



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0140572
(43) 공개일자 2022년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
C07K 14/54 (2006.01) C07K 14/55 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0637 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7031034
(22) 출원일자(국제) 2021년02월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년09월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/017620
(87) 국제공개번호 WO 2021/163298
국제공개일자 2021년08월19일
(30) 우선권주장
62/975,141 2020년02월11일 미국(US)
62/981,944 2020년02월26일 미국(US)

(71) 출원인
에이치씨더블유 바이오로지스, 인크.
미국, 플로리다 33025, 미라머, 노쓰 커머스 파크
웨이 2929
(72) 발명자
윙 힝 씨.
미국, 플로리다 33025, 미라머, 노쓰 커머스 파크
웨이 2929
슈레스타 니라지
미국, 플로리다 33025, 미라머, 노쓰 커머스 파크
웨이 2929
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
강명구

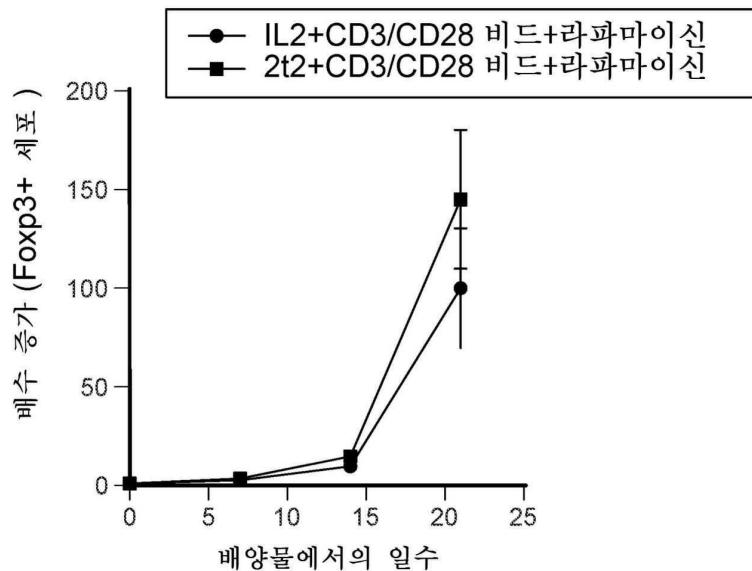
전체 청구항 수 : 총 367 항

(54) 발명의 명칭 조절 T 세포를 활성화시키는 방법

(57) 요약

T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법, 이들 방법에 의해 생성되는 T_{reg} 세포의 집단을 포함하는 조성물, 및 이들 조성물을 사용하여 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/5443 (2013.01)

C07K 14/55 (2013.01)

C07K 14/7155 (2013.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C12N 2501/2302 (2013.01)

C12N 2501/51 (2013.01)

C12N 2501/515 (2013.01)

(72) 발명자

조지 바르기즈

미국, 플로리다 33025, 미라머, 노쓰 커머스 파크
웨이 2929

디 마이클

미국, 플로리다 33025, 미라머, 노쓰 커머스 파크
웨이 2929

명세서

청구범위

청구항 1

T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법으로서,

방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 T_{reg} 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는

CD3/CD28-결합제; 및

제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 IL-2에 대한 수용체에 결합하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인과 상기 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인과 상기 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 가용성 IL-2를 포함하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 가용성 IL-2는 인간 가용성 IL-2인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 각각 SEQ ID NO: 1과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 각각 SEQ ID NO: 1과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 각각 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자 도메인으로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는, 방법:

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴;

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 22

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함하는, 방법:

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는 항-CD3/항-CD28 비드인, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 1:1 내지 약 6:1 비드/세포의 비로 포함하는, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 3:1 내지 약 5:1 비드/세포의 비로 포함하는, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이고,

상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함하는, 방법.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 상기 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 42

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 43

제36항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인과 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 44

제36항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 45

제36항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3은 인간 CD3인, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 49

제36항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD28은 인간 CD28인, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 53

제36항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인인, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와

적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 57

제36항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 방법.

청구항 58

제36항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는, 방법:

- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 59

제36항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함하는, 방법:

- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 60

제36항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 61

제36항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 62

제36항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 68

제36항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 70

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3/CD28 결합제는

(a) 제1 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 제1 표적-결합 도메인;

(ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및

(iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는, 제1 키메라 폴리펩타이드; 및

(b) 제2 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및

(ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는, 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이고,

상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고;

상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하는, 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함하는, 방법.

청구항 75

제70항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 상기 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 76

제70항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 77

제70항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인과 상기 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 78

제70항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 79

제70항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3은 인간 CD3인, 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 83

제70항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인인, 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 87

제70항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 방법.

청구항 88

제70항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는, 방법:

- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 89

제70항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함하는, 방법:

- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 90

제70항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 91

제70항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 94

제70항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 97

제70항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD28은 인간 CD28인, 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 101

제70항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 104

제70항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 107

제70항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 108

제70항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 110

제1항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 상기 mTOR 저해제는 라파마이신인, 방법.

청구항 112

제110항 또는 제111항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM의 mTOR 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 mTOR 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 114

제1항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 포함하지 않는, 방법.

청구항 115

제1항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소정의 기간의 시작 후 36시간 내지 약 60시간 후마다, 액체 배양 배지에 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약 500 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행되는, 방법.

청구항 117

제116항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 50 nM 내지 약 150 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행되는, 방법.

청구항 118

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소정의 기간의 시작 후 약 6일 내지 약 8일 후마다, 액체 배양 배지에 CD3/CD28-결합제를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 119

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일인, 방법.

청구항 120

제119항에 있어서, 상기 소정의 기간은 약 15일 내지 약 25일인, 방법.

청구항 121

제1항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 122

제1항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 단계 후에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 123

제121항 또는 제122항에 있어서, 상기 단리는 형광-분류 세포 선별(fluorescence-assorted cell sorting)의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 124

제1항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 말초 혈액 또는 제대혈로부터 분리되는 자가 T_{reg} 세포, 동일단배체 T_{reg} 세포, 또는 동종이계 T_{reg} 세포인, 방법.

청구항 125

제1항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ 세포인, 방법.

청구항 126

제1항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{dim}$ 세포인, 방법.

청구항 127

제1항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체를 포함하는, 방법.

청구항 128

제1항 내지 제127항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성되는 T_{reg} 세포의 집단.

청구항 129

제128항의 T_{reg} 세포 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 130

치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의 제129항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 131

제130항에 있어서, 상기 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단된, 방법.

청구항 132

제131항에 있어서, 상기 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 남성 섬유증, 췌장염에서의 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간판 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방세포 위축, 지방이영양증, 죽상동맥경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골질량 손실, 심근 경색, 사르코페니아, 상처 치유, 탈모증, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 연령 연관된 폐 조직 탄성 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간 경변증, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴 질환, 척추측만증, 실조증, 다발성 경화증 및 신장 기능이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 133

제131항에 있어서, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측삭 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 폐양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 134

키트로서,

(i) CD3/CD28-결합제;

(ii) 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드로서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 IL-2에 대한 수용체에 결합하는, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드; 및

(iii) mTOR 저해제를 포함하는, 키트.

청구항 135

제134항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는 키트.

청구항 136

제134항 또는 제135항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는 항-CD3/항-CD28 비드인, 키트.

청구항 137

제134항 또는 제135항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이고,

상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하는, 키트.

청구항 138

제137항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는 키트.

청구항 139

제134항 또는 제135항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는

(a) 제1 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 제1 표적-결합 도메인;

(ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및

(iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는, 제1 키메라 폴리펩타이드; 및

(b) 제2 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및

(ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는, 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이고,

상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고;

상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하는, 키트.

청구항 140

제139항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 141

T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법으로서,

방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 T_{reg} 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는

IL-2 수용체-활성화제; 및

제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하고, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하는, 방법.

청구항 142

제141항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 143

제142항에 있어서, 상기 IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 144

제143항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 145

제144항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함하는, 방법.

청구항 146

제141항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인과 상기 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 147

제141항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 148

제141항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인과 상기 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 149

제141항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 150

제141항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3은 인간 CD3인, 방법.

청구항 151

제150항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 152

제151항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 153

제152항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 154

제141항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD28은 인간 CD28인, 방법.

청구항 155

제154항에 있어서, 상기 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 156

제155항에 있어서, 상기 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 157

제156항에 있어서, 상기 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 158

제141항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인인, 방법.

청구항 159

제158항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 160

제159항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 161

제160항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 162

제141항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자 도메인으로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 방법.

청구항 163

제141항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는, 방법:

- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 164

제141항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함하는, 방법:

- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 165

제141항 내지 제164항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 166

제141항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 167

제141항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 169

제168항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 170

제169항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 171

제170항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 173

제141항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 174

제173항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 175

제141항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2 수용체-활성화제는 가용성 IL-2인, 방법.

청구항 176

제175항에 있어서, 상기 가용성 IL-2는 인간 가용성 IL-2인, 방법.

청구항 177

제176항에 있어서, 상기 인간 가용성 IL-2는 SEQ ID NO: 1과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 178

제177항에 있어서, 상기 인간 가용성 IL-2는 SEQ ID NO: 1과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 179

제178항에 있어서, 상기 인간 가용성 IL-2는 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 180

제176항 내지 제179항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 100 IU/mL 내지 약 800 IU/mL의 인간 가용성 IL-2를 포함하는, 방법.

청구항 181

제180항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 400 IU/mL 내지 약 600 IU/mL의 인간 가용성 IL-2를 포함하는, 방법.

청구항 182

제141항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 183

제182항에 있어서, 상기 mTOR 저해제는 라파마이신인, 방법.

청구항 184

제182항 또는 제183항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM의 mTOR 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 185

제184항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 mTOR 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 186

제141항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 포함하지 않는, 방법.

청구항 187

제141항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소정의 기간의 시작 후 36시간 내지 약 60시간 후마다, 액체 배양 배지에 IL-2 수용체-활성화제를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 188

제187항에 있어서, 상기 IL-2 수용체-활성화제의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 IL-2 수용체-활성화제의 농도를 초래하도록 수행되는, 방법.

청구항 189

제188항에 있어서, 상기 IL-2 수용체-활성화제의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 50 nM 내지 약 150 nM의 IL-2 수용체-활성화제의 농도를 초래하도록 수행되는, 방법.

청구항 190

제141항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소정의 기간의 시작 후 약 6일 내지 약 8일 후마다, 액체 배양 배지에 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 191

제141항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일인, 방법.

청구항 192

제191항에 있어서, 상기 소정의 기간은 약 15일 내지 약 25일인, 방법.

청구항 193

제141항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 194

제141항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 단계 후에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 195

제193항 또는 제194항에 있어서, 상기 단리는 형광-분류 세포 선별의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 196

제141항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 말초 혈액 또는 제대혈로부터 분리되는 자가

T_{reg} 세포, 동일단백체 T_{reg} 세포, 또는 동종이계 T_{reg} 세포인, 방법.

청구항 197

제141항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 세포인, 방법.

청구항 198

제141항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} 세포인, 방법.

청구항 199

제141항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체를 포함하는, 방법.

청구항 200

제141항 내지 제199항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성되는 T_{reg} 세포의 집단.

청구항 201

제200항의 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 202

치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의 제201항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 203

제202항에 있어서, 상기 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단된, 방법.

청구항 204

제203항에 있어서, 상기 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 남성 섬유증, 췌장염에서의 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간판 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방세포 위축, 지방이영양증, 죽상동맥경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골질량 손실, 심근 경색, 사르코페니아, 상처 치유, 탈모증, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 연령 연관된 폐 조직 탄성 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간 경변증, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴 질환, 척추소뇌 실조증, 다발성 경화증 및 신장 기능이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 205

제203항에 있어서, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측삭 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 폐양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 206

키트로서,

(i) 인터류킨-2 수용체-활성화제;

(ii) 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드로서,

상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하는, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드; 및

(iii) mTOR 저해제를 포함하는, 키트.

청구항 207

제206항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는 키트.

청구항 208

T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법으로서,

방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 T_{reg} 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는

CD3/CD28-결합제; 및

다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는

(a) 제1 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 제1 표적-결합 도메인;

(ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및

(iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는, 제1 키메라 폴리펩타이드; 및

(b) 제2 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및

(ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는, 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하고,

상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되는, 방법.

청구항 209

제208항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 210

제209항에 있어서, 상기 IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 211

제210항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 212

제211항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함하는, 방법.

청구항 213

제208항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인과 상기 가용성 조직 인자 도메인은 제1 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 214

제208항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 키메라 폴리펩타이드에서

제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 215

제208항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인과 상기 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인은 제1 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 216

제208항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 키메라 폴리펩타이드에서 가용성 조직 인자 도메인과 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 217

제208항 내지 제216항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인과 상기 제2 표적-결합 도메인은 제2 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 218

제208항 내지 제216항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 제2 키메라 폴리펩타이드에서 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 219

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 동일한 항원에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 220

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 상이한 항원에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 221

제208항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인과 상기 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 항원-결합 도메인인, 방법.

청구항 222

제208항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인과 상기 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적에 특이적으로 결합하는, 방법: CD16a, CD28, CD3, CD33, CD20, CD19, CD22, CD123, IL-1R, IL-1, VEGF, IL-6R, IL-4, IL-10, PDL-1, TIGIT, PD-1, TIM3, CTLA4, MICA, MICB, IL-6, IL-8, TNF α , CD26, CD36, ULBP2, CD30, CD200, IGF-1R, MUC4AC, MUC5AC, Trop-2, CMET, EGFR, HER1, HER2, HER3, PSMA, CEA, B7H3, EPCAM, BCMA, P-카드헤린, CEACAM5, UL16-결합 단백질, HLA-DR, DLL4, TYRO3, AXL, MER, CD122, CD155, PDGF-DD, TGF- β 수용체 II(TGF- β RII)의 리간드, TGF- β RIII의 리간드, DNAM-1의 리간드, Nkp46의 리간드, Nkp44의 리간드, NKG2D의 리간드, Nkp30의 리간드, scMHC I에 대한 리간드, scMHC II에 대한 리간드, scTCR에 대한 리간드, IL-1에 대한 수용체, IL-2에 대한 수용체, IL-3에 대한 수용체, IL-7에 대한 수용체, IL-8에 대한 수용체, IL-10에 대한 수용체, IL-12에 대한 수용체, IL-15에 대한 수용체, IL-17에 대한 수용체, IL-18에 대한 수용체, IL-21에 대한 수용체, PDGF-DD에 대한 수용체, 줄기세포 인자(SCF)에 대한 수용체, 줄기세포-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L)에 대한 수용체, MICA에 대한 수용체, MICB에 대한 수용체, ULP16-결합 단백질에 대한 수용체, CD155에 대한 수용체, CD122에 대한 수용체, 및 CD28에 대한 수용체.

청구항 223

제208항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인과 상기 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 단백질인, 방법.

청구항 224

제223항에 있어서, 상기 가용성 인터류킨, 사이토카인, 또는 리간드 단백질은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법: IL-1, IL-2, IL-3, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, PDGF-DD, SCF, 및 FLT3L.

청구항 225

제208항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적-결합 도메인과 상기 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 수용체인, 방법.

청구항 226

제225항에 있어서, 상기 가용성 수용체는 가용성 TGF- β 수용체 II(TGF- β RII), 가용성 TGF- β RIII, 가용성 NKG2D, 가용성 NKp30, 가용성 NKp44, 가용성 NKp46, 가용성 DNAM-1, scMHCI, scMHCII, scTCR, 가용성 CD155, 또는 가용성 CD28인, 방법.

청구항 227

제208항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드는 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인(들)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 228

제208항 내지 제227항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 229

제208항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친화도 도메인 쌍은 인간 IL-15 수용체의 알파 사슬(IL15R α) 및 가용성 IL-15로부터의 스시 도메인(sushi domain)인, 방법.

청구항 230

제229항에 있어서, 가용성 IL-15는 D8N 또는 D8A 아미노산 치환을 갖는, 방법.

청구항 231

제208항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친화도 도메인 쌍은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법: 바르나제(barnase)와 바른스타(barnstar), PKA 및 AKAP, 돌연변이화된 RNase I 단편에 기초한 어댑터/도킹 태그 모듈, 및 단백질 신택신(syntaxin), 시냅토태그민(synaptotagmin), 시냅토프레빈(synaptobrevin), 및 SNAP25의 상호작용에 기초한 SNARE 모듈.

청구항 232

제208항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인인, 방법.

청구항 233

제232항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 234

제233항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 235

제234항에 있어서, 상기 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 236

제208항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자 도메인으로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 방법.

청구항 237

제208항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는, 방법:

- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 238

제208항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함하는, 방법:

- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
- 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 239

제208항 내지 제238항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 240

제208항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 241

제208항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는 항-CD3/항-CD28 비드인, 방법.

청구항 242

제241항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 1:1 내지 약 6:1 비드/세포의 비로 포함하는, 방법.

청구항 243

제242항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 3:1 내지 약 5:1 비드/세포의 비로 포함하

는, 방법.

청구항 244

제208항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합체는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이고,

상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하는, 방법.

청구항 245

제244항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 246

제245항에 있어서, 상기 IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 247

제246항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 248

제247항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함하는, 방법.

청구항 249

제244항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 상기 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 250

제244항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 251

제244항 내지 제250항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인과 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 252

제244항 내지 제250항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 253

제244항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3은 인간 CD3인, 방법.

청구항 254

제253항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 255

제254항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90%

동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 256

제255항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 257

제244항 내지 제256항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD28은 인간 CD28인, 방법.

청구항 258

제257항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 259

제258항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 260

제259항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 261

제244항 내지 제260항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인인, 방법.

청구항 262

제261항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 263

제262항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 264

제263항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 265

제244항 내지 제260항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 방법.

청구항 266

제244항 내지 제260항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는, 방법:

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신;

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 267

제244항 내지 제260항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함하는, 방법:

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 268

제244항 내지 제267항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 269

제244항 내지 제268항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 270

제244항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 271

제270항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 272

제271항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 273

제272항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 274

제273항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 275

제274항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 276

제244항 내지 제275항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 277

제276항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 278

제208항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3/CD28 결합제는

(a) 제1 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 제1 표적-결합 도메인;

(ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및

(iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는, 제1 키메라 폴리펩타이드; 및

(b) 제2 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및

(ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는, 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이고,

상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고;

상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하는, 방법.

청구항 279

제278항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 280

제279항에 있어서, 상기 IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 281

제280항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 282

제281항에 있어서, 상기 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함하는, 방법.

청구항 283

제278항 내지 제282항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 상기 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 284

제278항 내지 제282항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩

타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 285

제278항 내지 제284항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인과 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있는, 방법.

청구항 286

제278항 내지 제284항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 287

제278항 내지 제286항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3은 인간 CD3인, 방법.

청구항 288

제287항에 있어서, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 289

제288항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 290

제289항에 있어서, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 291

제278항 내지 제290항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인인, 방법.

청구항 292

제291항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 293

제292항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 294

제293항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 295

제278항 내지 제290항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 방법.

청구항 296

제278항 내지 제290항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는, 방법:

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 297

제278항 내지 제290항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함하는, 방법:

성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 리신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신;
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및
 성숙 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

청구항 298

제278항 내지 제297항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 299

제278항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 300

제299항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 301

제300항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 302

제278항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 303

제302항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 304

제303항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 305

제278항 내지 제304항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD28은 인간 CD28인, 방법.

청구항 306

제305항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 307

제306항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 308

제307항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 309

제278항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 310

제309항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 311

제310항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 312

제311항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 313

제312항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 314

제313항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 315

제278항 내지 제314항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는, 방법.

청구항 316

제278항 내지 제315항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 317

제316항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 318

제208항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 319

제318항에 있어서, 상기 mTOR 저해제는 라파마이신인, 방법.

청구항 320

제318항 또는 제319항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM의 mTOR 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 321

제320항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 mTOR 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 322

제208항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 포함하지 않는, 방법.

청구항 323

제208항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소정의 기간의 시작 후 36시간 내지 약 60시간 후마다, 액체 배양 배지에 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 324

제323항에 있어서, 상기 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약 500 nM의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행되는, 방법.

청구항 325

제324항에 있어서, 상기 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 50 nM 내지 약 150 nM의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행되는, 방법.

청구항 326

제208항 내지 제325항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소정의 기간의 시작 후 약 6일 내지 약 8일 후마다, 액체 배양 배지에 CD3/CD28-결합제를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 327

제208항 내지 제326항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일인, 방법.

청구항 328

제327항에 있어서, 상기 소정의 기간은 약 15일 내지 약 25일인, 방법.

청구항 329

제208항 내지 제328항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 330

제208항 내지 제328항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 단계 후에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 331

제329항 또는 제330항에 있어서, 상기 단리는 형광-분류 세포 선별의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 332

제208항 내지 제331항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 말초 혈액 또는 제대혈로부터 분리되는 자가 T_{reg} 세포, 동일단배체 T_{reg} 세포, 또는 동종이계 T_{reg} 세포인, 방법.

청구항 333

제208항 내지 제332항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 세포인, 방법.

청구항 334

제208항 내지 제332항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ 세포인, 방법.

청구항 335

제208항 내지 제334항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체를 포함하는, 방법.

청구항 336

제208항 내지 제335항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성되는 T_{reg} 세포의 집단.

청구항 337

제336항의 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 338

치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의 제337항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 339

제338항에 있어서, 상기 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단된, 방법.

청구항 340

제339항에 있어서, 상기 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 낭성 섬유증, 췌장염에서의 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간판 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방세포 위축, 지방이영양증, 죽상동맥경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골질량 손실, 심근 경색, 사르코페니아, 상처 치유, 탈모증, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 연령 연관된 폐 조직 탄성 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간 경변증, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴 질환, 척추측만증, 다발성 경화증 및 신장 기능이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 341

제339항에 있어서, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측삭 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 폐양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애로 이루어진 군으로부터

선택되는, 방법.

청구항 342

키트로서,

CD3/CD28-결합제;

다중-사슬 키메라 폴리펩타이드로서,

(a) 제1 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 제1 표적-결합 도메인;

(ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및

(iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는, 제1 키메라 폴리펩타이드; 및

(b) 제2 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및

(ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는, 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하고,

상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되는, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드; 및

mTOR 저해제를 포함하는, 키트.

청구항 343

제342항에 있어서, 상기 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는 키트.

청구항 344

제342항 또는 제343항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는 항-CD3/항-CD28 비드인, 키트.

청구항 345

제342항 또는 제343항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이고, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하는, 키트.

청구항 346

제345항에 있어서, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는 키트.

청구항 347

제342항 또는 제343항에 있어서, 상기 CD3/CD28-결합제는

(a) 제1 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 제1 표적-결합 도메인;

(ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및

(iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는, 제1 키메라 폴리펩타이드; 및

(b) 제2 키메라 폴리펩타이드로서,

(i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및

(ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는, 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이고,

상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고;

상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하는, 키트.

청구항 348

제347항에 있어서, 상기 액체 배양 배지는 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 349

대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 방법으로서, 이의 CD39의 발현에 기초하여 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하여 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 350

제349항에 있어서,

T_{reg} 세포를 분리하기 전에 액체 배양 배지에서 시료를 배양함으로써 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 351

제349항 또는 제350항에 있어서,

CD39를 발현하는 T_{reg} 세포에 항체 또는 리간드가 결합하게 하는 조건 하에, CD39에 결합할 수 있는 항체 또는 리간드와 시료를 혼합하는 단계;

항체 또는 리간드에 결합된 T_{reg} 세포를 시료 내 다른 구성요소로부터 분리하여 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 352

제351항에 있어서,

상기 항체는 마우스, 인간화, 또는 인간 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고/또는

상기 항체 또는 리간드는 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 또는 형광단 중 적어도 하나로 표지되거나, 입자, 비드, 수지, 또는 고체 지지체에 결합되는, 방법.

청구항 353

제351항에 있어서, 상기 분리는 유세포측정법, 형광-활성화된 세포 선별(FACS), 원심분리, 또는 컬럼, 플레이트, 입자, 또는 비드-기초 방법의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 354

제349항에 있어서,

T_{reg} 세포에 항체 또는 리간드가 결합하게 하는 조건 하에, CD39에 결합할 수 있는 비오틴화된 항체 또는 리간드와 시료를 혼합하는 단계;

스트렙타비딘-코팅된 자성 입자를 사용하여, 상기 비오틴화된 항체 또는 리간드에 결합된 T_{reg} 세포를 포착하는 단계;

자석을 사용하여, 자성 입자-결합된 T_{reg} 세포를 분리하는 단계;

상기 자석 입자-결합된 T_{reg} 세포를 세척하여 시료 내 다른 구성요소를 제거하는 단계; 및

상기 자석으로부터 자성 입자-결합된 T_{reg} 세포를 용액 내로 방출시켜 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 355

제349항 내지 제354항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 신선한 또는 냉동된 말초 혈액, 제대혈, 말초 혈액 단핵 세포, 림프구, $CD4^{+}$ T 세포 또는 T_{reg} 세포를 포함하는 시료로부터 분리되는 자가 T_{reg} 세포, 동일단배체 T_{reg} 세포, 또는 동종이계 T_{reg} 세포인, 방법.

청구항 356

제349항 내지 제355항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ 세포인, 방법.

청구항 357

제349항 내지 제356항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{dim}$ 세포인, 방법.

청구항 358

제349항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체를 포함하는, 방법.

청구항 359

제349항 내지 제358항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포는 시험관내에서 그리고 생체내에서 면역억제성인, 방법.

청구항 360

제349항 내지 제359항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 분리된 T_{reg} 세포의 집단.

청구항 361

제360항의 분리된 T_{reg} 세포의 집단을 확장시키는 방법으로서, 분리된 T_{reg} 세포의 증식을 가능하게 하는 조건 하에 분리된 T_{reg} 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 362

제360항에 있어서, 상기 T_{reg} 세포의 분리된 집단은 70% 초과 $CD39^{+}$ 세포인, 분리된 T_{reg} 세포의 집단.

청구항 363

제360항 또는 제362항의 분리된 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 364

치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의 제363항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 365

제364항에 있어서, 상기 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단된, 방법.

청구항 366

제365항에 있어서, 상기 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 낭성 섬유증, 췌장염에서의 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간판 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방세포 위축, 지방이영양증, 죽상동맥경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골질량 손실, 심근 경색, 사르코페니아, 상처 치유, 탈모증, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 연령 연관된 폐 조직 탄성 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간 경변증, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴 질환, 척추소뇌 실조증, 다발성 경화증 및 신장 기능이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 367

제365항에 있어서, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측삭 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 췌양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2020년 2월 26일에 출원된 미국 임시 특허 출원 제62/981,944호, 및 2020년 2월 11일에 출원된 미국 임시 특허 출원 제62/975,141호에 대해 우선권을 주장하고, 이들의 전체 내용은 본원에 인용되어 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시내용은 생물공학 및 면역학 분야, 더 구체적으로 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 분자량이 약 46 kDa인 263개 아미노산 내재막 당단백질 및 외인성(extrinsic) 혈액 응고 경로의 촉발 단백질인 조직 인자(TF)는 *생체내에서* 응고의 1차 개시자이다. 순환중인 혈액과 통상적으로 접촉해 있지 않은 조직 인자는 순환중인 응고 세린 프로테아제 인자에 노출 시 응고 캐스케이드를 개시한다. 혈관 손상은 조직 인자를 발현하는 내피하(sub-endothelial) 세포를 노출시켜, 기존의 혈장 인자 VIIa(FVIIa)와의 칼슘-의존적, 고-친화도 복합체의 형성을 초래한다. 세린 프로테아제 FVIIa가 조직 인자에 결합하면, FX로부터 FXa로 그리고 FIX로부터 FIXa로의 신속한 절단이 촉진된다. 그 후에, 생성된 FXa 및 활성화 막 표면의 단백질분해 활성화는 소량의 프로트롬빈을 트롬빈으로 비효율적으로 전환시킨다. FXa에 의해 발생된 트롬빈은 혈소판 활성화를 개시하고, 미미한 양의 전구-보조인자 인자 V(FV) 및 인자 VIII(FVIII)을 활성화시켜, 활성화 보조인자, 인자 Va(FVa) 및 인자 VIIa(FVIIa)로 되게 한다. FIXa는 혈소판 표면 상의 FVIIa와 복합체화하여 내인성(intrinsic) 테나제(tenase) 복합체를 형성하며, 이는 FXa의 신속한 발생을 초래한다. FXa는 FVa와 복합체화하여, 활성화된 혈소판 표면 상에서 프로트롬비나제 복합체를 형성하며, 이는 프로트롬빈을 트롬빈으로 신속하게 절단한다.

[0006] 조직 인자-FVIIa 복합체 외에도, 최근의 연구는, 조직 인자-FVIIa-FXa 복합체가 FVIII를 활성화시킬 수 있으며, 이는 개시 단계(phase) 동안 FVIIIa의 추가 수준을 제공할 것임을 나타내었다. 외인성 경로는 제한된 양의 트롬빈의 활성화를 통해 응고를 개시하는 데 가장 중요한 반면, 내인성 경로는 초기 신호의 급격한 증폭에 의해 응고를 유지시킨다.

[0007] 세포 표면 상에서 발현되는 많은 조직 인자는 "암호화되며", 이는 응고에 완전히 참여하기 위해서는 "해독되어야" 한다. 세포-표면 조직 인자의 "해독" 기전은 현재로서는 여전히 명확하지 않지만, 음이온성 인지질의 노출이 이 과정에서 주요한 역할을 한다. 건강한 세포는 음이온성 인지질, 예컨대 포스파티딜 세린(PS)을 원형질막의 내층(inner leaflet)에 격리시킨다. 세포 손상, 활성화, 또는 세포기질 Ca^{2+} 의 증가된 수준 후, 이러한 이중층 비대칭이 소실되어, 외층 상에서 PS 노출의 증가가 초래되며, 이는 세포-표면 조직 인자-FVIIa 복합체의 특이적인 활성을 증가시킨다. PS 노출은 조직 인자-FVIIa 복합체에 의해 FIX 및 FX의 활성화에 대한 겉보기(apparent) Km을 저하시키는 것으로 알려져 있으나, 추가 기전은 조직 인자 또는 조직 인자-FVIIa의 형태적 재

배열(conformational rearrangement) 및 기질 결합 부위의 후속적인 노출을 포함할 수 있을 것이다.

[0008]

입양 면역요법 또는 세포 요법은 대상체에 다시 투여하기 전에 *생체내에서* 대상체로부터 수득된 면역 세포의 배양(및 선택적으로 키메라 항원 수용체 또는 T-세포 수용체를 발현하기 위한 면역 세포의 유전적 조작)을 필요로 한다. 대상체에서 치료 효과를 제공하기 위해 충분한 수의 면역 세포가 필요하다. 많은 예에서, 치료적 유효 수의 면역 세포를 얻기 전에 3주 이상 동안 대상체로부터 얻은 면역 세포를 배양할 필요가 있다. 게다가, 시험관 내 대상체로부터 얻은 면역 세포를 배양하기 위한 많은 방법은 피더 세포의 층을 요하고, 이는 대상체에 다시 투여하기 전에, 후속적인 면역 세포의 정제 또는 단리를 요한다.

발명의 내용

[0009]

Treg 세포를 제공받는 환자에서 우수한 안전성 프로파일이 제시되었다(문헌[Esensten 등, *J Allergy Clin Immunol* 142(6): 1710-1718, 2018]). 초기 임상 연구는 급성 및 만성 이식편대숙주 질환(Graft versus Host Disease)(문헌[Brunstein 등, *Blood* 117(3): 1061-1070, 2011]; 문헌[Di Ianni 등, *Blood* 117(14): 3921-3928, 2011]; 문헌[Martelli 등, *Blood* 124(4): 638-644, 2014]; 문헌[Theil 등, *Cytotherapy* 17(4): 473-486, 2015]; 문헌[Brunstein 등, *Blood* 127(8): 1044-1051, 2016]), 자가면역 및 신경퇴행성 질환(문헌[Thonhoff 등, *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 5(4): e465, 2018]; 문헌[Dall'Era 등, *Arthritis Rheumatol* 71(3): 431-440, 2019])을 예방하고 치료하기 위해 Treg 세포를 사용한 고무적인 결과를 제시하였다.

[0010]

Treg 세포를 포함한 T 세포-기초 입양 요법을 사용하기 위해, 생체의 세포 자극 단계가 GMP 제조 설정에 필요하다. 항-CD3/항-CD28 항체-코팅된 자성 비드(Dynabeads, Thermo Fisher)는 IL-2와 조합되어 세포 자극 및 확장에 가장 보편적으로 사용된다(문헌[Highfill 등, *Curr Hematol Malig Rep* 14(4): 269-277, 2019]). 이러한 접근법을 사용한다면, 배양물 수합 시 그리고 환자에게 주입 전에 T 세포에 "비드가 없는" 것을 보장하기 위한 방법이 개발되어야 한다. 이러한 연구에서, 본 발명자들은 라파마이신을 사용하지 않으면서 T 세포 자극 및 확장을 위해 IL-2 및 항-CD3/항-CD28-코팅된 자성 비드를 각각 효과적으로 치환하기 위해 2t2 및 3t15*-28s를 이용하는 방법을 기재한다. 3t15*-28s는 단순한 세척 단계로 배양물로부터 쉽게 제거될 수 있는 가용성 융합 단백질 복합체이며, 이는 비드 제거에 대한 필요성을 해소하여 시간 및 가공 비용을 절감하고 세포 회수를 증강시킨다. 이에 더하여, 본 발명자들은 또한, 세포 자극 및 확장 전에 또는 후에 Treg 세포의 단리 또는 정제에서 항-CD39 항체를 사용하는 분리 단계의 포함이 CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{lo} 및 CD39^{hi} Treg를 농화시켜 순도, 일관성(consistency), 및 이펙터 기능이 증가된 Treg 세포를 초래할 수 있음을 실증하였다.

[0011]

인간에서 노화는 상승된 전신 염증과 관련이 있다(문헌[Ferrucci 등, *Blood* 105(6): 2294-2299, 2005]; 문헌[Dinarello, *Am J Clin Nutr* 83(2): 447S-455S, 2006]). 염증을 노화와 연결하는 과정을 염증-노화(inflamm-aging)라고 하였다(문헌[Franceschi 등, *Ann N Y Acad Sci* 908: 244-254, 2000]). 노화 과정은 면역계에 영향을 미치고 여러 가지 노화-관련 병상(pathology)을 초래하는 주요 변화와 연결된다.

[0012]

면역계의 기능은 조직에 가해지는 손상 또는 병원성 미생물의 침범을 검출하고 이에 반응하는 것이다. 감염에 대한 제1선 방어인 내재성 면역 세포는 미생물에 독특한 보존된 병원체-관련 분자 패턴(PAMP: pathogen-associated molecular pattern)을 인식하는 별개의 생식세포계 인코딩된 패턴 인식 수용체(PRR: pattern recognition receptor)를 발현한다(문헌[Janeway, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13, 1989]; 문헌[Gong 등, *Nat Rev Immunol* 20(2): 95-112, 2020]). 부실한 또는 손상된 세포에 의해 방출되는 위험한 신호는 또한 손상-관련 분자 패턴(DAMP: damage-associated molecular pattern)의 수용체에 의해 인식된다(문헌[Gong 등, *Nat Rev Immunol* 20(2): 95-112, 2020]). PAMP와 DAMP는 둘 다 전형적인 PRR, 예컨대 Toll-유사 수용체(TLR), 및 다수의 생식세포계-인코딩된 수용체, 예컨대 NOD-유사 수용체(NLR), 레티노산-유도적 유전자 I(RIG-I)-유사 수용체(RLR), C-유형 렉틴 수용체(CLR) 및 세포내 DNA 센서의 활성화를 통해 내재성 면역 반응을 개시할 수 있다(문헌[Cao, *Nat Rev Immunol* 16(1): 35-50, 2016]). DAMP는 또한 몇몇 다른 수용체에 의해 감지될 수 있다. 이들은 진행성 당화 최종 생성물에 대한 수용체(RAGE: receptor for advanced glycation end product)(문헌[Hudson 등, *Annu Rev Med* 69: 349-364, 2018]; 문헌[Teissier 등, *Biogerontology* 20(3): 279-301, 2019]), 골수 세포 상에서 발현되는 촉발 수용체(TREM: triggering receptor expressed on myeloid cell)(문헌[Ford 등, *Curr Opin Immunol* 21(1): 38-46, 2009]), 몇몇 G-단백질-결합 수용체(GPCR)(문헌[Heng 등, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54: 227-249, 2014]; 문헌[Weiss 등, *Trends Immunol* 39(10): 815-829, 2018]) 및 이온 채널(문헌[Eisenhut 등, *Pflugers Arch* 461(4): 401-421, 2011])을 포함한다.

- [0013] DAMP-개시 염증 반응은 무균 염증으로 지칭되는데, 왜냐하면 이들 반응이 병원체 감염에 독립적이기 때문이다(문헌[Chen 등, *Nat Rev Immunol* 10(12): 826-837, 2010]). DAMP는 비-면역 세포와 내재성 면역 세포 둘 다를 활성화시킬 수 있다(문헌[Chen 등, *Nat Rev Immunol* 10(12): 826-837, 2010]). 이들 세포의 활성화는 사이토카인 및 케모카인의 생성을 유발하며, 이는 다시 염증성 세포를 모집하고 적응 면역 반응을 활성화시킨다(문헌[Chen 등, *Nat Rev Immunol* 10(12): 826-837, 2010]). 일부 DAMP는 또한 적응 면역 세포를 직접적으로 활성화시키는 것으로 알려져 있다(문헌[Lau 등, *J Exp Med* 202(9): 1171-1177, 2005]; 문헌[Qin 등, *J Immunol* 199(1): 72-81, 2017]). 무균 염증이 손상적 공격 후 조직 수선 및 재생에 필수적인 역할을 하여 조직 항상성을 재확립하긴 하지만, 반복된 조직 손상으로 인하거나 조직에 존재하는 내재-면역 촉발제의 과다존재(overabundance)에 반응하여 해결되지 않은 만성 염증은 숙주에게 유해하고, 암을 포함한 무균 염증성 질환, 대사 장애(예를 들어, 당뇨병), 신경퇴행성 질환(예를 들어, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환), 및 자가면역 질환(예를 들어, 다발성 경화증)을 유발할 수 있다(문헌[Roh 등, *Immune Netw* 18(4): e27, 2018]).
- [0014] 인플라마솜(inflammasome)은 세포기질 패턴-인식 수용체, 카스파제 모집 도메인을 함유하는 어댑터 단백질 세포자멸사-관련 스펙(Speck)-유사 단백질(ASC), 및 카스파제-1을 포함하는 큰 다량체성 단백질 복합체이다(문헌[Lamkanfi 등, *Cell* 157(5): 1013-1022, 2014]). 내재성 면역 세포 및 다른 세포에서 이들의 조립은 여러 가지 자극에 의해 유발되고, 카스파제-1의 활성화에 이르며, 이는 그 후에 전구(pro)-IL-1 β 를 IL-1 β 로 절단한다(문헌[Latz 등, *Nat Rev Immunol* 13(6): 397-411, 2013]; 문헌[Walsh 등, *Nat Rev Neurosci* 15(2): 84-97, 2014]). 현재까지, 다양한 인플라마솜이 발견되었다. 식별된 다양한 인플라마솜 중에서, 뉴클레오타이드-결합 올리고머화 도메인, 류신-풍부 반복부-함유 수용체(NLR) 계열 피린 도메인-함유 3(NLRP3) 인플라마솜이 가장 잘 특징화되어 있다(문헌[Swanson 등, *Nat Rev Immunol* 19(8): 477-489, 2019]). NLR은 병원체 및 위험 신호의 핵심 센서로서 인식된다. NLRP3 인플라마솜은 2-단계 활성화 기전을 갖는다: 전구-IL-1 β 및 NLRP3의 유도를 수반하는 "프라이밍", 및 PAMP 또는 DAMP의 흡수(uptake) 후 기능적 인플라마솜 복합체가 조립되는 "활성화". 알츠하이머 질환(문헌[Heneka 등, *Nature* 493(7434): 674-678, 2013]), 파킨슨 질환(문헌[Heneka 등, *Nat Rev Neurosci* 19(10): 610-621, 2018]), 및 아테롬성 동맥경화증(문헌[Jin 등, *J Am Heart Assoc* 8(12): e012219, 2019))을 포함한 다양한 질환의 병상은 NLRP3 인플라마솜의 과다활성화와 연관되어 있다.
- [0015] 무균 염증은 또한 노쇠(senescent) 세포의 축적으로부터 비롯될 수 있다. 세포 노쇠는, 세포 스트레스에 반응하여 발생하고 다음 세대로의 결합의 전파를 방지하는 비가역적인 세포 주기 억제로서 정의된다(문헌[Collado 등, *Nat Rev Cancer* 10(1): 51-57, 2010]; 문헌[McHugh 등, *J Cell Biol* 217(1): 65-77, 2018]). 세포 노쇠는 발달, 조직 항상성, 및 상처 치유의 과정에서 주요한 보호 역할을 한다(문헌[Munoz-Espin 등, *Cell* 155(5): 1104-1118, 2013]; 문헌[Storer 등, *Cell* 155(5): 1119-1130, 2013]; 문헌[Demaria 등, *Dev Cell* 31(6): 722-733, 2014]; 문헌[Yun 등, *Elife* 4, 2015]). 세포 노쇠는 전염증성 표현형에 의해 동반된다. 표현형은 노쇠-관련 분비 표현형(SASP: senescence-associated secretory phenotype)으로 지칭된다(문헌[McHugh 등, *J Cell Biol* 217(1): 65-77, 2018]). SASP는 염증성 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 프로테아제의 방출을 특징으로 한다. 이는 자가분비(autocrine) 및 측분비(paracrine) 신호전달을 통해 세포 노쇠를 강화하고, 면역 세포를 모집하고 노쇠 세포를 제거하도록 지시한다. 그러므로, 세포 노쇠 및 SASP는 세포 수준, 조직 수준 및 기관 수준에서 항상성을 유지하는 필수적인 생리학적 반응이다. 그러나, 지속적인 손상 시 또는 노화 동안, 노쇠 세포 제거는 약화되고, 기능장애 세포가 축적된다. 이들 제거되지 않고 축적된 노쇠 세포로부터의 SASP는 염증성 인자의 오래 지속되는(protracted) 만성 공급원이며, 다양한 범위의 병리학적 발현을 초래하는 염증성 미세환경을 만든다(문헌[Munoz-Espin 등, *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(7): 482-496, 2014]; 문헌[van Deursen, *Nature* 509(7501): 439-446, 2014]; 문헌[McHugh 등, *J Cell Biol* 217(1): 65-77, 2018]). 이에 더하여, 일부 SASP 인자는 인플라마솜-함유 세포를 프라이밍하며, 이는 만성 인플라마솜 활성화를 복돋아 무균 염증을 유도하는 위험을 증가시킨다.
- [0016] 조절 T(Treg) 세포는 말초 관용(peripheral tolerance) 및 숙주에서 자기-항원과 비-자기-항원에 대한 전반적인 면역조절 잠재성의 필수적인 매개자이다(문헌[Sakaguchi 등, *Cell* 133(5): 775-787, 2008]; 문헌[Sakaguchi 등, *Annu Rev Immunol* 38: 541-566, 2020]). Treg 세포는 다수의 억제성 기전을 통해 이러한 면역조절 제어를 달성한다. 이들은 CTLA-4에의 고-친화도 결합을 통한 항원-제시 세포로부터의 공동-자극성 분자의 획득, IL-2 부족(deprivation) 및 저해성 사이토카인(즉, IL-10 및 TGF- β)의 분비를 포함한다(문헌[Oberle 등, *J Immunol* 179(6): 3578-3587, 2007]; 문헌[Tang 등, *Nat Immunol* 9(3): 239-244, 2008]; 문헌[Zheng 등, *J Immunol* 181(3): 1683-1691, 2008]). 아데노신 트리포스페이트(ATP)-아데노신 경로가 또한, 조절 Treg에 의해 내재성 및 적응 면역의 핵심 조절자로서 활용된다. CD39는 면역 세포(예를 들어, Treg), 내피 세포 및 중양 세포 상에

서 광범위하게 발현되는 우세한 엑토-뉴클레오티다제이며, ATP 및 아데노신 디포스페이트(ADP)를 아데노신 모노포스페이트(AMP)로 가수분해한다(문헌[Moesta 등, *Nat Rev Immunol* 20(12): 739-755, 2020]). 그 후에, AMP는 CD73에 의해 아데노신으로 가수분해된다. 아데노신은 면역 세포 상에서 표시되는 이의 수용체 A1, A2A, A2B, 및 A3에 결합한다. A2A 수용체 및 A2B 수용체(A2AR 및 A2BR)는 세포내 cAMP 및 PKA 수준을 증가시키는 Gs-결합 수용체로서, 아데노신-유도 면역억제에서 cAMP-의존적 방식으로 우세한 역할을 한다. A1 수용체 및 A3 수용체(A1R 및 A3R)는 세포 활성화를 선호하는 세포내 cAMP를 저하시키는 Gi/o-결합 수용체이며, 따라서 일반적으로 면역-촉진성 아데노신 수용체로서 여겨진다. 인간에서, A1R, A2AR 및 A3R은 아데노신에 대해 높은 친화도를 표시하는 반면, A2BR은 유의하게 더 낮은 친화도를 갖는다. A2A 및 A2BR은 면역 세포 상에서 발현된다(문헌[Feng 등, *Cancer Cell Int* 20: 110, 2020]). 최근, 인간 CD39^{hi} 조절 T 세포는 염증성 조건 하에 더 강한 안정성, 더 높은 Foxp3 발현, 및 억제성 능력을 나타내는 것으로 제시되었다(문헌[Gu 등, *Cell Mol Immunol* 14(6): 521-528, 2017]). Treg 세포 발달, 항상성 또는 기능에서의 변경은 이들 세포가 알레르기, 자가면역, 이식 거부, 암, 및 면역요법에 대한 반응을 포함한 여러 가지 질환 병태에 대한 소인을 갖게 할 수 있다(문헌[Sakaguchi 등, *Annu Rev Immunol* 38: 541-566, 2020]). 현재의 연구는 내인성 Treg 세포 증식 또는 활성화를 지지하기 위한 사이토카인 및 저분자량 약물, 자가면역의 설정에서 면역조절을 촉진하기 위한 자가 입양 세포 요법(ACT)에서 생체의 조작된 Treg 세포, 또는 알레르기성 염증에서 반응을 강화시키기 위한 키메라 항원 수용체 Treg(CAR-Treg) 세포를 포함한 항원-특이적 Treg 세포의 사용을 통해 생체내에서 Treg 세포 기능을 증강시키는 신규 요법을 개발하는 데 초점을 맞춰져 있다(문헌[Ferreira 등, *Nat Rev Drug Discov* 18(10): 749-769, 2019]). 본 발명은 Treg 세포를 사용하여 인플라마즘을 탈활성화시킨 다음, 후속적으로 하나 이상의 면역치료제에 의해 활성화된 면역 세포를 사용하여 개체에서 축적된 노쇠 세포를 감소시켜 염증-노화 및/또는 임의의 노화-관련 병상을 치료하는 방법이다. 인플라마즘 관련 질환을 저해하고 노쇠 관련 질환을 저해하는 방법이 제공된다. Treg 세포는 ACT 설정에 사용되는 생체의 조작된 Treg 세포 또는 생체내 증강된 내인성 Treg 세포일 수 있다. 노쇠-세포 제거를 위한 면역 세포는 생체내에서 면역치료제에 의해 활성화되거나 생체의 자극 및 확장 방법에 의해 생성되어 ACT 투여를 지지할 수 있을 것이다. 본 발명은, 가용성 조직 인자 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 가용성 조직 인자 도메인을 CD3/CD28-결합체 또는 IL-2 수용체-활성화제와 조합하여 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드가 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 데 효과적이라는 발견에 기초한다. 이러한 발견에 기초하여, Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 Treg 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는 CD3/CD28-결합체; 및 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 IL-2에 대한 수용체에 결합한다.

[0017] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2

표적-결합 도메인은 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 가용성 IL-2를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 IL-2는 인간 가용성 IL-2이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 각각 SEQ ID NO: 1과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 각각 SEQ ID NO: 1과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 각각 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증

식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 항-CD3/항-CD28 비드이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 1:1 내지 약 6:1 비드/세포의 비(ratio)로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 3:1 내지 약 5:1 비드/세포의 비로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인과 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3은 인간 CD3이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD28은 인간 CD28이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열

을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.

[0018] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3/CD28 결합체는, (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합한다.

- [0019] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함한다.
- [0020] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인과 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다.
- [0021] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3은 인간 CD3이다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함한다.
- [0022] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인이다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0023] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.
- [0024] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에

상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

[0025] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104의 서열을 포함한다.

[0026] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD28은 인간 CD28이다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108의 서열을 포함한다.

[0027] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.

[0028] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, mTOR 저해제는 라파마이신이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM의 mTOR 저해제를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 mTOR 저해제를 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 포함하지 않는다.

[0029] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 소정의 기간의 시작 후 36시간 내지 약 60시간 후마다, 액체 배양 배지에 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약

500 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 50 nM 내지 약 150 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 소정의 기간의 시작 후 약 6일 내지 약 8일 후마다, 액체 배양 배지에 CD3/CD28-결합제를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 15일 내지 약 25일이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 단계 후에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0030] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단리는 형광-분류 세포 선별(fluorescence-assorted cell sorting)의 사용을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 말초 혈액 또는 체대혈로부터 분리되는 자가 T_{reg} 세포, 동일단배체 T_{reg} 세포, 또는 동종이계 T_{reg} 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체를 포함한다.

[0031] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 T_{reg} 세포의 집단이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 임의의 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 또한 본원에 제공되며, 치료적 유효량의 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 임의의 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 임의의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단되었다. 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 낭포성 섬유증, 폐장염 중 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간관 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방질 위축, 지방이영양증, 아테롬성 동맥경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골 질량 손실, 심근 경색, 근감소증, 상처 치유, 탈모, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 폐 조직 탄성의 노화-관련 손실, 황반 변성, 약액질, 사구체경화증, 간경변, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측색 경화증, 헌팅턴 질환, 척수소뇌 실조증, 다발성 경화증, 신경퇴행, 뇌졸중, 치매, 혈관 질환, 감염 감수성, 만성 염증, 및 신장 기능장애로 이루어진 군으로부터 선택된다. 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스(lupus erythematosus), 루푸스 신염(lupus nephritis), 당뇨병성 신증(diabetic nephropathy), CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측색 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 건선, 그레이브스 질환, 폐양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 또 다른 양태에서, 하기를 포함하는 키트가 본원에 제공된다: (i) CD3/CD28-결합제; (ii) 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드로서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 IL-2에 대한 수용체에 결합함; 및 (iii) mTOR 저해제. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, 키트는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자

도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 항-CD3/항-CD28 비드이다. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, 키트는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다.

[0033] 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, CD3/CD28 결합체는, (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합한다. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다.

[0034] 또 다른 양태에서, T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 T_{reg} 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는 IL-2 수용체-활성화제; 및 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하며, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3은 인간 CD3이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD28은 인간 CD28이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된

T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IL-2 수용체-활성화제는 가용성 IL-2이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 IL-2는 인간 가용성 IL-2이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시

키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 인간 가용성 IL-2는 SEQ ID NO: 1과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 인간 가용성 IL-2는 SEQ ID NO: 1과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 인간 가용성 IL-2는 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 100 IU/mL 내지 약 800 IU/mL의 인간 가용성 IL-2를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 400 IU/mL 내지 약 600 IU/mL의 인간 가용성 IL-2를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, mTOR 저해제는 라파마이신이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM의 mTOR 저해제를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 mTOR 저해제를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 포함하지 않는다.

[0035] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 소정의 기간의 시작 후 36시간 내지 약 60시간 후마다, 액체 배양 배지에 IL-2 수용체-활성화제를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IL-2 수용체-활성화제의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 IL-2 수용체-활성화제의 농도를 초래하도록 수행된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IL-2 수용체-활성화제의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 50 nM 내지 약 150 nM의 IL-2 수용체-활성화제의 농도를 초래하도록 수행된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 소정의 기간의 시작 후 약 6일 내지 약 8일 후마다, 액체 배양 배지에 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 15일 내지 약 25일이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 단계 후에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0036] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단리는 형광-분류 세포 선별의 사용을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 말초 혈액 또는 제대혈로부터 분리되는 자가 T_{reg} 세포, 동일단배체 T_{reg} 세포, 또는 동종이계 T_{reg} 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체를 포함한다.

