(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0051390
(43) 공개일자 2022년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0637 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7010359
(22) 출원일자(국제) 2020년08월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월28일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2020/052076
(87) 국제공개번호 WO 2021/038249
국제공개일자 2021년03월04일
(30) 우선권주장
1912515.2 2019년08월30일 영국(GB)

(71) 출원인
킹즈 컬리지 런던
영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드
(72) 발명자
마르티네즈-로델라, 마크
영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드, 킹즈 컬리지 런던
산체스-푸에요, 알베르토
영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드, 킹즈 컬리지 런던
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 발명의 명칭 **조작된 조절 T 세포**

(57) 요 약

본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포(Treg)를 제공하고, 상기 CAR은 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 특이적으로 결합하는 항원 인식 도메인을 포함한다. 본 발명은 또한 대상체에서 간 조직 복구 및/또는 재생을 촉진하는 방법을 제공하고, 방법은 키메라 항원 수용체 (CAR)을 포함하는 조작된 Treg 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

(52) CPC특허분류
A61P 1/16 (2018.01)
C07K 16/2851 (2013.01)
A61K 2039/515 (2013.01)
A61K 2039/577 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포(Treg)로서, 상기 CAR은 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 특이적으로 결합하는 항원 인식 도메인을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 ASGR1 및/또는 ASGR2, 바람직하게는 ASGR1에 특이적으로 결합하는, 조작된 Treg.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 인간 ASGR에 결합하는, 조작된 Treg.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 인간 ASGR1 동형체 a, 인간 ASGR1 동형체 b, 인간 ASGR2 동형체 a, 인간 ASGR2 동형체 b, 인간 ASGR2 동형체 c, 및 인간 ASGR2 동형체 d 로부터 선택된 하나 이상의 폴리펩티드에 결합하고, 바람직하게는 상기항원 인식 도메인은 인간 ASGR1 동형체 a에 결합하는, 조작된 Treg.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 약 1pM 내지 약 100nM, 약 1pM 내지 약 10nM, 또는 약 1pM 내지 약 1nM의 친화도로 ASGR에 결합하는, 조작된 Treg.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 항체, 항체 단편, 또는 항체로부터 유래된 것인, 조작된 Treg.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 항원 결합 단편 (Fab), 단쇄 항체 (scFv), 또는 단일-도메인 항체 (sdAb), 바람직하게는 단일-도메인 항체 (sdAb)인, 조작된 Treg.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 11-73 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 포함하는 그의 유도체로부터 선택된 1개 이상의 CDR 영역을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 11, 12 및 13 각각; 서열번호: 14, 15 및 16 각각; 서열번호: 17, 18 및 19 각각; 서열번호: 20, 21 및 22 각각; 서열번호: 23, 24 및 25 각각; 서열번호: 26, 27 및 28 각각; 및/또는 서열번호: 29, 30 및 31 각각을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하고; 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 11, 12 및 13 각각을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 하기를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하는, 조작된 Treg:

(i) 서열번호: 11, 12 및 13 각각; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각; 또는 서열번호: 26, 27 및 28 각각; 또는 서열번호: 29, 30 및 31 각각; 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 11, 12 및 13 각각; 및 서열번

호: 23, 24 및 25 각각을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함함;

(ii) 서열번호: 14, 15 및 16 각각; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각; 또는 서열번호: 26, 27 및 28 각각; 또는 서열번호: 29, 30 및 31 각각; 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 14, 15 및 16 각각; 및 서열번호: 26, 27 및 28 각각을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함함; 또는

(iii) 서열번호: 17, 18 및 19 각각; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각; 또는 서열번호: 26, 27 및 28 각각; 또는 서열번호: 29, 30 및 31 각각; 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 17, 18 및 19 각각; 및 서열번호: 29, 30 및 31 각각을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함함.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 74-80 중 하나 이상에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어지고, 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 74에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어지는, 조작된 Treg.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 막횡단(TM) 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 선택적으로 상기 CAR은 힌지 도메인 및/또는 하나 이상의 공동자극 도메인을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 CD28 힌지 도메인, CD8α 힌지 도메인, IgG 힌지 도메인, 및 IgD 힌지 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 힌지 도메인을 포함하고, 바람직하게는 상기 CAR은 CD8α 또는 CD28 힌지 도메인을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 CD28 TM 도메인, ICOS TM 도메인, CD8α TM 도메인, CD4 TM 도메인, OX40 TM 도메인, 4-1BB TM 도메인, 및 CD3 제타 TM 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 TM 도메인을 포함하고, 바람직하게는 상기 CAR은 CD28 TM 도메인을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 CD28 신호전달 도메인, ICOS 신호전달 도메인, OX40 신호전달 도메인, 4-1BB 신호전달 도메인, CD27 신호전달 도메인, 또는 TNFRSF25 신호전달 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 공동자극 도메인을 포함하고, 바람직하게는 상기 CAR은 CD28 신호전달 도메인을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 CD3 제타 신호전달 도메인 또는 그의 동족체 중 임의의 것, CD3 폴리펩티드, syk 계열 티로신 키나제, src 계열 티로신 키나제, CD2, CD5 및 CD8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 바람직하게는 상기 CAR은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 CD8α 또는 CD28 힌지 도메인; CD28 TM 도메인; CD28 신호전달 도메인; 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 자가 절단 또는 절단 도메인에 의해 연결된 신호 펩티드 및/또는 리포터 펩티드를 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 서열번호: 149-152 또는 167-169 중 하나 이상에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어지는, 조작된 Treg.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 STAT5 회합 모티프 및 JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프를 포함하는 엔도도메인을 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 엔도도메인은 JAK3 결합 모티프를 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 엔도도메인은 STAT3 회합 모티프를 포함하지 않는, 조작된 Treg.

청구항 23

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 엔도도메인은 아미노산 서열 YXXQ(서열번호: 133)를 포함하지 않는, 조작된 Treg.

청구항 24

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 STAT5 회합 모티프, JAK-1 결합 모티프, 및/또는 JAK-2 결합 모티프를 포함하는 엔도도메인을 포함하지 않고, 바람직하게는 상기 엔도도메인은 STAT5 회합 모티프를 포함하지 않는, 조작된 Treg.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Treg는 $CD4^+CD25^+CD127^-$ T 세포 및/또는 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T 세포인, 조작된 Treg.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Treg는 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 조작된 Treg.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 28

대상체에서 간 이식에 대한 내성의 유도에 사용하기 위한, 또는 대상체에서 간 이식 거부, 간 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 자가면역 간 질환, 또는 염증성 간 장애의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 조작된 Treg, 또는 제27항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 29

대상체에서 간 이식에 대한 내성을 유도하거나, 대상체에서 간 이식 거부, 간 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 자가면역 간 질환, 또는 염증성 간 장애를 치료 및/또는 예방하는 방법으로서, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 조작된 Treg, 또는 제27항에 따른 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

제28항에 따른 자가면역 간 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 제29항에 따른 자가면역 간 질환의 치료 및/또는 예방 방법으로서, 상기 자가면역 간 질환은 원발성 담즙성 담관염 및/또는 원발성 경화 담관염인, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 31

제28항에 따른 간 염증성 장애의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물, 또는 제29항에 따른 간 염증성 장애를 치료하고/거나 예방하는 방법으로서, 상기 간 염증성 장애는 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전이고/거나; 상기 간 염증은 알코올, 바이러스성 간염, 지방간염, 허혈 또는 약물 독성에 의해 야기되거나 상기 간 염증은 확인가능한 원인이 없는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물, 또는 방법.

청구항 32

대상체에서 간 조직을 복구 및/또는 재생하는데 사용하기 위한, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포 (Treg) 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함하는, 조작된 조절 T 세포 (Treg) 또는 약제학적 조성물.

청구항 33

대상체에서 간 조직 복구 및/또는 재생을 촉진하는 방법으로서, 키메라 항원 수용체 (CAR)을 포함하는 조작된 Treg 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 간은 허혈, 부분 간절제, 또는 염증에 의해 다치고/거나 손상된, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 간은 염증에 의해 다치고/거나 손상되었고, 상기 염증은 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전이고/거나; 상기 염증은 알코올, 바이러스성 간염, 지방간염, 허혈 또는 약물 독성에 의해 야기되고, 또는 상기 염증은 확인가능한 원인이 없는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 바람직하게는 급성 간부전, 간경변, 급성-만성 간부전, 간염, 지방증, 지방간염 및 노령 중 하나 이상으로 인한 손상된 간 재생을 가지고 있는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전을 가지고 있는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 아시알로당단백질 수용체 (ASGR), 나트륨/타우로콜레이트 공동수송 폴리펩티드 (NTCP), 만노스-6-포스페이트 수용체, 유형 VI 콜라겐 수용체, PDGF 수용체, 스캐빈저 수용체 클래스 A, 스캐빈저 수용체 클래스 B 유형 I, 헤파란 설페이트, 글리사이르히진 수용체, HDL-수용체, LDL- 수용체, 트랜스페린 수용체, 인슐린 수용체, 알파-2-매크로글로불린 수용체, 페리딘 수용체, 유로플라스미노겐 수용체, 트롬빈 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 간 특이적 항원에 특이적으로 결합하고, 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 ASGR에 특이적으로 결합하는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 39

제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 Treg는 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따라 정의되는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 40

대상체의 간 조직에서 알부민 생산을 증가 또는 자극하는 데 사용하기 위한, 키메라 항원 수용체 (CAR)을 포함

하는 조작된 Treg, 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함하는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물.

청구항 41

대상체의 간 조직에서 알부민 생산을 증가시키거나 자극하는 방법으로서, 키메라 항원 수용체 (CAR)을 포함하는 조작된 Treg, 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 항원 인식 도메인은 아시알로당단백질 수용체 (ASGR), 나트륨/타우로콜레이트 공동수송 폴리펩티드 (NTCP), 만노스-6-포스페이트 수용체, 유형 VI 콜라겐 수용체, PDGF 수용체, 스캐빈저 수용체 클래스 A, 스캐빈저 수용체 클래스 B 유형 I, 헤파란 설페이트, 글리사이르히진 수용체, HDL-수용체, LDL- 수용체, 트랜스페린 수용체, 인슐린 수용체, 알파-2-매크로글로불린 수용체, 페리딘 수용체, 유로플라스미노겐 수용체, 트롬빈 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 간 특이적 항원에 특이적으로 결합하고, 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 ASGR에 특이적으로 결합하는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 Treg는 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따라 정의되는, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 44

제29항 내지 제31항 또는 제33항 내지 제39항 또는 제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 단계를 포함하는 방법:

(i) 대상체로부터 Treg 농축 샘플을 단리하거나 제공하는 단계;

(ii) Treg 세포를 폴리뉴클레오티드, 핵산, 또는 상기 CAR을 인코딩하는 벡터로 형질도입 또는 형질감염시켜 조작된 Treg 세포를 제공하는 단계; 및

(iii) 조작된 Treg 세포를 대상체에게 투여하는 단계.

청구항 45

제28항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간인, 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물 또는 방법.

청구항 46

키메라 항원 수용체(CAR)로서, 상기 CAR은 아시알로당단백질 수용체 (ASGR)에 특이적으로 결합하고 CD3 제타 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 항원 인식 도메인을 포함하는, CAR.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 CAR은 STAT5 회합 모티프 및 JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프를 포함하는 엔도도메인을 포함하는, CAR.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 엔도도메인은 JAK3 결합 모티프를 포함하는, CAR.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 엔도도메인은 STAT3 회합 모티프를 포함하지 않는, CAR.

청구항 50

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 엔도도메인은 아미노산 서열 YXXQ(서열번호: 133)를 포함하지 않는, CAR.

청구항 51

제46항에 있어서, 상기 CAR은 서열번호: 149-152 또는 167-169 중 하나 이상에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어지는, CAR.

청구항 52

키메라 항원 수용체 (CAR)로서, CAR은 아시알로당단백질 수용체 (ASGR)에 특이적으로 결합하는 항원 인식 도메인을 포함하고, 상기 항원 인식 도메인은 제10항에서 정의된 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하고, 바람직하게는 상기 CAR는 제46항 내지 제51항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 것인, CAR.

청구항 53

제46항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 핵산, 또는 벡터.

청구항 54

제53항에 있어서, FOXP3 폴리펩티드를 추가로 인코딩하는, 폴리뉴클레오티드, 핵산 또는 벡터.

청구항 55

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 조작된 Treg를 생성하는 방법으로서,

(i) 대상체로부터 세포 함유 샘플의 분리 또는 세포 함유 샘플의 제공; 및

(ii) CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 핵산 또는 벡터로 세포 함유 샘플을 형질도입 또는 형질감염하여, 조작된 세포의 집단을 제공하는 단계를 포함하고,

상기 세포 함유 샘플은 Treg를 포함하고/하거나 Treg는 단계 (ii) 전 또는 후에 세포 함유 샘플로부터 풍부화되고/거나 생성되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 조작된 조절 T 세포 및 면역 매개 간 손상의 상황에서 이러한 세포의 치료적 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 간 세포를 인식하고, 이식 거부 또는 면역 매개 손상을 치료 및/또는 예방하고, 간 세포 재생을 촉진할 수 있는 조작된 조절 T 세포에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간은 신체의 거의 모든 다른 기관을 지원하는 중요한 기관이다. 간은 전략적 위치와 중요한 기능으로 인해 질환, 특히 면역 매개 손상에 취약하다. 간 질환은 전 세계적으로 연간 약 200만 명이 사망하고, 100만 명이 간경변의 합병증으로, 100만 명이 바이러스성 간염과 간세포 암종으로 사망한다. 간경변은 현재 전 세계적으로 11번째로 가장 흔한 사망 원인이다. 간경변은 장애 보정 생존 년수(disability-adjusted life years) 및 손실된 생존 년수의 상위 20개 원인에 속하며 전 세계 부담의 1.6%와 2.1%를 차지한다(Asrani, SK, 등, 2018. Journal of hepatology, 70, pp. 151 -171).

[0003] 원발성 담즙성 담관염 및 원발성 경화성 담관염과 같은 일반적인 자가면역 간 질환은 간을 손상시켜 간경변을 유발할 수 있다. 원발성 담즙성 담관염의 질환 부담은 종종 삶의 질 저하, 건강 상태 손상 및 피로, 가려움증 및 우울증의 심각한 증상으로 나타난다. 원발성 경화성 담관염은 담관암종, 담낭 및 결장직장암의 위험 인자이며 조기 사망에 기여할 수 있다. 일반 인구에 비해 원발성 경화성 담관염 환자의 사망률은 그 위험이 4배 증가하지만 특히 담관암종의 발병 위험은 398배 증가한다(Asrani, SK, 등, 2018. Journal of hepatology, 70, pp. 151-171).

[0004] 간경변은 또한 바이러스성 간염이나 지방간염과 같은 염증성 간 장애로 인해 유발될 수 있다. 2010년에, 바이러스성 간염으로 인한 사망자는 연간 30만 명으로 1990년보다 46% 증가하였다. 바이러스성 간염은 10번째 주요 사망 원인(1990년)에서 2013년에 7번째 주요 사망 원인으로 증가하였다. 2015년에는, 바이러스성 간염 관련 질환

으로 사망한 사람은 134만 명으로 결핵(137만 명)과 비슷하고 HIV(106만 명)나 말라리아(44만 명)보다 많다(Asrani, SK, 등, 2018. Journal of hepatology, 70, pp. 151-171).

[0005] 또한 이식편의 내성과 생존은 간 이식 시 중요한 문제이다. 급성 세포 거부 반응은 타크롤리무스(Tacrolimus) 기반 면역억제 레지멘에 대한 간 이식 수령체의 15-25%에서 발생하며 일반적으로 스테로이드로 개선된다. 급성 거부반응은 일반적으로 치료에 잘 반응하지만 만성 거부반응은 어려운 상황을 나타내며 상당한 비율의 환자가 증가된 면역억제에 반응하지 않는다. 만성 거부반응은 종종 재이식 또는 사망으로 이어진다(Choudhary, N.S., 등, 2017. Journal of Clinical and Experimental hepatology, 7(4), pp.358-366). 5년 사망률은 원발성 담즙성 담관염에 대해 간 이식을 받은 환자에서 가장 낮다. 재발할 수 있는 질병에는 자가면역 간염, 원발성 담즙성 간경변 및 원발성 경화성 담관염이 포함된다(Hirschfield, G.M., 등, 2009. BMJ, 338, p.b1670).

[0006] 간 이식은 이식편 대 숙주 질환으로 인한 면역 매개 손상을 초래할 수도 있다. 이식편대숙주 질환의 보고된 발병률은 0.1%에서 2%까지 다양하며 사망률은 75% 이상이다(Akbulut, S., 등, 2012. World Journal of Gastroenterology, 18(37), p.5240).

[0007] 간에는 독특한 재생 특성이 부여되어, 면역 매개 손상을 개선하는 데 도움이 될 수 있다. 그러나 만성 면역 매개 손상 상황에서 간 세포는 노화를 겪고 재생 능력이 손상되어 간부전 발병에 기여하고 상당한 환자 이환율과 사망률을 유발한다(Aravinthan, AD and Alexander, GJ, 2016. Journal of hepatology, 65(4), pp.825-834). 더욱이, 면역 매개 손상에 대한 반응으로 간 재생은 간경변 및 간암으로 이어지는 역효과를 가질 수 있다(Michalopoulos, G.K., 2017. Hepatology, 65(4), pp.1384-1392).

[0008] 결과적으로, 면역 매개 손상을 치료 및/또는 예방하고 간 재생을 촉진할 수 있는 요법은 간 질환 관리를 위한 엄청난 치료 잠재력을 가질 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 면역 매개 손상을 치료 및/또는 예방하고 간 재생을 촉진하기 위한 요법이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0010] 제1 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포(Treg)를 제공하고, 상기 CAR은 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 특이적으로 결합하는 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0011] 일부 구현예에서 CAR은 STAT5 회합 모티프 및 JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프를 포함하는 엔도도메인을 포함한다. 일부 추가 구현예에서 엔도도메인은 JAK3 결합 모티프를 포함하고/하거나 STAT3 회합 모티프를 포함하지 않는다.

[0012] 적합하게는, CAR 엔도도메인은 아미노산 서열 YXXQ(서열번호: 133)를 포함하지 않는다. 적합하게는, CAR 엔도도메인의 IL2Rβ 부분은 아미노산 서열 YXXQ(서열번호: 133)를 포함하지 않는다.

[0013] STAT5 신호전달을 갖는 본 발명의 조작된 Treg는 대상체의 일반 T 세포 집단과 비교하여 항원 인식 후 조작된 CAR-Treg에 생존 이점을 제공하는 데 특히 효과적일 수 있다. 특히, 예를 들어 면역억제 약물의 사용이 IL-2의 이용가능성을 감소시키는 이식의 맥락에서, CAR-Treg의 STAT5 신호전달은 그렇지 않으면 불리한 미세환경에서 본 발명의 Treg에 추가적인 생존 및 기능적 효과를 제공한다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 간 이식에 대한 내성의 유도에 사용하기 위한, 또는 대상체에서 간 이식 거부, 간 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 자가면역 간 질환, 또는 염증성 간 장애의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 본 발명에 따른 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 간 이식에 대한 내성을 유도하거나, 대상체에서 간 이식 거부, 간 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 자가면역 간 질환, 또는 염증성 간 장애를 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명에 따른 조작된 Treg, 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 이식에 대한 내성을 유도하거나, 또는 대상체에서 간 이식 거부, 간 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 자가면역 간 질환, 또는 염증성 간 장애를 치료하고/거나 예방하기 위한 약제의

제조를 위한, 본 발명에 따른 조작된 Treg의 용도에 관한 것이다.

[0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 간 조직을 복구 및/또는 재생하는데 사용하기 위한, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포 (Treg) 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 간 조직 복구 및/또는 재생을 촉진하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 키메라 항원 수용체 (CAR)을 포함하는 조작된 Treg 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 간 조직 복구 및/또는 재생을 촉진하기 위한 약제의 제조에서의, 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 조작된 Treg의 용도를 제공하며, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0021] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전을 치료하고/거나 예방하는데 사용하기 위한, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포 (Treg) 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0022] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전을 치료하고/거나 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 키메라 항원 수용체 (CAR)을 포함하는 조작된 Treg 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0023] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전을 치료하고/거나 예방하기 위한 약제의 제조에서의, 키메라 항원 수용체 (CAR)을 포함하는 조작된 Treg의 용도를 제공하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0024] 본 발명은 추가로 키메라 항원 수용체(CAR)을 제공하고, 상기 CAR은 아시알로당단백질 수용체 (ASGR)에 특이적으로 결합하고 CD3 제타 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0025] 일부 구현예에서 CAR은 STAT5 회합 모티프 및 JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프를 포함하는 엔도도메인을 포함한다. 일부 추가 구현예에서 엔도도메인은 JAK3 결합 모티프를 포함하고/하거나 STAT3 회합 모티프를 포함하지 않는다. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명은 CAR을 제공하고, 상기 CAR은 ASGR에 특이적으로 결합하고 STAT5 회합 모티프 및 JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프를 포함하고 바람직하게는 JAK3-결합 모티프를 포함하고/거나 STAT3 회합 모티프를 포함하지 않는 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0026] 본 발명은 본 발명의 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 핵산, 또는 벡터를 추가로 제공한다.

[0027] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 조작된 Treg를 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:

[0028] (i) 대상체로부터 세포 함유 샘플의 분리 또는 세포 함유 샘플의 제공 단계; 및

[0029] (ii) 조작된 세포 집단을 제공하기 위해 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 핵산 또는 벡터를 사용한 세포 함유 샘플의 형질도입 또는 형질감염 단계

[0030] 여기서 상기 세포 함유 샘플은 Treg를 포함하고/하거나 Treg는 단계 (ii) 전 또는 후에 세포 함유 샘플로부터 농축 및/또는 생성된다.

도면의 간단한 설명

[0031] **도 1 - 항-ASGR1 CAR 작제물의 예시적인 디자인**

예시적인 항-ASGR1 CAR 작제물의 개략도. **(A)** 다음을 포함하는 항-ASGR1 CAR 작제물: ASGR1 VH 항원 인식 도메인; CD8α 힌지 도메인; CD28 TM; CD28 신호전달 도메인; CD3z 신호전달 도메인; P2A 절단 도메인; 및 eGFP. **(B)** 다음을 포함하는 항-ASGR1 CAR 작제물: ASGR1 VH 항원 인식 도메인; CD28 힌지 도메인; CD28 TM; CD28 신호전달 도메인; CD3z 신호전달 도메인; P2A 절단 도메인; 및 eGFP.

도 2 - 항-ASGR1 CAR-Treg의 생성

FACS에 의해 평가된 항-ASGR1 CAR-Treg의 생성을 보여주는 히스토그램. **(A)** 형질도입되지 않은 Treg. **(B)** 형질

도입된 Treg. 단리된 CD4+CD25hiCD127- 세포를 단리하고 항-CD3/CD28 비드로 활성화하였다. 활성화 2일 후 Treg는 ASGR1-CAR 및 GFP 보고 유전자를 함유하는 렌티바이러스로 형질도입되었다. 형질도입 및 형질도입되지 않은 Treg를 10일 동안 배양하고 GFP를 측정하여 형질도입 효능을 평가하였다.

도 3 - HepG2 세포주 상의 ASGR1 발현의 검증

FACS에 의한 평가 시, K562 및 HepG2 세포의 ASGR1 수준을 보여주는 히스토그램. **(A)** K562 세포. **(B)** HepG2 세포.

도 4 - 항-ASGR1 CAR-Treg의 항원 특이성의 평가

FACS에 의한 평가 시, (i) 배지 단독; (ii) HepG2 세포; 및 (iii) 항-CD3/CD28 비드를 갖는 배양에 반응하는 CD69의 발현을 보여주는 히스토그램. **(A)** 형질도입된 Treg (GFP+). **(B)** 형질도입된 Treg (GFP-). **(C)** 형질도입되지 않은 Treg (GFP-). CD69의 상향조절은 배지 단독 존재하에서 관찰되지 않는다. HepG2 세포로 배양한 후, GFP+ 형질도입된 Treg (GPF 음성 형질도입 세포 또는 형질도입되지 않은 세포는 제외)만이 CD69를 상향조절한다. 대조적으로, 모든 세포는 비특이적 항-CD3/CD28 비드 자극과 함께 배양될 때 CD69를 상향조절하였다.

도 5 - 항-ASGR1 CAR-Treg (1:1 Treg:Teff)의 항원 특이성 억제 기능의 평가

FACS에 의한 평가 시, 활성화된 효과기 CD4+CD25-T 세포의 증식을 보여주는 히스토그램. 억제 검정은 증식 염료로 염색되고 항-CD3/CD28 비드로 사전 활성화된 효과기 T 세포의 증식 능력에 대한 항-ASGR1 CAR-Treg의 영향을 보여준다. HepG2 자극에 대한 반응으로, 항-ASGR1 CAR Treg는 기존의 T 세포 증식을 효과적으로 억제할 수 있었다.

도 6 - 항-ASGR1 CAR-Treg (1:1, 1:2 및 1:5 Treg:Teff)의 항원 특이성 억제 기능의 평가

1:1, 1:2 및 1:5 Treg:Teff에 대한 억제 검정 결과. 억제 검정은 증식 염료로 염색되고 항-CD3/CD28 비드로 사전 활성화된 효과기 T 세포의 증식 능력에 대한 항-ASGR1 CAR-Treg의 영향을 보여준다. HepG2 자극에 대한 반응으로, 항-ASGR1 CAR Treg는 형질도입되지 않은 Treg보다 낮은 Treg:T 효과기 비율에서 기존의 T 세포 증식을 효과적으로 억제할 수 있었다.

도 7 - 항-HLA.A2 IL2R CAR 작제물의 예시적인 디자인

IL2R 엔도도메인의 상이한 조합을 포함하는 예시적인 항-HLA.A2 CAR 작제물의 개략도. **(A)** dCAR 작제물: HLA.A2 scFv 항원 인식 도메인; CD28 힌지 도메인; CD28 TM 및 eGFP. **(B)** CD28z 작제물: HLA.A2 scFv 항원 인식 도메인; CD28 힌지 도메인; CD28 TM; CD28 신호전달 도메인; CD3z 신호전달 도메인 및 eGFP. **(C)** IL2R 작제물 1: HLA.A2 scFv 항원 인식 도메인; CD28 힌지 도메인; CD28 TM; CD28 신호전달 도메인; 말단절단된 IL2RB 엔도도메인; CD3z 신호전달 도메인 및 eGFP. **(D)** IL2R 작제물 1: HLA.A2 scFv 항원 인식 도메인; CD28 힌지 도메인; CD28 TM; CD28 신호전달 도메인; 말단절단된 IL2RG; 말단절단된 IL2RB 엔도도메인; CD3z 신호전달 도메인 및 eGFP. **(E)** IL2R 작제물 1: HLA.A2 scFv 항원 인식 도메인; CD28 힌지 도메인; CD28 TM; CD28 신호전달 도메인; 말단절단된 IL2RB 엔도도메인; CD3z 신호전달 도메인; FP2A 절단 도메인 및 eGFP.

도 8 - 항-HLA.A2 IL2R CAR-Treg의 생성

항-HLA.A2 IL2R CAR-Treg의 생성 및 확장을 보여주는 개략도. (A) 단리된 CD4+CD25hiCD127low 세포를 단리하고 항-CD3/CD28 비드로 활성화하였다. 활성화 3일 후 Treg는 HLA.A2-CAR 및 GFP 보고 유전자를 함유하는 렌티바이러스로 형질도입되었다. 새로운 배지와 1000 IU/ml IL-2를 2일마다 추가하였다. 형질도입 및 형질도입되지 않은 Treg를 10일 동안 배양하고 GFP를 측정하여 형질도입 효능을 평가하였다. Treg는 새로운 항-CD3/CD28 비드로 추가로 확장되었다. (B) 활성화 후 10일째에 형질도입되지 않거나 다른 CAR 작제물으로 형질도입된 Treg의 배수 변화 확장.

도 9 - 시간 경과에 따른 항-HLA.A2 IL2R 작제물의 형질도입 효능의 정량화

GFP 발현은 세포 활성화 후 상이한 시점에서 형질도입되지 않은 Treg 및 CAR 작제물로 형질도입된 Treg에서 분석되었다. **(A)** 형질도입 7일 후 HLA-A2 IL2R CAR Treg에서 GFP 발현의 대표적인 등고선 플롯. **(B)** 형질도입 7일 후 라이브 CD4+ 세포 중 GFP^+ CAR Treg의 정량화. **(C)** 시간 경과에 따른 HLA-A2 IL2R CAR Treg로부터의 GFP 발현의 정량화.

도 10 - 형질도입된 Treg에서 항-HLA.A2 IL2R CAR 작제물의 세포 표면 발현의 정량화

형질도입되지 않은 Treg 및 형질도입된 Treg에 대한 CAR 작제물의 막 발현을 PE-접합된 HLA-A*0201/CINGVCWTV 텍스트라머(Immudex, 코펜하겐, 덴마크)로 분석하였다. **(A)** 형질도입 7일 후 GFP+텍스트라머+ CAR Treg의 대표적인 등고선 플롯. **(B)** 형질도입 후 7일째에 GFP+ Treg 중 텍스트라머+ 세포의 정량화.

도 11 - 다클론성 세포 확장 후 CAR Treg의 표현형 특성화

Treg를 항-CD3/CD28 활성화 비드 및 IL-2의 존재 하에 15일 동안 배양하고 확장시켰다. Treg 관련 마커 FOXP3, HELIOS, CTLA4 및 TIGIT는 배양 15일째에 표현형 계통 안정성을 평가하기 위해 형질도입되지 않은 Treg 및 형질도입된 Treg에 대한 FACS에 의해 분석되었다.

도 12 - 항-HLA.A2 IL2R CAR-Treg의 항원 특이성의 평가

형질도입되지 않은 Treg 및 형질도입된 Treg를 상이한 자극의 존재 하에 18시간 동안 배양하였다. CD69 및 CD137 활성화 마커를 분석하여 특이적 및 비특이적 세포 활성화를 평가하였다. **(A)** HLA.A1 또는 HLA.A2 분자로 형질도입된 K562 세포와의 배양에 대한 반응으로 발현 CD69를 보여주는 대표적인 등고선 플롯. GFP 신호를 사용하여 형질도입된 Treg를 선택하였다. **(B)** 배지 단독(비자극), 항-CD3/CD28 비드 (비특이적 자극), K562-HLA.A1 및 K562-HLA.A2 세포를 사용한 배양 후 18시간 후에 Treg에서 CD69 및 CD137 발현의 정량화. **(C)** HLA.A1 및 HLA.A2 B 세포주를 사용한 배양 후 18시간 후에 Treg에서 CD69 발현을 보여주는 대표적인 히스토그램. 상이한 세포 대 세포 비율이 사용되었다.

도 13 - IL2R CAR 신호전달의 지표로서의 STAT5 인산화 분석

형질도입된 CAR Treg를 IL2가 없는 배양 배지에서 밤새 휴지시켰다. Treg의 STAT5 인산화는 배지 단독, 1000 IU/ml IL-2 또는 HLA.A2-Ig 기반 인공 APC의 존재 하에 배양 10분 및 120분 후 FACS 분석에 의해 평가되었다(DOI: 10.3791/2801에 설명된 프로토콜에 따라 생성됨). **(A)** 배지 단독, 1:1 비율의 HLA.A2 비드 및 1000 IU/ml IL-2로 10분 배양 후 형질도입된 CAR-Treg에서 GFP 및 phosphoSTAT5의 발현을 보여주는 등고선 플롯. **(B)** HLA.A2 비드 1:1 비율 또는 배지 단독(unstim)으로 120분 동안 배양된 Treg의 STAT5 인산화를 보여주는 히스토그램.

도 14 - IL-2가 없는 경우 비특이적 및 HLA.A2 특이적 활성화 후 Treg 생존의 평가

상이한 작제물을 갖는 CAR 형질도입된 Treg를 IL-2의 존재 없이 항-CD3/28 활성화 비드 및 K562.A2 발현 세포와 함께 배양하였다. 세포 생존을 FACS 분석에 의해 활성화 후 7일에 평가하였다. (A) IL-2 없이 활성화 후 7일째에 생존성 염료 염색을 기반으로 하는 GFP+ 세포의 세포 생존을 보여주는 CAR-Treg의 대표적인 히스토그램. (B) IL-2가 없는 항-CD3/28 비드 및 K562-HLA.A2 세포 배양 7일 후 GFP+ Treg에 대한 생존가능 세포의 백분율(* $p<0.05$, 터키(Tukey)의 사후 교정을 사용한 ANOVA 분석).

도 15 - Treg 억제 효능 테스트: B 세포에 대한 공동자극 분자의 조절을 분석하여 Treg의 면역 조절 기능을 평가한다.

Treg와의 공동 배양 후 CD80 및 CD86의 B 세포 발현을 분석하여 항원 제시 세포에 대한 공동 자극 분자의 발현을 감소시키는 Treg의 능력을 평가하였다. 고정된 수의 살아있는 A2-발현 B 세포(20K/웰)를 적정 수의 Treg 생성물(A2-음성 공여체)(200, 100, 50, 25, 12.5K)과 밤새 공동 배양하였다. B 세포에 대한 CD86 및 CD80 공동자극 마커의 FACS 분석.

도 16 - 시험관 내에서 일차 간세포에 의한 알부민 생산에 대한 사전 활성화된 비형질도입된 Treg의 효과 평가

일차 간세포를 단독으로 또는 이전에 활성화된 조절 T 세포의 존재하에 7일 동안 배양하였다. 조절 T 세포의 추가는 상청액에서 검출 가능한 개선된 알부민 분비를 초래하였다. 조절 T 세포 없이 간세포를 배양했지만 활성화된 조절 T 세포를 함유하는 배양물에서 얻은 조건화 배지가 있는 경우에도 유사한 효과가 나타났다. 이 도는 사전 활성화된 비형질도입 Treg의 추가가 시험관 내에서 일차 간세포에 의한 알부민 생산을 증가시킴을 보여준다.

도 17 - 시험관 내에서 일차 간세포에 의한 알부민 생산에 대한 사전 활성화된 비형질도입된 Treg 및 효과기 T 세포의 효과 평가

일차 간세포를 단독으로 또는 이전에 활성화된 조절 T, 사전 활성화된 효과기 T 세포 또는 둘 모두의 존재하에 3일 동안 배양하였다. 조절 T 세포의 추가는 상청액에서 검출 가능한 개선된 알부민 분비를 초래하였다. 이것은

간세포가 효과기 T 세포와 함께 배양되었을 때 관찰되지 않았으며, 이는 감소된 알부민 수준을 향한 경향을 초래하였다. 조절 T 세포가 사전 활성화된 효과기 T 세포와 조합된 경우에도 알부민 수준에 대한 조절 T 세포의 유리한 효과가 관찰되었다. 이 도는 효과기 T 세포가 아닌 사전 활성화된 비형질도입 Treg의 추가가 시험관 내에서 일차 간세포에 의한 알부민 생산을 증가시킴을 보여준다.

