRNDVOYOPLRDRDDAOYSHLGGNWAR NK (서열번호 73);
 MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTGTLLSDITRLDLGKRILDPGRGIYRCNGTDIYKDKESTVOVHYRTADTOALLRND VOYOPLRDRDDAOYSHLGGNWAR NK (서열번호 74); DOYOPLRDRDDAOYSHLGGN (서열번호 75);
 MQSGTHWRVLGCLLSVGWVGQDGNEMGGITQTPYKVISGTTVILTCQPYPGSEILWQHNDKNIGGEDDKNIGSDEHLSLKEFSELEQSGYVVCYPRG SKPEDANFYLYLRARVCENMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPVPNPDIYEP IRKGQRDLYSGLNQ RRI (서열번호 76); NPDIYEP IRKGQRDLYSGLNQ (서열번호 77);
 MEQKGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMI GFLTEDKKKWNLSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYR MCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGODGVROSASDKOTLLPNDOYOPDKREDDDQYSHLQGNQLRRN (서열번호 78);
 DOYOPDKREDDDQYSHLQGN (서열번호 79);
 MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGLFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGKPRR KNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 80);
 MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGLFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGKPRR RKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 81);
 RVKFSRSADAPAYQQGONOLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGSTATKDTYD ALHMQALPPR (서열번호 82); NOLYNELNLGRREEYDVLDKR (서열번호 83); EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK (서열번호 84);
 DGLYOGSTATKDTYDALHMO (서열번호 85);
 MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWVRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNTGLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQSCGYTLRVQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFKRKWONEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISR GLOGTYQDVGSLNIGDVQLEKP (서열번호 86);
 MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWVRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGT KNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFKRKWONEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYE DISRGLQGYQDVGSLNIGDVQLEKP (서열번호 87);
 ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG (서열번호 88); RPRRSPAQDGKVIYNMPGRG (서열번호 89); RPRRSPAQDGKVIYNMPGRG (서열번호 90);
 FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFI FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열번호 91);
 FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFI FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열번호 92); 및

MPDPAHLPPFFYGSIS

RAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDFVRFHHPFIERQLNGTYAIAAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSPGLEPQPGVFDCL
RDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTALSLIYGKTVYHYLISQDKAGK
YCIPEGTKFDLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAPTLPAHPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPSYDP
EELKDKKFLKRDNLIIADIELGCGNFGSVRQGVYMRKKQIDVAIKVLKQGTAKTEEMREAIIMHQLDNPIVRLIGVCQAEALMLMEMAGGGLPHK
FLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTARSAGKWPLKWAYPECINFRKFSSRSVWSYSG
VTMWEALSYGQKPYKKMGPEVMAFIEQGRMECPPECPPELYALMSDCWIYKWEDRPDFTLVEQRMACYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA (서열번
호 93) 또는 그의 부분들.

VII. 예

하기 예들은 본 발명의 실시예들을 설명하기 위해 포함된다. 이어지는 예들에 개시된 기술은 본 발명의 실시예
서 잘 기능하기 위해 본 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내며, 이에 따라 그 실시를 위해 바람직한 모드를 구
성하는 것으로 간주될 수 있다는 것이 당 기술분야의 숙련자들에게 이해되어야 한다. 그러나, 당 기술분야의 숙
련자들은, 본 발명에 비추어, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 개시된 특정 실시예들에서 많은 변화가
이루어질 수 있고 여전히 유사하거나 비슷한 결과를 얻을 수 있음을 이해해야 한다.

예 1

본 발명은 인간 및 마우스 TGF- β 를 중화시키는 단일 사슬 가변 단편 (scFvs) 뿐만 아니라, 인간 및 마우스
TGF- β 에 반응성이 있는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 설명한다. 포유류에 걸친 TGF- β 보존 수준은 설명된 scFv
및 CAR이 대부분의 포유류 TGF- β 에 결합하는 데 사용될 수 있음을 시사한다. 최종 배향이 N-말단 -VH-(G₄S)₃-
VL-C-말단이 되도록 (G₄S)₃ 링커로 중쇄 가변 도메인 (VH)을 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결시켜서 항-TGF- β
항체로부터 2 가지 scFv를 구축한다. 이들 scFv는 하기 표에 나타낸 scFv 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열
로 진핵 세포를 형질감염시켜서 제조될 수 있다:

표 1

단일 사슬 가변 단편	아미노산 서열 (단일 문자 약어)
scFv #1	METDTLLLVWLLWVPGSTGAGGSDYKDDDDKGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLWVGV INPGSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGGFYFDYWGQGTLLTVSSASTKPGSGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKGAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT SSLQPEDFATYYCHQYLSSDTFGQGTKVEIKRTVA (서열번호 96)
scFv #2	METDTLLLVWLLWVPGSTGAGGSDYKDDDDKGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVIISWVRQAPGQGLEWMGG VIPVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTYMESSLRSEDYAVYYCALPRAFLDAMDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQYADSPITFGQGTREIK (서열번호 97)

scFv가 분비되도록 쥐 카파 경쇄의 리더 (즉, 신호) 펩타이드로 각 scFv를 태그할 수 있고 생산자 세포가 배양
되는 배지로부터 직접 수집할 수 있다. scFvs는 또한 DYKDDDDK (서열 번호 17) 에피토프, HA 태그, 또는 GGS 링
커가 측면에 있는 cMyc 태그와 같은 마커로 (리더 펩타이드 뒤이지만 VH 서열 앞에) N-말단에서 태그할 수
있다. 각각의 scFv는 인간 또는 마우스 TGF- β 를 중화시키기 위해 직접 투여할 수 있다. scFv #1 및 #2가 scFv
#3보다 우수하다 (도 1 및 도 7). 또한, 각각의 scFv를 TGF- β 에 반응성이 있는 CAR을 구축하는 데 사용할 수
있다. CAR은 세포의 항원 결합 도메인, 세포의 스페이서, 막관통 도메인, 보조 자극 신호전달 영역 (특이적 CAR
디자인에 따라 가변하는 번호), 및 CD3-제타 신호전달 도메인/엔도도메인으로 구성된 융합 단백질이다. TGF- β
CAR는 세포의 항원 결합 도메인으로서 상술한 scFv를 사용하여 구축할 수 있다. T 세포 및 자연 살해 (NK) 세포
를 포함한, 면역 세포는 바이러스 형질도입, DNA nucleofection 및 RNA nucleofection을 포함한, 다양한 방법
으로 TGF- β CAR를 발현하도록 조작할 수 있다. TGF- β CAR에 대한 TGF- β 결합은 인간 T 세포를 활성화시켜서,
TGF- β 신호전달을 면역억제성 반응에서 면역자극성 반응으로 전용시킬 수 있다. 또한 TGF- β CAR은 종양 침윤
림프구, T-세포 수용체 조작, 또는 다른 CAR에 기초하든지 간에, 모든 입양 T-세포 요법에서 면역억제에 대응하
고 T-세포-매개 반응을 증대시키는 부속 수용체로서 사용될 수 있다.

도 2에 도시된 바와 같이, TGF- β CAR는 일차 인간 T 세포의 표면에서 효율적으로 발현된다. TGF- β CAR은 scFv
#2를 사용하여 만들었다. 표면 염색 및 유세포 측정법에 의하면 TGF- β CAR가 일차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포의
표면에 출현됨을 보여준다. 수용체의 세포의 도메인은 N-말단 FLAG 에피토프를 함유하고 있다. EGFRt는 세포 형

질도입의 표시자인 절단된(truncated) 표피 성장 인자 수용체이다. 또한 TGF- β CAR이 음성-음성 TGF- β 수용체보다 더 효율적으로 세포 표면에 출현하는 것으로 발견되었다(도 9). 세포내 신호전달 도메인이 빠진 절단된 TGF- β 수용체 사슬 II를 포함하는 음성-음성 TGF- β 수용체(DNR)가 TGF- β 신호전달을 억제하고 T-세포 효과기 기능을 향상시키는 것으로 보고되었다. 그러나, DNR은 세포 표면에 효율적으로 발현되지 않지만 TGF- β CAR은 효율적으로 발현된다. 도 9에 도시된 데이터는, FLAG-태그된 TGF- β CAR 또는 FLAG-태그된 DNR을 암호화하는 렌티바이러스로 일차 인간 CD4⁺ T 세포를 형질도입한 것이다. 각각의 수용체는 절단된 표피 성장 인자 수용체(EGFRt)에 T2A 절단 펩타이드를 통해 태그되어서, 형질도입된 세포가 EGFRt 염색에 의해 확인될 수 있는 반면, 수용체 표면 발현은 FLAG 염색에 의해 확인될 수 있다. 도 9의 결과는, TGF- β CAR이 DNR보다 T 세포 표면에서 훨씬 더 효율적으로 발현된다는 것을 나타낸다.

[0195] 도 3은 TGF- β CAR이 내인성 TGF- β 신호전달을 차단한다는 것을 보여준다. 일차 인간 T 세포에서의 TGF- β CAR 발현은 SMAD 경로를 통한 TGF- β 신호전달을 차단한다. 표시된 수용체를 발현하는 T 세포를 표시된 농도에서 TGF- β 와 함께 30분 동안 인큐베이팅하고, 웨스턴 블롯을 통해 포스포-SMAD2를 위한 프로브로 사용하였다. EGFRt는 절단된 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 T 세포를 지칭하며 "CAR이 없는" 대조군으로서 기능한다; scFv-less는 임의의 리간드-결합 scFv 도메인이 부족하지만 이와 달리 TGF- β CAR long과 일치하는 CAR을 발현하는 T 세포를 지칭한다. TGF- β CAR의 뒤쪽에 있는 "long" 및 "short" 라벨은 세포의 펩타이드 스페이스의 길이를 지칭한다. 도 6에 도시된 바와 같이, TGF- β CAR-T 세포는 TGF- β 에 반응하여 증식한다. TGF- β CAR을 발현하는 T 세포는 TGF- β 를 성장-억제성 사이토카인에서 성장-촉진 사이토카인으로 전환시킨다.