[0037] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 T_{reg} 세포의 집단이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 임의의 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 또한 본원에 제공되며, 치료적 유효량의 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 임의의 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포

합하는 임의의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단되었다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 낭포성 섬유증, 췌장염 중 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간판 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방질 위축, 지방이영양증, 아테롬성 동맥 경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골 질량 손실, 심근 경색, 근감소증, 상처 치유, 탈모, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 폐 조직 탄성의 노화-관련 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간경변, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측색 경화증, 헌팅턴 질환, 척수소뇌 실조증, 다발성 경화증, 신경퇴행, 뇌졸중, 치매, 혈관 질환, 감염 감수성(infection susceptibility), 만성 염증, 및 신장 기능장애로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측색 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 궤양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0038] 또 다른 양태에서, 하기를 포함하는 키트가 본원에 제공된다: (i) 인터류킨-2 수용체-활성화제; (ii) 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드로서, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합함; 및 (iii) mTOR 저해제. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, 키트는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다.

[0039] 또 다른 양태에서, T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 T_{reg} 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는 CD3/CD28-결합제; 및 (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인은 제1 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 키메라 폴리펩타이드에서 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인과 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인은 제1 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 키메라 폴리펩타이드에서 가용성 조직 인자 도메인과 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인과 제2 표적-결합 도메인은 제2 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 상기 제2 키메라 폴리펩타이드에서 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인과 제2

표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 동일한 항원에 특이적으로 결합한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 상이한 항원에 특이적으로 결합한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 항원-결합 도메인이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인과 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적에 특이적으로 결합한다: CD16a, CD28, CD3, CD33, CD20, CD19, CD22, CD123, IL-1R, IL-1, VEGF, IL-6R, IL-4, IL-10, PDL-1, TIGIT, PD-1, TIM3, CTLA4, MICA, MICB, IL-6, IL-8, TNF α , CD26, CD36, ULBP2, CD30, CD200, IGF-1R, MUC4AC, MUC5AC, Trop-2, CMET, EGFR, HER1, HER2, HER3, PSMA, CEA, B7H3, EPCAM, BCMA, P-카드헤린, CEACAM5, UL16-결합 단백질, HLA-DR, DLL4, TYRO3, AXL, MER, CD122, CD155, PDGF-DD, TGF- β 수용체 II(TGF- β RII)의 리간드, TGF- β RIII의 리간드, DNAM-1의 리간드, NKp46의 리간드, NKp44의 리간드, NKG2D의 리간드, NKp30의 리간드, scMHCI에 대한 리간드, scMHCII에 대한 리간드, scTCR에 대한 리간드, IL-1에 대한 수용체, IL-2에 대한 수용체, IL-3에 대한 수용체, IL-7에 대한 수용체, IL-8에 대한 수용체, IL-10에 대한 수용체, IL-12에 대한 수용체, IL-15에 대한 수용체, IL-17에 대한 수용체, IL-18에 대한 수용체, IL-21에 대한 수용체, PDGF-DD에 대한 수용체, 줄기세포 인자(SCF)에 대한 수용체, 줄기세포-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L)에 대한 수용체, MICA에 대한 수용체, MICB에 대한 수용체, ULP16-결합 단백질에 대한 수용체, CD155에 대한 수용체, CD122에 대한 수용체, 및 CD28에 대한 수용체. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 단백질이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인터류킨, 사이토카인, 또는 리간드 단백질은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: IL-1, IL-2, IL-3, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, PDGF-DD, SCF, 및 FLT3L. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 수용체이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 수용체는 가용성 TGF- β 수용체 II(TGF- β RII), 가용성 TGF- β RIII, 가용성 NKG2D, 가용성 NKp30, 가용성 NKp44, 가용성 NKp46, 가용성 DNAM-1, scMHCI, scMHCII, scTCR, 가용성 CD155, 또는 가용성 CD28이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인(들)을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 친화도 도메인 쌍은 인간 IL-15 수용체의 알파 사슬(IL15R α) 및 가용성 IL-15로부터의 스시 도메인(sushi domain)이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 IL-15는 D8N 또는 D8A 아미노산 치환을 갖는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 친화도 도메인 쌍은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 바르나제(barnase)와 바르스타(barnstar), PKA 및 AKAP, 돌연변이화된 RNase I 단편에 기초한 어댑터/도킹 태그 모듈, 및 단백질 신택신(syntaxin), 시냅토타그민(synaptotagmin), 시냅토프레빈(synaptobrevin), 및 SNAP25의 상호작용에 기초한 SNARE 모듈. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현

예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 항-CD3/항-CD28 비드이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 1:1 내지 약 6:1 비드/세포의 비 (ratio)로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 3:1 내지 약 5:1 비드/세포의 비로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인과 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3은 인간 CD3이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세

포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD28은 인간 CD28이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적

어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.

[0040] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3/CD28 결합제는, (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합한다.

[0041] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함한다.

[0042] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인과 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다.

[0043] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD3은 인간 CD3이다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5의 서열을 포함한다.

[0044] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인이다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드

드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

- [0045] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.
- [0046] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극하거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.
- [0047] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는다.
- [0048] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104의 서열을 포함한다.
- [0049] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, CD28은 인간 CD28이다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함한다.
- [0050] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106의 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키

메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108의 서열을 포함한다.

[0051] 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM의 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM의 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.

[0052] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, mTOR 저해제는 라파마이신이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM의 mTOR 저해제를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 mTOR 저해제를 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 소정의 기간의 시작 후 36시간 내지 약 60시간 후마다, 액체 배양 배지에 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약 500 nM의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 50 nM 내지 약 150 nM의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 소정의 기간의 시작 후 약 6일 내지 약 8일 후마다, 액체 배양 배지에 CD3/CD28-결합제를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 15일 내지 약 25일이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 단계 후에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 Treg 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0053] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 분리는 형광-분류 세포 선별의 사용을 포함한다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 말초 혈액 또는 체대혈로부터 분리되는 자가 T_{reg} 세포, 동일단배체 T_{reg} 세포, 또는 동종이계 T_{reg} 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} 세포이다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체를 포함한다.

[0054] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 T_{reg} 세포의 집단이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 임의의 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 또한 본원에 제공된다. 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 치료적 유효량의 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시

키거나 증가시키는 임의의 방법에 의해 생성되는 임의의 T_{reg} 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 임의의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단되었다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 낭포성 섬유증, 폐장염 중 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간관 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방질 위축, 지방이영양증, 아테롬성 동맥 경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골 질량 손실, 심근 경색, 근감소증, 상처 치유, 탈모, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 폐 조직 탄성의 노화-관련 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간경변, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측색 경화증, 헌팅턴 질환, 척수소뇌 실조증, 다발성 경화증, 신경퇴행, 뇌졸중, 치매, 혈관 질환, 감염 감수성, 만성 염증, 및 신장 기능장애로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측색 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 췌양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0055] 또 다른 양태에서, 키트가 본원에 제공되며: CD3/CD28-결합제; (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드; 및 mTOR 저해제를 포함하고, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인의 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합된다. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, 키트는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제는 항-CD3/항-CD28 비드이다. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다. 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, 키트는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다.

[0056] 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, CD3/CD28 결합제는, (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합한다.

[0057] 본원에 기재된 임의의 키트의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 추가 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다.

[0058] 또 다른 양태에서, 대상체로부터 수득된 시료로부터 Treg 세포를 분리하는 방법이 본원에 제공되며, 이의 CD39의 발현에 기초하여 시료로부터 Treg 세포를 분리하여 Treg 세포를 분리하는 단계를 포함한다.

[0059] 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 방법은 CD39를 발현하는 Treg 세포에 항체 또는 리간드가 결합하게 하는 조건 하에, CD39에 결합할 수 있는 항체 또는 리간드와 시료를 혼합하는 단계; 항체 또는 리간드에 결합된 Treg 세포를 시료 내 다른 구성요소로부터 분리하여 Treg 세포를 분리하는 단계를 포함한다.

[0060] 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 항체는 마우스, 인간화, 또는 인간 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고/또는 항체 또는 리간드는 비오티, 아비딘, 스트렙타비딘, 또는 형광단 중 적어도 하나로 표지되거나, 입자, 비드, 수지, 또는 고체 지지체에 결합된다. 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 분리는 유세포측정법, 형광-활성화된 세포 선별(FACS), 원심분리, 또는 컬럼, 플레이트, 입자, 또는 비드-기초 방법의 사용을 포함한다.

- [0061] 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 방법은 Treg 세포에 항체 또는 리간드가 결합하게 하는 조건 하에, CD39에 결합할 수 있는 비오틴화된 항체 또는 리간드와 시료를 혼합하는 단계; 스트렙타비딘-코팅된 자성 입자를 사용하여, 비오틴화된 항체 또는 리간드에 결합된 Treg 세포를 포착하는 단계; 자석을 사용하여, 자성 입자-결합된 Treg 세포를 분리하는 단계; 자성 입자-결합된 Treg 세포를 세척하여 시료 내 다른 구성요소를 제거하는 단계; 및 자석으로부터 자성 입자-결합된 Treg 세포를 용액 내로 방출시켜 Treg 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0062] 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, Treg 세포는 신선한 또는 냉동된 말초 혈액, 제대혈, 말초 혈액 단핵 세포, 림프구, $CD4^+$ T 세포 또는 Treg 세포를 포함하는 시료로부터 분리되는 자가 Treg 세포, 동일단백체 Treg 세포, 또는 동종이계 Treg 세포이다. 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, Treg 세포는 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 세포이다. 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, Treg 세포는 $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ 세포이다. 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, Treg 세포는 키메라 항원 수용체를 포함한다. 본원에 기재된 Treg 세포를 분리하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, Treg 세포는 시험관내에서 그리고 생체내에서 면역억제성이다.
- [0063] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 임의의 하나의 방법에 의해 생성된 분리된 Treg 세포의 집단이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 임의의 분리된 Treg 세포의 집단의 일부 구현예에서, 분리된 Treg 세포의 집단은 70% 초과 $CD39^+$ 세포이다. 본원에 기재된 임의의 분리된 Treg 세포의 집단을 확장시키는 방법이 또한 제공되며, 분리된 Treg 세포의 증식을 가능하게 하는 조건 하에 분리된 Treg 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함한다.
- [0064] 본원에 기재된 임의의 분리된 Treg 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 또한 본원에 제공된다.
- [0065] 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 또한 본원에 제공되며, 치료적 유효량의 본원에 기재된 임의의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단되었다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 낭포성 섬유증, 폐장염 중 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 중간관 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방질 위축, 지방이영양증, 아테롬성 동맥경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골 질량 손실, 심근 경색, 근감소증, 상처 치유, 탈모, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 폐 조직 탄성의 노화-관련 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간 경변, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측색 경화증, 헌팅턴 질환, 척수소뇌 실조증, 다발성 경화증, 신경퇴행, 뇌졸중, 치매, 혈관 질환, 감염 감수성, 만성 염증, 및 신장 기능장애로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 기재된 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측색 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 궤양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0066] 본원에 사용된 용어 "키메라"는 2개의 상이한 공급원(예를 들어, 동일하거나 상이한 종으로부터의 예를 들어, 2개의 상이한 천연-발생 단백질)으로부터 원래 유래된 아미노산 서열(예를 들어, 도메인)을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 예를 들어, 키메라 폴리펩타이드는 적어도 2개의 상이한 천연-발생 인간 단백질로부터의 도메인을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 키메라 폴리펩타이드는 합성 서열(예를 들어, scFv)인 도메인 및 천연-발생 단백질(예를 들어, 천연-발생 인간 단백질)로부터 유래된 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키메라 폴리펩타이드는 합성 서열인 적어도 2개의 상이한 도메인(예를 들어, 2개의 상이한 scFv)을 포함할 수 있다.
- [0067] "항원-결합 도메인"은 하나 이상의 단백질 도메인(들)(예를 들어, 하나 이상의 상이한 항원(들)에 특이적으로 결합할 수 있는 단일 폴리펩타이드로부터의 아미노산으로부터 형성되거나 2개 이상의 폴리펩타이드(예를 들어, 동일하거나 상이한 폴리펩타이드)로부터의 아미노산으로부터 형성됨)이다. 일부 예에서, 항원-결합 도메인은 천연-발생 항체와 유사한 특이성 및 친화도로 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 도메인은 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 도메인은 대안적인 스캐폴드(alternative scaffold)를 포함할 수 있다. 항원-결합 도메인의 비제한적인 예는 본원에 기재된다. 항원-결합 도메인의 추가 예는 당업계에 알려져 있다.

- [0068] "가용성 조직 인자 도메인"은 막관통 도메인 및 세포내 도메인이 결여된 야생형 포유류 조직 인자 단백질(예를 들어, 야생형 인간 조직 인자 단백질)의 분절과 적어도 70% 동일성(예를 들어, 적어도 75% 동일성, 적어도 80% 동일성, 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 99% 동일성, 또는 100% 동일성)의 분절을 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다. 가용성 조직 인자 도메인의 비제한적인 예는 본원에 기재된다.
- [0069] 용어 "항체"는 본원에서 이의 가장 넓은 의미로 사용되고, 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항원-결합 도메인을 포함하는 소정의 유형의 면역글로불린 분자를 포함한다. 항체는 예를 들어, 무손상(intact) 항체(예를 들어, 무손상 면역글로불린), 항체 단편, 및 다중-특이적 항체를 특이적으로 포함한다. 항원-결합 도메인의 일례는 VH -VL 이량체에 의해 형성되는 항원-결합 도메인이다. 항체의 추가 예는 본원에 기재되어 있다. 항체의 추가 예는 당업계에 알려져 있다.
- [0070] "친화도"는 항원-결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원 또는 에피토프) 사이의 비-공유 상호작용의 총 합계의 강도를 지칭한다. 다르게 제시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이, "친화도"는 내인성 결합 친화도를 지칭하며, 이는 항원-결합 도메인의 구성원과 항원 또는 에피토프 사이의 1:1 상호작용을 반영한다. 분자 X의 파트너 Y에 대한 상기 분자 X의 친화도는 해리 평형 상수(K_D)에 의해 표시될 수 있다. 해리 평형 상수에 기여하는 동역학 구성요소는 하기에서 더욱 상세히 기재된다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하여 당업계에 알려진 보편적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 친화도는 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술(예를 들어, BIACORE®) 또는 생물층 간섭계(biolayer interferometry)(예를 들어, FORTEBIO®)를 사용하여 결정될 수 있다. 항원-결합 도메인 및 이의 상응하는 항원 또는 에피토프에 대한 친화도를 결정하는 추가 방법은 당업계에 알려져 있다.
- [0071] 본원에 사용된 "단일-사슬 폴리펩타이드"는 단일 단백질 사슬을 지칭한다.
- [0072] 본원에 사용된 바와 같이 "다중-사슬 폴리펩타이드"는 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 단백질 사슬(예를 들어, 적어도 제1 키메라 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드)을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭하며, 이때, 2개 이상의 단백질 사슬은 비-공유 결합을 통해 회합되어, 4차 구조를 형성한다.
- [0073] 용어 "에피토프"는 항원-결합 도메인에 특이적으로 결합하는 항원의 일부를 의미한다. 에피토프는 예를 들어, 표면-접근 가능한 아미노산 잔기 및/또는 당(sugar) 측쇄로 구성될 수 있고, 특이적인 3-차원 구조 특징, 뿐만 아니라 특이적인 전하 특징을 가질 수 있다. 형태적 에피토프 및 비-형태적 에피토프는, 상기 비-형태적 에피토프가 아니라 형태적 에피토프가 변성 용매의 존재 하에 소실될 수 있다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접적으로 관여하는 아미노산 잔기, 및 결합에 직접적으로 관여하지 않는 다른 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 항원-결합 도메인이 결합하는 에피토프를 식별하는 방법은 당업계에 알려져 있다.
- [0074] 용어 "치료"는 장애의 적어도 하나의 증상을 호전시키는 것을 의미한다. 일부 예에서, 치료되는 장애는 암이고, 암의 적어도 하나의 증상을 호전시키는 것은 인자의 비정상적인 증식, 유전자 발현, 신호화, 번역, 및/또는 분비를 감소시키는 것을 포함한다. 일반적으로, 치료 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체 또는 이러한 치료를 필요로 하는 것으로 결정되었던 대상체에게 장애의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 치료적 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0075] 용어 "CD3/CD28-결합제"는 포유류 세포(예를 들어, T 세포, 예컨대 T_{reg} 세포)의 표면 상의 CD3과 CD28 둘 다에 특이적으로 결합하고 포유류 세포에서 다운스트림 신호전달을 유도하는 체제를 의미한다. CD3/CD28-결합제의 비제한적인 예는 본원에 기재되어 있다.
- [0076] 용어 "IL-2 수용체 활성화제"는 포유류 세포(예를 들어, T 세포, 예컨대 T_{reg} 세포)의 표면 상에 존재하는 IL-2 수용체에 특이적으로 결합하고 포유류 세포에서 다운스트림 신호전달을 유도하는 체제를 의미한다. IL-2 수용체 활성화제의 비제한적인 예는 본원에 기재되어 있다.
- [0077] 용어 "IgG1 항체 작제물"은 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인)에 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인 및 적어도 하나의 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 단일 사슬 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 폴리펩타이드를 의미한다. IgG1 항체 작제물의 비제한적인 예는 본원에 기재되어 있다.
- [0078] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속한 당업계의 숙련자에 의해 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 방법 및 물질은 본 발명에 사용하기 위해 본원에 기재되고; 당업계에 알려진 다른 적합한 방법 및 물질 또한 사용될 수 있다. 물질, 방법, 및 실시예는 예시적인

뿐이고, 제한하려는 것이 아니다. 본원에서 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 엔트리, 및 다른 참조문헌은 그 전체가 참조로서 포함된다. 상충하는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 제어할 것이다.

[0079] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 도면으로부터, 그리고 청구항으로부터 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 (1) 2t2, CD3/CD28 비드, 및 라파마이신 또는 (2) 재조합 인간 IL-2, CD3/CD28 비드, 및 라파마이신을 사용한 Foxp3^+ T_{reg} 세포의 확장을 도시하는 다이어그램이다.

도 2의 A 내지 I는 (1) 2t2, CD3/CD28 비드, 및 라파마이신 또는 (2) 재조합 인간 IL-2, CD3/CD28 비드, 및 라파마이신으로 T_{reg} 세포를 자극한 후 헬리오스(Helios)⁺, CTLA-4⁺, CD39⁺, CD62L⁺, CD25⁺, CD103⁺, CD69⁺, PD1⁺, 및 CD49b⁺ 마커의 증가를 도시하는 다이어그램이다.

도 3a 내지 도 3d는 (1) 2t2, CD3/CD28 비드, 및 라파마이신, 또는 (2) 재조합 인간 IL-2, CD3/CD28 비드, 및 라파마이신으로 인간 T_{reg} 세포를 활성화시킬 때의 포도당 대사 수준을 도시하는 다이어그램이다. 도 3a는 T_{reg} 세포의 해당작용 수준을 도시한다. 도 3b는 T_{reg} 세포의 해당작용 용량의 수준을 도시한다. 도 3c는 T_{reg} 세포의 해당작용 비축량의 수준을 도시한다. 도 3d는 T_{reg} 세포의 비-해당작용 산성화의 수준을 도시한다.

도 4는 (1) 2t2, CD3/CD28 비드, 및 라파마이신, 또는 (2) 재조합 인간 IL-2, CD3/CD28 비드, 및 라파마이신으로 사전에 자극된 T_{reg} 세포에 의한 자가 T 반응자의 억제를 도시하는 다이어그램이다.

도 5는 T 반응자 세포 억제 검정에서 T_{reg} 세포에 의한 IL-10 분비 수준을 도시하는 다이어그램으로서, 상기 T_{reg} 세포는 (1) 라파마이신의 존재 또는 부재 하에 2t2 및 CD3/CD28 비드, 또는 (2) 라파마이신의 존재 또는 부재 하에 재조합 인간 IL-2 및 CD3/CD28 비드로 사전에 자극되었다.

도 6a 및 도 6b는 항-CD3scFv/TF/IL15D8N 돌연변이체(3t15*)를 포함하여 생성된 융합 단백질 및 항-CD28scFv/IL15R α Su(28s) 융합 단백질에 대한 예시적인 다이어그램을 도시한다.

도 7은 항-TF 항체 친화도 컬럼으로부터 면역친화도 크로마토그래피에 의한 3t15*-28s 정제 용리를 도시하는 그래프이다.

도 8은 3t15*-28s의 크기 배제 크로마토그래피 분석을 도시한다.

도 9는 항-TF 항체 친화도 크로마토그래피로부터 정제된 3t15*-28s의 SDS 겔을 도시한다. 레인 1: 3t15*-28s; 레인 2: SeeBlue Plus 2 사전염색된 표준(좌측의 숫자는 분자량을 킬로달톤으로 나타냄).

도 10a는 3t15*-28s와 CD28 사이의 상호작용을 도시하는 그래프이다.

도 10b는 3t15*-28s와 CD3 사이의 상호작용을 도시하는 그래프이다.

도 11은 2t2 및 3t15*-28s를 함유하는 배지에서 Foxp3^+ 조절 T 세포의 확장을 도시하는 그래프이다.

도 12는 항-TF 항체와 함께 또는 없이 2t2 및 3t15*-28s를 함유하는 배지에서 인큐베이션 후 증식중인 인간 면역 세포의 수준을 도시하는 그래프이다.

도 13a는 상이한 정제 체계로 분리된 CD39⁺ 조절 T 세포의 순도를 나타내는 유세포측정법 히스토그램을 도시한다.

도 13b는 항-CD39 Ab 시약을 사용하여 분리된 CD39⁺ 조절 T 세포의 순도를 나타내는 유세포측정법 히스토그램을 도시한다.

도 14는 상이한 방법으로 분리된 조절 T 세포와 함께 인큐베이션 후 T 반응자 세포 증식의 수준을 도시하는 막대 그래프를 도시한다.

도 15는 상이한 방법을 사용하여 분리된 T 조절 세포와 함께 인큐베이션 후 T 반응자 세포 증식(IL-10의 수준에 의해 평가된 바와 같음)을 도시하는 그래프를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0081] T_{reg} 세포(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 T_{reg} 세포)의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법, 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성되는 T_{reg} 세포, 임의의 이들 T_{reg} 세포 집단을 포함하는 조성물, 및 임의의 이들 T_{reg} 세포 집단 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0082] 조직 인자
- [0083] 인간 조직 인자는 3개의 도메인을 함유하는 263개-아미노산 막관통 단백질이다: (1) 219-아미노산 N-말단 세포외 도메인(잔기 1-219); (2) 22-아미노산 막관통 도메인(잔기 220-242); 및 (3) 21-아미노산 세포질 C-말단 테일(tail)(잔기 242-263)(UniProtKB 식별 번호: P13726). 세포질 테일은 Ser253 및 Ser258에서 2개의 인산화 부위 및 Cys245에서 하나의 S-팔미토일화 부위를 함유한다. 세포질 도메인의 결실 또는 돌연변이는 조직 인자 응고 활성에 영향을 미치는 것으로 밝혀지지 않았다. 조직 인자는 Cys245에서 단백질의 세포내 도메인에 하나의 S-팔미토일화 부위를 갖는다. Cys245는 세포내 도메인의 아미노산 말단에 그리고 막 표면에 근접하게 위치한다. 조직 인자 막관통 도메인은 단일-경유(single-spanning) α -나선으로 이루어진다.
- [0084] 2개의 피브로넥틴 III형 도메인으로 이루어진 조직 인자의 세포외 도메인은 6-아미노산 링커를 통해 막관통 도메인에 연결된다. 이 링커는 조직 인자 세포외 도메인을 이의 막관통 도메인 및 세포질 도메인으로부터 디커플링시키기 위해 형태적 가요성(flexibility)을 제공한다. 각각의 조직 인자 피브로넥틴 III형 모듈(module)은 3개의 역평행 β -가닥을 함유하는 상단(top) 시트 도메인 및 4개의 β -가닥을 함유하는 하단(bottom) 시트를 갖는 2개의 중첩 β 시트로 이루어진다. β -가닥은 가닥 βA 와 βB , βC 와 βD , 및 βE 와 βF 사이에서 β -루프에 의해 연결되며, 이들은 모두 2개의 모듈에서 형태가 보존된다. β -가닥을 연결하는 3개의 짧은 α -나선 세그먼트(segment)가 존재한다. 조직 인자의 독특한 특질은 가닥 $\beta 10$ 과 가닥 $\beta 11$ 사이의 17-아미노산 β -헤어핀이고, 이는 피브로넥틴 슈퍼패밀리의 공통 요소(common element)가 아니다. N-말단 도메인은 또한, C-말단 도메인에 존재하지 않고 조직 인자에 독특한 $\beta 6F$ 와 $\beta 7G$ 사이에 12-아미노산 루프를 함유한다. 이러한 피브로넥틴 III형 도메인 구조는 단백질 폴드(fold)의 면역글로불린-유사 패밀리의 특질이고, 광범위하게 다양한 세포외 단백질 중에서 보존된다.
- [0085] 자이모겐 FVII는 제한된 단백질분해에 의해 FVIIa로 신속하게 전환되어, 일단 이것이 조직에 결합하면 활성 조직 인자-FVIIa 복합체를 형성한다. 대략 0.1 nM(1%의 혈장 FVII)의 농도에서 효소로서 순환되는 FVIIa는 또한, 조직 인자에 직접적으로 결합할 수 있다. 조직 인자-FVIIa 복합체 상에서 조직 인자와 FVIIa 사이의 알로스테릭(allosteric) 상호작용은 FVIIa의 효소적 활성을 크게 증가시킨다: 작은 발색성(chromogenic) 펩티드 기질의 가수분해 속도에서 대략 20-배 내지 100-배 증가, 및 천연 거대분자 기질 FIX 및 FX의 활성화 속도에서 거의 100만-배 증가. 조직 인자에의 결합 시 FVIIa의 활성 부위의 알로스테릭 활성화와 협력하여, 인지질 이중층 상에서 조직 인자-FVIIa 복합체의 형성(즉, 막 표면 상에서 포스파티딜-L-세린의 노출 시)은 FIX 또는 FX 활성화 속도를 Ca^{2+} -의존적 방식으로 추가 1,000-배 증가시킨다. 자유 FVIIa와 비교하여 조직 인자-FVIIa-인지질 복합체에 의한 FX 활성화의 대략 100만-배 전체적 증가는 응고 캐스케이드에 대한 중요한 조절점이다.
- [0086] FVII는 N-말단 γ -카르복시글루타메이트-풍부(GLA) 도메인, 2개의 표피 성장 인자-유사 도메인(EGF1 및 EGF2), 및 C-말단 세린 프로테아제 도메인과 함께 406개 아미노산 잔기로 구성된 약 50 kDa, 단일-사슬 폴리펩타이드이다. FVII는 EGF2와 프로테아제 도메인 사이의 짧은 링커 영역에서 Ile¹⁵⁴-Arg¹⁵² 결합의 특이적인 단백질분해 절단에 의해 FVIIa로 활성화된다. 이러한 절단은 Cys¹³⁵ 및 Cys²⁶²의 단일 이황화 결합에 의해 함께 보유되는 경쇄 및 중쇄를 초래한다. FVIIa는 이의 N-말단 GLA-도메인을 통해 Ca^{2+} -의존적 방식으로 인지질 막에 결합한다. GLA 도메인에 대해 바로 C-말단에 방향족 스택(stack) 및 2개의 EGF 도메인이 있다. 방향족 스택은 단일 Ca^{2+} 이온에 결합하는 EGF1 도메인에 GLA를 연결한다. 이 Ca^{2+} -결합 부위의 점유(occupancy)는 FVIIa 아미도분해(amidolytic) 활성 및 조직 인자 회합을 증가시킨다. 촉매적 트리아드(triad)는 His¹⁹³, Asp²⁴², 및 Ser³⁴⁴로 구성되고, FVIIa 프로테아제 도메인 내에서 단일 Ca^{2+} 이온의 결합은 이의 촉매적 활성화에 중요하다. FVII 내지 FVIIa의 단백질분해 활성화는 Ile¹⁵³에서 새로 형성된 아미노 말단을 유리시켜(free) 다시 접히게 하고, Asp³⁴³의 카르복실레이트와 염 브릿지를 형성하는 활성화 포켓 내로 삽입되어 옥시음이온 정공(oxyanion hole)을 형성한다. 이 염 브릿지의 형성은 FVIIa 활성화에 중요하다. 그러나, 옥시음이온 정공 형성은 단백질분해 활성화 시 자유

(free) FVIIa에서 발생하지 않는다. 그 결과, FVIIa는 혈장 프로테아제 저해제에 의해 불량하게 인식되는 자이모젠-유사 상태로 순환되어, 이것이 대략 90분의 반감기로 순환할 수 있게 한다.

[0087] 막 표면 위에서 FVIIa 활성 부위의 조직 인자-매개 위치화는 FVIIa가 동족(cognate) 기질로 향하게 하는 데 중요하다. 자유 FVIIa는 막 표면 위의 약 80 Å에 위치한 이의 활성 부위와 함께 막에 결합될 때 안정하고 연장된 구조를 채택한다. FVIIa가 조직 인자에 결합할 때, FVa 활성 부위는 막에 약 6 Å 더 근접하게 재위치된다. 이러한 조절은 표적 기질 절단 부위와 함께 FVIIa 촉매적 트리아드의 적절한 정렬에 일조할 수 있다. GLA-도메인리스(domainless) FVIIa를 사용하여, 활성 부위는 막 위의 유사한 거리에서 여전히 위치해 있는 것으로 나타났으며, 이는 조직 인자가 심지어 FVIIa-막 상호작용의 부재 하에 FVIIa 활성 부위 위치화를 완전히 지지할 수 있음을 실증한다. 추가 데이터는, 조직 인자 세포의 도메인이 일부 방식으로 막 표면에 부착되는(tethered) 한, 완전 FVIIa 단백질분해 활성을 뒷받침하였음을 나타내었다. 그러나, FVIIa의 활성 부위를 막 표면 위에서 80 Å보다 더 크게 상승시키는 것은, 조직 인자-FVIIa 복합체가 FX를 활성화시키는 능력을 크게 감소시켰으나, 조직 인자-FVIIa 아미도분해 활성은 저하시키지 않았다.

[0088] 알라닌 스캐닝 돌연변이형성(mutagenesis)은 FVIIa와의 상호작용을 위한 조직 인자 세포의 도메인에서 특이적인 아미노산 측쇄의 역할을 평가하는 데 사용되어 왔다(문헌[Gibbs 등, *Biochemistry* 33(47): 14003-14010, 1994]; 문헌[Schulick 등, *J Biol Chem* 269(30): 19399-19403, 1994]). 알라닌 치환은, 알라닌 대체가 FVIIa 결합에 대해 5-배 내지 10-배 더 낮은 친화도를 야기하는 제한된 수의 잔기 위치를 식별하였다. 대부분의 이들 잔기 측쇄는 거대분자 리간드 상호작용과 화합하는 결정 구조 내 용매에 잘-노출되는 것으로 밝혀졌다. FVIIa 리간드-결합 부위는 2개의 모듈 사이의 경계에서 광범위한 영역에 걸쳐 위치한다. C-모듈에서, 돌출형(protruding) B-C 루프 상에 위치한 잔기 Arg¹³⁵ 및 Phe¹⁴⁰는 FVIIa와 독립적인 접촉을 제공한다. Leu¹³³은 핑거유사(fingerlike) 구조의 기부(base)에 위치하고, 2개의 모듈 사이의 틈(cleft) 내로 패킹(packed)된다. 이는 Lys²⁰, Thr⁶⁰, Asp⁵⁸, 및 Ile²²로 구성된 중요한 결합 잔기의 주요 클러스터(cluster)에 연속성(continuity)을 제공한다. Thr⁶⁰은 단지 부분적으로 용매-노출되고, 리간드와 유의한 접촉을 형성하기보다는 국소적인 구조적 역할을 할 수 있다. 결합 부위는 Glu²⁴ 및 Gln¹¹⁰, 그리고 잠재적으로는 더 원거리의 잔기 Val²⁰⁷을 수반하는 모듈간(intermodule) 각도의 오목한(concave) 측면 상으로 연장된다. 결합 영역은 Asp58로부터 Lys⁴⁸, Lys⁴⁶, Gln³⁷, Asp⁴⁴, 및 Trp⁴⁵에 의해 형성되는 볼록한(convex) 표면적 상으로 연장된다. Trp⁴⁵ 및 Asp⁴⁴은 FVIIa와 독립적으로 상호작용하며, 이는 Trp⁴⁵ 위치에서의 돌연변이 효과가 인접한 Asp⁴⁴ 및 Gln³⁷ 측쇄의 국소적인 패킹을 위한 이 측쇄의 구조적 중요성을 반영할 수 있음을 나타낸다. 상호적인 영역은 2개의 표면-노출된 방향족 잔기인 Phe⁷⁶ 및 Tyr⁷⁸을 추가로 포함하고, 이들 잔기는 N-모듈에서 소수성 클러스터의 일부를 형성한다.

[0089] 조직 인자-FVIIa의 기지의 생리학적 기질은 FVII, FIX, 및 FX 및 소정의 프로테이나제-활성화된 수용체이다. 돌연변이 분석은, 돌연변이화되었을 때 작은 펩티드 기질에 대한 완전 FVIIa 아미도분해 활성을 뒷받침하지만 거대분자 기질(즉, FVII, FIX, 및 FX) 활성화를 뒷받침하는 이들의 능력이 부족한 많은 잔기를 식별하였다(문헌[Ruf 등, *J Biol Chem* 267(31): 22206-22210, 1992]; 문헌[Ruf 등, *J Biol Chem* 267(9): 6375-6381, 1992]; 문헌[Huang 등, *J Biol Chem* 271(36): 21752-21757, 1996]; 문헌[Kirchhofer 등, *Biochemistry* 39(25): 7380-7387, 2000]). 잔기 159-165에서의 조직 인자 루프 영역, 및 이러한 가요성 루프 내의 또는 루프에 인접한 잔기는 조직 인자-FVIIa 복합체의 단백질분해 활성에 중요한 것으로 나타났다. 이는, FVIIa 활성 부위로부터 꽤 원 거리에 있는 조직 인자의 제안된 기질-결합 부위외(exosite) 영역을 한정한다(define). 미미하게 더 벌키한 잔기 알라닌에 의한 글리신 잔기의 치환은 조직 인자-FVIIa 단백질분해 활성을 유의하게 손상시킨다. 이는, 글리신에 의해 부여되는 가요성이 조직 인자 거대분자 기질 인식을 위해 잔기 159-165의 루프에 중요함을 시사한다.

[0090] 잔기 Lys¹⁶⁵ 및 Lys¹⁶⁶은 또한, 기질 인식 및 결합에 중요한 것으로 실증되었다. 이들 잔기로부터 알라닌으로의 돌연변이는 조직 인자 보조-인자 기능에서 유의한 저하를 초래한다. Lys¹⁶⁵ 및 Lys¹⁶⁶은 서로로부터 멀리 향하며, 이때 Lys¹⁶⁵은 대부분의 조직 인자-FVIIa 구조에서 FVIIa로 향하고, Lys¹⁶⁶은 결정 구조에서 기질 결합 부위의 영역으로 향한다. FVIIa의 Lys¹⁶⁵과 Glu³⁵ 사이의 추정상(putative) 염 브릿지 형성은, FVIIa의 GLA 도메인과의 조직 인자 상호작용이 기질 인식을 조절한다는 개념을 뒷받침할 것이다. 이들 결과는, 조직 인자 엑토도메인의 C-말단 부분이 FIX 및 FX의 GLA-도메인, 가능한 인접한 EGF1 도메인과 직접적으로 상호작용하며, FVIIa GLA-도메

인의 존재는 이들 상호작용을 직접적으로 또는 간접적으로 조절할 수 있음을 시사한다.

[0091] **다중-사슬 키메라 폴리펩타이드**

[0092] 세포 활성화제의 비제한적인 예는 (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 이때, 제1 키메라 폴리펩타이드 및 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합된다.

[0093] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 제1 표적-결합 도메인)과 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인)은 제1 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 상기 제1 키메라 폴리펩타이드에서 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 제1 표적-결합 도메인)과 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인) 사이에 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 링커 서열)을 추가로 포함한다.

[0094] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인)과 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 친화도 도메인 쌍의 임의의 예시적인 제1 도메인)은 제1 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 상기 제1 키메라 폴리펩타이드에서 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인)과 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 친화도 도메인 쌍의 임의의 예시적인 제1 도메인) 사이에 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 링커 서열)을 추가로 포함한다.

[0095] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 친화도 도메인 쌍의 임의의 예시적인 제2 도메인)과 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 제2 표적-결합 도메인)은 제2 키메라 폴리펩타이드에서 서로 직접적으로 인접해 있다. 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 상기 제2 키메라 폴리펩타이드에서 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 친화도 도메인 쌍의 임의의 예시적인 제2 도메인)과 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 제2 표적-결합 도메인) 사이에 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 링커 서열)을 추가로 포함한다.

[0096] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)과 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인) 중 하나 또는 둘 다는 하기의 군으로부터 선택되는 표적에 특이적으로 결합한다: CD16a, CD28, CD3, CD33, CD20, CD19, CD22, CD123, IL-1R, IL-1, VEGF, IL-6R, IL-4, IL-10, PDL-1, TIGIT, PD-1, TIM3, CTLA4, MICA, MICB, IL-6, IL-8, TNF α , CD26, CD36, ULBP2, CD30, CD200, IGF-1R, MUC4AC, MUC5AC, Trop-2, CMET, EGFR, HER1, HER2, HER3, PSMA, CEA, B7H3, EPCAM, BCMA, P-카드헤린, CEACAM5, UL16-결합 단백질, HLA-DR, DLL4, TYRO3, AXL, MER, CD122, CD155, PDGF-DD, TGF- β 수용체 II(TGF- β RII)의 리간드, TGF- β RIII의 리간드, DNAM1의 리간드, NKp46의 리간드, NKp44의 리간드, NKG2D의 리간드, NKp30의 리간드, scMHC I에 대한 리간드, scMHC II에 대한 리간드, scTCR에 대한 리간드, IL-1에 대한 수용체, IL-2에 대한 수용체, IL-3에 대한 수용체, IL-7에 대한 수용체, IL-8에 대한 수용체, IL-10에 대한 수용체, IL-12에 대한 수용체, IL-15에 대한 수용체, IL-17에 대한 수용체, IL-18에 대한 수용체, IL-21에 대한 수용체, PDGF-DD에 대한 수용체, 줄기세포 인자(SCF)에 대한 수용체, 줄기세포-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L)에 대한 수용체, MICA에 대한 수용체, MICB에 대한 수용체, ULP16-결합 단백질에 대한 수용체, CD155에 대한 수용체, CD122에 대한 수용체, 및 CD28에 대한 수용체.

[0097] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)과 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인) 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 단백질이다. 가용성 인터류킨 단백질 및 가용성 사이토카인 단백질의 비제한

적인 예는 하기를 포함한다: IL-1, IL-2, IL-3, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, PDGF-DD, 및 SCF.

[0098] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인과 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인) 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 단백질이다. 가용성 인터류킨 수용체 및 가용성 사이토카인 수용체의 비제한적인 예는 하기를 포함한다: 가용성 TGF- β 수용체 II(TGF- β RII), 가용성 TGF- β RIII, 가용성 NKG2D, 가용성 NKp30, 가용성 NKp44, 가용성 NKp46, 가용성 DNAM-1, scMHCI, scMHCII, scTCR, 가용성 CD155, 가용성 CD122, 가용성 CD3, 또는 가용성 CD28.

[0099] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 수용체이다. 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 가용성 수용체는 가용성 TGF- β 수용체 II(TGF- β RII), 가용성 TGF- β RIII, TNF α 에 대한 가용성 수용체, IL-4에 대한 가용성 수용체, 또는 IL-10에 대한 가용성 수용체.

[0100] 가용성 조직 인자 도메인

[0101] 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 신호 서열, 막관통 도메인 및 세포내 도메인이 결여된 야생형 조직 인자 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 조직 인자 돌연변이체일 수 있으며, 여기서, 야생형 조직 인자 폴리펩타이드는 신호 서열, 막관통 도메인, 및 세포내 도메인이 결여되어 있고, 선택된 아미노산에서 추가로 변형되었다. 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인일 수 있다. 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 마우스 조직 인자 도메인일 수 있다. 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 래트 조직 인자 도메인일 수 있다. 가용성 인간 조직 인자 도메인, 마우스 가용성 조직 인자 도메인, 래트 가용성 조직 인자 도메인, 및 돌연변이체 가용성 조직 인자 도메인의 비제한적인 예는 하기에 나타나 있다.

[0102] 예시적인 가용성 인간 조직 인자 도메인(SEQ ID NO: 2)

[0103] SGTNTVAAYNLTKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0104] 가용성 인간 조직 인자 도메인을 인코딩하는 예시적인 핵산(SEQ ID NO: 13)

[0105] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGACCAAGTCCGCGGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGGCATCTACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCGGGTGTTTGTAGTACCCCGCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTTCTCCGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGACCGTGAATAGGAAAAGACACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGCGAGTTCGGGGAG

[0106] 예시적인 가용성 마우스 조직 인자 도메인(SEQ ID NO: 14)

[0107] agipekafnlwtistdfktilewqpknpytytvqisdrsrwnknkfsttdtecdltdeivkdvtwayeakvlsvprnsvhgdgdlvihgeppfntapkfllpyrdtnlgqpviqqfeqgrklvkvkdsftlvrkngtfltlrqvfgkdlgyiityrkgsstgkktntntnefsidveegvsycffvqamifsrktnqnspsgstvcteqwksflge

[0108] 예시적인 가용성 래트 조직 인자 도메인(SEQ ID NO: 15)

[0109] Agtppgkafnlwtistdfktilewqpknpytytvqisdrsrwnkykctgttdtecdltdeivkdvntyearlsvpwrnsthgketlfgthgeppfntarkfllpyrdtkigqpviqqyeqggtklkvtkdsftlvrkngtfltlrqvfgndlgyiityrkdsstgrkntnthtneflidvekgvsycffaqavifsrktnhkspesitkcteqwksvlge

[0110] 예시적인 돌연변이체 가용성 인간 조직 인자 도메인(SEQ ID NO: 16)

[0111] SGTNTVAAYNLTKSTNFATALEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDECALTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVARNNALSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

- [0112] **예시적인 돌연변이체 가용성 인자 조직 인자 도메인(SEQ ID NO: 17)**
- [0113] SGTNTVAAYNLTWKSTNFATALEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDAKSKCFYTTDTECALTDEIVKDVQKTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLAENSPEFTPLYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVARNTALSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQKEGFRE
- [0114] 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2, 14, 15, 16, 또는 17와 적어도 70% 동일한, 적어도 72% 동일한, 적어도 74% 동일한, 적어도 76% 동일한, 적어도 78% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2, 14, 15, 16, 또는 17의 서열을 포함할 수 있고, 1개 내지 12개의 아미노산(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산)은 이의 N 말단으로부터 제거되고/되거나, 1개 내지 12개의 아미노산(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산)은 이의 C 말단으로부터 제거된다.
- [0115] 당업계에서 이해될 수 있는 바와 같이, 당업자는, 상이한 포유류 종들 사이에서 보존되는 아미노산의 돌연변이는 단백질의 활성 및/또는 구조적 안정성을 저하시킬 가능성이 더 큰 한편, 상이한 포유류 종들 사이에서 보존되지 않는 아미노산의 돌연변이는 단백질의 활성 및/또는 구조적 안정성을 저하시킬 가능성이 더 작음을 이해할 것이다.
- [0116] 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 VIIa 인자에 결합할 수 없다. 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 불활성 X 인자를 Xa 인자로 전환하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 또는 다중-사슬 폴리펩타이드는 포유류에서 혈액 응고를 자극하지 않는다.
- [0117] 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 마우스 조직 인자 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 래트 조직 인자 도메인일 수 있다.
- [0118] 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은, 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 아미노산 위치 20에 상응하는 아미노산 위치에서 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 아미노산 위치 22에 상응하는 아미노산 위치에서 이소류신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 아미노산 위치 45에 상응하는 아미노산 위치에서 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 아미노산 위치 58에 상응하는 아미노산 위치에서 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 아미노산 위치 94에 상응하는 아미노산 위치에서 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 아미노산 위치 135에 상응하는 아미노산 위치에서 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 아미노산 위치 140에 상응하는 아미노산 위치에서 페닐알라닌 중 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 7개)을 포함하지 않는다.
- [0119] 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.
- [0120] 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.

[0121] 일부 구현예에서, 돌연변이체 가용성 조직 인자는 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 보유한다.

[0122] 일부 예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 13과 적어도 70% 동일한, 적어도 72% 동일한, 적어도 74% 동일한, 적어도 76% 동일한, 적어도 78% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 핵산에 의해 인코딩될 수 있다.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

약 180개 아미노산 내지 약 220개 아미노산, 약 180개 아미노산 내지 약 215개 아미노산, 약 180개 아미노산 내지 약 210개 아미노산, 약 180개 아미노산 내지 약 205개 아미노산, 약 180개 아미노산 내지 약 200개 아미노산, 약 180개 아미노산 내지 약 195개 아미노산, 약 180개 아미노산 내지 약 190개 아미노산, 약 180개 아미노산 내지 약 185개 아미노산, 약 185개 아미노산 내지 약 220개 아미노산, 약 185개 아미노산 내지 약 215개 아미노산, 약 185개 아미노산 내지 약 210개 아미노산, 약 185개 아미노산 내지 약 205개 아미노산, 약 185개 아미노산 내지 약 200개 아미노산, 약 185개 아미노산 내지 약 195개 아미노산, 약 185개 아미노산 내지 약 190개 아미노산, 약 190개 아미노산 내지 약 220개 아미노산, 약 190개 아미노산 내지 약 215개 아미노산, 약 190개 아미노산 내지 약 210개 아미노산, 약 190개 아미노산 내지 약 205개 아미노산, 약 190개 아미노산 내지 약 200개 아미노산, 약 190개 아미노산 내지 약 195개 아미노산, 약 195개 아미노산 내지 약 220개 아미노산, 약 195개 아미노산 내지 약 215개 아미노산, 약 195개 아미노산 내지 약 210개 아미노산, 약 195개 아미노산 내지 약 205개 아미노산, 약 195개 아미노산 내지 약 200개 아미노산, 약 200개 아미노산 내지 약 220개 아미노산, 약 200개 아미노산 내지 약 215개 아미노산, 약 200개 아미노산 내지 약 210개 아미노산, 약 200개 아미노산 내지 약 205개 아미노산, 약 205개 아미노산 내지 약 220개 아미노산, 약 205개 아미노산 내지 약 215개 아미노산, 약 205개 아미노산 내지 약 210개 아미노산, 약 210개 아미노산 내지 약 220개 아미노산, 약 210개 아미노산 내지 약 215개 아미노산, 또는 약 215개 아미노산 내지 약 220개 아미노산의 총 길이를 가질 수 있다.

[0124] 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 야생형 인간 조직 인자(또는 이로부터의 임의의 서열)를 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0125] 링커 서열

[0126] 일부 구현예에서, 링커 서열은 가요성 링커 서열일 수 있다. 사용될 수 있는 링커 서열의 비제한적인 예는 문헌 [Klein 등, Protein Engineering, Design & Selection Vol. 27, No. 10, pp. 325-330, 2014]; 문헌[Priyanka 등, Protein Sci., 2013 Feb; 22(2):153-167]에 기재되어 있다. 일부 예에서, 링커 서열은 합성 링커 서열이다.

[0127] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 링커 서열(들)(예를 들어, 동일하거나 상이한 링커 서열, 예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 링커 서열)을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 링커 서열(들)(예를 들어, 동일하거나 상이한 링커 서열, 예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 링커 서열)을 포함할 수 있다.

[0128] 본원에 기재된 임의의 제1 키메라 폴리펩타이드 및/또는 제2 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 링커 서열(들)(예를 들어, 동일하거나 상이한 링커 서열, 예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 링커 서열)을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 제1 키메라 폴리펩타이드 및/또는 제2 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 링커 서열(들)(예를 들어, 동일하거나 상이한 링커 서열, 예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 링커 서열)을 포함할 수 있다.

[0129] 일부 구현예에서, 링커 서열은 1개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 90개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 80개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 70개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 60개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 45개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 40개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 35개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 30개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 25개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 24개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 22개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 20개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 18개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 16개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 14개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 12개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 10개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 8개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 6개 아미노산, 1개 아미노산 내지 약 4개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 90개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 80개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 70개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 60개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 45개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 40개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 35개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 30개 아미노산, 약 2개 아미노산 내지 약 25개

[illegible]

[illegible]

[0130] 일부 구현예에서, 링커는 글리신(Gly 또는 G) 잔기가 풍부하다. 일부 구현예에서, 링커는 세린(Ser 또는 S) 잔기가 풍부하다. 일부 구현예에서, 링커는 글리신 및 세린 잔기가 풍부하다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 글리신-세린 잔기 쌍(GS), 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상의 GS 쌍을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 Gly-Gly-Gly-Ser(GGGGS) 서열, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상의 GGGGS 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(GGGGS) 서열, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상의 GGGGS 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 Gly-Gly-Ser-Gly(GGSG) 서열, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상의 GGSG 서열을 갖는다.

[0131] 일부 구현예에서, 링커 서열은 GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 18)를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGCGGAGGATCT(SEQ ID NO: 19)를 포함하거나 이로 구성된 핵산에 의해 인코딩될 수 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 GGGSGGG(SEQ ID NO: 20)를 포함하거나 이로

구성될 수 있다.

[0132] 표적-결합 도메인

[0133] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및/또는 추가 하나 이상의 표적-결합 도메인은 항원-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 항원-결합 도메인), 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 단백질(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 인터류킨 단백질 또는 가용성 사이토카인 단백질), 및 가용성 인터류킨 또는 사이토카인 수용체(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 인터류킨 수용체 또는 가용성 사이토카인 수용체)일 수 있다.

[0134] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및/또는 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 서로 독립적으로 약 5개 아미노산 내지 약 1000개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 950개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 900개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 850개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 800개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 750개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 700개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 650개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 600개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 550개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 500개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 450개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 400개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 350개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 300개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 280개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 260개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 240개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 220개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 200개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 195개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 190개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 185개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 180개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 175개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 170개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 165개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 160개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 155개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 150개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 145개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 140개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 135개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 130개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 125개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 120개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 115개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 110개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 105개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 95개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 90개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 85개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 80개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 75개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 70개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 65개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 60개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 55개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 45개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 40개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 35개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 30개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 25개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 20개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 15개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 10개 아미노산의 아미노산의 총 수를 가질 수 있다.

[0135] 본원에 기재된 임의의 표적-결합 도메인은 1×10^{-7} M 미만, 1×10^{-8} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 1×10^{-10} M 미만, 1×10^{-11} M 미만, 1×10^{-12} M 미만, 또는 1×10^{-13} M 미만의 해리 평형 상수(K_D)로 이의 표적에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 항원-결합 단백질 작제물은 약 1×10^{-3} M 내지 약 1×10^{-5} M, 약 1×10^{-4} M 내지 약 1×10^{-6} M, 약 1×10^{-5} M 내지 약 1×10^{-7} M, 약 1×10^{-6} M 내지 약 1×10^{-8} M, 약 1×10^{-7} M 내지 약 1×10^{-9} M, 약 1×10^{-8} M 내지 약 1×10^{-10} M, 또는 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-11} M(포함)의 K_D 로 식별 항원에 결합할 수 있다.

[0136] 본원에 기재된 임의의 표적-결합 도메인의 약 1 pM 내지 약 30 nM(예를 들어, 약 1 pM 내지 약 25 nM, 약 1 pM 내지 약 20 nM, 약 1 pM 내지 약 15 nM, 약 1 pM 내지 약 10 nM, 약 1 pM 내지 약 5 nM, 약 1 pM 내지 약 2 nM, 약 1 pM 내지 약 1 nM, 약 1 pM 내지 약 950 pM, 약 1 pM 내지 약 900 pM, 약 1 pM 내지 약 850 pM, 약 1 pM 내지 약 800 pM, 약 1 pM 내지 약 750 pM, 약 1 pM 내지 약 700 pM, 약 1 pM 내지 약 650 pM, 약 1 pM 내지 약 600 pM, 약 1 pM 내지 약 550 pM, 약 1 pM 내지 약 500 pM, 약 1 pM 내지 약 450 pM, 약 1 pM 내지 약 400 pM, 약 1 pM 내지 약 350 pM, 약 1 pM 내지 약 300 pM, 약 1 pM 내지 약 250 pM, 약 1 pM 내지 약 200 pM, 약 1 pM 내지 약 150 pM, 약 1 pM 내지 약 100 pM, 약 1 pM 내지 약 90 pM, 약 1 pM 내지 약 80 pM, 약 1 pM 내지

약 70 pM, 약 1 pM 내지 약 60 pM, 약 1 pM 내지 약 50 pM, 약 1 pM 내지 약 40 pM, 약 1 pM 내지 약 30 pM, 약 1 pM 내지 약 20 pM, 약 1 pM 내지 약 10 pM, 약 1 pM 내지 약 5 pM, 약 1 pM 내지 약 4 pM, 약 1 pM 내지 약 3 pM, 약 1 pM 내지 약 2 pM)의 K_D 로 이의 표적에 결합할 수 있다.