도 18 - 시험관 내에서 일차 간세포에 의한 알부민 생산에 대한 항-ASGPR CAR Treg의 효과 평가

일차 간세포는 단독으로 또는 항-ASGPR CAR을 발현하도록 렌티바이러스로 형질도입된 휴지기의 비조작 조절 T 세포 또는 휴지기 조절 T 세포의 존재 하에 배양되었다. 항-ASGPR을 보유하고 따라서 간세포에 의해 발현되는 ASGPR에 대한 반응으로 항원 특이적 활성화를 겪을 수 있는 Treg만이 상청액의 알부민 수준에 상당한 영향을 미쳤다. 이 도는 항-ASGPR CAR을 발현하는 사전 활성화되지 않은 Treg의 추가가 비형질도입된 Treg가 사용될 때 달성되는 것 이상으로 시험관 내에서 일차 간세포에 의한 알부민 생산을 증가시킨다는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 CAR을 포함하는 조작된 Treg를 제공하며, 이 CAR은 CAR이 간 특이적 항원(예를 들어, ASGR)에 결합할 때만 Treg에 활성화 신호를 제공하고; 따라서 간 미세환경 내에서 구체적으로 조작된 Treg의 보유, 기능 및 생존을 향상시킨다.

[0033] 본 발명의 조작된 Treg는 간 특이적 항원(예를 들어, ASGR)에 결합할 때 간 재생 및 조직 복구를 증가 또는 개선할 수 있다.

[0034] 본 발명의 다양한 바람직한 특징 및 구현예는 이제 비제한적인 예로서 기재될 것이다.

[0035] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an", 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 지시 대상을 포함함에 유의해야 한다.

[0036] 본 명세서에 사용된 용어 "포함하는(comprising)", "포함한다(comprise)" 및 "~로 포함된(comprised of)"은 "포함하는(including)", "포함한다(include)" 또는 "함유하는(containing)", "함유한다(contain)"와 동의어이며 포괄적이거나 개방형이며 추가적인, 비-인용된 구성원, 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. "포함하는(comprising)", "포함한다(comprise)" 및 "~로 포함된(comprised of)"이라는 용어는 "~로 구성된(consisting of)"이라는 용어도 포함한다.

[0037] 여기에 논의된 공보는 본 출원의 출원일 이전에 개시를 목적으로만 제공된다. 본원의 어느 것도 이러한 공보가 본원에 첨부된 특허청구범위에 대한 선행 기술을 구성한다는 것을 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0038] 본 개시내용은 본원에 개시된 예시적인 방법 및 물질에 의해 제한되지 않으며, 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 개시내용의 구현예의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있다. 숫자 범위에는 범위를 한정하는 숫자가 포함된다. 달리 표시되지 않는 한, 모든 핵산 서열은 5'에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 작성되고; 아미노산 서열은 각각 아미노에서 카복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 작성된다.

[0039] **조작된 조절 T 세포(Treg)**

[0040] 조절 T 세포(Treg)는 세포변성 면역 반응을 제어하는 억제 기능을 가진 면역 세포이며 면역 내성의 유지에 필수적이다.

[0041] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 Treg는 면역억제 기능을 갖는 T 세포를 지칭한다.

[0042] 적절하게는, "면역억제 기능"은 병원체, 항원, 예를 들어 동종항원, 또는 자가항원과 같은 자극에 반응하여 면역계에 의해 촉진되는 다수의 생리학적 및 세포적 효과 중 하나 이상을 감소시키거나 억제하는 Treg의 능력을 지칭할 수 있다. 이러한 효과의 예에는 기존 T 세포(Tconv)의 증식 증가 및 염증유발 사이토카인 분비가 포함된다. 그러한 효과는 면역 반응의 강도를 나타내는 지표로 사용될 수 있다. Treg의 존재 하에 Tconv에 의한 상대적으로 약한 면역 반응은 Treg가 면역 반응을 억제하는 능력을 나타낸다. 예를 들어, 사이토카인 분비의 상대적 감소는 면역 반응이 약함을 나타내며, 따라서 Treg가 면역 반응을 억제하는 능력을 나타낸다. Treg는 또한 B 세포, 수지상 세포 및 대식세포와 같은 항원 제시 세포(APC)에 대한 공동자극 분자의 발현을 조절함으로써 면역 반응을 억제할 수 있다. CD80 및 CD86의 발현 수준은 공동 배양 후 시험관 내에서 활성화된 Treg의 억제 효능을 평가하는 데 사용할 수 있다.

[0043] 면역 반응 강도 및 그에 따른 Treg의 억제 능력의 지표를 측정하기 위한 검정이 당업계에 공지되어 있다. 특히,

항원 특이적 Tconv 세포는 Treg와 공동 배양될 수 있고, Tconv 세포로부터의 반응을 자극하기 위해 공동 배양에 상응하는 항원의 펩티드가 첨가될 수 있다. Tconv 세포의 증식 정도 및/또는 펩티드 첨가에 대한 반응으로 분비하는 사이토카인 IL-2의 양은 공동 배양된 Treg의 억제 능력의 지표로 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 Treg와 공동 배양된 항원 특이적 Tconv 세포는 본 발명의 Treg의 부재 하에 배양된 동일한 Tconv 세포보다 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 95% 또는 99% 미만으로 증식할 수 있다.

[0045] 본 발명의 Treg와 공동 배양된 항원 특이적 Tconv 세포는 본 발명의 Treg의 부재하에 배양된 상응하는 Tconv 세포보다 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 60% 미만으로 효과기 사이토카인를 발현할 수 있다.

[0046] 효과기 사이토카인은 IL-2, IL-17, TNFα, GM-CSF, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 및 IL-13으로부터 선택될 수 있다.

[0047] 적합하게는 효과기 사이토카인은 IL-2, IL-17, TNFα, GM-CSF 및 IFN-γ로부터 선택될 수 있다.

[0048] 적합하게는, Treg는 마커 CD4, CD25 및 FOXP3($CD4^+CD25^+FOXP3^+$)을 발현하는 T 세포이다. "FOXP3"는 포크헤드 박스 P3 단백질의 약칭이다. FOXP3는 전사 인자의 FOX 단백질 계열의 구성원이며 조절 T 세포의 발달 및 기능에서 조절 경로의 마스터 조절자로서 기능한다.

[0049] 마커 수준은 당업자에게 공지된 임의의 방법, 예를 들어 유동 세포측정에 의해 결정될 수 있다.

[0050] Treg는 또한 CTLA-4 (세포독성 T-림프구 연관된 분자-4) 및/또는 GITR (글루코코르티코이드-유도된 TNF 수용체)을 발현할 수 있다. Treg 세포는 말초 혈액, 림프절 및 조직에 존재한다.

[0051] 적합하게는, Treg는 표면 단백질 CD127 ($CD4^+CD25^+CD127^-$ 또는 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 또는 $CD4^+CD25^{hi}CD127^-$ 또는 $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}$)의 낮은 수준 발현의 부재에서 또는 그 발현과 함께 세포 표면 마커 CD4 및 CD25를 사용하여 확인될 수 있다. Treg를 식별하기 위한 이러한 마커의 사용은 당업계에 공지되어 있으며 예를 들어 Liu 등 (JEM; 2006; 203; 7(10); 1701-1711)에 기재되어 있다.

[0052] Treg는 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T 세포 또는 $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ T 세포일 수 있다.

[0053] Treg는 $CD4^+CD25^+CD127^-$ T 세포 또는 $CD4^+CD25^{hi}CD127^-$ T 세포일 수 있다.

[0054] Treg는 $CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^-$ T 세포 또는 $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+CD127^-$ T 세포일 수 있다.

[0055] Treg는 탈메틸화된 Treg-특정 탈메틸화된 영역(TSDR)을 가질 수 있다. TSDR은 FOXP3 발현을 조절하는 중요한 메틸화 민감성 요소이다(Polansky, J.K., 등, 2008. European Journal of Immunology, 38(6), pp.1654-1663).

[0056] Treg는 천연 또는 흉선 유래, 적응성 또는 말초 유래, 또는 시험관내 유도일 수 있다(Abbas, A.K., 등, 2013. Nature immunology, 14(4), p.307-308). 적합하게는, Treg는 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$헬리오스$^+$뉴로필린 1^+일 수 있다.

[0057] 추가로 적합한 Treg는 Tr1 세포(Foxp3을 발현하지 않고 IL-10 생산이 높음); $CD8^+FOXP3^+$ T 세포; 및 γδ $FOXP3^+$ T 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0058] 적합하게는, Treg는 대상체로부터 수득된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리된다. 적합하게는, 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0059] 적합하게는, Treg는 매칭되거나(예를 들어, HLA-매칭됨), 조작된 Treg가 투여될 대상체에 자가 조직이다. 적합하게는, 조작된 Treg가 투여될 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다. Treg는 환자 자신의 말초 혈액(제1자)이나 공여체 말초 혈액(제2자) 또는 연결되지 않은 공여체(제3자)의 말초 혈액으로부터 조혈모세포 이식을 받은 환경에서 생체외에서 생성될 수 있다. 적합하게는 Treg는 조작된 Treg가 투여될 대상에 자가 조직이다.

[0060] 바람직한 구현예에서, Treg는 대상체로부터 수득된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리되고, 조작된 Treg가 투여될 대상체와 매칭되거나(예를 들어, HLA-매칭됨), 자가 조직이다.

[0061] 적절하게는, Treg는 Treg 집단의 일부이다. 적합하게는, Treg의 집단은 적어도 70% Treg, 예를 들어 적어도 75, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% Treg를 포함한다. 이러한 집단은 "농축 Treg 집단" 또는 "농축 Treg 샘플"로 지

칭될 수 있다.

[0062] 일부 양태에서, Treg는 Treg에 대한 유도성 선조 세포 또는 배아 선조 세포의 생체외 분화로부터 유래될 수 있다.

[0063] 본 명세서에 사용된 용어 "통상적인 T 세포" 또는 Tcon은 αβ T 세포 수용체(TCR) 뿐만 아니라 분화 4 클러스터(CD4) 또는 분화 8 클러스터(CD8)일 수 있고 면역억제 기능을 갖지 않는 공동 수용체를 발현하는 T 림프구 세포를 의미한다. 기존의 T 세포는 말초 혈액, 림프절 및 조직에 존재한다. 적합하게는, 조작된 Treg는 바이러스 벡터로의 형질도입, 또는 DNA 또는 RNA로의 형질감염을 포함하는 많은 수단 중 하나에 의해, 동일하거나 상이한 벡터 상에서, 본원에 기재된 바와 같은 CAR을 인코딩하는 DNA 및 RNA에 더하여 FOXP3을 인코딩하는 RNA 또는 DNA를 도입함으로써 Tcon으로부터 생성될 수 있다. 대안적으로, 조작된 Treg는 IL-2 및 TGF-β의 존재 하에 $CD4^{+}CD25^{-}FOXP3^{-}$ 세포의 시험관내 배양에 의해 Tcon으로부터 생성될 수 있다.

[0064] Treg는 Treg에 대한 유도성 선조 세포 또는 배아 선조 세포의 생체외 분화로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 Treg로의 분화 전 또는 후에 유도성 선조 세포 또는 배아 선조 세포 내로 도입될 수 있다.

[0065] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "조작된 Treg"는 세포, 특히 본 명세서에 기재된 CAR에 의해 자연적으로 인코딩되지 않는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 발현하도록 변형된 Treg를 의미한다. Treg를 조작하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 형질도입과 같은 형질도입에 의한 Treg의 유전적 변형, 리포펙션, 폴리에틸렌 글리콜, 인산칼슘 및 전기천공을 포함하는 형질감염(예컨대, 일시적 형질감염, DNA 또는 RNA 기반)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. Treg 내로 핵산 서열을 도입하기 위해 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다.

[0066] **키메라 항원 수용체**

[0067] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR" 또는 "CAR"은 세포에 항원 특이성을 부여하는 조작된 수용체, 이 경우 Treg를 지칭한다. CAR은 인공 T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체 또는 키메라 면역수용체로도 알려져 있다. 본 발명의 CAR은 간 항원에 특이적인 결합 도메인(예를 들어, ASGR), 선택적으로 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 엔도도메인(세포내 신호전달 도메인 및 선택적으로 하나 이상의 공동자극 도메인을 포함함)을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 CAR은 단일 폴리펩티드 사슬, 예를 들어 간 항원에 특이적인 결합 도메인 (예를 들어, ASGR)을 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬, 선택적으로 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및 엔도도메인 (세포내 신호전달 도메인 및 선택적으로 하나 이상의 공동자극 도메인 포함)으로 발현되거나 존재할 수 있다. 특히, 전형적으로, 세포내 신호전달 도메인 및 선택적으로 하나 이상의 공동자극 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬과 함께 존재할 수 있다. 따라서, 비록, 본 발명의 CAR이 하나 초과의 폴리펩티드 사슬, 예를 들어, 이중 폴리펩티드 또는 CAR 시스템을 포함하는 것이 가능하지만, 특정 구현예에서, 본 발명의 CAR은 이중 CAR이 아니다.

[0068] CAR 인코딩 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 레트로바이러스 벡터를 사용하여 Treg로 전달될 수 있다. 이러한 방식으로, 입양 세포 전달을 위해 많은 수의 항원 특이적 T 세포가 생성될 수 있다. CAR이 표적 항원에 결합하는 경우, 이는 발현되는 Treg에 대한 활성화 신호의 전달을 초래한다. 따라서 CAR은 조작된 Treg를 표적 항원을 발현하는 세포로 향하게 한다.

[0069] 본 발명의 Treg는 본 발명의 하나 이상의 상이한 CAR을 포함할 수 있고, 추가로 다른 폴리펩티드를 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0070] 항원 인식 도메인

[0071] 본 발명의 CAR은 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0072] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "항원 인식 도메인"은 CAR의 항원 결합 능력을 정의하는 CAR의 세포외 부분을 지칭한다. 본 발명의 특정 양태에서, 항원 인식 도메인은 간 특이적 항원, 바람직하게는 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 결합하는 능력을 CAR에 제공한다. 따라서, 항원 인식 도메인은 간 특이적 항원, 바람직하게는 ASGR을 표적으로 한다.

[0073] 간 특이적 항원은 간 조직에서 예를 들어 간세포, 실질 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 및/또는 간 굴모양 내피 세포에서 우선적으로 발현되는 항원이다. 적합하게는, 간 특이적 항원은 다른 조직과 비교하여 간 조직 (예를

들어, 간세포, 실질 세포, 쿠퍼 세포, 성상 세포, 및 간 굴모양 내피 세포 중 적어도 하나에서)에서 더 높은 발현 수준을 갖는 항원이다. 예를 들어, 간 특이적 항원은 다른 조직에서의 발현 수준과 비교하여 적어도 10% 초과, 적어도 20% 초과, 적어도 30% 초과, 적어도 40% 초과, 적어도 50% 초과, 적어도 100% 초과, 적어도 200% 초과, 적어도 300% 초과, 적어도 400% 초과, 적어도 500% 초과, 또는 적어도 1000% 초과의 발현 수준을 갖는 항원일 수 있다. 바람직하게는, 간 특이적 항원은 간 조직에서만 발현되는 것, 즉 다른 조직에서 검출가능하게 발현되지 않는 것이다.

[0074] 간 특이적 항원은 Treg 세포에 접근 가능하고(간 특이적 항원은 항원을 발현하는 모든 간 세포 유형에서 접근 가능하지 않아도 됨을 이해해야 함), 예를 들어 간 특이적 항원은 세포 표면 상에서 발현될 수 있다.

[0075] 적합한 간 특이적 항원의 예는 아시알로당단백질 수용체 (ASGR), 나트륨/타우로콜레이트 공동수송 폴리펩티드 (NTCP), 만노스-6-포스페이트 수용체, 유형 VI 콜라겐 수용체, PDGF 수용체, 스캐빈저 수용체 클래스 A, 스캐빈저 수용체 클래스 B 유형 I, 헤파란 설페이트, 글리사이르히진 수용체, HDL-수용체, LDL-수용체, 트랜스페린 수용체, 인슐린 수용체, 알파-2-매크로글로불린 수용체, 페리딘 수용체, 유로플라스미노겐 수용체, 및 트롬빈 수용체를 포함한다.

[0076] 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 특이적으로 결합한다. 가장 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 인간 ASGR에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원 인식 도메인은 인간 ASGR 및 다른 동물로부터의 ASGR, 예를 들어 마우스 ASGR 둘 모두에 결합한다. 적합하게는, 항원 인식 도메인은 인간 ASGR에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0077] 아시알로당단백질 수용체(ASGR 또는 ASGPR)는 C형 렉틴이고, 간세포의 굴모양 표면에서 일차적으로 발현된다. ASGR은 48kDa의 주요 서브유닛(ASGR1)와 40kDa의 소수 서브유닛(ASGR2)에 의해 형성된다. ASGR의 주요 역할은 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기(아시알로당단백질)를 함유하는 당단백질의 순환으로부터의 결합, 내재화 및 후속 청소능이다. (Roggenbuck, D., 등, 2012. Autoimmunity Highlights, 3(3), p.119). 정상 간세포에서 ASGR은 원형질 간세포막의 굴모양 및 기저측 표면에서 극성 방식으로 발현된다. 그러나 간 염증 동안, ASGR의 발현은 소관막으로 이동한다. 말기 간 질환(간경변)에서, ASGR이 과발현되고 아시알로당단백질의 혈청 수준이 증가한다. (Roggenbuck, D., 등, 2012. Autoimmunity Highlights, 3(3), p.119).

[0078] 항원 인식 도메인은 ASGR1 및/또는 ASGR2, 바람직하게는 ASGR1에 결합할 수 있다. 항원 인식 도메인은 ASGR1 및/또는 ASGR2, 바람직하게는 ASGR1에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0079] 인간 ASGR1(UniProt 항목 P07306)은 ASGR1 유전자에 의해 인코딩된다. 이 유전자에 대해 다중 동형체를 인코딩하는 스플라이싱된 전사 변이체가 관찰되었다(Harris, R.L., 등, 2012. Molecular biology International, 2012, Article ID 283974, 10 페이지). 더 긴 전사체는 8개의 모든 엑손을 포함하고 훨씬 더 풍부하고 전장 ASGR1(동형체 a, 291개 아미노산)을 인코딩한다. 더 짧은 전사체에는 39개 잔기(동형체 b, 252개 아미노산)가 손실되는 엑손 3의 프레임 내 결실이 있다. 동형체 b는 막관통 도메인은 없고 가용성 단백질로 분비된다. 인간 ASGR1 동형체 a 및 b의 예시적인 서열은 아래에 제시되어 있다(서열번호: 각각 1과 2).

[0080] *서열번호: 1 - 인간 ASGR1 동형체 a (NP_001662.1)*

MTKEYQDLQHLDNEESDHHQLRKGPPPPQPLLQRLCSGPRLLLLSLGLSLLLLVVVCVIGS
QNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAQVKGLSTQGGNVGRKMKSLESQLEKQQKDLSEDHS
SLLLHVKQFVSDLRSLSCQMAALQGNGSERTCCPVNWVEHERSCYWFSRSGKAWADAD
NYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWR
PEQPDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

[0081]

[0082] *서열번호: 2 - 인간 ASGR1 동형체 b (NP_001184145.1)*

MTKEYQDLQHLDNEESDHHQLRKDSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAQVKGLSTQGGNV
GRKMKSLESQLEKQQKDLSEDHSSLLLHVKQFVSDLRSLSCQMAALQGNGSERTCCPVN
WVEHERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHIGPVNTWMGLH
DQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQPDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQR
PYRWVCETELDKASQEPPLL

[0083]

[0084] 항원 인식 도메인은 인간 ASGR1 동형체 a 및/또는 인간 ASGR1 동형체 b, 바람직하게는 인간 ASGR1 동형체 a에

결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 1 및/또는 서열번호: 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 바람직하게는 항원 인식 도메인은 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합한다.

[0085] 인간 ASGR2(UniProt 항목 P07307)은 ASGR2 유전자에 의해 인코딩된다. 대안적으로 이 유전자에 대해 다중 동형체를 인코딩하는 스플라이싱된 전사 변이체가 관찰되었다(Harris, R.L., 등, 2012. Molecular biology International, 2012, Article ID 283974, 10 페이지). *ASGR2*는 대체 엑손 스플라이싱 이벤트에서 발생하는 서로 다른 프레임 내 결실을 함유하는 4개의 동형체(a 내지 d)을 인코딩하는 5개의 전사체(TH2', T1, T2, T3 및 T4)를 생성한다. 동형체 a 및 c는 막횡단 도메인과 CRD 사이의 접합부 근처에서 단백질분해 절단 신호 역할을 하는 5개의 아미노산을 함유한다. 동형체 b와 d는 이 신호가 없으므로 단백질 분해로 절단되지 않지만, 오히려 세포 표면에서 고유 ASGR을 형성하기 위해 ASGR1 동형체 a와 올리고머화될 수 있는 막에 결합된 상태로 남아 있다. ASGR2 동형체 a-d의 예시적인 서열은 하기에 나타낸다(서열번호: 3-6).

[0086] *서열번호: 3 - 인간 ASGR2 동형체 a (NP_001172.1 및 NP_550434.1)*

MAKDFQDIQQLSSEENDHPFHQGEGPGTRRLNPRRGNPFLKGPPPAQPLAQRLCSMVCF
SLLALSFNILLLVVICVTGSQSEGHRGAQLQAELRSLKEAFSNFSSSTLTEVQAISTHGGSVG
DKITSLGAKLEKQQQDLKADHDALLFHLKHFPVDLRFVACQMELLHSNGSQRTCCPVNWV
EHQGSCYWFSHSGKAWAEAEKYCQLENAHLVVINSWEEQKFIVQHTNPFNTWIGLTDSDG
SWKWVDGTDYRHNYKNWAVTQPDNWHGHELGGSEDCVEVQPDGRWNDDFCLQVYRW
VCEKRRNATGEVA

[0087]

[0088] *서열번호: 4 - 인간 ASGR2 동형체 b (NP_550435.1)*

MAKDFQDIQQLSSEENDHPFHQGPPPAQPLAQRLCSMVCFSLLALSFNILLLVVICVTGSQS
AQLQAELRSLKEAFSNFSSSTLTEVQAISTHGGSVGDKITSLGAKLEKQQQDLKADHDALLF
HLKHFPVDLRFVACQMELLHSNGSQRTCCPVNWVEHQGSCYWFSHSGKAWAEAEKYCQ
LENAHLVVINSWEEQKFIVQHTNPFNTWIGLTDSDGSWKWVDGTDYRHNYKNWAVTQPD
NWHGHELGGSEDCVEVQPDGRWNDDFCLQVYRWVCEKRRNATGEVA

[0089]

[0090] *서열번호: 5 - 인간 ASGR2 동형체 c (NP_550436.1)*

MAKDFQDIQQLSSEENDHPFHQGPPPAQPLAQRLCSMVCFSLLALSFNILLLVVICVTGSQS
EGHRGAQLQAELRSLKEAFSNFSSSTLTEVQAISTHGGSVGDKITSLGAKLEKQQQDLKAD
HDALLFHLKHFPVDLRFVACQMELLHSNGSQRTCCPVNWVEHQGSCYWFSHSGKAWAEA
EKYCQLENAHLVVINSWEEQKFIVQHTNPFNTWIGLTDSDGSWKWVDGTDYRHNYKNWA
VTQPDNWHGHELGGSEDCVEVQPDGRWNDDFCLQVYRWVCEKRRNATGEVA

[0091]

[0092] *서열번호: 6 - 인간 ASGR2 동형체 d (NP_001188281.1)*

MAKDFQDIQQLSSEENDHPFHQGEGPGTRRLNPRRGNPFLKGPPPAQPLAQRLCSMVCF
SLLALSFNILLLVVICVTGSQSAQLQAELRSLKEAFSNFSSSTLTEVQAISTHGGSVGDKITSL
GAKLEKQQQDLKADHDALLFHLKHFPVDLRFVACQMELLHSNGSQRTCCPVNWVEHQGS
CYWFSHSGKAWAEAEKYCQLENAHLVVINSWEEQKFIVQHTNPFNTWIGLTDSDGSWKW
VDGTDYRHNYKNWAVTQPDNWHGHELGGSEDCVEVQPDGRWNDDFCLQVYRWVCEKR
RNATGEVA

[0093]

[0094] 항원 인식 도메인은 인간 ASGR2 동형체 a, b, c 및/또는 d, 바람직하게는 인간 ASGR2 동형체 b 및/또는 d에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 3-6 중 하나 이상과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 적합

하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 바람직하게는 항원 인식 도메인은 서열번호: 4와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성 또는 서열번호: 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합한다.

[0095] 항원 인식 도메인은 (a) 인간 ASGR1 동형체 a 및 인간 ASGR2 동형체 b를 포함하는 인간 ASGR; 및/또는 (b) 인간 ASGR1 동형체 a 및 인간 ASGR2 동형체 d를 포함하는 인간 ASGR에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 항원 인식 도메인은 다음에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다: (a) 다음을 포함하는 하나 이상의 폴리펩티드 올리고머: (i) 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드; 및 (ii) 서열번호: 4와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드; 및/또는 (b) 다음을 포함하는 하나 이상의 폴리펩티드 올리고머: (i) 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드; 및 (ii) 서열번호: 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드.

[0096] 일부 구현예에서, 항원 인식 도메인은 인간 ASGR1 및/또는 ASGR2 및 다른 동물로부터의 ASGR1 및/또는 ASGR2, 예를 들어 마우스 ASGR1 및/또는 마우스 ASGR2 둘 모두에 결합한다. 따라서, 일부 구현예에서 항원 인식 도메인은 인간 ASGR과 마우스 ASGR 사이의 교차 반응성을 나타낸다. 예를 들어, 항원 인식 도메인은 인간 ASGR1 동형체 a에 결합하는 경우, 일부 구현예에서 이는 또한 마우스 ASGR1 동형체 a에도 결합한다. 예시적인 마우스 ASGR1 동형체 a 및 b, 및 마우스 ASGR2 동형체 a 및 b가 아래에 제시되어 있다(서열번호: 7-10).

[0097] *서열번호: 7 - 마우스 ASGR1 동형체 a (NP_033844.1 및 NP_001278060.1)*

MTKDYQDFQHLDNDNDHHQLRRGPPPTPRLLQRLCSGSRLLLLSSSLSILLLVVVCVITSQN
SQLREDLLALRQNFSNLTVSTEDQVKALSTQGSSVGRKMKLVESKLEKQQKDLTEDHSSLL
LHVKQLVSDVRSLSCQMAAFRGNGSERTCCPINWVEYEGSCYWFSSSVRPWTEADKYCQ
LENAHLVVVTSRDEQNFLQRHMGPLNTWIGLTDQNGPWKWVDGTDYETGFQNWRPEQP
DNWYGHGLGGGEDCAHFTTDGRWNDDVCRRPYRWVCETKLDKAN

[0098]

[0099] *서열번호: 8 - 마우스 ASGR1 동형체 b (NP_001278061.1)*

MTKDYQDFQHLDNDNDHHQLRRGPPPTPRLLQRLCSGSRLLLLSSSLSILLLVVVCVITSQN

[0100] SQLREDLLALRQNFSNLTVSTEDQVKALSTQGSSVGRKMKLVESKLEKQQKDLTEGSERT

CCPINWVEYEGSCYWFSSSVRPWTEADKYCQLENAHLVVVTSRDEQNFLQRHMGPLNTW
IGLTDQNGPWKWVDGTDYETGFQNWRPEQPDNWYGHGLGGGEDCAHFTTDGRWNDDV

[0101] CRRPYRWVCETKLDKAN

[0102] *서열번호: 9 - 마우스 ASGR2 동형체 a (NP_031519.1, NP_001300854.1, 및 NP_001300855.1)*

MEKDCQDIQQLDSEENDHQLSGDDEHGSHVQDPRIENPHWKGQPLSRPFPQRLCSTFRL
SLLALAFNILLLVVICVVSSQSIQLQEEFRTLKETFSNFSSSTLMEFGALDTLGGSTNAILTSW
LAQLEEKQQQLKADHSTLLFHLKHFPMDLRTLTCQLAYFQSNGTECCPVNWVEFGGSCYW
FSRDGLTWAEADQYCQLENAHLLVINSREEQDFVVKHRSQFHIWIGLTDRDGSWKWVDGT
DYRSNYRNWAFTQPDNWQGHEQGGGEDCAEILSDGHWNDNFCQQVNRWVCEKRRNIT

[0103] H

서열번호: 10 - 마우스 ASGR2 동형체 b (NP_001300856.1)

MEFGALDTLGGSTNAILTSWLAQLEEKQQQLKADHSTLLFHLKHFPMDLRTLTCQLAYFQS
NGTECCPVNWVEFGGSCYWFSRDGLTWAEADQYCQLENAHLLVINSREEQDFVVKHRSQ
FHIWIGLTDRDGSWKWVDGTDYRSNYRNWAFTQPDNWQGHEQGGGEDCAEILSDGHWN
DNFCQQVNRWVCEKRRNITH

[0104]

[0105] 항원 인식 도메인은 마우스 ASGR1 동형체 a, 마우스 ASGR1 동형체 b, 마우스 ASGR2 동형체 a, 및/또는 마우스

ASGR2 동형체 b, 바람직하게는 마우스 ASGR1 동형체 a에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 항원 인식 도메인은 동등한 인간 단백질에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 7-10 중 하나 이상과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 바람직하게는 항원 인식 도메인은 서열번호: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성 및 서열번호: 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 적합하게는 특이적으로 결합한다.

[0106] 항원 인식 도메인은 간 특이적 항원, 예를 들어, ASGR 내의 하나 이상의 영역 또는 에피토프에 결합하거나, 적합하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 항원 결정인자로도 알려진 에피토프는 항원 인식 도메인(예를 들어, 항체)에 의해 인식되는 항원의 일부이다. 즉, 에피토프는 항원 인식 도메인은 결합하는 항원의 특정 부분이다. 적합하게는, 항원 인식 도메인은 간 특이적 항원, 예를 들어 ASGR 내의 하나의 영역 또는 에피토프에 결합하고, 적합하게는 특이적으로 결합한다.

[0107] 본 발명에서 사용되는 항원 인식 도메인은 간 특이적 항원, 바람직하게는 ASGR에 선택적으로 또는 특이적으로 결합할 수 있으므로, 다른 단백질/분자에 대한 결합 친화도와 비교하여 간 특이적 항원, 바람직하게는 ASGR에 대한 더 큰 결합 친화도를 가질 수 있다. 적합하게는, 본 명세서에 사용된 바와 같이, "특이적으로 결합한다"는 항원 인식 도메인은 다른 단백질에 결합하지 않거나 (예를 들어, 특이적으로 결합하는 항원에 대한 그의 친화도보다 적어도 10, 50, 100, 500, 1000 또는 10000배 적은 친화도로) 그것이 특이적으로 결합하는 항원에 대한 결합과 비교하여 크게 감소된 친화도로 결합한다는 것을 의미한다. 따라서, 본원에 언급된 항원 인식 도메인은 다른 단백질에 대한 결합 친화도의 적어도 10, 50, 100, 500, 1000 또는 10000배로 그의 항원, 예를 들어, ASGR에 결합할 수 있다. 항원 인식 도메인의 결합 친화도는 Biacore 시스템과 같이 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 결정할 수 있다.

[0108] 항원 인식 도메인은 간 특이적 항원, 예를 들어 ASGR에 대해 높은 결합 친화도를 가질 수 있고, 즉 10^{-6}M 이하, 10^{-7}M 이하, 10^{-8}M 이하, 10^{-9}M 이하, 10^{-10}M 이하, 10^{-11}M 이하, 또는 10^{-12}M 이하 범위의 Kd를 가질 수 있다. 항원 인식 도메인은 100 nM, 50 nM, 20 nM 또는 10 nM 미만, 더 바람직하게는 10, 9.5, 9, 8.5, 8, 7.5, 7, 6.5, 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5 또는 1 nM 미만, 가장 바람직하게는 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 또는 0.1 nM 미만의 Kd에 해당하는 간 특이적 항원, 예를 들어 ASGR에 대한 결합 친화도를 가질 수 있다. 항원 인식 도메인은 약 1pM 내지 약 100nM, 약 1pM 내지 약 10nM, 또는 약 1pM 내지 약 1nM의 Kd에 해당하는 간 특이적 항원, 예를 들어 ASGR에 대한 결합 친화도를 가질 수 있다.

[0109] Kd를 결정하는 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있다. 그러나 편리하게 Kd는 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 검정 또는 시스템 (예를 들어, BIAcore 검정 또는 시스템)에서 측정할 수 있다. 예를 들어, Kd는, 예를 들어 Lineweaver-Burk 방법을 사용하여, 또는 BIAcore 1000 평가 소프트웨어에서 1:1 결합 모델과 같은 상업적으로 입수가능한 결합 모델 소프트웨어를 사용하여, 다양한 농도의 항원에 대한 다양한 농도의 항원 인식 도메인을 시험관내에서 시험하여 포화 곡선을 확립함으로써 결정될 수 있다. 적합하게는, HBS-P 완충계 (0.01M Hepes, pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.05% 계면활성제 P20)이 사용된다. 특히, 상기 항원 인식 도메인이 항체, 항체 단편, 또는 항체로부터 유래된 경우, 상기 Kd는 항원 인지 도메인이 임의의 포맷, 예를 들어 scFv 또는 sdAb 포맷, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 또 다른 포맷인 경우에 적절할 수 있다.

[0110] 항원 인식 도메인은 50℃, 55℃, 60℃, 65℃ 또는 그 초과, 바람직하게는 55℃ 또는 그 초과, 예를 들어 55℃ 내지 75℃ 의 용융 온도를 가질 수 있다. 용융 온도는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 적합하게는 용융 온도는 시차 주사 열량측정에 의해 결정된다. 적합하게는, 항원 인식 도메인은 1mg/mL PBS에서 시간당 180℃로 가열되고 검출 가능한 열 변화가 측정된다. 전이 중간점은 겉보기 용융 온도를 제공한다.

[0111] 항원 인식 도메인(항원 특이적 표적화 도메인으로도 알려짐)은 간 특이적 항원, 바람직하게는 아시알로당단백질 수용체 (ASGR)를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 보유하는 임의의 단백질 또는 펩티드일 수 있다. 항원 인식 도메인은 간 특이적 항원, 바람직하게는 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 대한 임의의 자연 발생, 합성, 반합성 또는 재조합적으로 생성된 결합 파트너를 포함한다. 예시적인 항원 인식 도메인은 항체, 항체 단편 또는 유도체, 수용체의 세포외 도메인, 세포 표면 분자/수용체에 대한 리간드, 또는 그의 수용체 결합 도메인, 및 종양 결합 단백질을 포함한다. 예를 들어, ASGR에 적합한 리간드는 베타-D-갈락토스 및 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함한다.