[0196] 또한 TGF- β CAR가 T 세포를 활성화시키고 사이토카인 생산을 유발하는 것으로 밝혀졌다(도 4). 도 4에 도시된 바와 같이, TGF- β CAR-T 세포는 CD69 활성화 마커의 발현을 상향조절하고 TGF- β 노출에 반응하여 면역자극성 사이토카인 IFN- γ 및 TNF- α 를 생산한다. CD69 상향조절은 TGF- β 유무에 따라 24시간 인큐베이팅한 후 표면 염색으로 모니터링하였다. 사이토카인 생산은 TGF- β 유무에 따라 24시간 인큐베이팅한 후 단백질 수송 억제자 Brefeldin A를 적용하고 세포내 염색을 수행함으로써 검출되었다. "scFv-less"는 임의의 리간드-결합 scFv 도메인이 부족한 CAR을 지칭한다.

[0197] TGF- β CAR와 달리, 음성-음성 TGF- β 수용체는 사이토카인 생산을 유발할 수 없다. 음성-음성 TGF- β 수용체는 TGF- β 신호전달을 억제하는 것으로도 보고되었지만, TNF- α 생산과 같은 면역자극적 작용을 유발하지는 않는다(도 5). "T β short"와 "T β long"은 두 가지의 서로 다른 TGF- β CAR이고, "Dom-Neg"는 음성-음성 TGF- β 수용체를 지칭하며, "scFv-less"는 임의의 리간드-결합 scFv 도메인이 부족한 CAR을 지칭한다.

[0198] 또한 TGF- β CAR 기능은 보조-자극 도메인 선택에 의해 조정될 수 있음이 밝혀졌다. 도 10에 도시된 바와 같이, CD28과 4-1BB 보조-자극 도메인 사이를 바꾸면 TGF- β 에 반응하여 사이토카인 생산 수준이 변경된다. 또한, TGF- β 는 다른 공여자로부터의 TGF- β CAR을 갖는 세포에서 용량-의존 방식으로 TNF- α 생산을 일관되게 유발하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 CAR의 성능이 임상 용도를 위해 의존되기에 충분히 강건함을 시사한다(도 11).

[0199] 또한 TGF- β CAR 스페이스 길이가 유발 역치를 조절한다는 것을 발견했다. 세포의 스페이스 길이를 증가시키면 CAR 유발의 TGF- β 역치가 증가한다(도 12). 이는 리간드 결합 도메인과 세포내 신호전달 도메인 사이의 결합을 변경시킴으로써 응용의 필요성에 대한 CAR 반응성을 맞춤화할 수 있음을 시사한다. "짧은 스페이스"는 인간 IgG4의 힌지 부분을 포함하고; "긴 스페이스"는 IgG4 힌지-CH2-CH3를 포함한다.

[0200] 다음으로, 가용성 리간드-매개 CAR 이량체화가 CAR 신호전달을 유발한다는 것이 발견되었다. 도 13에 도시된 것은 표시된 CAR(들)을 가지고 있는 Jurkat 세포주이다. GFP CAR #1과 GFP CAR #3은 모두 주로 동종이량체 형태로 존재하며, 두 CAR은 EGFP 상의 다른 에피토프에 결합하며, 동시에 개별 EGFP 분자에 결합할 수 있다. GFP CAR #1과 GFP CAR #2는 EGFP 상의 동일한 에피토프에 결합하지만, CAR #2는 동종이량체가 아닌 단량체로 존재한다. 결과는 CAR 신호전달이 리간드-매개 CAR 이량체화에 의해 촉진될 수 있음을 나타내지만, 리간드 또는 CAR 자체가 이량체로 미리 존재할 필요는 없다(도 13). 수용성 리간드가 CAR 신호전달을 유발할 수 있는 한 가지 가능한 기작은 두 개의 상이한 세포에서 수용체를 연결함으로써(ligating), 면역학적 시냅스를 형성하는 것이다. 이 기작은 단일 유형의 GFP CAR을 발현하는 Jurkat 세포가 이량체이지만 단량체가 아닌 EGFP로 활성화될 수 있다는 관찰과 일치한다. 이는 또한 각각 다른 GFP CAR을 발현하는 2개의 Jurkat 세포주의 혼합물이 이량체 및 단량체 EGFP 모두에 의해 활성화될 수 있다는 관찰과 일치한다. 이 경우, 단량체 EGFP는 또한 2개의 Jurkat 세포주 상의 CAR이 동일한 EGFP 분자 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합하기 때문에 세포-세포 연결을 유발할 수 있다(도 14).

[0201] TGF- β CAR은 세포-세포 접촉-의존적 및 -비의존적 방식 모두로 유발될 수 있음이 밝혀졌다. 세포-세포 접촉은

EGFP 및 TGF- β 와 같은 가용성 리간드가 CAR 신호전달을 유발할 수 있는 한 가지 가능한 기작이지만, CAR-T 세포 활성화는 또한 세포-세포 접촉이 없는 경우 가용성 리간드에 의해 유발될 수 있다. 도 15에서, TGF- β CAR를 안정적으로 발현하는 Jurkat 세포 및 NFAT 프로모터로부터 발현된 EGFP 리포터를 다양한 세포 밀도로 씨딩하고 5 ng/mL TGF- β 의 존재 또는 부재 하에 인큐베이팅한다. 심지어 세포가 단일-세포 분리물로서 주로 존재하는 매우 낮은 세포 밀도에서도, TGF- β 존재 하에 분명한 EGFP 신호가 관찰된다. 또한, 세포 밀도가 10-배 범위 (500 내지 5000 세포/cm²)인 경우, 세포 밀도에 따른 EGFP 생산은 증가하지 않는다 (도 15). 이러한 결과는 가용성 TGF- β 가 세포-세포 접촉과 독립적으로 T-세포 활성화를 유발할 수 있음을 나타낸다. 그러나, EGFP 생산은 임계 세포 밀도를 훨씬 넘어서 증가하여, 더 높은 세포 밀도 수준에서 세포-세포 접촉의 기여를 확인시켜 준다. 이를 더 시험하기 위해, TGF- β CAR을 발현하는 일차 인간 CD4⁺ T 세포를 칼슘 지시약 Fluo-4-AM으로 표지하고 형광 현미경으로 영상화하였다. 세포-세포 접촉의 부재 시에 TGF- β 첨가 후 관찰된 Fluo-4-AM 신호는 TGF- β CAR-T 세포가 세포-세포 연결이 없이 가용성 리간드에 의해 활성화될 수 있음을 확인시켜 준다 (도 16).

[0202] TGF- β CAR은 종양 미세환경에서 면역억제의 유도자로서 TGF- β 의 역할에 대항하기 위해 면역 세포의 필요성을 제시한다. CAR-T-세포 요법은 B-세포 악성 종양에 대한 놀랄만한 임상 결과를 가져왔지만, 고형 종양에 대한 그 효능은 상당히 제한적이었다. 고형 종양은 TGF- β 및 다른 사이토카인의 과다생산을 통해 고도의 면역억제성 미세환경을 생성하며, 궁극적으로 T 세포의 불활성화를 초래하는 것으로 알려져 있다. TGF- β CAR은 내인성 TGF- β 경로를 통한 신호전달을 감소시킴으로써 면역억제에 대응할 뿐만 아니라 TGF- β 존재 시에 T-세포 활성화를 특이적으로 유발할 수 있는 능력을 T 세포에 부여한다. T-세포 활성화는 면역 세포를 자극하여 면역자극성 사이토카인을 생산하고 증식하여, TGF- β 를 면역억제성 신호에서 항-종양 면역 반응을 촉진시키는 활성화 자극으로 전환시킨다.

[0203] 예 2: 자가면역 질환에 대한 다-기능성 조절성 T-세포 치료 조작

[0204] 본 예시는 종양 성장 인자 베타 (TGF- β)에 의해 활성화되어서 *생체 외에서* 선택적으로 확장하고, *생체 내에서* 강력한 억제 기능을 유지하고, 그리고 항-인터루킨 6 수용체 알파(IL-6R α) 단일-사슬 가변 단편 (scFv)을 분비해서 류마티스 관절염 (RA)을 가진 마우스 모델에서 염증을 효과적으로 감소시킬 수 있는 키메라 항원 수용체 (CAR)-발현 조절성 T 세포 (Treg)를 조작하는 데 사용 가능한 방법들을 기술하고 있다. 당 기술분야에 공지되고 그리고/또는 본원에 설명된 것과 같은 다른 자가면역 질환, 또한 본 예시 및 개시에서 설명된 방법들에 의해 치료될 수 있다는 것이 고려된다.

[0205] 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 기존의 T 세포 (Tconv)를 사용하는 입양 T-세포 치료법은 난치 암, 특히 B-세포 악성종양에 대해 현저한 임상 효능을 보였다. 하지만, 자가면역 질환의 치료에 CAR-T-세포 치료법을 적용하는 것은 여전히 초기 단계에 머물러 있다.

[0206] Treg는 다수 기작을 통해 Tconv 기능을 억제하는데, 그 중 하나는 효과기 T-세포와 자연 살해 세포 기능을 모두 억제하는 강력한 면역억제성 사이토카인인, TGF- β 의 분비이다. 본 발명자들은 TGF- β 의 존재 시에 Tconv를 특이적으로 활성화시키는 TGF- β CAR을 개발하였고 (도 4), TGF- β CAR-T 세포가 가용성 및 고정화된 형태 둘 다인 TGF- β 에 반응함을 확인시켜 주었다. TGF- β 가 보통 고도의 면역억제제라는 사실에도 불구하고, TGF- β CAR을 발현하는 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ Tconv는 강력한 NFAT 신호전달을 유발하고 Th2 사이토카인을 생산한다 (도 4).