[0137] 본원에 기재된 임의의 표적 결합 도메인은 약 1 nM 내지 약 10 nM(예를 들어, 약 1 nM 내지 약 9 nM, 약 1 nM 내지 약 8 nM, 약 1 nM 내지 약 7 nM, 약 1 nM 내지 약 6 nM, 약 1 nM 내지 약 5 nM, 약 1 nM 내지 약 4 nM, 약 1 nM 내지 약 3 nM, 약 1 nM 내지 약 2 nM, 약 2 nM 내지 약 10 nM, 약 2 nM 내지 약 9 nM, 약 2 nM 내지 약 8 nM, 약 2 nM 내지 약 7 nM, 약 2 nM 내지 약 6 nM, 약 2 nM 내지 약 5 nM, 약 2 nM 내지 약 4 nM, 약 2 nM 내지 약 3 nM, 약 3 nM 내지 약 10 nM, 약 3 nM 내지 약 9 nM, 약 3 nM 내지 약 8 nM, 약 3 nM 내지 약 7 nM, 약 3 nM 내지 약 6 nM, 약 3 nM 내지 약 5 nM, 약 3 nM 내지 약 4 nM, 약 4 nM 내지 약 10 nM, 약 4 nM 내지 약 9 nM, 약 4 nM 내지 약 8 nM, 약 4 nM 내지 약 7 nM, 약 4 nM 내지 약 6 nM, 약 4 nM 내지 약 5 nM, 약 5 nM 내지 약 10 nM, 약 5 nM 내지 약 9 nM, 약 5 nM 내지 약 8 nM, 약 5 nM 내지 약 7 nM, 약 5 nM 내지 약 6 nM, 약 6 nM 내지 약 10 nM, 약 6 nM 내지 약 9 nM, 약 6 nM 내지 약 8 nM, 약 6 nM 내지 약 7 nM, 약 7 nM 내지 약 10 nM, 약 7 nM 내지 약 9 nM, 약 7 nM 내지 약 8 nM, 약 8 nM 내지 약 10 nM, 약 8 nM 내지 약 9 nM, 및 약 9 nM 내지 약 10 nM)의 K_D 로 이의 표적에 결합할 수 있다.

[0138] 당업계에 알려진 여러 가지 상이한 방법들(예를 들어, 전기영동 이동성 시프트 검정법(electrophoretic mobility shift assay) 필터 결합 검정법, 표면 플라즈몬 공명, 및 생물분자 결합 동역학 검정법(biomolecular binding kinetics assay) 등)은 본원에 기재된 임의의 항원-결합 단백질 작제물의 K_D 값을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0139] 항원-결합 도메인

[0140] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 동일한 항원에 특이적으로 결합한다. 이들 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 이들 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0141] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 상이한 항원에 특이적으로 결합한다.

[0142] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 항원-결합 도메인이다. 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 각각 항원-결합 도메인이다. 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 항원-결합 도메인은 scFv 또는 단일 도메인 항체(예를 들어, V_{aH} 또는 V_{NAR} 도메인)를 포함하거나 이것이다.

[0143] 일부 예에서, 항원-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항원-결합 도메인)은 CD16a(예를 들어, 미국 특허 제9,035,026호에 기재된 것들 참조), CD28(예를 들어, 미국 특허 제7,723,482호에 기재된 것들 참조), CD3(예를 들어, 미국 특허 제9,226,962호에 기재된 것들 참조), CD33(예를 들어, 미국 특허 제8,759,494호에 기재된 것들 참조), CD20(예를 들어, WO 2014/026054호에 기재된 것들 참조), CD19(예를 들어, 미국 특허 제9,701,758호에 기재된 것들 참조), CD22(예를 들어, WO 2003/104425호에 기재된 것들 참조), CD123(예를 들어, WO 2014/130635호에 기재된 것들 참조), IL-1R(예를 들어, 미국 특허 제8,741,604호에 기재된 것들 참조), IL-1(예를 들어, WO 2014/095808호에 기재된 것들 참조), VEGF(예를 들어, 미국 특허 제9,090,684호에 기재된 것들 참조), IL-6R(예를 들어, 미국 특허 제7,482,436호에 기재된 것들 참조), IL-4(예를 들어, 미국 특허출원공개 2012/0171197호에 기재된 것들 참조), IL-10(예를 들어, 미국 특허출원공개 2016/0340413호에 기재된 것들 참조), PDL-1(예를 들어, 문헌[Drees 등, *Protein Express. Purif.* 94:60-66, 2014]에 기재된 것들 참조), TIGIT(예를 들어, 미국 특허출원공개 2017/0198042호에 기재된 것들 참조), PD-1(예를 들어, 미국 특허 제7,488,802호에 기재된 것들 참조), TIM3(예를 들어, 미국 특허 제8,552,156호에 기재된 것들 참조), CTLA4(예를 들어, WO 2012/120125호에 기재된 것들 참조), MICA(예를 들어, WO 2016/154585호에 기재된 것들 참조), MICB(예를 들어, 미국 특허 제8,753,640호에 기재된 것들 참조), IL-6(예를 들어, 문헌[Gejima 등, *Human Antibodies* 11(4):121-129, 2002]에 기재된 것들 참조), IL-8(예를 들어, 미국 특허 제6,117,980호에 기재된

것들 참조), TNF α (예를 들어, 문헌[Geng 등, *Immunol. Res.* 62(3):377-385, 2015]에 기재된 것들 참조), CD26(예를 들어, WO 2017/189526호에 기재된 것들 참조), CD36(예를 들어, 미국 특허출원공개 2015/0259429호에 기재된 것들 참조), ULBP2(예를 들어, 미국 특허 제9,273,136호에 기재된 것들 참조), CD30(예를 들어, 문헌[Homach 등, *Scand. J. Immunol.* 48(5):497-501, 1998]에 기재된 것들 참조), CD200(예를 들어, 미국 특허 제9,085,623호에 기재된 것들 참조), IGF-1R(예를 들어, 미국 특허출원공개 2017/0051063호에 기재된 것들 참조), MUC4AC(예를 들어, WO 2012/170470호에 기재된 것들 참조), MUC5AC(예를 들어, 미국 특허 제9,238,084호에 기재된 것들 참조), Trop-2(예를 들어, WO 2013/068946호에 기재된 것들 참조), CMET(예를 들어, 문헌[Edwardraja 등, *Biotechnol. Bioeng.* 106(3):367-375, 2010]에 기재된 것들 참조), EGFR(예를 들어, 문헌[Akbari 등, *Protein Expr. Purif.* 127:8-15, 2016]에 기재된 것들 참조), HER1(예를 들어, 미국 특허출원공개 2013/0274446호에 기재된 것들 참조), HER2(예를 들어, 문헌[Cao 등, *Biotechnol. Lett.* 37(7):1347-1354, 2015]에 기재된 것들 참조), HER3(예를 들어, 미국 특허 제9,505,843호에 기재된 것들 참조), PSMA(예를 들어, 문헌[Parker 등, *Protein Expr. Purif.* 89(2):136-145, 2013]에 기재된 것들 참조), CEA(예를 들어, WO 1995/015341호에 기재된 것들 참조), B7H3(예를 들어, 미국 특허 제9,371,395호에 기재된 것들 참조), EPCAM(예를 들어, WO 2014/159531호에 기재된 것들 참조), BCMA(예를 들어, 문헌[Smith 등, *Mol. Ther.* 26(6):1447-1456, 2018]에 기재된 것들 참조), P-카드헤린(예를 들어, 미국 특허 제7,452,537호에 기재된 것들 참조), CEACAM5(예를 들어, 미국 특허 제9,617,345호에 기재된 것들 참조), UL16-결합 단백질(예를 들어, WO 2017/083612호에 기재된 것들 참조), HLA-DR(예를 들어, 문헌[Pistillo 등, *Exp. Clin. Immunogenet.* 14(2):123-130, 1997]에 기재된 것들 참조), DLL4(예를 들어, WO 2014/007513호에 기재된 것들 참조), TYRO3(예를 들어, WO 2016/166348호에 기재된 것들 참조), AXL(예를 들어, WO 2012/175692호에 기재된 것들 참조), MER(예를 들어, WO 2016/106221호에 기재된 것들 참조), CD122(예를 들어, 미국 특허출원공개 2016/0367664호에 기재된 것들 참조), CD155(예를 들어, WO 2017/149538호에 기재된 것들 참조), 또는 PDGF-DD(예를 들어, 미국 특허 제9,441,034호에 기재된 것들 참조) 중 임의의 하나에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0144] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드에 존재하는 항원-결합 도메인은 각각 독립적으로, VHH 도메인, VNAR 도메인, 및 scFv로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 항원-결합 도메인은 BiTe, (scFv)₂, 나노바디, 나노바디-HSA, DART, TandAb, sc디아바디, sc디아바디-CH3, scFv-CH-CL-scFv, HSA바디, sc디아바디-HAS, 또는 탠덤-scFv이다. 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드에 사용될 수 있는 항원-결합 도메인의 추가 예는 당업계에 알려져 있다.

[0145] VHH 도메인은 낙타과(camelid)에서 발견될 수 있는 단일 단량체성 가변 항체 도메인이다. VNAR 도메인은 연골어류(cartilaginous fish)에서 발견될 수 있는 단일 단량체성 가변 항체 도메인이다. V_HH 도메인 및 V_{NAR} 도메인의 비제한적인 양태는 예를 들어 문헌[Cromie 등, *Curr. Top. Med. Chem.* 15:2543-2557, 2016]; 문헌[De Genst 등, *Dev. Comp. Immunol.* 30:187-198, 2006]; 문헌[De Meyer 등, *Trends Biotechnol.* 32:263-270, 2014]; 문헌[Kijanka 등, *Nanomedicine* 10:161-174, 2015]; 문헌[Kovaleva 등, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 14:1527-1539, 2014]; 문헌[Krah 등, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 38:21-28, 2016]; 문헌[Mujic-Delic 등, *Trends Pharmacol. Sci.* 35:247-255, 2014]; 문헌[Muyldermans, *J. Biotechnol.* 74:277-302, 2001]; 문헌[Muyldermans 등, *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235, 2001]; 문헌[Muyldermans, *Ann. Rev. Biochem.* 82:775-797, 2013]; 문헌[Rahbarizadeh 등, *Immunol. Invest.* 40:299-338, 2011]; 문헌[Van Audenhove 등, *EBioMedicine* 8:40-48, 2016]; 문헌[Van Bockstaele 등, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:1212-1224, 2009]; 문헌[Vincke 등, *Methods Mol. Biol.* 911:15-26, 2012]; 및 문헌[Wesolowski 등, *Med. Microbiol. Immunol.* 198:157-174, 2009]에 기재되어 있다.

[0146] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 각각의 항원-결합 도메인은 둘 다 VHH 도메인이거나, 적어도 하나의 항원-결합 도메인은 VHH 도메인이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 각각의 항원-결합 도메인은 둘 다 VNAR 도메인이거나, 적어도 하나의 항원-결합 도메인은 VNAR 도메인이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 각각의 항원-결합 도메인은 둘 다 scFv 도메인이거나, 적어도 하나의 항원-결합 도메인은 scFv 도메인이다.

[0147] 일부 구현예에서, 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드에 존재하는 2개 이상의 폴리펩타이드는 조립되어(예를 들어, 비-공유적으로 조립되어), 본원에 기재된 임의의 항원-결합 도메인, 예를 들어, 항체의 항원-결합 단편(예를 들어, 본원에 기재된 항체의 임의의 항원-결합 단편), VHH-scAb, VHH-Fab, 이중 scFab,

F(ab')₂, 디아바디, crossMab, DAF(투-인-원), DAF(포-인-원), DutaMab, DT-IgG, 낚스-인 홀(knobs-in-holes) 공통 경쇄, 낚스-인-홀 조립체, 전하쌍(charge pair), Fab-아암 교환, SEED바디, LUZ-Y, Fcab, $\kappa \lambda$ -바디, 오르토고날(orthogonal) Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zyboby, DVI-IgG, 디아바디-CH3, 트리플바디(triple body), 미니항체, 미니바디, TriBi 미니바디, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, F(ab')₂-scFv₂, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, 4가 HCAb, sc디아바디-Fc, 디아바디-Fc, 탠덤 scFv-Fc, 인트라체(intrabody), 도크 앤드 록(dock and lock), ImmTAC, IgG-IgG 접합체, Cov-X-바디, 및 scFv1-PEG-scFv₂를 형성할 수 있다. 예를 들어, 이들 요소의 설명에 대해 그 전체가 본원에 포함된 문헌[Spiess 등, *Mol. Immunol.* 67:95-106, 2015]를 참조한다. 항체의 항원-결합 단편의 비제한적인 예는 Fv 단편, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 및 Fab' 단편을 포함한다. 항체의 항원-결합 단편의 추가 예는 IgG의 항원-결합 단편(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 항원-결합 단편)(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgG, 예를 들어, 인간 또는 인간화 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 항원-결합 단편); IgA의 항원-결합 단편(예를 들어, IgA1 또는 IgA2의 항원-결합 단편)(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgA, 예를 들어, 인간 또는 인간화 IgA1 또는 IgA2의 항원-결합 단편); IgD의 항원-결합 단편(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgD의 항원-결합 단편); IgE의 항원-결합 단편(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgE의 항원-결합 단편); 또는 IgM의 항원-결합 단편의 항원-결합 단편(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgM의 항원-결합 단편)이다.

- [0148] "Fv" 단편은 하나의 중쇄 가변 도메인 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 비-공유-연결된 이량체를 포함한다.
- [0149] "Fab" 단편은 Fv 단편의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 외에도, 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(C_{H1})을 포함한다.
- [0150] "F(ab')₂" 단편은 힌지 영역 부근에서, 이황화 결합에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함한다.
- [0151] "이중 가변 도메인 면역글로불린" 또는 "DVD-Ig"은 예를 들어, 문헌[DiGiammarino 등, *Methods Mol. Biol.* 899:145-156, 2012]; 문헌[Jakob 등, *MABs* 5:358-363, 2013]; 및 미국 특허 제7,612,181호; 제8,258,268호; 제8,586,714호; 제8,716,450호; 제8,722,855호; 제8,735,546호; 및 제8,822,645호에 기재된 바와 같은 다가(multivalent) 및 다중특이적 결합 단백질을 지칭하며, 이들은 각각 그 전체가 참조로서 포함된다.
- [0152] DARTs는 예를 들어, 문헌[Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13:799-801, 2014]에 기재되어 있다.
- [0153] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 항원-결합 도메인은 단백질, 탄수화물, 지질, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원에 결합할 수 있다.
- [0154] 항원-결합 도메인의 추가 예 및 양태는 당업계에 알려져 있다.
- [0155] **가용성 인터류킨 또는 사이토카인 단백질**
- [0156] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 단백질 또는 가용성 사이토카인 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 가용성 인터류킨 또는 가용성 사이토카인 단백질은 IL-2, IL-3, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, PDGF-DD, SCF, 및 FLT3L의 군으로부터 선택된다. 가용성 IL-2, IL-3, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, PDGF-DD, SCF, 및 FLT3L의 비제한적인 예는 하기에 제공된다.
- [0157] **인간 가용성 IL-2(SEQ ID NO: 75)**
- [0158] aptssstkkk qlqlchllld lqmilnginn yknpkltrml tfkfympkka
- [0159] telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgse
- [0160] ttfmceyade tativeflnr witfcqsiis tlt
- [0161] **인간 가용성 IL-3(SEQ ID NO: 76)**
- [0162] apmtqtptlkt swncsnmid eiithlkqpp lplldfnnln gedqdilmen
- [0163] nlrrpnleaf nravkslqna saiesilknl lpclplataa ptrhpihikd

- [0164] gdwnefrrkl tfylktlena qaqqttlsia if
- [0165] **인간 가용성 IL-7(SEQ ID NO: 77)**
- [0166] dcdiegkdgkqyesv lmvsidqlld smkeigsncf nnefnffkrh icdankegmf
- [0167] lfraarklrq flkmnstgdf dlhlkvseg ttillnctgq vkgrkpaalg
- [0168] eaqptkslee nkslkeqkkl ndlclkrll qeiktcwnki lmgtkch
- [0169] **인간 가용성 IL-8(SEQ ID NO: 78)**
- [0170] egavlprsak elrcqikty skpfhpkfik elrviesgph canteiivkl
- [0171] sdgrelcldp kenwvqrve kflkraens
- [0172] **인간 가용성 IL-10(SEQ ID NO: 79)**
- [0173] spgqgtqsensc thfpgnlpnm lrdlrdafr vktffqmkdq ldnlllkesl
- [0174] ledfkgylyc qalsemiqfy leevmpqaen qdpdikahvn slgenkltlr
- [0175] lrlrrchrfl pceenkskave qvknafnklq ekgiykamse fdifinyiea ymtmkirn
- [0176] **인간 가용성 IL-15(SEQ ID NO: 80)**
- [0177] nwnvisdlkki edliqsmhid atlytesdvh psckvtamkc fllelqvsl
- [0178] esgdasihdt venliilann slssngnvt sgckeceele eknikeflqs
- [0179] fvhivqmfin ts
- [0180] **인간 가용성 IL-15 D8N 돌연변이체(SEQ ID NO: 99)**
- [0181] NWNVISNLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLEELQVISLES GDASIHDTVENLI ILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS
- [0182] **인간 가용성 IL-15 D8N 돌연변이체(SEQ ID NO: 100)**
- [0183] AACTGGGTGAACGCATCAGCAATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCT TGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATT TTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGATCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAATCAAGGAGTTCTGCAATCC TTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC
- [0184] **인간 가용성 IL-17(SEQ ID NO: 81)**
- [0185] gitiprn pgcpnsedkn fprtmvnl nhrntntnp krssdyynrs
- [0186] tspwnlhrne dperypsviw eakcrhlgi nadgnvdyhm nsvpiqqeil
- [0187] vlrrepphpc nsfrlekilv svgtcvtpi vhhva
- [0188] **인간 가용성 IL-18(SEQ ID NO: 82)**
- [0189] yfgklesklsvirn lndqvlfidq gnrplfedmt dsdcrdnapr tifiismykd
- [0190] sqprgmavti svkcekistl scenkiisfk emnppdnikd tksdiiffqr
- [0191] svpghdnkmq fesssyegyf lacekerdlf klilkkedel gdrsimftvq ned
- [0192] **인간 가용성 PDGF-DD(SEQ ID NO: 83)**
- [0193] rdtatpqsasi kalrnanlrr desnhltdly rrdetiqvkg ngyvqsprfp
- [0194] nsyprnlllt wrlshqentr iqlvfdnqfg leeaendicr ydfvevedis
- [0195] etstiirgrw cghkevppri ksrtmqikit fksddyfvak pgfkiiysll
- [0196] edfqpaaase tnwesvtssi sgvsynspsv tdptliadal dkkiaefdtv

[0197] edllkyfnpe swqedlenmy ldtprygrs yhdrkskvdI drlnddakry

[0198] sctprnysvn ireelklanv vffprcllvq rcggncgcgt vnwrscstns

[0199] gktvkkyhev lqfepghikr rgraktmalv diqldhherc dcicssrppr

[0200] **인간 가용성 SCF(SEQ ID NO: 84)**

[0201] egicrnrvtnnvkdv tkivanlpkd ymitlkyvpg mdvlpshcwi semvvqlsds

[0202] ltdlldkfsn iseglsnysi idklvnivdd lvecvkenss kdlkksfksp

[0203] eprlftpeef frifnrsida fkdfvvaset sdcvvsstls pekdsrvsvt

[0204] kpfmlppvaa sslrndssss nrkaknppgd sslhwaamal palfsliigf

[0205] afgalywkk rpslstraven iqineednei smlqekeref qev

[0206] **인간 가용성 FLT3L(SEQ ID NO: 85)**

[0207] tqdcseqhspissd favkirelsd yllqdyptv asnlqdealc gglwrlvlaq

[0208] rwmrlktva gskmqgller vnteihfvtk cafqpppscl rfvqtnisrl

[0209] lqetseqlva lkpwithrnf srclelqcqp dsstlppws prpleatapt

[0210] apqpplllll llpvglilla aawclhwqtr rrrtprpgeq vppvpspddl

[0211] llveh

[0212] 가용성 MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, 및 ULBP6의 비제한적인 예는 하기에 제공된다.

[0213] **인간 가용성 MICA(SEQ ID NO: 86)**

[0214] ephslry nltvlswdgs vqsgfltevh ldgqpflrcd rqlcrakpqq

[0215] qwaedvlgk twdretldt gngkdlrmtl ahikdqkegl hslqeirvce

[0216] ihednstrss qhfyydgelf lsqnletkew tmpqssraqt lamnvrnflk

[0217] edamtktkth hamhadclqe lrrylksgvv lrrtvpmmvn vtrseasegn

[0218] itvtcrasgf ypwnitlswr qdgvslshdt qqwgdvlpdg ngtyqtwvat

[0219] ricqgeeqrf tcymehsgnh sthpvpqgkv lvlqshwqtf hvsavaaaai

[0220] fviiifyvrc ckkktsaaeg pelvslqvld qhpvgtsdhr datqlgfqpl

[0221] msdlgstgst ega

[0222] **인간 가용성 MICB(SEQ ID NO: 87)**

[0223] aephslry nlmvlsqdes vqsgflaegh ldgqpflryd rqlrrakpqq

[0224] qwaedvlgak twdtetldt engqdlrrtl thikdqkggl hslqeirvce

[0225] ihedsstrgs rhfyydgelf lsqnletqes tvpqssraqt lamnvtfnwk

[0226] edamtktkth ramqadclqk lqrylksgva lrrtvpmmvn vtcsevsegn

[0227] itvtcrassf yprnitltwr qdgvslshnt qqwgdvlpdg ngtyqtwvat

[0228] rirqgeeqrf tcymehsgnh gthpvpqgkv lvlqsqrtdf pyvsaampcf

[0229] viiilcvpc ckkktsaaeg pelvslqvld qhpvgtdghr

[0230] daaqlgfqpl msatgstgst ega

[0231] **인간 가용성 ULBP1(SEQ ID NO: 88)**

[0232] wvdthclcydfiit pksrpepqwc evqglvderp flhydcvnhk akafaslgkk

[0233] vnvtktweeq tetlrdivdf lkgqlldiqv enlipieplt lqarmscehe
 [0234] ahghgrgswq flfngqkflf fdsnnrkwt a lhpqakkmte kweknrdvtm
 [0235] ffqkislqdc kmwleeflmy weqmdptkp pslapg
 [0236] **인간 가용성 ULBP2(SEQ ID NO: 89)**
 [0237] gradphslcyditvi pkfrpgprwc avqgqvdekt flhydcgnkt vtpv splgk
 [0238] lntttawkaq npvrevvdi lteqlrdiql enytpkeplt lqarmsceqk
 [0239] aeghssgswq fsfdgqifll fdsekrmwtt vhpqarkmke kwendkvvam
 [0240] sfhyfsmgdc igwledflmg mdstlepszag aplams

[0241] **인간 가용성 ULBP3(SEQ ID NO: 90)**
 [0242] dahslwynfti ihlprhgqww cevqsqvdekt nflsydcgsd kvlsmgglee
 [0243] qlyatdawgk qlemlrevgq rlrleladte ledftpsgpl tlqvrmscec
 [0244] eadgyirgsw qfsfdgrkfl lfdsnrkwt vvhagarmk ekwekdsglt
 [0245] tffkmvsmrd ckswlrdflm hrkkrepta pptmapg

[0246] **인간 가용성 ULBP4(SEQ ID NO: 91)**
 [0247] hslcfntfik slsrpgqpwc eaqvflnknf flqynsdnm vkplgllgk
 [0248] vyatstwgel tqtlgevgrd lrmlldikp qiktsdpstl qvemfcqrea
 [0249] erctgaswqf atngeksllf dammntwtvi nheaskiket wkkdrgleky
 [0250] frklsgkdcd hwlreflghw eampeptvsp vnasdihwss sslpdrwiil

[0251] gafillvlmg ivlicvwwqn gewqaglwpl rts
 [0252] **인간 가용성 ULBP5(SEQ ID NO: 92)**
 [0253] gladp hslcyditvi pkfrpgprwc avqgqvdekt flhydcgskt
 [0254] vtpv splgk lntttawkaq npvrevvdi lteqlldiql enyipkeplt
 [0255] lqarmsceqk aeghssgswq lsfdgqifll fdsenrmwtt vhpqarkmke
 [0256] kwendkdmtd sfhyismgdc tgwledflmg mdstlepszag apptmssg

[0257] **인간 가용성 ULBP6(SEQ ID NO: 93)**
 [0258] rrrddp hslcyditvi pkfrpgprwc avqgqvdekt flhydcgnkt
 [0259] vtpv splgk lnttmawkaq npvrevvdi lteqlldiql enytpkeplt
 [0260] lqarmsceqk aeghssgswq fsidgqtfll fdsekrmwtt vhpqarkmke
 [0261] kwendkdvam sfhyismgdc igwledflmg mdstlepszag aplamssg

[0262] 가용성 인터루킨 단백질 및 가용성 사이토카인 단백질의 추가 예는 당업계에 알려져 있다.

[0263] **가용성 수용체**

[0264] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터루킨 수용체 또는 가용성 사이토카인 수용체이다. 일부 구현예에서, 가용성 수용체는 가용성 TGF- β 수용체 II(TGF- β RII)(예를 들어, 문헌[Yung 등, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 194(9):1140-1151, 2016]에 기재된 것들 참조), 가용성 TGF- β RIII(예를 들어, 문헌[Heng 등, *Placenta* 57:320, 2017]에 기재된 것들 참조), 가용성 NK2D(예를 들어, 문헌[Cosman 등, *Immunity* 14(2):123-133, 2001]; 문헌[Costa 등, *Front. Immunol.*, Vol. 9, Article 1150, May 29, 2018; doi: 10.3389/fimmu.2018.01150] 참조), 가용성 NKp30(예를 들어, 문헌[Costa 등, *Front. Immunol.*, Vol. 9,

Article 1150, May 29, 2018; doi: 10.3389/fimmu.2018.01150] 참조), 가용성 NKp44(예를 들어, 문헌[Costa 등, *Front. Immunol.*, Vol. 9, Article 1150, May 29, 2018; doi: 10.3389/fimmu.2018.01150]에 기재된 것들 참조), 가용성 NKp46(예를 들어, 문헌[Mandelboim 등, *Nature* 409:1055-1060, 2001]; 문헌[Costa 등, *Front. Immunol.*, Vol. 9, Article 1150, May 29, 2018; doi: 10.3389/fimmu.2018.01150] 참조), 가용성 DNAM1(예를 들어, 문헌[Costa 등, *Front. Immunol.*, Vol. 9, Article 1150, May 29, 2018; doi: 10.3389/fimmu.2018.01150]에 기재된 것들 참조), scMHC I(예를 들어, 문헌[Washburn 등, *PLoS One* 6(3):e18439, 2011]에 기재된 것들 참조), scMHC II(예를 들어, 문헌[Bishwajit 등, *Cellular Immunol.* 170(1):25-33, 1996]에 기재된 것들 참조), scTCR(예를 들어, 문헌[Weber 등, *Nature* 356(6372):793-796, 1992]에 기재된 것들 참조), 가용성 CD155(예를 들어, 문헌[Tahara-Hanaoka 등, *Int. Immunol.* 16(4):533-538, 2004]에 기재된 것들 참조), 또는 가용성 CD28(예를 들어, 문헌[Hebbbar 등, *Clin. Exp. Immunol.* 136:388-392, 2004] 참조)이다. 가용성 인터류킨 수용체 및 가용성 사이토카인 수용체의 추가 예는 당업계에 알려져 있다.

[0265] 친화도 도메인의 쌍

[0266] 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는 1) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드, 및 2) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드가 제1 도메인 및 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인의 결합을 통해 회합되도록 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 친화도 도메인 쌍은 인간 IL-15 수용체의 알파 사슬(IL15R α) 및 가용성 IL-15로부터의 스시 도메인이다. 짧은 컨센서스(consensus) 반복부 또는 1형 당단백질 모티프로도 알려져 있는 스시 도메인은 단백질-단백질 상호작용에서 공통 모티프이다. 스시 도메인은 보체 구성 요소 C1r, C1s, 인자 H, 및 C2m, 뿐만 아니라 비면역학적 분자 인자 XIII 및 β 2-당단백질을 포함하여 많은 단백질-결합 분자들 상에서 식별되어 왔다. 전형적인 스시 도메인은 대략 60개 아미노산 잔기를 갖고 4개의 시스테인을 함유한다(문헌[Ranganathan, *Pac. Symp Biocomput.* 2000:155-67]). 제1 시스테인은 제3 시스테인과 이황화 결합을 형성할 수 있고, 제2 시스테인은 제4 시스테인과 이황화 브릿지를 형성할 수 있다. 친화도 도메인 쌍의 하나의 구성원이 가용성 IL-15인 일부 구현예에서, 가용성 IL15는 D8N 또는 D8A 아미노산 치환을 갖는다. 친화도 도메인 쌍의 하나의 구성원이 인간 IL-15 수용체의 알파 사슬(IL15R α)인 일부 구현예에서, 인간 IL15R α 는 성숙한 전장 IL15R α 이다. 일부 구현예에서, 친화도 도메인 쌍은 바르나제(barnase) 및 바르스타(barnstar)이다. 일부 구현예에서, 친화도 도메인 쌍은 PKA 및 AKAP이다. 일부 구현예에서, 친화도 도메인 쌍은 돌연변이화된 RNase I 단편에 기초한 어댑터/도킹 태그 모듈(문헌[Rossi, *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:6841-6846, 2006]; 문헌[Sharkey 등, *Cancer Res.* 68:5282-5290, 2008]; 문헌[Rossi 등, *Trends Pharmacol Sci.* 33:474-481, 2012]) 또는 단백질 신택신, 시냅토타그민, 시냅토프레빈, 및 SNAP25의 상호작용에 기초한 SNARE 모듈(문헌[Deyev 등, *Nat Biotechnol.* 1486-1492, 2003])이다.

[0267] 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하고, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인을 포함하며, 여기서 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인 및 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인은 1×10^{-7} M 미만, 1×10^{-8} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 1×10^{-10} M 미만, 1×10^{-11} M 미만, 1×10^{-12} M 미만, 또는 1×10^{-13} M 미만의 해리 평형 상수(K_D)로 서로 결합한다. 일부 구현예에서, 친화성 도메인 쌍의 제1 도메인과 친화성 도메인 쌍의 제2 도메인은 약 1×10^{-4} M 내지 약 1×10^{-6} M, 약 1×10^{-5} M 내지 약 1×10^{-7} M, 약 1×10^{-6} M 내지 약 1×10^{-8} M, 약 1×10^{-7} M 내지 약 1×10^{-9} M, 약 1×10^{-8} M 내지 약 1×10^{-10} M, 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-11} M, 약 1×10^{-10} M 내지 약 1×10^{-12} M, 약 1×10^{-11} M 내지 약 1×10^{-13} M, 약 1×10^{-4} M 내지 약 1×10^{-5} M, 약 1×10^{-5} M 내지 약 1×10^{-6} M, 약 1×10^{-6} M 내지 약 1×10^{-7} M, 약 1×10^{-7} M 내지 약 1×10^{-8} M, 약 1×10^{-8} M 내지 약 1×10^{-9} M, 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-10} M, 약 1×10^{-10} M 내지 약 1×10^{-11} M, 약 1×10^{-11} M 내지 약 1×10^{-12} M, 또는 약 1×10^{-12} M 내지 약 1×10^{-13} M(포함)의 K_D 로 서로에 결합한다. 당업계에 알려진 임의의 여러 가지 상이한 방법들(예를 들어, 전기영동 이동성 시프트 검정법, 필터 결합 검정법, 표면 플라즈몬 공명, 및 생물분자 결합 동역학 검정법 등)은 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인 및 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인의 결합의 K_D 값을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0268] 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인

을 포함하고, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인을 포함하며, 상기 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인, 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인, 또는 둘 다는 약 10개 내지 100개 아미노산 길이이다. 예를 들어, 친화성 도메인 쌍의 제1 도메인, 친화성 도메인 쌍의 제2 도메인, 또는 둘 다는 약 10개 내지 100개 아미노산 길이, 약 15개 내지 100개 아미노산 길이, 약 20개 내지 100개 아미노산 길이, 약 25개 내지 100개 아미노산 길이, 약 30개 내지 100개 아미노산 길이, 약 35개 내지 100개 아미노산 길이, 약 40개 내지 100개 아미노산 길이, 약 45개 내지 100개 아미노산 길이, 약 50개 내지 100개 아미노산 길이, 약 55개 내지 100개 아미노산 길이, 약 60개 내지 100개 아미노산 길이, 약 65개 내지 100개 아미노산 길이, 약 70개 내지 100개 아미노산 길이, 약 75개 내지 100개 아미노산 길이, 약 80개 내지 100개 아미노산 길이, 약 85개 내지 100개 아미노산 길이, 약 90개 내지 100개 아미노산 길이, 약 95개 내지 100개 아미노산 길이, 약 10개 내지 95개 아미노산 길이, 약 10개 내지 90개 아미노산 길이, 약 10개 내지 85개 아미노산 길이, 약 10개 내지 80개 아미노산 길이, 약 10개 내지 75개 아미노산 길이, 약 10개 내지 70개 아미노산 길이, 약 10개 내지 65개 아미노산 길이, 약 10개 내지 60개 아미노산 길이, 약 10개 내지 55개 아미노산 길이, 약 10개 내지 50개 아미노산 길이, 약 10개 내지 45개 아미노산 길이, 약 10개 내지 40개 아미노산 길이, 약 10개 내지 35개 아미노산 길이, 약 10개 내지 30개 아미노산 길이, 약 10개 내지 25개 아미노산 길이, 약 10개 내지 20개 아미노산 길이, 약 10개 내지 15개 아미노산 길이, 약 20개 내지 30개 아미노산 길이, 약 30개 내지 40개 아미노산 길이, 약 40개 내지 50개 아미노산 길이, 약 50개 내지 60개 아미노산 길이, 약 60개 내지 70개 아미노산 길이, 약 70개 내지 80개 아미노산 길이, 약 80개 내지 90개 아미노산 길이, 약 90개 내지 100개 아미노산 길이, 약 20개 내지 90개 아미노산 길이, 약 30개 내지 80개 아미노산 길이, 약 40개 내지 70개 아미노산 길이, 약 50개 내지 60개 아미노산 길이, 또는 이들 사이의 임의의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, 친화성 도메인 쌍의 제1 도메인, 친화성 도메인 쌍의 제2 도메인, 또는 둘 다는 약 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개 또는 100개 아미노산 길이이다.

[0269] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인 및/또는 제2 도메인은 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인 및/또는 제2 도메인의 기능이 무손상으로 유지되는 한, 이의 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 이상의 추가 아미노산(예를 들어, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 IL-15 수용체의 알파 사슬(IL15R α)로부터의 스시 도메인은 가용성 IL-15에 결합하는 능력을 여전히 보유하면서도 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 이상의 추가 아미노산을 포함할 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 가용성 IL-15는 인간 IL-15 수용체의 알파 사슬(IL15R α)로부터의 스시 도메인에 결합하는 능력을 여전히 보유하면서도 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 이상의 추가 아미노산을 포함할 수 있다.

[0270] IL-15 수용체 알파(IL15R α)의 알파 사슬로부터의 스시 도메인의 비제한적인 예는 ITCPPMSVEHADIIWVKSYSYLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI(RSEQ ID NO: 94)과 적어도 70% 동일한, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한 또는 100% 동일한 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, IL15R α 의 알파 사슬로부터의 스시 도메인은
ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGCCAGCAGCAGCCTACCGAGTGCCTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO: 95)를 포함하는 핵산에 의해 인코딩될 수 있다.

[0271] 일부 구현예에서, 가용성 IL-15는
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVHQMFINTS(SEQ ID NO: 96)와 적어도 70% 동일한, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한 또는 100% 동일한 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가용성 IL-15는
AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO: 97)의 서열을 포함하는 핵산에 의해 인코딩될 수 있다.

[0272] 단일 사슬 키메라 폴리펩타이드

[0273] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 하기를 포함한다: 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 표적-결합 도메인), 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인), 및 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[0278] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드인 예시적인 IL-2 수용체 활성화제

[0279] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 IL-2 수용체 활성화제일 수 있다. 이러한 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및/또는 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 IL-2에 대한 수용체(예를 들어, IL-2에

대한 인간 수용체)에 결합한다.

- [0280] IL-2 수용체 활성화제인 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및/또는 제2 표적-결합 도메인은 IL-2 수용체(예를 들어, 인간 IL-2 수용체)에 특이적으로 결합하는 작용제성(agonistic) 항원-결합 도메인일 수 있다(예를 들어, 문헌[Gaulton 등, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 36(1):18-29, 1985])에 기재된 것들 참조).
- [0281] IL-2 수용체 활성화제인 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인 중 하나 또는 둘 다는 가용성 인터류킨 2(IL-2) 단백질일 수 있다. 가용성 IL-2의 예시적인 서열은 아래에 제공된다.
- [0282] **인간 가용성 IL-2(SEQ ID NO: 1)**
- [0283] aptssstkkk qlqlhllld lqmilnginn yknpkltrml tfkfypmkka
- [0284] telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgse
- [0285] ttfmceyade tativeflnr witfcqsiis tlt
- [0286] 이들 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인 및 제2 표적-결합 도메인은 가용성 인간 IL-2 단백질이다. IL-2 수용체에 특이적으로 결합하는 IL-2 단백질의 비제한적인 예는 SEQ ID NO: 1과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함할 수 있다.
- [0287] 일부 구현예에서, 가용성 인간 IL-2 단백질은 하기 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열에 의해 인코딩될 수 있다:
- [0288] GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAAGTGGAGCATTTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCC
AAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAA
GTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAACA
TTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT(SEQ ID
NO: 31).
- [0289] 일부 구현예에서, 가용성 인간 IL-2 단백질은 하기 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열에 의해 인코딩될 수 있다:
- [0290] GCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAACTACAAGAACCCC
AAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTCGAGGAG
GTGCTGAATTTAGCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACC
TTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACC(SEQ ID
NO: 32)
- [0291] 일부 구현예에서, IL-2 수용체 활성화제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 하기 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함할 수 있다:
- [0292] APTSSSTKKTLQLLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT
FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTI LEWEPKPNVQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVQITY
LARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKNVTVEDERTLVRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLTYWKSSSSGKKTAKTNTN
EFLIDVDKGENYCFVSQAVIPSRVTNRKSTDSPVECMGQKEGFREAPTSSSTKKTLQLLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO: 3).
- [0293] 일부 구현예에서, IL-2 수용체 활성화제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 하기 서열과 적어도 80% 동일한(예

를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열에 의해 인코딩된다:

[0294]

GCCCCACCTCCTCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAACCTACAAGAACCCC
AAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTCGAGGAG
GTGCTGAATTTAGCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCGGGATTAAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACC
TTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACCAGCGGCACA
ACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAG
ATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCATCTCACCAGTATGATCGTAAAGATGTGAAACAGACCTAC
CTCGCCCGGGTGTAGTACCCCGCCGGAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAG
ACCAATTTAGGACAGCCACCATCCAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGGCGGGAACAACACC
TTTCTCAGCTCCGGGATGTGTTCCGCAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTCTCCGCAAGAAGACAGCTAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTAATCGACGTGGAATAAAGCGAAAACCTACTGTTTCAGCGTGAAGCTGTGATCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGACCGATAGCCCGTT
GAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGCGAGTTCCGGGAGGCACCTACTTCAAGTTCTACAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAG
ATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCAAACTACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTT
CAGTGCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAAC
GTAATAGTTCTGGAATAAAGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTT
TGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT (SEQ ID NO: 11).

[0295]

일부 구현예에서, IL-2 수용체 활성화제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 하기 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함할 수 있다:

[0296]

MKWVTFISLLFLFSSAYSAPTSSSTKKTLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD
LISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSGTNTVAAYNLTKWSTNFKTILEWEPKPNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTT
DTECDLTDEIVKDKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTL
YYWSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSQAVIPSRVTNRKSTDSPVECMGQEKGEFREAPTSSSTKKTLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTR
MLTFKFYMPKKATELKHLLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID
NO: 4).

[0297]

일부 구현예에서, IL-2 수용체 활성화제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 하기 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열에 의해 인코딩된다:

[0298]

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCAGCGCTACTCCGCCCCACCTCCTCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCAT
TTACTGCTGGATTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAACCTACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCC
ACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCCGGAT
TTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTA
AATCGTTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTTAAACCAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGAAGAGCACCAACTTC
AAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGCATCTACCGATGAGATCGTGAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTAGCTACCCCGCCGCAATGTGGAGAGCACTGGT
TCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACA
AAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGGCGGGAACAACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGCAAGATTTAATCTACACACTG
TATTACTGGAAGTCTCTTCTCCGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTTTCAGCGTG
CAAGCTGTGATCCCTCCCGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTCCGGGAGGCACCTACTTCA
AGTTCTACAAAGAAAACAGCTACAACCTGGAGCATTTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCAAACCTACCAGG
ATGCTCACATTTAAGTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTA
GCTCAAAGCAAAACCTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAATAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAA
TATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT (SEQ ID NO: 12).

[0299]

단일-사슬 키메라 폴리펩타이드인 예시적인 CD3/CD38 결합체

- [0300] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드가 CD3/CD28 결합제인 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인은 CD3(예를 들어, CD3 δ (예를 들어, 인간 CD3 δ), CD3 ϵ (예를 들어, 인간 CD3 ϵ), CD3 γ (예를 들어, 인간 CD3 γ), 및 CD3 ζ (예를 들어, 인간 CD3 ζ) 중 하나 이상)에 특이적으로 결합하고 제2 표적-결합 도메인은 CD28(예를 들어, 인간 CD28)에 특이적으로 결합한다.
- [0301] 일부 구현예에서, CD3(예를 들어, CD3 δ (예를 들어, 인간 CD3 δ), CD3 ϵ (예를 들어, 인간 CD3 ϵ), CD3 γ (예를 들어, 인간 CD3 γ), 및 CD3 ζ (예를 들어, 인간 CD3 ζ) 중 하나 이상)에 특이적으로 결합하는 제1 표적-결합 도메인은 항원-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 항원-결합 도메인, 예를 들어 항-CD3 scFv)이다.
- [0302] 일부 구현예에서, 제1 표적 결합 도메인은 항-CD3 scFv일 수 있다. 일부 구현예에서, 항-CD3 scFv는 QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO: 21)와 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 QIVLTQSPAISASPGKEVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR(SEQ ID NO: 22)과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, scFv(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 scFv)는 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 링커 서열)을 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인 사이에 포함할 수 있다.
- [0303] 일부 구현예에서, 항-CD3 scFv는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩되는 중쇄 가변 도메인:
- [0304] CAAGTTCAGTCCAGCAAAGCGGCGCCGAACCTCGCTCGGCCGCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGTGAAGGCTCCGGCTATACCTTCACCCGGTACACAATGCACCTGGGTCAAGCAACGGCGCCGTCAGGTTTAGAGTGGATTGGCTATATCAACCCCTCCCGGGCTATACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAAGCCACCTCACCACCGACAAGTCCAGCAGCACCCTTACATGCAGCTGAGCTCTTAACATCCGAGGATTCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGTACTACGACGATCATTACTGCCTCGATTACTGGGGCCAAGGTACCACCTTAACAGTCTCTCC(SEQ ID NO: 23), 및/또는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 핵산에 의해 인코딩되는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다:
CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCGCTATTATGAGCGTAGCCCCGGTGAAAAGGTGACTATGACATGCAGCGCCAGCTCTTCGGTGAGCTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAGCCCTAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCGCGTCCCCGCTCACTTTCGGGGCTCCGGCTCCGAACAAGCTACTCTCTGACCATCAGCGCATGGAAGCCGAGGATGCCGTACCTATTACTGTGACAGTGGAGTCCAAACCCCTTCACCTTTGGATCCGGCACCAAGCTCGAGATTAATCGT(SEQ ID NO: 24).
- [0305] 일부 구현예에서, 항-CD3 scFv는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함할 수 있다:
- [0306] qivltqspaimsaspgkevmtmtcsasssvsymnwqqsgtspkrwiydtskiasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqwwssnpftfgsgtkleinrgggsgggsgggsgggsgvqlqqsgaelarpgasvkmckasgytftrytmhwvkprpgqglewigynpsrgytnynqkfkdkatltdkssstaymqllssltedsavyyccaryddhycldywgqgttlvtss(SEQ ID NO: 5). 일부 구현예에서, 항-CD3 scFv는 SEQ ID NO: 5에 존재하는 6개의 CDR을 포함할 수 있다.
- [0307] 일부 구현예에서, 항-CD3 scFv는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 핵산 서열에 의해 인코딩되는 서열을 포함할 수 있다:
- [0308] CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCGCTATTATGAGCGTAGCCCCGGTGAAAAGGTGACTATGACATGCAGCGCCAGCTCTTCGGTGAGCTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAGCCCTAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCGCGTCCCCGCTCACTTTCGGGGCTCCGGCTCCGAACAAGCTACTCTCTGACCATCAGCGCATGGAAGCCGAGGATGCCGTACCTATTACTGTGACAGTGGAGTCCAAACCCCTTCACCTTTGGATCCGGCACCAAGCTCGAGATTAATCGTGGAGGCGGAGGTAGCGGAGGAGGCGGATCCGGCGGTGGAGGTAGCCAAGTTCAGTCCAGCAAAGCGGCGCGGAACCTCGCTCGGCC

GGCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGTAAAGCCTCCGGCTATACCTTACCCGGTACACAATGCACTGGGTCAAGCAACGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATT
GGCTATATCAACCCCTCCCGGGCTATACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAAGCCACCCTCACCACCGACAAGTCCAGCAGCACCCTTACATGCAG
CTGAGCTCTTTAACATCCGAGGATTCCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGTACTACGACGATCATTACTGCCTCGATTACTGGGGCCAAGGTACCACCTTAACA
GTCTCCTCC(SEQ ID NO: 25).

[0309] 일부 구현예에서, CD28(예를 들어, 인간 CD28)에 특이적으로 결합하는 제2 표적-결합 도메인은 항원-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 항원-결합 도메인, 예를 들어 항-CD28 scFv)이다.

[0310] 일부 구현예에서, 항-CD28 scFv는
DIEMTQSPAIMASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQKPGSSPKLCIYSTNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTK
LETKR(SEQ ID NO: 26)과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동
일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 중쇄 가
변 도메인 및/또는
VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGN
YWGRGTTLTVSS(SEQ ID NO: 27)와 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도
85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는
경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0311] 일부 구현예에서, 항-CD28 scFv는
GACATCGAGATGACACAGTCCCCGCTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGTACAGCTTCTCCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTC
CACTGGTACCAGCAGAAACCCGGCTCCTCCCTAACTGTGTATCTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGCGGCGTGCCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCGGCAGC
ACCTCTTACTCTTTAACATTAGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGGTCCCTACCTTTGGCGGAGGCACAAAG
CTGGAGACCAAGCGG(SEQ ID NO: 28)와 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적
어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함
하는 핵산에 의해 인코딩되는 중쇄 가변 도메인, 및/또는
GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCGAACTGGTCAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAA
TGGGTGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAATCCCTACAACGATTACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGGCCACT
CTGACAAGCGACAAGAGCTCCATTACCGCTACATGGAGTTTCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAAT
TATTGGGGCCGGGAACTACTTTAACAGTGAGCTCC(SEQ ID NO: 29)와 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한,
적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100%
동일한) 서열을 포함하는 핵산에 의해 인코딩되는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0312] 일부 구현예에서, 항-CD28 scFv는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80%
동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서
열을 포함할 수 있다:

[0313] VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGN
YWGRGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIEMTQSPAIMASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQKPGSSPKLCIYSTNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTI
SSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR(SEQ ID NO: 6). 일부 구현예에서, 항-CD28 scFv는 SEQ ID NO: 6에 존재하는
6개의 CDR을 포함할 수 있다.

[0314] 일부 구현예에서, 항-CD28 scFv는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80%
동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 핵
산 서열에 의해 인코딩되는 서열을 포함할 수 있다:

[0315] GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCGAACTGGTCAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAA
TGGGTGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAATCCCTACAACGATTACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGGCCACT
CTGACAAGCGACAAGAGCTCCATTACCGCTACATGGAGTTTCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAAT
TATTGGGGCCGGGAACTACTTTAACAGTGAGCTCCGGCGGCGGGAAGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCAGCGACATCGAGATGACACAGTCC
CCCGTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGTACAGCTTCTCCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAAACCC
GGCTCCTCCCTAACTGTGTATCTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGCGGCGTGCCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCGGCAGCACCTCTTACTCTTTAACATT
AGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGGTCCCTACCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAGACCAAGCGG(SEQ
ID NO: 30).

[0316] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들

어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함할 수 있다:

[0317] QIVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP AHFRSGSGTSYSLTISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGTTNTVAAYNLTKWSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSI NPYNDYTKYNEKFKGKATLTSKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGSGGGSGGGGSDIEMTQSPA IMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISGMEAEADAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR(SEQ ID NO: 7).

[0318] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 CAGATCGTGTGACCCAAAGCCCGCCATCATGAGCGTAGCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCTACATGAACCTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAGCTCGAAATCAATCGTGGAGGAGTGGCAGCGCGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGCGCTGAACCTGGCCCGGCCGGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATCAACCCCTTCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCCTGACAAGAGCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCCTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCGCTTATAACCTCACATGAAGAGCACCAACTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGAGATCTCCACCAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCTCCGAAATTCACCCCTTATTAGAGACCAATTTAGGCCAGCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGACTTTAGTGCGCGGAATAACACATTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGCAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAGACCCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAATACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGGAGTTCCGGGAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACCTCGTAAACCCGGTGCTTCCGTGAAATGTCTTGAAGCCAGCGATACACCTTACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACCTTACAACGACTATACCAATACAACGAGAAGTTTAAGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAAGCTCCATCACAGCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGTGGGGCGACGGCAATTACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCTCTTTAGGCGAGCGGGTCAACATGACTTGTACAGCTCTCCAGCGTCTCTCTCTCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCTAACTGTGCATCTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGCGTGCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTACTCTTTAACCTCTCTCCATGGAGGTGAGGATGCCCCACCTACTTTTGTACCAGTACCACCGTCCCCACCTTCGGAGGCGGCACCAAACTGGAGACAAAGAGG(SEQ ID NO: 9)와 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 핵산에 의해 인코딩된다.

[0319] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함할 수 있다:

[0320] MKWVTFISLLFLFSSAYSQIVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP AHFRSGSGTSYSLTISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGTTNTVAAYNLTKWSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGSGGGSGGGGSDIEMTQSPA IMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISGMEAEADAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR(SEQ ID NO: 8).

[0321] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 하기 서열과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 75% 동일한, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 핵산에 의해 인코딩된다:

[0322] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTATTCAGCTCCGCTATTC

CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCTACATGAAGTGG
TATCAGCAGAAAAGCGGAACAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACC
AGCTACTCTTTAACCATTTCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTACATTTCGGATCTGGCACCAG
CTCGAAATCAATCGTGGAGGAGTGGCAGCGCGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGCGCTGAAGTGGCCCGGCC
GGCGCTCCGTCAAGATGAGTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCGCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATC
GGATATATCAACCCCTTCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCCTGACAAGAGCTCCTCCACCGCTACATGCAG
CTGTCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGTGTTTACTACTGCGTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGACAAGGTACCCTTTAACC
GTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCGGTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCAAGCCCGTCAAT
CAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGTCTTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAG
GACGTCAGCAAACTATCTGGTCCGGTCTTTTCTACCCCGTGGCAATGTGAGTCCACCGGTCCGTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCACCCCGAA
TTCACCCCTTATTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTA
GTGCGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACC
GCTAAGACCAACACCAACGAGTTTAAATTGACGTGGACAAGGCGGAGAACTACTGTTTACGCGTGAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAG
AGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAAGTTCGTGAAACCCCGTGTCTCC
GTGAAAATGTCTTGAAGGCCAGCGGATACACCTTCACTCTCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATC
AACCCCTTACAACGACTATACCAATACAACGAGAAGTTTAAAGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAAGCTCCATCACAGCTACATGGAGTTCAGTCTCT
TTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGACGGCAATTACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGCGGAGGC
TCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCGCTATCATGTCCGCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGT
ACAGCTCTCTCCAGCGTCTCTCTCTACTTCCATTGGTACCAACAGAACCAGGAGTCCCTAACTGTGCATCTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGC
GGCGTGCCCCCTAGGTTTTCGGAAGCGGAAGCACCAGCTACTCTTTAACCATCTCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTACCAGTAC
CACCGGTCCCCACCTTCGGAGGCGGCACCAAACTGGAGACAAAGAGG(SEQ ID NO: 10).