[0112] 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 항체(Ab)이거나 이 항체로부터 유래된다. 항체 유래 항원 인식 도메인은 항체의 단편 또는 항체의 하나 이상의 단편의 유전적으로 조작된 산물일 수 있으며, 이 단편은 항원과의 결합에 관여한다. 예는 낙타과 항체 (VHH), 항원-결합 단편 (Fab), 가변 영역 (Fv), 단쇄 항체 (scFv), 단일-도메인 항체 (sdAb), 중쇄 가변 영역 (VH), 경쇄 가변 영역 (VL), 및 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.

[0113] 바람직한 구현예에서, 항원 인식 도메인은 단일 사슬 항체(scFv) 또는 단일 도메인 항체(sdAb)이다. 가장 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 단일 도메인 항체(sdAb)이다.

[0114] 항체는 단편 항원 결합(Fab) 가변 영역을 통해 항원을 인식한다. 항체는 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 당단백질이다. 그들은 혈액 단백질의 감마 글로불린 분획의 대부분을 구성한다. 이들은 일반적으로 각각 2개의 큰 중쇄와 2개의 작은 경쇄를 갖는 기본 구조 단위로 만들어진다. 낙타류 항체(VHH)는 경쇄가 없고 가변 도메인에 부착된 2개의 중쇄로 구성된다.

[0115] "항원 결합 단편"(Fab)은 항원에 결합하는 항체 상의 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄 각각의 하나의 불변 영역과 하나의 가변 영역으로 구성된다.

[0116] "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 구성된다. "단일 사슬 항체"(scFv)는 직접적으로 또는 펩티드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 구성된 조작된 항체를 지칭한다. 펩티드 링커 서열은 일반적으로 길이가 약 10-25개 아미노산이며 유연성을 위해 글리신이 농축되고 용해성을 위해 세린 또는 트레오닌이 농축된다. 펩티드 링커 서열은 중쇄 가변 영역의 N-말단을 경쇄 가변 영역의 C-말단과 연결하거나 그 반대로 연결할 수 있다.

[0117] 나노바디로도 알려진 "단일 도메인 항체"(sdAb)는 단일 단량체 가변 항체 도메인으로 구성된 항체 단편을 의미한다. 따라서, sdAb는 중쇄 가변 영역(VH) 또는 경쇄 가변 영역(VL)일 수 있다.

[0118] "중쇄 가변 영역" 또는 "VH"는 프레임워크 영역으로 알려진 측접 스트레치 사이에 개재된 3개의 CDR을 포함하는 항체의 중쇄 단편을 지칭하며, 이는 CDR보다 고도로 보존되고 CDR을 지지하기 위해 스캐폴드를 형성한다. "경쇄 가변 영역" 또는 "VL"은 프레임워크 영역 사이에 개재된 3개의 CDR을 함유하는 항체의 경쇄 단편을 지칭한다.

[0119] 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 관련하여 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항체의 경쇄와 중쇄의 가변 영역에서 고도로 가변 루프를 지칭한다. CDR은 항원 형태와 상호작용하고 항원에 대한 결합을 크게 결정할 수 있다(일부 프레임워크 영역이 결합에 관여하는 것으로 알려져 있음). 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 3개의 CDR(아미노에서 카르복시 말단까지 번호가 매겨진 중쇄 CDR 1, 2 및 3 및 경쇄 CDR 1, 2 및 3)을 함유한다.

[0120] 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 CDR은 관련 기술분야에서 이용가능한 예측 소프트웨어를 사용하여, 예를 들어 Abysis 알고리즘을 사용하여, 또는 IMGT/V-QUEST 소프트웨어, 예컨대 www.IMGT.org에서 찾아볼 수 있는 IMGT 알고리즘 (ImMunoGeneTics)을 사용하여 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열로부터 예측될 수 있다(예를 들어 Lefranc et al, 2009 NAR 37:D1006-D1012 및 Lefranc 2003, Leukemia 17: 260-266 참조). 어느 알고리즘에 의해 확인된 CDR 영역은 본 발명에서 사용하기에 동등하게 적합한 것으로 간주된다. CDR은 예측되는 항체와 중쇄와 경쇄 사이에 따라 길이가 다양할 수 있다. 따라서, 온전한 항체의 3개의 중쇄 CDR은 상이한 길이일 수 있고(또는 동일한 길이일 수 있음) 온전한 항체의 3개의 경쇄 CDR은 상이한 길이일 수 있다(또는 동일한 길이일 수 있음). CDR은 예를 들어 2 또는 3 개의 아미노산 길이 내지 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 개의 아미노산 길이의 범위일 수 있다. 특히, CDR은 3-14 개의 아미노산, 예를 들어 적어도 3개의 아미노산 및 15개 미만의 아미노산 길이일 수 있다.

[0121] CDR의 위치를 정의하기 위해 필요한 경우 본 명세서에서 카밧(Kabat) 명명법을 따른다는 점에 유의해야 한다(Kabat et al, 1991, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669).

[0122] 간 특이적 항원, 바람직하게는 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 특이적으로 결합하는 항체, 이의 유도체 및 단편은 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 방법에는 파아지 디스플레이, 인간 또는 인간화 항체를 생성하는 방법, 또는 인간 항체를 생성하도록 조작된 형질전환 동물 또는 식물을 사용하는 방법이 포함된다. 부분적으로 또는 완전히 합성된 항체의 파아지 디스플레이 라이브러리를 사용할 수 있으며 표적 분자에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편에 대해 스크리닝할 수 있다. 인간 항체의 파아지 디스플레이 라이브러리도 사용할 수 있다. 일단 확인되면, 항체(또는 이의 유도체 또는 단편)를 인코딩하는 아미노산 서열 또는

폴리뉴클레오티드 서열이 단리 및/또는 결정될 수 있다. 항체의 서열을 사용하여 이의 적합한 유도체 또는 단편을 설계할 수 있다.

[0123] 간 특이적 항원, 바람직하게는 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 특이적으로 결합하는 적합한 항체, 및 이의 유도체 및 단편이 공지되어 있다. 예를 들어, 항-NTCP 항체는 문헌[Stieger, B., 등, 1994. Gastroenterology, 107(6), pp.1781-1787]에 기재되어 있고; 항-만노스-6-포스페이트 수용체 항체는 문헌[von Figura, K., 등, 1984. The EMBO journal, 3(6), pp.1281-1286]에 기재되어 있고; 항-PDGF 수용체 항체는 문헌[Ogawa, S., 등, 2010. Hepatology Research, 40(11), pp.1128-1141]에 기재되어 있고; 항-스캐빈저 수용체 클래스 A 항체는 문헌[Tomokiyo, R.I., 등, 2002. Atherosclerosis, 161(1), pp.123-132]에 기재되어 있고; 항 스캐빈저 수용체 클래스 B 유형 I 항체는 문헌[Meuleman, P., 등, 2012. Hepatology, 55(2), pp.364-372]에 기재되어 있고; 그리고 항 헤파란 설페이트 항체는 문헌[Gao, W., 등, 2014. Hepatology, 60(2), pp.576-587]에 기재되어 있다. 간 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 항체, 및 그의 유도체 및 단편은 상업적으로 입수가능하다. 공지된 항체의 서열을 사용하여 이의 적합한 유도체 또는 단편을 설계할 수 있다.

[0124] 본 발명에서 사용될 수 있는 항체, 및 이의 단편 및 유도체의 예는 하기에 추가로 기술된다.

[0125] 항원 인식 도메인은 간-특이적 항원, 바람직하게는 아시알로당단백질 수용체 (ASGR) (또는 이러한 예측된 CDR의 변이체 (예를 들어, 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환을 갖는 변이체))에 결합하는 항체로부터 예측될 수 있는 적어도 하나의 CDR (예컨대 CDR3)을 포함할 수 있다. 3개 이하의 CDR 영역(예를 들어, 단일 CDR 또는 이의 일부)을 함유하는 분자는 CDR이 유래된 항체의 항원 결합 활성을 유지할 수 있음이 이해될 것이다. 2개의 CDR 영역을 함유하는 분자는 표적 항원, 예를 들어, 미니바디 형태로 표적 항원에 결합할 수 있는 것으로 당업계에 기술되어 있다 (Vaughan and Sollazzo, 2001, Combinational Chemistry & High Throughput Screening, 4, 417-430). 표적에 대한 강한 결합 활성을 나타낼 수 있는 단일 CDR을 함유하는 분자가 기재되어 있다(Nicaise et al, 2004, Protein Science, 13: 1882-91).

[0126] 이와 관련하여, 항원 인식 도메인은 하나 이상의 가변 중쇄 CDR, 예를 들어, 1, 2 또는 3개의 가변 중쇄 CDR을 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 항원 인식 도메인은 하나 이상의 가변 경쇄 CDR, 예를 들어, 1, 2 또는 3개의 가변 경쇄 CDR을 포함할 수 있다. 항원 인식 도메인은 3개의 중쇄 CDR 및/또는 3개의 경쇄 CDR(더욱 특히, 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역)을 포함할 수 있고, 여기서 적어도 하나의 CDR, 바람직하게는 모든 CDR은 간-특이적 항원, 바람직하게는 ASGR에 결합하는 항체로부터 유래될 수 있거나, 하기에 제공된 CDR 서열 중 하나로부터 선택될 수 있다.

[0127] 항원 인식 도메인은 가변 중쇄 및 경쇄 CDR의 임의의 조합, 예를 들어 1개의 가변 중쇄 CDR을 1개의 가변 경쇄 CDR과 함께, 2개의 가변 중쇄 CDR을 1개의 가변 경쇄 CDR과 함께, 2개의 가변 중쇄 CDR을 2개의 가변 경쇄 CDR과 함께, 3개의 가변 중쇄 CDR을 1 또는 2개의 가변 경쇄 CDR과 함께, 1개의 가변 중쇄 CDR을 2 또는 3개의 가변 경쇄 CDR과 함께, 또는 3개의 가변 중쇄 CDR을 3개의 가변 경쇄 CDR과 함께 포함할 수 있다. 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 3개의 가변 중쇄 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3) 또는 3개의 가변 경쇄 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3), 즉 3개의 CDR을 포함한다. 대안적으로, 항원 인식 도메인은 3개의 가변 중쇄 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 3개의 가변 경쇄 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함하거나, 그렇지 않으면 6개의 CDR을 포함할 수 있다.

[0128] 항원 인식 도메인 내에 존재하는 하나 이상의 CDR은 도메인이 상기 기재된 결합 활성을 갖는 한 동일한 항체로부터 모두가 아닐 수 있다. 따라서, 하나의 CDR은 간-특이적 항원, 예를 들어 ASGR에 결합하는 항체의 중쇄 또는 경쇄로부터 예측될 수 있는 반면, 존재하는 또 다른 CDR은 동일한 간-특이성 항원 (예를 들어 ASGR)에 결합하는 상이한 항체로부터 예상될 수 있다. 이 경우, 간 특이적 항원, 예를 들어, ASGR에 결합하는 항체로부터 CDR3을 예측하는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 특히 하나 이상의 CDR이 항원 인식 도메인에 존재하는 경우, CDR은 예를 들어 간 특이적 항원, 예를 들어 ASGR에 결합하는 항체로부터 예측되는 것이 바람직하다. CDR의 조합은 상이한 항체, 특히 동일한 원하는 영역 또는 에피토프에 결합하는 항체로부터 사용될 수 있다. 예시적이고 바람직한 CDR 서열은 본 명세서의 다른 곳에서 기재된다.

[0129] 특히 바람직한 구현예에서, 항원 인식 도메인은 간 특이적 항원, 예를 들어 ASGR에 결합하는 항체의 가변 중쇄 서열로부터 예측된 3개의 CDR 및/또는 간 특이적 항원, 예를 들어 ASGR (바람직하게는 동일한 항체)에 결합하는 항체의 가변 경쇄 서열로부터 예측된 3개의 CDR을 포함한다. 예시적이고 바람직한 CDR 서열은 본 명세서의 다른 곳에서 기재된다.

[0130] 일부 구현예에서, 항원 인식 도메인은 항체 (예를 들어 Fab, scFv, 또는 sdAb임)이거나, 그로부터 유래되고, 상

기 항체는 서열번호: 11-73, 또는 그의 유도체로부터 선택된 1개 이상의 CDR 영역을 포함한다. 다시 말해서, 일부 구현예에서 항원 인식 도메인은 서열번호: 11-73, 또는 그의 유도체로부터 선택된 하나 이상의 CDR 영역을 포함한다. 적합하게는, 항원 인식 도메인은 서열번호: 11-73, 또는 그의 유도체로부터 선택된 3개의 CDR 영역을 포함한다.

명칭	CDR1	CDR2	CDR3
ASGR1 VH1 CDR (서열번호: 11-13)	EKYAMA (서열번호: 11)	RISARGVT (서열번호: 12)	HKRHEHTRFDS (서열번호: 13)
ASGR1 VH2 CDR (서열번호: 14-16)	RYTMG (서열번호: 14)	AIGPPGSNTYYA DSVKG (서열번호: 15)	WVMLRGRFDY (서열번호: 16)
ASGR1 VH3 CDR (서열번호: 17-19)	DYGMG (서열번호: 17)	AIGRNGSQTYYA DSVKG (서열번호: 18)	LRRGRGLNTFTLD Y (서열번호: 19)
ASGR1 VH4 CDR (서열번호: 20-22)	AAGMG (서열번호: 20)	AIGRNGSQTYYA DSVKG (서열번호: 21)	LRRGRGLNTFTLD Y (서열번호: 22)
ASGR1 VK1 CDR (서열번호: 23-25)	RASQAIGRWLL (서열번호: 23)	PGSRLRS (서열번호: 24)	QQAYAWPPT (서열번호: 25)
ASGR1 VK2 CDR (서열번호: 26-28)	RASQAIGRWLL (서열번호: 26)	PGSRLQS (서열번호: 27)	QQAYQLPVT (서열번호: 28)
ASGR1 VK3 CDR (서열번호: 29-31)	RASQAIGRWLL (서열번호: 29)	PGSRLQS (서열번호: 30)	QQAYSLPPT (서열번호: 31)
ASGR1 VK4 CDR (서열번호: 32-34)	RASGDIGHALW (서열번호: 32)	RGGSALQS (서열번호: 33)	GQSHVRPFT (서열번호: 34)
ASGR1 VK5 CDR (서열번호: 35-37)	QASKNIGERLV (서열번호: 35)	GFASLLQS (서열번호: 36)	GQYRWVPAT (서열번호: 37)
ASGR1 VH5 CDR (서열번호: 38-40)	STYPMH (서열번호: 38)	SISPSGDS (서열번호: 39)	NALRFDY (서열번호: 40)
ASGR1 VH6 CDR (서열번호: 41-43)	KPYAMH (서열번호: 41)	SISSTGLS (서열번호: 42)	DASRFRQPFDY (서열번호: 43)
ASGR1 VH7 CDR	PKYGMA	RIGATGSE	HRGTAHSSFFDY

[0131]

(서열번호: 44-46)	(서열번호: 44)	(서열번호: 45)	(서열번호: 46)
ASGR1 VH8 CDR (서열번호: 47-49)	SANGMH (서열번호: 47)	VISATGDQ (서열번호: 48)	GYDRRHRKFDY (서열번호: 49)
ASGR1 VH9 CDR (서열번호: 50-52)	ADYSMY (서열번호: 50)	DISPSGSM (서열번호: 51)	GLPGQNMHVGFDY (서열번호: 52)
ASGR1 VK6 CDR (서열번호: 53-55)	RASQAIGRWLL (서열번호: 53)	YAASRLQS (서열번호: 54)	QQAYSLPPT (서열번호: 55)
ASGR1 VK7 CDR (서열번호: 56-58)	RASMSIDESLW (서열번호: 56)	RGGSGLQS (서열번호: 57)	GQAARRPYT (서열번호: 58)
ASGR1 VK8 CDR (서열번호: 59-61)	RASHYIGNELW (서열번호: 59)	RRGSGLQS (서열번호: 60)	GQARHRPYT (서열번호: 61)
ASGR1 VK9 CDR (서열번호: 62-64)	RASSNIGRSLV (서열번호: 62)	AGGSLLQS (서열번호: 63)	GQYAEEPFT (서열번호: 64)
ASGR1 VK10 CDR (서열번호: 65-67)	RASVKIGERLW (서열번호: 65)	RDASLLQS (서열번호: 66)	GQSWMRPYT (서열번호: 67)
ASGR1 VK11 CDR (서열번호: 68-70)	RASSYIGGELW (서열번호: 68)	SGTSGLQS (서열번호: 69)	GQAAKRPFT (서열번호: 70)
ASGR1 VK12 CDR (서열번호: 71-73)	RASSWINSDLV (서열번호: 71)	AGGSLLQS (서열번호: 72)	GQYLEEPYT (서열번호: 73)

[0132]

[0133] 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 동일한 가변 사슬로부터 선택된 CDR (CDR1, CDR2, 및 CDR3), 또는 그의 유도체를 포함한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 서열번호: 11-13, 서열번호: 14-16, 서열번호: 17-19, 서열번호: 20-22, 서열번호: 23-25, 서열번호: 26-28, 서열번호: 29-31, 서열번호: 32-34, 서열번호: 35-37, 서열번호: 38-40, 서열번호: 41-43, 서열번호: 44-46, 서열번호: 47-49, 서열번호: 50-52, 서열번호: 53-55, 서열번호: 56-58, 서열번호: 59-61, 서열번호: 62-64, 서열번호: 65-67, 서열번호: 68-70, 및/또는 서열번호: 71-73, 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

[0134] 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 서열번호: 11-13, 서열번호: 14-16, 서열번호: 17-19, 서열번호: 20-22, 서열번호: 23-25, 서열번호: 26-28, 및/또는 서열번호: 29-31, 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

[0135] 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 서열번호: 11-13, 서열번호: 14-16, 서열번호: 17-19, 서열번호: 23-25, 서열번호: 26-28, 및/또는 서열번호: 29-31, 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

[0136] 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 서열번호: 11-13, 서열번호: 14-16, 또는 서열번호: 17-19, 및/또는 서열번호: 23-25, 서열번호: 26-28, 또는 서열번호: 29-31, 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

[0137] 바람직한 구현예에서, 항원 인식 도메인은 서열번호: 11-31로부터 선택된 1개 이상의 CDR 영역을 포함한다. 적합하게, 항원 인식 도메인은 서열번호: 11-31, 또는 그의 유도체로부터 선택된 3개의 CDR 영역을 포함한다.

[0138] 바람직한 구현예에서, 항원 인식 도메인은 다음을 포함한다:

[0139] (i) CDR1 서열 EKYAMA (서열번호: 11), CDR2 서열 RISARGVT (서열번호: 12), 및 CDR3 서열 HKRHEHTRFDS (서열번호: 13), 또는 그의 유도체;

[0140] (ii) CDR1 서열 RYTMG (서열번호: 14), CDR2 서열 AIGPPGSNTYYADSVKG (서열번호: 15), 및 CDR3 서열 WVMLRGRFDY (서열번호: 16), 또는 그의 유도체;

[0141] (iii) CDR1 서열 DYGMG (서열번호: 17), CDR2 서열 AIGRNGSQTYYADSVKG (서열번호: 18), 및 CDR3 서열

LRRGRGLNTFTLDY (서열번호: 19), 또는 그의 유도체;

[0142] (iv) CDR1 서열 AAGMG (서열번호: 20), CDR2 서열 AIGRNGSQTYYADSVKG (서열번호: 21), 및 CDR3 서열 LRRGRGLNTFTLDY (서열번호: 22), 또는 그의 유도체;

[0143] (v) CDR1 서열 RASQAIGRWLL (서열번호: 23), CDR2 서열 PGSRLRS (서열번호: 24), 및 CDR3 서열 QQAYAWPPT (서열번호: 25), 또는 그의 유도체;

[0144] (vi) CDR1 서열 RASQAIGRWLL (서열번호: 26), CDR2 서열 PGSRLQS (서열번호: 27), 및 CDR3 서열 QQAYQLPVT (서열번호: 28), 또는 그의 유도체; 및/또는

[0145] (vii) CDR1 서열 RASQAIGRWLL (서열번호: 29), CDR2 서열 PGSRLQS (서열번호: 30), 및 CDR3 서열 QQAYSLPPT (서열번호: 31), 또는 그의 유도체.

[0146] 가장 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 CDR1 서열 EKYAMA (서열번호: 11), CDR2 서열 RISARGVT (서열번호: 12), 및 CDR3 서열 HKRHEHTRFDS (서열번호: 13), 또는 그의 유도체를 포함한다. 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 CDR1 서열 EKYAMA (서열번호: 11), CDR2 서열 RISARGVT (서열번호: 12), 및 CDR3 서열 HKRHEHTRFDS (서열번호: 13), 또는 그의 유도체를 포함하는 sdAb이다.

[0147] 다른 구현예에서, 항원 인식 도메인은 다음을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함한다:

[0148] (i) 서열번호: 11, 12 및 13 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각, 또는 그의 유도체; 또는 서열번호: 26, 27 및 28 각각, 또는 그의 유도체; 또는 서열번호: 29, 30 및 31 각각, 또는 그의 유도체; 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 11, 12 및 13 각각; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함함;

[0149] (ii) 서열번호: 14, 15 및 16 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각, 또는 그의 유도체; 또는 서열번호: 26, 27 및 28 각각, 또는 그의 유도체; 또는 서열번호: 29, 30 및 31 각각, 또는 그의 유도체; 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 14, 15 및 16 각각; 및 서열번호: 26, 27 및 28 각각을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함함; 또는

[0150] (iii) 서열번호: 17, 18 및 19 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각, 또는 그의 유도체; 또는 서열번호: 26, 27 및 28 각각, 또는 그의 유도체; 또는 서열번호: 29, 30 및 31 각각, 또는 그의 유도체; 바람직하게는 상기 항원 인식 도메인은 서열번호: 17, 18 및 19 각각; 및 서열번호: 29, 30 및 31 각각을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함함.

[0151] 따라서, 그와 같은 구현예에서, 항원 인식 도메인은 서열번호: 11, 12 및 13 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각, 또는 그의 유도체을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0152] 항원 인식 도메인은 서열번호: 11, 12 및 13 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 26, 27 및 28 각각, 또는 그의 유도체를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0153] 항원 인식 도메인은 서열번호: 11, 12 및 13 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 29, 30 및 31 각각, 또는 그의 유도체를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0154] 항원 인식 도메인은 서열번호: 14, 15 및 16 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각, 또는 그의 유도체를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0155] 항원 인식 도메인은 서열번호: 14, 15 및 16 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 26, 27 및 28 각각, 또는 그의 유도체를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0156] 항원 인식 도메인은 서열번호: 14, 15 및 16 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 29, 30 및 31 각각, 또는 그의 유도체를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0157] 항원 인식 도메인은 서열번호: 17, 18 및 19 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 23, 24 및 25 각각, 또는 그의 유도체를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0158] 항원 인식 도메인은 서열번호: 17, 18 및 19 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 26, 27 및 28 각각, 또는 그의 유도체를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0159] 항원 인식 도메인은 서열번호: 17, 18 및 19 각각, 또는 그의 유도체; 및 서열번호: 29, 30 및 31 각각, 또는

그의 유도체를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0160] 이러한 항원 인식 도메인을 포함하는 CAR은 본 발명의 또 다른 양태를 형성한다.

[0161] 바람직하게는 6개의 CDR을 포함하는 상기 항원 인식 도메인은 scFv이다.

[0162] 본 발명은 상기 및 본 명세서의 다른 곳에서 기재된 CDR 영역(및 VH 및 VL(VK) 영역, 및 상기 영역 내의 CDR 영역)의 "유도체"를 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "유도체"는 "변이체, 유도체 및 단편" 섹션에서 아래에 정의된다. 항원 결합 능력을 유지하면서 CDR에서 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, CDR 유도체는 3개 이하의 아미노산 치환, 예를 들어 3개의 아미노산 치환, 2개의 아미노산 치환 또는 1개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 특히, 일부 구현예에서 CDR 유도체는 하나의 아미노산 치환을 포함하고 항원 결합 능력을 보유한다. 유도체는 변이체, 예를 들어 CDR에 대해 적어도 80% 또는 90% 동일성을 갖는 변이체일 수 있다.

[0163] 일부 구현예에서, 항원 인식 도메인은 서열번호: 74-94 중 하나 이상에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성된다.

[0164]

명칭	서열
ASGR1 VH1 (서열번호: 74)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKG LEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH2 (서열번호: 75)	ELQLLEFGGGLVQPGGSLRLSCTTSGFTFSRYTMGWVRQAPGKGL EWVSAIGPPGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKWVMLRGRFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH3 (서열번호: 76)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEDYGMGWVRQAPGKG LEWVSAIGRNGSQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKLRRGRGLNTFTLDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH4 (서열번호: 77)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGAAGMGWVRQAPGKG LEWVSAIGRNGSQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKLRRGRGLNTFTLDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VK1 (서열번호: 78)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPK LLIGPGSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFVTYYCQQAY AWPPTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK2 (서열번호: 79)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPK HLIGPGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAY QLPVTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK3 (서열번호: 80)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPK LLIGPGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIGSLQPEDFATYYCQQAY SLPPTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK4 (서열번호: 81)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGDIGHALWWYQQKPGKAPK LLIRGGSALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSH VRPFTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK5 (서열번호: 82)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASKNIGERLVWYQQKPGKAPKL LIGFASLLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQYRW VPATFGQGTKVEIKR
ASGR1 VH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYPMHWARQAPGKGL

(서열번호: 83)	EWVSSISPSGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKNALRFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH6 (서열번호: 84)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKPYAMHWVRQAPGKG LEWVSSISSTGLSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDASRFRQPFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH7 (서열번호: 85)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPKYGMAWVRQAPGKG LEWVSRIGATGSETYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKHRGTAHSSFFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH8 (서열번호: 86)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSANGMHWVRQAPGKG LEWVSVISATGDQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKGYDRRHRKFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VH9 (서열번호: 87)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYSMYWVRQAPGKG LEWVSDISPSGSMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKGLPGQNMHVGFDYWGQGTLVTVSS
ASGR1 VK6 (서열번호: 88)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPK LLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAY SLPPTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK7 (서열번호: 89)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASMSIDESLWWYQQKPGKAPKL LIRGGSGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQAAR RPYTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK8 (서열번호: 90)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASHYIGNELWWYQQKPGKAPK LLIRRGSGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQAR HRPYTFGQGTRVEIKR
ASGR1 VK9 (서열번호: 91)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSNIGRSLVWYQQKPGKAPKL LIAGGSLLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQYAE EPFTFGQGTRVEIKR
ASGR1 VK10 (서열번호: 92)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASVKIGERLWWYQQKPGEAPKL LIRDASLLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSWM RPYTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK11 (서열번호: 93)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSYIGGELWWYQQKPGKAPKL LISGTSGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQAAK RPFTFGQGTKVEIKR
ASGR1 VK12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSWINSDLVWYQQKPGEAPKL

[0165]

(서열번호: 94)	LIAGGSLLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQYLE EPYTFGQGTKVEVKR

[0166]

[0167] 바람직한 구현예에서, 항원 인식 도메인은 서열번호: 74-80 중 하나 이상에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성된다.

[0168] 가장 바람직하게는, 항원 인식 도메인은 ASGR1 VH1 (서열번호: 74)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성된다.

[0169] 일부 구현예에서, 항원 인식 도메인은 서열번호: 74, 75 또는 76의 아미노산 서열, 또는 그의 유도체, 및/또는 서열번호: 78, 79 또는 80의 아미노산 서열, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 구성된다. 바람직한 구현예에서, 항원 인식 도메인은 서열번호: 74 및 78의 아미노산 서열, 또는 그의 유도체; 서열번호: 75 및 79, 또는 그의 유도체; 또는 서열번호: 76 및 80, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 구성된다.

[0170] 따라서, 이러한 구현예에서, 항원 인식 도메인은 서열번호: 74 및 78, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 74 및 79, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 74 및 80, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다.

[0171] 항원 인식 도메인은 서열번호: 75 및 78, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 75 및 79, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 75 및 80, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다.

[0172] 항원 인식 도메인은 서열번호: 76 및 78, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 76 및 79, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다. 항원 인식 도메인은 서열번호: 76 및 80, 또는 그의 유도체를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다.

[0173] 바람직하게는 VH 및 VL(VK) 도메인을 포함하는 상기 항원 인식 도메인은 scFv이다. 이러한 scFv는 VH 및 VL(VK) 도메인 사이에 링커를 함유할 수 있다.

[0174] 항원 인식 도메인은 서열번호: 74 또는 그의 유도체 및 서열번호: 81, 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0175] 항원 인식 도메인은 서열번호: 75 또는 그의 유도체 및 서열번호: 81, 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0176] 항원 인식 도메인은 서열번호: 76 또는 그의 유도체 및 서열번호: 81, 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0177] 항원 인식 도메인은 서열번호: 77 또는 그의 유도체 및 서열번호: 78 내지 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0178] 항원 인식 도메인은 서열번호: 83 또는 그의 유도체 및 서열번호: 78 내지 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0179] 항원 인식 도메인은 서열번호: 84 또는 그의 유도체 및 서열번호: 78 내지 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0180] 항원 인식 도메인은 서열번호: 85 또는 그의 유도체 및 서열번호: 78 내지 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0181] 항원 인식 도메인은 서열번호: 86 또는 그의 유도체 및 서열번호: 78 내지 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0182] 항원 인식 도메인은 서열번호: 87 또는 그의 유도체 및 서열번호: 78 내지 82 또는 88 내지 94 중 임의의 하나 또는 그의 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[0183] 일부 예시적인 scFv(scFv 단편)는 아래에 요약되어 있다:

[0184] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKRH EHTRFDSWGQGTLVTVSSLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPKLLIGPGSRLRSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFVTYYCQQAYAWPPTFGQGTKVEIKR (서열번호:173)

[0185] ELQLLEFGGGLVQPGGSLRLSCTTSGFTFSRYTMGWVRQAPGKGLEWVSAIGPPGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWVML RGRFDYWGQGTLVTVSSLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPKHLIGPGSRLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYQLPVTFGQGTKVEIKR (서열번호:174)

[0186] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEDYGMGWVRQAPGKGLEWVSAIGRNGSQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLRRG RGLNTFTLDYWGQGTLVTVSSLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKAPKLLIGPGSRLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTIGSLQPEDFATYYCQQAYSLPPTFGQGTKVEIKR (서열번호:175)

[0187] 이러한 항원 인식 도메인을 포함하는 CAR은 본 발명의 또 다른 양태를 형성한다.

[0188] 본 명세서에 기재된 항원 인식 도메인 변이체는 항원 결합 능력을 보유한다. 예를 들어, 변이체는 상응하는 참조 아미노산 서열의 수준의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%으로 ASGR에 결합할 수 있다. 변이체는 상응하는 참조 아미노산 서열과 유사

하거나 동일한 수준으로 ASGR에 결합할 수 있거나 상응하는 참조 아미노산 서열보다 더 큰 수준 (예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40% 또는 적어도 50%까지 증가됨)으로 ASGR에 결합할 수 있다. 따라서, 항원 인식 도메인은 ASGR1 VH1-4 (서열번호: 11-22) 및/또는 ASGR1 VK1-3 (서열번호: 23-31) (상기에서 나타냄, 서열번호: 74-77 및 서열번호: 78-80 각각에 밑줄)의 CDR을 포함하는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어질 수 있다. 항원 인식 도메인은 ASGR1 VH1-3 (서열번호: 11-19) 및/또는 ASGR1 VK1-3 (서열번호: 23-31) (상기에서 나타냄, 서열번호: 74-76 및 서열번호: 78-80 각각에 밑줄)의 CDR을 포함하는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어질 수 있다. 하나(또는 그 초과)의 아미노산 잔기의 치환, 변이, 변형, 대체, 결실 및/또는 부가는 프레임워크 영역에서 발생할 수 있다.

[0189] 따라서, 일부 구현예에서 항원 인식 도메인은 다음을 포함하거나 그로 구성된다:

[0190] (i) ASGR1 VH1 (서열번호: 74)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로서, CDR1 서열 EKYAMA (서열번호: 11), CDR2 서열 RISARGVT (서열번호: 12), 및 CDR3 서열 HKRHEHTRFDS (서열번호: 13)을 포함하는 아미노산 서열;

[0191] (ii) ASGR1 VH2 (서열번호: 75)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로서, CDR1 서열 RYTMG (서열번호: 14), CDR2 서열 AIGPPGSNTYYADSVKG (서열번호: 15), 및 CDR3 서열 WVMLRGRFDY (서열번호: 16)을 포함하는 아미노산 서열;

[0192] (iii) ASGR1 VH3 (서열번호: 76)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로서, CDR1 서열 DYGMG (서열번호: 17), CDR2 서열 AIGRNGSQTYYADSVKG (서열번호: 18), 및 CDR3 서열 LRRGRGLNTFTLDY (서열번호: 19)을 포함하는 아미노산 서열;

[0193] (iv) ASGR1 VH4 (서열번호: 77)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로서, CDR1 서열 AAGMG (서열번호: 20), CDR2 서열 AIGRNGSQTYYADSVKG (서열번호: 21), 및 CDR3 서열 LRRGRGLNTFTLDY (서열번호: 22)을 포함하는 아미노산 서열;

[0194] (v) ASGR1 VK1 (서열번호: 78)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로서, CDR1 서열 RASQAIGRWLL (서열번호: 23), CDR2 서열 PGSRLRS (서열번호: 24), 및 CDR3 서열 QQAYAWPPT (서열번호: 25)을 포함하는 아미노산 서열;

[0195] (vi) ASGR1 VK2 (서열번호: 79)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로서, CDR1 서열 RASQAIGRWLL (서열번호: 26), CDR2 서열 PGSRLQS (서열번호: 27), 및 CDR3 서열 QQAYQLPVT (서열번호: 28)을 포함하는 아미노산 서열; 또는

[0196] (vii) ASGR1 VK3 (서열번호: 80)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로서, CDR1 서열 RASQAIGRWLL (서열번호: 29), CDR2 서열 PGSRLQS (서열번호: 30), 및 CDR3 서열 QQAYSLPPT (서열번호: 31)을 포함하는 아미노산 서열.

[0197] 바람직한 구현예에서 항원 인식 도메인은 ASGR1 VH1 (서열번호: 74)에 대해 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어지고, 아미노산 서열은 CDR1 서열 EKYAMA (서열번호: 11), CDR2 서열 RISARGVT (서열번호: 12), 및 CDR3 서열 HKRHEHTRFDS (서열번호: 13), 또는 그의 유도체를 포함한다.