[0207] TGF- β CAR은 다음과 같은 이유로 Treg 치료에 특이하게 적합할 것으로 고려된다: 1) TGF- β 는 Treg 분화를 촉진시키며, 따라서 CAR-발현 T 세포의 TGF- β -매개 확장은 오염성 Tconv의 파생물을 방지하면서 Treg를 선별적으로 확장시키는 방법을 제시하는 것으로 알려져 있다. 우리는 단지 조사된(irradiated) 영양 세포의 존재 시에만, TGF- β 가 TGF- β CAR-발현 Tconv의 강력한 증식을 유도하는 것을 관찰하였다. 영양 세포의 부재 시에는, TGF- β CAR-Tconv의 증식은 TGF- β 의 존재에 의해 특이적으로 억제되며, 상기 억제는 비변형 Tconv 또는 비-TGF- β CAR을 발현하는 Tconv와 비교할 때 TGF- β CAR-Tconv에 대해 상당히 강하다. 본 발명자의 실험 결과는 천연 동종이량체로서 존재하는, TGF- β 가 둘 다 TGF- β CAR을 발현하는 두 가지 T 세포 사이의 접합을 일으킬 수 있음을 시사한다. 이러한 세포-세포 접합은 Tconv 사이에 동족체 독성을 초래할 수도 있다. 단지 조사된 영양 세포의 지원에 의한 경우에만, 이 독성은 CAR 신호전달로 초래되는 증식 반응에 의해 보상되는 것 이상일 수 있다. Tconv와 달리, Treg는 그랜자임(granzyme)-매개 세포독성을 나타내지 않으며 내인성 TGF- β 신호전달에 의해 저해되지 않는다. 따라서, 영양-세포 지원의 부재 시에-TGF- β CAR-발현 Treg는 TGF- β -유도된 *생체 외* 확장 프로토콜에서 오염성 Tconv에 비해 선별적으로 확장됨에 따라, 치료용 Treg의 생산에서 주요 장애물 중 하나를 해결할 수 있게 된다. 2) 활성화된 Treg는 자연적으로 TGF- β 를 생산하여, TGF- β CAR-Treg의 *시험관 내* 및 *생체 내* 활성화를 자가-지속시키는 기작을 제공하게 된다. 항원-특이적 Treg가 면역억제에 있어서 폴리클로날

Treg보다 더 효과적이라는 것이 나타났다. 반면에, 일단 활성화되면, Treg가 항원-비특이적인 방식으로 억제자 기능을 발휘할 수 있는 것으로도 나타났다. 또한, 미리-활성화되면, 폴리클로날 Treg는 마우스에서 콜라겐-유도된 관절염을 억제하는 것으로 증명되었다. 종합하면, 이 결과들에 의하면 항원-특이적 Treg가 비-항원-특이적 Treg보다 활성화될 가능성이 크기 때문에 더 효과적일 수 있으며, 타겟 세포에 대한 특이성은-유익할 것 같음에도 불구하고-치료 기능에 필수적이지는 않음을 시사하고 있다. 자연 항원-특이적 Treg는 단리하기 어렵고 치료용으로 충분한 양으로 확장하기가 어렵다. 비록 트랜스제닉 T-세포 수용체 (TCR)의 도입이 매력적인 대안을 제공하지만, 각각의 질환은 그 자체에 특이적인 TCR 및 적합한 항원 타겟의 이용가능성을 필요로 하며, 이들 중 후자는 T-세포 치료제의 개발에서 주된 병목 현상으로 인식되어 왔다. TGF- β 생산은 TCR 특이성에 상관없이 Treg의 자연적인 결과이므로, TGF- β CAR은 Treg 활성화를 자가-지속시키는 것을 가능하게 하는 보편화가능한 전략을 제시하며, 이는 질환-특이적 수용체를 필요로 하지 않고 광범위한 질환 타겟에 대한 Treg-매개 억제를 지원할 수 있게 된다.

[0208] 이 예시는 초기 연구를 위한 질환 모델로서 RA를 사용하여, 자가면역 질환에 대한 세포-기반 면역 요법을 위한 새로운 방법론과 특이적인 Treg 산물을 제공한다. 전체적인 목적은 지속적인 치료 기능을 가진 치료용 Treg의 생성에 대한 보편화가능한 접근법을 확립하고 마우스에서 콜라겐-유도된 관절염 모델에서 조작된 Treg의 유용성을 입증하는 것이다.

[0209] A. 강력한 Treg 전파를 위한 TGF- β -매개된 생체 외 확장 프로토콜 개발

[0210] RosetteSep CD4+ T-Cell Enrichment Kit에 이어서 CD127- 및 CD25+ 세포의 자성 비드-기반 농축을 이용하여 긴 강한 공여자 혈액 샘플로부터 일차 인간 Treg를 단리할 수 있다. 단리된 세포는 CD3/CD28 Dynabead로 활성화시키고 렌티바이러스 형질도입 전 2일간 300 U/ml IL-2를 보충한 완전 배지 (RPMI + 10% 열-불활성화 우태 혈청)에서 배양할 수 있다. 절단된(truncated) 표피 성장 인자 수용체 (EGFRt)로 (T2A 절단 펩타이드를 통해) 태그된 TGF- β CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 이미 구축되었고 일차 인간 Tconv 내로의 형질도입에 의해 검증되었다. CAR-발현 세포는 EGFRt+ 세포에 대한 자성 비드-기반 정렬(sorting)에 의해 단리될 수 있다. 이 정렬 체계는 CAR에 대한 직접적인 항체 결합의 필요성을 피하고 비생산적인 T-세포 활성화의 가능성을 감소시킨다. 정렬된 CAR-Treg는 다음과 같은 다양한 배양 조건 하에서 96-웰 플레이트에서 확장될 수 있다: (a) 300 U/ml IL-2 단독, (b) 농도 구배(1 - 20 ng/ml)에서 TGF- β 단독, (c) IL-2 (50 - 300 U/ml) + TGF- β (1 - 20 ng/ml)의 구배, 및 (d) 1:7 T-세포:TM-LCL 비율에서 IL-2 및 TGF- β 농도의 구배 + 조사된 영양 세포 (TM-LCL). 생존 세포 수는 3-주 기간을 통해 유세포 분석법에 의해 정량화할 수 있다. 또한, Foxp3 발현 수준은 새로 단리된 CD4+/CD25+/CD127-세포에서 시작하여, 세포-제조 과정 전반에 걸쳐 세포내 염색에 의해 정량화될 수 있다. TGF- β -결합 scFv 도메인이 부족하다는 것을 제외하고는 TGF- β -CAR과 일치하는 “scFv-less” CAR이 구축되었으며 음성 대조군으로 포함시킬 수 있다.

[0211] 이 예에서 설명한 연구를 통해, 다음 중 하나를 결정할 수 있다: (1) TGF- β 첨가에 반응하여 특이적으로 증식하는 능력을 TGF- β CAR 발현이 Treg에 부여하는지 여부 및 (2) 고효율 (큰 배수-확장으로 정의됨) 및 고순도 (오염성 Tconv의 최소 존재로 정의됨)로 생체 외 Treg 확장을 위한 IL-2, TGF- β , 및/또는 영양 세포의 최적의 조합을 확인하는 것. 본 발명자들은 상이한 구조적 성질을 갖는 다수의 TGF- β CAR을 개발하였고, TGF- β 에 반응하여 이들 CAR의 별개의 신호전달 역치를 관찰하였다. 하나는 짧은 (12-아미노산) 세포외 스페이서를 가지며 다른 하나는 긴 (229-아미노산) 세포외 스페이서를 가진, 두 가지 다른 TGF- β CAR가 Treg 적용을 위한 최적의 구축을 결정하는 데 검증될 수 있다.

[0212] B. 시험관 내 및 생체 내에서 TGF- β CAR-Treg의 억제자 기능 최적화.

[0213] TGF- β CAR을 안정적으로 발현하는 Treg의 억제자 기능을 추가로 조사할 수 있다. Treg는 상술한대로 단리되고, 형질도입되고, 정렬될 것이다. 긴-스페이서와 짧은-스페이서 TGF- β CAR 모두 검증할 수 있다. 음성 대조군으로서, CD4+ T 세포의 분획 (CD127-/CD25+ 표현형에 대한 농축 전에)을 형질도입하고, 조작된 Treg에 대한 TGF- β CAR-Tconv 비교를 제공하도록 정렬할 수 있다. 두 번째 음성 대조군으로서, 상술한 scFv-less CAR로 형질도입된 Treg는 본 연구에 포함될 수 있다. 정렬된 CAR-Treg는 300 U/ml IL-2가 보충된 완전 배지에서 확장될 수 있는데, 이 IL-2 농도는 Treg 생존 및 생체 외 증식을 지지하는 것으로 보고되었으며 공개된 연구에서 보고된 것들 중 중간 농도이다. 확장 절차는 최적의 Treg 확장을 지원하도록 결정된 조건으로 업데이트될 수 있다. Tconv는 50 U/ml IL-2 및 1 ng/ml IL-15가 보충된 완전 배지에서 확장될 것이다.