[0323] 추가 항원-결합 도메인

[0324] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예는 이의 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 이
상의(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의) 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본
원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)을 추가로 포함할 수 있다.

[0325] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 이의 N-말단에 하나 이상의(예를 들어, 2개, 3개, 4개,
5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의) 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에
알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이
드의 N-말단에서 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는
임의의 예시적인 표적-결합 도메인) 중 하나는 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업
계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거
나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 또는 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원
에 기재된 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인)에 직접적으로 인접해 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 단
일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 N-말단에서 적어도 하나의 추가 표적-결
합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)과 제1
표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합
도메인), 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표
적-결합 도메인), 또는 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 조직 인자
도메인) 사이에 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 링커 서
열)을 추가로 포함한다.

[0326] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 이
의 C-말단에 하나 이상의(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의) 추가 표적-결합
도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)을 추가로 포함
할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 C-말단에서 하나 이상의 추가 표적-결합 도메
인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인) 중 하나는 제
1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메
인), 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결
합 도메인), 또는 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의
예시적인 가용성 조직 인자 도메인)에 직접적으로 인접해 있다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이

들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개)의 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)은 각각 동일한 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 및 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개)의 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)은 각각 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개)의 추가 표적-결합 도메인은 각각 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0330] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 및 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개)의 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)은 상이한 항원에 특이적으로 결합한다.

[0331] 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 하나 이상의 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상의 표적-결합 도메인은 항원-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 항원-결합 도메인)이다. 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 각각 항원-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 항원-결합 도메인)이다. 일부 구현예에서, 항원-결합 도메인은 scFv 또는 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다.

[0332] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개)의 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)은 CD28, CD3, 또는 IL-2에 대한 수용체에 특이적으로 결합한다.

[0333] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 하나 이상의 제1 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인), 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)은 가용성 IL-2이다.

[0334] 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 하나 이상의(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의) 추가 표적-결합 도메인(들)(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)을 추가로 포함하며, 이때, 하나 이상의 추가 항원-결합 도메인(들) 중 적어도 하나는 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인)과 친화도 도메인의 쌍의 제1 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 친화도 도메인의 쌍의 임의의 예시적인 제1 도메인) 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 가용성 조직 인자 도메인)과 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인 중 적어도 하나(들)(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인) 사이에 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 링커 서열), 및/또는 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인 중 적어도 하나(들)(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)와 친화도 도메인의 쌍의 제1 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 친화도 도메인의 쌍의 본원에 기재된 임의의 예시적인 제1 도메인) 사이에 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 링커 서열)을 추가로 포함할 수 있다.

[0335] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 키메라 폴리펩타이드의 N-말단 및/또는 C-말단 단부에 하나 이상의(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의) 추가 표적-결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 표적-결합

예시적인 표적-결합 도메인) 사이에, 및/또는 (ii) 친화도 도메인의 쌍의 제1 도메인과, 가용성 조직 인자 도메인과 상기 친화도 도메인의 쌍의 제1 도메인 사이에 위치한 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인 중 적어도 하나 위치 사이에 배치된 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 링커 서열)을 추가로 포함한다.

[0337] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 상기 제2 키메라 폴리펩타이드의 N-말단 단부 및/또는 C-말단 단부에 하나 이상의(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의) 추가 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)는 제2 키메라 폴리펩타이드 내의 친화도 도메인의 쌍의 제2 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 친화도 도메인의 쌍의 임의의 예시적인 제2 도메인)에 직접적으로 인접해 있다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 상기 제2 키메라 폴리펩타이드 내의 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)와 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 친화도 도메인 쌍의 본원에 기재된 임의의 제2 도메인) 사이에 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 링커 서열)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)는 제2 키메라 폴리펩타이드 내의 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 표적-결합 도메인)에 직접적으로 인접해 있다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 상기 제2 키메라 폴리펩타이드 내에 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인)와 제2 표적-결합 도메인(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 표적-결합 도메인) 사이에 링커 서열(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 링커 서열)을 추가로 포함한다.

[0338] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 2개 이상(예를 들어, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 또는 10개 이상)의 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 동일한 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 2개 이상(예를 들어, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 또는 10개 이상)의 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 2개 이상(예를 들어, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 또는 10개 이상)의 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제1 표적-결합 도메인, 상기 제2 표적-결합 도메인, 및 상기 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 각각 동일한 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 상기 제1 표적-결합 도메인, 상기 제2 표적-결합 도메인, 및 상기 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 각각 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 상기 제1 표적-결합 도메인, 상기 제2 표적-결합 도메인, 및 상기 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 각각 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0339] 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 상이한 항원에 특이적으로 결합한다. 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인 중 하나 이상(예를 들어, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 또는 10개 이상)은 항원-결합 도메인이다. 일부 구현예에서, 제1 표적-결합 도메인, 제2 표적-결합 도메인, 및 하나 이상의 추가 표적-결합 도메인은 각각 항원-결합 도메인(예를 들어, scFv 또는 단일-도메인 항체)이다.

[0340] **신호 서열**

[0341] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 이의 N-말단 단부에 신호 서열을 추가로 포함할 수 있다. 당업자가 이해할 바와 같이, 신호 서열은, 많은 내인성적으로 생성된 단백질의 N-말단에 존재하고 상기 단백질을 분비 경로로 안내하는 아미노산 서열이다(예를 들어, 단백질은 소정의 세포내 소기관에 체류하도록, 세포막에 체류하도록, 또는 세포로부터 분비되도록 안내됨). 신호 서열은 이중성이고, 이의 1차 아미노산 서열에서 크게 차이가 난다. 그러나, 신호 서열은

전형적으로 16개 내지 30개 아미노산 길이이고, 친수성의 통상 양으로 하전된 N-말단 영역, 중심의 소수성 도메인, 및 신호 펩티다제에 대한 절단 부위를 함유하는 C-말단 영역을 포함한다.

[0342] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 아미노산 서열 MKWVTFISLLFLFSSAYS(SEQ ID NO: 33)를 갖는 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 핵산 서열: ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC(SEQ ID NO: 34), ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCTCTTCCAGCGCTACAGC(SEQ ID NO: 35), ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC (SEQ ID NO: 36), 또는

[0343] ATGAAATGGGTCACCTTCATCTCTTTACTGTTTTATTAGCAGCGCTACAGC(SEQ ID NO: 101)에 의해 인코딩되는 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0344] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 아미노산 서열 MKCLLYLAFLFLGVNC(SEQ ID NO: 37)를 갖는 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 아미노산 서열: MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVLIIITSIKAVYNFATCGILALVSLFLAGRSCG(SEQ ID NO: 38)를 갖는 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 아미노산 서열: MPNHQSGSPTGSSDLLSGKKQRPHLALRRKRRREMRKINRKVRMNLAPIKEKTAWQHLQALISEAEVLKTSQTPQNSLTLFLALLSVLGPPVTG(SEQ ID NO: 39)를 갖는 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 아미노산 서열 MDSKGSSQKGSRLLLLVSNLLLCQGVVS(SEQ ID NO: 40)를 갖는 신호 서열을 포함할 수 있다. 당업자는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드에 사용되기에 적절한 다른 신호 서열을 알고 있을 것이다.

[0345] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 약 10개 내지 100개 아미노산 길이인 신호 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 신호 서열은 약 10개 내지 100개 아미노산 길이, 약 15개 내지 100개 아미노산 길이, 약 20개 내지 100개 아미노산 길이, 약 25개 내지 100개 아미노산 길이, 약 30개 내지 100개 아미노산 길이, 약 35개 내지 100개 아미노산 길이, 약 40개 내지 100개 아미노산 길이, 약 45개 내지 100개 아미노산 길이, 약 50개 내지 100개 아미노산 길이, 약 55개 내지 100개 아미노산 길이, 약 60개 내지 100개 아미노산 길이, 약 65개 내지 100개 아미노산 길이, 약 70개 내지 100개 아미노산 길이, 약 75개 내지 100개 아미노산 길이, 약 80개 내지 100개 아미노산 길이, 약 85개 내지 100개 아미노산 길이, 약 90개 내지 100개 아미노산 길이, 약 95개 내지 100개 아미노산 길이, 약 10개 내지 95개 아미노산 길이, 약 10개 내지 90개 아미노산 길이, 약 10개 내지 85개 아미노산 길이, 약 10개 내지 80개 아미노산 길이, 약 10개 내지 75개 아미노산 길이, 약 10개 내지 70개 아미노산 길이, 약 10개 내지 65개 아미노산 길이, 약 10개 내지 60개 아미노산 길이, 약 10개 내지 55개 아미노산 길이, 약 10개 내지 50개 아미노산 길이, 약 10개 내지 45개 아미노산 길이, 약 10개 내지 40개 아미노산 길이, 약 10개 내지 35개 아미노산 길이, 약 10개 내지 30개 아미노산 길이, 약 10개 내지 25개 아미노산 길이, 약 10개 내지 20개 아미노산 길이, 약 10개 내지 15개 아미노산 길이, 약 20개 내지 30개 아미노산 길이, 약 30개 내지 40개 아미노산 길이, 약 40개 내지 50개 아미노산 길이, 약 50개 내지 60개 아미노산 길이, 약 60개 내지 70개 아미노산 길이, 약 70개 내지 80개 아미노산 길이, 약 80개 내지 90개 아미노산 길이, 약 90개 내지 100개 아미노산 길이, 약 20개 내지 90개 아미노산 길이, 약 30개 내지 80개 아미노산 길이, 약 40개 내지 70개 아미노산 길이, 약 50개 내지 60개 아미노산 길이, 또는 이들 사이의 임의의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 서열은 약 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개 또는 100개 아미노산 길이이다.

[0346] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 신호 서열은 상기 신호 서열의 기능이 무손상으로 유지되는 한, 이의 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 이상의 추가 아미노산(예를 들어, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 MKWVTFISLLFLFSSAYS(SEQ ID NO: 33)를 갖는 신호 서열은 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드를 분비 경로로 지시하는 능력을 여전히 보유하면서 N-말단 또는 C-말단에서 하나 이상의 추가 아미노산을 포함할 수 있다.

[0347] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드를 세포외 영역으로 지시하는 신호 서열을 포함할 수 있다. 이러한 구현예는 단리되고/거나 정제되기에 상대적으로 용이한 단일-사

슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 및 제2 키메라 폴리펩타이드를 생성하는 데 유용하다.

[0348] **펩타이드 태그**

[0349] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 펩타이드 태그를(예를 들어, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드의 N-말단 단부 또는 C-말단 단부에서) 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 2개 이상의 펩타이드 태그를 포함한다.

[0350] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드에 포함될 수 있는 예시적인 펩타이드 태그는 제한 없이 하기를 포함한다: AviTag(GLNDIFEAQKIEWHE; SEQ ID NO: 41), 칼모듈린-태그(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSGAL; SEQ ID NO: 42), 폴리글루타메이트 태그(EEEEE; SEQ ID NO: 43), E-태그(GAPVYPDPLEPR; SEQ ID NO: 44), FLAG-태그(DYKDDDDK; SEQ ID NO: 45), 헤마글루티닌으로부터의 펩타이드인 HA-태그(YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 46), his-태그(HHHHHH(SEQ ID NO: 47); HHHHHH(SEQ ID NO: 48); HHHHHH(SEQ ID NO: 49); HHHHHHHH(SEQ ID NO: 50); HHHHHHHH(SEQ ID NO: 51); 또는 HHHHHHHHHH(SEQ ID NO: 52)), myc-태그(EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 53), NE-태그(TKENPRSNQEESYDDNES; SEQ ID NO: 54), S-태그(KETAAAKFERQHMD; SEQ ID NO: 55), SBP-태그(MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRLARLEHHPQGQREP; SEQ ID NO: 56), Softag 1(SLAELLNAGLGGS; SEQ ID NO: 57), Softag 3(TQDPSRVG; SEQ ID NO: 58), Spot-태그(PDRVRAVSHWSS; SEQ ID NO: 59), Strep-태그(WSHPOQFEK; SEQ ID NO: 60), TC 태그(CCPGCC; SEQ ID NO: 61), Ty 태그(EVHTNQDPLD; SEQ ID NO: 62), V5 태그(GKPIPNPLGLDST; SEQ ID NO: 63), VSV-태그(YTDIEMNRLGK; SEQ ID NO: 64), 및 Xpress 태그(DLYDDDDK; SEQ ID NO: 65). 일부 구현예에서, 조직 인자 단백질은 펩타이드 태그이다.

[0351] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드에 포함될 수 있는 펩타이드 태그는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드와 관련된 임의의 여러 가지 적용에 사용될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 태그는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드의 정제에 사용될 수 있다. 하나의 비제한적인 예로서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 myc 태그를 포함할 수 있고; myc 태그(들)를 인식하는 항체를 사용하여 정제될 수 있다. Myc 태그를 인식하는 항체의 하나의 비제한적인 예는 비-상업적인 Developmental Studies Hybridoma Bank로부터 입수 가능한 9E10이다. 또 다른 비제한적인 예로서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 히스티딘 태그를 포함할 수 있고, 니켈 또는 코발트 킬레이트를 사용하여 정제될 수 있다. 당업자는 다른 적합한 태그 및 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드를 정제하는 데 사용되기 위한 태그에 결합하는 제제를 알고 있을 것이다. 일부 구현예에서, 펩타이드 태그는 정제 후에 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 펩타이드 태그는 정제 후에 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드로부터 제거되지 않는다.

[0352] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드에 포함될 수 있는 펩타이드 태그는 예를 들어, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드의 면역침전, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드의(예를 들어, 웨스턴 블로팅, ELISA, 유세포분석법, 및/또는 면역세포화학을 통한) 이미징화, 및/또는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드의 용해에 사용될 수 있다.

[0353] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드는 약 10개 내지 100개 아미노산 길이인 펩타이드 태그를 포함할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 태그는 약 10개 내지 100개 아미노산 길이, 약 15개 내지 100개 아미노산 길이, 약 20개 내지 100개 아미노산 길이, 약 25개 내지 100개 아미노산 길이, 약 30개 내지 100개 아미노산 길이, 약 35개 내지 100개 아미노산 길이, 약 40개 내지 100개 아미노산 길이, 약 45개 내지 100개 아미노산 길이, 약 50개 내지 100개 아미노산 길이, 약 55개 내지 100개 아미노산 길이, 약 60개 내지 100개 아미노산 길이, 약 65개 내지 100개 아미노산 길이, 약 70개 내지 100개 아미노산 길이, 약 75개 내지 100개 아미노산 길이, 약 80개 내지 100개 아미노산 길이, 약 85개 내지 100개 아미노산 길이, 약 90개 내지 100개 아미노산 길이, 약 95개 내지 100개 아미노산 길이, 약 10개 내지 95개 아미노산 길이, 약 10개 내지 90개 아미노산 길이, 약 10개 내지 85개 아미노산 길이, 약 10개 내지 80개 아미노산 길이, 약 10개 내지 75개 아미노산 길이, 약 10개 내지 70개 아미노산 길이, 약 10개 내지 65개 아미노산 길이, 약 10개 내지 60개 아미노산 길이, 약 10개 내지 55개 아미노산 길이, 약 10개 내지 50개 아미노산 길

이, 약 10개 내지 45개 아미노산 길이, 약 10개 내지 40개 아미노산 길이, 약 10개 내지 35개 아미노산 길이, 약 10개 내지 30개 아미노산 길이, 약 10개 내지 25개 아미노산 길이, 약 10개 내지 20개 아미노산 길이, 약 10개 내지 15개 아미노산 길이, 약 20개 내지 30개 아미노산 길이, 약 30개 내지 40개 아미노산 길이, 약 40개 내지 50개 아미노산 길이, 약 50개 내지 60개 아미노산 길이, 약 60개 내지 70개 아미노산 길이, 약 70개 내지 80개 아미노산 길이, 약 80개 내지 90개 아미노산 길이, 약 90개 내지 100개 아미노산 길이, 약 20개 내지 90개 아미노산 길이, 약 30개 내지 80개 아미노산 길이, 약 40개 내지 70개 아미노산 길이, 약 50개 내지 60개 아미노산 길이, 또는 이들 사이의 임의의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드 태그는 약 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개 또는 100개 아미노산 길이이다.

[0354] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드에 포함된 펩타이드 태그는 임의의 적합한 길이일 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 태그는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 아미노산 길이일 수 있다. 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 제1 키메라 폴리펩타이드, 또는 제2 키메라 폴리펩타이드가 2개 이상 펩타이드 태그를 포함하는 구현예에서, 2개 이상 펩타이드 태그는 동일하거나 상이한 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 펩타이드 태그는 상기 펩타이드 태그의 기능이 무손상으로 유지되는 한, 이의 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 이상의 추가 아미노산(예를 들어, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 EQKLISEEDL(SEQ ID NO: 53)을 갖는 myc 태그는 항체(예를 들어, 9E10)에 의해 결합되는 능력을 여전히 보유하면서 하나 이상의 추가 아미노산을(예를 들어, 펩타이드 태그의 N 말단 및/또는 C 말단에) 포함할 수 있다.

[0355] CD3/CD28-결합제

[0356] 하나 이상의 CD3/CD28-결합제(들)의 사용을 포함하는 방법이 본원에 제공된다. CD3/CD28-결합제는 예를 들어, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드, 이중-특이적 항체, 또는 항-CD3/항-CD28 비드일 수 있다.

[0357] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드

[0358] CD3/CD28-결합제의 비제한적인 예는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다. CD3/CD28-결합제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 비제한적인 예는 본원에 기재되어 있다.

[0359] 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드

[0360] CD3/CD28 결합제의 비제한적인 예는 (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합한다.

[0361] 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 66, 67 또는 74, 및 68의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 69, 70, 및 71의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73과 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 72를 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO: 73을 포함한다.

[0362] 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 제1 표적-결합 도메인과 가용성 조직 인자 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 가용성 조직 인자 도메인과 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 서로 직접적으로 인접해 있다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 가용성 조직 인자 도메인과 제2 표적-결합 도메인 사이에 링커 서열을 추가로 포함한다.

- [0363] 일부 구현예에서, CD3은 인간 CD3이다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 5와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.
- [0364] 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 가용성 인간 조직 인자 도메인이다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 인간 조직 인자 도메인은 SEQ ID NO: 2와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 야생형 가용성 인간 조직 인자로부터의 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0365] 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 임의의 것을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.
- [0366] 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 하기 중 하나 이상을 포함하지 않는다: 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 20번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 라이신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 22번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 이소류틴; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 45번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 트립토판; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 58번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아스파르트산; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 94번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 티로신; 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 135번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 아르기닌; 및 성숙한 야생형 인간 조직 인자 단백질의 140번 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치에서의 페닐알라닌.
- [0367] 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인은 혈액 응고를 개시하지 않는다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.
- [0368] 일부 구현예에서, CD28은 인간 CD28이다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 SEQ ID NO: 6과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드는 혈액 응고를 개시하지 않는다.
- [0369] 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM(또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위 범위)의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 50 nM 내지 약 300 nM(또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0370] **예시적인 성숙한 제1 키메라 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 102)**
- [0371] qivltqspaimsaspgkvtmtcsasssvsymnyqqksqgtspkriwydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaadaatyccqwwsnpftfgsgtkleinnrgggsgggsgggsggsgvqlqqsgaelarpgasvksckasgyfttrytmhwwkprpgqglewigynpsrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymq lssltedsavvycaryyddhycldywqggtlttvsssgtntvaaynltwkstnfktilewepkpvnvqvytvqistksdwwskcfytdtecdltdeivkdvkqtylarvfyspagnvestgsageplyenspeftpyletnlgqptiqsfegvgtkvntvedertlvrrnntflslrdvfgkdliytlyywkssssgkktaktntneflidvdkgenyfcfsqvavipsrtvnrkstdspvecmgqekgefreNWNVVISNLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
- [0372] **예시적인 성숙한 제1 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA(SEQ ID NO: 103)**
- [0373] CAGATCGTGTGACCCAAAGCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCTACATGAAC TGG

TATCAGCAGAAAAGCGGAACAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACC
AGCTACTCTTTAACCATTTCGGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTGCGATCTGGCACCAG
CTCGAAATCAATCGTGGAGGAGTGGCAGCGGCGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGCGCTGAACTGGCCCGGCC
GGCGCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATC
GGATATATCAACCCCTTCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCCTGACAAGAGCTCCTCCACCGCTACATGCAG
CTGTCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCCTTTAACC
GTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCAAGCCCGTCAAT
CAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTCTTACACAACAGACACCGAGTGTGATTAAACCGACGAAATCGTCAAG
GACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGTCTTTTCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCGAA
TTCACCCCTTATTAGAGACCAATTTAGGCCAGCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTA
GTGCGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTTCGCAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACC
GCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAAGTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAG
AGCACAGATTCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAAGTGGGTGAACGTCATCAGCAATTTAAGAAGATCGAAGATTTAATT
CAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACAGAAATCCGACGTGCACCCCTCTTGAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATC
TCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGC
TGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

[0374] 예시적인 전구체 제1 키메라 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 104)

[0375] mkwvtfisllflfssaysqivltqspaimsaspekvmtcsasssvsymnwyyqksgtsprwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeadaat
yycqwwsnpftfgsgtkleinrgggsgggsgggsgsqvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytfttrytmhvwkqrpqgglewiyginsprgytnynqkf
kdkatlttdkssstaymqlssltedsavyyccaryyddhycldywgqgtltvsssgtntvaaynltwkstnfktilewepkpvnvqytvqistksgdwks
kcfytdtedcltdeivdkvqktylarvfyspagnvestgsageplyenspeftpyletnlgqptiqsfeqvgtkvnvtvedertlvrrnntflslrdvfgk
dliytlyywkssssgkktaktntnefliidvdkgenycfsvqavipsrtvnrkstdspvecmgqekgefrenwvniSNLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH
PSCVKTAMKCFLLQLVISESGDASIHDTVENLILANNSLSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIQMFINTS

[0376] 예시적인 전구체 제1 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA(SEQ ID NO: 105)

[0377] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTTATTAGCTCCGCCTATTCC
CAGATCGTGTGACCCAAAGCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCAGCTCCGTGTCTACATGAAGTGG
TATCAGCAGAAAAGCGGAACAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACC
AGCTACTCTTTAACCATTTCGGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTGCGATCTGGCACCAG
CTCGAAATCAATCGTGGAGGAGTGGCAGCGGCGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGCGCTGAACTGGCCCGGCC
GGCGCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATC
GGATATATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCCTGACAAGAGCTCCTCCACCGCTACATGCAG
CTGTCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCCTTTAACC
GTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCAAGCCCGTCAAT
CAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTCTTACACAACAGACACCGAGTGTGATTAAACCGACGAAATCGTCAAG
GACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGTCTTTTCTACCCCGTGGCAATGTCGAGTCCACCGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCGAA
TTCACCCCTTATTAGAGACCAATTTAGGCCAGCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTA
GTGCGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTTCGCAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACC
GCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAAGTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAG
AGCACAGATTCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAAGTGGGTGAACGTCATCAGCAATTTAAGAAGATCGAAGATTTAATT
CAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACAGAAATCCGACGTGCACCCCTCTTGAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATC
TCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGC
TGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

[0378] 예시적인 성숙한 제2 키메라 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 106)

[0379] vqlqqsgpelvkgasvkmsckasgytftsyviqwvkqkpgqglewigsinpyndytkynekfkgkatltsdkssitaymefssltedsalyycarwgdgn
ywgrgtltvssggsgsgggsgggsggsdiemtqspaimsaslgervmtctasssvsssyfhwyyqkpgsspkciystnlasgvpprfsgsgtsyslti
ssmeadaatyfchqyhrsptfgggtkletkrITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPLKCIIR

[0380] 예시적인 성숙한 제2 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA(SEQ ID NO: 107)

[0381] GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCCGAAGTGGTCAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAA
TGGGTGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAATCCCTACAACGATTACACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGGCCACT
CTGACAAGCGACAAGAGCTCCATTACCGCTACATGGAGTTTCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAAT
TATTGGGGCCGGGAAGTACTTTAACAGTGAGCTCCGGCGGCGGGAAGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCAGCGACATCGAGATGACACAGTCC
CCCGTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGTACAGCTTCTCCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAAACCC
GGCTCCTCCCTAAAGTGTATCTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGCGGCTGCCTCCTCGTTTACGCGCTCCGGCAGCACCTCTTACTCTTTAACATT
AGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTGCCATCAGTACCACCGGTCCCTACCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAGACCAAGCGGATTACA
TGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCAGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTCAAGAGGAAG
GCCGGCACCAGCAGCTCACCAGTGCCTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[0382] **예시적인 전구체 제2 키메라 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 108)**

[0383] MKWVTFISLLFLFSSAYSvqlqqsgpelvkgasvksckasgytftsyviqwkqkpgqglewigsinpyndytkynekfkgkatltsdkssitaymefss
ltsedsalyycarwdgnywgrgtltvssggggsgggsgggsggsdiemtqspaimsaslgervtmtctasssvsssyfhwyyqkpgsspkiciystsnlas
gvpprfsgsgstsysltissmeaadaatyfchqyhrsptfgggtkletkrITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATN
VAHWHTPSLKCIR

[0384] **예시적인 전구체 제2 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA(SEQ ID NO: 109)**

[0385] ATGAAATGGGTACCTTCATCTCTTTACTGTTTTTATTTAGCAGCGCTACAGCGTGACGCTGCAGCAGTCCGGACCCGAAGTGGTCAAGCCCGGTGCCTCC
GTGAAATGTCTTGTAAAGCTTCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAATGGGTGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATC
AATCCCTACAACGATTACACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAAGGCAAGGCCACTCTGACAAGCGACAAGAGTCCATTACCGCTACATGGAGTTTCTCTCT
TTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAATTATTGGGGCCGGGAAGTACTTTAACAGTGAGCTCCGGCGGCGGCGGA
AGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCAGCGACATCGAGATGACACAGTCCCCCGCTATCATGAGCGCTCTTTAGGAGAAGCTGTGACCATGACTTGT
ACAGCTTCTCCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTCCTACTGGTACCAGCAGAAACCCGGCTCCTCCCTAAACTGTGTATCTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGC
GGCGTGCCTCCTCGTTTACGCGCTCCGGCAGCACCTCTTACTCTTTAACCATTAGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTAC
CACCGGTCCCTACCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAGACCAAGCGGATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCAGCCGACATCTGGGTGAAGAGC
TATAGCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCAGTGCCTGCTGAATAAGGCTACCAAC
GTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[0386] **항-CD3/항-CD28 비드**

[0387] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 항-CD3/항-CD28 비드일 수 있다. 항-CD3/항-CD28 비드는 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 항-CD28 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 이들은 둘 다 비드에 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항-CD3 scFv(예를 들어, 본원에 기재된 예시적인 항-CD3 scFv)이다. 일부 구현예에서, 항-CD28 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항-CD28 scFv(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항-CD28 scFv)이다. 비드는 당업계에 알려진 임의의 적합한 구형 중합체 입자일 수 있다. 비드의 평균 직경은 약 0.5 내지 약 20 마이크로미터(예를 들어, 약 0.5 내지 약 10 마이크로미터, 약 0.8 내지 약 8 마이크로미터, 또는 약 1 내지 약 5 마이크로미터)일 수 있다. 일부 구현예에서, 비드는 하나 이상의 상자성 물질, 예컨대 비제한적으로 다이나비드(dynabead)를 포함할 수 있다. 항-CD3/항-CD28 비드의 비제한적인 예는 항-CD3/항-CD28 다이나비드, 예컨대 ThermoFisher Scientific, Gibco, 및 Invitrogen에 의해 개발된 것들을 포함한다. 항-CD3/항-CD28 비드의 추가 상업적 공급원은 당업계에 알려져 있다.

[0388] **IL-2 수용체-활성화제**

[0389] 하나 이상의 IL-2 수용체-활성화제(들)의 사용을 포함하는 방법이 본원에 제공된다. IL-2 수용체-활성화제의 비제한적인 예는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드, 가용성 IL-2(예를 들어, 재조합 인간 IL-2), 및 IL-2 수용체(예를 들어, 인간 IL-2 수용체)에 특이적으로 결합하는 작용제성 항체를 포함한다.

[0390] **단일-사슬 키메라 폴리펩타이드**

[0391] 일부 구현예에서, IL-2 수용체-활성화제는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 IL-2에 대한 수용체에 결합한다. IL-2 수용체 활성화제인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 비제한적인

예는 본원에 기재되어 있다.

[0392] **가용성 IL-2**

[0393] 일부 예에서, IL-2 수용체-활성화제는 가용성 IL-2(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 가용성 IL-2 단백질)일 수 있다. 일부 구현예에서, 가용성 IL-2 단백질은 SEQ ID NO: 1과 적어도 80% 동일한, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한 서열을 포함할 수 있다.

[0394] **작용제성 항체**

[0395] 일부 예에서, IL-2 수용체 활성화제는 IL-2 수용체(예를 들어, 인간 IL-2 수용체)에 특이적으로 결합하는 작용제성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편일 수 있다(예를 들어, 문헌[Gaulton 등, *Clinical Immunology and Immunopathology* 36(1):18-29, 1985]에 기재된 것들 참조).

[0396] **IgG1 항체 작제물**

[0397] IgG1 항체 작제물은 IgG1 항체(예를 들어, 가용성 조직 인자 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 단일클론 또는 다중클론 IgG1 항체)일 수 있다. 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 IgG1 Fc 영역(예를 들어, 인간 IgG1 Fc 영역)을 포함하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 당해 분야에 공지된 것처럼, IgG1 Fc 영역은 CD16a(FcR감마III)(예를 들어, 인간 CD16a)에 결합하고, 이의 세포 내 신호전달을 유도한다. 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 CD16a(FcR감마III)(예를 들어, 인간 CD16a)에 특이적으로 결합할 수 있고 자연 살해 세포(예를 들어, 인간 자연 살해 세포)에서 이의 세포 내 신호전달을 유도할 수 있는 Fc 영역을 포함하고, 가용성 조직 인자도메인에 특이적으로 결합하는 단일-사슬 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 야생형 IgG1 Fc 도메인(예를 들어, 야생형 인간 IgG1 Fc 도메인, 예를 들어 SEQ ID NO: 98)과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한 또는 적어도 99% 동일한) 서열을 포함하고 CD16a(FcR감마III)(예를 들어, 인간 CD16a)에 특이적으로 결합할 수 있는 Fc 영역을 포함하고, 자연 살해 세포(예를 들어, 인간 자연 살해 세포)에서 이의 세포 내 신호전달을 유도할 수 있고, 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 가용성 조직 인자 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 가용성 조직 인자 도메인)에 특이적으로 결합하고, 비-인간 Fc 영역이 인간 CD16a(인간 FcR감마III)에 결합하고 자연 살해 세포(예를 들어, 인간 자연 살해 세포)에서 이의 세포 내 신호전달을 유도할 수 있도록 변경된(예를 들어, 야생형 비-인간 Fc 영역에서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개의 아미노산을 치환함으로써) 비-인간 Fc 영역(예를 들어, 비-인간 항체로부터의 Fc 영역)을 포함한다.

[0398] **야생형 인간 IgG1 Fc 영역(SEQ ID NO: 98)**

[0399] PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0400] 일부 예에서, IgG1 항체 작제물은 인간화 또는 완전 인간 항-조직 인자 항체이다(예를 들어, 미국 특허 제 7,968,094호 및 미국 특허 제 8,007,795호에 기재된 항-조직 인자 항체 참조).

[0401] 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 하기 CDR 서열 세트를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다: DYNVY(SEQ ID NO: 66)를 포함하는 CDR1; YIDPYNGITIYDQNFKG(SEQ ID NO: 67)를 포함하는 CDR2; 및 DVTALDF(SEQ ID NO: 68)를 포함하는 CDR3.

[0402] 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 하기 CDR 서열 세트를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다: DYNVY(SEQ ID NO: 66)를 포함하는 CDR1; YIDPYNGITIYDQNLKG(SEQ ID NO: 74)를 포함하는 CDR2; 및 DVTALDF(SEQ ID NO: 68)를 포함하는 CDR3.

[0403] **예시적인 중쇄 가변 도메인(SEQ ID NO: 72)**

[0404] QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSCKASGYSTFDYNYVWRVSPGKGLEWIGYIDPYNGITIYDQNFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARDVTTALDFWQGQTTVTVSS

- [0405] 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 72와 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 72%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.
- [0406] 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 하기 CDR 서열 세트를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다: LASQTIDTWLA(SEQ ID NO: 69)를 포함하는 CDR1; AATNLAD(SEQ ID NO: 70)를 포함하는 CDR2; 및 QQVYSSPFT(SEQ ID NO: 71)를 포함하는 CDR3.
- [0407] **예시적인 경쇄 가변 도메인(SEQ ID NO: 73)**
- [0408] DIQMTQSPASLSASVGDRTITCLASQTIDTWLAWYLQKPGKSPQLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFSFITISLQPEDFATYYCQQVYSSPFTFGQGT KLEIK
- [0409] 일부 구현예에서, IgG1 항체 작제물은 SEQ ID NO: 73과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 72%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.
- [0410] IgG1 항체 작제물의 비제한적인 예는 하기를 포함할 수 있다: SEQ ID NO: 72와 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 72%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 73과 적어도 70% 동일한(예를 들어, 적어도 72%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인.
- [0411] **mTOR 저해제**
- [0412] mTOR 저해제의 비제한적인 예는 라파마이신(시롤리무스(sirolimus)라고도 함), 조르트레스(Zortress)(에베롤리무스(everolimus) 및 RAD001이라고도 함), 토리셀(Torisel)(템시롤리무스(temsirolimus) 및 CCI-779라고도 함), 아피니토르(Afinitor)(에베롤리무스), 닥톨리시브(dactolisib)(NVP-BEZ235라고도 함), GSK2126458, XL765, AZD8055, INK128(MLN0128이라고도 함), OSI027, 및 라파링크(RapaLinks)를 포함한다.
- [0413] **T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 예시적인 방법**
- [0414] T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 T_{reg} 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는 CD3/CD28-결합체(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 CD3/CD28-결합체); 및 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 IL-2에 대한 수용체에 결합한다. 일부 예에서, 액체 배양 배지는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함한다. 일부 예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4와 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다.
- [0415] 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM(예를 들어, 약 10 nM 내지 약 450 nM, 약 10 nM 내지 약 400 nM, 약 10 nM 내지 약 350 nM, 약 10 nM 내지 약 300 nM, 약 10 nM 내지 약 250 nM, 약 10 nM 내지 약 200 nM, 약 10 nM 내지 약 150 nM, 약 10 nM 내지 약 100 nM, 약 10 nM 내지 약 50 nM, 약 50 nM 내지 약 500 nM, 약 50 nM 내지 약 450 nM, 약 50 nM 내지 약 400 nM, 약 50 nM 내지 약 350 nM, 약 50 nM 내지 약 300 nM, 약 50 nM 내지 약 250 nM, 약 50 nM 내지 약 200 nM, 약 50 nM 내지 약 150 nM, 약 50 nM 내지 약 100

nM, 약 100 nM 내지 약 500 nM, 약 100 nM 내지 약 450 nM, 약 100 nM 내지 약 400 nM, 약 100 nM 내지 약 350 nM, 약 100 nM 내지 약 300 nM, 약 100 nM 내지 약 250 nM, 약 100 nM 내지 약 200 nM, 약 100 nM 내지 약 150 nM, 약 150 nM 내지 약 500 nM, 약 150 nM 내지 약 450 nM, 약 150 nM 내지 약 400 nM, 약 150 nM 내지 약 350 nM, 약 150 nM 내지 약 300 nM, 약 150 nM 내지 약 250 nM, 약 150 nM 내지 약 200 nM, 약 200 nM 내지 약 500 nM, 약 200 nM 내지 약 450 nM, 약 200 nM 내지 약 400 nM, 약 200 nM 내지 약 350 nM, 약 200 nM 내지 약 300 nM, 약 200 nM 내지 약 250 nM, 약 250 nM 내지 약 500 nM, 약 250 nM 내지 약 450 nM, 약 250 nM 내지 약 400 nM, 약 250 nM 내지 약 350 nM, 약 250 nM 내지 약 300 nM, 약 300 nM 내지 약 500 nM, 약 300 nM 내지 약 450 nM, 약 300 nM 내지 약 400 nM, 약 300 nM 내지 약 350 nM, 약 350 nM 내지 약 500 nM, 약 350 nM 내지 약 450 nM, 약 350 nM 내지 약 400 nM, 약 400 nM 내지 약 500 nM, 약 400 nM 내지 약 450 nM, 또는 약 450 nM 내지 약 500 nM)의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.

[0416] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 항-CD3/항-CD28 비드(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 항-CD3/항-CD28 비드)이다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 1:1 내지 약 6:1 비드/세포(예를 들어, 약 1:1 내지 약 5:1, 약 1:1 내지 약 4:1, 약 1:1 내지 약 3:1, 약 1:1 내지 약 2:1, 약 2:1 내지 약 6:1, 약 2:1 내지 약 5:1, 약 2:1 내지 약 4:1, 약 2:1 내지 약 3:1, 약 3:1 내지 약 6:1, 약 3:1 내지 약 5:1, 약 3:1 내지 약 4:1, 약 4:1 내지 약 6:1, 약 4:1 내지 약 5:1, 약 5:1 내지 약 6:1 비드/세포)의 비로 포함한다.

[0417] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 제1 항원-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 특이적으로 결합하고 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함한다.

[0418] 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM(예를 들어, 약 10 nM 내지 약 950 nM, 약 10 nM 내지 약 900 nM, 약 10 nM 내지 약 850 nM, 약 10 nM 내지 약 800 nM, 약 10 nM 내지 약 750 nM, 약 10 nM 내지 약 700 nM, 약 10 nM 내지 약 650 nM, 약 10 nM 내지 약 600 nM, 약 10 nM 내지 약 550 nM, 약 10 nM 내지 약 500 nM, 약 10 nM 내지 약 450 nM, 약 10 nM 내지 약 400 nM, 약 10 nM 내지 약 350 nM, 약 10 nM 내지 약 300 nM, 약 10 nM 내지 약 250 nM, 약 10 nM 내지 약 200 nM, 약 10 nM 내지 약 150 nM, 약 10 nM 내지 약 100 nM, 약 10 nM 내지 약 50 nM, 약 25 nM 내지 약 1000 nM, 약 25 nM 내지 약 950 nM, 약 25 nM 내지 약 900 nM, 약 25 nM 내지 약 850 nM, 약 25 nM 내지 약 800 nM, 약 25 nM 내지 약 750 nM, 약 25 nM 내지 약 700 nM, 약 25 nM 내지 약 650 nM, 약 25 nM 내지 약 600 nM, 약 25 nM 내지 약 550 nM, 약 25 nM 내지 약 500 nM, 약 25 nM 내지 약 450 nM, 약 25 nM 내지 약 400 nM, 약 25 nM 내지 약 350 nM, 약 25 nM 내지 약 300 nM, 약 25 nM 내지 약 250 nM, 약 25 nM 내지 약 200 nM, 약 25 nM 내지 약 150 nM, 약 25 nM 내지 약 100 nM, 약 25 nM 내지 약 50 nM, 약 50 nM 내지 약 1000 nM, 약 50 nM 내지 약 950 nM, 약 50 nM 내지 약 900 nM, 약 50 nM 내지 약 850 nM, 약 50 nM 내지 약 800 nM, 약 50 nM 내지 약 750 nM, 약 50 nM 내지 약 700 nM, 약 50 nM 내지 약 650 nM, 약 50 nM 내지 약 600 nM, 약 50 nM 내지 약 550 nM, 약 50 nM 내지 약 500 nM, 약 50 nM 내지 약 450 nM, 약 50 nM 내지 약 400 nM, 약 50 nM 내지 약 350 nM, 약 50 nM 내지 약 300 nM, 약 50 nM 내지 약 250 nM, 약 50 nM 내지 약 200 nM, 약 50 nM 내지 약 150 nM, 약 50 nM 내지 약 100 nM, 약 100 nM 내지 약 1000 nM, 약 100 nM 내지 약 950 nM, 약 100 nM 내지 약 900 nM, 약 100 nM 내지 약 850 nM, 약 100 nM 내지 약 800 nM, 약 100 nM 내지 약 750 nM, 약 100 nM 내지 약 700 nM, 약 100 nM 내지 약 650 nM, 약 100 nM 내지 약 600 nM, 약 100 nM 내지 약 550 nM, 약 100 nM 내지 약 500 nM, 약 100 nM 내지 약 450 nM, 약 100 nM 내지 약 400 nM, 약 100 nM 내지 약 350 nM, 약 100 nM 내지 약 300 nM, 약 100 nM 내지 약 250 nM, 약 100 nM 내지 약 200 nM, 약 100 nM 내지 약 150 nM, 약 150 nM 내지 약 1000 nM, 약 150 nM 내지 약 950 nM, 약 150 nM 내지 약 900 nM, 약 150 nM 내지 약 850 nM, 약 150 nM 내지 약 800 nM, 약 150 nM 내지 약 750 nM, 약 150 nM 내지 약 700 nM, 약 150 nM 내지 약 650 nM, 약 150 nM 내지 약 600 nM, 약 150 nM 내지 약 550 nM,

약 150 nM 내지 약 500 nM, 약 150 nM 내지 약 450 nM, 약 150 nM 내지 약 400 nM, 약 150 nM 내지 약 350 nM, 약 150 nM 내지 약 300 nM, 약 150 nM 내지 약 250 nM, 약 150 nM 내지 약 200 nM, 약 200 nM 내지 약 1000 nM, 약 200 nM 내지 약 950 nM, 약 200 nM 내지 약 900 nM, 약 200 nM 내지 약 850 nM, 약 200 nM 내지 약 800 nM, 약 200 nM 내지 약 750 nM, 약 200 nM 내지 약 700 nM, 약 200 nM 내지 약 650 nM, 약 200 nM 내지 약 600 nM, 약 200 nM 내지 약 550 nM, 약 200 nM 내지 약 500 nM, 약 200 nM 내지 약 450 nM, 약 200 nM 내지 약 400 nM, 약 200 nM 내지 약 350 nM, 약 200 nM 내지 약 300 nM, 약 200 nM 내지 약 250 nM, 약 250 nM 내지 약 1000 nM, 약 250 nM 내지 약 950 nM, 약 250 nM 내지 약 900 nM, 약 250 nM 내지 약 850 nM, 약 250 nM 내지 약 800 nM, 약 250 nM 내지 약 750 nM, 약 250 nM 내지 약 700 nM, 약 250 nM 내지 약 650 nM, 약 250 nM 내지 약 600 nM, 약 250 nM 내지 약 550 nM, 약 250 nM 내지 약 500 nM, 약 250 nM 내지 약 450 nM, 약 250 nM 내지 약 400 nM, 약 250 nM 내지 약 350 nM, 약 250 nM 내지 약 300 nM, 약 300 nM 내지 약 1000 nM, 약 300 nM 내지 약 950 nM, 약 300 nM 내지 약 900 nM, 약 300 nM 내지 약 850 nM, 약 300 nM 내지 약 800 nM, 약 300 nM 내지 약 750 nM, 약 300 nM 내지 약 700 nM, 약 300 nM 내지 약 650 nM, 약 300 nM 내지 약 600 nM, 약 300 nM 내지 약 550 nM, 약 300 nM 내지 약 500 nM, 약 300 nM 내지 약 450 nM, 약 300 nM 내지 약 400 nM, 약 300 nM 내지 약 350 nM, 약 350 nM 내지 약 1000 nM, 약 350 nM 내지 약 950 nM, 약 350 nM 내지 약 900 nM, 약 350 nM 내지 약 850 nM, 약 350 nM 내지 약 800 nM, 약 350 nM 내지 약 750 nM, 약 350 nM 내지 약 700 nM, 약 350 nM 내지 약 650 nM, 약 350 nM 내지 약 600 nM, 약 350 nM 내지 약 550 nM, 약 350 nM 내지 약 500 nM, 약 350 nM 내지 약 450 nM, 약 350 nM 내지 약 400 nM, 약 400 nM 내지 약 1000 nM, 약 400 nM 내지 약 950 nM, 약 400 nM 내지 약 900 nM, 약 400 nM 내지 약 850 nM, 약 400 nM 내지 약 800 nM, 약 400 nM 내지 약 750 nM, 약 400 nM 내지 약 700 nM, 약 400 nM 내지 약 650 nM, 약 400 nM 내지 약 600 nM, 약 400 nM 내지 약 550 nM, 약 400 nM 내지 약 500 nM, 약 400 nM 내지 약 450 nM, 약 450 nM 내지 약 1000 nM, 약 450 nM 내지 약 950 nM, 약 450 nM 내지 약 900 nM, 약 450 nM 내지 약 850 nM, 약 450 nM 내지 약 800 nM, 약 450 nM 내지 약 750 nM, 약 450 nM 내지 약 700 nM, 약 450 nM 내지 약 650 nM, 약 450 nM 내지 약 600 nM, 약 450 nM 내지 약 550 nM, 약 450 nM 내지 약 500 nM, 약 500 nM 내지 약 1000 nM, 약 500 nM 내지 약 950 nM, 약 500 nM 내지 약 900 nM, 약 500 nM 내지 약 850 nM, 약 500 nM 내지 약 800 nM, 약 500 nM 내지 약 750 nM, 약 500 nM 내지 약 700 nM, 약 500 nM 내지 약 650 nM, 약 500 nM 내지 약 600 nM, 약 500 nM 내지 약 550 nM, 약 550 nM 내지 약 1000 nM, 약 550 nM 내지 약 950 nM, 약 550 nM 내지 약 900 nM, 약 550 nM 내지 약 850 nM, 약 550 nM 내지 약 800 nM, 약 550 nM 내지 약 750 nM, 약 550 nM 내지 약 700 nM, 약 550 nM 내지 약 650 nM, 약 550 nM 내지 약 600 nM, 약 600 nM 내지 약 1000 nM, 약 600 nM 내지 약 950 nM, 약 600 nM 내지 약 900 nM, 약 600 nM 내지 약 850 nM, 약 600 nM 내지 약 800 nM, 약 600 nM 내지 약 750 nM, 약 600 nM 내지 약 700 nM, 약 600 nM 내지 약 650 nM, 약 650 nM 내지 약 1000 nM, 약 650 nM 내지 약 950 nM, 약 650 nM 내지 약 900 nM, 약 650 nM 내지 약 850 nM, 약 650 nM 내지 약 800 nM, 약 650 nM 내지 약 750 nM, 약 650 nM 내지 약 700 nM, 약 700 nM 내지 약 1000 nM, 약 700 nM 내지 약 950 nM, 약 700 nM 내지 약 900 nM, 약 700 nM 내지 약 850 nM, 약 700 nM 내지 약 800 nM, 약 700 nM 내지 약 750 nM, 약 750 nM 내지 약 1000 nM, 약 750 nM 내지 약 950 nM, 약 750 nM 내지 약 900 nM, 약 750 nM 내지 약 850 nM, 약 750 nM 내지 약 800 nM, 약 800 nM 내지 약 1000 nM, 약 800 nM 내지 약 950 nM, 약 800 nM 내지 약 900 nM, 약 800 nM 내지 약 850 nM, 약 850 nM 내지 약 1000 nM, 약 850 nM 내지 약 950 nM, 약 850 nM 내지 약 900 nM, 약 900 nM 내지 약 1000 nM, 약 900 nM 내지 약 950 nM, 또는 약 950 nM 내지 약 1000 nM)의 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.

[0419] 일부 구현예에서, CD3/CD28 결합체는 (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함한다.

[0420] 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82%

동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 mTOR 저해제, 예를 들어, 라파마이신)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 mTOR 저해제를 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 포함하지 않는다.

[0421] 일부 구현예는 소정의 기간의 시작 후 각각 36시간 내지 약 60시간(예를 들어, 약 36 내지 약 56시간, 약 36 내지 약 52시간, 약 36 내지 약 48시간, 약 36 내지 약 44시간, 약 36 내지 약 40시간, 약 40 내지 약 60시간, 약 40 내지 약 56시간, 약 40 내지 약 52시간, 약 40 내지 약 48시간, 약 40 내지 약 44시간, 약 44 내지 약 60시간, 약 44 내지 약 56시간, 약 44 내지 약 52시간, 약 44 내지 약 48시간, 약 48 내지 약 60시간, 약 48 내지 약 56시간, 약 48 내지 약 52시간, 약 52 내지 약 60시간, 약 52 내지 약 56시간, 또는 약 56 내지 약 60시간) 후 액체 배양 배지에 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드)를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약 500 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행된다.

[0422] 일부 구현예에는 소성의 기간의 시작 후 각각 약 4일 내지 약 10일 후(예를 들어, 각각 약 4일 내지 약 9일 후, 각각 약 4일 내지 약 8일 후, 각각 약 4일 내지 약 7일 후, 각각 약 4일 내지 약 6일 후, 각각 약 4일 내지 약 5일 후, 각각 약 5일 내지 약 10일 후, 각각 약 5일 내지 약 9일 후, 각각 약 5일 내지 약 8일 후, 각각 약 5일 내지 약 7일 후, 각각 약 5일 내지 약 6일 후, 각각 약 6일 내지 약 10일 후, 각각 약 6일 내지 약 9일 후, 각각 약 6일 내지 약 8일 후, 각각 약 6일 내지 약 7일 후, 각각 약 7일 내지 약 10일 후, 각각 약 7일 내지 약 9일 후, 각각 약 7일 내지 약 8일 후, 각각 약 8일 내지 약 10일 후, 각각 약 8일 내지 약 9일 후, 또는 각각 약 9일 내지 약 10일 후) 액체 배양 배지에 CD3/CD28-결합체를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0423] 본원에 기재된 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 mTOR 저해제)를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 mTOR 저해제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 mTOR 저해제)를 포함한다.

[0424] 이들 방법의 일부 예에서, 액체 배양 배지는 무혈청 액체 배양 배지이다. 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 화학적으로-한정된 액체 배양 배지이다.

[0425] 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일(예를 들어, 약 7일 내지 약 56일, 약 7일 내지 약 54일, 약 7일 내지 약 46일, 약 7일 내지 약 38일, 약 7일 내지 약 32일, 약 7일 내지 약 28일, 약 7일 내지 약 25일, 약 7일 내지 약 23일, 약 7일 내지 약 21일, 약 7일 내지 약 19일, 약 7일 내지 약 17일, 약 7일 내지 약 15일, 약 7일 내지 약 13일, 약 7일 내지 약 11일, 약 7일 내지 약 9일, 약 9일 내지 약 56일, 약 9일 내지 약 54일, 약 9일 내지 약 46일, 약 9일 내지 약 38일, 약 9일 내지 약 32일, 약 9일 내지 약 28일, 약 9일 내지 약 25일, 약 9일 내지 약 23일, 약 9일 내지 약 21일, 약 9일 내지 약 19일, 약 9일 내지 약 17일, 약 9일 내지 약 15일, 약 9일 내지 약 13일, 약 9일 내지 약 11일, 약 11일 내지 약 56일, 약 11일 내지 약 54일, 약 11일 내지 약 46일, 약 11일 내지 약 38일, 약 11일 내지 약 32일, 약 11일 내지 약 28일, 약 11일 내지 약 25일, 약 11일 내지 약 23일, 약 11일 내지 약 21일, 약 11일 내지 약 19일, 약 11일 내지 약 17일, 약 11일 내지 약 15일, 약 11일 내지 약 13일, 약 13일 내지 약 56일, 약 13일 내지 약 54일, 약 13일 내지 약 46일, 약 13일 내지 약 38일, 약 13일 내지 약 32일, 약 13일 내지 약 28일, 약 13일 내지 약 25일, 약 13일 내지 약 23일, 약 13일 내지 약 21일, 약 13일 내지 약 19일, 약 13일 내지 약 17일, 약 13일 내지 약 15일, 약 15일 내지 약 56일, 약 15일 내지 약 54일, 약 15일 내지 약 46일, 약 15일 내지 약 38일, 약 15일 내지 약 32일, 약 15일 내지 약

28일, 약 15일 내지 약 25일, 약 15일 내지 약 23일, 약 15일 내지 약 21일, 약 15일 내지 약 19일, 약 15일 내지 약 17일, 약 17일 내지 약 56일, 약 17일 내지 약 54일, 약 17일 내지 약 46일, 약 17일 내지 약 38일, 약 17일 내지 약 32일, 약 17일 내지 약 28일, 약 17일 내지 약 25일, 약 17일 내지 약 23일, 약 17일 내지 약 21일, 약 17일 내지 약 19일, 약 19일 내지 약 56일, 약 19일 내지 약 54일, 약 19일 내지 약 46일, 약 19일 내지 약 38일, 약 19일 내지 약 32일, 약 19일 내지 약 28일, 약 19일 내지 약 25일, 약 19일 내지 약 23일, 약 19일 내지 약 21일, 약 21일 내지 약 56일, 약 21일 내지 약 54일, 약 21일 내지 약 46일, 약 21일 내지 약 38일, 약 21일 내지 약 32일, 약 21일 내지 약 28일, 약 21일 내지 약 25일, 약 21일 내지 약 23일, 약 23일 내지 약 56일, 약 23일 내지 약 54일, 약 23일 내지 약 46일, 약 23일 내지 약 38일, 약 23일 내지 약 32일, 약 23일 내지 약 28일, 약 23일 내지 약 25일, 약 25일 내지 약 56일, 약 25일 내지 약 54일, 약 25일 내지 약 46일, 약 25일 내지 약 38일, 약 25일 내지 약 32일, 약 25일 내지 약 28일, 약 28일 내지 약 56일, 약 28일 내지 약 54일, 약 28일 내지 약 50일, 약 28일 내지 약 46일, 약 28일 내지 약 38일, 약 28일 내지 약 32일, 약 32일 내지 약 56일, 약 32일 내지 약 54일, 약 32일 내지 약 46일, 약 32일 내지 약 38일, 약 38일 내지 약 56일, 약 38일 내지 약 54일, 약 38일 내지 약 46일, 약 46일 내지 약 56일, 약 46일 내지 약 54일, 약 54일 내지 약 56일)이다.