[0198] 본 발명의 CAR은 하나 초과의 항원 인식 도메인을 포함할 수 있지만, 즉, 예를 들어, 이중 또는 2개의 폴리펩티드 CAR 시스템의 일부로서, 상기 정의된 바와 같은 간 특이적 항원 내의 하나 초과의 에피토프, 또는 하나 초과의 에피토프에 결합할 수 있고, 특정 구현예에서, 본 발명의 CAR은 단 하나 또는 단일 항원 인식 도메인을 포함할 수 있다.

[0199] 힌지 도메인

[0200] CAR은 힌지 도메인을 포함할 수 있다.

[0201] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "스페이서 도메인"으로도 지칭되는 "힌지 도메인"은 항원 결합 도메인을 막횡단 도메인으로부터 분리하는 CAR의 세포외 부분을 지칭한다. 힌지는 표적화 항원에 접근할 수 있는 유연성을 제공할 수 있다. 예를 들어, 긴 스페이서는 CAR에 추가적인 유연성을 제공하고 막-근위 에피토프에 대한 더 나은 접근을 허용한다.

[0202] 적합한 힌지 도메인은 당업자에게 명백할 것이다(예를 들어, Guedan, S., 등, 2018. Molecular Therapy-

Methods & Clinical Development, 12, 145-156). 적합한 힌지 도메인은 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: CD28 힌지 도메인, CD8α 힌지 도메인, IgG 힌지 도메인 및 IgD 힌지 도메인. 바람직하게는 힌지 도메인은 CD8α 또는 CD28 힌지 도메인이다.

[0203] 적합하게는, 힌지 도메인은 서열번호: 95로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 95와 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0204] *예시적인 CD28 힌지 도메인* (서열번호: 95):

[0205] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP

[0206] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 95와 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0207] 적합하게는, 힌지 도메인은 서열번호: 96으로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 96과 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0208] *예시적인 CD8 알파 힌지 도메인* (서열번호: 96)*:*

[0209] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0210] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 96과 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0211] 적합하게는, CAR은 태그(tag), 예컨대 c-Myc tag (EQKLISEEDL - 서열번호: 97)을 인코딩할 수 있다. 적합하게는 태그는 CAR의 세포외 도메인에, 예를 들어 세포외 도메인의 힌지 도메인 내로 혼입될 수 있다. 통합된 c-Myc 태그가 있는 예시적인 CD28 힌지 도메인은 아래에 나와 있다.

[0212] *통합된 c-Myc 태그가 있는 예시적인 CD28 힌지 도메인*(서열번호: 98)*:*

[0213] IEVEQKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP

[0214] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 98과 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0215] 막횡단 도메인

[0216] CAR은 막횡단 도메인을 포함할 수 있다.

[0217] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "막횡단 도메인"은 CAR을 Treg의 세포막에 고정시키는 CAR의 부분을 지칭한다. 따라서, 막횡단 도메인은 Treg의 세포막에 걸쳐 있거나 존재할 수 있다. 막횡단 도메인은 세포외 및/또는 세포내 부분을 포함하는 단백질로부터 유래될 수 있고, 따라서 본 명세서에 사용되는 바와 같은 막횡단 도메인은 세포막 내 또는 세포막에 걸친 부분 이외에 기원 단백질로부터 유래된 세포외 및/또는 세포내 잔기에 부착될 수 있다. 예를 들어, 막횡단 도메인은 기원 단백질에서 유래된 힌지 도메인에 부착될 수 있고, 예를 들어, CD8α에서 유래된 막횡단 도메인은 CD8α에서 유래된 힌지 도메인에 부착될 수 있다. 세포막 내 막횡단 도메인의 존재는 형광 현미경검사를 사용한 형광 표지를 포함하는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0218] 적합한 막횡단 도메인은 당업자에게 명백할 것이다. 막횡단 도메인은 I형, II형 또는 III형 막횡단 단백질 중 임의의 것을 포함하는, 막횡단 도메인을 갖는 임의의 단백질로부터의 막횡단 서열을 포함할 수 있다. CAR의 막횡단 도메인은 또한 인공 소수성 서열을 포함할 수 있다. 막횡단 도메인은 이량체화되지 않도록 선택될 수 있다.

[0219] CAR 작제물에 사용되는 막횡단(TM) 도메인의 예는 다음과 같다: 1) CD28 TM 도메인 (Pule 등, Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41; Brentjens 등, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Casucci 등, Blood, 2013, Nov 14;122(20):3461-72.); 2) OX40 TM 도메인 (Pule 등, Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41); 3) 41BB TM 도메인 (Brentjens 등, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35); 4) CD3 제타 TM 도메인 (Pule 등, Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41; Savoldo B, Blood, 2009, Jun 18;113(25):6392-402.); 5) CD8 알파 TM 도메인 (Maher 등, Nat Biotechnol, 2002, Jan;20(1):70-5.; Imai C, Leukemia, 2004, Apr;18(4):676-84; Brentjens 등, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Milone 등, Mol Ther, 2009, Aug;17(8):1453-64.); 6) ICOS TM 도메인; 7) CD4 TM 도메인.

[0220] 적합하게는, CAR은 CD28 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 막횡단 도메인은 서열번호: 99로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 99와 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0221] *예시적인 CD28 TM 도메인 (AA 153 내지 179)* (서열번호: 99):

[0222] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0223] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 99와 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0224] 적합하게는, CAR은 CD8α 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 막횡단 도메인은 서열번호: 165로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 165와 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0225] *예시적인 CD8α TM 도메인 (AA 183 내지 203)* (서열번호: 165):

[0226] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

[0227] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 165와 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0228] 적합하게는, CAR은 CD28 힌지 및 막횡단 도메인(선택적으로 c-Myc 태그를 가짐)을 포함할 수 있다. 적합하게는, 힌지 및 막횡단 도메인은 서열번호: 100 또는 서열번호: 101로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 100 또는 서열번호: 101과 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0229] *예시적인 CD28 힌지 및 막횡단 도메인* (서열번호: 100):

[0230] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0231] *c-Myc 태그를 갖는 예시적인 CD28 힌지 및 막횡단 도메인* (서열번호: 101):

[0232] IEVEQKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0233] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 100 또는 서열번호: 101과 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0234] 적합하게는, CAR은 CD8α 힌지 도메인 및 CD28 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 힌지 및 막횡단 도메인은 서열번호: 102로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 102와 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0235] *예시적인 CD8α 힌지 도메인 및 CD28 막횡단 도메인 (서열번호: 102):*

[0236] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0237] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 102와 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0238] 적합하게는, CAR은 CD28 힌지 도메인 및 CD8α 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 힌지 및 막횡단 도메인은 서열번호: 166으로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 166과 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0239] *예시적인 CD28 힌지 도메인 및 CD8α 막횡단 도메인* (서열번호: 166):

[0240] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

[0241] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 166과 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0242] 엔도도메인

[0243] CAR은 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 선택적으로 하나 이상의 공동자극 도메인을 포함하는 엔도도메인을 포함할 수 있다.

[0244] CAR은 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0245] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "세포내 신호전달 도메인"은 간 특이적 항원 (예를 들어, ASGR)에 대한 효과적인 CAR 결합의 메시지를 Treg의 내부로 전달하여 Treg 기능, 예를 들어 면역억제 기능을 유도하는데 참여하는 CAR의 세포내 부분을 지칭한다.

[0246] 적합한 세포내 신호전달 도메인은 당업자에게 명백할 것이다. 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 변환하고 Treg가 항원 결합 시 특화 기능을 수행하도록 지시하는 데 필요하다. 세포내 신호전달 도메인의 예는 T-세포 수용체 또는 그의 동족체 중 임의의 것의 ζ 사슬 (예를 들어, η 사슬, FcεR1γ 및 β 사슬, MB1 (Igα) 사슬, B29 (Igβ) 사슬, 등), CD3 폴리펩티드 (Δ, δ 및 ε), syk 계열 티로신 키나제 (Syk, ZAP 70, 등),

src 계열 티로신 키나제 (Lck, Fyn, Lyn, 등) 및 T-세포 형질도입에 관여하는 다른 분자, 예컨대 CD2, CD5 및 CD28을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD3 제타 신호전달 도메인, FcγRIII, FcεRI, Fc 수용체의 세포질 꼬리, 세포질 수용체를 보유하는 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 (ITAM) 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0247] 바람직하게는, 세포내 신호전달 도메인은 인간 CD3 제타 신호전달 도메인의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 바람직하게는, CD3 제타 신호전달 도메인은 ASGR에 결합하거나 특이적으로 결합하는 항원 인식 도메인과 동일한 폴리펩티드 사슬에 있다. 적합하게는, 세포내 신호전달 도메인은 서열번호: 103으로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 103과 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0248] *예시적인 CD3 제타 신호전달 도메인* (서열번호: 103):

[0249] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0250] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 103과 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0251] CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD28 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 세포내 신호전달 도메인은 서열번호: 104로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 104와 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0252] *예시적인 CD28 신호전달 도메인* (서열번호: 104):

[0253] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0254] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 104와 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0255] CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD27 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 세포내 신호전달 도메인은 서열번호: 105로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 105와 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0256] *예시적인 CD27 신호전달 도메인 (서열번호: 105):*

[0257] QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

[0258] 한 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열번호: 105에 대해 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 신호전달 모티프를 포함한다.

[0259] 추가적인 세포내 신호전달 도메인은 당업자에게 명백할 것이고 본 발명의 대안적인 구현예와 관련하여 사용될 수 있다.

[0260] CAR은 또한 하나 이상의 공동자극 도메인을 포함할 수 있다.

[0261] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "공동자극 도메인"은 Treg 기능(예를 들어, 면역억제 기능), 확장 및/또는 지속성을 촉진할 수 있는 CAR의 세포내 부분을 지칭한다.

[0262] 따라서, CAR은 세포내 신호전달 도메인, 예를 들어 CD3ζ의 것에 대한 하나 이상의 공동-자극 도메인의 융합을 포함하는 화합물 엔도도메인을 포함할 수 있다. 이러한 화합물 엔도도메인은 항원 인식 후 활성화 및 공동자극 신호를 동시에 전달할 수 있는 2세대 CAR로 지칭될 수 있다. 가장 일반적으로 사용되는 공동 자극 도메인은 CD28의 도메인이다. 이것은 Treg 증식을 유발하는 가장 강력한 공동 자극 신호, 즉 면역학적 신호 2를 공급한다. 적합한 공동자극 도메인은 당업자에게 명백할 것이다.

[0263] 적합하게는, 하나 이상의 공동자극 도메인은 서열번호: 104 또는 서열번호: 105로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 104 또는 서열번호: 105와 적어도 80% (예를 들어, 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99%) 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0264] 적합하게는, 하나 이상의 공동자극 도메인은 OX40, 4-1BB, ICOS 또는 TNFRSF25의 신호전달 도메인과 같은 하나 이상의 TNF 수용체 계열 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0265] OX40, 4-1BB, ICOS 및 TNFRSF25 신호전달 도메인에 대한 예시적인 서열은 아래에 나와 있다. 하나 이상의 공동자극 도메인은 서열번호: 106-109 중 하나 이상 또는 서열번호: 106-109 중 하나 이상과 적어도 80% 이상 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0266] *예시적인 OX40 신호전달 도메인 (서열번호: 106):*

[0267] ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

[0268] *예시적인 41BB 신호전달 도메인 (서열번호: 107):*

[0269] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0270] *예시적인 ICOS 신호전달 도메인 (서열번호: 108):*

[0271] CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL

[0272] *예시적인 TNFRSF25 신호전달 도메인 (서열번호: 109):*

[0273] TYTYRHCWPHKPLVTADEAGMEALTPPPATHLSPLDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGNSW TPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAAPTLSPESPAGSPAMMLQPGPQLYDVMD AVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAVYAALERM GLDGCVEDLRSRLQRGP

[0274] 하나 이상의 공동자극 도메인은 서열번호: 106-109 중 어느 하나에 대해 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 OX40, 4-1BB, ICOS 및 TNFRSF25 신호전달 도메인 중 하나 이상의 변이체를 포함할 수 있다.

[0275] CAR의 엔도도메인은 CD28 신호전달 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 엔도도메인은 서열번호: 110으로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 110과 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0276] *예시적인 CD28 신호전달 도메인 및 CD3 제타 신호전달 도메인* (서열번호: 110):

[0277] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0278] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 110과 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0279] 일부 구현예에서 CAR은 STAT5 회합 모티프 및 JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프를 포함하는 엔도도메인을 포함한다

[0280] "전사 5의 신호 변환체 및 활성화제" (STAT5)은 *FOXP3, IL2RA* 및 *BCLXL*과 같은 유전자의 발현을 촉진하여 Treg 기능, 안정성 및 생존에 중요한 역할을 하는 IL-2 신호 전달 경로에 관여하는 전사 인자이다. 기능을 하고 핵으로 이동하려면 STAT5가 인산화되어야 한다. IL-2 결찰은 각각 IL-2Rβ 및 IL-2Rɣ 사슬에 존재하는 특정 신호전달 도메인을 통해 Jak1 및 Jak3 키나제를 활성화함으로써 STAT5 인산화를 초래한다. Jak1(또는 Jak2)은 Jak3 없이도 STAT5를 인산화할 수 있지만, STAT5 활성은 Jak1과 Jak3 모두의 트랜스인산화에 의해 증가되어 활성이 안정화된다.

[0281] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "STAT5 회합 모티프"는 티로신을 포함하고 STAT5 폴리펩티드에 결합할 수 있는 아미노산 모티프를 지칭한다. 단백질:단백질 상호작용을 결정하기 위해 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 회합 모티프가 STAT5에 결합할 수 있는지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 공동 면역침강 후, 웨스턴 블롯.

[0282] 따라서 본 발명은 간 특이적 항원, 바람직하게는 아시알로당단백질 수용체(ASGR)에 결합하는 능력이 있는 CAR을 포함하는 조작된 Treg를 제공하며, 이 CAR은 또한 CAR이 항원에 결합하는 경우에만 Treg에 STAT5-매개 생존촉진 신호를 제공한다. 특히, 항원 인식 후, CAR 클러스터 및 신호는 CAR의 세포내 신호전달 도메인(엔도도메인)을 통해 조작된 Treg로 전달된다. CAR이 STAT5 회합 모티프 및 JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프를 포함하는 엔도도메인을 포함하는 경우, CAR의 클러스터링은 STAT5 및 JAK1 및/또는 JAK2 동원 및 활성화를 유도하고; 따라서 미세환경에서 IL-2의 이용가능성에 의존하지 않고 항원 특이적 방식으로 조작된 Treg의 기능 및 생존을 향상시키는 신호를 제공한다.

[0283] STAT5 신호전달을 갖는 본 발명의 조작된 Treg는 대상체의 일반 T 세포 집단과 비교하여 항원 인식 후 조작된 CAR-Treg에 생존 이점을 제공하는 데 특히 효과적일 수 있다. 특히, 예를 들어 면역억제 약물의 사용이 IL-2의 이용가능성을 감소시키는 이식의 맥락에서, CAR-Treg의 STAT5 신호전달은 그렇지 않으면 불리한 미세환경에서

본 발명의 세포에 추가적인 생존 및 기능적 효과를 제공한다.

[0284] 적합하게는, CAR 엔도도메인은 본 명세서에 정의된 2개 이상의 STAT5 회합 모티프를 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR 엔도도메인은 본 명세서에 정의된 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 초과의 STAT5 회합 모티프를 포함할 수 있다. 바람직하게는, CAR 엔도도메인은 본 명세서에 정의된 2개 또는 3개의 STAT5 회합 모티프를 포함할 수 있다.

[0285] 적합하게는, STAT5 결합 모티프는 막횡단 단백질의 세포질 도메인에 내인성으로 존재할 수 있다. 예를 들어, STAT5 회합 모티프는 인터루킨 수용체(IL) 수용체 엔도도메인 또는 호르몬 수용체로부터 유래할 수 있다.

[0286] CAR 엔도도메인은 STAT5가 다운스트림 구성요소인 인터류킨 수용체의 임의의 사슬로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 예를 들어, IL-2 수용체 β 사슬 (NCBI REFSEQ: NP_000869.1, 서열번호: 111)의 아미노 산가 266 내지 551, IL-7R α 사슬 (NCBI REFSEQ: NP_002176.2, 서열번호: 112)의 아미노 산가 265 내지 459, 말단절단된 IL-7RA 2Y 사슬 (서열번호: 113), IL-9R 사슬 (NCBI REFSEQ: NP_002177.2, 서열번호: 114)의 아미노 산가 292 내지 521, IL-4R α 사슬 (NCBI REFSEQ: NPJD00409.1, 서열번호: 115)의 아미노 산가 257 내지 825, IL-3R β 사슬 (NCBI REFSEQ: NP_000386.1, 서열번호: 116)의 아미노 산가 461 내지 897 또는 IL-17R β 사슬 (NCBI REFSEQ: NP_061195.2, 서열번호: 117)의 아미노 산가 314 내지 502를 포함하는 세포질 도메인이 사용될 수 있다. 인터루킨 수용체 사슬의 세포질 도메인의 전체 영역이 사용될 수 있다.

[0287] 서열번호: 111 - *IL7RB (NP_000869.1의 AA 265 내지 551)*

[0288] NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPY
SEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG
SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPR
EGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

[0289] 서열번호: 112 - *IL7RA (NP_002176.2의 AA 265 내지 459)*

[0290] KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQD
TFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRS
LDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILTSLGSNQEEAY
VTMSSFYQNQ

[0291] 서열번호: 113 - *말단절단된 IL7RA 2Y:*

[0292] KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQD
TFPQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQ

[0293] 서열번호: 114 - *IL9R (NP_002177.2의 AA 292 내지 521)*

[0294] KLSPRVKRIFYQNVPSPAMFFQPLYSVHNGNFQTWMGAHGAGVLLSQDCAGTPQGALEP
CVQEATALLTCGPARPWKSVALEEEQEGPGTRLPGNLSSEDVLPAGCTEWRVQTLAYLPQ

[0295] EDWAPTSLTRPAPPDSEGSRSSSSSSSSNNNNYCALGCYGGWHLSALPGNTQSSGPIPAL
ACGLSCDHQGLETQQGVAWVLAGHCQRPGLHEDLQGMLLPSVLSKARSWTF

[0296] 서열번호: 115 - *IL4RA (NPJD00409.1의 AA 257 내지 825)*

KIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQDAQGSQWEKRSRGQEPAKCPHWKNCLTKLLPCFLEHN
MKRDEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEEEEEV
EEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGFCQQDMGESCLLPPSG
STSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHLEPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPAY
RSFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHLEEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRRNV
LQHGAAAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSSLLASSAVSPE
KCGFGASSGEEGYKPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSPQSSHLPSSSPEHL
GLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLVDSLGSGIVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQTPV
MASPCCGCCCGDRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSKSSSSFHPAP
GNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS

[0297]

[0298] 서열번호: 116 - *IL3RB (NP_000386.1 의 AA 461 내지 897)*

RFCGIYGYRLRRKWEEKIPNPSKSHLFQNGSAELWPPGSMSAFTSGSPPHQGPWGSRFP
ELEGVFPVGFGDSEVSPLTIEDPKHVCDPPSGPDTTPAASDLPTEQPPSPQPGPPAASHTP
EKQASSFDFNGPYLGPPHSRSLPDILGQPEPPQEGGSQKSPPPGSLEYLCLPAGGQVQLV
PLAQAMGPGQAVEVERRPSQGAAGSPSLESGGGPAPPALGPRVGGQDQKDSPVAIPMSS
GDTEDPGVASGYVSSADLVFTPNSGASSVSLVPSLGLPSDQTPSLCPGLASGPPGAPGPV
KSGFEGYVELPPIEGRSPRSPRNNPVPPEAKSPVLNPGERPADVSPTSPQPEGLLVLQQV
GDYCFLPGLGPGPLSLRSKPSSPGPGPEIKNLDQAFQVKKPPGQAVPQVPVIQLFKALKQQ
DYLSLPPWEVNKPGEVC

[0299]

[0300] 서열번호: 117 - *IL17RB (NP_061195.2의 AA 314 내지 502)*

RHERIKKTSFSTTTLLPPIKVLVVYPSEICFHHTICYFTEFLQNHCRSEVILEKWQKKKIAEMG
PVQWLATQKKAADKVVFLLSNDVNSVCDGTCGKSEGSPSENSQDLFPLAFNLFCSDLRSQI
HLHKYVVVYFREIDTKDDYNALSVCPKYHLMKDATAFCAELLHVKQQVSAGKRSQACHDG
CCSL

[0301]

[0302] CAR 엔도도메인은 서열번호: 111-117 중 하나로 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 STAT5 회합 모티프, 또는 서열번호: 111-117 중 하나와 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일한 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 변이체는 서열번호: 111-117 중 하나로서 나타낸 아미노산 서열의 수준의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%로 STAT5에 결합할 수 있다. 변이체는 서열번호: 111-117 중 하나로 나타낸 것과 유사하거나 동일한 수준으로 STAT5에 결합할 수 있거나, 서열번호: 111-117 중 하나로 나타낸 아미노산 서열보다 더 큰 수준 (예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40% 또는 적어도 50%까지 증가됨)으로 STAT5에 결합할 수 있다.

[0303] 예를 들어, STAT5 회합 모티프는 IL2Rβ, IL7Rα, IL-3Rβ (CSF2RB), IL-9R, IL-4Rα, IL-17Rβ, 에리트로포이에틴 수용체, 트롬보포이에틴 수용체, 성장 호르몬 수용체 및 프로락틴 수용체로부터 유래될 수 있다.

[0304] STAT5 결합 모티프는 아미노산 모티프 YXXF/L (서열번호: 118)를 포함할 수 있고; 여기서 X는 임의의 아미노산이다.

[0305] 적합하게는, STAT5 회합 모티프는 아미노산 모티프 YCTF (서열번호: 119), YFFF (서열번호: 120), YLSL (서열번호: 121), 또는 YLSLQ (서열번호: 122)를 포함할 수 있다.

[0306] 적합하게는, STAT5 회합 모티프는 아미노산 모티프 YLSLQ (서열번호: 122)를 포함할 수 있다.

[0307] CAR 엔도도메인은 아미노산 모티프 YCTF (서열번호: 119), YFFF (서열번호: 120), YLSL (서열번호: 121), 및/또는 YLSLQ (서열번호: 122)를 포함하는 하나 이상의 STAT5 회합 모티프를 포함할 수 있다.

[0308] CAR 엔도도메인은 아미노산 모티프 YLSLQ (서열번호: 122)를 포함하는 제1 STAT5 회합 모티프 및 아미노산 모티프 YCTF (서열번호: 119) 또는 YFFF (서열번호: 120)를 포함하는 제2 STAT5 회합 모티프를 포함할 수 있다.

[0309] CAR 엔도도메인은 다음의 STAT5 회합 모티프: YLSLQ (서열번호: 122), YCTF (서열번호: 119) 및 YFFF (서열번호: 120)를 포함할 수 있다.

[0310] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프"는 티로신 키나제 JAK1- 및/또는 JAK2-결합을 허용하는 BOX 모티프를 지칭한다. 적합한 JAK1- 및 JAK2-결합 모티프는 예를 들어 Ferrao & Lupardus(Frontiers in Endocrinology; 2017; 8(71); 이는 참고로 본 명세서에 포함됨)에 기재되어 있다.

[0311] 단백질:단백질 상호작용을 결정하기 위해 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 모티프가 JAK1 및/또는 JAK2에 결합할 수 있는지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 공동 면역침강 후, 웨스턴 블롯.

[0312] JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프는 막횡단 단백질의 세포질 도메인에서 내인성으로 발생할 수 있다.

[0313] 예를 들어, JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프는 IFNLR1, IFNAR, IFNGR1, IL10RA, IL20RA, IL22RA, IFNGR2 또는 IL10RB로부터 유래될 수 있다.

[0314] JAK1-결합 모티프는 서열번호: 123-129로 나타낸 아미노산 모티프 또는 JAK1에 결합할 수 있는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 변이체는 서열번호: 123-129 중 하나로서 나타낸 아미노산 서열의 수준의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%로 JAK1에 결합할 수 있다. 변이체는 서열번호: 123-129 중 하나로 나타낸 것과 유사하거나 동일한 수준으로 JAK1에 결합할 수 있거나, 서열번호: 123-129 중 하나로 나타낸 아미노산 서열보다 더 큰 수준 (예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40% 또는 적어도 50%까지 증가됨)으로 JAK1에 결합할 수 있다.

[0315]

JAK1-결합 모티프 1 (서열번호: 123)	KVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDK
JAK1-결합 모티프 2 (서열번호: 124)	NPWFQRAKMPRALDFSGHTHPVATFQPSRPESVNDLFLCPQKELT
JAK1-결합 모티프 3 (서열번호: 125)	GYICLRNSLPKVLNFHNFLAWPFPNLPPLEAMDMVEVIYINR
JAK1-결합 모티프 4 (서열번호: 126)	PLKEKSIILPKSLISVVRSATLETKPESKYVSLITSYQPFSL
JAK1-결합 모티프 5 (서열번호: 127)	RRRKKLPSVLLFKKPSPFIFISQRPSPETQDTIHPLDEEAFLK
JAK1-결합 모티프 6 (서열번호: 128)	YIHVGKEKHPANLILIYGNEFDKRFFVPAEKIVINFITLNISDDS
JAK1-결합 모티프 7 (서열번호: 129)	RYVTKPPAPPNSLNVQRVLTFQPLRFIQEHVLIPVFDLSGP

[0316] 변이체는 서열번호: 123-129 중 임의의 것과 비교하여 1, 2 또는 3개의 아미노산 차이를 포함할 수 있고 JAK1에 결합하는 능력을 보유할 수 있다.

[0317] 변이체는 서열번호: 123-129 중 임의의 하나와 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0318] 바람직한 구현예에서, JAK1-결합 도메인은 서열 123 또는 JAK1에 결합할 수 있는 그의 변이체를 포함한다.

[0319] JAK2-결합 모티프는 서열번호: 130-132로 나타낸 아미노산 모티프 또는 JAK2에 결합할 수 있는 그의 변이체를

포함할 수 있다. 예를 들어, 변이체는 서열번호: 130-132 중 하나로서 나타낸 아미노산 서열의 수준의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%로 JAK2에 결합할 수 있다. 변이체는 서열번호: 130-132 중 하나로 나타낸 것과 유사하거나 동일한 수준으로 JAK2에 결합할 수 있거나, 서열번호: 130-132 중 하나로 나타낸 아미노산 서열보다 더 큰 수준 (예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40% 또는 적어도 50%까지 증가됨)으로 JAK2에 결합할 수 있다.

JAK2-결합 모티프 1 (서열번호: 130)	NYVFFPSLKPSSSIDEYFSEQPLKNLLLSTSEEQIEKCFIIEN
JAK2-결합 모티프 2 (서열번호: 131)	YWFHTPPSIPLQIEEYLKDPTQPILEALDKDSSPKDDVWDSVSIISFPE
JAK2-결합 모티프 3 (서열번호: 132)	YAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHHNTLLFFSFPLSDENDVFDKLSVIAEDSES

[0320]

[0321] 변이체는 서열번호: 130-132 중 임의의 것과 비교하여 1, 2 또는 3개의 아미노산 차이를 포함할 수 있고 JAK2에 결합하는 능력을 보유할 수 있다.

[0322] 변이체는 서열번호: 130-132 중 임의의 하나와 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0323] 단백질:단백질 상호작용을 결정하기 위해 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 JAK1- 또는 JAK2-결합 모티프가 JAK1 또는 JAK2에 결합할 수 있는지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 공동 면역침강 후, 웨스턴 블롯.

[0324] 적합하게는, 본 명세서에 기재된 CAR의 엔도도메인은 "전사 3의 신호 변환체 및 활성화제"(STAT3) 회합 모티프를 포함하지 않을 수 있다.

[0325] STAT3는 Treg의 안정성과 기능에 해로운 신호로 기재되었다. 예를 들어, STAT3 신호전달은 *IL17, IL21* 및 *IL22*와 같은 염증유발 유전자의 발현을 촉진한다. 이와 같이, STAT3 회합 모티프를 포함하지 않는 CAR의 사용은 본 발명의 조작된 Treg의 맥락에서 특정 이점을 제공한다.

[0326] STAT3 회합 모티프는 아미노산 서열 YXXQ(서열번호: 133)를 포함할 수 있으며, 여기서 "X"는 임의의 아미노산이고 STAT3에 결합할 수 있다. 단백질:단백질 상호작용을 결정하기 위해 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 STAT3 회합 모티프가 STAT3에 결합할 수 있는지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 공동 면역침강 후, 웨스턴 블롯.

[0327] 적합하게는, CAR 엔도도메인은 아미노산 서열 YXXQ(서열번호: 133)를 포함하지 않으며, 여기서 "X"는 임의의 아미노산이다.

[0328] "STAT3 회합 모티프"는 티로신을 포함하고 Treg에 존재하는 경우 STAT3 폴리펩티드에 기능적으로 결합할 수 있는(즉, 활성화를 유도하는) 아미노산 모티프를 지칭할 수 있다.

[0329] 적합하게는, CAR 엔도도메인은 티로신을 포함하고 STAT3 폴리펩티드에 결합할 수 있는 아미노산 모티프를 포함하지 않는다. 예를 들어, 적합하게는 CAR 엔도도메인은 티로신을 포함하고 Treg에 존재할 때 STAT3 폴리펩티드에 기능적으로 결합할 수 있는(즉, 활성화를 유도하는) 아미노산 모티프를 포함하지 않는다.

[0330] 적절하게는, 본 CAR의 엔도도메인은 Treg에서 발현될 때 생산적인 STAT3 및/또는 STAT1 신호전달을 유도할 수 없다. 즉, Treg에서 발현되는 경우, 본 CAR은 기능적으로 결합할 수 없고/거나 STAT3 및/또는 STAT1의 인산화 및 활성화를 유도할 수 없다. 적합하게는, CAR은 Treg에서 발현될 때 STAT3 및/또는 STAT1 의존성 전사 활성화를 유도할 수 없다.

[0331] 적합하게는, CAR 엔도도메인의 IL2Rβ 엔도도메인 부분은 본 명세서에 정의된 STAT3 회합 모티프를 포함하지 않는다.

[0332] 적합하게는, CAR 엔도도메인은 IL2Rβ 엔도도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, CAR 엔도도메인은 서열번호: 134로 나타낸 아미노산 서열; 또는 서열번호: 134에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함할 수

있다.

[0333] *예시적인 IL2Rβ 엔도도메인* (서열번호: 134)

[0334] NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPY
SEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG
SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPR
EGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

[0335] 변이체는 서열번호: 134와 적어도 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0336] 적합하게는, CAR 엔도도메인은 말단절단된 IL2Rβ 엔도도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, CAR 엔도도메인은 서열번호: 135 또는 서열번호: 136로 나타낸 아미노산 서열; 또는 그에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 서열번호: 135 또는 서열번호: 136의 변이체를 포함할 수 있다.

[0337] *말단절단된 예시적인 IL2RB - Y510* (서열번호: 135)

[0338] NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

[0339] *말단절단된 예시적인 IL2RB* - Y510 & Y392 (서열번호: 136)

[0340] NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVP
RDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFR
ALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

[0341] 변이체는 서열번호: 135 또는 서열번호: 136과 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0342] STAT5 활성은 Jak1/2 및 Jak3 둘 다의 트랜스인산화에 의해 증가되는데, 이는 활성이 안정화되기 때문이다. 적합하게는, 본 명세서에 기재된 CAR 엔도도메인은 JAK3 결합 모티프를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "JAK3 결합 모티프"는 티로신 키나제 JAK3을 허용하는 BOX 모티프를 지칭한다. 적합한 JAK3 결합 모티프는 예를 들어 Ferrao & Lupardus(Frontiers in Endocrinology; 2017; 8(71); 이는 참고로 본 명세서에 포함됨)에 기재되어 있다.

[0343] 단백질:단백질 상호작용을 결정하기 위해 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 모티프가 JAK3에 결합할 수 있는지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 공동 면역침강 후, 웨스턴 블롯.

[0344] JAK3 결합 모티프는 막횡단 단백질의 세포질 도메인에서 내인성으로 발생할 수 있다.

[0345] 예를 들어, JAK3 결합 모티프는 IL-2Rɣ 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다.

[0346] JAK3-결합 모티프는 서열번호: 137 또는 138로 나타낸 아미노산 모티프 또는 JAK3에 결합할 수 있는 그의 변이체를 포함할 수 있다.

[0347] *JAK3-결합 모티프 1* (서열번호: 137)

[0348] ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEI

[0349] *JAK3-결합 모티프 2* (서열번호: 138)

[0350] ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGE
GPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET

[0351] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 137 또는 138과 적어도 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0352] 일부 구현예에서 CAR은 STAT5 회합 모티프, JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프, 및 JAK3-결합 모티프를 포함하는

엔도도메인을 포함한다

[0353] 바람직한 구현예에서, CAR 엔도도메인은 하나 이상의 JAK1 결합 도메인 및 하나 이상의 JAK3 결합 도메인을 포함한다.

[0354] 적합하게는, CAR 엔도도메인은 서열번호: 139 또는 서열번호: 139에 대해 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 변이체를 포함할 수 있다.

[0355] *서열번호: 139 (CD28, IL2RG-T52, IL2RB-Y510, 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 예시적인 엔도도메인 서열)*

[0356] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSERTMPRIPTLKNLEDLVTE
YHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQL
SSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQ
DPTHLVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0357] 적합하게는, CAR 엔도도메인은 서열번호: 140 또는 서열번호: 140에 대해 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖는 변이체를 포함할 수 있다.

[0358] 서열번호: 140 (*CD28, IL2RG-T52, IL7RA-2Y, 및 CD3 제타 신호전달 도메인*을 포함하는 예시적인 엔도도메인 서열)

[0359] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSERTMPRIPTLKNLEDLVTE
YHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN
LNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQN
QRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGA
TNFSLLKQAGDVEENPG

[0360] 기타 도메인

[0361] 일부 구현예에서 CAR은 하나 이상의 신호 펩티드를 포함한다.

[0362] CAR은 세포 표면 상에서의 발현을 위해 소포체 경로를 표적으로 하는 리더 서열을 포함할 수 있다. 예시적인 리더 서열은 CD8 리더 (서열번호: 141)이다

[0363] CD8 *리더* (서열번호: 141):

[0364] MALPVTALLLPLALLLHAARP

[0365] 일부 구현예에서 CAR은 선택적으로 자가 절단 또는 절단 도메인과 조합하여 하나 이상의 리포터 도메인을 포함한다.