[0214] TGF- β CAR-Treg의 억제자 기능은 타겟 Tconv와 공동-배양에서 검증할 수 있다. 타겟 Tconv는 CD19 CAR을 발현하기 위해 렌티바이러스로 형질도입된 CD4+ T 세포일 것이다. Treg 기능을 검사하기 위해, TGF- β CAR-Treg는

CFSE-표지된 CD19 CAR-Tconv와 CD19+ Raji 림프종 세포 모두로 가용성 TGF- β 의 존재 또는 부재 시에 공동-배양할 수 있다. CD19 CAR-Tconv의 증식은 유세포 측정법을 통한 생존 세포 계수 뿐만 아니라 CFSE 회석으로 검증할 수 있다. 이 공동-배양 세팅에서 Treg 대 Tconv 증식을 명확하게 구분하기 위해서 보다 널리 사용되는 3H-티미딘 통합 분석 대신 CFSE-기반 증식 분석을 수행할 수 있다. CFSE-표지된 세포는 초기 시간 지점들에서 출발하여 유세포 측정법에 의해 정확하게 정량화될 수 있는 반면, CFSE 회석 피크는 7-일 기간에 걸쳐 세포-분할 동역학을 밝혀낼 것이다. 음성 대조군으로서, TGF- β CAR-Tconv 또는 scFv-less CAR-Treg는 공동-배양 샘플의 TGF- β CAR-Treg를 대체할 수 있다. scFv-less CAR-Treg가 약간 억제성 기능을 나타낼 것이지만, TGF- β 생산과 이어진 TGF- β CAR를 통한 자가분비 Treg 활성화로 인해 TGF- β CAR-Treg는 향상된 억제를 나타낼 것으로 기대된다. 또한, 외인성 TGF- β 의 첨가는 TGF- β CAR-Treg의 억제자 기능을 더욱 강화시켜서, CD19+ 타겟 세포의 존재에도 불구하고 최소한의 CD19 CAR-Tconv 확장을 초래할 것으로 기대된다.

[0215] 시험관 내 TGF- β CAR-Treg의 억제자 기능의 검증 시, 조작된 Treg가 생체 내 억제자 기능을 수행할 수 있는지를 검증할 수 있다. 동물 연구를 위해, 쥐 CD4+/CD25+ Treg는 DBA/1 마우스의 림프절과 비장에서 자성 비드-기반 세포 정렬에 의해 분리될 것이다. 정렬된 세포는 쥐 CD3/CD28 Dynabead에 의해 활성화될 수 있으며 인간 Treg에 대해 이전에 설명된 바와 같이 TGF- β CAR 발현을 위해 형질도입되고, 확장되고, 정렬될 수 있다. 인간 TGF- β 를 표적으로 하는 scFv로 TGF- β CAR을 구축하지만, 발명자들은 이 수용체가 쥐 TGF- β 와 고효율로 교차-반응한다는 것을 확인하였다 (도 8). 콜라겐-유도된 관절염 (CIA)을 유발하기 위해, DBA/1 마우스는 1:1 비율로 0.1 M 아세트산을 함유한 PBS에 용해된 2 mg/ml 닭 II 형 콜라겐과 혼합된 완전한 프로인트 보강제를 함유한 100- μ l 유화액으로 꼬리의 베이스에 주사 가능하다. 질환 진행의 여러 단계에서 Treg의 성능을 검증하기 위해 CIA 면역화 하루 전 또는 CIA 면역화 2주 후에 꼬리-정맥 주사를 통해 100만 Treg를 투여할 수 있다. TGF- β CAR-Treg는 관절염을 예방하거나 완화시키는 능력에 대해 scFv-less CAR-Treg와 "무-Treg" 대조군 (즉, CIA 면역화 후 Treg 투여 없음)에 대해 비교 가능하다. Kelchtermans, H. 등 (*Arthritis Res Ther* **7**, R402-415 (2005))에 의해 이전에 설명된 바와 같이 4-점 척도에 기초하여 발에서의 임상 관절염에 대해 마우스를 평가할 수 있다. 각각의 시험 조건에 대해 10마리의 동물을 포함시킬 수 있다 (총 40 마리). $n = 10$ 의 샘플 크기는 관절염 점수화에서 1.5 표준 편차의 차이를 검출하기 위한 92%의 능력을 제공할 것이다 (2-면 t -테스트, $\alpha = 0.05$). 이용 가능한 문헌에 기초할 때, scFv-less CAR-Treg가 CIA 모델에서 관절염 증상의 눈에 띄는 억제를 달성할 것으로 예상된다. 하지만, TGF- β CAR을 첨가하면 Treg 기능이 향상될 것이며, 보다 효과적인 CIA 억제를 유도할 것으로 예상된다. 긴-스페이스 또는 짧은-스페이스 CAR이 CIA 모델에서 우수한 생체 내 기능성을 나타낼지 여부에 대한 확인이 여전히 남아 있다.

[0216] * * *

[0217] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 개시내용에 비추어 과도한 실험없이 이루어지고 구현될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 실시예들로 설명되었지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위를 벗어나지 않고 본 방법 및 단계 또는 설명된 방법의 단계의 순서에서 변형이 적용될 수 있다는 것이 당해 기술 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 동일하거나 유사한 결과가 달성되는 동안 화학적으로 및 생리학적으로 관련 있는 소정의 제제가 본원에 설명된 제제에 대해 치환될 수 있다는 것이 명백할 것이다. 당해 기술 분야의 숙련자에게 자명한 그러한 모든 유사한 치환물 및 변형은 첨부된 청구 범위에 의해 정의된 본 발명의 사상, 범위 및 개념 이내에 있는 것으로 간주된다. 모든 참고 문헌, 인용된 문헌 논문, 특허 공보 및 언급된 임의의 GenBank 수탁 번호와 관련된 서열들은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고 문헌으로 본원에 인용된다.

[0218] 참고 문헌

[0219] 다음의 참고 문헌들은, 본원에 기재된 것들에 보조적인 예시적인 절차적 또는 기타 세부사항을 제공하는 정도로, 본원에 참고로 구체적으로 인용된다.

[0220] US20110008364;

[0221] US7151169;

[0222] Yingling 등, *Nat Rev Drug Discov* 2004;

[0223] US8012482;

[0224] US20060135517;

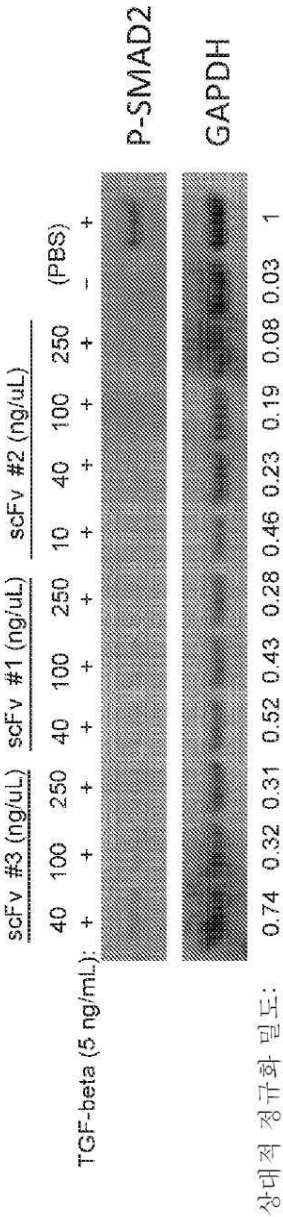
[0225] US 2004026871;

- [0226] US20070142376;
- [0227] Gorelik and Flavell, Nat Med 2001;
- [0228] Bollard 등, Blood 2002;
- [0229] Zhang 등, Cancer Res 2005;
- [0230] Foster 등, J Immunother 2008;
- [0231] Zhang 등, Gene Ther 2012;
- [0232] Quatromoni 등, J Transl Med 2012;
- [0233] Bendle 등, J Immunol 2013
- [0234] Brentjens, R.J. 등 CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* **5**, 177ra138 (2013).
- [0235] Kalos, M. 등 T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* **3**, 95ra73 (2011).
- [0236] Kochenderfer, J.N. 등 B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* **119**, 2709-2720 (2012).
- [0237] Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **365**, 725-733 (2011).
- [0238] Davila, M.L. 등 Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* **6**, 224ra225 (2014).
- [0239] Ellebrecht, C.T. 등 Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science* **353**, 179-184 (2016).
- [0240] Wright, G.P., Ehrenstein, M.R. & Stauss, H.J. Regulatory T-cell adoptive immunotherapy: potential for treatment of autoimmunity. *Expert Rev Clin Immunol* **7**, 213-225 (2011).
- [0241] Wright, G.P. 등 Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19078-19083 (2009).
- [0242] Kelchtermans, H. 등 Activated CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* **68**, 744-750 (2009).
- [0243] Morgan, M.E. 등 Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum* **52**, 2212-2221 (2005). Blat, D., Zigmund, E., Alteber, Z., Waks, T. & Eshhar, Z. Suppression of murine colitis and its associated cancer by carcinoembryonic antigen-specific regulatory T cells. *Mol Ther* **22**, 1018-1028 (2014).
- [0244] Tang, Q. & Bluestone, J.A. Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3** (2013).
- [0245] Nakamura, K. 등 TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* **172**, 834-842 (2004).
- [0246] Thornton, A.M. & Shevach, E.M. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* **164**, 183-190 (2000).
- [0247] Brusko, T.M. 등 Human antigen-specific regulatory T cells generated by T cell receptor gene transfer. *PLoS One* **5**, e11726 (2010).
- [0248] Rosenberg, S.A. Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* **21**, 45-47 (2014).