[0426] 일부 구현예는 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 단리 방법을 사용하여) T_{reg} 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0427] T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 예시적인 방법

[0428] T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법이 또한 본원에 제공되며, 방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 T_{reg} 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는 IL-2 수용체-활성화제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 IL-2 수용체 활성화제); 및 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하며, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다. 일부 예에서, 액체 배양 배지는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함한다.

[0429] 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다.

[0430] 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드)를 포함한다.

[0431] 일부 구현예에서, IL-2 수용체-활성화제는 가용성 IL-2이다. 일부 구현예에서, 인간 가용성 IL-2는 SEQ ID NO: 1과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 100 IU/mL 내지 약 800 IU/mL(예를 들어, 약 100 IU/mL 내지 약 800 IU/mL, 약 100 IU/mL 내지 약 700 IU/mL, 약 100 IU/mL 내지 약 600 IU/mL, 약 100 IU/mL 내지 약 500 IU/mL, 약 100 IU/mL 내지 약 400 IU/mL, 약 100 IU/mL 내지 약 300 IU/mL, 약 100 IU/mL 내지 약 200 IU/mL, 약 200 IU/mL 내지 약 800 IU/mL, 약 200 IU/mL 내지 약 700 IU/mL, 약 200 IU/mL 내지 약 600 IU/mL, 약 200 IU/mL 내지 약 500 IU/mL, 약 200 IU/mL 내지 약 400 IU/mL, 약 200 IU/mL 내지 약 300 IU/mL, 약 300 IU/mL 내지 약 800 IU/mL, 약 300 IU/mL 내지 약 700 IU/mL, 약 300 IU/mL 내지 약 600 IU/mL, 약 300 IU/mL 내지 약 500 IU/mL, 약 300 IU/mL 내지 약 400 IU/mL, 약 400 IU/mL 내지 약 800 IU/mL, 약 400 IU/mL 내지 약 700 IU/mL, 약 400 IU/mL 내지 약 600 IU/mL, 약 400 IU/mL 내지 약 500 IU/mL, 약 500 IU/mL 내지 약 800 IU/mL, 약 500 IU/mL 내지 약 700 IU/mL, 약 500 IU/mL 내지 약 600 IU/mL)

IU/mL, 약 600 IU/mL 내지 약 800 IU/mL, 약 600 IU/mL 내지 약 700 IU/mL, 또는 약 700 IU/mL 내지 약 800 IU/mL)의 인간 가용성 IL-2를 포함한다.

[0432] 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 mTOR 저해제, 예를 들어, 라파마이신)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 mTOR 저해제를 포함한다.

[0433] 이들 방법의 일부 구현예는 소정의 기간의 시작 후 각각 36시간 내지 약 60시간(예를 들어, 약 36 내지 약 56시간, 약 36 내지 약 52시간, 약 36 내지 약 48시간, 약 36 내지 약 44시간, 약 36 내지 약 40시간, 약 40 내지 약 60시간, 약 40 내지 약 56시간, 약 40 내지 약 52시간, 약 40 내지 약 48시간, 약 40 내지 약 44시간, 약 44 내지 약 60시간, 약 44 내지 약 56시간, 약 44 내지 약 52시간, 약 44 내지 약 48시간, 약 48 내지 약 60시간, 약 48 내지 약 56시간, 약 48 내지 약 52시간, 약 52 내지 약 60시간, 약 52 내지 약 56시간, 또는 약 56 내지 약 60시간) 후 액체 배양 배지에 IL-2 수용체-활성화제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 IL-2 수용체-활성화제)를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, IL-2 수용체-활성화제의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약 1000 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 IL-2 수용체-활성화제의 농도를 초래하도록 수행된다.

[0434] 이들 방법의 일부 구현예는 소정의 기간의 시작 후 각각 약 4일 내지 약 10일 후(예를 들어, 각각 약 4일 내지 약 9일 후, 각각 약 4일 내지 약 8일 후, 각각 약 4일 내지 약 7일 후, 각각 약 4일 내지 약 6일 후, 각각 약 4일 내지 약 5일 후, 각각 약 5일 내지 약 10일 후, 각각 약 5일 내지 약 9일 후, 각각 약 5일 내지 약 8일 후, 각각 약 5일 내지 약 7일 후, 각각 약 5일 내지 약 6일 후, 각각 약 6일 내지 약 10일 후, 각각 약 6일 내지 약 9일 후, 각각 약 6일 내지 약 8일 후, 각각 약 6일 내지 약 7일 후, 각각 약 7일 내지 약 10일 후, 각각 약 7일 내지 약 9일 후, 각각 약 7일 내지 약 8일 후, 각각 약 8일 내지 약 10일 후, 각각 약 8일 내지 약 9일 후, 또는 각각 약 9일 내지 약 10일 후) 액체 배양 배지에 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드)를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0435] 이들 방법의 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일(예를 들어, 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)이다.

[0436] 일부 구현예는 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 분리 방법을 사용하여) T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0437] **T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 예시적인 방법**

[0438] T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 방법이 또한 본원에 제공되며, 방법은 소정의 기간에 걸쳐 액체 배양 배지에서 T_{reg} 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 소정의 기간의 시작 시, 액체 배양 배지는 CD3/CD28-결합제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 CD3/CD28-결합제); 및 (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합된다(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드). 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함한다.

[0439] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제는 항-CD3/항-CD28 비드(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항-CD3/항-CD28 비드)이다. 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 항-CD3/항-CD28 비드를 약 1:1 내지 약 6:1 비드/세포(예를 들어, 약 1:1 내지 약 5:1, 약 1:1 내지 약 4:1, 약 1:1 내지 약 3:1, 약 1:1 내지 약 2:1, 약 2:1 내지 약 6:1, 약 2:1 내지 약 5:1, 약 2:1 내지 약 4:1, 약 2:1 내지 약 3:1, 약 3:1 내지 약 6:1, 약 3:1 내지 약 5:1, 약 3:1 내지 약 4:1, 약 4:1 내지 약 6:1, 약 4:1 내지 약 5:1, 약 5:1 내지 약 6:1 비드/세포)의 비로 포함한다.

[0440] 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다(예를 들어

어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드). 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 7과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.

[0441] 일부 구현예에서, CD3/CD28 결합제는 (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합되고; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함한다.

[0442] 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 102와 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 104와 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 106과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 키메라 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 108과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 82% 동일한, 적어도 84% 동일한, 적어도 86% 동일한, 적어도 88% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 98% 동일한, 적어도 99% 동일한, 또는 100% 동일한) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 1000 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함한다.

[0443] 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 mTOR 저해제, 예를 들어, 라파마이신)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 약 10 nM 내지 약 500 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 mTOR 저해제를 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 mTOR 저해제를 포함하지 않는다.

[0444] 이들 방법의 일부 구현예는 소정의 기간의 시작 후 각각 36시간 내지 약 60시간(예를 들어, 약 36 내지 약 56시간, 약 36 내지 약 52시간, 약 36 내지 약 48시간, 약 36 내지 약 44시간, 약 36 내지 약 40시간, 약 40 내지 약 60시간, 약 40 내지 약 56시간, 약 40 내지 약 52시간, 약 40 내지 약 48시간, 약 40 내지 약 44시간, 약 44 내지 약 60시간, 약 44 내지 약 56시간, 약 44 내지 약 52시간, 약 44 내지 약 48시간, 약 48 내지 약 60시간, 약 48 내지 약 56시간, 약 48 내지 약 52시간, 약 52 내지 약 60시간, 약 52 내지 약 56시간, 또는 약 56 내지 약 60시간) 후 액체 배양 배지에 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드)를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 주기적 첨가는 액체 배양 배지 내 약 10 nM 내지 약 500 nM(예를 들어 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 농도를 초래하도록 수행된다.

[0445] 이들 방법의 일부 구현예는 소정의 기간의 시작 후 각각 약 4일 내지 약 10일 후(예를 들어, 각각 약 4일 내지 약 9일 후, 각각 약 4일 내지 약 8일 후, 각각 약 4일 내지 약 7일 후, 각각 약 4일 내지 약 6일 후, 각각 약 4일 내지 약 5일 후, 각각 약 5일 내지 약 10일 후, 각각 약 5일 내지 약 9일 후, 각각 약 5일 내지 약 8일 후, 각각 약 5일 내지 약 7일 후, 각각 약 5일 내지 약 6일 후, 각각 약 6일 내지 약 10일 후, 각각 약 6일 내지 약

9일 후, 각각 약 6일 내지 약 8일 후, 각각 약 6일 내지 약 7일 후, 각각 약 7일 내지 약 10일 후, 각각 약 7일 내지 약 9일 후, 각각 약 7일 내지 약 8일 후, 각각 약 8일 내지 약 10일 후, 각각 약 8일 내지 약 9일 후, 또는 각각 약 9일 내지 약 10일 후) 액체 배양 배지에 CD3/CD28-결합제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 CD3/CD28-결합제)를 주기적으로 첨가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0446] 이들 방법의 일부 구현예에서, 소정의 기간은 약 7일 내지 약 56일(예를 들어, 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)이다.

[0447] 일부 구현예는 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 분리 방법을 사용하여) T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0448] 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 방법

[0449] 본원에 기재된 바와 같은 T_{reg} 세포의 증식을 자극시키거나 증가시키는 임의의 방법은 배양 단계 전에, 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0450] 시료는 혈액 시료(예를 들어, 말초 혈액 시료 또는 체대혈 시료), 림프양 조직, 또는 흉선 시료(예를 들어, 소아 흉선 시료)일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예는 대상체로부터 시료를 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0451] 대상체로부터 수득된 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 자기-활성화된 세포 선별(MACS) 및/또는 형광-활성화된 세포 선별(FACS)는 마커 표면에 기초하여 T_{reg} 세포를 분리하는 데 사용될 수 있다. FACS 장비의 비제한적인 예는 FACSria (Becton Dickinson), FX500 유체 세포 선별기(Sony), 및 MACSQuant Tyto 세포 선별기(Miltenyi Biotec)를 포함한다. 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하기 위한 예시적인 세포 표면 단백질은 CD4, CD25, 및 CD127을 포함한다. T_{reg} 세포에 대한 세포내 마커는 Foxp3이다. 예를 들어, CD4 및 CD25의 발현 수준은 시료(예를 들어, 체대혈 시료)로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 데 사용될 수 있다. CD127의 발현 수준은 시료(예를 들어, 말초 혈액 시료)로부터 T_{reg} 세포를 분리하기 위한 추가 마커로서 사용될 수 있다. 일부 경우, 시료로부터 T_{reg} 세포를 분리하는 단계는 $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ 이고/이거나 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{dim}$ 인 T_{reg} 세포를 선별하는 단계를 포함한다. T_{reg} 세포를 분리하기 위한 키트는 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{dim}$ 조절 T 세포 분리 키트 II 시약(Miltenyi Biotec)을 포함한다. T_{reg} 세포를 분리하기 위한 추가 키트는 StemCell Technologies(EasySepTM 인간 $CD4^{+}CD127^{low}$, $CD25^{+}$ 조절 T 세포 분리 키트), Miltenyi Biotec(인간 $CD4^{+}CD25^{+}$ 조절 T 세포 분리 키트), 및 R&D Systems(MagCelect 인간 $CD4^{+}CD25^{+}$ 조절 T 세포 분리 키트)로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0452] 대상체로부터 수득된 시료로부터 Treg 세포를 분리하는 방법이 또한 본원에 제공되며, 이의 CD39의 발현에 기초하여 시료로부터 Treg 세포를 분리하여 Treg 세포를 분리하는 단계를 포함한다. 이들 방법의 일부 구현예는 CD39를 발현하는 Treg 세포에 항체 또는 리간드가 결합하게 하는 조건 하에, CD39에 결합할 수 있는 항체 또는 리간드와 시료를 혼합하는 단계; 및 항체 또는 리간드에 결합된 Treg 세포를 시료 내 다른 구성요소로부터 분리하여 Treg 세포를 분리하는 단계를 포함한다. 이들 방법의 일부 구현예에서, 항체는 마우스, 인간화, 또는 인간 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고/또는 항체 또는 리간드는 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 또는 형광단 중 적어도 하나로 표지되거나, 입자, 비드, 수지, 또는 고체 지지체에 결합된다. 이들 방법의 일부 구현예에서, 분리는 유세포측정법, 형광-활성화된 세포 선별(FACS), 원심분리, 또는 컬럼, 플레이트, 입자, 또는 비드-기초 방법의 사용을 포함한다. 이들 방법의 일부 구현예는 Treg 세포에 항체 또는 리간드가 결합하게 하는 조건 하에, CD39에 결합할 수 있는 비오틴화된 항체 또는 리간드와 시료를 혼합하는 단계;

[0453] 스트렙타비딘-코팅된 자성 입자를 사용하여, 비오틴화된 항체 또는 리간드에 결합된 Treg 세포를 포착하는 단계; 자석을 사용하여, 자성 입자-결합된 Treg 세포를 분리하는 단계; 자성 입자-결합된 Treg 세포를 세척하여 시료 내 다른 구성요소를 제거하는 단계; 및 자석으로부터 자성 입자-결합된 Treg 세포를 용액 내로 방출시켜 Treg 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0454] 일부 예에서, Treg 세포는 신선한 또는 냉동된 말초 혈액, 체대혈, 말초 혈액 단핵 세포, 림프구, $CD4^{+}$ T 세포

또는 Treg 세포를 포함하는 시료로부터 분리되는 자가 Treg 세포, 동일단배체 Treg 세포, 또는 동종이계 Treg 세포이다. 일부 예에서, Treg 세포는 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 세포이다. 일부 예에서, Treg 세포는 $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ 세포이다. 일부 예에서, Treg 세포는 키메라 항원 수용체를 포함한다. 일부 예에서, Treg 세포는 시험관내에서 그리고 생체내에서 면역억제성이다.

[0455] 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성되고/되거나 분리된, 분리된 Treg 세포의 집단이 또한 본원에 제공된다. 일부 예에서, 분리된 Treg 세포의 집단은 70% 초과(예를 들어, 75% 초과, 80% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과)의 $CD39^+$ 세포이다. 일부 예에서, 본원에 제공된 분리된 Treg 세포 또는 분리된 Treg 세포의 집단은 시험관내에서 추가로 확장된다. 본원에 기재된 임의의 분리된 Treg 세포의 집단을 확장시키는 방법이 또한 제공되며, 분리된 Treg 세포의 증식을 가능하게 하는 조건 하에 분리된 Treg 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함한다.

[0456] 본원에 기재된 임의의 분리된 Treg 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 또한 본원에 제공된다. 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 또한 본원에 제공되며, 치료적 유효량의 본원에 기재된 임의의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 예에서, 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단되었다. 일부 예에서, 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 낭성 섬유증, 췌장염에서의 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간판 퇴행, 황반변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방세포 위축, 지방이영양증, 죽상동맥경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골질량 손실, 심근 경색, 사르코페니아, 상처 치유, 탈모증, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 연령 연관된 폐 조직 탄성 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간 경변증, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴 질환, 척추손괴 실조증, 다발성 경화증 및 신장 기능이상으로부터 선택된다. 일부 예에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측삭 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 케양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애의 군으로부터 선택된다.

[0457] **T_{reg} 세포**

[0458] 본원에 기재된 임의의 방법, 조성물, 및 키트의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 말초 혈액 또는 제대혈로부터 분리되는 자가 T_{reg} 세포, 동일단배체 T_{reg} 세포, 또는 동종이계 T_{reg} 세포일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법, 조성물, 및 키트의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 세포일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법, 조성물, 및 키트의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ 세포일 수 있다.

[0459] 본원에 기재된 임의의 방법, 조성물, 및 키트의 일부 구현예에서, T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체 또는 재조합 T-세포 수용체를 포함할 수 있다. 일부 예에서, T_{reg} 세포는 키메라 항원 수용체 또는 재조합 T-세포 수용체를 발현하도록 사전에 유전적으로 변형되었다. 일부 예에서, T_{reg} 세포는 표적 조직에서 관심 펩타이드 또는 공동-자극성 분자(예를 들어, ICOS)를 인식하는 재조합 T-세포 수용체를 발현하도록 사전에 유전적으로 변형되었다.

[0460] 이들 방법의 일부 구현예는 배양 단계 후에, 키메라 항원-수용체 또는 재조합 T-세포 수용체를 인코딩하는 핵산을 T_{reg} 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이들 방법의 일부 구현예는 배양 단계 후에, 공동-자극성 분자(예를 들어, ICOS)를 인코딩하는 핵산을 T_{reg} 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0461] 이들 방법의 일부 구현예는 배양 단계 전에, 키메라 항원-수용체 또는 재조합 T-세포 수용체를 인코딩하는 핵산을 T_{reg} 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이들 방법의 일부 구현예는 배양 단계 전에, 공동-자극성 분자(예를 들어, ICOS)를 인코딩하는 핵산을 T_{reg} 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0462] T_{reg} 세포의 증식의 검출은 당업계에 알려진 방법, 예를 들어, 유세포측정법(예를 들어, 형광-보조 유세포측정법), 현미경 분석, 및 면역형광 현미경 분석을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, T_{reg} 세포의 증식은 염료(예를 들어, 트립판 블루)로 염색하고 생존 세포의 수를 카운팅함으로써 결정될 수 있다. 일부 예에서, T_{reg} 세포의 증식 및/또는 활성화는 예컨대 비제한적으로 헬리오스, CTLA-4, CD39, CD62L, CD25, CD103,

CD69, PD1 및 CD49b와 같이 T_{reg} 세포 상의 표면 마커의 수준을 검출함으로써 결정될 수 있다. 이들 표면 마커의 검출은 FACS를 사용하여 수행될 수 있다. T_{reg} 세포의 활성화는 또한 T_{reg} 세포에서 포도당 대사의 수준을 검출함으로써 결정될 수 있다. 일부 예에서, 포도당 대사는 비-해당작용성 산성화(약물 없음), 해당작용(포도당의 첨가), 해당작용 역량(올리고마이신의 첨가), 및 해당작용 비측량(2-데옥시글루코스의 첨가)의 단계를 수반하는 세포외 산성화율(ECAR: extracellular acidification rate)을 측정함으로써 결정될 수 있다. 세포외 유량 분석기(Agilent)가 ECAR을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0463] 일부 예에서, T_{reg} 세포의 증식 및/또는 활성화는 IL-10 분비 수준의 증가를 검출함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법은 T_{reg} 세포에 의해 분비되는(예를 들어, 소정의 기간의 시작과 비교하여 소정의 기간의 종료 시) IL-10의 수준에서, 약 1% 내지 약 800%(예를 들어, 약 1% 내지 약 750%, 약 1% 내지 약 700%, 약 1% 내지 약 650%, 약 1% 내지 약 600%, 약 1% 내지 약 550%, 약 1% 내지 약 500%, 약 1% 내지 약 450%, 약 1% 내지 약 400%, 약 1% 내지 약 350%, 약 1% 내지 약 300%, 약 1% 내지 약 280%, 약 1% 내지 약 260%, 약 1% 내지 약 240%, 약 1% 내지 약 220%, 약 1% 내지 약 200%, 약 1% 내지 약 180%, 약 1% 내지 약 160%, 약 1% 내지 약 140%, 약 1% 내지 약 120%, 약 1% 내지 약 100%, 약 1% 내지 약 90%, 약 1% 내지 약 80%, 약 1% 내지 약 70%, 약 1% 내지 약 60%, 약 1% 내지 약 50%, 약 1% 내지 약 45%, 약 1% 내지 약 40%, 약 1% 내지 약 35%, 약 1% 내지 약 30%, 약 1% 내지 약 25%, 약 1% 내지 약 20%, 약 1% 내지 약 15%, 약 1% 내지 약 10%, 약 1% 내지 약 5%, 약 5% 내지 약 800%, 약 5% 내지 약 750%, 약 5% 내지 약 700%, 약 5% 내지 약 650%, 약 5% 내지 약 600%, 약 5% 내지 약 550%, 약 5% 내지 약 500%, 약 5% 내지 약 450%, 약 5% 내지 약 400%, 약 5% 내지 약 350%, 약 5% 내지 약 300%, 약 5% 내지 약 280%, 약 5% 내지 약 260%, 약 5% 내지 약 240%, 약 5% 내지 약 220%, 약 5% 내지 약 200%, 약 5% 내지 약 180%, 약 5% 내지 약 160%, 약 5% 내지 약 140%, 약 5% 내지 약 120%, 약 5% 내지 약 100%, 약 5% 내지 약 90%, 약 5% 내지 약 80%, 약 5% 내지 약 70%, 약 5% 내지 약 60%, 약 5% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 45%, 약 5% 내지 약 40%, 약 5% 내지 약 35%, 약 5% 내지 약 30%, 약 5% 내지 약 25%, 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 800%, 약 10% 내지 약 750%, 약 10% 내지 약 700%, 약 10% 내지 약 650%, 약 10% 내지 약 600%, 약 10% 내지 약 550%, 약 10% 내지 약 500%, 약 10% 내지 약 450%, 약 10% 내지 약 400%, 약 10% 내지 약 350%, 약 10% 내지 약 300%, 약 10% 내지 약 280%, 약 10% 내지 약 260%, 약 10% 내지 약 240%, 약 10% 내지 약 220%, 약 10% 내지 약 200%, 약 10% 내지 약 180%, 약 10% 내지 약 160%, 약 10% 내지 약 140%, 약 10% 내지 약 120%, 약 10% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 90%, 약 10% 내지 약 80%, 약 10% 내지 약 70%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 45%, 약 10% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 35%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 20%, 약 10% 내지 약 15%, 약 15% 내지 약 800%, 약 15% 내지 약 750%, 약 15% 내지 약 700%, 약 15% 내지 약 650%, 약 15% 내지 약 600%, 약 15% 내지 약 550%, 약 15% 내지 약 500%, 약 15% 내지 약 450%, 약 15% 내지 약 400%, 약 15% 내지 약 350%, 약 15% 내지 약 300%, 약 15% 내지 약 280%, 약 15% 내지 약 260%, 약 15% 내지 약 240%, 약 15% 내지 약 220%, 약 15% 내지 약 200%, 약 15% 내지 약 180%, 약 15% 내지 약 160%, 약 15% 내지 약 140%, 약 15% 내지 약 120%, 약 15% 내지 약 100%, 약 15% 내지 약 90%, 약 15% 내지 약 80%, 약 15% 내지 약 70%, 약 15% 내지 약 60%, 약 15% 내지 약 50%, 약 15% 내지 약 45%, 약 15% 내지 약 40%, 약 15% 내지 약 35%, 약 15% 내지 약 30%, 약 15% 내지 약 25%, 약 15% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 800%, 약 20% 내지 약 750%, 약 20% 내지 약 700%, 약 20% 내지 약 650%, 약 20% 내지 약 600%, 약 20% 내지 약 550%, 약 20% 내지 약 500%, 약 20% 내지 약 450%, 약 20% 내지 약 400%, 약 20% 내지 약 350%, 약 20% 내지 약 300%, 약 20% 내지 약 280%, 약 20% 내지 약 260%, 약 20% 내지 약 240%, 약 20% 내지 약 220%, 약 20% 내지 약 200%, 약 20% 내지 약 180%, 약 20% 내지 약 160%, 약 20% 내지 약 140%, 약 20% 내지 약 120%, 약 20% 내지 약 100%, 약 20% 내지 약 90%, 약 20% 내지 약 80%, 약 20% 내지 약 70%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 45%, 약 20% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 35%, 약 20% 내지 약 30%, 약 20% 내지 약 25%, 약 25% 내지 약 800%, 약 25% 내지 약 750%, 약 25% 내지 약 700%, 약 25% 내지 약 650%, 약 25% 내지 약 600%, 약 25% 내지 약 550%, 약 25% 내지 약 500%, 약 25% 내지 약 450%, 약 25% 내지 약 400%, 약 25% 내지 약 350%, 약 25% 내지 약 300%, 약 25% 내지 약 280%, 약 25% 내지 약 260%, 약 25% 내지 약 240%, 약 25% 내지 약 220%, 약 25% 내지 약 200%, 약 25% 내지 약 180%, 약 25% 내지 약 160%, 약 25% 내지 약 140%, 약 25% 내지 약 120%, 약 25% 내지 약 100%, 약 25% 내지 약 90%, 약 25% 내지 약 80%, 약 25% 내지 약 70%, 약 25% 내지 약 60%, 약 25% 내지 약 50%, 약 25% 내지 약 45%, 약 25% 내지 약 40%, 약 25% 내지 약 35%, 약 35% 내지 약 800%, 약 35% 내지 약 750%, 약 35% 내지 약 700%, 약 35% 내지 약 650%, 약 35% 내지 약 600%, 약 35% 내지 약 550%, 약 35% 내지 약 500%, 약 35% 내지 약 450%, 약 35% 내지 약 400%, 약 35% 내지 약 350%, 약

[illegible]

650%, 약 160% 내지 약 600%, 약 160% 내지 약 550%, 약 160% 내지 약 500%, 약 160% 내지 약 450%, 약 160% 내지 약 400%, 약 160% 내지 약 350%, 약 160% 내지 약 300%, 약 160% 내지 약 280%, 약 160% 내지 약 260%, 약 160% 내지 약 240%, 약 160% 내지 약 220%, 약 160% 내지 약 200%, 약 160% 내지 약 180%, 약 180% 내지 약 800%, 약 180% 내지 약 750%, 약 180% 내지 약 700%, 약 180% 내지 약 650%, 약 180% 내지 약 600%, 약 180% 내지 약 550%, 약 180% 내지 약 500%, 약 180% 내지 약 450%, 약 180% 내지 약 400%, 약 180% 내지 약 350%, 약 180% 내지 약 300%, 약 180% 내지 약 280%, 약 180% 내지 약 260%, 약 180% 내지 약 240%, 약 180% 내지 약 220%, 약 180% 내지 약 200%, 약 200% 내지 약 800%, 약 200% 내지 약 750%, 약 200% 내지 약 700%, 약 200% 내지 약 650%, 약 200% 내지 약 600%, 약 200% 내지 약 550%, 약 200% 내지 약 500%, 약 200% 내지 약 450%, 약 200% 내지 약 400%, 약 200% 내지 약 350%, 약 200% 내지 약 300%, 약 200% 내지 약 280%, 약 200% 내지 약 260%, 약 200% 내지 약 240%, 약 200% 내지 약 220%, 약 220% 내지 약 800%, 약 220% 내지 약 750%, 약 220% 내지 약 700%, 약 220% 내지 약 650%, 약 220% 내지 약 600%, 약 220% 내지 약 550%, 약 220% 내지 약 500%, 약 220% 내지 약 450%, 약 220% 내지 약 400%, 약 220% 내지 약 350%, 약 220% 내지 약 300%, 약 220% 내지 약 280%, 약 220% 내지 약 260%, 약 220% 내지 약 240%, 약 240% 내지 약 800%, 약 240% 내지 약 750%, 약 240% 내지 약 700%, 약 240% 내지 약 650%, 약 240% 내지 약 600%, 약 240% 내지 약 550%, 약 240% 내지 약 500%, 약 240% 내지 약 450%, 약 240% 내지 약 400%, 약 240% 내지 약 350%, 약 240% 내지 약 300%, 약 240% 내지 약 280%, 약 240% 내지 약 260%, 약 260% 내지 약 800%, 약 260% 내지 약 750%, 약 260% 내지 약 700%, 약 260% 내지 약 650%, 약 260% 내지 약 600%, 약 260% 내지 약 550%, 약 260% 내지 약 500%, 약 260% 내지 약 450%, 약 260% 내지 약 400%, 약 260% 내지 약 350%, 약 260% 내지 약 300%, 약 260% 내지 약 280%, 약 280% 내지 약 800%, 약 280% 내지 약 750%, 약 280% 내지 약 700%, 약 280% 내지 약 650%, 약 280% 내지 약 600%, 약 280% 내지 약 550%, 약 280% 내지 약 500%, 약 280% 내지 약 450%, 약 280% 내지 약 400%, 약 280% 내지 약 350%, 약 280% 내지 약 300%, 약 300% 내지 약 800%, 약 300% 내지 약 750%, 약 300% 내지 약 700%, 약 300% 내지 약 650%, 약 300% 내지 약 600%, 약 300% 내지 약 550%, 약 300% 내지 약 500%, 약 300% 내지 약 450%, 약 300% 내지 약 400%, 약 300% 내지 약 350%, 약 350% 내지 약 800%, 약 350% 내지 약 750%, 약 350% 내지 약 700%, 약 350% 내지 약 650%, 약 350% 내지 약 600%, 약 350% 내지 약 550%, 약 350% 내지 약 500%, 약 350% 내지 약 450%, 약 350% 내지 약 400%, 약 400% 내지 약 800%, 약 400% 내지 약 750%, 약 400% 내지 약 700%, 약 400% 내지 약 650%, 약 400% 내지 약 600%, 약 400% 내지 약 550%, 약 400% 내지 약 500%, 약 400% 내지 약 450%, 약 450% 내지 약 800%, 약 450% 내지 약 750%, 약 450% 내지 약 700%, 약 450% 내지 약 650%, 약 450% 내지 약 600%, 약 450% 내지 약 550%, 약 450% 내지 약 500%, 약 500% 내지 약 800%, 약 500% 내지 약 750%, 약 500% 내지 약 700%, 약 500% 내지 약 650%, 약 500% 내지 약 600%, 약 500% 내지 약 550%, 약 550% 내지 약 800%, 약 550% 내지 약 750%, 약 550% 내지 약 700%, 약 550% 내지 약 650%, 약 550% 내지 약 600%, 약 600% 내지 약 800%, 약 600% 내지 약 750%, 약 600% 내지 약 700%, 약 600% 내지 약 650%, 약 650% 내지 약 800%, 약 650% 내지 약 750%, 약 650% 내지 약 700%, 약 700% 내지 약 800%, 약 700% 내지 약 750%, 또는 약 750% 내지 약 800%)의 증가를 초래할 수 있다.

[0464] 본원에 제공된 방법은 T_{reg} 세포의 농도 또는 수(예를 들어, 소정의 기간의 시작과 비교하여 소정의 기간의 종료 시)의 증가(예를 들어, 약 1% 내지 약 800% 증가, 또는 본원에 기재된 이러한 범위의 임의의 하위범위)를 초래할 수 있다.

[0465] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 T_{reg} 세포의 농도 또는 수(예를 들어, 소정의 기간의 시작 시와 비교하여 소정의 기간의 종료 시)의 증가(예를 들어, 약 0.1배 증가 내지 약 100배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 90배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 80배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 70배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 60배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 50배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 45배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 40배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 35배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 30배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 25배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 20배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 15배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 10배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 8배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 6배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 4배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 2배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 1.5배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 1배 증가, 약 0.1배 증가 내지 약 0.5배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 100배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 90배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 80배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 70배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 60배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 50배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 45배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 40배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 35배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 30배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 25배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 20배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 15배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 10배 증가, 약 0.5배 증가 내지 약 8배 증가, 약 0.5배 증가

[illegible]

지 약 100배 증가, 약 40배 증가 내지 약 90배 증가, 약 40배 증가 내지 약 80배 증가, 약 40배 증가 내지 약 70배 증가, 약 40배 증가 내지 약 60배 증가, 약 40배 증가 내지 약 50배 증가, 약 40배 증가 내지 약 45배 증가, 약 45배 증가 내지 약 100배 증가, 약 45배 증가 내지 약 90배 증가, 약 45배 증가 내지 약 80배 증가, 약 45배 증가 내지 약 70배 증가, 약 45배 증가 내지 약 60배 증가, 약 45배 증가 내지 약 50배 증가, 약 50배 증가 내지 약 100배 증가, 약 50배 증가 내지 약 90배 증가, 약 50배 증가 내지 약 80배 증가, 약 50배 증가 내지 약 70배 증가, 약 50배 증가 내지 약 60배 증가, 약 60배 증가 내지 약 100배 증가, 약 60배 증가 내지 약 90배 증가, 약 60배 증가 내지 약 80배 증가, 약 60배 증가 내지 약 70배 증가, 약 70배 증가 내지 약 100배 증가, 약 70배 증가 내지 약 90배 증가, 약 70배 증가 내지 약 80배 증가, 약 80배 증가 내지 약 100배 증가, 약 80배 증가 내지 약 90배 증가, 또는 약 90배 증가 내지 약 100배 증가)를 초래할 수 있다.

[0466] **조성물 및 키트**

[0467] 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성된 T_{reg} 세포 집단이 또한 본원에 제공된다. 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성된 T_{reg} 세포 또는 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성된 T_{reg} 세포 집단을 포함하는 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)이 또한 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체(예를 들어, 포스페이트 완충 식염수)를 포함할 수 있다. 조성물은 치료를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 대상체)를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0468] 약학적 조성물의 단일 또는 다중 투여는 예를 들어, 대상체에 의해 필요하고 내약력있는 바와 같은 투약량 및 빈도에 따라 이를 필요로 하는 대상체에게 주어질 수 있다. 제형은 대상체에서 병태, 질환, 또는 증상을 효과적으로 치료하거나 방지하거나 완화하기 위해 충분한 양의 T_{reg} 세포를 제공해야 한다.

[0469] 하기를 포함하는 키트가 또한 본원에 제공된다: (i) CD3/CD28-결합제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 CD3/CD28-결합제); (ii) 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드로서, 상기 제1 표적-결합 도메인 및 상기 제2 표적-결합 도메인은 IL-2에 대한 수용체에 결합함(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 이러한 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드); 및 (iii) mTOR 저해제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 mTOR 저해제). 이들 키트의 일부 구현예는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함할 수 있다. 이들 키트의 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제는 항-CD3/항-CD28 비드(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 항-CD3/항-CD28 비드)이다. 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합제는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 이러한 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 예). 일부 구현예에서, 키트는 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함할 수 있다.

[0470] 키트가 또한 본원에 제공되며, (i) 인터류킨-2 수용체-활성화제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 인터류킨-2 수용체-활성화제); (ii) 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드로서, 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하거나; 상기 제1 표적-결합 도메인은 CD28에 결합하고 상기 제2 표적-결합 도메인은 CD3에 결합함(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 이러한 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드); 및 (iii) mTOR 저해제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 mTOR 저해제)를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함할 수 있다.

[0471] 키트가 또한 본원에 제공되며, CD3/CD28-결합제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 CD3/CD28-결합제); (a) (i) 제1 표적-결합 도메인; (ii) 가용성 조직 인자 도메인; 및 (iii) 친화도 도메인 쌍의 제1 도메인을 포함하는 제1 키메라 폴리펩타이드; 및 (b) (i) 친화도 도메인 쌍의 제2 도메인; 및 (ii) 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 제2 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드); 및 mTOR 저해제(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 mTOR 저해제)를 포함하고, 상기 제1 키메라 폴리펩타이드 및 상기 제2 키메라 폴리펩타이드는 친화도 도메인의 쌍의 제1 도

메인과 제2 도메인의 결합을 통해 회합된다. 이들 키트의 일부 구현에는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 항-CD3/항-CD28 비드(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항-CD3/항-CD28 비드)이다. 일부 구현예에서, CD3/CD28-결합체는 제1 표적-결합 도메인, 가용성 조직 인자 도메인, 및 제2 표적-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드이며, 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제1 표적-결합 도메인은 CD3에 결합하고 상기 추가 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 제2 표적-결합 도메인은 CD28에 결합한다(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 이러한 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 예). 일부 구현예에서, 키트는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드의 가용성 조직 인자 도메인에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는 IgG1 항체 작제물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 IgG1 항체 작제물)을 추가로 포함한다.

[0472] 핵산/벡터

[0473] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산이 또한 본원에 제공된다. 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 임의의 핵산을 포함하는 벡터가 또한 본원에 제공된다.

[0474] 본원에 기재된 임의의 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 서열을 포함할 수 있다.

[0475] 벡터의 비제한적인 예는 플라스미드, 트랜스포존, 코스미드, 및 바이러스 벡터(예를 들어, 임의의 아데노바이러스 벡터(예를 들어, pSV 또는 pCMV 벡터), 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 렌티바이러스 벡터, 및 레트로바이러스 벡터), 및 임의의 Gateway® 벡터를 포함한다. 벡터는 예를 들어, 발현을 위한 충분한 cis-작용 요소를 포함할 수 있으며; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 포유류 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 숙련된 실행자는 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 제조하기 위한 적합한 벡터 및 포유류 세포를 선택할 수 있을 것이다.

[0476] 세포

[0477] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 본원에 기재된 임의의 핵산을 포함하는 세포(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 세포)가 또한 본원에 제공된다.

[0478] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 인코딩하는 본원에 기재된 임의의 벡터를 포함하는 세포(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 예시적인 세포)가 또한 본원에 제공된다.

[0479] 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 세포는 진핵 세포일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "진핵 세포"는 별개의, 막-결합 핵을 갖는 세포를 지칭한다. 이러한 세포는 예를 들어, 포유류(예를 들어, 설치류, 비-인간 영장류, 또는 인간), 곤충, 진균류, 또는 식물 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 진핵 세포는 *사카로마이세스 세레비지애*(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모 세포이다. 일부 구현예에서, 진핵 세포는 고등 진핵생물, 예컨대 포유류, 조류, 식물, 또는 곤충 세포이다. 포유류 세포의 비제한적인 예는 차이니즈 햄스터 난소 세포 및 인간 배아 신장 세포(예를 들어, HEK293 세포)를 포함한다.

[0480] 핵산 및 발현 벡터를 세포(예를 들어, 진핵 세포) 내로 도입하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 핵산을 세포 내로 도입하는 데 사용될 수 있는 방법의 비제한적인 예는 리포펙션(lipofection), 형질주입, 전기천공, 미세주사, 칼슘 포스페이트 형질주입, 덴드리머-기초 형질주입, 양이온성 중합체 형질주입, 세포 스퀴징(cell squeezing), 소노포레이션(sonoporation), 광학적 형질주입, 임팔레펙션(impalefection), 유체역학적 전달(hydrodynamic delivery), 마그네토펙션(magnetofection), 바이러스 형질도입(예를 들어, 아데노바이러스 및 렌티바이러스 형질도입), 및 나노입자 형질주입을 포함한다.

[0481] 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 생성하는 방법

[0482] 본원에 기재된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 생성하는 방법도 또한 본원에 제공되며, 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 생성을 초래하기에 충분한 조건 하에 배양 배지에서 본원에 기재된 임의의 세포를 배양하는 단계; 및 세포 및/또는 배양 배지로부터 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함한다.

- [0483] 배양 배지 또는 세포(예를 들어, 진핵 세포)로부터 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드의 회수는 당업계에 잘 알려진 기법(예를 들어, 암모늄 설페이트 침전, 폴리에틸렌 글리콜 침전, 이온-교환 크로마토그래피(음이온 또는 양이온), 소수성 상호작용에 기초한 크로마토그래피, 금속-친화도 크로마토그래피, 리간드-친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피)을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0484] 세포를 배양하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 세포는 증식, 분화 및 성장을 선호하는 조건 하에 *시험관내*에서 유지될 수 있다. 간략하게는, 세포는 세포 생존력 및 성장을 뒷받침하기 위해 필요한 성장 인자 및 보충제를 포함하는 세포 배양 배지와 세포(예를 들어, 임의의 세포)를 접촉시킴으로써 배양될 수 있다.
- [0485] 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생성되는 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드(예를 들어, 본원에 제공된 임의의 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드) 또는 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드(예를 들어, 본원에 제공된 임의의 다중-사슬 키메라 폴리펩타이드)가 또한 본원에 제공된다.
- [0486] **치료 방법**
- [0487] 치료를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 대상체)를 치료하는 방법이 또한 본원에 제공되며, 치료적 유효량의 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생산된 T_{reg} 세포 집단 또는 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생산된 T_{reg} 세포 또는 T_{reg} 세포 집단을 포함하는 임의의 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0488] 이들 방법의 일부 구현예에서, 대상체는 노화-관련 질환 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 식별되거나 진단되었다. 일부 구현예에서, 노화-관련 질환은 알츠하이머 질환, 동맥류, 낭성 섬유증, 체장염에서의 섬유증, 녹내장, 고혈압, 특발성 폐 섬유증, 염증성 장 질환, 추간판 퇴행, 황반 변성, 골관절염, 2형 진성 당뇨병, 지방세포 위축, 지방이영양증, 죽상동맥경화증, 백내장, COPD, 특발성 폐 섬유증, 신장 이식 실패, 간 섬유증, 골질량 손실, 심근 경색, 사르코페니아, 상처 치유, 탈모증, 심근세포 비대, 골관절염, 파킨슨 질환, 연령 연관된 폐 조직 탄성 손실, 황반 변성, 악액질, 사구체경화증, 간 경변증, NAFLD, 골다공증, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴 질환, 척추측만증, 다발성 경화증 및 신장 기능 이상의 군으로부터 선택된다.
- [0489] 일부 구현예에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 당뇨병성 신증, CNS 손상, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 근위축성 측삭 경화증, 크론 질환, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 건선, 그레이브스 질환, 췌양성 대장염, 비알코올성 지방간염, 및 기분 장애의 군으로부터 선택된다.
- [0490] 일부 구현예에서, 이들 방법은 대상체에서 암의 하나 이상의 증상의 수, 중증도, 또는 빈도의 감소(예를 들어, 치료 전의 대상체에서의 노화-관련 질환 또는 염증성 질환의 하나 이상의 증상의 수, 중증도, 또는 빈도와 비교하여) 초래할 수 있다.
- [0491] 일부 예에서, 방법은 예를 들어, 치료 전의 대상체에서의 노쇠 세포의 수와 비교하여 대상체에서의 노쇠 세포의 수의 저하(예를 들어, 대상체에서 노화-관련 질환 또는 염증성 질환에 관여하고/하거나 연관된 하나 이상의 특정 조직에서 노쇠 세포의 수의 저하)(예를 들어, 약 1% 저하 내지 약 99% 저하, 약 1% 저하 내지 약 95% 저하, 약 1% 저하 내지 약 90% 저하, 약 1% 저하 내지 약 85% 저하, 약 1% 저하 내지 약 80% 저하, 약 1% 저하 내지 약 75% 저하, 약 1% 내지 약 70% 저하, 약 1% 저하 내지 약 65% 저하, 약 1% 저하 내지 약 60% 저하, 약 1% 저하 내지 약 55% 저하, 약 1% 저하 내지 약 50% 저하, 약 1% 저하 내지 약 45% 저하, 약 1% 저하 내지 약 40% 저하, 약 1% 저하 내지 약 35% 저하, 약 1% 저하 내지 약 30% 저하, 약 1% 저하 내지 약 25% 저하, 약 1% 저하 내지 약 20% 저하, 약 1% 저하 내지 약 15% 저하, 약 1% 저하 내지 약 10% 저하, 약 1% 저하 내지 약 5% 저하, 약 5% 저하 내지 약 99% 저하, 약 5% 저하 내지 약 95% 저하, 약 5% 저하 내지 약 90% 저하, 약 5% 저하 내지 약 85% 저하, 약 5% 저하 내지 약 80% 저하, 약 5% 저하 내지 약 75% 저하, 약 5% 내지 약 70% 저하, 약 5% 저하 내지 약 65% 저하, 약 5% 저하 내지 약 60% 저하, 약 5% 저하 내지 약 55% 저하, 약 5% 저하 내지 약 50% 저하, 약 5% 저하 내지 약 45% 저하, 약 5% 저하 내지 약 40% 저하, 약 5% 저하 내지 약 35% 저하, 약 5% 저하 내지 약 30% 저하, 약 5% 저하 내지 약 25% 저하, 약 5% 저하 내지 약 20% 저하, 약 5% 저하 내지 약 15% 저하, 약 5% 저하 내지 약 10% 저하, 약 5% 저하 내지 약 5% 저하, 약 10% 저하 내지 약 99% 저하, 약 10% 저하 내지 약 95% 저하, 약 10% 저하 내지 약 90% 저하, 약 10% 저하 내지 약 85% 저하, 약 10% 저하 내지 약 80% 저하, 약 10% 저하 내지 약 75% 저하, 약 10% 내지 약 70% 저하, 약 10% 저하 내지 약 65% 저하, 약 10% 저하 내지 약 60% 저하, 약 10% 저하 내지 약 55% 저하, 약 10% 저하 내지 약 50% 저하, 약 10% 저하 내지 약 45% 저하, 약 10% 저하 내지 약 40% 저하, 약 10% 저하 내지 약 35% 저하, 약 10% 저하 내지 약 30% 저하, 약 10% 저하 내지 약 25% 저하, 약 10% 저하 내지 약 20% 저하, 약 10% 저하 내지 약 15% 저하, 약 15% 저하 내지 약 99% 저하, 약 15% 저하 내지

약 95% 저하, 약 15% 저하 내지 약 90% 저하, 약 15% 저하 내지 약 85% 저하, 약 15% 저하 내지 약 80% 저하, 약 15% 저하 내지 약 75% 저하, 약 15% 내지 약 70% 저하, 약 15% 저하 내지 약 65% 저하, 약 15% 저하 내지 약 60% 저하, 약 15% 저하 내지 약 55% 저하, 약 15% 저하 내지 약 50% 저하, 약 15% 저하 내지 약 45% 저하, 약 15% 저하 내지 약 40% 저하, 약 15% 저하 내지 약 35% 저하, 약 15% 저하 내지 약 30% 저하, 약 15% 저하 내지 약 25% 저하, 약 15% 저하 내지 약 20% 저하, 약 20% 저하 내지 약 99% 저하, 약 20% 저하 내지 약 95% 저하, 약 20% 저하 내지 약 90% 저하, 약 20% 저하 내지 약 85% 저하, 약 20% 저하 내지 약 80% 저하, 약 20% 저하 내지 약 75% 저하, 약 20% 내지 약 70% 저하, 약 20% 저하 내지 약 65% 저하, 약 20% 저하 내지 약 60% 저하, 약 20% 저하 내지 약 55% 저하, 약 20% 저하 내지 약 50% 저하, 약 20% 저하 내지 약 45% 저하, 약 20% 저하 내지 약 40% 저하, 약 20% 저하 내지 약 35% 저하, 약 20% 저하 내지 약 30% 저하, 약 20% 저하 내지 약 25% 저하, 약 25% 저하 내지 약 99% 저하, 약 25% 저하 내지 약 95% 저하, 약 25% 저하 내지 약 90% 저하, 약 25% 저하 내지 약 85% 저하, 약 25% 저하 내지 약 80% 저하, 약 25% 저하 내지 약 75% 저하, 약 25% 내지 약 70% 저하, 약 25% 저하 내지 약 65% 저하, 약 25% 저하 내지 약 60% 저하, 약 25% 저하 내지 약 55% 저하, 약 25% 저하 내지 약 50% 저하, 약 25% 저하 내지 약 45% 저하, 약 25% 저하 내지 약 40% 저하, 약 25% 저하 내지 약 35% 저하, 약 25% 저하 내지 약 30% 저하, 약 30% 저하 내지 약 99% 저하, 약 30% 저하 내지 약 95% 저하, 약 30% 저하 내지 약 90% 저하, 약 30% 저하 내지 약 85% 저하, 약 30% 저하 내지 약 80% 저하, 약 30% 저하 내지 약 75% 저하, 약 30% 내지 약 70% 저하, 약 30% 저하 내지 약 65% 저하, 약 30% 저하 내지 약 60% 저하, 약 30% 저하 내지 약 55% 저하, 약 30% 저하 내지 약 50% 저하, 약 30% 저하 내지 약 45% 저하, 약 30% 저하 내지 약 40% 저하, 약 30% 저하 내지 약 35% 저하, 약 35% 저하 내지 약 99% 저하, 약 35% 저하 내지 약 95% 저하, 약 35% 저하 내지 약 90% 저하, 약 35% 저하 내지 약 85% 저하, 약 35% 저하 내지 약 80% 저하, 약 35% 저하 내지 약 75% 저하, 약 35% 내지 약 70% 저하, 약 35% 저하 내지 약 65% 저하, 약 35% 저하 내지 약 60% 저하, 약 35% 저하 내지 약 55% 저하, 약 35% 저하 내지 약 50% 저하, 약 35% 저하 내지 약 45% 저하, 약 35% 저하 내지 약 40% 저하, 약 40% 저하 내지 약 99% 저하, 약 40% 저하 내지 약 95% 저하, 약 40% 저하 내지 약 90% 저하, 약 40% 저하 내지 약 85% 저하, 약 40% 저하 내지 약 80% 저하, 약 40% 저하 내지 약 75% 저하, 약 40% 내지 약 70% 저하, 약 40% 저하 내지 약 65% 저하, 약 40% 저하 내지 약 60% 저하, 약 40% 저하 내지 약 55% 저하, 약 40% 저하 내지 약 50% 저하, 약 40% 저하 내지 약 45% 저하, 약 45% 저하 내지 약 99% 저하, 약 45% 저하 내지 약 95% 저하, 약 45% 저하 내지 약 90% 저하, 약 45% 저하 내지 약 85% 저하, 약 45% 저하 내지 약 80% 저하, 약 45% 저하 내지 약 75% 저하, 약 45% 내지 약 70% 저하, 약 45% 저하 내지 약 65% 저하, 약 45% 저하 내지 약 60% 저하, 약 45% 저하 내지 약 55% 저하, 약 45% 저하 내지 약 50% 저하, 약 50% 저하 내지 약 99% 저하, 약 50% 저하 내지 약 95% 저하, 약 50% 저하 내지 약 90% 저하, 약 50% 저하 내지 약 85% 저하, 약 50% 저하 내지 약 80% 저하, 약 50% 저하 내지 약 75% 저하, 약 50% 내지 약 70% 저하, 약 50% 저하 내지 약 65% 저하, 약 50% 저하 내지 약 60% 저하, 약 50% 저하 내지 약 55% 저하, 약 55% 저하 내지 약 99% 저하, 약 55% 저하 내지 약 95% 저하, 약 55% 저하 내지 약 90% 저하, 약 55% 저하 내지 약 85% 저하, 약 55% 저하 내지 약 80% 저하, 약 55% 저하 내지 약 75% 저하, 약 55% 내지 약 70% 저하, 약 55% 저하 내지 약 65% 저하, 약 55% 저하 내지 약 60% 저하, 약 60% 저하 내지 약 99% 저하, 약 60% 저하 내지 약 95% 저하, 약 60% 저하 내지 약 90% 저하, 약 60% 저하 내지 약 85% 저하, 약 60% 저하 내지 약 80% 저하, 약 60% 내지 약 70% 저하, 약 60% 저하 내지 약 65% 저하, 약 65% 저하 내지 약 99% 저하, 약 65% 저하 내지 약 95% 저하, 약 65% 저하 내지 약 90% 저하, 약 65% 저하 내지 약 85% 저하, 약 65% 저하 내지 약 80% 저하, 약 65% 저하 내지 약 75% 저하, 약 65% 내지 약 70% 저하, 약 70% 저하 내지 약 99% 저하, 약 70% 저하 내지 약 95% 저하, 약 70% 저하 내지 약 90% 저하, 약 70% 저하 내지 약 85% 저하, 약 70% 저하 내지 약 80% 저하, 약 70% 저하 내지 약 75% 저하, 약 75% 저하 내지 약 99% 저하, 약 75% 저하 내지 약 95% 저하, 약 75% 저하 내지 약 90% 저하, 약 75% 저하 내지 약 85% 저하, 약 75% 저하 내지 약 80% 저하, 약 80% 저하 내지 약 99% 저하, 약 80% 저하 내지 약 95% 저하, 약 80% 저하 내지 약 90% 저하, 약 80% 저하 내지 약 85% 저하, 약 85% 저하 내지 약 99% 저하, 약 85% 저하 내지 약 95% 저하, 약 85% 저하 내지 약 90% 저하, 약 90% 저하 내지 약 99% 저하, 약 90% 저하 내지 약 95% 저하, 또는 약 95% 저하 내지 약 99% 저하)를 초래할 수 있다.