[0366] 적합한 리포터 도메인은 당업계에 잘 알려져 있으며 GFP와 같은 형광 단백질을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 리포터 도메인의 사용은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터가 성공적으로 도입된(인코딩된 CAR이 발현되도록) Treg가 선택되고 일반적인 방법, 예를 들어 유동 세포측정을 사용하여 출발 세포 집단으로부터 분리되도록 하기 때문에 유리하다.

[0367] 적합하게는, 리포터 도메인은 형광 단백질, 예를 들어 GFP, YFP, RFP, tdTomato, dsRed 또는 이들의 변이체일 수 있다. 일부 구현예에서 형광 단백질은 GFP 또는 GFP 변이체이다. 적합하게는, GFP 변이체는 서열번호: 142로 나타낸 아미노산 서열, 또는 서열번호: 142와 적어도 80% 동일한 변이체를 포함할 수 있다.

[0368] *예시적인 eGFP* (서열번호: 142):

[0369] MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTL
VTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV
NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQ
QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

[0370] 적합하게는, 변이체는 서열번호: 142와 적어도 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다.

[0371] 적합하게는, 리포터 도메인은 루시퍼라제 기반 리포터, PET 리포터 (예를 들어, 요오드화나트륨 동반수송체 (NIS)), 또는 멤브레인 단백질 (예를 들어, CD34, 저친화성 신경 성장 인자 수용체 (LNGFR))일 수 있다.

[0372] CAR 및 리포터 도메인을 인코딩하는 핵산 서열은 별개의 독립체로서 각 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하는 공동-발현 부위에 의해 분리될 수 있다. 적합한 공동-발현 부위는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 내부 리보솜 유입 부위 (IRES) 및 자가 절단 펩티드를 포함한다.

[0373] 따라서, CAR은 자가 절단 또는 절단 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 서열은 단백질 생산 동안 자동 절단되거나 세포에 존재하는 일반적인 효소에 의해 절단될 수 있다. 따라서, 폴리펩티드 서열에 이러한 자가 절단 또는 절단 도메인을 포함시키면 제1 및 제2 폴리펩티드가 단일 폴리펩티드로 발현될 수 있고, 이는 후속적으로 절단되어 별개의 분리된 기능적 폴리펩티드를 제공한다. 적합한 자가 절단 또는 절단 도메인은 P2A 펩티드, T2A 펩티드, E2A 펩티드, F2A 펩티드, 및 퓨린 부위 (서열번호: 143-148)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0374] *P2A 펩티드 - 절단 도메인:* GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호: 143)

[0375] *T2A 펩티드 - 절단 도메인:* GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP (서열번호: 144)

[0376] *E2A 펩티드 - 절단 도메인:* GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (서열번호: 145)

[0377] *F2A 펩티드 - 절단 도메인:* GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (서열번호: 146)

[0378] *퓨린 부위 - 절단 도메인:* RXXR (서열번호: 147) (우선적으로: RRKR (서열번호: 148))

[0379] 예시적인 CAR

[0380] 본 발명에서 사용하기 위한 예시적인 CAR은 하기에 제시되어 있다. CAR은 서열번호: 149-152 또는 167-169 중 하나 이상에 대해 적어도 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는 임의의 이러한 변이체는 서열번호: 149-152 또는 167-169와 비교하여 적어도 부분적인 기능성을 갖는다. 예를 들어, 변이체는 서열번호: 149-152 또는 167-169 중 하나로서 나타낸 아미노산 서열의 기능의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%를 가질 수 있다. 변이체는 서열번호: 149-152 또는 167-169 중 하나와 유사하거나 동일한 수준의 기능성을 가질 수 있거나 서열번호: 149-152 또는 167-169 중 하나로 나타낸 아미노산 서열의 수준보다 더 큰 기능성 (예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40% 또는 적어도 50%까지 증가됨)을 가질 수 있다.

[0381] 서열번호: 149 - *예시적인 CAR 1: CD8 리더, ASGR1 VH, CD8α 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

[0382] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQA
PGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKR
HEHTRFDSWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

[0383]

[0384] 서열번호: 150 - *예시적인 CAR 2: CD8 리더, ASGR1 VH, C-Myc 태그를 갖는 CD28 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQA
PGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKR
HEHTRFDSWGQGTLVTVSSAAAIEVEQKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP
SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

[0385]

[0386] 서열번호: 151 - *예시적인 CAR 3: CD8 리더, ASGR1 VH, CD8α 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질, FP2A 도메인, GFP를 함유하는 CAR*

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQA
PGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKR
HEHTRFDSWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPRRRKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPTRGGGATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDV
NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHD
FFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN
YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSK
LSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

[0387]

[0388] 서열번호: 152 - *예시적인 CAR 4: CD8 리더, ASGR1 VH, CD8α 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질, FP2A 도메인, GFP를 함유하는 CAR*

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQA
PGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKR
HEHTRFDSWGQGTLVTVSSAAAIEVEQKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP
SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP

[0389]

RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPRRRKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPTRGGGATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDV
NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHD
FFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN
YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSK
LSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

[0390]

[0391] 서열번호: 167 - *예시적인 CAR 5: CD8 리더, ASGR1 VH (VH1, 서열번호:74), 링커, ASGR1 VL (VK1, 서열번호:78), C-Myc 태그를 갖는 CD28 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEW
VSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKRHEHTRFDSWGQGTL
VTVSSLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGK
APKLLIGPGSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFVTYYCQQAYAWPPTFGQGTKVEIKRAA
AIEVEQKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII
FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

[0392]

[0393] 서열번호: 168 - *예시적인 CAR 6: CD8 리더, ASGR1 VH (VH2, 서열번호:75), 링커, ASGR1 VL (VK2, 서열번호:79), C-Myc 태그를 갖는 CD28 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

MALPVTALLLPLALLLHAARPELQLLEFGGGLVQPGGSLRLSCTTSGFTFSRYTMGWVRQAPGKGLEW
VSAIGPPGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWVMLRGRFDYWGQGTLV
TVSSLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQKPGKA
PKHLIGPGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYQLPVTFGQGTKVEIKRAAA
IEVEQKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF
WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

[0394]

[0395] 서열번호: 169 - *예시적인 CAR 7: CD8 리더, ASGR1 VH (VH3, 서열번호:76), 링커, ASGR1 VL (VK3, 서열번호:80), C-Myc 태그를 갖는 CD28 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEDYGMGWVRQAPGKGLEW
VSAIGRNGSQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLRRGRGLNTFTLDYWGQ

[0396]

GTLVTVSSLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIGRWLLWYQQK
PGKAPKLLIGPGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIGSLQPEDFATYYCQQAYSLPPTFGQGTKVEIK
RAAAIEVEQKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA
FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0397]

[0398] 변이체, 유도체 및 단편

[0399] 본 명세서에 언급된 특정 단백질, 펩티드 및 뉴클레오티드에 추가하여, 본 발명은 또한 그의 유도체, 변이체 및 단편의 사용을 포괄한다.

[0400] 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드와 관련하여 본원에 사용된 용어 "유도체"는 생성된 단백질 또는 폴리펩티드가 목적하는 기능을 보유하는 것을 제공하는 서열로부터의 또는 서열에 대한 1개 (또는 그 초과)의 아미노산 잔기의 임의의 치환, 변이, 변형, 대체, 결실 및/또는 첨가 (예를 들어, 유도체 또는 변이체가 항원 결합 도메인인 경우에, 목적하는 기능은 항원 결합 도메인이 그의 표적 항원에 결합하는 능력일 수 있거나, 또는 유도체 또는 변이체는 신호전달 도메인인 경우에는, 목적하는 기능이 그 도메인이 신호전달하는 능력 (예컨대, 하류 분자를 활성화 또는 불활성화시킴)일 수 있음)을 포함한다. 변이체 또는 유도체는 상응하는 참조 서열과 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%의 기능; 상응하는 참조 서열과 비교하여 유사한 또는 동일한 수준의 기능; 또는 상응하는 참조 서열과 비교하여 증가된 수준의 기능, 예를 들어 비변형된 서열과 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%까지 증가된 기능을 가질 수 있다.

[0401] 전형적으로, 아미노산 치환은 예를 들어 1, 2 또는 3 내지 10 또는 20개의 치환으로부터 이루어질 수 있고, 단, 변형된 서열은 필요한 활성 또는 능력, 예를 들어 상응하는 참조 서열과 비교하여 예를 들어 적어도 10%, 적어

도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%의 활성; 상응하는 참조 서열과 비교하여 유사한 또는 동일한 수준의 활성; 또는 상응하는 참조 서열과 비교하여 증가된 수준의 활성, 예를 들어 비변형된 서열과 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%까지 증가된 활성을 보유한다. 아미노산 치환은 비-자연 발생 유사체의 사용을 포함할 수 있다.

[0402] 본 발명에 사용된 단백질 또는 펩티드는 또한 침묵 변화를 생성하고 기능적으로 동등한 단백질을 생성하는 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 가질 수 있다. 의도적인 아미노산 치환은 내인성 기능이 유지되는 한 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 성질의 유사성을 기반으로 할 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하고; 양으로 하전된 아미노산은 라이신 및 아르기닌을 포함하고; 그리고 유사한 친수성 값을 갖는 전하를 띠지 않는 극성 헤드 그룹을 갖는 아미노산은 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함한다.

[0403] 예를 들어 아래 표에 따라 보존적 치환이 이루어질 수 있다. 두 번째 컬럼의 동일한 블록, 바람직하게는 세 번째 컬럼의 동일한 라인에 있는 아미노산은 서로 치환될 수 있다:

지방족	무극성	GAP
		ILV
	극성-비전하	CSTM
		NQ
	극성-전하	DE
		KRH
방향족		FWY

[0404]

[0405] 유도체는 동족체 또는 변이체일 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "상동체" 또는 "변이체"는 야생형 아미노산 서열 및 야생형 뉴클레오티드 서열과 특정 상동성을 갖는 독립체를 의미한다. "상동성"이라는 용어는 "동일성"과 동일시될 수 있다.

[0406] 상동체 또는 변이체 서열은 대상 서열과 적어도 50%, 55%, 65%, 75%, 85% 또는 90% 동일한, 바람직하게는 적어도 95% 또는 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로 상동체는 유사한 화학적 특성/기능을 가지며, 예를 들어 대상 아미노산 서열 또는 대상 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열과 동일한 결합 부위 등을 포함한다. 상동성은 또한 유사성(즉, 유사한 화학적 특성/기능을 갖는 아미노산 잔기)의 관점에서 고려될 수 있지만, 본 발명의 맥락에서, 상동성을 서열 동일성 관점에서 표현하는 것이 바람직하다.

[0407] 상동성 비교는 눈으로 수행하거나 보다 일반적으로 쉽게 사용할 수 있는 서열 비교 프로그램을 사용하여 수행할 수 있다. 이러한 상업적으로 이용 가능한 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성 또는 동일성 백분율을 계산할 수 있다.

[0408] 상동성 백분율은 인접 서열에 대해 계산될 수 있고, 즉, 한 서열이 다른 서열과 정렬되고 한 서열의 각 아미노산이 한 번에 한 잔기씩 다른 서열의 상응하는 아미노산과 직접 비교된다. 이것을 "언갭핑(unapped)" 정렬이라고 한다. 일반적으로 이러한 언갭핑 정렬은 상대적으로 적은 수의 잔기에 대해서만 수행된다.

[0409] 이는 매우 간단하고 일관된 방법이지만, 예를 들어, 달리 동일한 서열 쌍에서, 뉴클레오티드 서열에서의 하나의 삽입 또는 결실이 하기 코돈을 정렬에서 벗어나게 할 수 있고, 이에 따라 글로벌 정렬이 수행될 때 잠재적으로 퍼센트 상동성의 큰 감소를 초래할 수 있다는 것을 고려할 수 없다. 결과적으로, 대부분의 서열 비교 방법은 전체 상동성 점수에 부당한 불이익을 주지 않으면서 가능한 삽입 및 삭제를 고려하는 최적의 정렬을 생성하도록 설계되었다. 이는 국소 상동성을 최대화하기 위해 서열 정렬에 "갭"을 삽입함으로써 달성된다.

[0410] 그러나, 이들 보다 복잡한 방법은 정렬에서 발생하는 각각의 갭에 "갭 페널티"를 할당하여, 동일한 수의 동일한

아미노산에 대해, 2개의 비교된 서열 사이의 보다 높은 관련성을 반영하는 가능한 한 적은 갭을 갖는 서열 정렬이 많은 갭을 갖는 것보다 더 높은 점수를 달성할 것이다. "아핀 갭 비용"은 일반적으로 갭의 존재에 대해 상대적으로 높은 비용을 부과하고 갭의 각 후속 잔류물에 대해 더 작은 패널티를 부과하는 데 사용된다. 이것은 가장 일반적으로 사용되는 갭 스코어링 시스템이다. 높은 갭 패널티는 물론 더 적은 갭으로 최적화된 정렬을 생성한다. 대부분의 정렬 프로그램은 갭 패널티를 수정할 수 있다. 그러나 이러한 소프트웨어를 서열 비교에 사용할 때는 디폴트 값을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어 GCG Wisconsin Bestfit 패키지를 사용할 때 아미노산 서열에 대한 디폴트 갭 패널티는 갭에 대해 -12이고 각 확장에 대해 -4이다.

[0411] 따라서 최대 백분율 상동성을 계산하려면 먼저 갭 페널티를 고려하여 최적의 정렬을 생성해야 한다. 이러한 정렬을 수행하기 위한 적절한 컴퓨터 프로그램은 GCG Wisconsin Bestfit 패키지 (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux 등 (1984) Nucleic Acids Res. 12: 387)이다. 서열 비교를 수행할 수 있는 다른 소프트웨어의 예는 비교 도구의 BLAST 패키지(Ausubel 등(1999) 상기 참조 - Ch. 18 참조), FASTA(Atschul 등(1990) J. Mol. Biol 403-410) 및 GENEWORKS 스위트를 포함하지만 이제 제한되지 않는다. BLAST 및 FASTA 모두 오프라인 및 온라인 검색에 사용할 수 있다(Ausubel 등(1999) ibid, 페이지 7-58에서 7-60 참조). 그러나 일부 응용 프로그램의 경우 GCG Bestfit 프로그램을 사용하는 것이 바람직하다. BLAST 2 서열라고 하는 또 다른 도구는 또한 단백질 및 뉴클레오티드 서열을 비교하는 데 사용할 수 있다(FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174: 247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177: 187-8 참조).

[0412] 최종 백분율 상동성은 동일성의 관점에서 측정할 수 있지만 정렬 프로세스 자체는 일반적으로 모두 또는 전무 쌍 비교를 기반으로 하지 않는다. 대신, 화학적 유사성 또는 진화적 거리를 기반으로 각 쌍별 비교에 점수를 할당하는 척도화된 유사성 점수 매트릭스가 일반적으로 사용된다. 통상적으로 사용되는 이러한 매트릭스의 예는 BLAST 프로그램 스위트에 대한 디폴트 매트릭스인 BLOSUM62 매트릭스이다. GCG 위스콘신 프로그램은 일반적으로 공공 디폴트 값 또는 공급된 경우 맞춤 기호 비교 표를 사용한다 (추가의 상세한 설명을 위해 사용자 매뉴얼 참조). 일부 적용에 있어서, GCG 패키지에 대한 공공 디폴트 값, 또는 다른 소프트웨어의 경우, BLOSUM62와 같은 디폴트 매트릭스를 사용하는 것이 바람직하다. 적절하게, 백분율 동일성은 참조 및/또는 쿼리 서열 전체에 걸쳐 결정된다.

[0413] 소프트웨어가 최적의 정렬을 생성하면 상동성 백분율, 바람직하게는 서열 동일성 백분율을 계산할 수 있다. 소프트웨어는 일반적으로 서열 비교의 일부로 이 작업을 수행하고 수치 결과를 생성한다.

[0414] "단편"은 일반적으로 기능적으로 관심이 있는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 선택된 영역을 지칭한다. 따라서 "단편"은 전장 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 일부인 아미노산 또는 핵산 서열을 지칭한다.

[0415] 이러한 유도체, 변이체 및 단편은 부위 지정 돌연변이유발과 같은 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 삽입이 이루어져야 하는 경우, 삽입 부위의 어느 한 쪽의 자연 발생 서열에 상응하는 5' 및 3' 측접 영역과 함께 삽입을 인코딩하는 합성 DNA가 만들어질 수 있다. 측접 영역은 자연 발생 서열의 부위에 상응하는 편리한 제한 부위를 포함하여 서열이 적절한 효소(들) 및 절단에 결찰된 합성 DNA로 절단될 수 있다. 그 다음, DNA는 인코딩된 단백질을 만들기 위해 본 발명에 따라 발현된다. 이들 방법은 DNA 서열의 조작을 위해 당업계에 공지된 수많은 표준 기술의 예시일 뿐이고 다른 공지된 기술도 사용될 수 있다.

[0416] **약제학적 조성물**

[0417] 또한, 본 발명의 조작된 Treg, 또는 CAR을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0418] 약제학적 조성물은 치료적 유효량의 약제학적 활성화제, 즉 Treg를 포함하거나 이로 구성된 조성물이다. 이는 바람직하게는 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제(이들의 조합 포함)를 포함한다.

[0419] "약제학적으로 허용 가능한"은 제형이 멸균되고 발열원이 없는 것을 포함한다. 담체, 희석제 및/또는 부형제는 Treg와 양립할 수 있고 그 수령체에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용 가능한"이어야 한다. 전형적으로, 담체, 희석제 및 부형제는 멸균되고 발열원이 없는 염수 또는 주입 배지일 것이지만, 다른 허용가능한 담체, 희석제 및 부형제가 사용될 수 있다.

[0420] 치료적 용도를 위한 허용 가능한 담체, 희석제 및 부형제는 약학 분야에 잘 알려져 있다. 약제학적 담체, 부형제 또는 희석제의 선택은 의도된 투여 경로 및 표준 약제학적 실시와 관련하여 선택될 수 있다. 약제학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제로서 또는 그것 외에 임의의 적합한 결합제(들), 윤활제(들), 현탁화제(들), 코팅제(들) 또는 가용화제(들)을 포함할 수 있다.

[0421] 약학적으로 허용 가능한 담체의 예는 예를 들어, 물, 염 용액, 알코올, 실리콘, 왁스, 바셀린, 식물성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 리포솜, 당, 젤라틴, 락토스, 아밀로스, 스테아르산마그네슘, 탈크, 계면활성제, 규산, 점성 파라핀, 방향 오일, 지방산 모노글리세라이드 및 디글리세라이드, 펫트로에트랄 지방산 에스테르, 하이드록시메틸-셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 등을 포함한다.

[0422] 본 발명에 따른 Treg 또는 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 질환을 치료 및/또는 예방하기에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여의 수량과 빈도는 대상체의 상태, 대상체의 질환의 유형 및 중증도와 같은 요인에 의해 결정되지만 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있다. 이에 따라 약제학적 조성물이 제형화될 수 있다.

[0423] 본 명세서에 기재된 Treg 또는 약제학적 조성물은 비경구적으로, 예를 들어 정맥내로 투여될 수 있거나, 주입 기술에 의해 투여될 수 있다. Treg 또는 약제학적 조성물은 다른 물질, 예를 들어 용액을 혈액과 등장성으로 만들기에 충분한 염 또는 포도당을 함유할 수 있는 멸균 수용액의 형태로 투여될 수 있다. 수용액은 적절하게 완충될 수 있다(바람직하게는 pH 3 내지 9). 이에 따라 약제학적 조성물이 제형화될 수 있다. 멸균 조건 하에 적합한 비경구 제형의 제조는 당업자에게 잘 알려진 표준 약제학적 기술에 의해 용이하게 달성된다.

[0424] 약제학적 조성물은 주입 매질, 예를 들어 멸균 등장 용액에 본 발명의 Treg를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 앰플, 일회용 주사기 또는 다중 용량 바이알에 봉입될 수 있다.

[0425] Treg 또는 약제학적 조성물은 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 특히, Treg 또는 약제학적 조성물은 단일 하나의 오프 용량으로 투여될 수 있다. 이에 따라 약제학적 조성물이 제형화될 수 있다.

[0426] 질환 및 치료될 대상체, 뿐만 아니라 투여 경로에 따라, Treg 또는 약제학적 조성물은 다양한 용량으로 투여될 수 있다(예를 들어, 세포/kg 또는 세포/대상체로 측정됨). 어떤 경우에도 의사는 개별 대상체에게 가장 적합한 실제 복용량을 결정할 것이며 특정 대상체의 연령, 체중 및 반응에 따라 달라질 것이다. 그러나, 일반적으로, 본 발명의 Treg의 경우, 대상체당 $5x10^7$ 내지 $3x10^9$ 세포, 또는 10^8 내지 $2x10^9$ 세포의 용량이 투여될 수 있다.

[0427] Treg는 약제학적 조성물에 사용하기 위해 적절하게 변형될 수 있다. 예를 들어, Treg는 대상체에 주입되기 전에 적절한 시간에 동결보존 및 해동될 수 있다.

[0428] 약제학적 조성물은 하나 이상의 다른 치료제, 예컨대 림프 고갈 제제 (예를 들어, 티모 글로불린, 캄파쓰-1H, 항-CD2 항체, 항-CD3 항체, 항-CD20 항체, 사이클로포스파미드, 플루다라빈), mTOR의 억제제 (예를 들어, 시롤리무스, 에버롤리무스), 공동자극 경로를 억제하는 약물 (예를 들어, 항-CD40/CD40L, CTAL4Ig), 및/또는 특정 사이토카인을 억제하는 약물 (IL-6, IL-17, TNFalpha, IL18)을 추가로 포함할 수 있다.

[0429] 본 발명은 본 발명의 Treg 및/또는 약제학적 조성물을 포함하는 키트의 용도를 추가로 포함한다. 바람직하게는 상기 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법 및 용도, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료 방법에 사용하기 위한 것이다. 바람직하게는 상기 키트는 키트 구성요소의 사용 설명서를 포함한다.

[0430] **질환의 치료 및/또는 예방 방법**

[0431] 조작된 Treg는 질환과 연관된 적어도 하나의 증상을 경감, 감소 또는 개선하기 위해 및/또는 질환의 진행을 늦추거나, 감소시키거나 차단하기 위해 기존의 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여될 수 있다.

[0432] 예를 들어, 조작된 Treg는 간 질환의 적어도 하나의 증상, 예컨대 황달, 진한 소변, 가려움, 복부 팽윤 또는 압통, 피로, 메스꺼움 또는 구토, 및/또는 식욕 상실을 줄이고, 감소시키거나 개선하기 위해 간 질환 (예를 들어, 간 이식 거부, 간 GvHD, 자가면역 간 질환, 간 염증, 간부전)이 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 적어도 하나의 증상은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%까지 줄이거나, 감소되거나 개선될 수 있거나, 적어도 하나의 증상이 완전히 완화될 수 있다.

[0433] 조작된 Treg는 간 질환 (예를 들어, 간 이식 거부, 간 GvHD, 자가면역 간 질환, 간 염증, 간부전)이 있는 대상체에게 투여하여 간 질환의 진행을 늦추거나 감소시키거나 차단할 수 있다. 질환의 진행은 조작된 Treg가 투여되지 않은 대상체에 비해 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%까지 느려지거나, 감소되거나, 차단될 수 있거나, 질환의 진행이 완전히 중단될 수 있다.

[0434] 대안적으로, 조작된 Treg는 질환을 예방하거나 질환과 연관된 적어도 하나의 증상의 발생을 감소시키거나 예방하기 위해, 아직 질환에 걸리지 않은 및/또는 질환의 임의의 증상을 나타내지 않는 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체는 질환에 대한 소인은 있거나 발병 위험이 있을 수 있다.

[0435] 예를 들어, 조작된 Treg는 간 질환의 적어도 하나의 증상, 예컨대 황달, 진한 소변, 가려움, 복부 팽윤 또는 압통, 피로, 메스꺼움 또는 구토, 및/또는 식욕 상실을, 감소시키거나 예방하기 위해 아직 질환에 걸리지 않았고/거나 간 질환 (예를 들어, 간 이식 거부, 간 GvHD, 자가면역 간 질환, 간 염증, 간부전)의 임의의 증상을 나타내지 않은 대상체에게 투여될 수 있다. 적어도 하나의 증상은 조작된 Treg가 투여되지 않은 대상체에 비해 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 감소될 수 있거나, 적어도 하나의 증상이 완전히 예방될 수 있다.

[0436] 조작된 Treg는 간 질환을 예방하기 위해 아직 질환에 걸리지 않았고/거나 간 질환 (예를 들어, 간 이식 거부, 간 GvHD, 자가면역 간 질환, 간 염증, 간부전)의 임의의 증상을 나타내지 않은 대상체에게 투여될 수 있다. 간 질환은 조작된 Treg가 투여되지 않은 대상체에 비해 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%까지 손상될 수 있거나, 또는 간 질환이 완전히 예방될 수 있다.

[0437] 간 질환은 간 이식 거부, 간 GvHD, 자가면역 간 질환, 간 염증 및 간부전과 같은 병태를 포함하고, 특히 간 손상 또는 파괴를 초래할 수 있는 대상체에서 바람직하지 않은 증가된 면역 반응과 연관된 간 질환을 포함한다. 특정 구현예에서, 간 질환은 예를 들어 간암을 포함하지 않을 수 있고, 보다 구체적으로 간세포 암종(HCC)을 포함하지 않을 수 있다. 따라서 간 질환은 바람직하게는 특히 간 또는 그 근처에서 면역 반응의 감소(예를 들어, 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90% 감소)에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 병태를 포함한다.

[0438] 적합하게는, 본 발명의 치료 방법은 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물 중의) 본 발명에 따르거나, 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한(예를 들어, 수득된) 조작된 Treg, 또는 명세서에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0439] 적절하게는, 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 본 방법은 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물 중의) 본 발명에 따른 조작된 Treg를 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0440] 이 방법은 다음 단계를 수반할 수 있다:

[0441] (i) 세포 함유 샘플을 단리하거나 세포 함유 샘플을 제공하는 단계;

[0442] (ii) 본 명세서에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 도입하는 단계; 및

[0443] (iii) (ii)로부터의 세포를 대상체에게 투여하는 단계.

[0444] 적합하게는, 세포는 본 명세서에 정의된 Treg이다.

[0445] 적합하게는, 농축된 Treg 집단은 방법의 단계 (ii) 이전 및/또는 이후에 세포 함유 샘플로부터 단리 및/또는 생성될 수 있다. 예를 들어, 단리 및/또는 생성은 농축된 Treg 샘플을 단리 및/또는 생성하기 위해 단계 (ii) 이전 및/또는 이후에 수행될 수 있다. 농축은 본 발명의 CAR, 폴리뉴클레오티드, 및/또는 벡터를 포함하는 세포 및/또는 Treg를 농축하기 위해 단계 (ii) 후에 수행될 수 있다.

[0446] 적합하게는, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 형질도입 및/또는 형질감염에 의해 도입될 수 있다.

[0447] 적합하게는, 세포는 자가 및/또는 동종이형일 수 있다.

[0448] 적합하게는, 조작된 Treg는 하나 이상의 다른 치료제, 예컨대 림프 고갈 제제 (예를 들어, 티모 글로불린, 캄파쓰-1H, 항-CD2 항체, 항-CD3 항체, 항-CD20 항체, 사이클로포스파미드, 플루다라빈), mTOR의 억제제 (예를 들어, 시롤리무스, 에버롤리무스), 공동자극 경로를 억제하는 약물 (예를 들어, 항-CD40/CD40L, CTAL4Ig), 및/또는 특정 사이토카인을 억제하는 약물 (IL-6, IL-17, TNFalpha, IL18)와 조합하여 투여될 수 있다. 조작된 Treg는 하나 이상의 다른 치료제와 동시에 또는 순차적으로(즉, 이전 또는 이후에) 투여될 수 있다.

[0449] 간 이식

[0450] 간 이식은 현재 말기 간 질환 환자에게 사용할 수 있는 유일한 치유적 치료 옵션이다. 최근 면역억제제의 발전에도 불구하고 급성 동종이식 거부반응은 간 이식의 흔한 합병증으로 남아 있으며, 발생률은 간 이식의 20~40%이다. 대부분의 경우 거부반응은 간 이식 후 첫 달 이내에 발생한다. 초기 거부 에피소드는 장기 이식 성공 또는 환자 결과를 크게 손상시키지 않는다. 대조적으로, 늦은 발병 동종이식 거부(간 이식 후 >3-6개월)는 불량한 이식 생존과 관련이 있다(Dogan, N., 등, 2018. Journal of International Medical Research, 46(9), pp.3979-3990).

[0451] 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물 또는 조작된 Treg을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 이식에 대

한 내성을 유도하는 방법을 제공한다. 적합하게는, 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0452] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "간 이식에 대한 내성을 유도하는"은 수령체에서 이식된 간에 대한 내성을 유도하는 것을 지칭한다. 즉, 간 이식에 대한 내성을 유도한다는 것은 공여체 이식 장기에 대한 수령체의 면역 반응 수준을 낮추는 것을 의미한다. 이식된 간에 대한 내성을 유도하면 거부 반응의 발생률이 감소하거나 이식 환자에게 필요한 면역억제 약물의 양을 줄이거나 면역억제 약물의 중단을 가능하게 할 수 있다.

[0453] 본 발명은 또한 본 발명의 약제학적 조성물 또는 조작된 Treg을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 이식 거부를 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 적합하게는, 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 적절하게는, 간 이식 거부를 치료 및/또는 예방하는 것은 간 이식 수령체가 필요로 하는 면역억제 약물의 양을 줄이는 것을 의미할 수 있거나 면역억제 약물의 중단을 가능하게 할 수 있다.

[0454] 한 구현예에서, 대상체는 면역억제 요법을 받고 있는 간 이식 수령체이다.

[0455] 한 구현예에서, 본 발명은 바람직하게는 간 이식에 대한 내성을 유도하거나 간 이식 거부를 치료 및/또는 예방하는 것에 추가하여 간 조직 복구 및/또는 간 재생을 촉진한다.

[0456] 이식편대숙주 질환

[0457] 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물 또는 조작된 Treg을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 이식편대숙주 질환(GvHD)의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다. 대상체는 간 이식 수령체일 수 있다. 적합하게는, 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0458] GvHD는 유전적으로 다른 사람에게서 이식된 조직을 받은 후 발생하는 일반적인 합병증이다. GvHD는 일반적으로 골수 이식에서 발생하는 것과 같은 줄기 세포 이식과 관련이 있다. GvHD는 간 이식과 같은 다른 형태의 이식 조직에도 적용된다. 기증된 조직(이식편) 내에 남아 있는 공여체의 면역 체계의 백혈구는 수령체(숙주)를 외래(비자기)로 인식한다. 이식된 조직 내에 존재하는 백혈구는 수령체의 신체 세포를 공격하여 GvHD를 유발한다. 고전적 의미에서 급성 이식편대숙주병은 간, 피부, 점막 및 위장관에 대한 선택적 손상이 특징이다. 따라서, 대상체는 간 손상, 즉 간 GvHD를 가질 수 있다.

[0459] 일부 구현예에서 대상체는 이식이 간, 신장, 심장, 폐, 췌장, 장, 위, 골수, 혈관화된 복합 조직 이식편 및 피부 이식으로부터 선택되는 이식 수령체이다. 바람직하게는 대상체는 간 이식 수령체이다.

[0460] 한 구현예에서, 대상체는 면역억제 요법을 받고 있는 간 이식 수령체이다.

[0461] 한 구현예에서, 본 발명은 간 GvHD를 치료 및/또는 예방하는 것에 추가하여 간 조직 복구 및/또는 간 재생을 촉진한다.

[0462] 자가면역 간 질환

[0463] 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물 또는 조작된 Treg을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역 간 질환의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다. 적합하게는, 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0464] 적합하게는, 자가면역 간 질환은 만성 자가면역 간 질환이다.

[0465] 자가면역 간 질환은 자가면역 간염, 원발성 담즙성 담관염 및/또는 (원발성) 경화성 담관염 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다. 자가면역 간 질환은 중복되는 특징을 가질 수 있는 만성의 천천히 진행하는 염증성 간 질환이다(Decock, S., McGee, P. and Hirschfield, G.M., 2009. Bmj, 339, p.b3305).

[0466] 자가면역 간염은 일반적으로 재발성 면역 매개 간염이다. 환자는 임상적으로 증상이 있는 경우 관절통과 피로를 나타내고 환자의 1/3은 간경변을 나타낸다. 증가된 간 효소(아미노전이효소)는 초기 실험실 비정상의 특징을 나타낸다(Decock, S., McGee, P. 및 Hirschfield, G.M., 2009. Bmj, 339, p.b3305). 자가면역 간염은 또한 치료하지 않고 방치할 경우 간부전 및 사망으로 이어지는 급성 질환으로 나타날 수 있다.

[0467] 원발성 담즙성 담관염은 천천히 진행되는 만성 담즙정체 질환이며 소관 육아종성 담관염과 생화학적 담즙정체(상승된 알칼리성 인산분해효소)가 특징이다. 현재 원발성 담즙성 담관염으로 진단된 환자의 60%는 증상이 없으며 대부분이 비간경변성 질환이다. 증상이 있을 때 피로, 소양감, 우상복부 불편감이 흔하지만 질환의 중증도를 나타내지는 않는다. 그러나 증상이 없는 경우에도 원발성 담즙성 담관염 환자는 일반적인 집단에 비해 장기간 생존이 현저히 감소한다(Decock, S., McGee, P. and Hirschfield, G.M., 2009. Bmj, 339, p.b3305).

[0468] 원발성 경화성 담관염은 간내 및/또는 간외 담도계의 섬유화 염증성 파괴를 특징으로 하는 만성 담즙정체성 간

질환이다. 현재 원발성 경화성 담관염에 대한 치료법은 없다. 일단 증상이 나타나면 10년 동안 이식이 필요할 확률이 약 50%이고 담관암종이 발생할 위험이 10%이다. (Decock, S., McGee, P. 및 Hirschfield, G.M., 2009. Bmj, 339, p.b3305).

[0469] 한 구현예에서, 본 발명은 자가면역 간 질환을 치료 및/또는 예방하는 것에 추가하여 간 조직 복구 및/또는 간 재생을 촉진한다.

[0470] 간 염증

[0471] 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물 또는 조작된 Treg을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 간 장애의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다. 적합하게는, 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0472] 간 조직의 염증은 간염이라고도 한다. 간염은 급성 또는 만성일 수 있다. 급성 간염은 때때로 저절로 해결되거나 만성 간염으로 진행되거나 드물게 급성 간부전으로 이어질 수 있다. 시간이 지남에 따라 만성 형태는 간 흉터(간경변), 만성 간부전 및/또는 간암으로 진행될 수 있다. 간경변의 징후 및 증상은 황달, 복수(복강 내 체액 축적), 피로 및 간성 뇌병증(간부전으로 인한 뇌 기능 장애)을 포함한다.