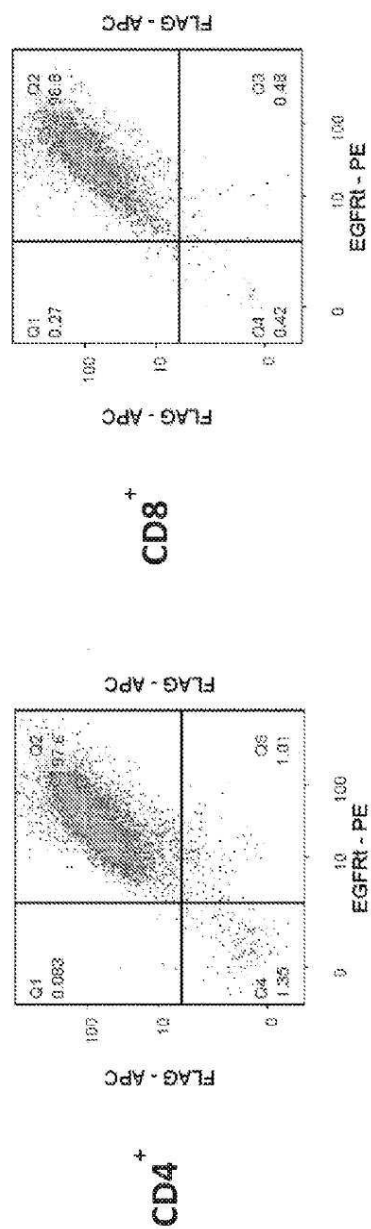
- [0249] Myasoedova, E., Crowson, C.S., Kremers, H.M., Therneau, T.M. & Gabriel, S.E. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum* **62**, 1576-1582 (2010).
- [0250] Widdifield, J. 등 The epidemiology of rheumatoid arthritis in Ontario, Canada. *Arthritis Rheumatol* **66**, 786-793 (2014).
- [0251] Lee, D.W. 등 Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* **124**, 188-195 (2014).
- [0252] Brudno, J.N. & Kochenderfer, J.N. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* **127**, 3321-3330 (2016).
- [0253] Brunstein, C.G. 등 Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* **127**, 1044-1051 (2016).
- [0254] Kelchtermans, H. 등 Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther* **7**, R402-415 (2005).
- [0255] Wu, Y. 등 FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **126**, 375-387 (2006).