[0492] 용어 "대상체"는 임의의 포유류를 지칭한다. 일부 구현예에서, 대상체 또는 "치료를 필요로 하는 대상체"는 개과(예를 들어, 개), 고양이과(예를 들어, 고양이), 말과(예를 들어, 말), 양, 소, 돼지, 염소, 영장류, 예를 들어, 시미안(simian)(예를 들어, 원숭이(예를 들어, 마모셋(marmoset), 개코원숭이(baboon)), 또는 유인원(예를 들어, 고릴라, 침팬지, 오랑우탄, 또는 긴팔원숭이(gibbon)) 또는 인간, 또는 설치류(예를 들어, 마우스, 기니 피그, 햄스터, 또는 래트)일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체 또는 "치료를 필요로 하는 대상체"는 비-인간 포유류일 수 있으며, 특히 인간에서 치료적 효능을 실증하기 위한 모델로서 통상적으로 사용되는 포유류(예를

들어, 무린, 토끼(lapine), 돼지, 개과 또는 영장류 동물)가 이용될 수 있다.

[0493] 노쇠 세포

[0494] 노쇠는 표현형 변화, 세포자멸사에 대한 저항성 및 손상-감지 신호화 경로의 활성화에 의해 동반되는 비가역적인 성장 억제 형태이다. 이의 증식 능력을 소실하여 약 50개 집단 배가(Hayflick 한계라고 칭함) 후 영구적인 정지에 도달하는 배양된 인간 섬유아세포 세포에서 세포 노쇠가 처음에 기재되었다. 노쇠는 산화적 및 유전자독성(genotoxic) 스트레스, DNA 손상, 텔로미어 마모(attrition), 종양원성(oncogenic) 활성화, 미토콘드리아 기능장애, 또는 화학치료를 포함하여 광범위한 내인성 공격(insult) 및 외인성 공격에 의해 유도될 수 있는 스트레스 반응으로 간주된다.

[0495] 노쇠 세포는 대사적으로 활성적으로 남아 있고, 이들 세포의 분비 표현형을 통해 조직 항상성, 질환 및 노화에 영향을 미칠 수 있다. 노쇠는 생리학적 과정으로서 간주되고, 상처 치유, 조직 항상성, 재생, 및 섬유증 조절을 촉진하는 데 중요하다. 예를 들어, 노쇠 세포의 일시적인 유도는 상처 치유 동안 관찰되고, 상처 해소(resolution)에 기여한다. 아마도 노쇠의 가장 중요한 역할 중 하나는 종양 억제에서의 노화의 역할이다. 그러나, 노쇠 세포의 축적은 또한, 나이- 및 노화-관련 질환 및 병태를 유발한다. 노화 표현형은 또한, 만성 염증 반응을 촉발하고 결과적으로 만성 염증 병태를 악화시켜(augment) 종양 성장을 촉진할 수 있다. 노쇠와 노화(aging) 사이의 연관성은 처음에, 노쇠 세포가 노화 조직에서 축적된다는 관찰에 기초하였다. 유전자이식(trasngenic) 모델의 사용은 많은 노화-관련 병상(pathology)에서 노쇠 세포를 전신적으로 검출할 수 있게 하였다. 노쇠 세포를 선택적으로 제거하기 위한 전략은, 노쇠 세포가 사실상 노화 및 관련 병상에서 인과 관계 역할을 할 수 있음을 실증하였다.

[0496] 노쇠 세포는 형태, 염색질 구조화, 유전자 발현, 및 대사에서의 변화를 포함하는 중요하고 독특한 특성을 나타낸다. 세포적 노쇠와 관련된 생화학적 특성 및 기능적 특성, 예컨대 (i) 사이클린-의존적 키나제의 저해제인 p16 및 p21의 증가된 발현, (ii) 리소좀 활성화의 마커인 노화-관련 β -갈락토시다제의 존재, (iii) 노화-관련 이질염색질 좌(loci)의 출현 및 라민 B1 수준의 하향조절, (iv) 항-세포자멸사 BCL-패밀리 단백질의 증가된 발현에 의해 야기되는 세포자멸사에 대한 내성, 및 (v) CD26(DPP4), CD36(스캐빈저 수용체), 포크헤드 박스 4(FOXO4), 및 분비형 담체 막 단백질 4(SCAMP4)의 상향조절이 존재한다. 노쇠 세포는 또한, 소위 노쇠-관련 분비 표현형(SASP)인 염증 시그니처를 발현한다. SASP를 통해, 노쇠 세포는, 노쇠를 보강하고(자가분비 autocrine) 효과 미세환경과 소통하며 이를 변형시키는(측분비(paracrine) 효과) 세포-자율 방식으로 작동하는 광범위한 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8), 성장 인자(TGF- β), 케모카인(CCL-2), 및 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP-3, MMP-9)를 생성한다. SASP 인자는 노쇠 세포의 면역-매개 청소인 노쇠 감시를 촉발함으로써 종양 억제에 기여할 수 있다. 그러나, 만성 염증 또한 종양발생의 기지의 유발자이고, 누적되고 있는 증거는 만성 SASP가 또한 암 및 노화-관련 질환을 증강시킬 수 있음을 나타낸다.

[0497] 노쇠 세포의 분비 프로파일은 컨텍스트(context) 의존적이다. 예를 들어, 인간 섬유모세포에서 상이한 미토콘드리아 기능장애에 의해 유도되는 미토콘드리아 기능장애-관련 노쇠(MiDAS)는 IL-1-의존적 염증 인자가 부족한 SASP의 출현을 유발하였다. NAD⁺/NADH 비의 저하는 AMPK 신호화를 활성화시켰으며, 이는 p53의 활성화를 통해 MiDAS를 유도하였다. 그 결과, p53은 전-염증성 SASP의 중요한 유도인자인 NF- κ B 신호화를 저해하였다. 대조적으로, 인간 세포에서 지속적인 DNA 손상에 의해 야기되는 세포 노쇠는 염증성 SASP를 유도하였으며, 이는 p53이 아니라 운동실조-모세혈관확장증 돌연변이화된(ATM: ataxia-telangiectasia mutated) 키나제의 활성화에 의존하였다. 특히, IL-6 및 IL-8의 발현 및 분비 수준은 증가되었다. 이소성(ectopic) 발현 p16INK4a 및 p21CIP1에 의해 야기된 세포 노쇠는 염증성 SASP 없이 인간 섬유모세포에서 노쇠 표현형을 유도하였으며, 이는 성장 억제 자체가 SASP를 자극시키지 않았음을 나타내는 것이 또한 실증되었다.

[0498] 노쇠의 가장 규정적인(defining) 특징 중 하나는 안정한 성장 억제이다. 이는 2개의 중요한 경로인 p16/Rb 및 p53/p21에 의해 달성되며, 둘 다 종양 억제에서 중심적이다. DNA 손상은 (1) 염색질에서 γ H2Ax(히스톤 코딩 유전자) 및 53BP1(DNA 손상 반응에 관여함)의 높은 침착을 초래하며: 이는 키나제 캐스케이드의 활성화를 유발하여 결국 p53 활성화를 초래하고, (2) p16INK4a 및 ARF(둘 다 CDKN2A에 의해 인코딩됨) 및 P15INK4b(CDKN2B에 의해 인코딩됨)의 활성화를 초래하며: p53은 사이클린-의존적 키나제 저해제(p21)의 전사를 유도하고, p16INK4a와 p15INK4b 둘 다와 함께 세포 주기 진행을 위한 유전자(CDK4 및 CDK6)를 차단시킨다. 이는 결국 망막모세포종 단백질(Rb)의 과소인산화(hypophosphorylation) 및 G1 기에서 세포 주기 억제를 유발한다.

[0499] 노쇠 세포의 선택적인 사멸화는 정상적인 노화의 맥락에서 마우스의 건강 수명(health span)을 유의하게 향상시키고 노화-관련 질환 또는 암 요법의 결과를 호전시키는 것으로 나타났다(문헌[Ovadya, *J Clin Invest*.

128(4):1247-1254, 2018]). 자연상에서, 노쇠 세포는 내재 면역(innate immune) 세포에 의해 정상적으로 제거된다. 노쇠의 유도는 손상된/변경된 세포의 잠재적인 증식 및 형질전환을 방지할 뿐만 아니라, 주로 자연 살해(NK) 세포(예컨대 IL-15 및 CCL2) 및 대식세포(예컨대 CFS-1 및 CCL2)에 대해 화학주성인자(chemoattractant)로서 작용하는 SASP 인자의 생성을 통한 조직 복구를 선호한다. 이들 내재 면역 세포는 스트레스를 받은 세포를 제거하기 위한 면역감시 기전을 매개한다. 노쇠 세포는 통상, NK-세포 활성화 수용체 NKG2D 및 DNAM1 리간드를 상향조절하며, 상기 리간드는 스트레스-유도성 리간드: 감염성 질환 및 악성물에 대한 최전방 면역 방어의 중요한 구성요소의 패밀리에 속한다. 수용체 활성화 시, NK 세포는 그 후에 노쇠 세포의 사멸을 이들 세포의 세포용해 기구를 통해 특이적으로 유도할 수 있다. 노쇠 세포의 면역 감시에서 NK 세포의 역할은 간 섬유증(문헌[Sagiv, *Oncogene* 32(15): 1971-1977, 2013]), 간세포 암종(문헌[Iannello, *J Exp Med* 210(10): 2057-2069, 2013]), 다발성 골수종(문헌[Soriani, *Blood* 113(15): 3503-3511, 2009]), 및 메발로네이트(mevalonate) 경로의 기능장애에 의해 스트레스를 받는 신경교종 세포(문헌[Ciaglia, *Int J Cancer* 142(1): 176-190, 2018])에서 주목되었다. 자궁내막 세포는 급성 세포 노쇠를 겪고, 탈락막(decidual) 세포로 분화되지 않는다. 분화된 탈락막 세포는 IL-15를 분비하여, 자궁 NK 세포를 표적으로 동원시키고 미분화된 노쇠 세포를 제거하므로, 자궁내막의 재건(re-model) 및 회춘(rejuvenate)을 돕는다(문헌[Brighton, *Elife* 6: e31274, 2017]). 유사한 기전을 이용하여, 간 섬유증 동안, p53-발현 노쇠 간 위성 세포(satellite cell)는, 전-염증성 M1 표현형으로 향하는 체류하는 쿠퍼 대식세포 및 새로 침윤된 대식세포의 분극화를 회피하였으며(skew), 이는 노화세포용해(senolytic) 활성을 나타낸다. F4/80+ 대식세포는 분만후 자궁 기능을 유지시키기 위해 마우스 자궁 노쇠 세포의 청소에서 주요 역할을 하는 것으로 나타났다.

[0500] 노쇠 세포는 NKG2D(NK 세포 상에서 발현됨), 케모카인, 및 다른 SASP 인자에 대한 리간드를 주로 상향조절함으로써 NK 세포를 동원한다. 간 섬유증의 생체내 모델은 활성화된 NK 세포에 의한 노쇠 세포의 효과적인 청소를 나타내었다(문헌[Krizhanovsky, *Cell* 134(4): 657-667, 2008]). 연구는 간 섬유증(문헌[Krizhanovsky, *Cell* 134(4): 657-667, 2008]), 골관절염(문헌[Xu, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 72(6): 780-785, 2017]), 및 파킨슨 질환(문헌[Chinta, *Cell Rep* 22(4): 930-940, 2018])을 포함하여 노쇠를 연구하기 위한 다양한 모델을 기재하였다. 노쇠 세포를 연구하기 위한 동물 모델은 문헌[Krizhanovsky, *Cell* 134(4): 657-667, 2008]; 문헌[Baker, *Nature* 479(7372): 232-236, 2011]; 문헌[Farr, *Nat Med* 23(9): 1072-1079, 2017]; 문헌[Bourgeois, *FEBS Lett* 592(12): 2083-2097, 2018]; 문헌[Xu, *Nat Med* 24(8): 1246-1256, 2018])에 기재되어 있다.

[0501] 추가 치료제

[0502] 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현에는 치료적 유효량의 하나 이상의 추가 치료제를 대상체(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 대상체)에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가 치료제는 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생산된 T_{reg} 세포 또는 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생산된 T_{reg} 세포 집단을 포함하는 임의의 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)과 실질적으로 동시에 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 치료제는 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성된 T_{reg} 세포 또는 T_{reg} 세포 집단을 포함하는 임의의 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)의 투여 전에 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 치료제는 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성된 T_{reg} 세포 또는 T_{reg} 세포 집단을 포함하는 임의의 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)을 대상체에게 투여한 후에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0503] 추가 치료제의 비제한적인 예는 항암 약물, 활성화 수용체 작용제, 면역 체크포인트 저해제, HLA-특이적 저해 수용체를 차단하기 위한 제제, 글루코겐 신타제 키나제(GSK) 3 저해제, 및 항체를 포함한다.

[0504] 항암 약물의 비제한적인 예는 항대사 약물(예를 들어, 5-플루오로우라실(5-FU: 5-fluorouracil), 6-머캅토피린(6-MP: 6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 시타라빈(cytarabine), 플록수리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시카르바마이드(hydroxycarbamide), 메토트렉세이트(methotrexate), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 클라드리빈(cladribine), 넬라라빈(nelarabine), 펜토스타틴(pentostatin), 또는 페메트렉세드(pemetrexed)), 식물 알칼로이드(예를 들어, 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 캄토테신(camptothecin), 9-메톡시캄토테신, 코로나리딘(coronaridine), 택솔(taxol), 나우클레오알스(nucleosides), 디프레닐화된 인돌 알칼로이드(diprenylated indole alkaloid), 몬타민(montamine), 쉬시키니인(schischkiniin), 프로토베르베린(protoberberine), 베르베린, 산귀나린(sanguinarine), 켈레리트린(chelerythrine), 켈리도닌(chelidonine), 리리오테닌(liriodenine), 클리보린(clivorine), β-카르볼린(carboline), 안토티(antofine), 티로포린(tylophorine), 크립톨레핀

(cryptolepine), 네오크립톨레핀, 코리놀린(corynoline), 삼판긴(sampangine), 카르바졸(carbazole), 크리나민(crinamine), 몬타닌(montanine), 엘립티신(ellipticine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니소파이드(tenisopide), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 또는 아크리돈 알칼로이드), 프로테아좀 저해제(예를 들어, 락타시스틴(lactacystin), 디설피람(disulfiram), 에피갈로카테킨-3-갈레이트(epigallocatechin-3-gallate), 마리조밍(marizomib)(살리노스포라마이드 A(salinosporamide A)), 오프로조밍(oprozomib)(ONX-0912), 델란조밍(delanzomib)(CEP-18770), 에폭소미신(epoxomicin), MG132, 베타-하이드록시 베타-메틸부티레이트, 보르테조밍(bortezomib), 카르필조밍(carfilzomib), 또는 익사조밍(ixazomib)), 항종양 항생제(예를 들어, 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin), 미톡산트론(mitoxantrone), 이다루비신(idarubicin), 액티노마이신(actinomycin), 플리카마이신(plicamycin), 미토마이신(mitomycin), 또는 블레오마이신(bleomycin)), 히스톤 데아세틸라제 저해제(예를 들어, 보리노스탯(vorinostat), 파노비노스탯(panobinostat), 벨리노스탯(belinostat), 기비노스탯(givinostat), 아벡시노스탯(abexinostat), 덤시펩타이드(depsipeptide), 엔티노스탯(entinostat), 페닐 부티레이트, 발프로산(valproic acid), 트리코스타틴 A(trichostatin A), 다시노스탯(dacinostat), 모세티노스탯(mocetinostat), 프라시노스탯(pracinostat), 니코틴아미드(nicotinamide), 캄비놀(cambinol), 테노빈 1(tenovin 1), 테노빈 6, 시르티놀(sirtinol), 리콜리노스탯(ricolinostat), 테피노스탯(tefinostat), 케베트린(kevetrin), 퀴시노스탯(quisinostat), 레스미노스탯(resminostat), 타세디날린(tacedinaline), 키다마이드(chidamide), 또는 셀리시스탯(selisistat)), 티로신 키나제 저해제(예를 들어, 악시티닙(axitinib), 다사티닙(dasatinib), 엔코라피닙(encorafenib), 에를로티닙(erlotinib), 이마티닙(imatinib), 닐로티닙(nilotinib), 파조파닙(pazopanib), 및 수니티닙(sunitinib)), 및 화학치료제(예를 들어, 올-트랜스(all-trans) 레티노산, 아자시티딘(azacitidine), 아자티오프린(azathioprine), 독시플루리딘(doxifluridine), 에포틸론(epothilone), 하이드록시우레아, 이마티닙(imatinib), 테니포사이드(teniposide), 티오구아닌(tioguanine), 발루비신(valrubicin), 베무라페닙(vemurafenib), 및 레날리도마이드(lenalidomide))을 포함한다. 화학치료제의 추가 예는 알킬화제, 예를 들어, 메클로레타민(mechlorethamine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 클로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 이포스파미드(ifosfamide), 티오테파(thiotepa), 핵사메틸멜라민, 부설판(busulfan), 알트레타민(altretamine), 프로카르바진(procarbazine), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 카르무스틴(carmustine), 루무스틴(lumustine), 스트렙토조신(streptozocin), 카르보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)을 포함한다.

[0505] 실시예

[0506] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 기재되며, 이 실시예는 청구항에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0507] 실시예 1. αCD3scFv/TF/αCD28scFv의 생성

[0508] αCD3scFv/TF/αCD28scFv의 핵산 및 아미노산 서열이 아래 제시된다.

[0509] αCD3scFv/TF/αCD28scFv를 인코딩하는 핵산(SEQ ID NO: 10)

[0510] (신호 펩타이드)

[0511] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTATTCAGCTCCGCTATTC

[0512] (αCD3 경쇄 가변 영역)

[0513] CAGATCGTGTGACCCAAAGCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGCTCTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACAGCAAGCTGGCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTTCGGATCTGGACCAAGCTCGAAATCAATCGT

[0514] (링커)

[0515] GGAGGAGGTGGCAGCGCGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGC

[0516] (αCD3 중쇄 가변 영역)

[0517] CAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGCGCTGAACTGGCCCGGCCGCGCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCTTCCCGGGGTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCAGTACAAGAGCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGAC

CACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGC

- [0518] (인간 조직 인자 219 형태)
- [0519] TCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTAC
ACCGTGCAGATCTCCACCAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAG
CAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTTCCCGGAATTCACCCCT
TATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGG
AATAACACATTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGTAAGACC
AACACCAACGAGTTTAAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGAT
TCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGCGAGTTCCGGGAG
- [0520] (a CD28 경쇄 가변 영역)
- [0521] GTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATACACCTTCACCTCCTATGTGATCCAG
TGGGTCAAACAGAACCCGACAAAGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACCTTACAACGACTATACCAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACT
TTAACCTCCGACAAAAGCTCCATCAGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGACGGCAAT
TACTGGGGACGGGGCACAACTGACCGTGAGCAGC
- [0522] (링커)
- [0523] GGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGCTCC
- [0524] (a CD28 경쇄 가변 영역)
- [0525] GACATCGAGATGACCCAGTCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGTACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCTACTTC
CATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGTCCCTAAACTGTGCATCTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGC
ACCAGCTACTCTTTAACCATCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTACCAGTACCACCGGTCCCCACCTTCGGAGGCGGCACCAAA
CTGGAGACAAAGAGG
- [0526] a CD3scFv/TF/ a CD28scFv(SEQ ID NO: 8)
- [0527] (신호 펩타이드)
- [0528] mkwvtfisllflfssays
- [0529] (a CD3 경쇄 가변 영역)
- [0530] qivltqspaimsaspekvmtmtcsasssvsymnwyqqksqtsprkwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaadaatyyccqwssnptfgsgtk
leintr
- [0531] (링커)
- [0532] ggggsgggsggggs
- [0533] (a CD3 중쇄 가변 영역)
- [0534] qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytfttrytmhvwkqrpqgglewigyinpsrgytnynqkfkdkatltdkssstaymqlssltedsavyycaryydd
hycldywgqgttlvtss
- [0535] (인간 조직 인자 219)
- [0536] sgttntvaaynlwtkstnfktilewepkpvqnvytvqistksgdwkskcfyttedcdltdeivkdvkqtylarvfsypagnvestgsageplyenspeftp
yletnlgqptiqsfeqvgtkvntvedertlvrrnntflslrdvfgkdliytlyywkssssgkktaktntneflidvdkgenycfsvqavipsrtvnrkstd
spvecmgqekgefre
- [0537] (a CD28 경쇄 가변 영역)
- [0538] vqlqqsgpelvkgpaskvmsckasgytftsylvqwkqkpggglewigsinpyndytkynekfkgkatltsdkssitaymefssltedsalyycarwgdgn
ywgrgttlvtss
- [0539] (링커)
- [0540] ggggsgggsggggs

- [0541] (*α* CD28 중쇄 가변 영역)
- [0542] diemtqspaimsaslgervtmtctasssvsssyfhwyyqkpgsspkiciystsnlasgvpprfsgsgstsysltissmeaadaatyfchqyhrsptfgggtk
letkr
- [0543] *α* CD3scFv/TF/ *α* CD28scFv를 인코딩하는 핵산을 이전에 기재된 바와 같이 변형된 레트로바이러스 발현 벡터 내로 클로닝하였다(문헌[Hughes 등, *Hum Gene Ther* 16:457-72, 2005]). *α* CD3scFv/TF/ *α* CD28scFv를 인코딩하는 발현 벡터를 CHO-K1 세포 내로 형질주입하였다. CHO-K1 세포에서 발현 벡터의 공동-발현은 가용성 *α* CD3scFv/TF/ *α* CD28scFv 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드(3t28로 지칭됨)의 분비를 가능하게 하였으며, 이는 항-TF 항체 친화도 및 다른 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다.
- [0544] 항-조직 인자 항체 친화도 컬럼을 사용하여, *α* CD3scFv/TF/ *α* CD28scFv 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 정제하였다. 항-조직 인자 항체 친화도 컬럼을 GE Healthcare AKTA Avant 시스템에 연결하였다. 유속이 2 mL/분인 용출 단계를 제외하고는, 모든 단계에 대해 4 mL/분의 유속을 사용하였다.
- [0545] *α* CD3scFv/TF/ *α* CD28scFv 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드를 포함하는 세포 배양 수확물을 1 M Tris 염기를 이용하여 pH 7.4로 조정하고, 5 컬럼 부피의 PBS로 평형화된 항-TF 항체 친화도 컬럼(상기 기재됨) 상으로 로딩하였다. 시료를 로딩한 후, 컬럼을 5 컬럼 부피의 PBS로 세척하고, 뒤이어 6 컬럼 부피의 0.1 M 아세트산, pH 2.9로 용출하였다. A280 용출 피크를 수집한 다음, 1 M Tris 염기를 첨가함으로써 pH 7.5 내지 8.0으로 중화시켰다. 그 후에, 30 kDa 분자량 컷오프와 함께 Amicon 원심분리 필터를 사용하여, 중화된 시료를 PBS로 완충제 교환하였다.
- [0546] 각각의 용출 후, 6 컬럼 부피의 0.1 M 글리신, pH 2.5를 사용하여 항-조직 인자 항체 친화도 컬럼을 박리시켰다. 그 후에, 컬럼을 10 컬럼 부피의 PBS, 0.05% Na₃를 사용하여 중화시키고, 2°C 내지 8°C에 보관하였다.
- [0547] **실시예 2. IL-2/TF/IL-2의 생성**
- [0548] IL-2/TF/IL-2의 핵산 및 아미노산 서열이 아래 제시된다.
- [0549] **IL-2/TF/IL-2를 인코딩하는 핵산(SEQ ID NO: 12)**
- [0550] (*신호 펩타이드*)
- [0551] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCTACTCC
- [0552] (*제1 IL-2 단편*)
- [0553] GCCCCACCTCTCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAACTACAAGAACCCC
AAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCCTCGAGGAG
GTGCTGAATTTAGCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTACAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACC
TTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACC
- [0554] (*인간 조직 인자 219 형태*)
- [0555] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTAC
ACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCATCTCACCAGTATGATCGTGAAAGATGTGAAA
CAGACCTACCTCGCCCGGTGTTTAGCTACCCCGCCGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCT
TACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCAGCGG
AACACACCTTTCTCAGCTCCGGGATGTGTTCCGCAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTCTCCGCAAGAAGACAGCTAAACC
AACACAAACGAGTTTTTAATCGAGCTGGATAAAGCGAAAACACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCTCCCGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGAT
AGCCCCGTTGAGTGCATGGGCAAGAAAAGGCGAGTTCCGGGAG
- [0556] (*제2 IL-2 단편*)
- [0557] GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCC
AAACTCACCAGATGCTCATTAAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAA
GTGCTAAATTTAGCTCAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACATAAAGGATCTGAAACAACA
TTCATGTGTAATATGCTGATGAGACAGCAACCATGTAGAAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT

- [0558] IL-2/TF/IL-2(SEQ ID NO: 4)
- [0559] (신호 펩타이드)
- [0560] MKWVTFISLLFLFSSAYS
- [0561] (인간 IL-2)
- [0562] aptssstkkqlqlhlldlqmilnginnyknkpltrmltfkfympkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt
- [0563] (인간 조직 인자 219)
- [0564] SGTNTVAAYNLTKSTNFKTILEWEPKPVNVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
- [0565] (인간 IL-2)
- [0566] aptssstkkqlqlhlldlqmilnginnyknkpltrmltfkfympkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt
- [0567] IL-2/TF/IL-2를 인코딩하는 핵산을 이전에 기재된 바와 같이 변형된 레트로바이러스 발현 벡터 내로 클로닝하였다(문헌[Hughes 등, *Hum Gene Ther* 16:457-72, 2005]). IL-2/TF/IL-2를 인코딩하는 발현 벡터를 CHO-K1 세포 내로 형질주입하였다. CHO-K1 세포에서 발현 벡터의 공동-발현은 가용성 IL-2/TF/IL-2 단일-사슬 키메라 폴리펩타이드(2t2로 지칭됨)의 분비를 가능하게 하였으며, 이는 항-TF 항체 친화도 및 다른 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다.
- [0568] **실시예 3: 상업적인 재조합 인간 IL-2와 비교하여 항-CD3/항-CD28 비드 및 라파마이신과 함께 2t2에 의한 Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 자극**
- [0569] 새로운 인간 백혈구(3명의 공여자)를 혈액 은행으로부터 입수하였고, CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T_{reg} 세포를 CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} 조절 T 세포 분리 키트 II 시약(Miltenyi Biotec)으로 분리하였다. Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 순도는 >35%였고, CD4-Alexa Fluoro 488, CD25-APC, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Intracellular staining, Invitrogen), 및 CD127-Alex Fluoro 700(BioLegend)으로 염색함으로써 확인하였다. 세포를 카운팅하고, 48-웰 편평 바닥 플레이트에서 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco))에 1x10⁶/mL로 재현탁하였다. 세포를 (1) hIL-2 사이토카인(500 IU/mL)(Proleukin), 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2, 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 자극시킨 다음, 37° C 및 5% CO₂에서 21일 동안 인큐베이션하였다. 확장 기간 동안, 세포를 (1) hIL-2 사이토카인(500 IU/mL)(Proleukin) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 격일마다 재자극시켰다. 7일마다, 세포를 항-CD3/항-CD28 비드(1:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies)로 재자극시켰다. 세포를 (1) hIL-2 사이토카인(500 IU/mL)(Proleukin) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)을 함유하는 새로운 완전 배지로 1x10⁶/mL 농도에서 21일 동안 유지시켰다. 제7일, 제14일, 및 제21일에, 세포를 CD4-Alexa Fluoro 488, CD25-PE, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Foxp3 염색 키트를 사용한 세포내 염색, Invitrogen), 및 CD127-Alex Fluoro 700(BioLegend)으로 염색하여, 유세포측정법에 의해 Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 확장을 평가하였다. 트립판 블루(0.4%, Invitrogen) 생존력 검정에서 카운팅함으로써 Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 배수-확장(fold-expansion)을 측정하였다. 도 1은 hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin), 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)을 이용할 경우의 100배 증가와 비교하여 100 nM의 2t2, 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 자극시킨 Foxp3⁺ T_{reg} 세포에서 145배 증가를 보여준다.

[0570] 실시예 4: Helios, CTLA-4, CD39, CD62L, CD25, CD103, CD69, PD1 및 CD49b 마커의 검출

[0571] 새로운 인간 백혈구(3명의 공여자)를 혈액 은행으로부터 입수하였고, $CD4^+CD25^+CD127^{dim} T_{reg}$ 세포를 $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ 조절 T 세포 분리 키트 II 시약(Miltenyi Biotec)으로 분리하였다. $Foxp3^+ T_{reg}$ 세포의 순도는 >35%였고, CD4-Alexa Fluoro 488, CD25-APC, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Intracellular staining, Invitrogen), 및 CD127-Alex Fluoro 700(BioLegend)으로 염색함으로써 확인하였다. 세포를 카운팅하고, 48-웰 편평 바닥 플레이트에서 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco))에 1×10^6 /mL로 재현탁하였다. 세포를 (1) hIL-2 사이토카인(500 IU/mL)(Proleukin), 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2, 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 자극시킨 다음, 37° C 및 5% CO₂에서 21일 동안 인큐베이션하였다. 확장 기간 동안, 세포를 (1) hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 격일마다 재자극시켰다. 7일마다, 세포를 항-CD3/항-CD28 비드(1:1, 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies)로 재자극시켰다. 세포를 (1) hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)을 함유하는 새로운 완전 배지로 1×10^6 /mL 농도에서 21일 동안 유지시켰다. 세포를 CD4-Alexa Fluoro 488, CD25-PE, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Foxp3 염색 키트를 사용한 세포내 염색, Invitrogen), 및 CD127-Alex Fluoro 700(BioLegend)으로 염색하여, 유세포측정법에 의해 $Foxp3^+ T_{reg}$ 세포의 확장을 평가하였다. 트립판 블루(0.4%, Invitrogen) 생존력 검정에서 카운팅함으로써 $Foxp3^+ T_{reg}$ 세포의 배수-확장을 측정하였다. 제21일에, 세포를 수합하고, CD4-Alexa Fluoro 488, CD25-PE, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Foxp3 염색 키트를 사용한 세포내 염색, Invitrogen), CD127-Alex Fluoro 700, 헬리오스 PE-Cy7, CTLA-4 Brilliant Violet 605, CD39 APC, CD62L PECy7, CD25 PE, CD103 PerCP.Cy5.5, CD69 APC Fire 750, PD1 Alexa Fluoro 750, 및 CD49b APC로 표면 염색하고, Foxp3-Pacific Blue(BioLegend)(세포내 염색 키트, Invitrogen)를 사용하여 세포내 염색하였다. 표면 염색 후, 세포를 FACS 완충제(0.5% BSA(EMD Millipore) 및 0.001% 소듐 아자이드(Sigma)를 포함하는 1x PBS(Hyclone))에서 세척하였다(실온에서 1500 RPM에서 5분 동안). 2회의 세척 후, 유세포측정기(Celesta-BD Bioscience)에 의해 세포를 분석하였다. 세포내 세포 염색을 위해, 세포를 고정 완충제(Invitrogen)에서 실온에서 20분 동안 고정하였다. 고정 단계 후, 세포를 1x 투과화 완충제(Permeabilized Buffer)(eBioscience)에서 세척(실온에서 5분 동안 1500 RPM)하고, 실온에서 30분 동안 Foxp3-Pacific Blue(BioLegend)를 사용하여 염색하였다. 세포를 다시 한번 1x 투과화 완충제로 세척하고, 이후 FACS 완충제로 세척하였다. 세포 펠렛을 유세포측정법(Celesta-BD Bioscience)에 의한 분석을 위해 300 μ L의 FACS 완충제에 재현탁하였다. (세포를 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 세포 상에서 게이팅(gate)하고, 표면 마커의 데이터-%를 플롯팅하였음, 3명의 건강한 공여자). 도 2의 A 내지 I는 (1) 100 nM의 2t2, 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin), 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)로 21일 동안 자극시킨 $Foxp3^+ T_{reg}$ 세포 상에서 대등한 표면 마커를 보여준다.

[0572] 실시예 5: 인간 조절 T 세포의 활성화는 높은 수준의 포도당 대사를 나타낸다.

[0573] 새로운 인간 백혈구(3명의 공여자)를 혈액 은행으로부터 입수하였고, $CD4^+CD25^+CD127^{dim} T_{reg}$ 세포를 $CD4^+CD25^+CD127^{dim} T_{reg}$ 세포 분리 키트 II(Miltenyi Biotec)를 사용하여 분리하였다. $Foxp3^+ T_{reg}$ 세포의 순도는 >35%였고, CD4-Alexa Fluoro 488, CD25-APC, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Intracellular staining, Invitrogen), 및 CD127-Alex Fluoro 700(BioLegend)으로 염색함으로써 확인하였다. 세포를 카운팅하고, 24-웰 편평 바닥 플레이트에서 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco))에 1×10^6 /mL로 재현탁하였다. 세포를 (1) hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin), 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2, 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세

포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 자극시킨 다음, 37° C 및 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 이튿날, 세포를 수확하고, 카운팅하고, 96-웰 플레이트에서 4 x 10⁶/mL로 재현탁하고, 50 μL/웰을 Cell-Tak 코팅된 Seahorse Bioanalyzer XFe96 배양 플레이트에서 2 mM L-글루타민이 보충된 Seahorse XF RPMI 배지, pH 7.4에서 시딩하였다. 세포를 37°C에서 30분 동안 플레이트에 부착하게 하였다. 추가 130 μL의 검정 배지를 플레이트의 각각의 웰(또한 배경 웰)에 첨가하였다. 플레이트를 1시간 동안 37°C, 비-CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 보정 플레이트에 대해: 포도당/올리고마이신/2-데옥시글루코스의 10x 용액을 Seahorse 검정 배지에서 제조하였다. 20 μL 부피의 포도당/올리고마이신/2-데옥시글루코스를 밤새 보정된 세포의 유입 플레이트의 B 포트 및 C 포트에 첨가하였다. XFe96 Extracellular Flux Analyzer를 사용하여 세포의 산성화율(ECAR)을 측정하였다. 완전 ECAR 분석은 4개 단계로 구성되었으며: 비-해당작용 산성화(약물 없음), 해당작용(10 mM 포도당), 해당작용 역량(2 μM 올리고마이신), 및 해당작용 비측량(100 mM 2-데옥시글루코스), 이를 Seahorse Xfe96 소프트웨어, 웨이브를 사용하여 계산하였다. 결과(도 3a 내지 도 3d)는 활성화된 인간 T_{reg} 세포가 높은 수준의 포도당 대사를 나타내었음을 보여주었다.

[0574] **실시예 6: 확장된 조절 T 세포에 의한 자가 T 반응자 세포의 억제 측정**

[0575] 새로운 인간 백혈구(3명의 공여자)를 혈액 은행으로부터 입수하였고, CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T_{reg} 세포를 CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} 조절 T 세포 분리 키트 II 시약(Miltenyi Biotec)으로 분리하였다. Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 순도는 >35%였고, CD4-Alexa Fluor 488, CD25-APC, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Intracellular staining, Invitrogen), 및 CD127-Alex Fluor 700(BioLegend)으로 염색함으로써 확인하였다. 세포를 카운팅하고, 24-웰 편평 바닥 플레이트에서 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco))에 1x10⁶/mL로 재현탁하였다. 세포를 (1) hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin), 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2, 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 자극시킨 다음, 37° C 및 5% CO₂에서 21일 동안 인큐베이션하였다. 확장 기간 동안, 세포를 (1) hIL-2 사이토카인(500 IU/mL)(Proleukin) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 격일마다 재자극시켰다. 7일마다, 세포를 항-CD3/항-CD28 비드(1:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies)로 재자극시켰다. 세포를 (1) hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)을 함유하는 새로운 완전 배지로 1x10⁶/mL 농도에서 21일 동안 유지시켰다. 트립판 블루(0.4%, Invitrogen) 생존력 검정에서 카운팅함으로써 Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 배수-확장을 측정하였다. 제21일에, 냉동된 자가 T 반응자(Tresp) 세포를 해동시키고, Cell Trace Violet(Invitrogen)으로 표지하였다. 확장된 T_{reg} 세포를 수확하고 카운팅하였다. T_{reg} 세포를 다양한 비(5:1, 2:1, 1:1, 0.5:1, T_{reg} 세포:T 반응자 세포)에서 T 반응자 세포와 함께 배양하였다. 세포를 (1) 항-CD3/항-CD28 비드(비드:세포 1:70) 및 2t2(25 nM) 또는 (2) 항-CD3/항-CD28 비드(비드:세포 1:70) 및 IL2(50 IU/mL)로 재자극시키고, 5일 동안 배양하였다. 세포를 수확하고, FACS 완충제(0.5% BSA(EMD Millipore) 및 0.001% 소듐 아자이드(Sigma)를 포함하는 1x PBS(Hyclone))에서 세척하였다(실온에서 1500 RPM에서 5분 동안). 2회의 세척 후, 유세포측정기(Celesta-BD Bioscience)에 의해 세포를 분석하였다. (CFSE⁺ 증식중인 세포의 %를 플롯팅하였음). 도 4는 hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin), 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 자극된 세포와 비교하여 100 nM의 2t2, 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 자극시킨 Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 억제 역량을 보여준다.

[0576] **실시예 7: 억제 검정으로부터 IL-10의 측정**

[0577] 새로운 인간 백혈구(3명의 공여자)를 혈액 은행으로부터 입수하였고, CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} T_{reg} 세포를 CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} 조절 T 세포 분리 키트 II 시약(Miltenyi Biotec)으로 분리하였다. Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 순도는 >35%였고, CD4-Alexa Fluor 488, CD25-APC, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Intracellular staining, Invitrogen), 및

CD127-Alex Fluoro 700(BioLegend)으로 염색함으로써 확인하였다. 세포를 카운팅하고, 24-웰 편평 바닥 플레이트에서 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco))에 1×10^6 /mL로 재현탁하였다. 세포를 (1) hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin), 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2, 항-CD3/항-CD28 비드(4:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies), 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 자극시킨 다음, 37° C 및 5% CO₂에서 21일 동안 인큐베이션하였다. 확장 기간 동안, 세포를 (1) hIL-2 사이토카인(500 IU/mL)(Proleukin) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)으로 격일마다 재자극시켰다. 7일마다, 세포를 항-CD3/항-CD28 비드(1:1 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies)로 재자극시켰다. 세포를 (1) hIL-2(500 IU/mL)(Proleukin) 및 라파마이신(100 nM)(Sigma) 또는 (2) 100 nM의 2t2 및 라파마이신(100 nM)(Sigma)을 함유하는 새로운 완전 배지로 1×10^6 /mL 농도에서 21일 동안 유지시켰다. 트립판 블루(0.4%, Invitrogen) 생존력 검정에서 카운팅함으로써 Foxp3⁺ T_{reg} 세포의 배수-확장을 측정하였다. 제21일에, 냉동된 자가 T 반응자(Tresp) 세포를 해동시키고, Cell Trace Violet(Invitrogen)으로 표지하였다. 확장된 T_{reg} 세포를 수확하고 카운팅하였다. T_{reg} 세포를 다양한 비(5:1, 1:1, T_{reg} 세포:T 반응자 세포)에서 T 반응자 세포와 함께 배양하였다. 세포를 (1) 항-CD3/항-CD28 비드(비드:세포 1:70) 및 2t2(25 nM) 또는 (2) 항-CD3/항-CD28 비드(비드:세포 1:70) 및 IL2(50 IU/mL)로 재자극시키고, 5일 동안 배양하였다. 세포-무함유 액체 배양 배지를 수집하고, 제조업체의 설명에 따라 LEGENDplex 다중-분석물 유동 검정 키트(Biolegend)에 의해 분석하였다. 도 5는 억제 검정으로부터의 액체-무함유 액체 배양 배지에서 IL-10을 보여주며, 여기서 IL-10 분비는 IL-2 확장된 T_{reg} 세포와 비교하여 2t2-확장된 T_{reg} 세포에서 유의하게 더 높았고, 둘 다 라파마이신의 존재 또는 부재 하에서였다.

[0578] 실시예 8. 3t15*-28s 융합 단백질 복합체의 생산 및 특성화

[0579] *3t15*-28s의 작제 및 생성*

[0580] 항-CD3scFv/TF/IL15D8N 돌연변이체 및 항-CD28scFv/IL15R α Su 융합 단백질을 포함하는 융합 단백질을 생성하였다. 항-CD3 항체(α CD3) 가변 영역, 인간 조직 인자, IL15D8N 돌연변이체, 항-CD28 항체(α CD28) 가변 영역, 및 IL15R α Su 서열을 UniProt 웹사이트로부터 취득하였고, 이들 서열에 대한 DNA를 게네위즈에 의해 합성하였다. 구체적으로, α CD3 경쇄 가변 영역 서열을 (G₄S)₃ 링커에 의해 α CD3 중쇄 가변 영역 서열에 연결하여 α CD3scFv를 형성함으로써 작제물을 만들었다. α CD3scFv를 조직 인자 219의 N-말단 코딩 영역에 연결하고, 뒤이어 IL15D8N 돌연변이체의 N-말단 코딩 영역에 연결하였다(도 6a 내지 도 6b). 작제물의 핵산 및 단백질 서열은 아래에 제시된다.

[0581] α CD3scFv/TF/IL15D8N 작제물(신호 펩타이드 서열 포함)의 핵산 서열은 하기와 같다(SEQ ID NO: 105):

[0582] (신호 펩타이드)

[0583] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTATTCAGCTCCGCCTATTCC

[0584] (α CD3 경쇄 가변 영역)

[0585] CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACAGCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAGCTCGAAATCAATCGT

[0586] (링커)

[0587] GGAGGAGGTGGCAGCGCGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGC

[0588] (α CD3 중쇄 가변 영역)

[0589] CAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAAGTGGCCCGGCCGCGCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCGCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCCCTCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCAGTACAAGAGCTCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCTCTTTAACCAGCAGGAGTCCGCTGTTACTACTGCGTAGGTATTACGACGAC

CACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGC

[0590] (인간 조직 인자 219 형태)

[0591] TCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTAC
ACCGTGCAGATCTCCACCAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAG
CAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATCCCCGAATTCACCCCT
TATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCAGCGG
AATAACACATTTTATCCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACC
AACACCAACGAGTTTAAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGAT
TCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGCGAGTTCCGGGAG

[0592] (인간 IL15D8N 돌연변이체)

[0593] AACTGGGTGAACGTCATCAGCAATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCT
TGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATT
TTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCC
TTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCAATACCTCC

[0594] αCD3scFv/TF/IL15D8N 작제물(신호 펩타이드 서열 포함)의 아미노산 서열은 하기와 같다(SEQ ID NO: 104):

[0595] (신호 펩타이드)

[0596] mkwvtfisllflfssays

[0597] (αCD3 경쇄 가변 영역)

[0598] qivltqspaimsaspgkvtmtcsasssvsymnwyqqksgrspkrwiydtklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaadaatyycqwwsnptfsgsgtk
leintr

[0599] (링커)

[0600] gggsgsgsgsgsgsgs

[0601] (αCD3 중쇄 가변 영역)

[0602] qvqlqqsgaelarpgasvkmckasgytfttrytmhvwkqrpggglewigyinpsrgytnynqkfkdktltdkssstaymqllssltedsavyyccaryydd
hycldywqgttlvtss

[0603] (인간 조직 인자 219)

[0604] sgtntvaaynlrtwkstnfktilewepkpvnvqyvtvqistksdwwskcfytdtedcltdeivkdvkqtylarvfsypagnvestgsageplyenspeftp
yletnlgqptiqsfeqvgtkvnvtvedertlvrrnntflslrdvfgkdliytlyywkssssgkktaktntneflidvdkgenycfsvqavipsrtvnrkstd
spvecmgqekgefre

[0605] (인간 IL15D8N 돌연변이체)

[0606] NWVNVISNLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQS
FVHIVQMFINTS

[0607] αCD28 경쇄 가변 영역 서열을 (G₄S)₃ 링커에 의해 αCD28 중쇄 가변 영역 서열에 연결함으로써 작제된 αCD28scFv를 IL15R αSu의 N-말단 코딩 영역에 연결함으로써 또 다른 작제물을 만들었다. 최종 작제물 αCD28scFv/IL15R αSu 융합 단백질 서열을 Genewiz에 의해 합성하였다. 작제물의 핵산 및 단백질 서열은 아래에 제시된다.

[0608] αCD28scFv/IL15R αSu 작제물(신호 펩타이드 서열 포함)의 핵산 서열은 하기와 같다(SEQ ID NO: 109):

[0609] (신호 펩타이드)

[0610] ATGAAATGGGTCACCTTCATCTCTTTACTGTTTTTATTAGCAGCGCTACAGC

[0611] (αCD28 경쇄 가변 영역)

[0612] GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCCGAACCTGGTCAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAA

TGGGTGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAATCCCTACAACGATTACACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGGCCACT
CTGACAAGCGACAAGAGCTCCATTACCGCTACATGGAGTTTCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAAT
TATTGGGGCCGGGAACCTTTAACAGTGAGCTCC

[0613] (링커)

[0614] GGCGGCGGCGGAAGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCAGC

[0615] (αCD28 중쇄 가변 영역)

[0616] GACATCGAGATGACACAGTCCCCGCTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGTACAGCTTCCTCCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTC
CACTGGTACCAGCAGAAACCCGGCTCTCCCTAACTGTGTATCTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGCGGCGTGCCTCCTCGTTTTCAGCGGCTCCGGCAGC
ACCTCTTACTCTTTAACATTAGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGGTCCCTACCTTTGGCGGAGGCACAAAG
CTGGAGACCAAGCGG

[0617] (인간 IL15R α Su)

[0618] ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCAGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAG
AGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTACCGAGTGCCTGAATAAGGCTACCAACGTGGTCACTGGACAACCCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[0619] αCD28scFv/IL15R α Su 작제물(신호 펩타이드 서열 포함)의 아미노산 서열은 하기와 같다(SEQ ID NO: 108):

[0620] (신호 펩타이드)

[0621] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0622] (αCD28 경쇄 가변 영역)

[0623] vqlqqsgpelvkgasvkmckasgytftsyviqvwkqkpggglewigsinpyndytkynekfkgkatltsdkssitaymefssltsedsalyycarwgdgn
ywggrgttlvtss

[0624] (링커)

[0625] ggggsggsgsgsggs

[0626] (αCD28 중쇄 가변 영역)

[0627] diemtqspaimsaslgervtmtctasssvsssyfhwyyqqkpgsspkciystsnlasgvpprfsgsgstsysltissmeaadaatyfchqyhrsptfgggtk
letkr

[0628] (인간 IL-15R α 스시 도메인)

[0629] ITCPPPMSEVHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R

[0630] 일부 경우, 리더 펩타이드를 무손상 폴리펩타이드로부터 절단하여, 가용성이거나 분비될 수 있는 성숙한 형태를 생성시킨다.

[0631] αCD3scFv/TF/IL15D8N 및 αCD28scFv/IL15R α Su 작제물을 이전에 기재된 바와 같이 상이한 항생제 선택 마커와 함께 변형된 레트로바이러스 발현 벡터 내로 클로닝하고(문헌[Hughes 등, *Hum Gene Ther* 16: 457-72, 2005]), 발현 벡터를 CHO-K1 세포 내로 공동-형질주입하였다. CHO-K1 세포에서 작제물의 발현은 가용성 αCD3scFv/TF/IL15D8N: αCD28scFv/IL15R α Su 융합 단백질(3t15*-28s로 지칭됨)의 분비를 가능하게 하였으며, 이는 항-TF 항체 친화도 크로마토그래피 및 다른 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다.

[0632] 면역친화도 크로마토그래피에 의한 3t15*-28s의 정제

[0633] 항-TF 항체 친화도 컬럼을 GE Healthcar AKTA Avant 시스템에 연결하였다. 유속이 2 mL/분인 용출 단계를 제외하고는, 모든 단계에 대해 유속은 4 mL/분이었다.

[0634] 3t15*-28s의 세포 배양 수확물을 1 M Tris 염기를 이용하여 pH 7.4로 조정하고, 5 컬럼 부피의 PBS로 평형화된 항-TF 항체 친화도 컬럼(상기 기재됨) 상으로 로딩하였다. 시료를 로딩한 후, 컬럼을 5 컬럼 부피의 PBS로 세척하고, 뒤이어 6 컬럼 부피의 0.1 M 아세트산, pH 2.9로 용리하였다. A280 용출 피크를 수집한 다음, 1 M Tris 염기를 첨가함으로써 pH 7.5 내지 8.0으로 중화시켰다. 그 후에, 30 kDa 분자량 컷오프와 함께 Amicon 원심분리 필터를 사용하여, 중화된 시료를 PBS로 완충제 교환하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 항-TF 항체 친화도 컬럼은, TF를 3t15*-28s의 융합 파트너로서 함유하는 3t15*-28s에 결합할 수 있다. 완충제-교환된 단백질 시료를 추

가의 생화학적 분석 및 생물학적 활성 시험을 위해 2°C 내지 8°C에 보관한다.

[0635] 그 후에, 각각의 용출 후, 6 컬럼 부피의 0.1 M 글리신, pH 2.5를 사용하여 항-TF 항체 친화도 컬럼을 박리시켰다. 그 후에, 컬럼을 10 컬럼 부피의 PBS, 0.05% Na₂S₂O₃를 사용하여 중화시키고, 2°C 내지 8°C에 보관하였다.

[0636] 3t15*-28s의 분석적 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석

[0637] Superdex 200 Increase 10/300 GL 겔 여과 컬럼(GE Healthcare)을 AKTA Avant 단백질 정제 시스템(GE Healthcare)에 연결하였다. 상기 컬럼을 2 컬럼 부피의 PBS로 평형화시켰다. 유속은 0.8 mL/분이었다. 200 µL 시료의 3t15*-28s(1 mg/mL)를 모세관 루프를 사용하여 컬럼 상으로 주사하였다. 뒤이어, 1.25 컬럼 부피의 PBS를 주사하였다. SEC 크로마토그래프를 도 8에 도시하였다. 결과는, 3t15*-28s의 단량체 형태 및 이량체 형태 또는 다른 상이한 형태를 나타내는 것 같은 4개의 단백질 피크가 존재함을 나타내었다.

[0638] 3t15*-28s의 SDS PAGE 분석

[0639] 순도 및 단백질 분자량을 결정하기 위해, 항-TF 항체 친화도 크로마토그래피로부터 정제된 3t15*-28s 단백질 시료를, 환원된 조건 하에 표준 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔(4% 내지 12% NuPage Bis-Tris 겔) 전기영동(SDS-PAGE) 방법에 의해 분석하였다. 상기 겔을 InstantBlue으로 약 30분 동안 염색시키고, 뒤이어 정제수에서 밤새 탈색시켰다. 도 9는 항-TF 항체 친화도 크로마토그래피로부터 정제된 3t15*-28s의 SDS 겔을 도시한다. 결과는, 정제된 3t15*-28s가 환원 SDS PAGE에서 예상된 분자량(72 kDa)을 갖는 단백질 밴드를 함유함을 나타내었다.