[0473] 간염의 원인은 다음의 주요 카테고리: 감염성, 대사성, 알코올성, 허혈성, 자가면역성, 유전성으로 나눌 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서 간염은 감염성 간염, 대사 간염, 알코올성 간염, 허혈성 간염, 자가면역 간염, 및 유전적 간염으로부터 선택된다.

[0474] 감염성 간염은 바이러스성 간염, 기생충성 간염, 세균성 간염을 포함한다.

[0475] 바이러스성 간염은 바이러스 감염으로 인한 간 염증이다. 비교적 빠르게 발병하는 최근의 감염으로 급성 형태로 나타나거나 만성 형태로 나타날 수 있다. 바이러스성 간염의 가장 흔한 원인은 5가지 관련 없는 간친화성 바이러스 A, B, C, D, E형 간염이다. 다른 바이러스는 또한 사이토메갈로바이러스, 엡슈타인-바르 바이러스, 및 황열병을 포함하여 간 염증을 유발할 수 있다. 또한 단순 헤르페스 바이러스로 인한 바이러스성 간염 사례가 많이 기록되어 있다.

[0476] 기생충성 간염은 기생충성 감염으로 인한 간 염증이다. 원생동물 중에서 트라이파노소마 크루지, 라이쉬마니아 종, 및 말라리아 유발 열원충 종은 모두 간 염증을 유발할 수 있다. 벌레 중 개 촌충은 간에 감염되어 특징적인 간 포충 낭포를 형성한다. 간 흡충 파스시올라 헤파티카(Fasciola hepatica) 및 클로노르키스 시넨시스(Clonorchis sinensis)는 담관에 서식하며 진행성 간염 및 간 섬유증을 유발한다.

[0477] 박테리아 간염은 박테리아 감염으로 인한 간 염증이다. 급성 간염은 나이세리아 메닌기티디스, 나이세리아 고노르호아에, 바르토넬라 헨셀라에, 보렐리아 버그도르페리, 살모넬라 종, 브루셀라 종 및 캄필로박터 종에 의해 발생한다. 만성 또는 육아종성 간염은 마이코박테리아 종, 트로페리마 위플레이, 트레포네마 팔리둠, 콕시엘라 부르네티이, 및 리케차 종으로부터의 감염으로 볼 수 있다.

[0478] 알코올성 간염은 과도한 알코올 섭취로 인해 간에 염증이 생기는 질환이다. 알코올성 간염은 간경변, 간부전 및/또는 암, 또는 급성 발현으로 이어질 수 있는 만성 경과를 가질 수 있다. 급성 알코올성 간염의 중증 사례는 50%가 3개월 사망율이다. 약물, 산업 독소, 약초 및 식이 보조제를 포함한 많은 화학 물질도 독성 간염을 유발할 수 있다.

[0479] 대사성 간염의 가장 흔한 형태인 비알코올성 지방간염은 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)의 범위 내에 있다. 비알코올성 지방간 질환은 알코올 사용 이력이 거의 또는 전혀 없는 사람들에게 발생하며 대신 대사 증후군, 비만, 인슐린 내성 및 당뇨병, 및 고중성지질혈증과 강하게 연관된다. 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간염을 유발할 수 있다. 지방간염은 간에 염증이 생기는 지방간 질환의 일종으로 간에 지방이 동시에 축적되어 간경변, 간부전 및/또는 간암을 유발할 수 있다.

[0480] 허혈성 간염 또는 쇼크 간으로도 알려진 허혈성 간염은 간으로의 불충분한 혈류(결과적으로 불충분한 산소 전달)로 인한 급성 간 손상으로 정의되는 상태이다.

[0481] 간염의 유전적 원인에는 알파-1-항트립신 결핍, 혈색소 침착증, 윌슨병 등이 있다.

[0482] 일부 구현예에서 간 염증은 확인가능한 원인은 없다.

[0483] 한 구현예에서, 본 발명은 염증성 간 장애을 치료 및/또는 예방하는 것에 추가하여 간 조직 복구 및/또는 간 재생을 촉진한다.

[0484] 간 복구 또는 재생

[0485] 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물 또는 조작된 Treg을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 조직 복구 및/또는 간 재생을 촉진하는 방법을 제공한다. 적합하게는, 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 대상체는 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전을 가질 수 있다.

[0486] 여기에 사용된 "간 재생"은 반흔을 남기지 않고 손상(예를 들어, 급성 손상) 후 간 구조 및 기능의 재생을 의미할 수 있다(Cordero-Espinoza, L. and Huch, M., 2018. The Journal of clinical investigation, 128(1), pp.85-96). 예를 들어, 간 재생은 원래 간 질량의 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%의 회복을 초래할 수 있다. 본 발명의 방법은 최대 간 질량이 달성될 때까지의 시간을 감소시킬 수 있으며, 예를 들어 시간은 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%만큼 감소될 수 있다.

[0487] 여기에 사용된 "간 조직 복구"는 흉터(즉, 섬유증)가 있는 손상(예를 들어, 만성 손상) 후 간 구조 및 기능의 재생을 의미할 수 있다(Cordero-Espinoza, L. and Huch, M., 2018. The Journal of clinical investigation, 128(1), pp.85-96). 이것은 기능적 조직 실질을 세포외 기질(ECM)의 섬유주로 대체하는 것을 특징으로 할 수 있다. 간 구조가 변경될 수 있으며 최적의 기능이 방해받을 수 있다. 예를 들어, 간 복구는 원래 간 기능의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%의 회복을 초래할 수 있다. 본 발명의 방법은 최대 간 기능이 도달될 때까지의 시간을 감소시킬 수 있으며, 예를 들어 시간은 조작된 Treg 또는 약제학적 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%만큼 감소될 수 있다.

[0488] 본 발명의 조작된 Treg는 간 재생 및 조직 복구에 관여하는 유전자를 발현하여 강력한 간 복구 및/또는 재생을 촉진할 수 있다.

[0489] 성체 간세포는 수명이 길고 일반적으로 세포 분열을 겪지 않지만 염증 손상에 반응하거나 부분 간 절제술 후에 증식하는 능력을 유지한다. 이 능력은 설치류의 2/3 부분 간절제술 모델에서 가장 명확하게 나타난다. 이 모델에서는 간의 2/3를 외과적으로 제거하고 남은 간은 원래의 간 질량이 회복될 때까지(수술 후 약 1주일) 확대된 후 재생 과정이 멈춘다. 인간에서 간 재생은 허혈이나 간염에 의한 간 손상 후에 가장 자주 발생한다. (Taub, R., 2004. Nature reviews Molecular cell biology, 5(10), p.836-847). 매우 유사한 현상이 간 종양 치료로 부분 간절제술을 받은 사람이나 생체 기증 간 이식 중에 발생한다. 또한 인간의 경우 허혈, 독성, 급성 또는 만성 간염으로 인한 간세포 손상 후에 간 재생이 발생한다.

[0490] 적절하게는 간염에 의해 간이 다치고/거나 손상될 수 있다. 일부 구현예에서, 간 조직 복구 및/또는 간 재생을 촉진하는 것 외에도, 본 발명의 조작된 Treg는 간염을 추가로 치료한다. 간염은 감염성 간염, 대사 간염, 알코올성 간염, 허혈성 간염, 자가면역 간염, 및 유전적 간염으로부터 선택될 수 있다. 한 구현예에서, 간염은 전격성 또는 만성 간염이 아닐 수 있다.

[0491] 간 재생으로 인해 생체 공여체의 일부 간을 이식에 사용할 수 있게 되어 이식 가능한 장기의 수가 증가하였다. 간 이식 수의 증가는 생존, 관련 기증 조직 및 소형 이식 장기를 사용하여 이루어지고 있으며, 이식에 성공하려면 최소한 간 재생 및 복구가 필요하다. (Taub, R., 2004. Nature reviews Molecular cell biology, 5(10), p.836-847).

[0492] 따라서, 대상체는 간 이식 수령체 또는 부분 간절제술을 받는 환자(예를 들어, 간 이식을 위한 살아있는 공여체로서 또는 외과적 절제가 필요한 간 종양의 존재로 인해)일 수 있다. 간은 이식된 간일 수 있다.

[0493] 간경변(간 섬유증), 지방증(지방간), 심지어 노령으로 인한 병태를 포함한 특정 간 질환이 있는 사람은 간 손상이나 훼손에 대한 반응으로 이환율과 사망률을 증가시키는 간 재생 장애가 있다. (Taub, R., 2004. Nature reviews Molecular cell biology, 5(10), p.836-847).

[0494] 따라서, 대상체는 바람직하게는 급성 간부전, 간경변, 급성-만성 간부전, 간염, 지방증, 지방간염 및 노령 중 하나 이상으로 인한 손상된 간 재생을 가질 수 있다.

[0495] 한 구현예에서, 본 발명은 간 조직 복구 및/또는 간 재생을 촉진하는 것 외에 면역 매개 손상을 치료 및/또는 예방한다. 예를 들어, 본 발명은 또한 대상체에서 간 이식에 대한 내성을 유도하거나, 대상체에서 간 이식 거부, 간 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 자가면역 간 질환, 또는 염증성 간 장애를 치료 및/또는 예방할 수 있다.

[0496] 복구 및/또는 재생을 위해 이들 구현예에서 사용하기 위한 바람직한 CAR Treg(및 본원에 기재된 다른 구현에, 여기서 복구 또는/또는 재생이 수반됨)는 알부민 생성을 증가 또는 자극할 수 있고, 예를 들어 간에서, 예컨대 간 세포 또는 간 조직에서, 예컨대 간세포에서, 알부민 농도 또는 수준을 증가시키고/거나 알부민 생성을 자극시킬 수 있다.

[0497] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 대상체의 간 조직 또는 간 세포에서 알부민 생산을 증가시키거나 자극하는데 사용하기 위한, 또는 알부민 수준을 증가시키거나 알부민 생산을 자극하는데 사용하기 위한 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포 (Treg), 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0498] 대안적으로 볼 때, 본 발명의 이러한 양태는 대상체의 간 조직 또는 간 세포에서 알부민 생산을 증가시키거나 자극하는 방법, 또는 알부민 수준을 증가시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포 (Treg), 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0499] 대안적으로 볼 때, 본 발명의 이러한 양태는 대상체의 간 조직 또는 간 세포에서 알부민 생산을 증가시키거나 자극하거나 알부민 수준을 증가시키기 위한 약제 또는 조성물의 제조에서의, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 조작된 조절 T 세포 (Treg), 또는 조작된 Treg를 포함하는 약제학적 조성물의 용도를 제공하고, 상기 CAR은 간 특이적 항원 인식 도메인을 포함한다.

[0500] 알부민 수준이 증가된 이러한 양태에서 사용하기 위한 적절하고 바람직한 간 특이적 항원 인식 도메인, 예를 들어 ASGR에 결합하거나 특이적으로 결합하는 항원 인식 도메인은 본 명세서의 다른 곳에서 기재된다. 이 양태에 대한 다른 바람직한 실시예는 또한 본 명세서의 다른 곳에서 기재된다.

[0501] 간세포는 전형적으로 간세포 또는 간 조직 샘플이 시험관내에서 또는 환자의 혈액에서 배양될 때 상청액 내에서 간세포 내의 간 질량 및 알부민 수준 또는 알부민 농도의 대부분을 구성하고, 간 세포의 마커, 예를 들어 간세포, 분화, 기능 및 생존력이다. 따라서, 이러한 세포 내의 알부민 수준에 대한 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 Treg의 효과를 결정하는 것은 항원 자극에 반응하여 간 세포 또는 간 조직에 대한 영양성(예를 들어, 간세포 기능 및/또는 생존력을 촉진하는 영양성 신호) 및/또는 세포보호 효과를 매개하는 CAR Treg 능력의 측정 또는 표시를 제공한다.

[0502] 알부민 생성을 증가 또는 자극할 수 있거나 알부민 수준 또는 농도를 증가시킬 수 있는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 Treg는 임의의 적합한 검정을 사용하여 확인될 수 있다. 적합한 검정은 당업계에 잘 알려져 있을 것이다. 예를 들어, 적절한 간 세포를 사용하고 일상적인 기술(예를 들어, ELISA)로 (예를 들어, 분비된 알부민 수준 평가하기 위해) 이러한 세포 또는 이들 세포의 상청액에서 알부민 수준을 측정하는 시험관 내 분석을 쉽게 사용할 수 있다. 적절한 CAR Treg의 존재 및 부재하에 수준을 편리하게 측정하고 비교할 수 있다. 간세포, 특히 인간 간세포, 예를 들어 일차 인간 간세포가 특히 적절하다. 예시적인 검정이 실시예 14에 제시되어 있다. 상기 기재된 바와 같이, 이러한 CAR Treg는 차례로 항원 자극에 반응하여 간 세포에 대한 영양 및/또는 세포보호 효과를 매개하는 능력을 가질 수 있고, 이에 의해 간 복구 및/또는 재생을 포함하는 본 발명의 양태에서 사용하기에 특히 적절하다. 본 명세서에 정의된 조작된 Treg로 치료한 후 환자 내의 알부민 수준 또는 농도는 상기 논의된 바와 같은 일상적인 기술을 사용하여 혈액 샘플을 통해 측정될 수 있다.

[0503] 본 명세서에 언급된 바와 같이 알부민 생산 또는 간 세포 또는 간 조직에서 알부민 수준 또는 농도의 증가 또는 자극(또는 동등한 용어)에 대한 언급은 적절한 대조군과 비교할 때 임의의 측정 가능한 증가 또는 향상 또는 개선을 포함한다. 바람직하게 이러한 증가 등은 적절한 대조군 수준 또는 값과 비교할 때 예를 들어 <0.05의 확률 값을 갖는 유의한 증가, 바람직하게는 임상적으로 유의하거나 통계적으로 유의한 증가이다.

[0504] 적절한 대조군은 당업자에 의해 용이하게 확인될 것이고, 예를 들어, 상기 CAR Treg의 부재와 비교하여 (예를 들어, 비처리된 샘플과 비교하여, 예컨대 적절한 대조군 배지 단독과 비교하여) 본 발명의 CAR Treg(예를 들어, 본 발명의 형질도입된 CAR Treg)의 존재 하에 관찰된 알부민의 생산, 수준 또는 농도를 포함할 수 있거나, 또는 예를 들어 비-형질도입된 Treg (예컨대, 활성화 또는 비-활성화/휴식 비- 형질도입 Treg)의 존재와 비교하여, 본 발명의 CAR Treg(예를 들어 본 발명의 형질도입된 CAR Treg)의 존재하에 관찰된 알부민의 생산, 수준 또는 농도를 포함할 수 있다.

[0505] 간 세포에서 증가된 알부민 생산, 수준 또는 농도가 본 발명의 CAR Treg(예를 들어, 본 발명의 형질도입된 CAR Treg)로 관찰되는 이러한 구현예에서, 적어도(또는 최대) 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 7배, 10배, 15배, 20배,

25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 또는 50배의 알부민 수준 또는 농도의 개선 또는 증가가 관찰되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 적어도(또는 최대) 5배, 7배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 또는 50배의 알부민 수준 또는 농도의 개선 또는 증가는 예를 들어, 본 발명의 CAR Treg의 부재 하에 관찰된 수준 또는 농도와 비교하여 예를 들어 처리되지 않은 샘플 또는 적절한 대조 배지와만 비교할 때 본 발명의 바람직한 CAR Treg로 관찰될 수 있다. 예를 들어, 적어도(또는 최대) 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 7배 또는 10배의 알부민 수준의 개선 또는 증가는 비-형질도입된 또는 비-형질감염된 Treg로 관찰된 수준에 비해, 예를 들어 형질도입되지 않은 활성화 또는 비활성화/휴식 Treg와 비교할 때 본 발명의 바람직한 CAR Treg로 관찰될 수 있다.

[0506] 간 섬유증, 간경변, 급성 간부전 및 급성-만성 간부전

[0507] 본 발명은 간 섬유증, 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0508] 간 섬유증, 간경변, 급성 간부전 또는 급성-만성 간부전의 개선은 일반적으로 간의 면역 매개 손상을 치료 및/또는 예방하고 간 재생을 촉진할 필요가 있을 것이다.

[0509] 간 섬유증은 특정 기관의 구조를 변화시키고 정상적인 기능을 방해하기 때문에 사망의 주요 원인 중 하나이다. 간 섬유증은 만성 간 질환 예컨대 바이러스성 간염, 알코올성 간 질환, 비-알코올성 지방 간 질환, 및 다른 간 장애로 인한 상처 치유 과정의 조직학적 결과이다. 원섬유 형성 콜라겐이 풍부한 과잉 세포외 기질(ECM)의 침착은 간 섬유증의 전형적인 발견이다. ECM의 과도한 침착은 간의 정상적인 구조를 변화시켜 장기의 병태생리학적 손상을 초래한다(Suk, K.T. and Kim, D.J., 2015. World Journal of hepatology, 7(3), p.607).

[0510] 간경변은 간 맥관구조와 구조의 왜곡을 동반한 간 섬유화의 진행 단계로 정의된다. 조직학적으로, 섬유 조직을 가진 재생 결절은 만성 손상에 대한 반응으로 형성되어 간경변을 유발한다. 결과적으로, 간 섬유화 및/또는 간경변으로 인한 간 구조의 붕괴는 혈류학적 불안정성과 관문 고혈압을 유발한다(Suk, K.T. and Kim, D.J., 2015. World journal of hepatology, 7(3), p.607).

[0511] 급성 간부전은 알려진 이전 간 질환이 없는 환자에서 간세포 기능장애, 구체적으로 응고장애 및 뇌병증의 급속한 발달로 본 명세서에서 정의된다. 예를 들어, "급성 간부전"은 간 증상이 시작된 후 26주 이내에 뇌병증이 발생하는 것으로 정의될 수 있다. 이는 8주 이내에 뇌병증이 발병해야 하는 "전격성 간부전"과 8주 이후부터 26주 이전에 뇌증이 발병하는 "아전격성"으로 세분될 수 있다. 또 다른 계획은 "초급성"을 7일 이내에 발병하는 것으로 정의하고, "급성"을 7일에서 28일 사이에 발병하고, "아급성"을 28일에서 24주 사이에 발병하는 것으로 정의한다.

[0512] 급성-만성 간부전은 장기 부전 및 높은 단기 사망률과 관련된 만성 간 질환의 급성 대상부전(decompensation)이 특징이다. 알코올 및 만성 바이러스 간염은 가장 흔한 기저 간 질환이다(Hernaez, R., 등, 2017. Gut, 66(3), pp.541-553).

[0513] **폴리뉴클레오티드**

[0514] 본 발명은 본 발명의 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0515] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 수많은 상이한 폴리뉴클레오티드가 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서 동일한 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 또한, 당업자는 통상의 기술을 사용하여, 본 발명의 폴리펩티드가 발현되는 임의의 특정한 숙주 유기체의 코돈 용법을 반영하도록 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 폴리펩티드 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오티드 치환을 만들 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0516] 폴리뉴클레오티드는 당업계에서 이용가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 생체내 활성 또는 수명을 향상시키기 위해 수행될 수 있다.

[0517] DNA 폴리뉴클레오티드와 같은 폴리뉴클레오티드는 재조합에 의해, 합성에 의해 또는 당업자에게 이용가능한 임의의 수단에 의해 생성될 수 있다. 표준 기술로 클로닝될 수 있다.

[0518] 더 긴 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR) 클로닝 기술을 사용하여 재조합 수단을 사용하여 생산될 것이다. 이는 클로닝하는 것이 바람직한 표적 서열에 플랭킹하는 한 쌍의 프라이머 (예를 들어, 약 15 내지 30개 뉴클레오티드)를 제조하는 것, 프라이머를 동물 또는 인간 세포로부터 수득된 mRNA 또는 cDNA와 접촉시키는 것, 목적하는 영역의 증폭을 일으키는 조건 하에 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하는 것, 증폭된 단편을 단리하는 것 (예를 들면, 반응 혼합물을 아가로스 겔로 정제함으로써) 및 증폭된 DNA를 회수하는 것

을 포함할 것이다. 프라이머는 증폭된 DNA가 적절한 벡터로 클로닝될 수 있도록 적절한 제한 효소 인식 부위를 포함하도록 설계될 수 있다.

[0519] 본 발명에서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 코돈 최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 WO 1999/41397 및 WO 2001/79518에서 이전에 기재되었다. 상이한 세포는 특정 코돈의 사용법이 다르다. 이 코돈 바이어스는 세포 유형에서 특정 tRNA의 상대적 존재비에서의 바이어스에 해당한다. 서열의 코돈을 변경하여 상응하는 tRNA의 상대적 존재비와 일치하도록 맞춤화함으로써 발현을 증가시킬 수 있다. 마찬가지로, 상응하는 tRNA가 특정 세포 유형에서 드문 것으로 알려진 코돈을 의도적으로 선택하여 발현을 감소시키는 것이 가능하다. 따라서 추가 수준의 번역 제어를 사용할 수 있다.

[0520] 본 발명의 예시적인 CAR을 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열(서열번호: 149-152 또는 167-169)이 하기에 제시되어 있다. 본 발명의 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 153-156 또는 170-172 중 하나 이상에 대해 적어도 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0521] 서열번호: 153 - *예시적인 CAR 1을 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열: CD8 리더, ASGR1 VH, CD8α 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

[0522]
```
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCA
GGCCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGAAGTATGCGATGGCGTGGG
TCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCACGGATTTCGGCGAGGGGTG
TGACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATAT
TACTGTGCGAAACATAAGCGGCACGAGCATACTCGTTTTGACTCCTGGGGTCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCGAGCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGC
CCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCG
GGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGGTGCTGGTG
GTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATC
TTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACC
CCCCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC
CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG
ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA
CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCCCCTCGCTAA
```

[0523]

[0524] 서열번호: 154 - *예시적인 CAR 2를 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열: CD8 리더, ASGR1 VH, C-Myc 태그를 갖는 CD28 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCA
GGCCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGAAGTATGCGATGGCGTGGG
TCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCACGGATTTCGGCGAGGGGTG
TGACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATAT
TACTGTGCGAAACATAAGCGGCACGAGCATACTCGTTTTGACTCCTGGGGTCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGGCCGCCATCGAGGTGGAGCAGAAGCTGATCAGCG
AGGAGGACCTGCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCA
AGCACCTGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGG
TGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCA
TCTTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGA
CCCCCCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG
ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGT
ACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA
CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG
GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC

[0525] TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT

TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCC

[0526] TGCCCCCTCGCTAA

[0527] 서열번호: 155 - *예시적인 CAR 3을 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열: CD8 리더, ASGR1 VH, CD8α 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질, FP2A 도메인, GFP를 함유하는 CAR*

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCA
GGCCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGAAGTATGCGATGGCGTGGG
TCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCACGGATTTCGGCGAGGGGTG
TGACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATAT
TACTGTGCGAAACATAAGCGGCACGAGCATACTCGTTTTGACTCCTGGGGTCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCGAGCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGC
CCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCG
GGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGGTGCTGGTG
GTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATC
TTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACC
CCCCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC
CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG
ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA
CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCCCCTCGCAGGAGAAAAAGAGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAG
GCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTACGCGTGGAGGTGGCGCCACCATGGTG
AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGC
GACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACA
TGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCAC
CATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC
GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC
ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCG
ACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG

[0528]

CAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGT
GCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAAC
GAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC
GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

[0529] 서열번호: 156 - *예시적인 CAR 4를 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열: CD8 리더, ASGR1 VH, CD8α 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질, FP2A 도메인, GFP를 함유하는 CAR*

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCA
GGCCGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGAAGTATGCGATGGCGTGGG
TCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCACGGATTTCGGCGAGGGGTG
TGACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATAT
TACTGTGCGAAACATAAGCGGCACGAGCATACTCGTTTTGACTCCTGGGGTCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCGGCCGCCATCGAGGTGGAGCAGAAGCTGATCAGCG
AGGAGGACCTGCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCA
AGCACCTGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGG
TGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCA
TCTTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGA
CCCCCCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG
ACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGT
ACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA
CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG
GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT
TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCC
TGCCCCCTCGCAGGAGAAAAAGAGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCA
GGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTACGCGTGGAGGTGGCGCCACCATGGT
GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACG
GCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCT
ACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC
CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCA
CATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGG

[0530] GCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCA

ACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGC
CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGAC
GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCC
GTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTC

[0531] TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

[0532] 서열번호: 170 - *예시적인 CAR 5를 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열: CD8 리더, ASGR1 VH (VH1, 서열번호:74), 링커, ASGR1 VL (VK1, 서열번호:78), C-Myc 태그를 갖는 CD28 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGT
GCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCT
CCGGATTCACCTTTGAGAAGTATGCGATGGCGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGG
GTCTCACGGATTTCGGCGAGGGGTGTGACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCAT
CTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGG
TATATTACTGTGCGAAACATAAGCGGCACGAGCATACTCGTTTTGACTCCTGGGGTCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCGAGCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGCGGAGGCAGCGGCGG
AGGCGGTAGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCA
CCATTACTTGCCGGGCAAGTCAGGCGATTGGGCGGTGGTTATTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCTAAGCTCCTGATCGGTCCGGGTTCCCGGTTGCGAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTACAACCTGAAGATTTTGTTACGTACTACT
GTCAACAGGCGTATGCCTGGCCTCCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGGCC
GCCATCGAGGTGGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCAC
CATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCT
GGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATC
TTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGGCGGCC
TGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAG
TGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC
AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG
CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGT
CTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0533]

[0534] 서열번호: 171 - *예시적인 CAR 6을 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열: CD8 리더, ASGR1 VH (VH2, 서열번호:75), 링커, ASGR1 VL (VK2, 서열번호:79), C-Myc 태그를 갖는 CD28 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGTT
GCAGCTGTTGGAGTTTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTACAACCT
CCGGATTCACCTTTTCGAGGTATACTATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGG
GTCTCAGCCATTGGCCCGCCCGGGTCGAACACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGTCGGTTCACCAT
CTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGG
TATATTACTGTGCGAAATGGGTGATGTTGCGGGGGCGCTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCGAGCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGCGGAGGCAGCGGCGGAGG
CGGTAGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCA
TTACTTGCCGGGCAAGTCAGGCGATTGGGCGGTGGTTATTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCACCTGATCGGTCCGGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTC
AACAGGCGTATCAGCTGCCTGTCACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCC
ATCGAGGTGGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCAT
CATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGG
TGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTC
TGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGGCGGCCTGG
GCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGA
AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT
CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAA
GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTC
AGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0535]

[0536] 서열번호: 172 - *예시적인 CAR 7을 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열: CD8 리더, ASGR1 VH (VH3, 서열번호:76), 링커, ASGR1 VL (VK3, 서열번호:80), C-Myc 태그를 갖는 CD28 힌지, CD28 막횡단, CD28 세포질, CD3z 세포질을 함유하는 CAR*

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGT
GCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCT
CCGGATTCACCTTTGAGGATTATGGTATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTAGAGTGG
GTCTCAGCGATTGGCCGCAACGGGTCGCAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCAT
CTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGG
TATATTACTGTGCGAAACTTCGGAGGGGGCGGGGTCTGAATACGTTTACGTTAGACTACTGGGGTCAA
GGAACCCTGGTCACCGTCTCAAGCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGCGGAGG
CAGCGGCGGAGGCGGTAGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
ACCGTGTCACCATTACTTGCCGGGCAAGTCAGGCGATTGGGCGGTGGTTATTGTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCGGTCCGGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTT
CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCGGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTA
CGTACTACTGTCAACAGGCGTATAGTCTGCCTCCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
CGGGCGGCCGCCATCGAGGTGGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGCTGGACAACGAGAAGAG
CAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGCA
AGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCC
TTCATCATCTTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCC
CCGGCGGCCTGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATC
GCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT
AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA
GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGA
TGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT
TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG
C

[0537]

[0538] 이전에 논의된 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 본 명세서에 정의된 바와 같은 CAR 외에 폴리펩티드, 예를 들어 리포터 또는 마커 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩할 수 있다. 특히, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 FOXP3 폴리펩티드를 추가로 인코딩할 수 있다.

[0539] 한 구현예에서, 본 발명의 Treg는 본 발명의 CAR 및 FOXP3 폴리펩티드(외인성 FOX P3 폴리펩티드)를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 따라서 본 발명의 CAR 및 FoxP3 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 본 발명에 따른 Treg가 생산될 수 있다. 본 발명의 CAR 및 FOXP3 폴리펩티드는 단일 폴리뉴클레오티드 서열 또는 상이한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있음이 이해될 것이다.

[0540] "FOXP3"는 포크헤드 박스 P3 단백질의 약칭이다. FOXP3는 전사 인자의 FOX 단백질 계열의 구성원이며 조절 T 세포의 발달 및 기능에서 조절 경로의 마스터 조절자로서 기능한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "FOXP3"은 FOXP3의 변이체, 동형체 및 기능적 단편을 포괄한다.

[0541] "FOXP3 폴리펩티드"는 FOXP3 활성을 갖는 폴리펩티드, 즉 FOXP3 표적 DNA에 결합할 수 있고 Treg의 발달 및 기능을 조절하는 전사 인자로서 기능할 수 있는 폴리펩티드이다. 특히, FOXP3 폴리펩티드는 야생형 FOXP3(서열번호: 157)과 동일하거나 유사한 활성을 가질 수 있고, 예를 들어 야생형 FOXP3 폴리펩티드의 활성의 적어도 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140 또는 150%를 가질 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 FOXP3 폴리펩티드는 야생형 FOXP3에 비해 증가되거나 감소된 활성을 가질 수 있다. 전사 인자 활성을 측정하는 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 전사 인자 DNA 결합 활성은 ChIP에 의해 측정될 수 있다. 전사 인자의 전사 조절 활성은 조절하는 유전자의 발현 수준을 정량함으로써 측정할 수 있다. 유전자 발현은 기술 예컨대 노던 블롯팅, SAGE, qPCR, HPLC, LC/MS, 웨스턴 블롯팅 또는 ELISA을 사용하여 유전자로부터 생성된 mRNA 및/또는 단백질의 수준을 측정함으로써 정량화될 수 있다. FOXP3에 의해 조절되는 유전자는 IL-2, IL-4 및 IFN-γ와 같은 사이토카인 포함한다(Siegler 등 Annu. Rev. Immunol. 2006, 24: 209-26, 참고로 본 명세서에 포함됨). 하기 및 이전에 상세히 논의된 바와 같이, FOXP3 또는 FOXP3 폴리펩

티드는 예를들어, 서열번호: 157의 그의 기능적 단편, 변이체 및 동형을 포함한다.

[0542] "FOXP3의 기능적 단편"은 전장 FOXP3 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 FOXP3 폴리펩티드 또는 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(즉, 뉴클레오티드 서열)의 일부 또는 영역을 지칭할 수 있다. 기능적 단편은 전장 FOXP3 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 활성의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%를 가질 수 있다. 당업자는 FOXP3의 공지된 구조적 및 기능적 특징에 기초하여 기능적 단편을 생성할 수 있을 것이다. 이들은 예를 들어 문헌[Song, X., 등, 2012. Cell reports, 1(6), pp.665-675; Lopes, J.E., 등, 2006. The Journal of Immunology, 177(5), pp.3133-3142; and Lozano, T., et al, 2013. Frontiers in oncology, 3, p.294]에 기재되어 있다. 추가로, N 및 C 말단 절단된 FOXP3 단편은 예를 들어 하기 논의된 바와 같은 서열 서열번호:157을 갖는WO2019/241549(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0543] "FOXP3 변이체"는 FOXP3 폴리펩티드 또는 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와, 예를 들어 서열번호 157과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 적어도 90% 동일한, 바람직하게는 적어도 95% 또는 적어도 97% 또는 적어도 99% 동일할 수 있는 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. FOXP3 변이체는 야생형 FOXP3 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 유사한 활성을 가질 수 있고, 예를 들어 야생형 FOXP3 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 활성의 적어도 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140 또는 150%를 가질 수 있다. 당업자는 FOXP3의 알려진 구조적 및 기능적 특징에 기초하여 및/또는 보존적 치환을 사용하여 FOXP3 변이체를 생성할 수 있을 것이다. FOXP3 변이체는 Treg 세포에서 야생형 FOXP3과 비교하여 유사하거나 동일한 턴오버 시간(또는 분해 속도), 예를 들어 Treg에서 야생형 FoxP3의 턴오버 시간 (또는 분해률)의 적어도 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 또는 100%를 가질 수 있다. 일부 FOXP3 변이체, 야생형 FOXP3, 예를 들어 WO2019/241549 (본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 서열번호: 157의 아미노산 418 및/또는 422에서 아미노산 치환을 갖는 FOXP3 변이체 (예를 들어 S418E 및/또는 S422A)와 비교하여 감소된 턴오버 시간 (또는 분해 속도)을 가질 수 있고, 각각 aa418, aa422 및 aa418 및 aa422 돌연변이체를 나타내는 서열번호: 158 내지 160에 제시된다.

[0544] 적합하게는, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 분자, 작제물 또는 벡터에 의해 인코딩되는 FOXP3 폴리펩티드는 인간 FOXP3의 폴리펩티드 서열, 예컨대 UniProtKB 가입 Q9BZS1 (서열번호: 157), 또는 기능적 단편 또는 그의 변이체를 포함하거나 그로 구성될 수 있다.

[0545] 본 발명의 일부 구현예에서, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 157 또는 그의 기능적 단편과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성된다. 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 157 또는 그의 기능적 단편과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성된다. 일부 구현예에서, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 157 또는 그의 기능적 단편을 포함하거나 그로 구성된다.

[0546] 일부 구현예에서, 상기 논의된 바와 같이, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호 158, 서열번호 159, 또는 서열번호 160으로 제시된 서열번호 157의 잔기 418 및/또는 422에서의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0547] 본 발명의 일부 구현예에서, FOXP3 폴리펩티드는 N 및/또는 C 말단에서 절단되어 기능적 단편을 생성할 수 있다. 특히, FOXP3의 N 및 C 말단 절단된 기능적 단편은 서열 번호: 161의 아미노산 서열 또는 그에 대해 적어도 80, 85, 90, 95 또는 99% 동일성을 갖는 그의 기능적 변이체를 포함하거나 그로 구성될 수 있다.

[0548] 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 157의 변이체, 예를 들어 천연 변이체일 수 있다. 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 157의 동형체이다. 예를 들어, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 157에 비해 아미노산 위치 72-106의 결실을 포함할 수 있다. 대안적으로, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 157에 비해 아미노산 위치 246-272의 결실을 포함할 수 있다.

[0549] 적합하게는, FOXP3 폴리펩타이드는 서열번호: 162 또는 이의 기능적 단편을 포함한다. 서열번호:162는 예시적인 FOXP3 폴리펩티드를 나타낸다.