도면

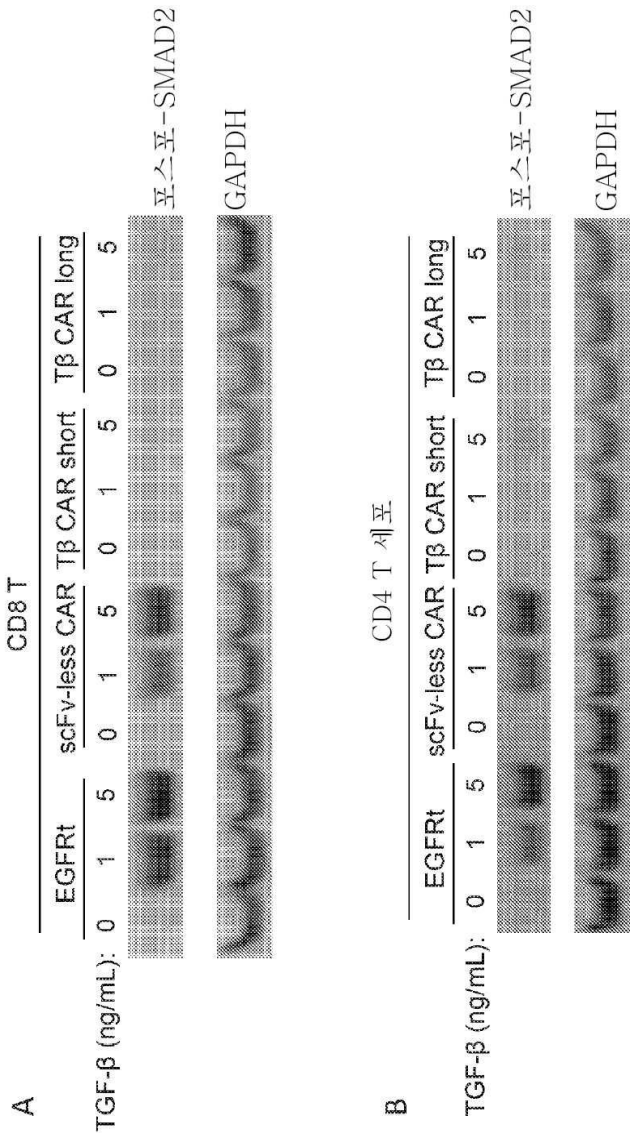
도면1



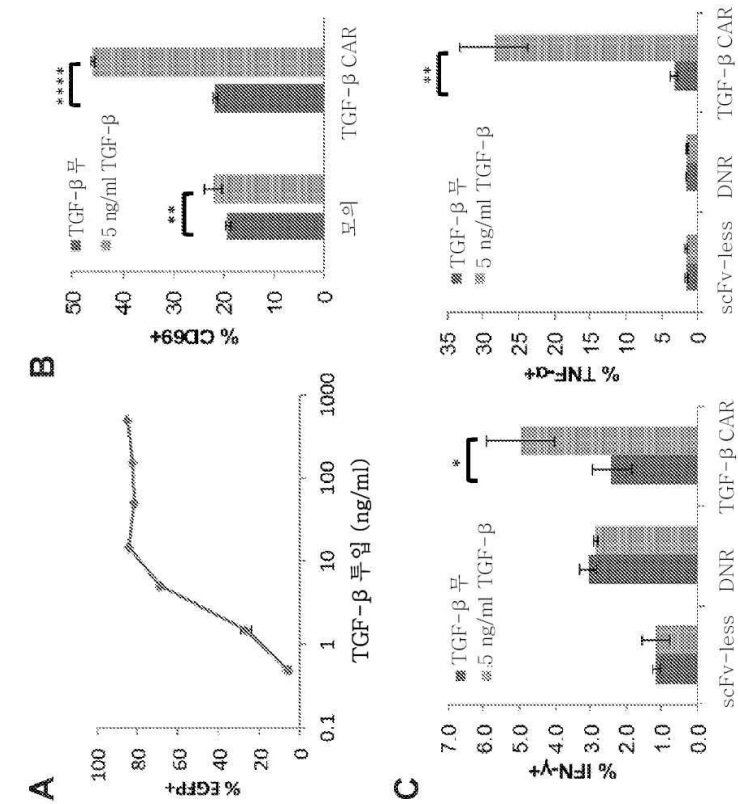
도면2



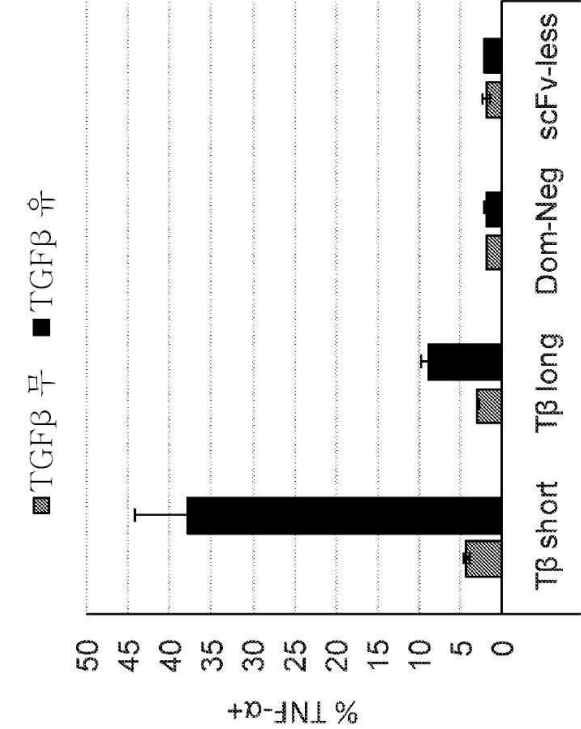
도면3



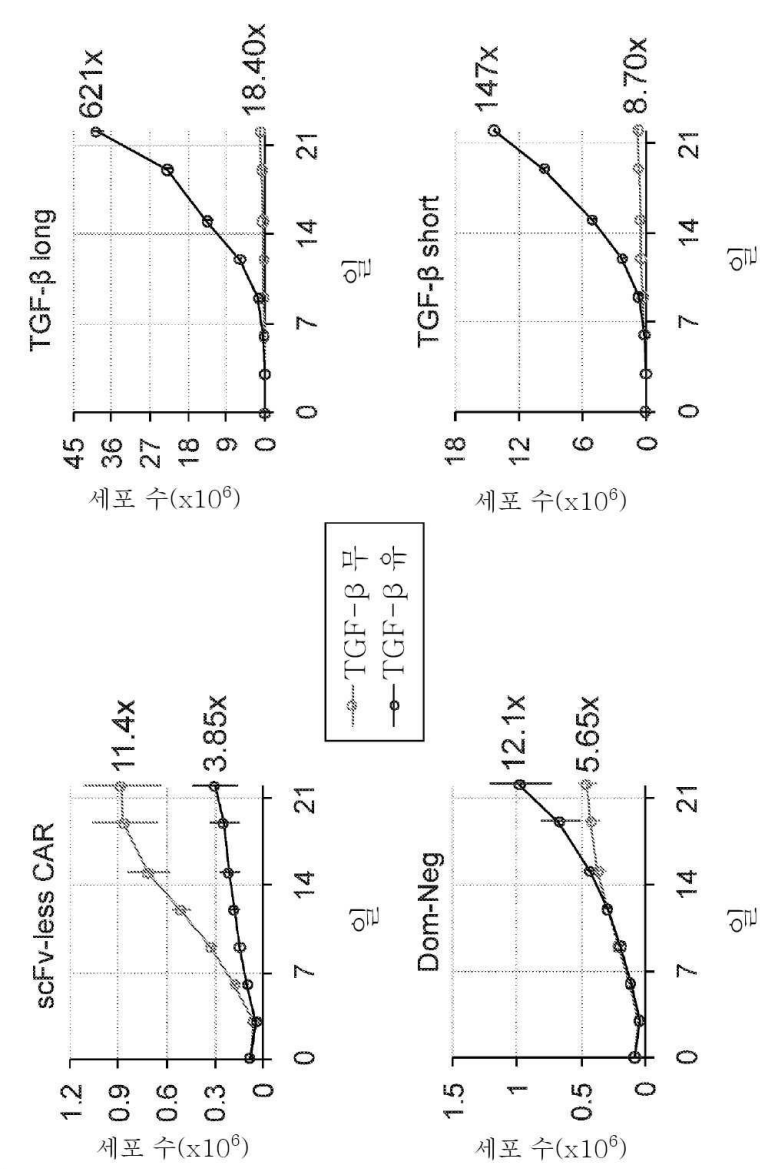
도면4



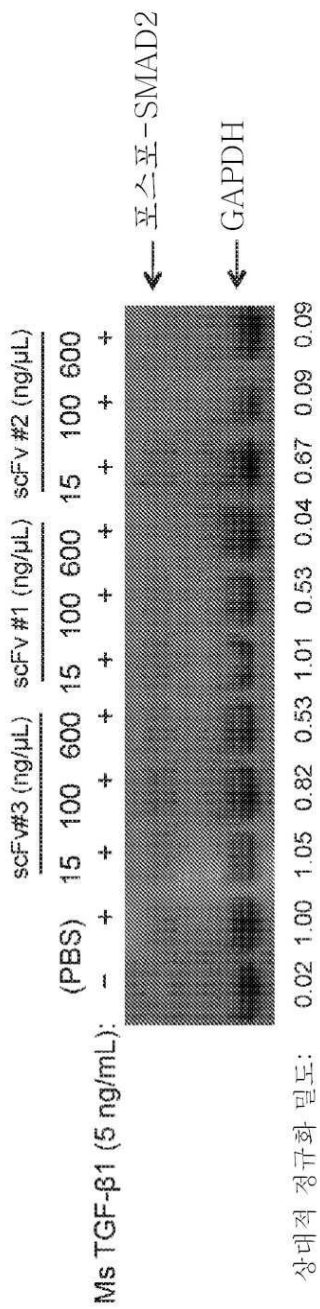
도면5



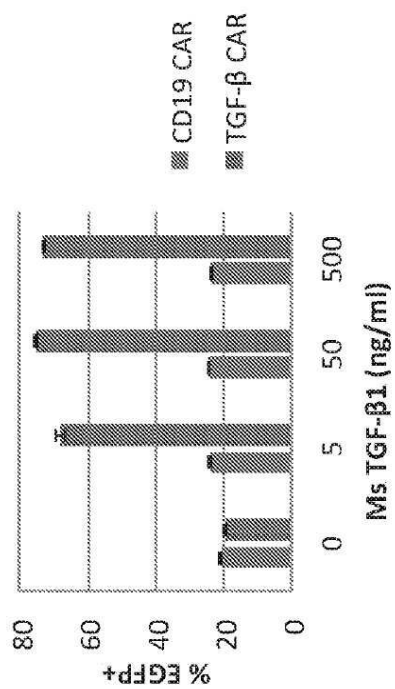
도면6



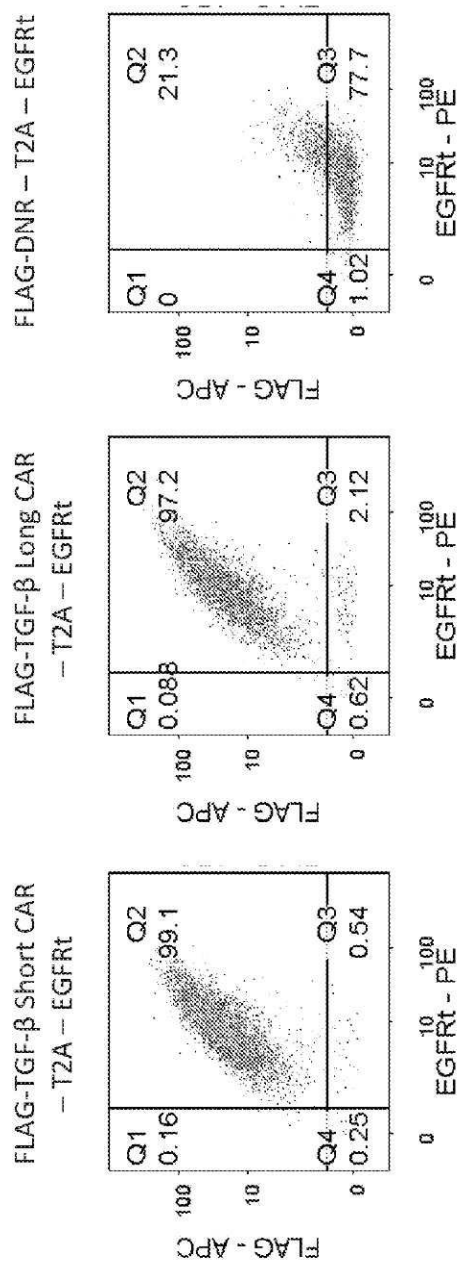
도면7



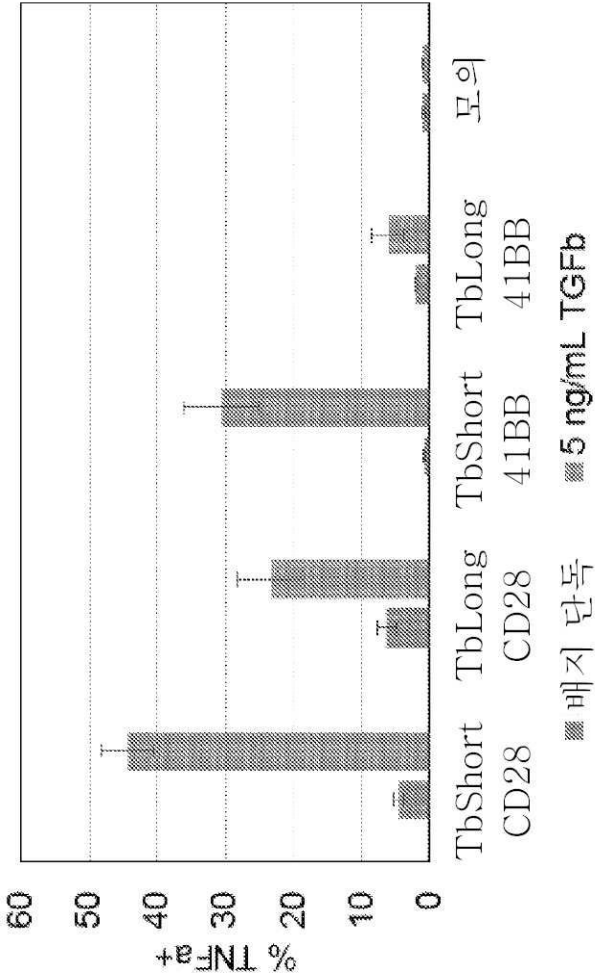
도면8



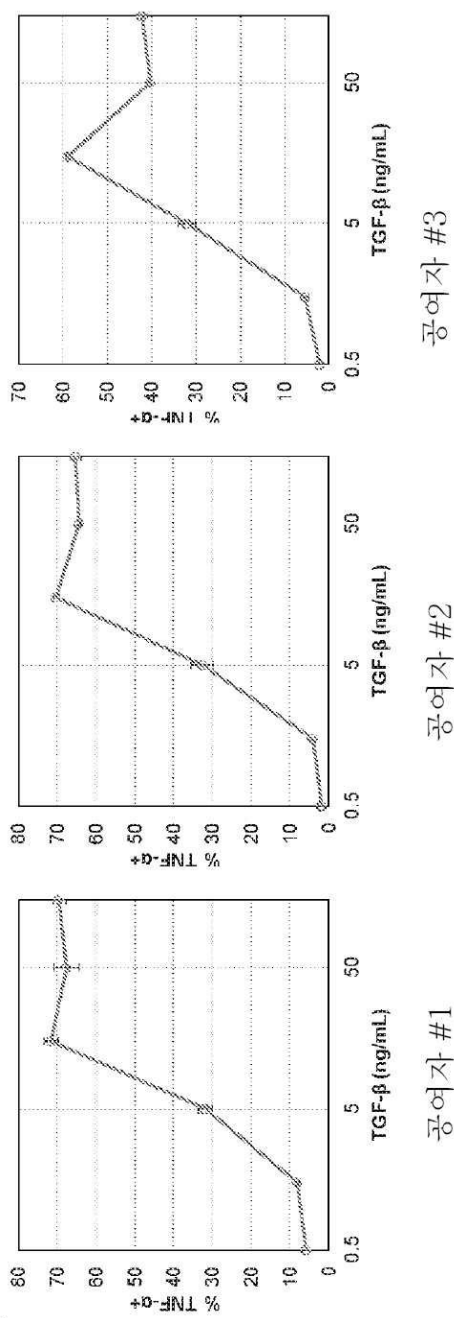
도면9



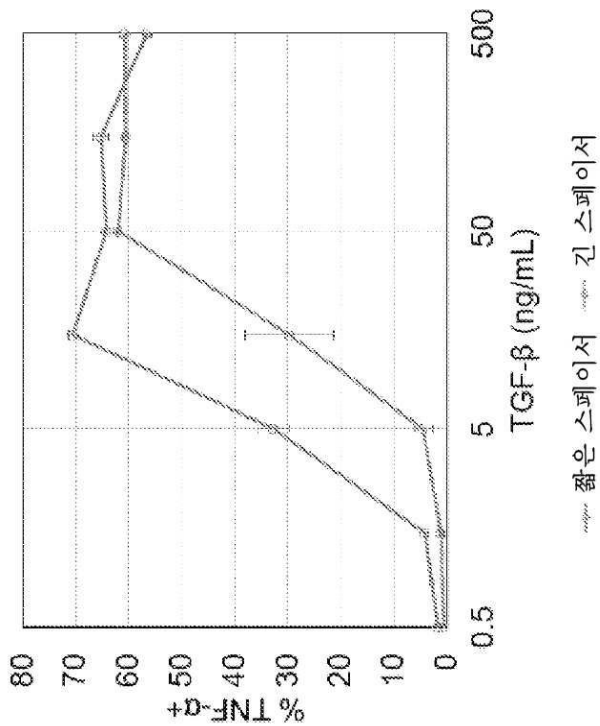
도면10



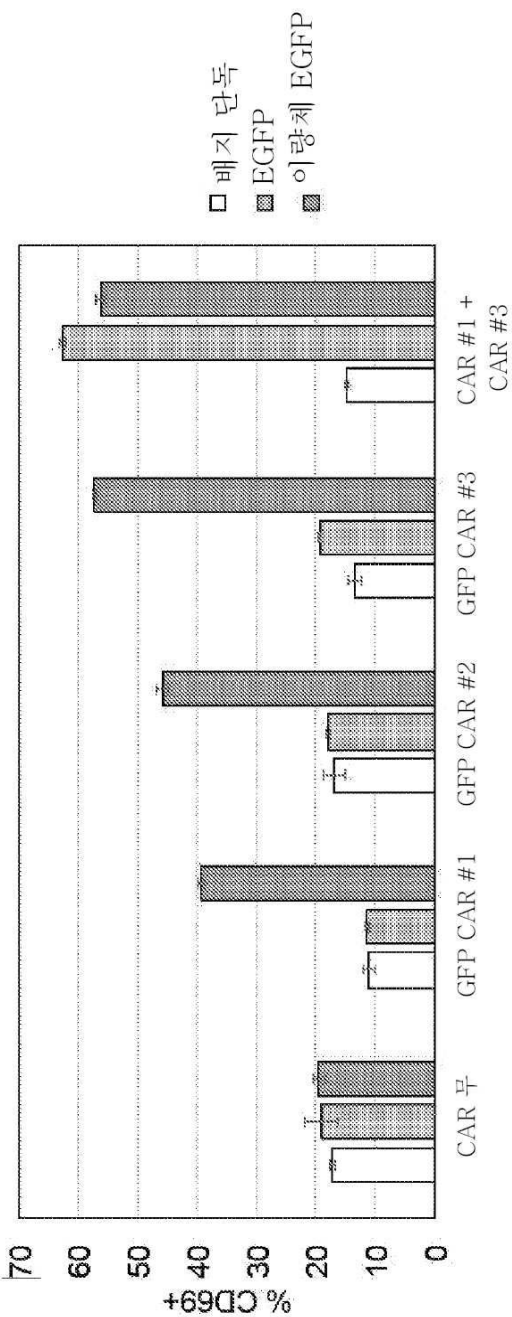
도면11



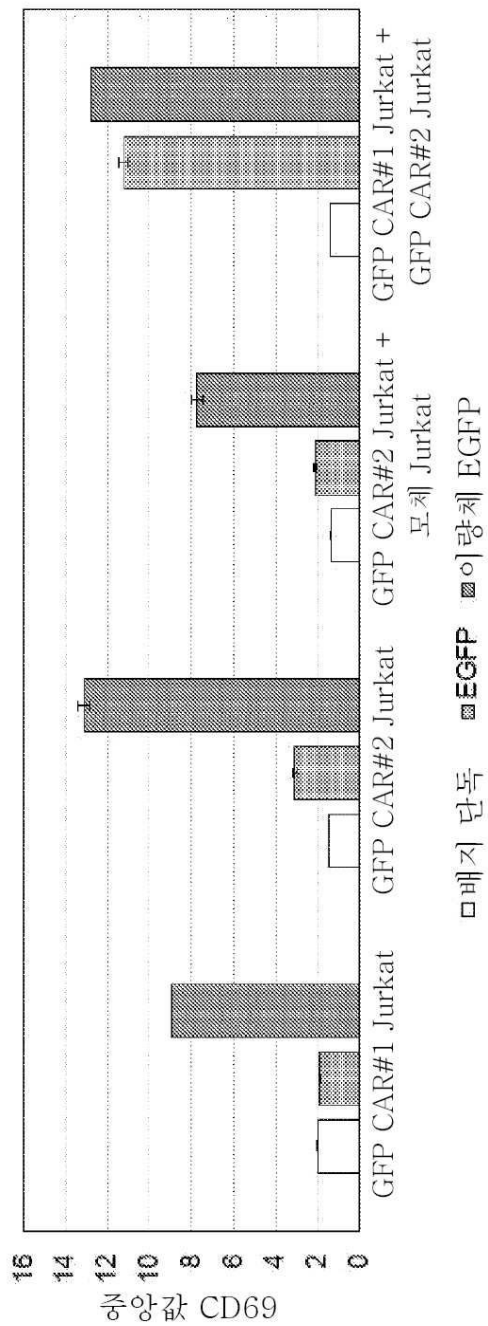
도면12



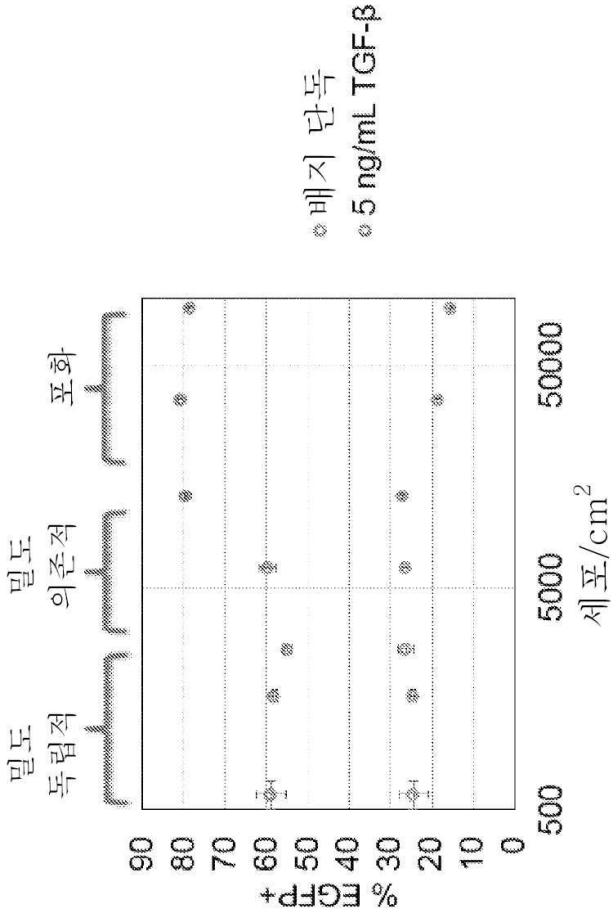
도면13



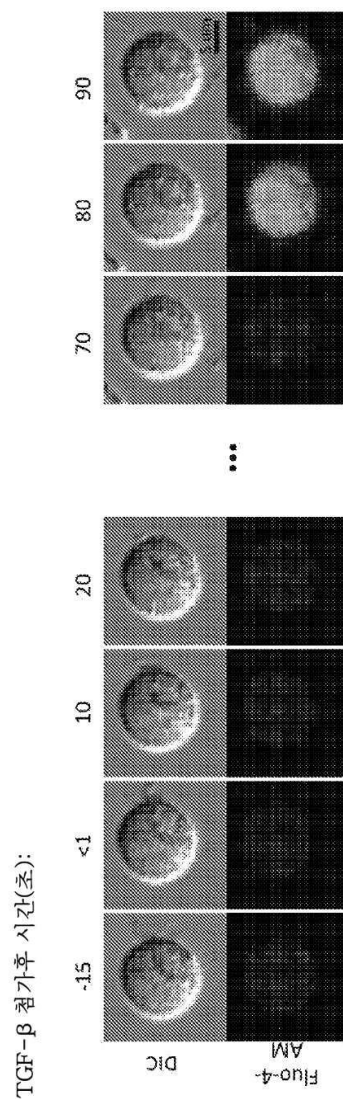
도면14



도면15



도면16



서열 목록

- <110> CHEN, Yvonne Yu-Hsuan
CHANG, Zenan Li
- <120> TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-RESPONSIVE POLYPEPTIDES AND THEIR
METHODS FOR USE
- <130> UCLA.P0013WO
- <150> 62/248,685
- <151> 2015-10-30
- <160> 101
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 124
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

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

115 120

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95
Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala

115

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 3

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

20 25 30
Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Leu Pro Arg Ala Phe Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 4
 Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 5
 Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu
 1 5 10

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 6

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 7

Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 9

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 10

His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 11

Ser Asn Val Ile Ser

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 12

Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 13

Pro Arg Ala Phe Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400>

> 14

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 15

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 16

Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 17

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 19

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400>

> 21

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 22

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 23
 Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 24
 Arg Ser Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu Gly
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 25
 Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 26

Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 27

Asp Lys Thr His Thr
 1 5

<210> 28
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 28

Cys Pro Pro Cys
 1

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 29

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 30

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
 1 5 10

<210> 31
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 31
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5 10

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 32
 Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro
 1 5

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 33
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 1 5

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 34
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15
 <210> 35
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 35

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 36

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

1 5 10 15

Pro

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 37

Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln

1 5 10

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 38

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Tyr Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 39

<211> 45

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 39

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> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> Repeated more than once

<400> 40

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> Repeated more than once

<400> 41

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide

<400> 42
 Gly Gly Ser Gly

1
 <210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide

<400> 43
 Gly Gly Ser Gly Gly

1 5
 <210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide

<400> 44
 Gly Ser Gly Ser Gly

1 5
 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide

<400> 45
 Gly Ser Gly Gly Gly

1 5
 <210> 46
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 46

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 47

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 48

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 49

Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Val Ala Ile His Leu Cys Cys

20

<210> 50

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 50

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

1 5 10 15

Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys

20 25

<210> 51

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 51

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu

1 5 10 15

Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val

20

<210> 52

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 52

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

1 5 10 15

Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 53

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 53

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro

1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu

20 25

<210> 54

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 54

Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly

1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ala

20

<210> 55

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 56

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 56

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met

1	5	10	15
Asn Met Thr	Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr	Arg Lys His Tyr	Gln Pro
20	25	30	
Tyr Ala Pro	Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr	Arg Ser	
35	40		