[0640] 3t15*-28s 융합 단백질 복합체의 활성의 시험관내 특징화

[0641] ELISA-기초 방법은 3t15*-28s 융합 단백질 복합체의 형성을 확인시켜 주었다. 3t15*-28s가 CD28 및 CD3과 상호작용하는지의 여부를 평가하기 위해(도 10a 내지 도 10b), 50 mM 카보네이트 완충제 pH 9.4(100 µl/웰) 중 10 µg/mL의 인간 CD28-Fc(Cat# CD8-H525a, Acro Biosystems) 또는 10 µg/mL의 인간 CD3E/CD3D 헤테로이량체-Llama Fc/Llama Fc(Cat# CDD-H5258, Acro Biosystems)를 ELISA 플레이트(Cat# 80040LE 0910, ThermoFisher)에 적용하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 이튿날, 플레이트를 ELISA 세척 완충제(0.05% Tween 20과 함께 포스페이트-완충 식염수)로 3회 세척하고, 차단 완충제(1% BSA-PBS)로 1시간 동안 차단시켰다. 하강(descending) 농도(차단 완충제 중 3 내지 0.00243 µg/mL)의 3t15*-28s 또는 음성 대조군 융합 단백질(동일한 TF 도메인을 함유하는 HCW9218)을 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 25°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 ELISA 세척 완충제로 3회 동안 세척하였다. 검출 항체인 비오틴화된 항-TF 항체(Cat# BAF2339, R&D Systems)를 0.1 µg/mL에서 플레이트에 첨가하고, 25°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 0.25 µg/mL에서 호스래디쉬 퍼옥시다제-스트렙타비딘(code#016-030-084, Jackson ImmunoResearch)을 플레이트에 첨가하고, 25°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, HRP의 기질인 ABTS(Cat# ABTS-1000-01, Surmodics)를 플레이트에 첨가하고, 25°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기(Multiscan Sky, Thermo Scientific)로 OD405 nm에서 판독하였다. 도 10a 내지 도 10b에 도시된 바와 같이, 3t15*-28s는 CD28 및 CD3과 상호작용한 한편, 대조군 융합 단백질 HCW9218은 그렇지 않았다. 3t15*-28s 융합 단백질 복합체의 αCD3scFv 도메인 및 αCD28scFv 도메인은 CD3 및 CD28에 결합할 수 있었다. CD28 및 항-TF 항체 각각의 αCD28scFv 및 TF 도메인의 결합(도 10a)은 정제된 단백질이 3t15*-28s 헤테로이량체 복합체로 이루어졌음을 확인시켜 주었다.

[0642] **실시예 9. 2t2 및 3t15*-28s를 사용한 Foxp3⁺ 조절 T 세포의 확장**

[0643] 새로운 인간 백혈구(3명의 공여자)를 혈액 은행으로부터 입수하였고, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 조절 세포를 EasySep 인간 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 조절 T 세포 분리 키트(StemCell Technology)로 분리하였다. Foxp3⁺ 조절 T 세포의 순도는 >35%였고, CD4-Alexa Fluor 488, CD25-PE, CD3 APC-Cy7 및 Foxp3-PacBlue(BioLegend)로 염색함으로써 확인하였다. 세포를 카운팅하고, 24-웰 편평 바닥 플레이트에서 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco)에 1x10⁶/mL로 재현탁하였다. 세포를 2t2(100 nM) 및 3t15*-28s(200 nM)로 자극시키고, 37°C, 5% CO₂에서 11일 동안 인큐베이션하였다. 확장 기간 동안, 세포를 격일로 2t2(100

nM) 및 3t28(200 nM)을 함유하는 새로운 완전 배지로 1×10^6 /mL 농도에서 11일 동안 유지시켰다. 그 후에, 세포를 CD4-Alexa Fluro 488, CD25-PE, CD3 APC-Cy7 및 Foxp3-PacBlue Abs(BioLegend)로 염색하여, 유세포측정법에 의해 Foxp3⁺ 조절 T 세포의 확장을 평가하였다. 트립판 블루(0.4%, Invitrogen) 배제를 사용하여 카운팅함으로써 Foxp3⁺ 조절 T 세포의 배수-확장을 측정하였다. 도 11은 11일째에 Foxp3⁺ 조절 T 세포에서 2.5배 증가를 보여준다.

[0644] 실시예 10. 2t2 및 3t15*-28s 플러스 항-조직 인자 항체를 사용한 인간 면역 세포의 확장

[0645] 새로운 인간 백혈구(2명의 공여자)를 혈액 은행으로부터 입수하였고, PBMC(말초 혈액 단핵 세포)를 Ficoll 분리로 분리하였다. 세포를 카운팅하고, PBS 중에 1×10^7 세포/mL의 밀도로 재현탁하였다. 2 μ M의 최종 농도의 Cell-Trace Violet Dye(Life Technologies)를 세포에 첨가하고, 5% CO₂의 분위기 하에 37°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 실온에서 5분 동안 2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 항생제(페니실린, 10,000 단위/mL; 스트렙토마이신, 10,000 μ g/mL; Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 새로운 예온된 RPMI 1640 배지(Gibco)에서 10배 부피로 재현탁하였다. 세포를 10분 동안 1200 rpm에서 2회 세척하고, 카운팅하고, 2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 항생제(페니실린, 10,000 단위/mL; 스트렙토마이신, 10,000 μ g/mL; Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640 배지(Gibco)에 2×10^6 세포/mL의 밀도로 재현탁하였다. 세포(0.1 mL)를 96웰 편평 바닥 플레이트로 옮기고, 항-조직 인자 항체(α TF Ab, 0.01-100 nM)와 함께 또는 없이 2t2(100 nM) 및 3t15*-28s(0.01-1000 nM)와 함께 인큐베이션하였다. 3t15*-28s와 항-조직 인자 항체의 복합체를 자극 전 15분전에 2:1의 비로 만들었다. 배지 중 절반을 제거하고, 항-조직 인자 항체와 함께 또는 없이 새로운 2t2(100 nM) 및 3t15*-28s로 48시간 내지 72시간마다 대체하였다. 세포를 CD4-Alexa Fluro 488, CD3-PE, CD8-PerCP Cy5.5 Abs(BioLegend)로 염색하여, Cell Trace Violet의 희석을 유세포측정법에 의해 평가하였다.

[0646] 도 12는 상이한 배양 조건 하에 6회 이상의 세포 분열을 겪고 있는 CD4⁺ T 세포의 백분율을 보여준다. 3t15*-28s: α TF Ab 복합체 플러스 2t2와의 인큐베이션은 3t15*-28s 플러스 2t2(α TF Ab 없음)로 관찰된 것보다 더 낮은 3t15*-28s 농도에서 세포 증식을 지지할 수 있었다. 이러한 결과는, PBMC로부터 유래된 면역 세포가 항-조직 인자 항체와 3t28의 복합체를 사용하여 증식하도록 최적으로 자극될 수 있었음을 시사한다.

[0647] 실시예 11. 항-CD39 IgG1_k 시약을 사용한 CD39⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포의 정제

[0648] 새로운 인간 백혈구를 혈액 은행으로부터 수득하였다. 백혈구 중 절반을 사용하여, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 조절 세포를 EasySep 인간 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 조절 T 세포 분리 키트(StemCell Technology)로 정제하였다. Foxp3⁺ 조절 T 세포의 순도는 >60%였고, CD4-Alexa Fluro 488, CD39-APC, CD3 PE, Foxp3-PacBlue(BioLegend)로 염색함으로써 확인하였다. 백혈구 중 다른 절반을 사용하여, CD39⁺ Foxp3⁺ 조절 T 세포를 2개 단계 과정에 의해 정제하였다. 먼저, CD4⁺ T 세포를 RosetteSep 인간 CD4⁺ 세포 분리 키트(StemCell Technology)를 이용하여 분리하였다. CD4⁺ T 세포를 농화시킨 후, 신규 비오틴화된 항 CD39 항체 시약(HCW Biologic) 및 자성 입자를 제조업체의 설명(EasySep Human Biotin Positive Selection Kit, StemCell Technology)에 따라 사용하여 CD39⁺ CD4⁺ 세포를 분리하였다. 세포를 CD4-Alexa Fluro 488, CD39-APC, CD3 PE, Foxp3-PacBlue Abs(BioLegend)로 염색하여, CD39⁺ Foxp3⁺ 조절 T 세포의 순도를 유세포측정법에 의해 평가하였다(세포를 CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ 상에서 게이팅하였음). 유세포측정기에 의한 정제후 순도 분석은, 비오틴화된 항 CD39 Ab를 사용하여 정제된 세포가 EasySep 인간 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 조절 T 세포 분리 키트(StemCell Technology)를 사용하여 분리된 세포에 대한 62%와 비교하여 84.8% CD39⁺였음을 보여주었다. 이러한 데이터는, 분리된 고도로 순수하고 표현형 활성 조절 T 세포를 위한 신규 전략을 실증한다(도 13a). 이들 세포를 hIL-2, 항-CD3/항-CD28 비드, 라파마이신, 2t2, 3t15*, 및 또는 3t15*-28s: α TF Ab 복합체를 함유하는 배지에서 상기 기재된 방법에 의해 확장시킬 수 있다.

[0649] 제2 연구에서, Foxp3⁺ 조절 T 세포를 먼저 정제된 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 조절 세포로부터의 2t2를 이용하여 확장시킨 다음, 냉동시켰다. 세포를 해동하고, T25 플레이트에서 2t2(100 nM)와 함께 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life

Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco))에 2×10^6 /mL로 유지시켰다. 신규 비오틴화된 항 CD39 Ab 시약(HCW Biologic) 및 자성 입자를 제조업체의 설명(EasySep Human Biotin Positive Selection Kit, StemCell Technology)에 따라 사용하여 $CD39^+CD4^+$ 세포를 단리하였다. 세포를 CD4-Alexa Fluro 488, CD39-APC, CD3 PE, Foxp3-PacBlue Abs(BioLegend)로 염색하여, $CD39^+Foxp3^+$ 조절 T 세포의 순도를 유세포측정법에 의해 평가하였다(세포를 $CD3^+CD4^+Foxp3^+$ 상에서 게이팅하였음). 유세포측정기에 의한 정제후 순도 분석은, 비오틴화된 항 CD39 항체를 사용하여 정제된 세포가 고도로 억제성인 $CD39^+$ 하위세트에 대해 99.9% 농화된 $Foxp3^+$ 조절 T 세포를 산출하였음을 보여준다(도 13b). 이들 세포를 hIL-2, 항-CD3/항-CD28 비드, 라파마이신, 2t2, 3t15*, 및 또는 3t15*-28s: α TF Ab 복합체를 함유하는 배지에서 상기 기재된 방법에 의해 확장시킬 수 있다.

[0650] 실시예 12. 정제된 $CD39^+$ 조절 T 세포에 의한 자가 T 반응자 세포의 억제

[0651] 새로운 인간 백혈구를 혈액 은행으로부터 수득하였다. 백혈구 중 절반을 사용하여, $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ T 조절 세포를 EasySep 인간 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 조절 T 세포 단리 키트(StemCell Technology)로 정제하였다. $Foxp3^+$ 조절 T 세포의 순도는 >60%였고, CD4-Alexa Fluro 488, CD39-APC, CD3 PE, Foxp3-PacBlue(BioLegend)로 염색함으로써 확인하였다. 백혈구 중 다른 절반을 사용하여, $CD39^+Foxp3^+$ 조절 T 세포를 2개 단계 과정에 의해 정제하였다. 먼저, $CD4^+$ T 세포를 RosetteSep 인간 $CD4^+$ 세포 단리 키트(StemCell Technology)를 이용하여 단리하였다. $CD4^+$ T 세포를 농화시킨 후, 신규 비오틴화된 항 CD39 항체 시약(HCW Biologics) 및 자성 입자를 제조업체의 설명(EasySep Human Biotin Positive Selection Kit, StemCell Technology)에 따라 사용하여 $CD39^+CD4^+$ 세포를 단리하였다. 세포를 CD4-Alexa Fluro 488, CD39-APC, CD3 PE, Foxp3-PacBlue Abs(BioLegend)로 염색하여, $CD39^+Foxp3^+$ 조절 T 세포의 순도를 유세포측정법에 의해 평가하였다(세포를 $CD3^+CD4^+Foxp3^+$ 상에서 게이팅하였음). 자가 T 반응자(Tresp) 세포를 Cell Trace Violet(Invitrogen)으로 표지하였다. 정제된 $Foxp3^+$ T 세포를 T 반응자 세포와 함께 배양하였다(1:1 조절 T 세포: T 반응자 세포). 세포를 2t2(10 nM)로 재자극시키고, 5일 동안 배양하였다. 세포를 수확하고, FACS 완충제(0.5% BSA(EMD Millipore) 및 0.001% 소듐 아자이드(Sigma)를 포함하는 1x PBS(Hyclone))에서 세척하였다(실온에서 1500 RPM에서 5분 동안). 2회의 세척 후, 세포를 유세포측정기(Celesta-BD Bioscience)에 의해 분석하고, 분열중인 Tresp 세포의 %를 Cell Trace Violet 회색에 기초하여 결정하였다. 도 14는, 정제된 $CD39^+Foxp3^+$ 조절 T 세포가 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ T 조절 세포에 기초하여 단리된 세포와 비교할 때 T 반응자 세포 증식을 억제시키는 데 있어서 더 효과적이었음을 보여준다.

[0652] 실시예 13. 확장되고 $CD39^+$ -정제된 T 조절 세포에 의한 THP-1 단핵구 세포의 억제

[0653] 새로운 인간 백혈구를 혈액 은행으로부터 수득하였다. $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ T 조절 세포를 EasySep 인간 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 조절 T 세포 단리 키트(StemCell Technology). $Foxp3^+$ 조절 T 세포의 순도는 >60%였고, CD4-Alexa Fluro 488, CD39-APC, CD3 PE, Foxp3-PacBlue(BioLegend)로 염색함으로써 확인하였다. 세포를 카운팅하고, 24-웰 편평 바닥 플레이트에서 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco))에 1×10^6 /mL로 재현탁하였다. 세포를 CD3/CD28 비드(4:1, 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies)와 함께 100 nM의 2t2로 자극시키고, 37°, 5% CO₂에서 21일 동안 인큐베이션하였다. 확장 기간 동안, 세포를 100 nM의 2t2로 격일로 재자극시키고 7일마다 세포를 CD3/CD28 비드(1:1, 비드:세포)(Dynabeads, Life Technologies)로 재자극시켰다. 세포를 격일로 100 nM의 2t2를 함유하는 새로운 완전 배지로 1×10^6 /mL 농도에서 21일 동안 유지시켰다.

[0654] 제21일에, 세포를 CD4-Alexa Fluro 488, CD25-PE, CD3 APC-Cy7, Foxp3-PE(Foxp3 염색 키트를 사용한 세포내 염색, Invitrogen), 및 CD127-Alex Fluro 700(BioLegend)으로 염색하여, 유세포측정법에 의해 $Foxp3^+$ 조절 T 세포의 확장을 평가하고, 20×10^6 /mL로 냉동시켰다. 이전에 확장된 세포를 해동하고, T25 플레이트에서 완전 배지(2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo

Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco))에 2×10^6 /mL로 1시간 동안 유지시키고, 세척한 다음 $CD39^+CD4^+$ T reg 세포를 단리하였다. 신규 비오틴화된 항-CD39 Ab 시약(HCW Biologics; EasySep Human Biotin Positive Selection Kit, StemCell Technology)을 사용하여 $CD39^+CD4^+$ 세포를 단리하였다. 세포를 CD4-Alexa Fluoro 488, CD39-APC, CD3 PE, Foxp3-PacBlue Abs(BioLegend)로 염색하여, $CD39^+Foxp3^+$ 조절 T 세포의 순도를 유세포측정법에 의해 평가하였다(세포를 $CD3^+CD4^+Foxp3^+$ 상에서 게이팅하였음). 유세포측정기에 의한 정제후 순도 분석은, 비오틴화된 항 CD39 항체를 사용하여 정제된 세포가 고도로 억제성인 $CD39^+$ 하위세트에 대해 99.9% 농화된 Foxp3⁺ 조절 T 세포를 산출하였음을 보여준다. 억제 검정은 THP-1(인간 단핵구 세포) 또는 정제된 $CD39^+Foxp3^+$ T Reg 세포 또는 $CD39^-Foxp3^+$ T Reg 세포 또는 총 $CD4^+$ T Reg 세포(1:1 비)로 설정되었다. 세포를 50 ng/mL LPS가 보충된 2 mM L-글루타민(Thermo Life Technologies), 페니실린(Thermo Life Technologies), 스트렙토마이신(Thermo Life Technologies) 및 10% FBS(Hyclone)가 보충된 RPMI 1640(Gibco)에서 3일 동안 배양하였다. 세포 상층액을 제3일에 수집하여, IL-10을 ELISA(R&D System)에 의해 분석하였다.

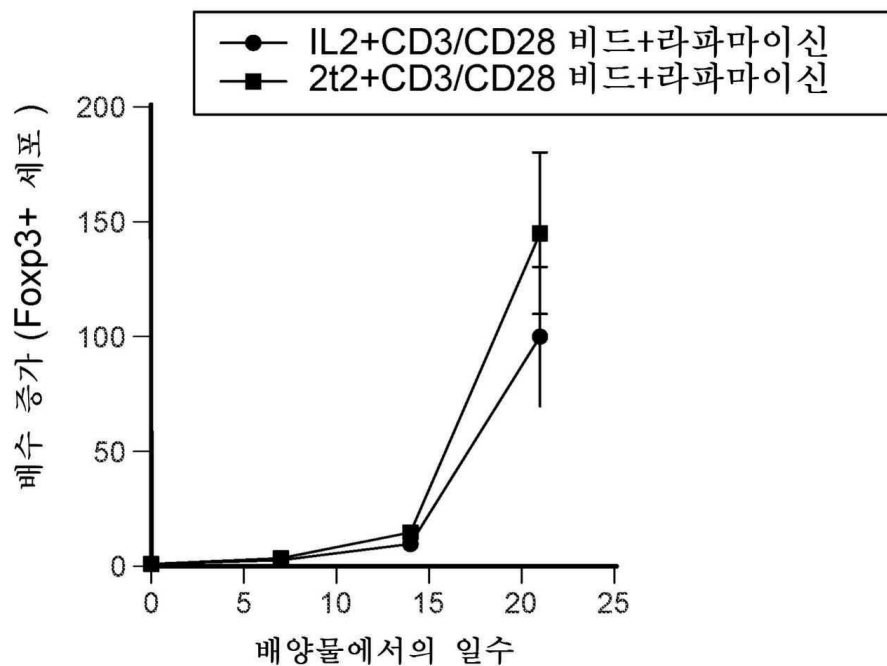
[0655] 도 15는 $CD39^+Foxp3^+$ 조절 T 세포가 $CD39^-Foxp3^+$ T Reg 세포 또는 총 $CD4^+$ T Reg 세포와 비교하여 유의하게 더 많은 IL-10을 분비함을 보여준다. 이러한 데이터는, $CD39^+Foxp3^+$ T Reg가 $CD39^-Foxp3^+$ T Reg 세포 또는 총 $CD4^+$ T Reg 세포와 비교하여 더 많은 억제 역량을 가짐을 보여준다.

[0656] 다른 구현예

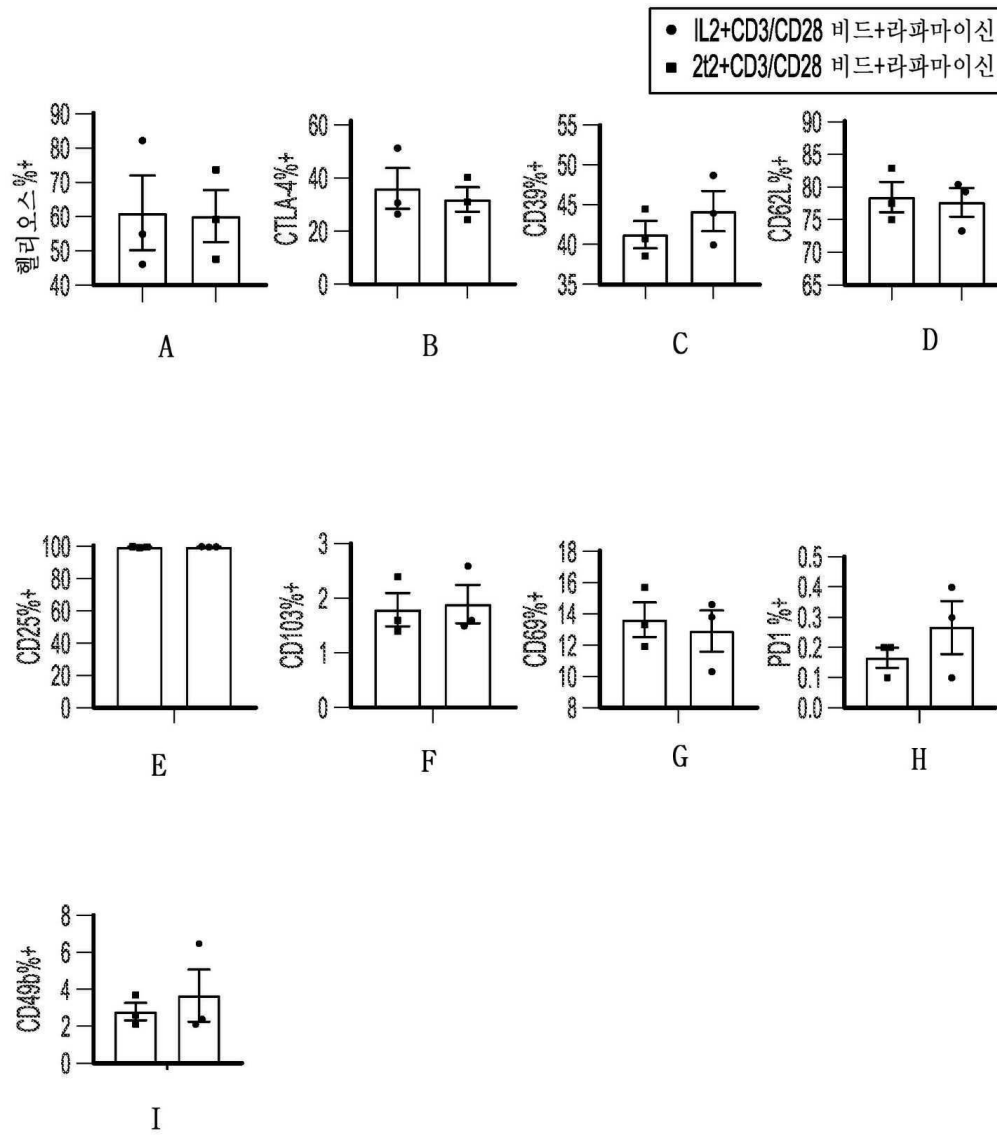
[0657] 본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 기재되긴 하였지만, 상기 설명은 본 발명의 범위를 예시하는 것이고 이를 제한하려는 것이 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구항의 범위에 의해 정의된다. 다른 양태, 이점 및 변형은 하기 청구항의 범위 내에 있다.

도면

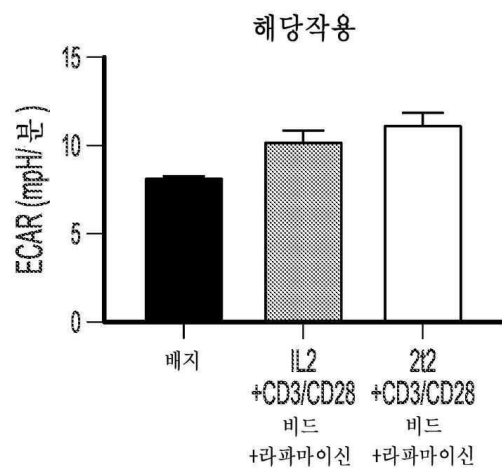
도면1



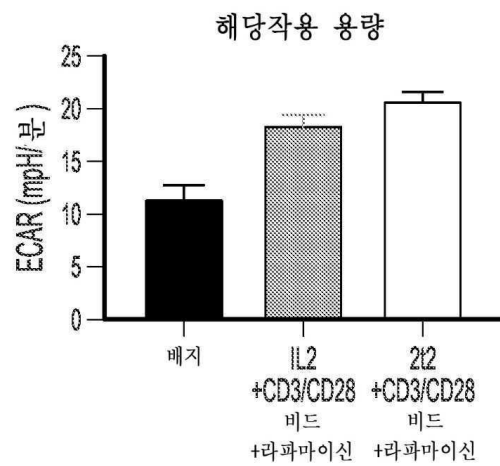
도면2



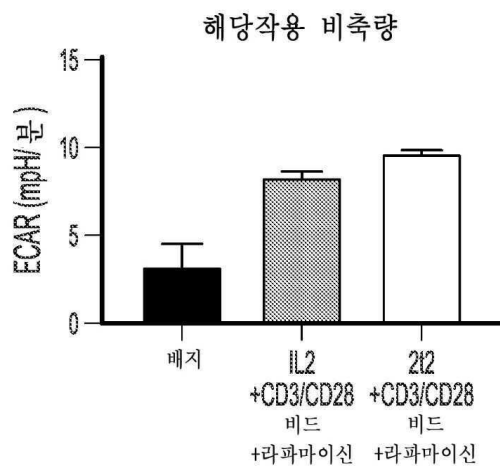
도면3a



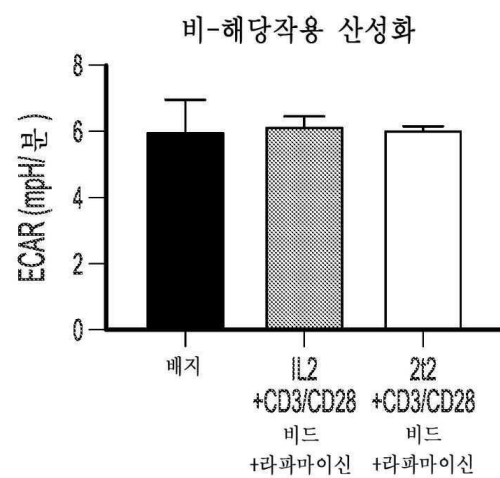
도면3b



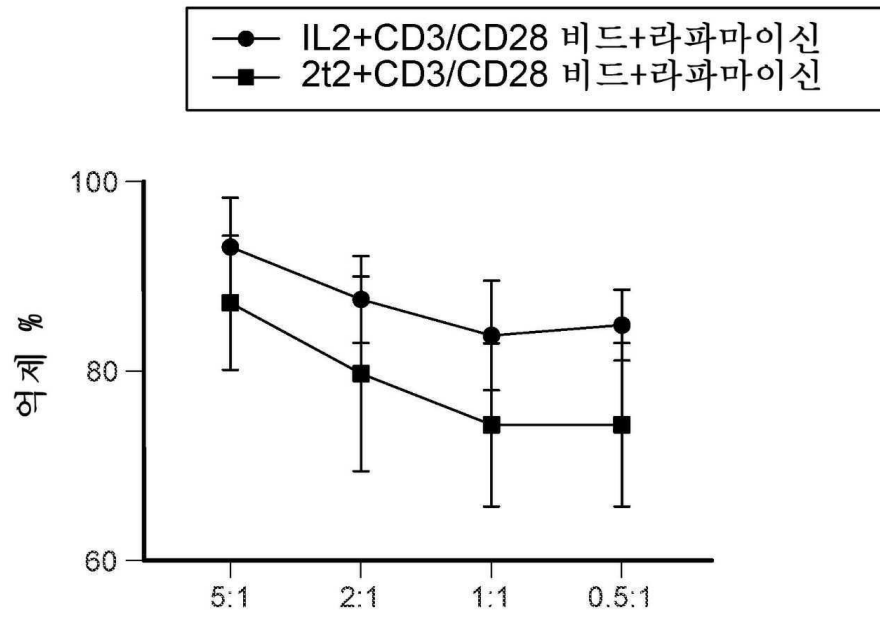
도면3c



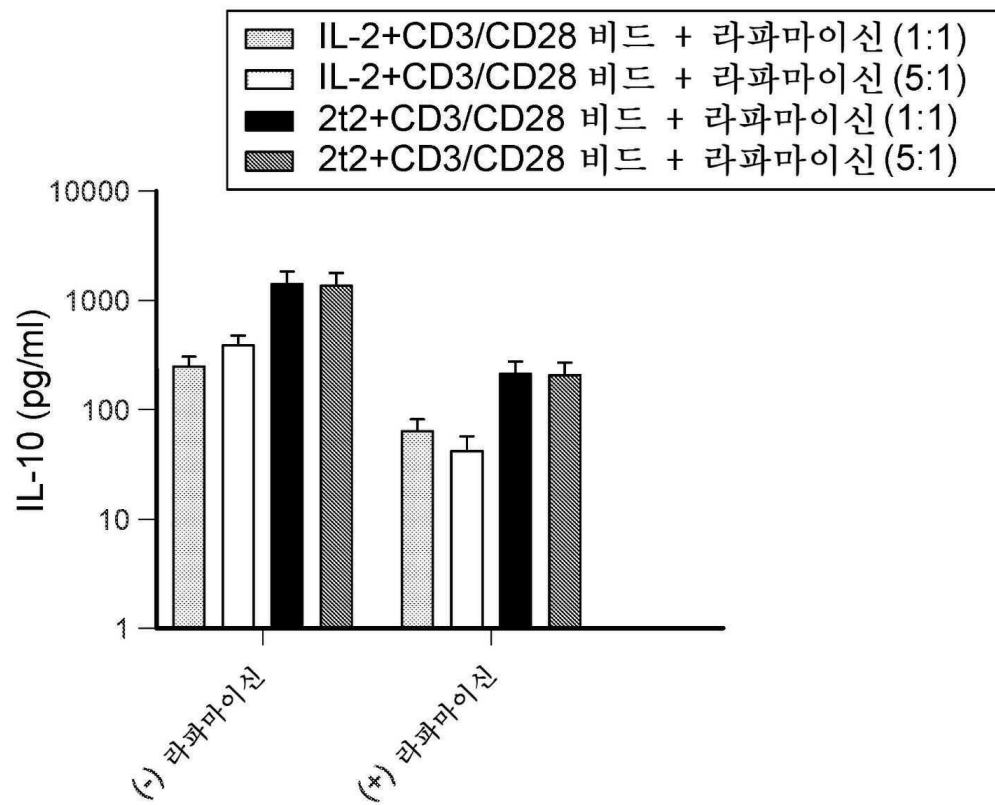
도면3d



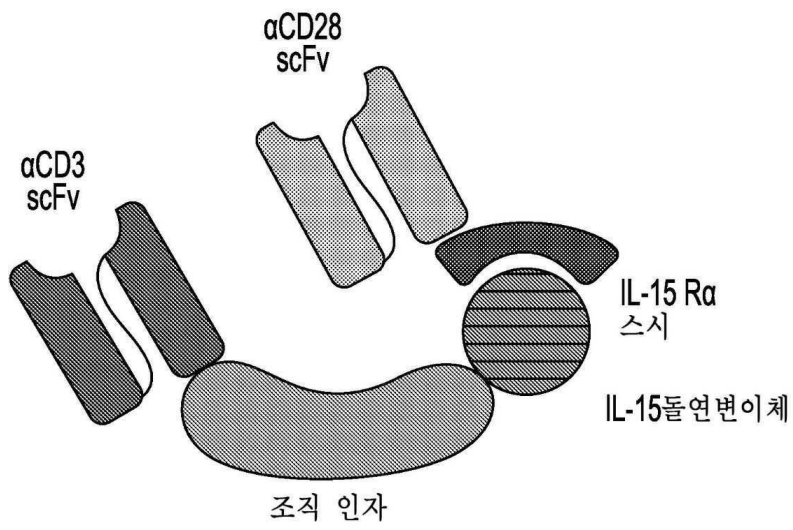
도면4



도면5



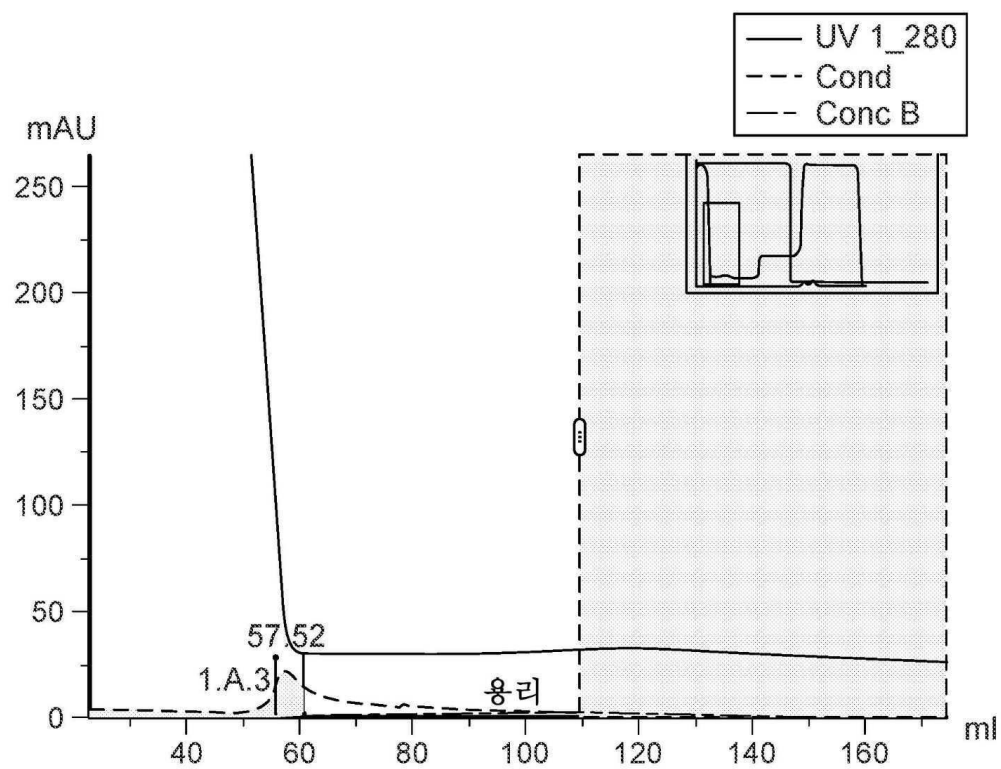
도면6a



도면6b



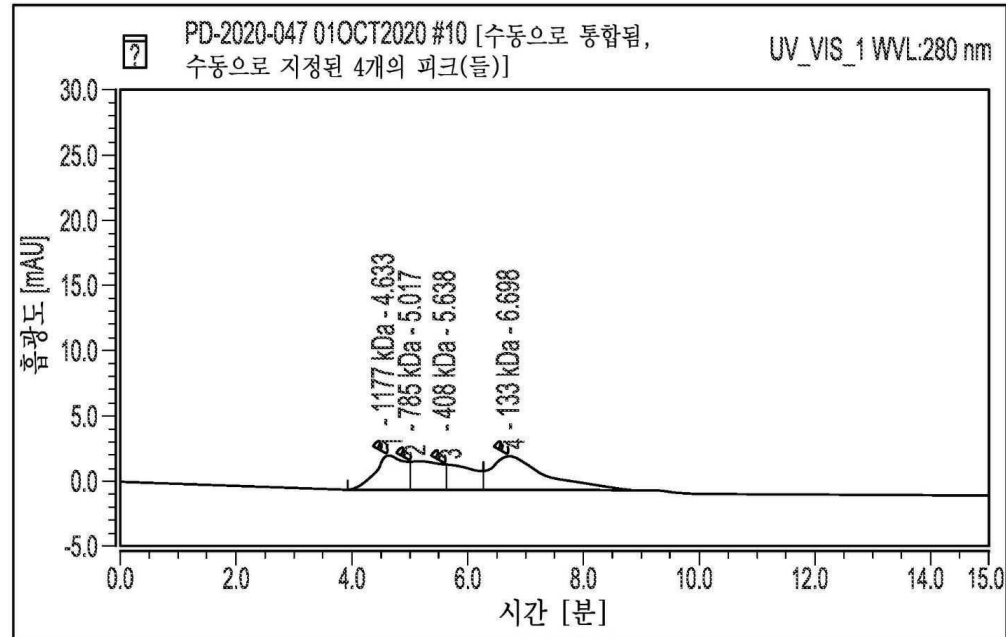
도면7



도면8

주사 명칭:	58-77 9213	진행 시간 (분):	15.00
바이얼 번호:	RB2	주사 부피:	50.00
주사 유형:	미지	채널:	UV_VIS_1
보정 방법:		파장:	280
장비 방법:	Agilent AdvanceBioSEC 4.6 x 300, 가드 있음	밴드폭:	n.a.
가공 방법:	HCW9218 SEC 가공 방법	희석 계수:	1.0000
주사 일자/시간:	01/Oct/20 19:14	시료 중량:	1.0000

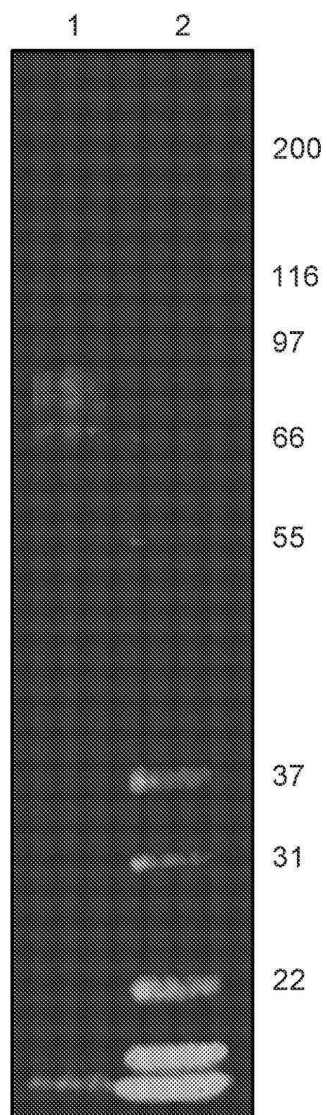
크로마토그램



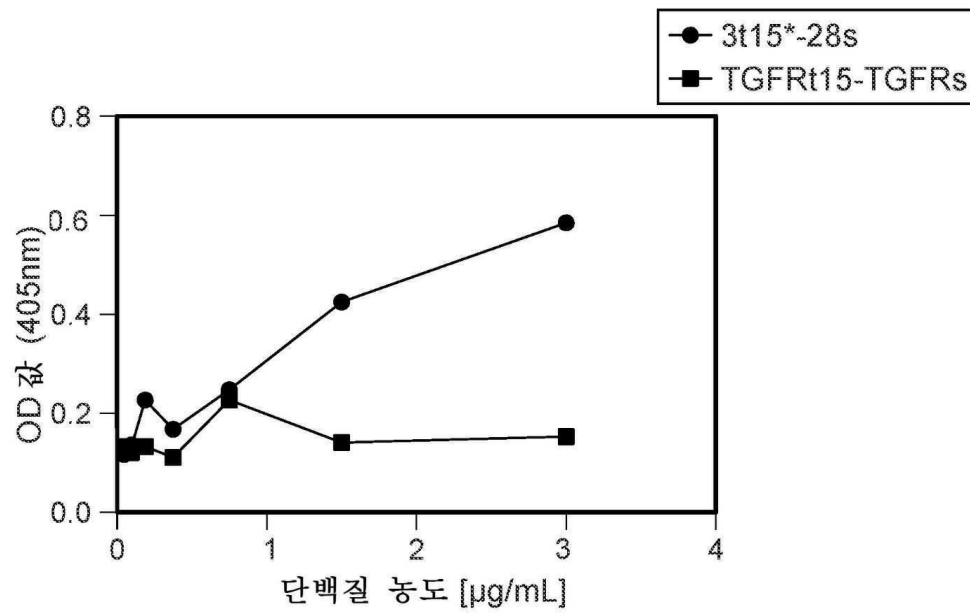
통합 결과

No.	피크 명칭	체류 시간 분	면적 mAU*분	높이 mAU	상대 면적 %	상대높이 %	양 n.a.
1	1177 kDa	4.633	1.587	2.681	22.89	28.14	n.a.
2	785 kDa	5.017	1.312	2.201	18.92	23.10	n.a.
3	408 kDa	5.638	1.107	1.985	15.96	20.84	n.a.
4	133 kDa	6.698	2.928	2.661	42.23	27.92	n.a.
합계:			6.934	9.529	100.00	100.00	

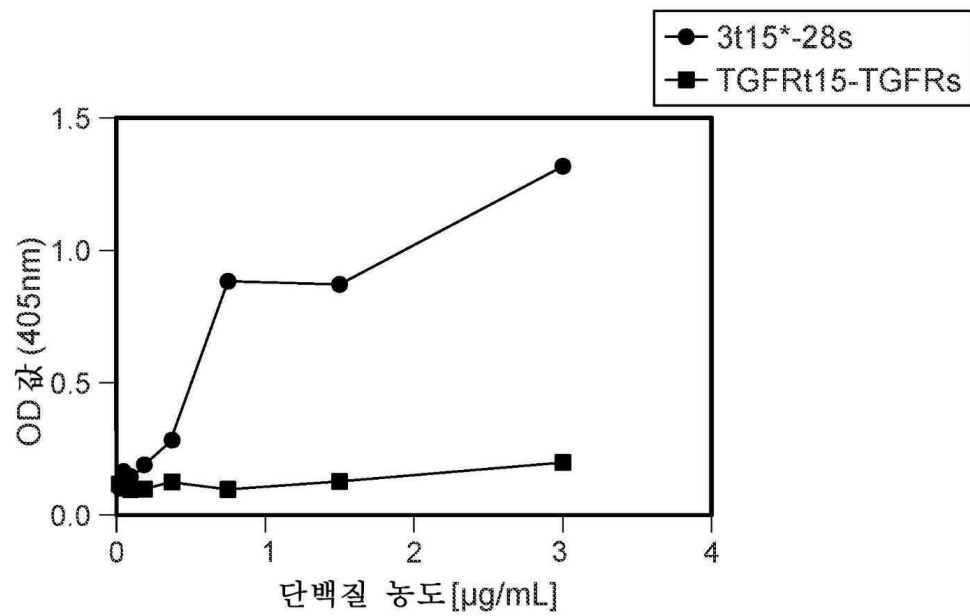
도면9



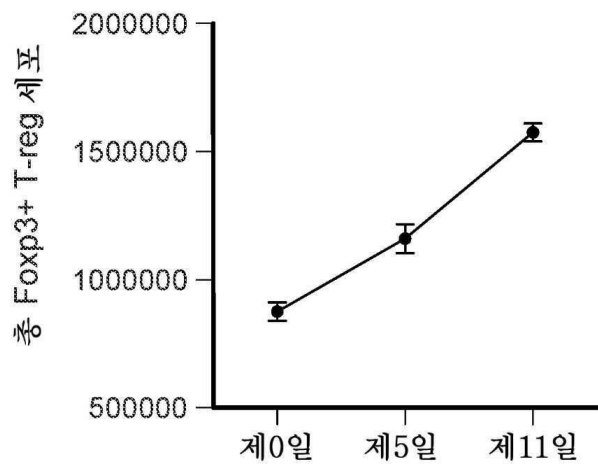
도면10a



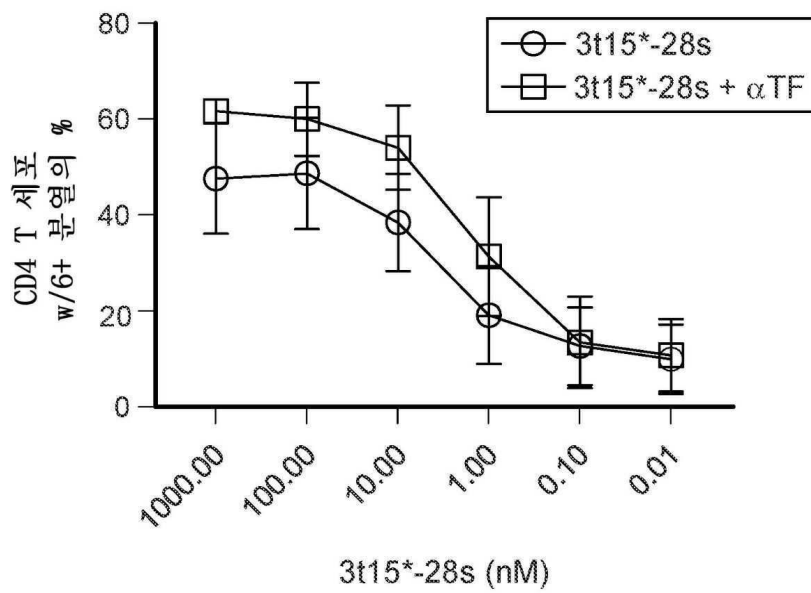
도면10b



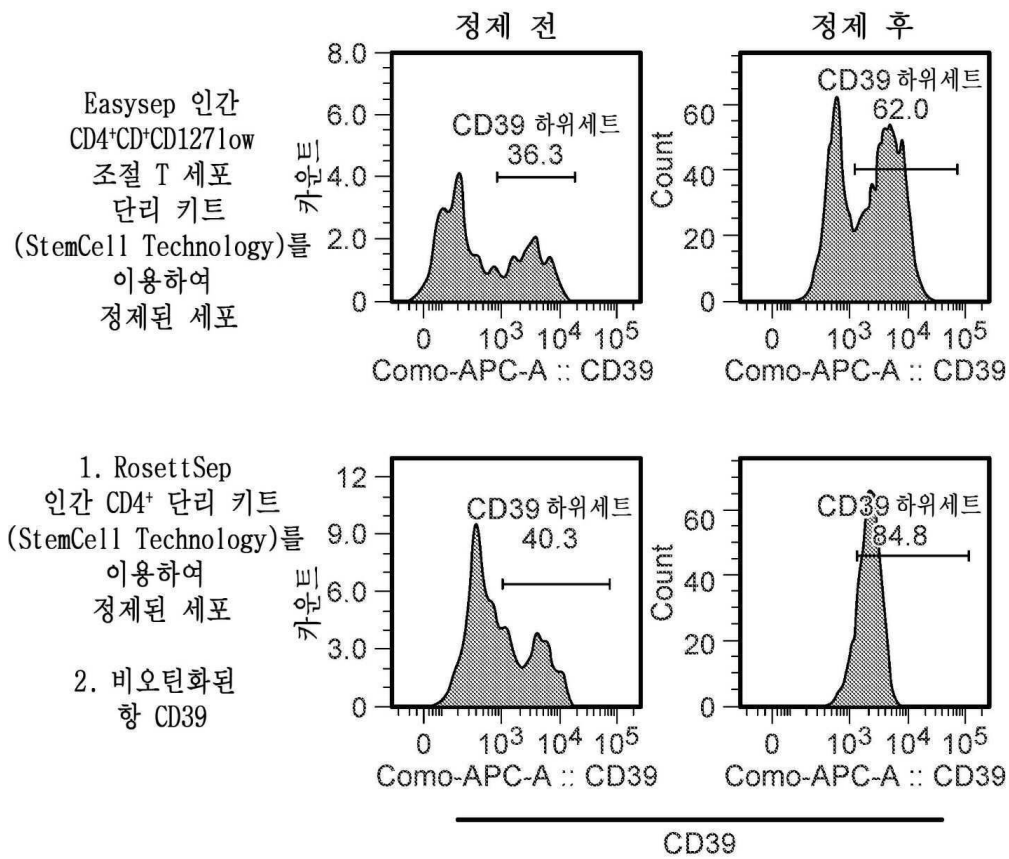
도면11



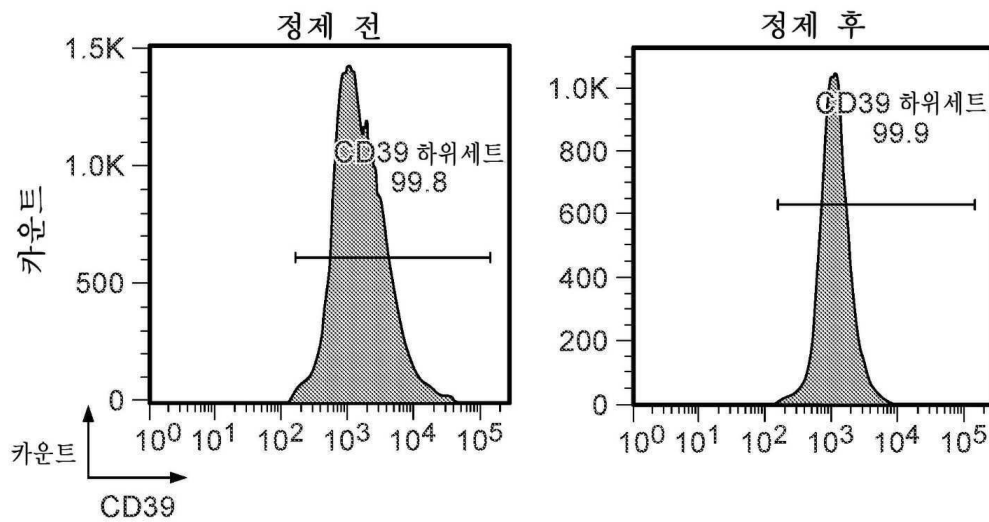
도면12



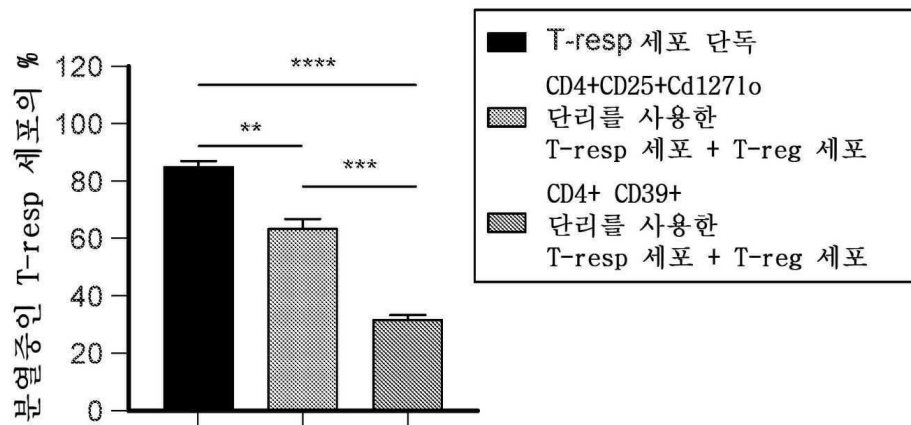
도면13a



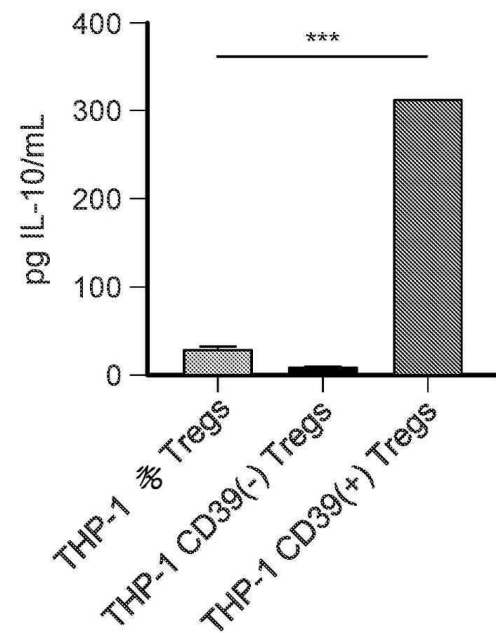
도면13b



도면14



도면15



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> HCW BIOLOGICS, INC.