[0550] 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 162 또는 그의 기능적 단편과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성된다. 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 162 또는 그의 기능적 단편과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 162 또는 그의 기능적 단편을 포함하거나 그로 구성된다.

[0551] 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 162의 변이체, 예를 들어 천연 변이체일 수 있다. 적합하게는,

FOXP3 폴리펩타이드는 서열번호: 162 또는 이의 기능적 단편의 동형체를 포함한다. 예를 들어, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 162에 비해 아미노산 위치 72-106의 결실을 포함할 수 있다. 대안적으로, FOXP3 폴리펩티드는 서열번호: 162에 비해 아미노산 위치 246-272의 결실을 포함할 수 있다.

[0552] 적합하게는, FOXP3 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 예시적인 FOXP3 뉴클레오타이드 서열을 나타내는 서열번호: 163에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 구성된다.

[0553] 본 발명의 일부 구현예에서, FOXP3 폴리펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 163과 적어도 70% 동일한 뉴클레오티드 서열 또는 기능성 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 그의 단편을 포함한다. 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 163과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열 또는 기능적 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 그의 단편을 포함한다. 본 발명의 일부 구현예에서, FOXP3 폴리펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 163 또는 기능적 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 그의 단편을 포함하거나 그로 구성된다.

[0554] 적합하게는, FOXP3 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 또 다른 예시적인 FOXP3 뉴클레오타이드를 나타내는 서열번호: 164에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 구성된다.

[0555] 본 발명의 일부 구현예에서, FOXP3 폴리펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 164와 적어도 70% 동일한 뉴클레오티드 서열 또는 기능성 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 그의 단편을 포함한다. 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 164와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열 또는 기능적 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 그의 단편을 포함한다. 본 발명의 일부 구현예에서, FOXP3 폴리펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 164 또는 기능적 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 그의 단편을 포함하거나 그로 구성된다.

[0556] 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈 최적화될 수 있다. 적합하게는, FOXP3 폴리펩티드 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화될 수 있다.

[0557] 서열번호 157 *FOXP3, UniProtKB 가입 Q9BZS1*:

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSS
SLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQ
VHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDS
TLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQS
LEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREA
PDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEI
YHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSR
CSNPTPGP

[0558]

[0559] 서열번호 158 *FOXP3, aa418 돌연변이체*:

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSS
SLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQ
VHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDS
TLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQS
LEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREA
PDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEI
YHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKREQRPSR
CSNPTPGP

[0560]

[0561] 서열번호 159 *FOXP3, aa422 돌연변이체*:

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSS
SLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQ
VHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDS
TLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQS
LEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREA

[0562] PDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEI

YHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPAR

[0563] CSNPTPGP

[0564] 서열번호 160 *FOXP3, aa 418 및 422 돌연변이체*:

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSS
SLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQ
VHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDS
TLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQS
LEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREA
PDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEI
YHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKREQRPAR

[0565] CSNPTPGP

[0566] 서열번호 161 *FOXP3, 말단절단된 변이체*:

GGAHASSSSL NPMPPSQLQL PTLPLVMVAP SGARLGPLPH LQALLQDRPH
FMHQLSTVDA HARTPVLQVH PLESPAMISL TPPTTATGVF SLKARPGLPP GINVASLEWV
SREPALLCTF PNPSAPRKDS TLSAVPQSSY PLLANGVCKW PGCEKVFEEP
EDFLKHCQAD HLLDEKGRAQ CLLQREMVQS LEQQLVLEKE KLSAMQAHLA
GKMALTKASS VASSDKGSCC IVAAGSQGPV VPAWSGPREA PDSLFAVRRH
LWGSHGNSTF PEFLHNMDYF KFHNMRPPFT YATLIRWAIL EAPEKQRTLN

[0567] EIYHWFTRMF AFFRNHPATW KNAIRHNLSL HKCFVRVESE KGAVWTVDEL EF

[0568] 서열번호 162 *FOXP3, 예시적인 변이체* :

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSS
SLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQ
VHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDS
TLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQS
LEQVEELSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLF
AVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWF
TRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNP

[0569] TPGPEGRGSLLTCGDVEEN

[0570] 서열번호 163 *FOXP3, 예시적인 FOXP3 폴리뉴클레오티드*:

ATGCCCAACCCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCCTTCCTTGGCCCTTGGCCCATCC
CCAGGAGCCTCGCCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGGCC

[0571] CGGGGCCCAGGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGATCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCTC

CTCTTCTTCCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGCTGCCCACACTGCCCCTA
GTCATGGTGGCACCCTCCGGGGCACGGCTGGGCCCCTTGCCCCACTTACAGGCACTC
CTCCAGGACAGGCCACATTTCATGCACCAGCTCTCAACGGTGGATGCCCACGCCCGGA
CCCCTGTGCTGCAGGTGCACCCCCTGGAGAGCCCAGCCATGATCAGCCTCACACCAC
CCACCACCGCCACTGGGGTCTTCTCCCTCAAGGCCCGGCCTGGCCTCCCACCTGGGA
TCAACGTGGCCAGCCTGGAATGGGTGTCCAGGGAGCCGGCACTGCTCTGCACCTTCC
CAAATCCCAGTGCACCCAGGAAGGACAGCACCCTTTCGGCTGTGCCCCAGAGCTCCTA
CCCACTGCTGGCAAATGGTGTCTGCAAGTGGCCCGGATGTGAGAAGGTCTTCGAAGAG
CCAGAGGACTTCCTCAAGCACTGCCAGGCGGACCATCTTCTGGATGAGAAGGGCAGG
GCACAATGTCTCCTCCAGAGAGAGATGGTACAGTCTCTGGAGCAGCAGCTGGTGCTGG
AGAAGGAGAAGCTGAGTGCCATGCAGGCCCACCTGGCTGGGAAAATGGCACTGACCA
AGGCTTCATCTGTGGCATCATCCGACAAGGGCTCCTGCTGCATCGTAGCTGCTGGCAG
CCAAGGCCCTGTCGTCCCAGCCTGGTCTGGCCCCCGGGAGGCCCCTGACAGCCTGTT
TGCTGTCCGGAGGCACCTGTGGGGTAGCCATGGAAACAGCACATTCCCAGAGTTCCTC
CACAACATGGACTACTTCAAGTTCCACAACATGCGACCCCCTTTCACCTACGCCACGCT
CATCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTCCAGAGAAGCAGCGGACACTCAATGAGATCTAC
CACTGGTTCACACGCATGTTTGCCTTCTTCAGAAACCATCCTGCCACCTGGAAGAACGC
CATCCGCCACAACCTGAGTCTGCACAAGTGCTTTGTGCGGGTGGAGAGCGAGAAGGG
GGCTGTGTGGACCGTGGATGAGCTGGAGTTCCGCAAGAAACGGAGCCAGAGGCCCAG
CAGGTGTTCCAACCCTACACCTGGCCCCTGA

[0572]

[0573] 서열번호164 *FOXP3, 예시적인 FOXP3 폴리뉴클레오티드*:

GAATTCGTCGACATGCCCAACCCCAGACCCGGCAAGCCTTCTGCCCCTTCTCTGGCCC
TGGGACCATCTCCTGGCGCCTCCCCATCTTGGAGAGCCGCCCCTAAAGCCAGCGATCT
GCTGGGAGCTAGAGGCCCTGGCGGCACATTCCAGGGCAGAGATCTGAGAGGCGGAG
CCCACGCCTCTAGCAGCAGCCTGAATCCCATGCCCCCTAGCCAGCTGCAGCTGCCTAC
ACTGCCTCTCGTGATGGTGGCCCCTAGCGGAGCTAGACTGGGCCCTCTGCCTCATCTG
CAGGCTCTGCTGCAGGACCGGCCCCACTTTATGCACCAGCTGAGCACCGTGGACGCC
CACGCCAGAACACCTGTGCTGCAGGTGCACCCCCTGGAAAGCCCTGCCATGATCAGC
CTGACCCCTCCAACCACAGCCACCGGCGTGTTCAGCCTGAAGGCCAGACCTGGACTG
CCCCCTGGCATCAATGTGGCCAGCCTGGAATGGGTGTCCCGCGAACCTGCCCTGCTG
TGCACCTTCCCCAATCCTAGCGCCCCCAGAAAGGACAGCACACTGTCTGCCGTGCCCC
AGAGCAGCTATCCCCTGCTGGCTAACGGCGTGTGCAAGTGGCCTGGCTGCGAGAAGG
TGTTCGAGGAACCCGAGGACTTCCTGAAGCACTGCCAGGCCGACCATCTGCTGGACGA
GAAAGGCAGAGCCCAGTGCCTGCTGCAGCGCGAGATGGTGCAGTCCCTGGAACAGCA
GCTGGTGCTGGAAAAAGAAAAGCTGAGCGCCATGCAGGCCCACCTGGCCGGAAAGAT
GGCCCTGACAAAAGCCAGCAGCGTGGCCAGCTCCGACAAGGGCAGCTGTTGTATCGT

[0574]

GGCCGCTGGCAGCCAGGGACCTGTGGTGCCTGCTTGGAGCGGACCTAGAGAGGCCC
CCGATAGCCTGTTTGCCGTGCGGAGACACCTGTGGGGCAGCCACGGCAACTCTACCTT
CCCCGAGTTCCTGCACAACATGGACTACTTCAAGTTCCACAACATGAGGCCCCCCTTCA
CCTACGCCACCCTGATCAGATGGGCCATTCTGGAAGCCCCCGAGAAGCAGCGGACCC
TGAACGAGATCTACCACTGGTTTACCCGGATGTTCGCCTTCTTCCGGAACCACCCCGC
CACCTGGAAGAACGCCATCCGGCACAATCTGAGCCTGCACAAGTGCTTCGTGCGGGTG
GAAAGCGAGAAGGGCGCCGTGTGGACAGTGGACGAGCTGGAATTTCGGAAGAAGCGG
TCCCAGAGGCCCAGCCGGTGTAGCAATCCTACACCTGGCCCTGAGGGCAGAGGAAGT
CTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC

[0575]

[0576] **벡터**

[0577] 본 발명은 본 발명의 CAR을 인코딩하는 벡터를 제공한다. 벡터는 예를 들어 본 발명의 CAR을 인코딩하고 선택적으로 추가의 폴리펩티드, 예를 들어 FOXP3 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0578] 벡터는 한 환경에서 다른 환경으로 독립체를 전달하거나 하거나 용이하게 하는 도구이다. 본 발명에 따르면, 그리고 예로서 재조합 핵산 기술에 사용되는 일부 벡터는 독립체, 예컨대 핵산의 절편 (예를 들어 이종 DNA 절편, 예컨대 이종 cDNA 절편)이 표적 세포로 전달되도록 한다. 벡터는 비바이러스성 또는 바이러스성일 수 있다. 재조합 핵산 기술에 사용되는 벡터의 예는 플라스미드, mRNA 분자 (예를 들어, 시험관 내 전사된 mRNA), 염색체, 인공 염색체 및 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 벡터는 또한 예를 들어 네이키드 핵산(예를 들어, DNA)일 수 있다. 가장 단순한 형태의 벡터는 그 자체가 관심 뉴클레오티드일 수 있다.

[0579] 본 발명에서 사용되는 벡터는 예를 들어 플라스미드, mRNA 또는 바이러스 벡터일 수 있고 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터 및 선택적으로 프로모터의 조절자를 포함할 수 있다.

[0580] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 형질전환 및 형질도입과 같은 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 여러 기술은 당해 기술에 알려져 있고, 그 예는 재조합 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 바큘로바이러스 및 단순 포진 바이러스 벡터에 의한 감염; 핵산의 직접 주입 및 바이오리스틱 형질전환이다.

[0581] 비바이러스 전달 시스템에는 DNA 형질감염 방법이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서, 형질감염은 비-바이러스 벡터를 사용하여 유전자를 표적 세포에 전달하는 과정을 포함한다. 비-바이러스 전달 시스템은 바람직하게는 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 복합된 리포솜 또는 양친매성 세포 침투 펩티드를 포함할 수 있다.

[0582] 전형적인 형질감염 방법은 전기천공, DNA 바이오리스틱, 지질-매개된 형질감염, 결속된 DNA-매개된 형질감염, 리포솜, 면역리포솜, 리포펙틴, 양이온성 제제-매개된 형질감염, 양이온성 안면 친양쪽성체 (CFA) (Nat. Biotechnol. (1996) 14: 556) 및 이들의 조합을 포함한다.

[0583] 예를 들어 본 발명의 상이한 CAR을 인코딩하거나, 본 발명의 CAR을 인코딩하는 다중 벡터 및 추가의 폴리펩티드는 형질도입/형질감염을 위해 사용될 수 있다.

[0584] **세포를 만드는 방법**

[0585] 본 발명의 조작된 Treg는 바이러스 벡터를 사용한 형질도입, 또는 DNA 또는 RNA로 형질감염을 포함하는 많은 수단 중 하나에 의해 본 명세서에 정의된 CAR을 인코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입함으로써 생성될 수 있다.

[0586] 본 발명의 조작된 Treg는 본 명세서에 정의된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 Treg에 도입함으로써(예를 들어, 형질도입 또는 형질감염에 의해) 제조될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 조작된 Treg는 Treg가 아닌 세포에 본 명세서에 정의된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 도입하고 하기에 추가로 기재된 바와 같이 Treg 표현형을 갖도록 전환(예를 들어, 상기 세포를 분화 또는 재프로그래밍)함으로써 만들어 수 있다. 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 임의의 전환 전 또는 후에 도입될 수 있다.

[0587] 적합하게는, Treg는 대상체로부터 단리된 샘플에서 유래할 수 있다. Treg는 임의의 적절한 방법, 예를 들어 자성 분리에 의해 샘플에서 추가로 분리될 수 있다.

[0588] 본 발명의 조작된 Treg는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다:

[0589] (i) 대상체로부터 세포 함유 샘플의 분리 또는 세포 함유 샘플의 제공 단계; 및

[0590] (ii) 본 발명의 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 핵산 또는 벡터로 세포 함유 샘플을 형질도입 또는 형질감염하여, 조작된 세포의 집단을 제공하는 단계를 포함하고,

[0591] 적합하게는, Treg-농축 샘플은 방법의 단계 (ii) 이전 및/또는 이후에 세포 함유 샘플로부터 단리, 농축 및/또는 생성될 수 있다. 예를 들어, Treg의 단리, 농축 및/또는 생성은 Treg 농축 샘플을 단리, 농축 또는 생성하기 위해 단계 (ii) 이전 및/또는 이후에 수행될 수 있다. 단리 및/또는 농축은 본 발명의 CAR, 폴리뉴클레오티드, 및/또는 벡터를 포함하는 세포 및/또는 Treg를 농축하기 위해 단계 (ii) 후에 수행될 수 있다.

[0592] Treg 농축 샘플은 예를 들어 FACS 및/또는 자성 비드 분류에 의해 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 단리되거나 농축될 수 있다. Treg 농축 샘플은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 세포 함유 샘플로부터, 예를 들어 FOXP3를 인코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입함으로써 및/또는 유도성 선조 세포 또는 배아 선조 세포의 생체외 분화로부터 Tcon 세포로부터 생성될 수 있다.

[0593] 적합하게는, 세포는 본 명세서에 정의된 Treg이다.

[0594] 적합하게는, 본 발명의 조작된 Treg는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다:

[0595] (i) 대상체로부터 Treg 농축 샘플의 분리 또는 Treg 농축 샘플의 제공 단계; 및

[0596] (ii) 본 발명에 따른 조작된 Treg 세포의 집단을 제공하기 위해 본 발명의 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 핵산 또는 벡터로 Treg 농축 샘플을 형질도입하거나 형질감염하는 단계.

[0597] 세포 및/또는 Treg는 예를 들어 항-CD3 단클론성 항체 또는 항-CD3 및 항-CD28 단클론성 항체 둘 모두로 처리함으로써 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 도입 전 또는 후에 활성화 및/또는 확장될 수 있다.

[0598] 세포 및/또는 Treg는 또한 IL-2와 조합된 항-CD3 및 항-CD28 단클론성 항체의 존재 하에 확장될 수 있다. 적합하게는, IL-2는 IL-15로 치환될 수 있다. Treg 확장 프로토콜에 사용될 수 있는 다른 구성요소는 라파마이신, 올-트랜스 레틴산 (ATRA) 및 TGFβ을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0599] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "활성화된"은 세포 또는 세포 집단이 자극되어 세포(들)이 증식함을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "확장된"은 세포 또는 세포 집단이 증식하도록 유도되었음을 의미한다. 세포 집단의 확장은 예를 들어 집단에 존재하는 세포의 수를 카운트함으로써 측정될 수 있다. 세포의 표현형은 당해 분야에서 알려진 방법 예컨대 유동 세포측정에 의해 결정될 수 있다.

[0600] 세포 및/또는 Treg는 방법의 각 단계 후, 특히 확장 후에 세척될 수 있다.

[0601] 조작된 세포 또는 Treg의 집단은 또한 당업자에게 공지된 임의의 방법, 예를 들어 FACS 및/또는 자성 비드 분류에 의해 농축될 수 있다.

[0602] 생산 방법의 단계는 폐쇄되고 멸균된 세포 배양 시스템에서 수행될 수 있다.

[0603] **실시예**

[0604] 이제 본 발명을 실시예를 통해 추가로 설명할 것이며, 이는 당업자가 본 발명을 수행하는 데 도움을 주기 위한 것이며 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한하도록 의도되지 않는다.

[0605] **실시예 1 - 항-ASGR1 CAR 작제물의 설계**

[0606] 키메라 항원 수용체(CAR)는 ASGR에 특이적으로 결합하는 것으로 알려진 단일 도메인 항체(sdAb)로부터 유래된 항원 인식 도메인; CD28로부터 유래된 막횡단 도메인(TM)(aa 153 내지 179); 및 CD3ζ 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되었다. 예시적인 구성은 아래 및 도 1에 나와 있다.

[0607] *다음을 포함하는 항-ASGR1 CAR 작제물 1: CD8 리더, ASGR1 VH 항원 인식 도메인, CD8α 힌지 도메인, CD28 막횡단, CD28 세포질 신호전달 도메인, CD3z 세포질 신호전달 도메인, FP2A 도메인, GFP* (서열번호: 151)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQA
PGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKR
HEHTRFDSWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPRRRKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPTRGGGATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDV
NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHD
FFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN
YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSK
LSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

[0608]

[0609] *다음을 포함하는 항-ASGR1 CAR 작제물 2: CD8 리더, ASGR1 VH 항원 인식 도메인, c-Myc tag를 갖는 CD28 힌지 도메인, CD28 막횡단, CD28 세포질 신호전달 도메인, CD3z 세포질 신호전달 도메인, FP2A 도메인, GFP* (서열번호: 152)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQA
PGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHKR
HEHTRFDSWGQGTLVTVSSAAAIEVEQKLISEEDLLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP
SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPRRRKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPTRGGGATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDV
NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHD
FFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN
YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSK
LSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

[0610]

[0611] **실시예 2 - 항-ASGR1 CAR-Treg의 생성**

[0612] 항-ASGR1 CAR-Treg가 생성되었다. 단리된 CD4+CD25hiCD127-를 단리하고 항-CD3/CD28 비드로 활성화하였다. 활성화 2일 후 Treg는 항-ASGR1 CAR 및 GFP 보고 유전자를 함유하는 렌티바이러스로 형질도입되었다. 형질도입 및 형질도입되지 않은 Treg를 10일 동안 배양하고 GFP를 측정하여 형질도입 효능을 평가하였다. 도 2는 형질도입된 Treg의 67.3%가 GFP를 발현했음을 보여준다(즉, 항-ASGR1 CAR 작제물을 함유함).

[0613] **실시예 3 - HepG2 세포주 상의 ASGR1 발현의 검증**

[0614] HepG2 세포는 분극된 인간 간세포 연구를 위한 적합한 시험관 내 모델 시스템이다. HepG2에서 ASGR1의 발현은 FACS에 의해 확인되었고 불멸화된 인간 골수형성 백혈병 세포주인 K562 세포와 비교되었다. 도 3은 HepG2 세포에서 ASGR1의 높은 발현이 있음을 보여준다. HepG2 세포는 다음 실험에서 CAR-Treg 표적 세포로서 사용될 것이다

[0615] **실시예 4 - 항-ASGR1 CAR-Treg의 항원 특이성의 평가**

[0616] 본 발명자는 ASGR1을 발현하는 세포주 HepG2로 배양한 후 Treg의 활성화 및 증식을 평가했으며, 항-ASGR1 CAR을 발현하는 Treg만이 ASGR1 자극에 대한 반응으로 CD69를 상향조절한다는 것을 확인하였다.

[0617] 도 4는 배지 단독의 존재 하에서 CD69의 상향조절이 관찰되지 않음을 보여준다. HepG2 세포로 배양한 후, GFP+ 형질도입된 Treg (GPF 음성 형질도입 세포 또는 형질도입되지 않은 세포는 제외)만이 CD69를 상향조절한다. 대조적으로, 모든 세포는 비특이적 항-CD3/CD28 비드 자극과 함께 배양될 때 CD69를 상향조절하였다.

[0618] **실시예 5 - 항-ASGR1 CAR-Treg의 항원 특이성 억제 기능의 평가**

[0619] 항원 특이적 방식으로 활성화된 효과기 CD4+CD25-T 세포의 증식을 억제하는 항-ASGR1 CAR Treg의 능력을 평가하기 위해, 사전 활성화된 CD4+CD25- 효과기 T 세포를 HepG2 세포의 존재 하에 항-ASGR1 CAR-Treg 또는 형질도입되지 않은 Treg와 공동 배양하였다.

[0620] Teff 사전 활성화 조건은 다음과 같다: 활성화된 CD4+CD25- T 세포; aCD3/CD28 비드 1:10; 14시간. 억제 검정 조건은 다음과 같았다: 3일 배양; 100,000 Teff; 30,000 HepG2; 형질도입되지 않은 vs 항ASGR1 CAR-Treg.

[0621] 억제 검정(도 5 및 도 6)은 증식 염료로 염색되고 항-CD3/CD28 비드로 사전 활성화된 효과기 T 세포의 증식 능력에 대한 항-ASGR1 CAR-Treg의 영향을 보여준다. HepG2 자극에 대한 반응으로, 항-ASGR1 CAR Treg는 형질도입되지 않은 Treg보다 낮은 Treg:T 효과기 비율에서 기존의 T 세포 증식을 효과적으로 억제할 수 있었다.

[0622] **실시예 6 - 항-HLA.A2 IL2R CAR-Treg의 생성**

[0623] STAT5 결합 모티프 및 JAK1- 및/또는 JAK2-결합 모티프를 포함하는 (선택적으로 JAK3 결합 모티프를 포함하고/하거나 STAT3 결합 모티프를 포함하지 않는) 엔도도메인의 효능은 HLA.A2-CAR 작제물을 사용하여 실시예 6 내지 13에서 입증된다. 예시된 항원 결합 도메인은 HLA.A2를 표적으로 하지만, 엔도도메인은 예를 들어 간 특이적 항원, 예를 들어 ASGR을 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR 작제물에 광범위하게 적용 가능한 것으로 간주된다.

[0624] CD4+CD25hiCD127low 세포를 단리하고 항-CD3/CD28 비드로 활성화하였다. 활성화 3일 후 Treg는 HLA.A2-CAR 작제물 (도 7) 및 GFP 리포터 유전자를 함유하는 렌티바이러스로 형질도입되었다. 다클론성 활성화 후 전체 Treg의 세포 확장은 형질도입되지 않은 Treg 또는 형질도입된 Treg 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 8).

[0625] **실시예 7 - 시간 경과에 따른 항-HLA.A2 IL2R 작제물의 형질도입 효능의 정량화**

[0626] GFP 발현은 세포 활성화 후 상이한 시점에서 형질도입되지 않은 Treg 및 CAR 작제물로 형질도입된 Treg에서 분석되었다.

[0627] GFP+ 세포의 빈도를 분석하여 Treg 확장 기간 동안 상이한 작제물의 발현 지속성 및 형질도입 효능을 평가하였다. dCAR, CD28z, 작제물 1, 2 및 3을 포함하는 Treg는 형질도입 후 유사한 발현 빈도를 나타내었다. 전체 Treg 중 GFP+ 세포의 백분율은 다클론성 세포 확장 동안 유지되었다(도 9).

[0628] **실시예 8 - 형질도입된 Treg에서 항-HLA.A2 IL2R CAR 작제물의 세포 표면 발현의 정량화**

[0629] 형질도입되지 않은 Treg 및 형질도입된 Treg에 대한 CAR 작제물의 막 발현을 PE-접합된 HLA-A*0201/CINGVCWTV 덱스트라머(Immudex, 코펜하겐, 덴마크)로 분석하였다. 세포 표면(HLA-A2 덱스트라머+)에서 CAR 단백질을 발현하는 Treg의 빈도는 모든 작제물 사이에서 유사하였다(도 10).

[0630] **실시예 9 - 다클론성 세포 확장 후 CAR Treg의 표현형 특성화**

[0631] Treg를 항-CD3/CD28 활성화 비드 및 IL-2의 존재 하에 15일 동안 배양하고 확장시켰다. Treg 관련 마커 FOXP3, HELIOS, CTLA4 및 TIGIT는 배양 15일째에 표현형 계통 안정성을 평가하기 위해 형질도입되지 않은 Treg 및 형질도입된 Treg에 대한 FACS에 의해 분석되었다.

[0632] 비형질도입 및 CAR 형질도입은 다클론성 확장 후 Treg 계통 및 기능과 연관된 단백질의 유사한 발현 수준을 보여주었다(도 11).

[0633] **실시예 10 - HLA.A2 IL2R CAR-Treg의 항원 특이성의 평가**

[0634] 형질도입되지 않은 Treg 및 형질도입된 Treg를 상이한 자극의 존재 하에 18시간 동안 배양하였다. CD69 및 CD137 활성화 마커를 분석하여 특이적 및 비특이적 세포 활성화를 평가하였다.

[0635] CD28z, 작제물 1, 2 및 3 CAR을 갖는 형질도입된 Treg는 T 세포 활성화 마커의 발현에 기초하여 HLA-A2 분자에 대해 유사한 특이성을 나타내었다. CD69 및 CD137의 발현은 불활성화된 세포에서 또는 HLA-A1 발현 세포와의 배양 후에 증가하지 않았다. dCAR 작제물은 신호전달 엔도도메인의 결여로 인해 활성화를 나타내지 않았다(도 12).

[0636] **실시예 11 - IL2R CAR 신호전달의 지표로서의 STAT5 인산화 분석**

[0637] 형질도입된 CAR Treg를 IL2가 없는 배양 배지에서 밤새 휴지시켰다. Treg의 STAT5 인산화는 배지 단독, 1000 IU/ml IL-2 또는 HLA.A2-Ig 기반 인공 APC의 존재 하에 배양 10분 및 120분 후 FACS 분석에 의해 평가되었다

(DOI: 10.3791/2801에 설명된 프로토콜에 따라 생성됨).

[0638] IL2R 엔도도메인의 CAR 작제물로의 통합은 HLA-A2 분자에 의한 CAR 활성화 후 STAT5의 효율적인 인산화를 보여주었다. HLA-A2 비드로 배양한 후 IL2R 엔도도메인이 없는 CAR-Treg에서는 pSTAT5의 유의한 증가가 검출되지 않았다(도 13).

[0639] **실시예 12 - IL-2가 없는 경우 비특이적 및 HLA.A2 특이적 활성화 후 Treg 생존의 평가**

[0640] 상이한 작제물을 갖는 CAR 형질도입된 Treg를 IL-2의 존재 없이 항-CD3/28 활성화 비드 및 K562.A2 발현 세포와 함께 배양하였다. 세포 생존을 FACS 분석에 의해 활성화 후 7일에 평가하였다.

[0641] IL2R 엔도도메인을 함유하는 CAR 작제물을 발현하는 Treg는 HLA-A2 발현 세포를 사용한 세포 배양 후 참조 CD28z와 비교하여 증가된 세포 생존력을 나타내었다. Treg의 다클론성 활성화 후에는 차이가 관찰되지 않았으며, 이는 효과가 CAR 신호전달에 의존함을 입증한다(도 14).

[0642] **실시예 13 - Treg 억제 효능 테스트: B 세포에 대한 공동자극 분자의 조절을 분석하여 Treg의 면역 조절 기능을 평가한다.**

[0643] Treg와의 공동 배양 후 CD80 및 CD86의 B 세포 발현을 분석하여 항원 제시 세포에 대한 공동 자극 분자의 발현을 감소시키는 Treg의 능력을 평가하였다.

[0644] CD28z, 작제물 1 및 작제물 2 CAR을 발현하는 Treg는 Treg를 발현하는 비형질도입 또는 dCAR과 비교하여 증가된 억제 기능을 보여주었다. B 세포 상에서의 CD80 및 CD86 발현은 CAR 분자를 통해 신호를 전달하는 Treg를 사용한 배양 후에만 하향조절된다(도 15).

[0645] **실시예 14 - 간 세포에서 알부민 생산에 대한 CAR Treg의 효과 평가**

[0646] 방법:

[0647] 10%FBS, 2mM L-글루타민, 1% ITS, 10nM Hepes, 50 IU/mL의 인간 재조합 인터류킨-2가 있거나/없는 100U/L Pen/Strep (Aldesleukin, Novartis)이 보충된 윌리엄(Williams) E 배지 (Gibco)에서 225K/cm2 (절반 면적 96웰 플레이트 또는 트랜스웰 플레이트에서 36K/웰)의 세포 밀도로 냉동보존된 성인 인간 일차 간세포(Lonza)를 유형-1 콜라겐 (랫트 꼬리 유래된) -코팅된 플레이트 상에서 플레이팅하였다. 24시간 후 간세포가 부착되면, CD4+CD25-효과기 T 세포의 존재 또는 부재하에 CD4+CD25+Foxp3+ 조절 T 세포를 배양물에 첨가하였다. 상청액을 48시간마다 교체하고 분석을 위해 동결보존하였다. 간접 공동 배양은 HTS Transwell 멤브레인(공극 크기 0.4 um; CORNING)을 사용하여 착수되었다. 일부 실험에 대해, 조절 T 세포 및 효과기 T 세포는 항-CD3 및 항-CD28 비드의 존재하에 사전 활성화되었다. 다른 실험을 위해, 사전 활성화되지 않은 조절 T 세포를 배양 플레이트에 첨가하기 전에 항-ASGPR1 CAR(실시예 1에 기재된 바와 같은 작제물 1)로 렌티바이러스 형질도입하였다. 일부 실험에서 간세포는 확장 조절 T 세포를 함유하는 배양물에서 얻은 조건화 배지로 배양되었다. 간세포 기능 및 생존력의 마커인 알부민 농도는 인간 알부민 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA - Bethyl Laboratories)을 사용하여 배지에서 측정되었다. 통계 분석을 위해 던(Dunn)의 그룹 간 사후 테스트와 함께 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 비모수 테스트를 수행하였다. 별표는 $p<0.05$를 나타낸다. 간세포 단독 및 $p<0.05$와의 쌍별 비교만 표시된다. 표시된 플롯은 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

[0648] 결과: 항원 자극에 반응하여 간 세포에 대한 영양 및 세포보호 효과를 매개하는 항-ASGPR CAR Treg의 능력을 결정하기 위해, 본 발명자들은 1차 인간 간세포를 Treg 및/또는 효과기 T 세포의 상이한 조합과 함께 최대 7일 동안 배양하는 공동-배양 실험을 설정하였다. 간세포 표현형 안정성 및 기능에 대한 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 간세포 합성 기능, 생존력 및 계통 안정성과 상관관계가 있는 상청액으로 알부민 생산을 정량화한다. 항-CD3/항-CD28 비드의 존재 하에 이전에 활성화된 Treg를 배양된 일차 간세포에 첨가하면 알부민 수준이 증가하였다. 이 효과는 공동 배양 3일 후에는 유의했지만 7일째에는 더 이상 중요하지 않았으며, 이는 Treg가 간세포에 영양 효과를 발휘하기 위해 반복적인 항원 자극을 받아야 할 필요성을 반영한다(도 16). Treg의 유익한 효과는 활성화된 Treg에서 얻은 조건화 배지로 간세포를 배양함으로써 복제될 수 있다는 점을 감안할 때 세포 대 세포 접촉을 필요로 하지 않았다(도 17). 참고로, 48시간마다 반복적으로 배양 플레이트에 첨가된 조건화 배지는 일반적으로 매주 재활성화가 필요한 사전 활성화된 Treg보다 더 지속적인 유익한 효과를 유도하였다. Treg와 대조적으로, 효과기 T 세포는 알부민 수준을 증가시킬 수 없었다(도 17).

[0649] 휴지(사전 활성화되지 않음) Treg의 사용은 더 약한 중요하지 않은 효과를 발휘하였다(도 18). 휴지 Treg가 배양된 간세포에서 ASGPR을 인식하고 Treg 활성화를 유도할 수 있는 항-ASGPR CAR을 발현했을 때만 상당한 효과가

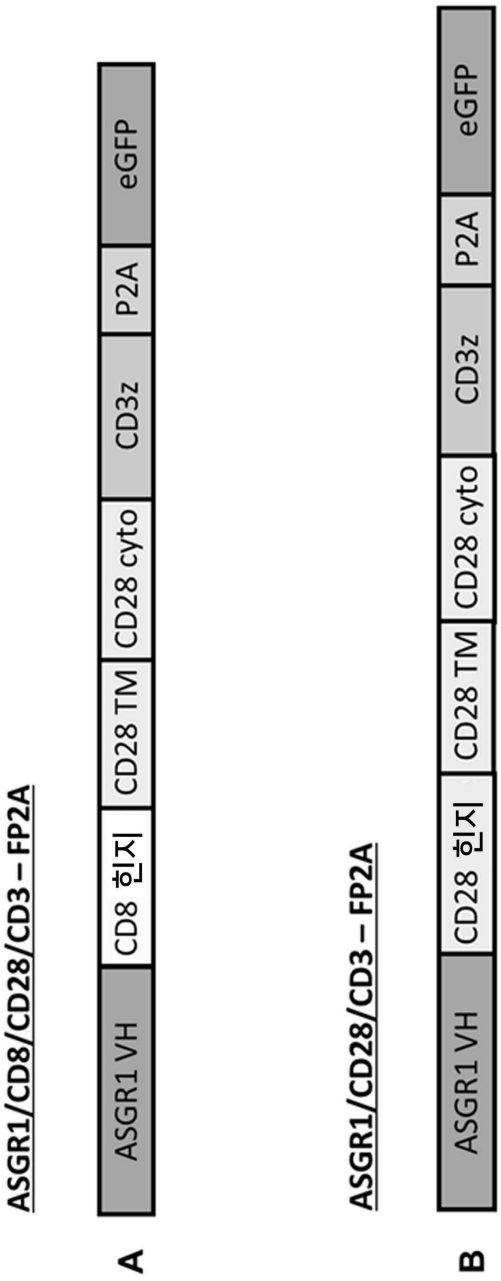
달성되었다(도 18).