<210> 57

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 57

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
1 5 10 15

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
20 25 30
Val Thr Leu
35

<210> 58

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 58

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
35

<210> 59

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 59

Cys Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr

1 5 10 15

Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln

20 25 30

Thr Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr

35 40 45

Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu

85 90 95

Ala Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val

100 105 110

Arg Ser

<210> 60

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 60

His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu

1 5 10 15

Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro

<210> 61

<211> 187

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 61

Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met

100 105 110

Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu

115 120 125

Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu

130 135 140

Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro

145 150 155 160

Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys

165 170 175

Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys

180 185

<210> 62
 <211> 54
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 62
 His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln
 20 25 30
 Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg
 35 40 45
 Leu Gly Asp Leu Trp Val
 50

<210> 63
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 63
 Cys Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val
 1 5 10 15
 Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile
 20 25 30
 Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His
 50 55 60

<210> 64
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is leucine or isoleucine

<400> 64

Tyr Xaa Xaa Xaa

1

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is leucine or isoleucine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(12)

<223> X is any amino acid or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(15)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> X is leucine or isoleucine

<400> 65

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa

1

5

10

15

<210

> 66

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (82)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (92)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)

<223> X is pyrrolysine

<400> 66

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Xaa Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Xaa Glu Leu Xaa Gly

85 90 95

Xaa Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr

100 105 110

Lys

<210> 67
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (81)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (91)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (94)
 <223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (96)
 <223> X is pyrrolysine
 <400> 67

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
 20 25 30
 Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
 35 40 45
 Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
 50 55 60
 Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Thr Arg Lys
 65 70 75 80
 Xaa Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Xaa Glu Leu Xaa Gly Xaa
 85 90 95
 Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys
 100 105 110

<210> 68
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (71)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (81)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (84)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (86)

<223> X is pyrrolysine

<400> 68

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu

35 40 45

Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala

50 55 60

Glu Ala Ala Thr Arg Lys Xaa Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr

65 70 75 80

Xaa Glu Leu Xaa Gly Xaa Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr

85 90 95

Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys

100

<210> 69
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (70)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (80)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (83)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (85)
 <223> X is pyrrolysine
 <400> 69

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1	5	10	15
Leu	Ala	Val	Ser
Asp	Cys	Ser	Cys
Ser	Thr	Val	Ser
Pro	Gly	Val	Leu
20	25	30	
Ala	Gly	Ile	Val
Met	Gly	Asp	Leu
Val	Leu	Thr	Val
Leu	Ile	Ala	Leu
35	40	45	
Ala	Val	Tyr	Phe
Leu	Gly	Arg	Leu
Val	Pro	Arg	Gly
Arg	Gly	Ala	Ala
50	55	60	
Glu	Ala	Thr	Arg
Lys	Xaa	Arg	Ile
Thr	Glu	Thr	Glu
Ser	Pro	Tyr	Xaa
65	70	75	80
Glu	Leu	Xaa	Gly
Xaa	Arg	Ser	Asp
Val	Tyr	Ser	Asp
Leu	Asn	Thr	Gln
85	90	95	
Arg	Pro	Tyr	Tyr
Lys			
100			

<210> 70

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (8)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (10)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)
 <223> X is pyrrolysine
 <400> 70

Glu Ser Pro Tyr Xaa Glu Leu Xaa Gly Xaa Arg Ser Asp Val Tyr Ser
 1 5 10 15
 Asp Leu Asn Thr Xaa
 20

<210> 71
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 71

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
 20 25 30
 Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
 35 40 45

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

85

<210> 72

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> X is pyrrolysine

<400> 72

Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Xaa Glu Thr Tyr Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Lys His Glu

20

<210> 73

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (140)

<223> X is pyrrolysine

<220><

221> MISC_FEATURE

<222> (147)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (150)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (159)

<223> X is pyrrolysine

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile

50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys

65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys

85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val

100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His

115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Xaa Ala Leu Leu Arg

130 135 140

Asn Asp Xaa Val Tyr Xaa Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Xaa Tyr

145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

165 170

<210> 74

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (87)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (96)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (103)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (106)

<223> X is pyrrolysine

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile

50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys

65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Xaa Val His Tyr Arg Thr Ala Asp Thr Xaa

85 90 95

Ala Leu Leu Arg Asn Asp Xaa Val Tyr Xaa Pro Leu Arg Asp Arg Asp

100 105 110

Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

115 120 125

<210> 75

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> X is pyrrolysine

<400> 75

Asp Xaa Val Tyr Xaa Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Xaa Tyr Ser

1 5 10 15

His Leu Gly Gly Asn

20

<210> 76

<211> 207

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 76

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

1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr

20

25

30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr

35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys

50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp

65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr

85 90 95

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

165 170 175
Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190
Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 77

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 77

Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser
1 5 10 15

Gly Leu Asn Gln Arg
20

<210> 78

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (139)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (144)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (151)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (158)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (161)

<223> X is pyrrolysine

<400> 78

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe

50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp

65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro

85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala

100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val

115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Xaa Asp Gly Val Arg Xaa

130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Xaa Thr Leu Leu Pro Asn Asp Xaa Leu Tyr

145 150 155 160

Xaa Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly

165

170

175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn

180

<210> 79

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)

<223> X is pyrrolysine

<400> 79

Asp Xaa Leu Tyr Xaa Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Xaa Tyr Ser

1

5

10

15

His Leu Xaa Gly Asn

20

<210> 80

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (114)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (142)

<223> X is pyrrolysine

<400> 80

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala

35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Xaa Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Xaa Gly Leu

130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu

145 150 155 160

Pro Pro Arg

<210> 81

<211> 164

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (115)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (143)

<223> X is pyrrolysine

<400> 81

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala

35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Glu Leu Xaa Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Xaa Gly

130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 82

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (55)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (91)

<223> X is pyrrolysine

<400> 82

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

1 5 10 15

Xaa Asn Xaa 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 Xaa Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Xaa 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 Xaa 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> 83
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> X is pyrrolysine
 <400> 83
 Asn Xaa Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 1 5 10 15
 Val Leu Asp Lys Arg
 20
 <210> 84
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 84
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 1 5 10 15
 Ser Glu Ile Gly Met Lys
 20
 <210> 85
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> X is pyrrolysine
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)

<223> X is pyrrolysine

<400> 85

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

1 5 10 15

Ala Leu His Met Xaa

20

<210> 86

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (170)

<223> X is pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (207)

<223> X is pyrrolysine

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val

50 55 60

Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe

65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val

85 90 95

Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn

100 105 110
 Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro
 115 120 125
 Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile
 130 135 140
 Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly
 145 150 155 160
 Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Xaa Asn Glu Lys Leu Gly Leu
 165 170 175

Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
 180 185 190
 Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Xaa Gly
 195 200 205
 Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu
 210 215 220

Lys Pro

225

<210> 87

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 87

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

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

65						70						75					80
Leu	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Glu	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Leu		
				85					90					95			
Asp	Met	Gly	Glu	Gly	Thr	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Ile		
			100						105					110			
Ile	Leu	Leu	Phe	Cys	Ala	Val	Val	Pro	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg		
			115						120					125			
Lys	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Tyr		
		130						135					140				
Glu	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Asp	Asp	Cys	Ser	Met		

145 150 155 160
Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly

 165 170 175
Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys Pro

180 185

<210> 88

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 88

Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu

1 5 10 15

Asp Ile Ser Arg Gly

20

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 89

Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met

1 5 10 15
Pro Gly Arg Gly
20
<210> 90
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Peptide
<400> 90
Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met

1 5 10 15
Pro Gly Arg Gly
20
<210> 91
<211> 68
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Peptide
<400> 91
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> 92
<211> 68
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 92

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> 93

<211> 619

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 93

Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser

1 5 10 15

Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly

20 25 30

Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu

35 40 45

Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln

50 55 60

Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro

65 70 75 80

Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys

85 90 95

Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro

100 105 110

Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
 115 120 125
 Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
 130 135 140
 Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
 145 150 155 160
 Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
 180 185 190
 Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
 195 200 205
 Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
 210 215 220
 Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
 245 250 255
 Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
 260 265 270
 His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn
 275 280 285
 Ser Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys
 290 295 300
 Pro Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser
 305 310 315 320
 Asp Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn
 325 330 335
 Leu Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val
 340 345 350
 Arg Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile

355 360 365
 Lys Val Leu Lys Gln Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met
 370 375 380
 Arg Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg
 385 390 395 400
 Leu Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met
 405 410 415
 Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu
 420 425 430
 Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly
 435 440 445
 Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 450 455 460
 Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe
 465 470 475 480
 Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg
 485 490 495
 Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn
 500 505 510
 Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
 515 520 525
 Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys
 530 535 540
 Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys
 545 550 555 560
 Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp
 565 570 575
 Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg
 580 585 590
 Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro
 595 600 605

Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala

610

615

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 94

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1

5

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 95

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1

5

10

<210> 96

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 96

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe

50

55

60

Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

65 70 75 80
 Glu Trp Val Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn
 85 90 95
 Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn

 100 105 110
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 115 120 125
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 130 135 140
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 165 170 175

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

 245 250 255
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu
 260 265 270
 Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 275 280 285
 Val Ala
 290
 <210> 97
 <211> 278
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 97

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Ala Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

20 25 30
Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

35 40 45
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

50 55 60
Ser Ser Asn Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

65 70 75 80
Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala

85 90 95
Gln Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

100 105 110
Thr Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

115 120 125
Tyr Tyr Cys Ala Leu Pro Arg Ala Phe Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr

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

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

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

180 185 190
Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln

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

210 215 220

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

275
 <210> 98
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

><223> Synthetic Peptide
 <400> 98

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 99

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 100
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <400> 100

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

1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met

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

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

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

Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 225 230 235 240
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 101
 <211> 245
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<400> 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn

195 200 205

Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr

210 215 220

Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

Val Thr Val Ser Ser

245