<120> METHODS OF ACTIVATING REGULATORY T CELLS

<130> 47039-0019W01

<140> PCT/US2021/017620

<141> 2021-02-11

<150> 62/981,944

<151> 2020-02-26

<150> 62/975,141

<151> 2020-02-11

<160> 123

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 2

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

195 200 205
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu

210 215

<210> 3

<211> 485

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 3

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn
130 135 140

Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro
145 150 155 160

Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly
165 170 175

Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu
180 185 190

Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val
195 200 205

Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu
210 215 220

Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn
225 230 235 240

Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val
 245 250 255
 Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr
 260 265 270
 Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu
 275 280 285

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

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

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

 Ile Ser Thr Leu Thr

485

<210> 4

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 4

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

1 5 10 15

Tyr Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu

20 25 30

Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn

35 40 45

Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe

85 90 95

His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu

100 105 110

Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu

115 120 125

Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln

130 135 140

Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala

145 150 155 160

Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys

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

 Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu
 245 250 255
 Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr
 260 265 270
 Lys Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn
 275 280 285
 Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr
 290 295 300

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

 Arg Glu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
 370 375 380
 Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn
 385 390 395 400
 Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met
 405 410 415
 Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu
 420 425 430

 Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe
 435 440 445

His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu
 450 455 460
 Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu
 465 470 475 480
 Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln
 485 490 495

Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 500

<210> 5

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 5

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
 115 120 125
 Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
 130 135 140

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys
 145 150 155 160
 Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser
 165 170 175

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

Ser

<210> 6

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 6

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

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

Arg Trp Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu
130 135 140

Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser
145 150 155 160

Ser Tyr Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu
165 170 175

Cys Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe
180 185 190

Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
195 200 205

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
210 215 220

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg
225 230 235

<210> 7

<211

> 696

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 7

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

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

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

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

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

305 310 315 320

Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu

325 330 335

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

340 345 350

Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val

355 360 365

Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu

370 375 380

Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys

385 390 395 400

Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe

405 410 415

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

420 425 430

Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val

435 440 445

Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Val Gln Leu Gln

450 455 460

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

465 470 475 480

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Ile Gln Trp Val

485 490 495

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

500 505 510

Tyr Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr

515 520 525

Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr Met Glu Phe Ser Ser

530 535 540

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

545 550 555 560
Gly Asn Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly

 565 570 575
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu

 580 585 590
Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val

 595 600 605
Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Phe His

 610 615 620
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr Ser

625 630 635 640
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly

 645 650 655
Ser Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala

 660 665 670
Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Thr Phe Gly Gly

 675 680 685
Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg

 690 695

<210> 8

<211> 714

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 8

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

1 5 10 15

Tyr Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp

50

55

60

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

65

70

75

80

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met

145

150

155

160

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

245

250

255

Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr

260

265

270

Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro

275

280

285

Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp

290 295 300
 Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp

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

 370 375 380
 Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu
 385 390 395 400
 Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr
 405 410 415
 Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn
 420 425 430
 Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val

 435 440 445
 Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser
 450 455 460
 Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Val Gln
 465 470 475 480
 Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 485 490 495
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Ile Gln

 500 505 510
 Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile
 515 520 525
 Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys
 530 535 540

Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr Met Glu Phe
 545 550 555 560
 Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp

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

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

690 695 700
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg

705 710

<210> 9

<211> 2088

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 9

cagatcgtgc tgacccaaag ccccgccatc atgagcgcta gccccggtga gaaggtgacc	60
atgacatgct ccgcttccag ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaaaagcgga	120
accagcccca aaaggtggat ctacgacacc agcaagctgg cctccggagt gcccgtcat	180

ttccggggct ctggatccgg caccagctac tctttaacca ttccggcat ggaagctgaa 240

gacgctgcc cctactattg ccagcaatgg agcagcaacc cttcacatt cggatctggc 300

accaagctcg aaatcaatcg tggaggaggt ggcagcggcg gcggtggatc cggcggagga 360

ggaagccaag ttcaactcca gcagagcggc gctgaactgg cccggcccgg cgcctccgtc 420

aagatgagct gcaaggcttc cggctataca ttactcgtt acacaatgca ttgggtcaag 480

cagaggcccc gtcaaggttt agagtggatc ggatatatca acccttcccg gggctacacc 540

aactataacc aaaagttaa ggataaagcc actttaacca ctgacaagag ctctccacc 600

gcctacatgc agctgtcctc ttttaaccagc gaggactccg ctgtttacta ctgcgtagg 660

tattacgacg accactactg tttagactat tggggacaag gtaccacttt aaccgtcagc 720

agctccggca ccaccaatac cgtggccgct tataacctca catggaagag caccaacttc 780

aagacaattc tggaatggga acccaagccc gtcaatcaag ttacaccgt gcagatctcc 840

accaaaccg gagactggaa gagcaagtgc ttctacaca cagacaccga gtgtgattta 900

accgacgaaa tcgtcaagga cgtcaagcaa acctatctgg ctccgggtctt ttcctacccc 960

gctggcaatg tcgagtccac cggctccgct ggcgagcctc tctacgagaa ttccccgaa 1020

ttcacccctt atttagagac caatttaggc cagcctacca tccagagctt cgagcaagtt 1080

ggcaccaagg tgaacgtcac cgtcgaggat gaaaggactt tagtgcggcg gaataacaca 1140

tttttatccc tccgggatgt gttcggcaaa gacctcatct acacactgta ctattggaag 1200

tccagctcct ccggcaaaaa gaccgctaag accaacacca acgagttttt aattgacgtg 1260

gacaaaggcg agaactactg cttcagcgtg caagccgtga tcccttctcg taccgtcaac 1320

cggaagagca cagattcccc cgttgagtgc atggccaag aaaagggcga gttccgggag 1380

gtccagctgc agcagagcgg accgaactc gtgaaaccg gtgcttccgt gaaaatgtct 1440

tgtaaggcca gcggatacac cttcacctcc tatgtgatcc agtgggtcaa acagaagccc 1500

ggacaaggtc tcgagtggat cggcagcatc aacccttaca acgactatac caaatacaac 1560

gagaagttaa agggaaagcg tactttaacc tccgacaaaa gctccatcac agcctacatg 1620

gagttcagct ctttaacatc cgaggacagc gctctgtact attgcgcccg gtggggcgac 1680

ggcaattact ggggacgggg cacaacactg accgtgagca gcggaggcgg aggtccggc 1740

ggaggcggat ctggcgttgg cggctccgac atcgagatga ccagtcctc cgctatcatg 1800

tccgctctt taggcgagcg ggtcacaatg acttgtacag cctcctccag cgtctcctcc 1860

tcctacttcc attggtacca acagaaacc ggaagctccc ctaaactgtg catctacagc 1920

accagcaatc tcgccagcgg cgtgccccct aggttttccg gaagcgggaag caccagctac 1980
tctttaacca tctcctccat ggagcctgag gatgccgcca cctacttttg tcaccagtac 2040
caccggtccc ccaccttcgg aggcggcacc aaactggaga caaagagg 2088

<210> 10
<211> 2142
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polynucleotide
<400> 10

atgaagtggg tgaccttcat cagcttatta tttttattca gctccgccta ttcccagatc 60
gtgctgacct aaagccccgc catcatgagc gctagccccg gtgagaaggt gaccatgaca 120
tgctccgctt ccagctccgt gtctacatg aactggatc agcagaaaag cggaaccagc 180

cccaaaaggt ggatctacga caccagcaag ctggcctccg gagtccccgc tcatttccgg 240
ggctctggat ccggcaccag ctactcttta accatttccg gcatggaagc tgaagacgct 300
gccacctact attgccagca atggagcagc aacccttca cattcgatc tggcaccaag 360
ctcgaaatca atcgtggagg aggtggcagc ggcgccgggtg gatccggcgg aggaggaagc 420
caagttaac tccagcagag cggcgctgaa ctggccccgc ccggcgctc cgtcaagatg 480
agctgcaagg cticcggcta tacatttact cgttacacaa tgcatgggt caagcagagg 540
cccgtcaag gtttagagtg gatcggatat atcaaccctt cccggggcta caccaactat 600

aacaaaaagt tcaaggataa agccacttta accactgaca agagctctc caccgcctac 660
atgcagctgt cctctttaac cagcaggac tccgtgttt actactgcgc taggtattac 720
gacgaccact actgtttaga ctattgggga caaggtacca ctttaaccgt cagcagctcc 780
ggcaccacca ataccgtggc cgcttataac ctcacatgga agagcaccaa cttcaagaca 840
attctggaat gggaacccaa ccccgtaaat caagtttaca ccgtgcagat ctccacaaa 900
tccggagact ggaagagcaa gtgcttctac acaacagaca ccgagtgtga tttaaccgac 960
gaaatcgtca aggacgtcaa gcaaacctat ctggctcggg tcttttcta ccccgctggc 1020

aatgtcgagt ccaccggctc cgctggcgag cctctctacg agaattcccc cgaattcacc 1080
ccttatttag agaccaatit aggccagcct accatccaga gcttcgagca agttggcacc 1140
aaggtgaacg tcaccgtcga ggatgaaagg acttttagtc ggcggaataa cacattttta 1200
tccctccggg atgtgttcgg caaagacctc atctacacac tgtactattg gaagtcagc 1260
tcctccggca aaaagaccgc taagaccaac accaacgagt ttttaattga cgtggacaaa 1320
ggcgagaact actgcttcag cgtgcaagcc gtgatccctt ctcgtaccgt caaccggaag 1380

agcacagatt cccccgttga gtgcatgggc caagaaaagg gcgagttccg ggaggtccag 1440

ctgcagcaga gcggaaccga actcgtgaaa cccggtgctt ccgtgaaaat gtcttgtaag 1500

gccagcggat acaccttcac ctccatgtg atccagtggg tcaaacagaa gcccggacaa 1560

ggtctcgagt ggatcggcag catcaaccct tacaacgact ataccaaata caacgagaag 1620

tttaaggga aggtacttt aacctccgac aaaagctcca tcacagccta catggagttc 1680

agctctttta catccgagga cagcgtctg tactattgcg cccggtgggg cgacggcaat 1740

tactggggac ggggcacaac actgaccgtg agcagcggag gcggaggctc cggcggaggc 1800

ggatctggcg gtggcggctc cgacatcgag atgaccagc ccccgcctat catgtccgcc 1860

tctttaggcg agcgggtcac aatgacttgt acagcctcct ccagcgtctc ctccctctac 1920

ttccattggt accaacagaa acccggaagc tcccctaaac tgtgcatcta cagcaccagc 1980

aatctcgcca gggcggtgcc ccctaggttt tccggaagcg gaagcaccag ctactcttta 2040

accatctcct ccatggaggc tgaggatgcc gccacctact tttgtacca gtaccaccgg 2100

tccccacct tcggaggcgg caccaaactg gagacaaaga gg 2142

<210> 11

<211> 1455

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 11

gccccacct cctcctccac caagaagacc cagctgcagc tggagcattt actgctggat 60

ttacagatga ttttaaaccg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac tcgtatgctg 120

accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga agcatttaca gtgttttagag 180

gaggagctga agccccctga ggaggtgctg aatttagccc agtccaagaa ttccattta 240

aggccccggg atttaatcag caacatcaac gtgatcgttt tagagctgaa gggctccgag 300

accacattca tgtgcgagta cgccgacgag accgccacca tcgtggagtt tttaaatcgt 360

tggatcacct tcigccagtc catcatctcc actttaacca gcggcacaac caacacagtc 420

gctgcctata acctcacttg gaagagcacc aacttcaaaa ccatcctcga atgggaaccc 480

aaaccggtta accaagttaa caccgtgcag atcagcacca agtccggcga ctggaagtcc 540

aaatgtttct ataccaccga caccgagtgc gatctcaccg atgagatcgt gaaagatgtg 600

aaacagacct acctcgcccc ggtgttttagc taccgcccg gcaatgtgga gagcactggt 660

tccgctggcg agcctttata cgagaacagc cccgaattta ccccttacct cgagaccaat 720

ttaggacagc ccaccatcca aagctttgag caagttggca caaagtgaa tgtgacagtg 780
 gaggacgagc ggactttagt gcggcggaac aacacctttc tcagcctccg ggatgtgttc 840
 ggcaaagatt taatctacac actgtattac tggaagtcct cttcctccgg caagaagaca 900

 gctaaaacca acacaaacga gtttttaatc gacgtggata aaggcgaaaa ctactgtttc 960
 agcgtgcaag ctgtgatccc ctcccggaac gtgaatagga aaagcaccga tagccccgtt 1020
 gagtgcatgg gccaaagaaa gggcgagttc cgggaggcac ctacttcaag ttctacaaag 1080
 aaaacacagc tacaactgga gcatttactg ctggatttac agatgatttt gaatggaatt 1140
 aataattaca agaatcccaa actcaccagg atgctcacat ttaagtttta catgccaag 1200
 aaggccacag aactgaaaca tcttcagtgt ctagaagaag aactcaaacc tctggaggaa 1260
 gtgctaaatt tagctcaaag caaaaacttt cacttaagac ccaggggactt aatcagcaat 1320

 atcaacgtaa tagttctgga actaaaggga tctgaaacaa cattcatgtg tgaatatgct 1380
 gatgagacag caaccattgt agaatttctg aacagatgga ttaccttttg tcaaagcatc 1440
 atctcaacac taact 1455

 <210> 12
 <211> 1509
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 12

 atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgcccta ctccgcccc 60
 acctctctct ccaccaagaa gaccagctg cagctggagc atttactgct ggatttacag 120
 atgattttaa acggcatcaa caactacaag aacccaagc tgactcgtat gctgaccttc 180

 aagtcttaca tgccaagaa ggccaccgag ctgaagcatt tacagtgttt agaggaggag 240
 ctgaagcccc tcgaggaggt gctgaattta gccagtcga agaatttcca tttaaggccc 300
 cgggatttaa tcagcaacat caacgtgac gttttagagc tgaagggtc cgagaccacc 360
 ttcatgtgcg agtacgccga cgagaccgcc accatcgtgg agtttttaa tcgttggatc 420
 accttctgcc agtccatcat ctccacttta accagcgga caaccaacac agtcgtgcc 480
 tataacctca ctiggaagag caccaacttc aaaacatcc tcgaatggga acccaaacc 540
 gtaaccaag tttaaccgt gcagatcagc accaagtcg gcgactggaa gtccaatgt 600

 ttctatacca ccgacaccga gtgcgatctc accgatgaga tcgtgaaaga tgtgaaacag 660
 acctacctcg cccgggtgtt tagctacccc gccggcaatg tggagagcac tggttccgct 720

ggcgcgcctt tatacgagaa cagccccgaa ttaccctt acctcgagac caatttagga 780
 cagccccacca tccaaagctt tgagcaagtt ggcacaaagg tgaatgtgac agtggaggac 840
 gagcggactt tagtgccgga gaacaacacc ttctcagcc tccgggatgt gttcggcaaa 900
 gatttaattc acacactgta ttactggaag tctcttcct ccggcaagaa gacagctaaa 960
 accaacacaa acgagttttt aatcgacgtg gataaaggcg aaaactactg tttcagcgtg 1020

caagctgtga tcccctcccg gaccgtgaat aggaaaagca ccgatagccc cgttgagtgc 1080
 atgggccaag aaaaggcgga gttccgggag gcacctactt caagtctac aaagaaaaca 1140
 cagctacaac tggagcattt actgtggat ttacagatga ttttgaatgg aattaataat 1200
 tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc 1260
 acagaactga aacatcttca gtgtctagaa gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta 1320
 aatttagctc aaagcaaaaa ctttacttta agaccaggga acttaatcag caatatcaac 1380
 gtaatagtgc tggaactaaa gggatctgaa acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag 1440

acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga tggattacct tttgtcaaag catcatctca 1500
 acactaact 1509

<210> 13

<211> 657

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

agcggcacia ccaacacagt cgctgcctat aacctcactt ggaagagcac caacttcaaa 60
 accatctcgc aatgggaacc caaacccgtt aaccaagttt acaccgtgca gatcagcacc 120
 aagtccggcg actggaagtc caaatgtttc tataccaccg acaccgagtg cgatctcacc 180
 gatgagatcg tgaagatgt gaaacagacc tacctcgccc ggggtgttag ctaccccgcc 240

ggcaatgtgg agagcactgg ttccgctggc gagcctttat acgagaacag ccccgaattt 300
 accccttacc tcgagaccaa tttaggacag cccaccatcc aaagctttga gcaagtggc 360
 acaaagtgta atgtgacagt ggaggacgag cggacttttag tgcggcggaa caacaccttt 420
 ctacgctcc gggatgtgtt cggcaaagat ttaatttaca cactgtatta ctggaagtc 480
 tcttctccg gcaagaagac agctaaaacc aacacaaacg agtttttaac cgacgtggat 540
 aaaggcgaaa actactgttt cagcgtgcaa gctgtgatcc cctcccggac cgtgaatagg 600
 aaaagcaccg atagccccgt tgagtgcatt ggccaagaaa agggcgagtt ccgggag 657

<210> 14

<211> 223

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Ala Gly Ile Pro Glu Lys Ala Phe Asn Leu Thr Trp Ile Ser Thr Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Val Gln Ile Ser Asp Arg Ser Arg Asn Trp Lys Asn Lys Cys Phe

35 40 45

Ser Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp

50 55 60

Val Thr Trp Ala Tyr Glu Ala Lys Val Leu Ser Val Pro Arg Arg Asn

65 70 75 80

Ser Val His Gly Asp Gly Asp Gln Leu Val Ile His Gly Glu Glu Pro

85 90 95

Pro Phe Thr Asn Ala Pro Lys Phe Leu Pro Tyr Arg Asp Thr Asn Leu

100 105 110

Gly Gln Pro Val Ile Gln Gln Phe Glu Gln Asp Gly Arg Lys Leu Asn

115 120 125

Val Val Val Lys Asp Ser Leu Thr Leu Val Arg Lys Asn Gly Thr Phe

130 135 140

Leu Thr Leu Arg Gln Val Phe Gly Lys Asp Leu Gly Tyr Ile Ile Thr

145 150 155 160

Tyr Arg Lys Gly Ser Ser Thr Gly Lys Lys Thr Asn Ile Thr Asn Thr

165 170 175

Asn Glu Phe Ser Ile Asp Val Glu Glu Gly Val Ser Tyr Cys Phe Phe

180 185 190

Val Gln Ala Met Ile Phe Ser Arg Lys Thr Asn Gln Asn Ser Pro Gly

195 200 205

Ser Ser Thr Val Cys Thr Glu Gln Trp Lys Ser Phe Leu Gly Glu

210 215 220

<210> 15

<211> 224

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 15

Ala Gly Thr Pro Pro Gly Lys Ala Phe Asn Leu Thr Trp Ile Ser Thr

1 5 10 15

Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Gln Pro Lys Pro Thr Asn Tyr Thr

20 25 30

Tyr Thr Val Gln Ile Ser Asp Arg Ser Arg Asn Trp Lys Tyr Lys Cys

35 40 45

Thr Gly Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys

50 55 60

Asp Val Asn Trp Thr Tyr Glu Ala Arg Val Leu Ser Val Pro Trp Arg

65 70 75 80

Asn Ser Thr His Gly Lys Glu Thr Leu Phe Gly Thr His Gly Glu Glu

85 90 95

Pro Pro Phe Thr Asn Ala Arg Lys Phe Leu Pro Tyr Arg Asp Thr Lys

100 105 110

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

115 120 125

Lys Val Thr Val Lys Asp Ser Phe Thr Leu Val Arg Lys Asn Gly Thr

130 135 140

Phe Leu Thr Leu Arg Gln Val Phe Gly Asn Asp Leu Gly Tyr Ile Leu

145 150 155 160

Thr Tyr Arg Lys Asp Ser Ser Thr Gly Arg Lys Thr Asn Thr Thr His

165 170 175

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

180 185 190

Phe Ala Gln Ala Val Ile Phe Ser Arg Lys Thr Asn His Lys Ser Pro

195 200 205

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

210

215

220

<210> 16

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 16

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

1

5

10

15

Thr Asn Phe Ala Thr Ala Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Ala Leu Thr Asp Glu Ile Val

50

55

60

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

65

70

75

80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn

85

90

95

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

100

105

110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu

165

170

175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val

180

185

190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
195 200 205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu
210 215

<210> 17

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 17

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
1 5 10 15

Thr Asn Phe Ala Thr Ala Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
20 25 30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Ala Lys Ser Lys
35 40 45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Ala Leu Thr Asp Glu Ile Val
50 55 60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
65 70 75 80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Ala Glu Asn
85 90 95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
100 105 110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
115 120 125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Ala Arg Asn Asn Thr Ala Leu Ser Leu Arg
130 135 140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145 150 155 160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
165 170 175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val

180 185 190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

195 200 205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu

210 215

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 18

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

1 5 10 15

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 19

ggcgggtggag gatccggagg aggtggctcc ggcggcggag gatct 45

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 20

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 21

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

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

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

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 22

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg

100 105

<210> 23

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 23

caagttcagc tccagcaaag cggcgccgaa ctgctcggc cggcgcttc cgtgaagatg 60

tcttgtaagg cctccggcta taccttcacc cggtaacaaa tgcaactgggt caagcaacgg 120

cccggtaag gtttagagt gattggctat atcaaccct cccggggcta taccaactac 180

aaccagaagt tcaaggacaa agccaccctc accaccgaca agtccagcag caccgcttac 240

atgcagctga gctctttaac atccgaggat tccgccgtgt actactgcgc tcggtactac 300

gacgatcatt actgcctcga ttactggggc caaggtacca ccttaacagt ctctcc 357

<210> 24

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 24

cagatcgtgc tgaccagtc ccccgctatt atgagcgcta gccccggtga aaagtgact 60

atgacatgca gcgccagctc ttccgtgagc tacatgaact ggtatcagca gaagtcggc 120

accagcccta aaaggtggat ctacgacacc agcaagctgg ccagcggcgt ccccgctcac 180

tttcggggct cgggctcgg aacaagctac tctctgacca tcagcggcat ggaagccgag 240

gatgccgcta cctattactg tcagcagtg agtccaacc ccttcacctt tggatccggc 300

accaagctcg agattaatcg t 321

<210> 25

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 25

cagatcgtgc tgaccagtc ccccgctatt atgagcgcta gccccggtga aaagtgact	60
atgacatgca ggcacagtc ttccgtgagc tacatgaact ggtatcagca gaagtccggc	120
accagcccta aaaggtggat ctacgacacc agcaagctgg ccagcggcgt ccccgctcac	180
tttcggggct ccggtccgg aacaagctac tctctgacca tcagcggcat ggaagccgag	240
gatgccgcta cctattactg tcagcagtgg agtccaacc cttcacctt tggatccggc	300
accaagctcg agattaatcg tggaggcggg ggtagcggag gaggcggatc cggcgggtgga	360
ggtagccaag ttcagctcca gcaaagcggc gccgaactcg ctggccccgg cgcttccgtg	420
aagatgtctt gtaaggcctc cggctatacc ttcacccggg acacaatgca ctgggtcaag	480
caacggcccc gtcaaggttt agagtggatt ggctatatca acccctcccg gggtataacc	540
aactacaacc agaagttcaa ggacaaagcc accctcacca ccgacaagtc cagcagcacc	600
gcttacatgc agctgagctc tttaacatcc gaggattccg ccgtgtacta ctgcgctcgg	660
tactacgacg atcattactg cctcgattac tggggccaag gtaccacctt aacagtctcc	720
tcc	723

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 26

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg

100 105

<210> 27

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Trp Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 28

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 28

gacatcgaga tgacacagtc ccccgctatc atgagcgcct ctttaggaga acgtgtgacc 60

atgacttgta cagcttcctc cagcgtgagc agctcctatt tccactggta ccagcagaaa 120

cccggtcctt cccctaaact gtgtatctac tccacaagca atttagctag cggcgtgcct 180

cctcgtttta gcggctccgg cagcacctct tactctttaa ccattagctc tatggaggcc 240

gaagatgccg ccacatactt ttgccatcag taccaccggt cccctacctt tggcggaggc 300

acaaagctgg agaccaagcg g 321

<210> 29

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 29

gtgcagctgc agcagtcagg acccgaactg gtcaagcccg gtgcctccgt gaaaatgtct 60

tgtaaggctt ctggctacac ctttacctcc tacgtcatcc aatgggtgaa gcagaagccc 120

ggtcaaggtc tcgagtggat cggcagcatc aatccctaca acgattacac caagtataac 180

gaaaagttta agggcaaggc cactctgaca agcgacaaga gtcattac cgcctacatg 240

gagttttcct ctttaacttc tgaggactcc gctttatact attgcgctcg ttggggcgat 300

ggcaattatt ggggccgggg aactacttta acagtgagct cc 342

<210> 30

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 30

gtgcagctgc agcagtcagg acccgaactg gtcaagcccg gtgcctccgt gaaaatgtct 60

tgtaaggctt ctggctacac ctttacctcc tacgtcatcc aatgggtgaa gcagaagccc 120

ggtcaaggtc tcgagtggat cggcagcatc aatccctaca acgattacac caagtataac 180

gaaaagttta agggcaaggc cactctgaca agcgacaaga gtcattac cgcctacatg 240

gagttttcct ctttaacttc tgaggactcc gctttatact attgcgctcg ttggggcgat 300

ggcaattatt ggggccgggg aactacttta acagtgagct ccggcggcgg cggaagcggg 360

ggtggaggat ctggcgttgg aggcagcgac atcgagatga cacagtcccc cgctatcatg 420

agcgctcttt taggagaacg tgtgaccatg acttgtacag cttcctccag cgtgagcagc 480
 tcctatttcc actggtacca gcagaaaccc ggctcctccc ctaaactgtg tatctactcc 540
 acaagcaatt tagctagcgg cgtgcctcct cgttttagcg gctccggcag cacctcttac 600

tctttaacca ttagctctat ggaggccgaa gatgccgcca catacttttg ccatcagtac 660
 caccggtccc ctacctttgg cggaggcaca aagctggaga ccaagcgg 708

<210> 31
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240

agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactaact 399

<210> 32
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

gccccacct cctcctccac caagaagacc cagctgcagc tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttaaagg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac tcgtatgctg 120
 accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga agcatttaca gtgttttagag 180

gaggagctga agccccctga ggaggtgctg aatttagccc agtccaagaa tttccattta 240
 aggccccggg atttaatcag caacatcaac gtgatcgtt tagagctgaa gggtccgag 300
 accacattca tgtgcgagta cgccgacgag accgccacca tcgtggagtt tttaaatcgt 360
 tggatcacct tctgccagtc catcatctcc actttaacc 399

<210> 33
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 33

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

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 34

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 34

atgaaatggg tgacctttat ttctttactg ttctctttta gcagcgccta ctcc 54

<210> 35

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 35

atgaagtggg tcacatttat ctctttactg ttctctttct ccagcgccta cagc 54

<210> 36

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 36

atgaaatggg tgacctttat ttctttactg ttctctttta gcagcgccta ctcc 54

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 37

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Leu Gly Val Asn Cys

1 5 10 15

<210> 38

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 38

Met Gly Gln Ile Val Thr Met Phe Glu Ala Leu Pro His Ile Ile Asp

1 5 10 15

Glu Val Ile Asn Ile Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Ile Thr Ser Ile

20 25 30

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

35 40 45

Phe Leu Phe Leu Ala Gly Arg Ser Cys Gly

50 55

<210> 39

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 39

Met Pro Asn His Gln Ser Gly Ser Pro Thr Gly Ser Ser Asp Leu Leu

1 5 10 15

Leu Ser Gly Lys Lys Gln Arg Pro His Leu Ala Leu Arg Arg Lys Arg

20 25 30

Arg Arg Glu Met Arg Lys Ile Asn Arg Lys Val Arg Arg Met Asn Leu

35 40 45

Ala Pro Ile Lys Glu Lys Thr Ala Trp Gln His Leu Gln Ala Leu Ile

50 55 60

Ser Glu Ala Glu Glu Val Leu Lys Thr Ser Gln Thr Pro Gln Asn Ser

65 70 75 80
Leu Thr Leu Phe Leu Ala Leu Leu Ser Val Leu Gly Pro Pro Val Thr
85 90 95
Gly

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 40

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser

20 25 30

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 41

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

1 5 10 15

<210> 42

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 42

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg

1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu

20 25

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 43

Glu Glu Glu Glu Glu Glu

1 5

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 44

Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg

1 5 10

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 45

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 46

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 47

His His His His His

1 5

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 48

His His His His His His

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 49

His His His His His His His

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 50

His His His His His His His His

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic peptide

<400> 51

His His His His His His His His His

1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 52

His His His His His His His His His His

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 53

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 54

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

1 5 10 15

Glu Ser

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 55

Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser

1 5 10 15

<210> 56

<211> 38

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 56

Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly

1 5 10 15

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro

20 25 30

Gln Gly Gln Arg Glu Pro

35

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 57

Ser Leu Ala Glu Leu Leu Asn Ala Gly Leu Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 58

Thr Gln Asp Pro Ser Arg Val Gly

1 5

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 59

Pro Asp Arg Val Arg Ala Val Ser His Trp Ser Ser

1 5 10

<210> 60

<211>

> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 60

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 61

Cys Cys Pro Gly Cys Cys

1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 62

Glu Val His Thr Asn Gln Asp Pro Leu Asp

1 5 10

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 63

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 64

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys

1 5 10

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 65

Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 66

Asp Tyr Asn Val Tyr

1 5

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 67

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

1 5 10 15

Gly

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 68

Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe

1 5

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 69

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Asp Thr Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 70

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 71

Gln Gln Val Tyr Ser Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 72

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 74

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

1 5 10 15

Gly

<210> 75

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

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

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

<210> 76
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 76

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

Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys Asn
 65 70 75 80
 Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr Arg His Pro

85 90 95
 Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg Lys Leu Thr
 100 105 110
 Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr Leu
 115 120 125

Ser Leu Ala Ile Phe

130

<210> 77

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30
 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45

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

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
 115 120 125
 Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140
 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

<210> 78

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp

50 55 60

Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser

65 70 75

<210> 79

<211> 160

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro

1 5 10 15

Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg

20 25 30

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

35 40 45

Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala

50 55 60

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu

100 105 110

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe

115 120 125

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

130 135 140

Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn

145 150 155 160

<210> 80

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln

35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu

50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val

65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile

85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

100 105 110

Thr Ser

<210> 81

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys

1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn

20 25 30

Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr

35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser

50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp

65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile

85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu

100 105 110

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

115 120 125

His His Val Ala

130

<210> 82

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn

1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp

20 25 30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile

35 40 45

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

50 55 60
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
65 70 75 80

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

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
145 150 155

<210> 83

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

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

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

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

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

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

<210> 84

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr

1 5 10 15

Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr

20 25 30

Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met

35 40 45

Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser

50 55 60

Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val

65 70 75 80

Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser Lys

85 90 95

Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr Pro

100 105 110

Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp

115 120 125

Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr Leu

130 135 140

Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu

145 150 155 160

Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn

165 170 175

Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp Ser Ser Leu His Trp Ala Ala

180 185 190

Met Ala Leu Pro Ala Leu Phe Ser Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly

195 200 205

Ala Leu Tyr Trp Lys Lys Arg Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val Glu

210 215 220
 Asn Ile Gln Ile Asn Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu
 225 230 235 240
 Lys Glu Arg Glu Phe Gln Glu Val

245

<210> 85

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

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

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

Glu Leu Gln Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser
 130 135 140
 Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu
 145 150 155 160
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 165 170 175

Trp Cys Leu His Trp Gln Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly
180 185 190

Glu Gln Val Pro Pro Val Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu Val Glu
195 200 205

His

<210> 86

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly
1 5 10 15

Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu Val His Leu Asp Gly Gln Pro
20 25 30

Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln

35 40 45

Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg
50 55 60

Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu Arg Met Thr Leu Ala His Ile
65 70 75 80

Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys
85 90 95

Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr

100 105 110

Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr
115 120 125

Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Arg Asn
130 135 140

Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr His Ala Met
145 150 155 160

His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val

165 170 175

Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu

180 185 190

Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr

195 200 205

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

210 215 220

His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr

225 230 235 240

Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg

245 250 255

Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val

260 265 270

Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln Ser His Trp Gln Thr Phe His

275 280 285

Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His Pro Val Gly Thr Ser Asp His

325 330 335

Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly

340 345 350

Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala

355 360

<210> 87

<211> 361

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

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

305 310 315 320
 Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His Pro Val Gly Thr Gly Asp
 325 330 335
 His Arg Asp Ala Ala Gln Leu Gly Phe Gln Pro Leu Met Ser Ala Thr
 340 345 350
 Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
 355 360

<210> 88

<211> 190

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Trp Val Asp Thr His Cys Leu Cys Tyr Asp Phe Ile Ile Thr Pro Lys

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

65 70 75 80
 Asp Ile Gln Val Glu Asn Leu Ile Pro Ile Glu Pro Leu Thr Leu Gln
 85 90 95

Ala Arg Met Ser Cys Glu His Glu Ala His Gly His Gly Arg Gly Ser
100 105 110

Trp Gln Phe Leu Phe Asn Gly Gln Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn
115 120 125

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

Lys Trp Glu Lys Asn Arg Asp Val Thr Met Phe Phe Gln Lys Ile Ser
145 150 155 160

Leu Gly Asp Cys Lys Met Trp Leu Glu Glu Phe Leu Met Tyr Trp Glu
165 170 175

Gln Met Leu Asp Pro Thr Lys Pro Pro Ser Leu Ala Pro Gly
180 185 190

<210> 89
<211> 191
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400>
89

Gly Arg Ala Asp Pro His Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro
1 5 10 15

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

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

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

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

Arg Asp Ile Gln Leu Glu Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu
85 90 95

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

Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser

115 120 125

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

130 135 140

Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser

180 185 190

<210> 90

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Asp Ala His Ser Leu Trp Tyr Asn Phe Thr Ile Ile His Leu Pro Arg

1 5 10 15

His Gly Gln Gln Trp Cys Glu Val Gln Ser Gln Val Asp Gln Lys Asn

20 25 30

Phe Leu Ser Tyr Asp Cys Gly Ser Asp Lys Val Leu Ser Met Gly His

35 40 45

Leu Glu Glu Gln Leu Tyr Ala Thr Asp Ala Trp Gly Lys Gln Leu Glu

50 55 60

Met Leu Arg Glu Val Gly Gln Arg Leu Arg Leu Glu Leu Ala Asp Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Met Ser Cys Glu Cys Glu Ala Asp Gly Tyr Ile Arg Gly Ser Trp Gln

100 105 110

Phe Ser Phe Asp Gly Arg Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg

115 120 125

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

130 135 140
 Glu Lys Asp Ser Gly Leu Thr Thr Phe Phe Lys Met Val Ser Met Arg
 145 150 155 160
 Asp Cys Lys Ser Trp Leu Arg Asp Phe Leu Met His Arg Lys Lys Arg
 165 170 175
 Leu Glu Pro Thr Ala Pro Pro Thr Met Ala Pro Gly

180 185

<210> 91

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

His Ser Leu Cys Phe Asn Phe Thr Ile Lys Ser Leu Ser Arg Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Trp Cys Glu Ala Gln Val Phe Leu Asn Lys Asn Leu Phe Leu

20 25 30

Gln Tyr Asn Ser Asp Asn Asn Met Val Lys Pro Leu Gly Leu Leu Gly

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ile Lys Thr Ser Asp Pro Ser Thr Leu Gln Val Glu Met Phe Cys

85 90 95

Gln Arg Glu Ala Glu Arg Cys Thr Gly Ala Ser Trp Gln Phe Ala Thr

100 105 110

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

115 120 125

Val Ile Asn His Glu Ala Ser Lys Ile Lys Glu Thr Trp Lys Lys Asp

130 135 140

Arg Gly Leu Glu Lys Tyr Phe Arg Lys Leu Ser Lys Gly Asp Cys Asp

145 150 155 160

His Trp Leu Arg Glu Phe Leu Gly His Trp Glu Ala Met Pro Glu Pro
165 170 175

Thr Val Ser Pro Val Asn Ala Ser Asp Ile His Trp Ser Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Pro Asp Arg Trp Ile Ile Leu Gly Ala Phe Ile Leu Leu Val Leu
195 200 205

Met Gly Ile Val Leu Ile Cys Val Trp Trp Gln Asn Gly Glu Trp Gln
210 215 220

Ala Gly Leu Trp Pro Leu Arg Thr Ser
225 230

<210> 92

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Gly Leu Ala Asp Pro His Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro
1 5 10 15

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

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

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

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

Leu Asp Ile Gln Leu Glu Asn Tyr Ile Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu
85 90 95

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

Ser Trp Gln Leu Ser Phe Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser
115 120 125

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

Gly

<210> 93

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

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

50 55 60
 Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Ile Gln Leu Glu Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu
 85 90 95
 Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly
 100 105 110
 Ser Trp Gln Phe Ser Ile Asp Gly Gln Thr Phe Leu Leu Phe Asp Ser
 115 120 125
 Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys

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

180 185 190
 Gly

<210> 94

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 94

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn

35 40 45
 Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 Arg

65

<210> 95

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 95

attacatgcc ccctcccat gagcgtggag cagccgaca tctgggtgaa gagctatagc 60
 ctctacagcc gggagaggta tatctgtaac agcggcttca agaggaaggc cggcaccagc 120

agcctcaccg agtgcgtgct gaataaggct accaacgtgg ctactggac aacaccctct 180

ttaaagtgc tccgg 195

<210> 96

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 96

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln

35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu

50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val

65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile

85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

100 105 110

Thr Ser

<210> 97

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 97

aactgggtga acgtcatcag cgatttaaag aagatcgaag atttaattca gtccatgcat 60

atcgacgcca cttatacac agaatccgac gtgcaccct cttgtaaggt gaccgcatg 120

aaatgttttt tactggagct gcaagttatc tcttttagaga gcggagacgc tagcatccac 180

gacaccgtgg agaatttaat catttttagcc aataactctt tatccagcaa cggcaacgtg 240

acagagtccg gctgcaagga gtgcaagag ctggaggaga agaacatcaa ggagtttctg 300

caatcctttg tgcacattgt ccagatgttc atcaatacct cc 342

<210> 98

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

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

1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

165 170 175

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

<210> 99

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 99

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

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110
Thr Ser

<210> 100

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 100

aactgggtga acgtcatcag caatttaaag aagatcgaag atttaattca gtccatgcat	60
atcgacgcca cttatacac agaatccgac gtgcaccctt cttgtaaggt gaccgcatg	120
aaatgttttt tactggagct gcaagttatc tctttagaga gcggagacgc tagcatccac	180
gacacgtgg agaatttaat catttttagcc aataactctt tatccagcaa cggcaacgtg	240
acagagtccg gctgcaagga gtgcgaagag ctggaggaga agaacatcaa ggagtttctg	300
caatcctttg tgcacattgt ccagatgttc atcaatacct cc	342

<210> 101

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 101

atgaaatggg tcaccttcat ctctttactg tttttattta gcagcgccta cagc	54
---	----

<210> 102

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 102

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys

130

135

140

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys

145

150

155

160

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser

165

170

175

Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu

180

185

190

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

195

200

205

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn

260

265

270

Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser

275

280

285

Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile

290

295

300

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

305

310

315

320

Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu

325

330

335

Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro
340 345 350

Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val
355 360 365

Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu
370 375 380

Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys
385 390 395 400

Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe
405 410 415

Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala
420 425 430

Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val
435 440 445

Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asn Trp Val Asn
450 455 460

Val Ile Ser Asn Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His
465 470 475 480

Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys
485 490 495

Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu
500 505 510

Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile
515 520 525

Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly
530 535 540

Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu
545 550 555 560

Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
565 570

<210> 103

<211> 1722

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 103

cagatcgtgc tgacccaaag ccccgccatc atgagcgcta gccccggtga gaaggtgacc	60
atgacatgct ccgcttcag ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaaaagcgga	120
accagcccca aaaggtggat ctacgacacc agcaagctgg cctccggagt gcccgtcat	180
ttccggggct ctggatccgg caccagctac tctttaacca tttccggcat ggaagctgaa	240
gacgctgcca cctactattg ccagcaatgg agcagcaacc cttcacatt cggatctggc	300
accaagctcg aaatcaatcg tggaggaggt ggagcgcgcg gcggtggatc cggcggagga	360
ggaagccaag ttcaactcca gcagagcggc gctgaactgg cccggcccgg cgcctccgtc	420
aagatgagct gcaaggcttc cggctataca ttactcgtt acacaatgca ttgggtcaag	480
cagaggcccc gtcaaggttt agagtggatc ggatatatca acccttcccg gggctacacc	540
aactataacc aaaagttcaa ggataaagcc actttaacca ctgacaagag ctctccacc	600
gcctacatgc agctgtcctc tttaaccagc gaggactccg ctgtttacta ctgcgtagg	660
tattacgacg accactactg tttagactat tggggacaag gtaccacttt aaccgtcagc	720
agctccggca ccaccaatac cgtggccgct tataacctca catggaagag caccaacttc	780
aagacaattc tggaatggga acccaagccc gtcaatcaag ttacaccgt gcagatctcc	840
accaaaccgg gagactggaa gagcaagtgc ttctacacaa cagacaccga gtgtgattta	900
accgacgaaa tcgtcaagga cgtcaagcaa acctatctgg ctcggtcttt ttctacccc	960
gctggcaatg tcgagtcac cggtccgct ggcgagcctc tctacgagaa ttccccgaa	1020
ttcacccctt atttagagac caatttaggc cagcctacca tccagagctt cgagcaagtt	1080
ggcaccaagg tgaacgtcac cgtcgaggat gaaaggactt tagtgccgcg gaataacaca	1140
tttttatccc tccgggatgt gttcggcaaa gacctcatct acacactgta ctattggaag	1200
tccagctcct ccggcaaaaa gaccgctaag accaacacca acgagttttt aattgacgtg	1260
gacaaaggcg agaactactg cttcagcgtg caagccgtga tcccttctcg taccgtcaac	1320
cggaagagca cagattcccc cgttgagtgc atgggccaag aaaagggcga gttccgggag	1380
aactgggtga acgtcatcag caatttaaag aagatcgaag atttaattca gtccatgcat	1440
atcgacgcca ctttatacac agaatccgac gtgcacccct cttgtaaggt gaccgccatg	1500
aaatgttttt tactggagct gcaagttatc tctttagaga gcggagacgc tagcatccac	1560

gacaccgtgg agaatttaat catttttagcc aataactctt tatccagcaa cggcaacgtg 1620
acagagtcgg gctgcaagga gtgcgaagag ctggaggaga agaacatcaa ggagtttctg 1680
caatcctttg tgcacattgt ccagatgttc atcaatacct cc 1722

<210> 104

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 104

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

1 5 10 15

Tyr Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met

145 150 155 160

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp

165 170 175

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

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

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

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

370 375 380
Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu
385 390 395 400
Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr
405 410 415
Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn

420 425 430
Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val

435 440 445
Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser

450 455 460
Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asn Trp

465 470 475 480
Val Asn Val Ile Ser Asn Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser

485 490 495
Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser

500 505 510
Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile

515 520 525
Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu

530 535 540
Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu

545 550 555 560
Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu

565 570 575
Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser

580 585 590

<210> 105

<211> 1776

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 105

atgaagtggg tgaccttcat cagcttattt tttttattca gctccgccta ttcccagatc 60

gtgctgacct aaagccccgc catcatgagc gctagccccg gtgagaaggt gaccatgaca 120

tgctccgctt ccagctccgt gtctacatg aactggtatc agcagaaaag cggaaccagc 180

cccaaaaggt ggatctacga caccagcaag ctggcctccg gaggccccgc tcatttccgg 240

ggctctggat ccggcaccag ctactcttta accatttccg gcatggaagc tgaagacgct 300
gccacctact attgccagca atggagcagc aacccttca cattcggatc tggcaccaag 360
ctcgaaatca atcgtggagg aggtggcagc ggcgccggtg gatccggcgg aggaggaagc 420
caagtccaac tccagcagag cggcgctgaa ctggcccggc ccggcgccctc cgtcaagatg 480
agctgcaagg cttccggcta tacatttact cgttacacaa tgcattgggt caagcagagg 540
cccgtcaag gtttagagtg gatcggatat atcaaccctt cccggggcta caccaactat 600

aacaaaaagt tcaaggataa agccacttta accactgaca agagctcctc caccgcctac 660
atgcagctgt cctctttaac cagcaggagc tccgctgttt actactgcgc taggtattac 720
gacgaccact actgtttaga ctattgggga caaggtacca ctttaaccgt cagcagctcc 780
ggcaccacca ataccgctgc cgtttataac ctacatgga agagcaccaa cttcaagaca 840
attctggaat gggaacccaa gcccgtcaat caagtttaca ccgtgcagat ctccacaaa 900
tccggagact ggaagagcaa gtgcttctac acaacagaca ccgagtgtga ttttaaccgac 960
gaaatcgtca aggacgtcaa gcaaacctat ctggctcggg tcttttcta ccccgtggc 1020

aatgtcgagt ccaccgctc cgctggcgag cctctctacg agaattcccc cgaattcacc 1080
ccttattttag agaccaattt aggccagcct accatccaga gcttcgagca agttggcacc 1140
aaggtgaacg tcaccgtcga ggatgaaagg actttagtgc ggcggaataa cacattttta 1200
tcctccggg atgtgttcgg caaagacctc atctacacac tgtactattg gaagtccagc 1260
tcctccggca aaaagaccgc taagaccaac accaacgagt ttttaattga cgtggacaaa 1320
ggcgagaact actgcttcag cgtgcaagcc gtgatccctt ctcgtaccgt caaccggaag 1380
agcacagatt cccccgttga gtgcatgggc caagaaaagg gcgagttccg ggagaactgg 1440

gigaacgtca tcagcaattt aaagaagatc gaagatttaa ttcagtccat gcatatcgac 1500
gccactttat acacagaatc cgacgtgcac cctcttctga aggtgaccgc catgaaatgt 1560
tttttactgg agctgcaagt tatctcttta gagagcggag acgctagcat ccacgacacc 1620
gtggagaatt taatcatttt agccaataac tctttatcca gcaacggcaa cgtgacagag 1680
tccggctgca aggagtgcga agagctggag gagaagaaca tcaaggagtt tctgcaatcc 1740
tttgtgcaca ttgtccagat gttcatcaat acctcc 1776

<210> 106

<211> 301

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 106

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

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

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

<210> 107

<211> 903

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic polynucleotide

<400> 107

gtgcagctgc agcagtcgga acccgaactg gtcaagcccg gtgcctccgt gaaaatgtct 60
 tgtaagctt ctggctacac ctttacctcc tacgtcatcc aatgggtgaa gcagaagccc 120
 ggtcaaggtc tcgagtggat cggcagcatc aatccctaca acgattacac caagtataac 180
 gaaaagttaa agggcaaggc cactctgaca agcgacaaga gctccattac cgcctacatg 240
 gaggtttctt ctttaacttc tgaggactcc gctttatact attgcgctcg ttggggcgat 300
 ggcaattatt ggggccgggg aactacttta acagtgagct ccggcggcgg cggaagcgga 360
 ggtggaggat ctggcgtgg aggcagcgac atcgagatga cacagtcccc cgctatcatg 420

agcgctctt taggagaacg tgtgaccatg acttgtagag cttcctccag cgtgagcagc 480
 tcctatttcc actggtacca gcagaaaccc ggctcctccc ctaaactgtg tatctactcc 540
 acaagcaatt tagctagcgg cgtgcctcct cgttttagcg gctccggcag cacctcttac 600
 tctttaacca ttagctctat ggaggccgaa gatgccgcca catacttttg ccatcagtag 660
 caccgggtccc ctacctttgg cggaggcaca aagctggaga ccaagcggat tacatgcccc 720
 cctccatga gcgtggagca cgccgacatc tgggtgaaga gctatagcct ctacagccgg 780
 gagaggtata tcgtaacag cggcttcaag aggaaggccg gcaccagcag cctcaccgag 840

tgcgtgctga ataaggctac caacgtggct cactggacaa caccctcttt aaagtgcac 900
 cgg 903

<210> 108

<211> 319

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Met Glu Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr

100 105 110

Cys Ala Arg Trp Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Thr Leu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210	215	220	
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr His Arg			
225	230	235	240
Ser Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg Ile Thr			
	245	250	255
Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser			
	260	265	270
Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys			
275	280	285	
Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala			
290	295	300	
Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg			
305	310	315	
<210> 109			
<211> 957			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic polynucleotide			
<400> 109			
atgaaatggg tcaccttcat ctctttactg tttttattta gcagcgccta cagcgtgcag		60	
ctgcagcagt ccggaccga actggtcaag cccggtgcct ccgtgaaaat gtcttgtaag		120	
gcttctggct acacctttac ctctacgtc atccaatggg tgaagcagaa gcccgtcaa		180	
ggtctcgagt ggatcggcag catcaatccc tacaacgatt acaccaagta taacgaaaag		240	
tttaaggga aggccactct gacaagcgac aagagctcca ttaccgccta catggagttt		300	
tcctctttaa ctctgagga ctccgcttta tactattgcg ctctgtgggg cgatggcaat		360	
tattggggcc ggggaactac tttaacagtg agctccggcg gcggcgaag cggaggtgga		420	
ggatctggcg gtggaggcag cgacatcgag atgacacagt cccccgtat catgagcgcc		480	
tccttaggag aacgtgtgac catgacttgt acagcttcct ccagcgtgag cagctcctat		540	
ttccactggt accagcagaa acccggtcc tcccctaaac tgtgtatcta ctccacaagc		600	
aatttagcta gcggcgtgcc tcctcgtttt agcggctccg gcagcacctc ttactcttta		660	
accattagct ctatggaggc cgaagatgcc gccacatact tttgcatca gtaccaccgg		720	

tcccctacct ttggcggagg cacaaagctg gagaccaagc ggattacatg cccccctccc	780
atgagcgtgg agcacgccga catctgggtg aagagctata gcctctacag cggggagagg	840
tatatctgta acagcggtt caagaggaag gccggcacca gcagcctcac cgagtgcgtg	900
ctgaataagg ctaccaacgt ggctcactgg acaacaccct ctttaaagt catccgg	957

<210> 110

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 110

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 111

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 112

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 112

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 113

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid encoding signal peptide

<400> 113
atgaagtggg tgaccttcat cagcttatta tttttattca gtcctgccta ttcc 54

<210> 114
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleic acid encoding anti-CD3 light chain variable region
<400> 114
cagatcgtgc tgacccaaag ccccgccatc atgagcgcta gccccggtga gaagtgacc 60
atgacatgct ccgcttcag ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaaaagcgga 120
accagcccca aaaggtggat ctacgacacc agcaagctgg cctccggagt gcccgtcat 180
ttccggggct ctggatccgg caccagctac tctttaacca tttccggcat ggaagctgaa 240

gacgctgcca cctactattg ccagcaatgg agcagcaacc cttcacatt cggatctggc 300
accaagctcg aaatcaatcg t 321

<210> 115
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleic acid encoding linker
<400> 115
ggaggaggtg gcagcggcgg cggatgatcc ggcggaggag gaagc 45

<210> 116
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleic acid encoding anti-CD3 heavy chain variable region
<400> 116
caagttcaac tccagcagag cggcgtgaa ctggcccggc cggcgcctc cgtcaagatg 60

agctgcaagg ctccggcta tacatttact cgttacacaa tgcatgggt caagcagagg 120
cccggtcaag gtttagagt gatcgatat atcaaccctt cccggggcta caccaactat 180
aaccaaaagt tcaaggataa agccacttta accactgaca agagctcctc caccgcctac 240
atgcagctgt cctctttaac cagcaggagac tccgtgttt actactgcgc taggtattac 300
gacgaccact actgtttaga ctattgggga caaggtacca ctttaaccgt cagcagc 357

<210> 117

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid encoding human tissue factor 219 form

<400> 117

tccggcacca ccaataccgt ggccgcttat aacctcacat ggaagagcac caacttcaag	60
acaattcttg aatgggaacc caagcccgtc aatcaagttt acaccgtgca gatctccacc	120
aaatccggag actggaagag caagtgcctt tacacaacag acaccgagtg tgatttaacc	180
gacgaaatcg tcaaggacgt caagcaaacc tatctggctc gggctctttc ctaccccgct	240
ggcaatgtcg agtccaccgg ctccgctggc gagcctctct acgagaattc ccccgaaattc	300
accccttatt tagagaccaa tttaggccag cctaccatcc agagcttcga gcaagttggc	360
accaagtgta acgtcacctg cgaggatgaa aggacttttag tgcggcggaa taacacattt	420

ttatccctcc gggatgtgtt cggcaaagac ctcatctaca cactgtacta ttggaagtec	480
agctcctccg gcaaaaagac cgctaagacc aacaccaacg agtttttaat tgacgtggac	540
aaaggcgaga actactgctt cagcgtgcaa gccgtgatcc cttctcgtac cgtcaaccgg	600
aagagcacag attccccctg tgagtgcatt ggccaagaaa agggcgagtt ccggggag	657

<210> 118

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid encoding anti-CD28 light chain variable region

<400> 118

gtccagctgc agcagagcgg acccgaactc gtgaaaccgg gtgcttcctg gaaaatgtct	60
tgtaaggcca ggggatacac cttcacctcc tatgtgatcc agtgggtcaa acagaagccc	120
ggacaaggtc tcgagtggat cggcagcatc aacccttaca acgactatac caaatataac	180
gagaagttaa agggaaagc tactttaacc tccgacaaaa gctccatcac agcctacatg	240
gagttcagct ctttaacatc cgaggacagc gctctgtact attgcgcccg gtggggcgac	300
ggcaattact ggggacgggg cacaacactg accgtgagca gc	342

<210> 119

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid encoding linker

<400> 119

ggaggcggag gctccggcgg aggcggatct ggcggtggcg gctcc 45

<210> 120

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid encoding anti-CD28 heavy chain variable region

<400> 120

gacatcgaga tgaccagtc cccgctatc atgtccgct ctttaggcga gcgggtcaca 60

atgacttgta cagcctctc cagcgtctcc tcctcctact tccattggta ccaacagaaa 120

cccggaagct ccctaaact gtgcatctac agcaccagca atctcgccag cggcgtgccc 180

cctaggtttt ccggaagcgg aagcaccagc tactctttaa ccatctctc catggaggct 240

gaggatgccg ccacctactt ttgtcaccag taccaccggt cccccacctt cggaggcggc 300

accaaactgg agacaaagag g 321

<210> 121

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid encoding signal sequence

<400> 121

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgccta ctcc 54

<210> 122

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20

25

30

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

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

130

<210> 123

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid encoding linker

<400> 123

ggcggcggcg gaagcggagg tggaggatct ggcggtggag gcagc

45