[0650] 이러한 결과는 조절 T 세포(Treg)가 간 세포에 영양 세포보호 효과를 제공할 수 있음을 보여준다. 이를 위해서는 Treg 활성화가 필요하며 세포 대 세포 접촉이 없을 때 발생할 수 있다. Treg의 활성화는 항-CD3/항-CD28 비드와 같은 기존의 T 세포 자극제로 이들을 자극하거나 ASGPR과 같은 간세포 특이적 항원을 인식한 후 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 CAR로 형질도입함으로써 달성될 수 있다.

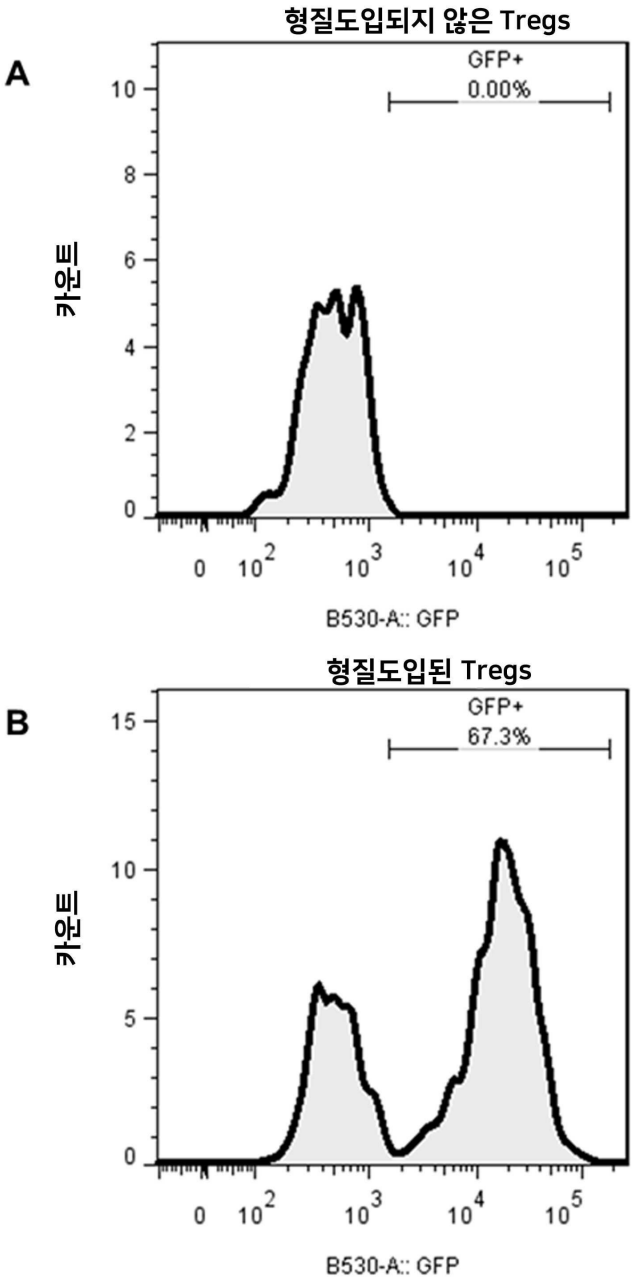
[0651] 상기 명세서에 언급된 모든 공보는 참고로 본 명세서에 포함된다. 본 발명의 개시된 방법, 세포, 조성물 및 용도의 다양한 변형 및 변경은 본 발명의 범위 및 사상으로부터 벗어남이 없이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명이 특정한 바람직한 구현예와 관련하여 개시되었지만, 청구된 바와 같은 본 발명이 그러한 특정한 구현예에 과도하게 제한되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 당업자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 개시된 모드의 다양한 수정은 다음 청구범위의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

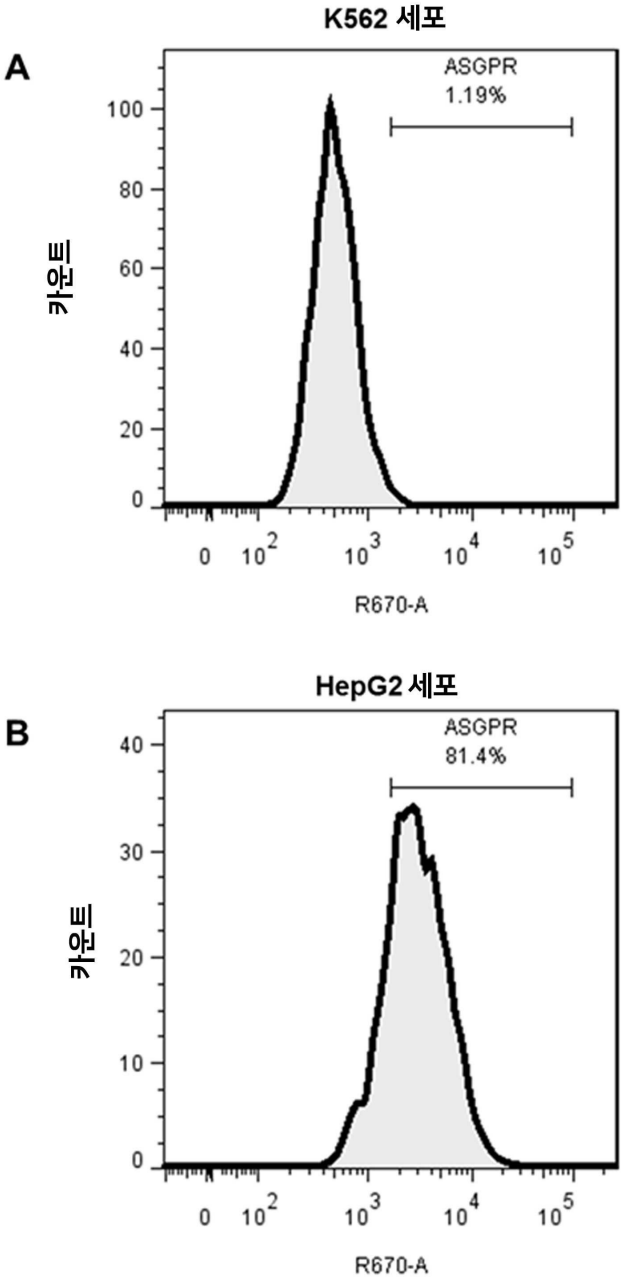
도면1



도면2


A
형질도입되지 않은 Tregs
GFP+
0.00%
카운트
B530-A:: GFP
B
형질도입된 Tregs
GFP+
67.3%
카운트
B530-A:: GFP

도면3

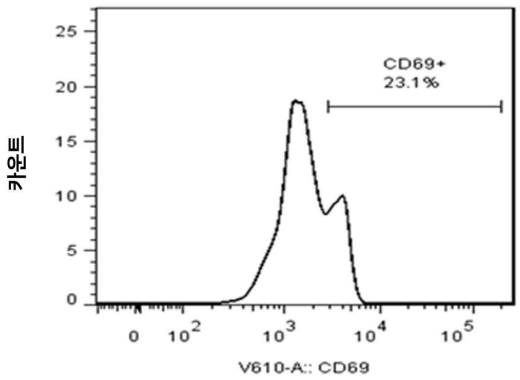


도면4a

A

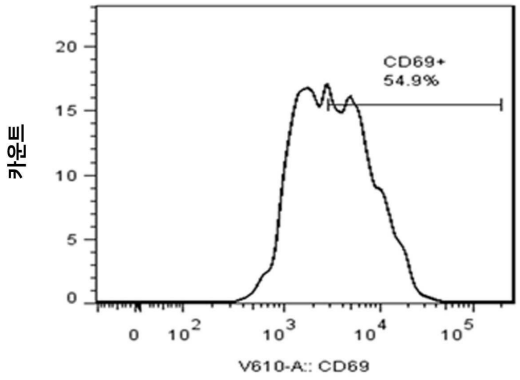
(i) MEDIA

형질도입된 TREGS
(GFP+)



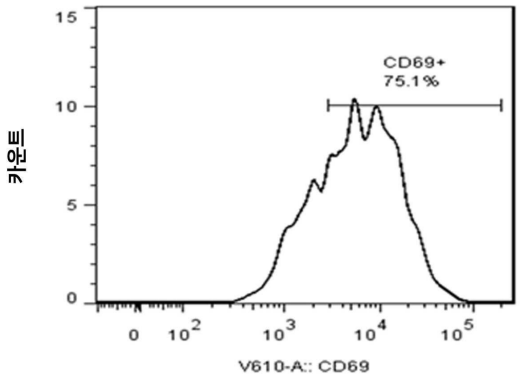
(ii) HEPG2

형질도입된 TREGS
(GFP+)



(ii) CD3/CD28 BEADS

형질도입된 TREGS
(GFP+)

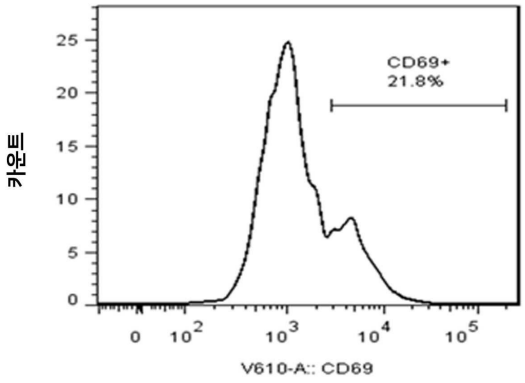


도면4b

B

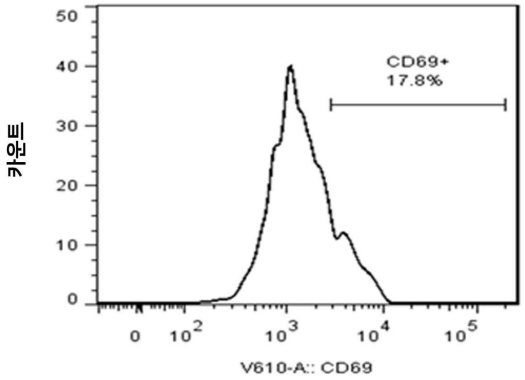
(i) MEDIA

형질도입된 TREGS
(GFP-)



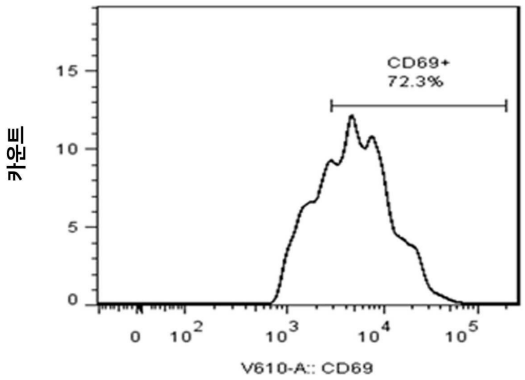
(ii) HEPG2

형질도입된 TREGS
(GFP-)



(ii) CD3/CD28 BEADS

형질도입된 TREGS
(GFP-)

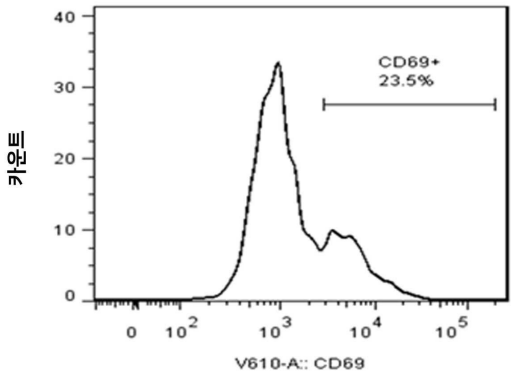


도면4c

C

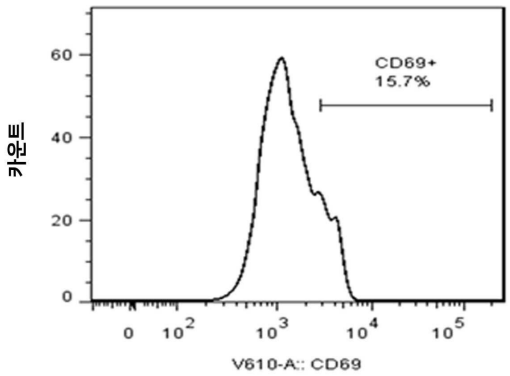
(i) MEDIA

형질도입되지 않은 TREGS



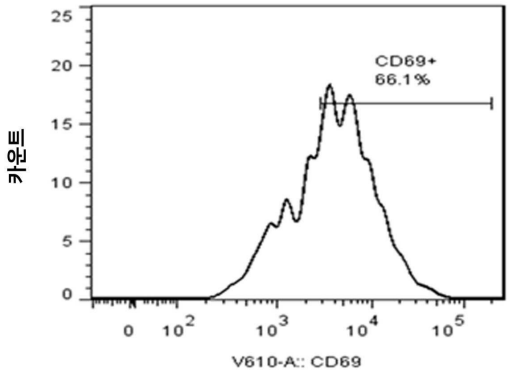
(ii) HEPG2

형질도입되지 않은 TREGS

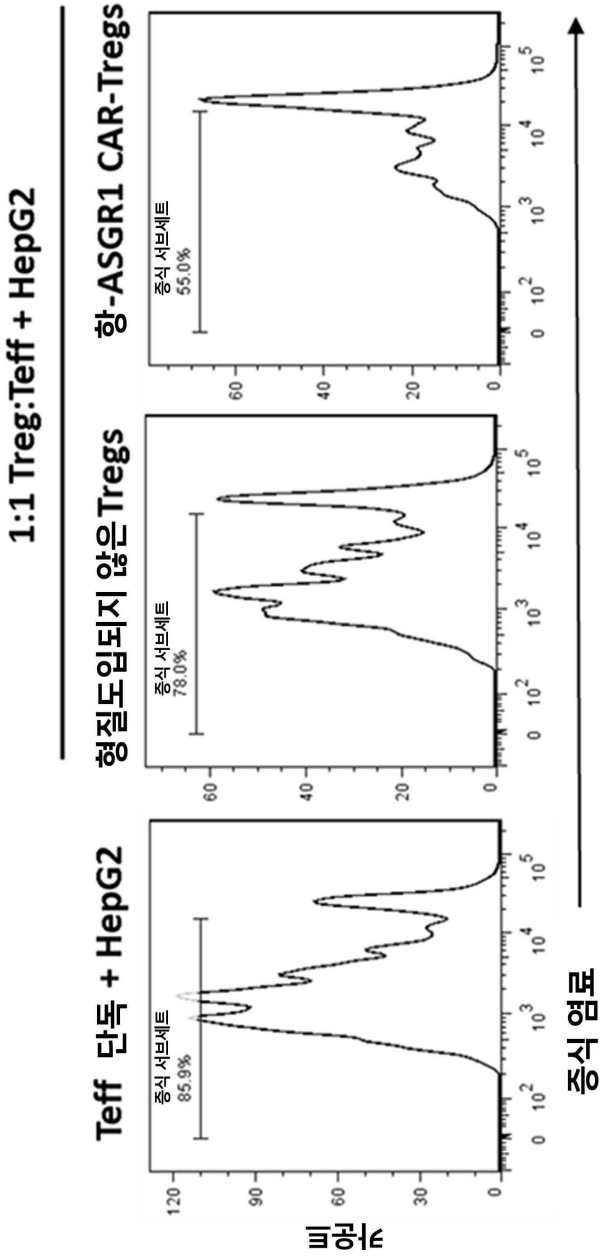


(ii) CD3/CD28 BEAD

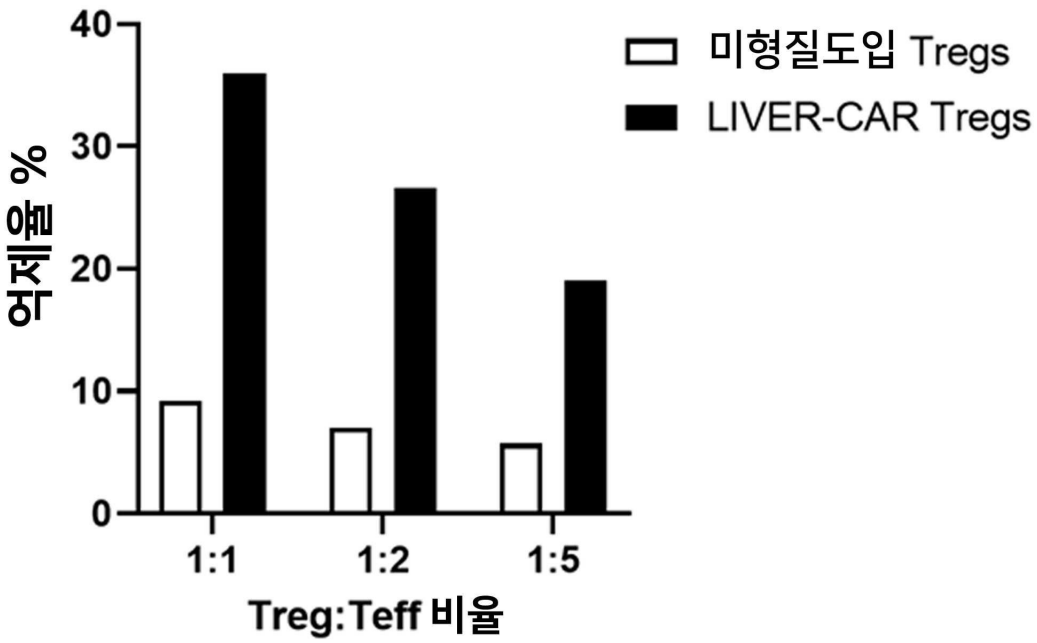
형질도입되지 않은 TREGS



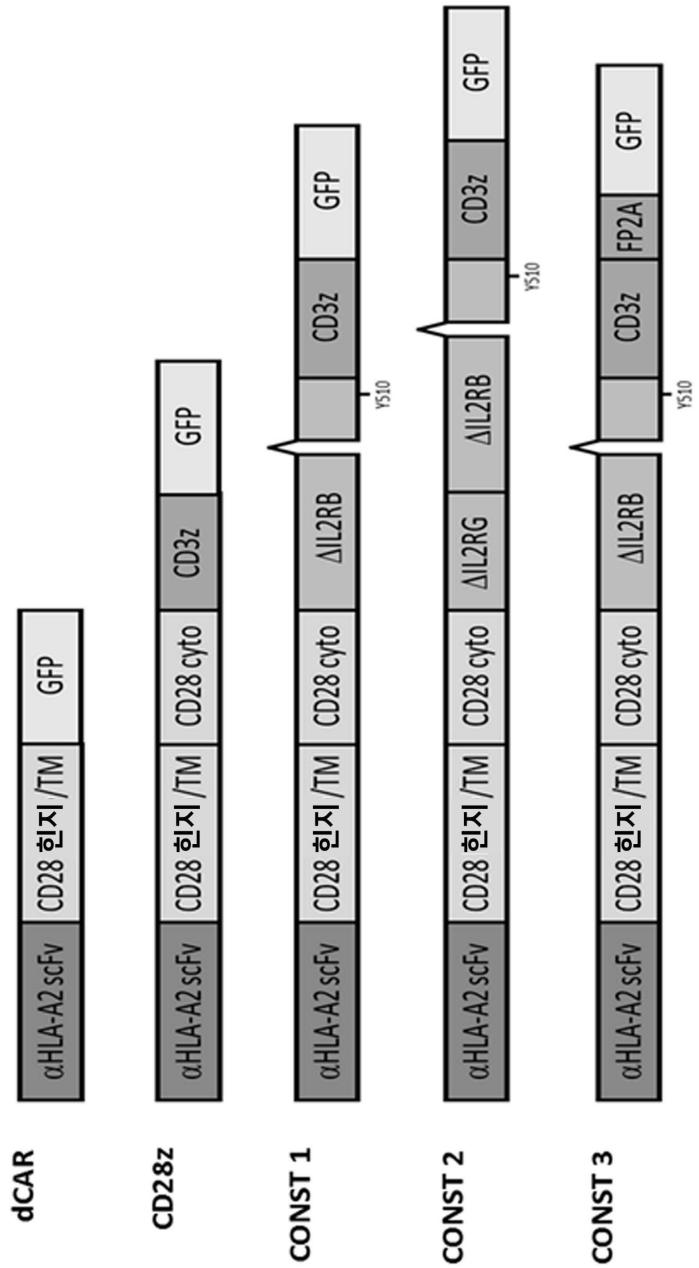
도면5


1:1 Treg:Teff + HepG2
Teff 단독 + HepG2
형질도입되지 않은Tregs
항-ASGR1 CAR-Tregs
중식 서브세트
85.9%
78.0%
55.0%
카운트
중식 염료

도면6

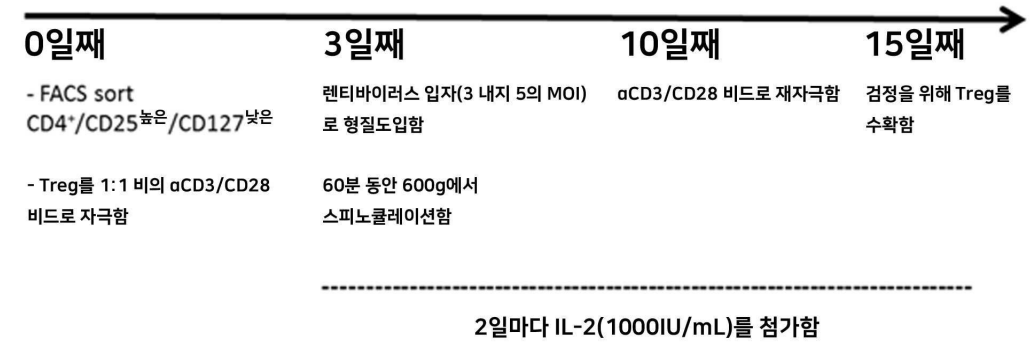

40
30
20
10
0
억제율 %
1:1
1:2
1:5
Treg:Teff 비율
미형질도입 Tregs
LIVER-CAR Tregs

도면7

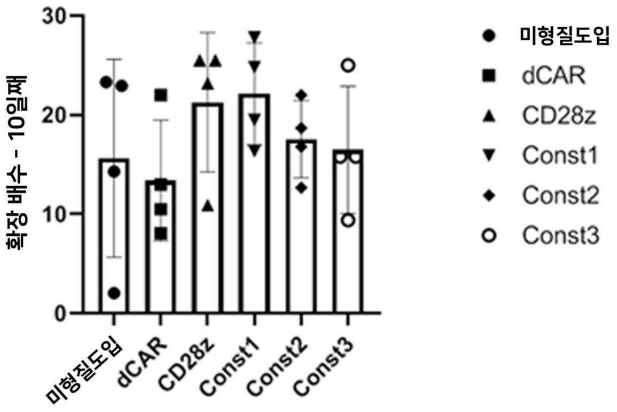

dCAR
αHLA-A2 scFv
CD28 힌지/TM
GFP
CD28z
αHLA-A2 scFv
CD28 힌지/TM
CD28 cyto
CD3z
GFP
CONST 1
αHLA-A2 scFv
CD28 힌지/TM
CD28 cyto
ΔIL2RB
Y510
CD3z
GFP
CONST 2
αHLA-A2 scFv
CD28 힌지/TM
CD28 cyto
ΔIL2RG
ΔIL2RB
Y510
CD3z
GFP
CONST 3
αHLA-A2 scFv
CD28 힌지/TM
CD28 cyto
ΔIL2RB
Y510
CD3z
FP2A
GFP

도면8

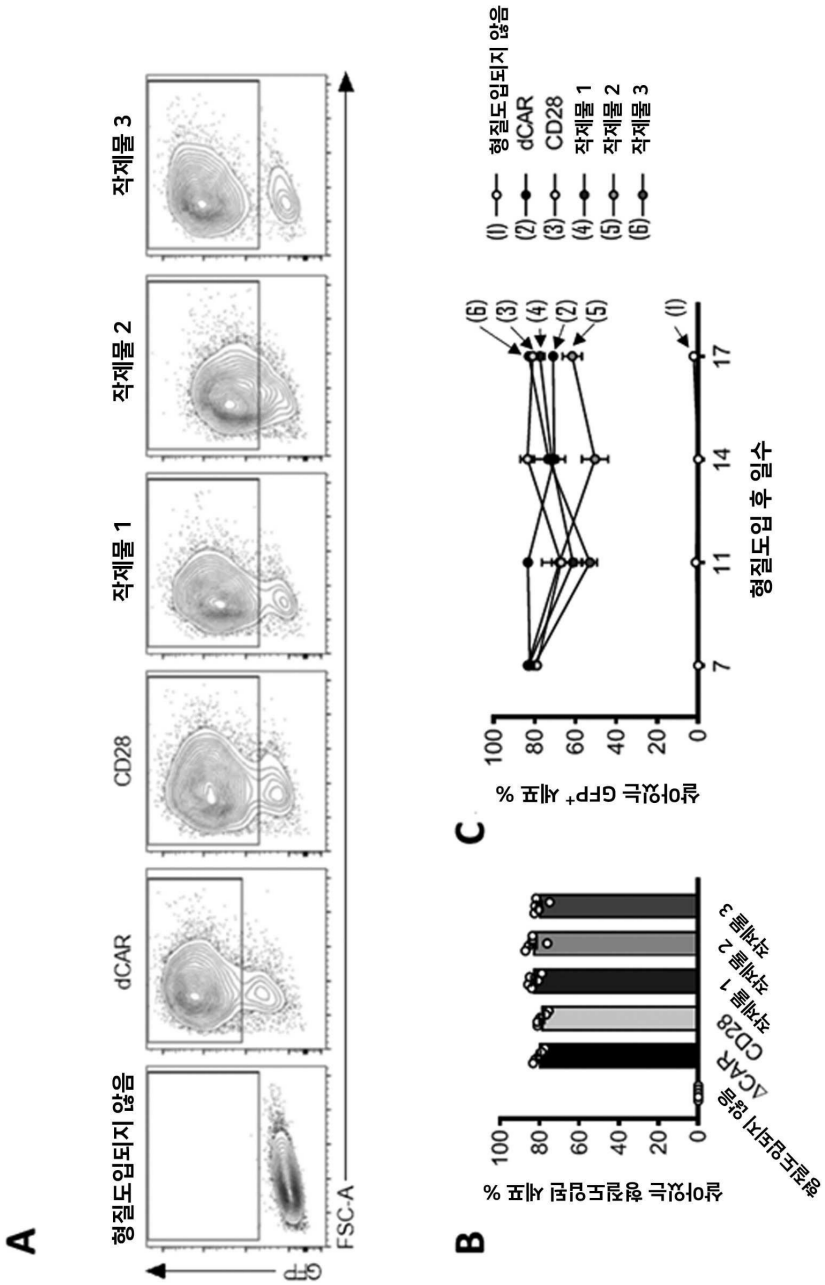
A


0일째
- FACS sort CD4+/CD25높은/CD127낮은
- Treg를 1:1 비의 αCD3/CD28 비드로 자극함
3일째
렌티바이러스 입자(3 내지 5의 MOI)로 형질도입함
60분 동안 600g에서 스피노큘레이션함
10일째
αCD3/CD28 비드로 재자극함
15일째
검정을 위해 Treg를 수확함
2일마다 IL-2(1000IU/mL)를 첨가함

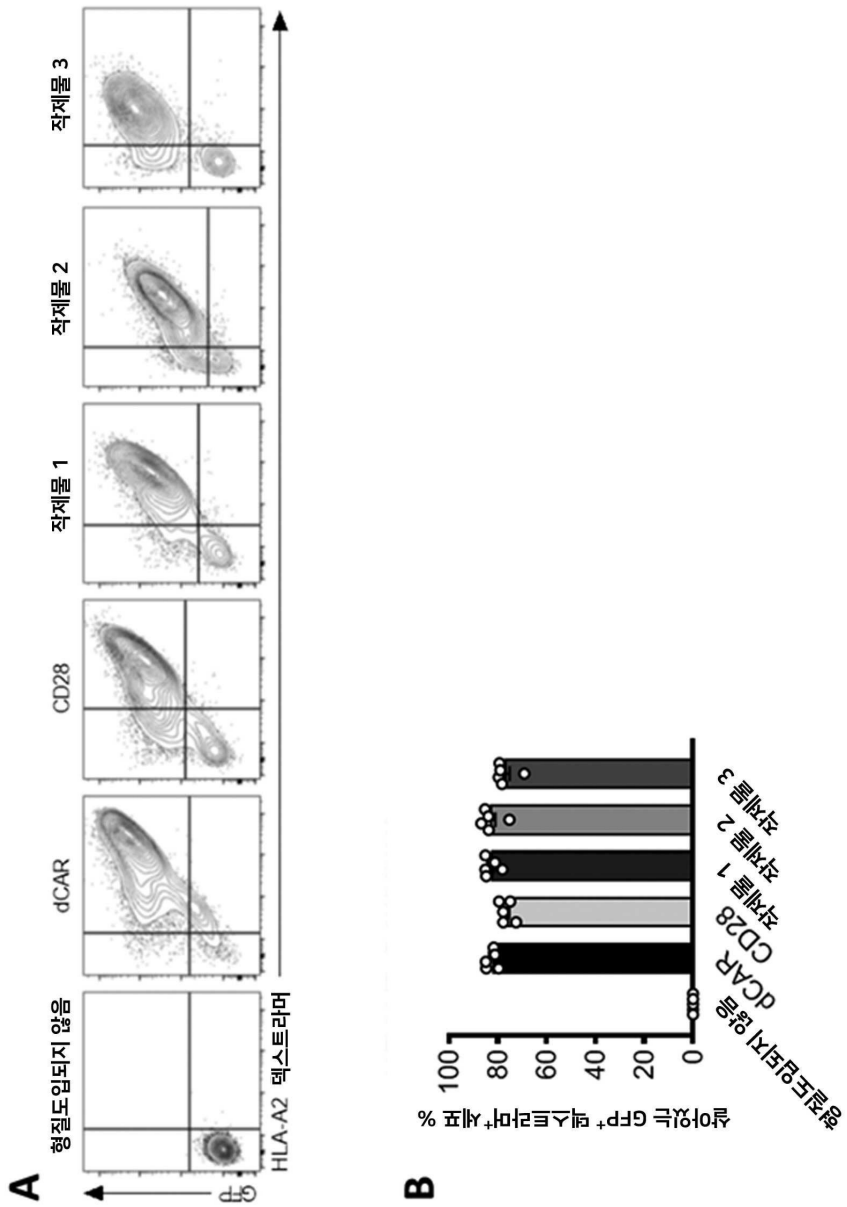
B


확장 배수 - 10일째
30
20
10
0
미형질도입
dCAR
CD28z
Const1
Const2
Const3

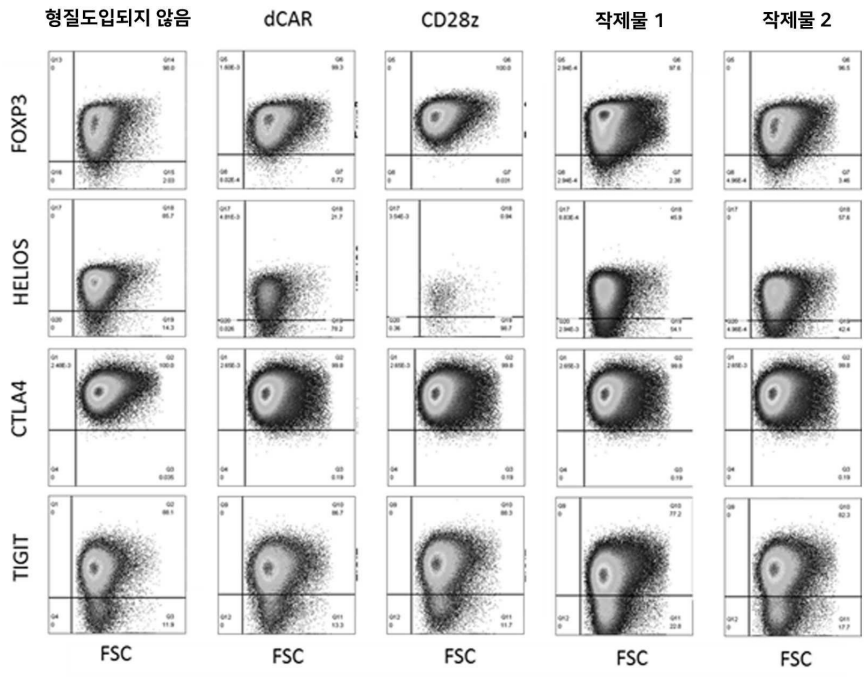
도면9


A
형질도입되지 않음
dCAR
CD28
작제물 1
작제물 2
작제물 3
GFP
FSC-A
B
살아있는 형질도입된 세포 %
형질도입되지 않음
ΔCAR
CD28
작제물 1
작제물 2
작제물 3
C
살아있는 GFP+ 세포 %
형질도입 후 일수
(1) 형질도입되지 않음
(2) dCAR
(3) CD28
(4) 작제물 1
(5) 작제물 2
(6) 작제물 3

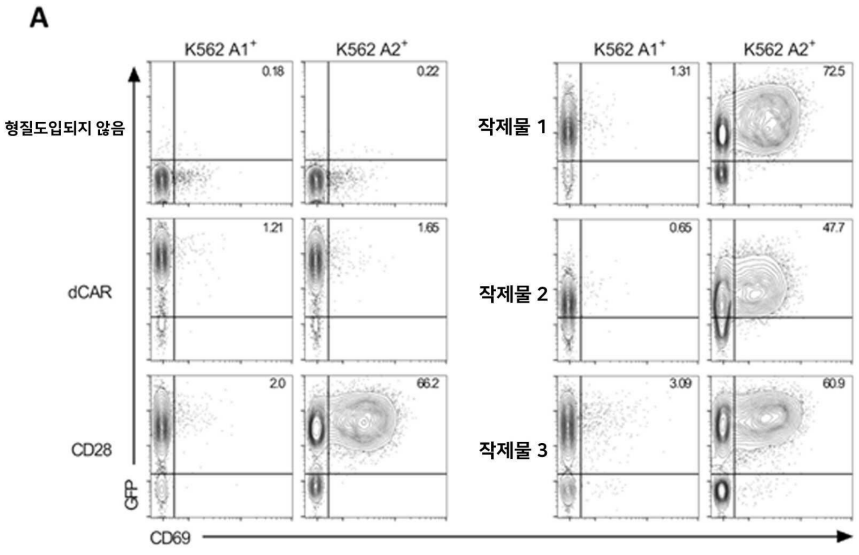
도면10


A
형질도입되지 않음
dCAR
CD28
작제물 1
작제물 2
작제물 3
GFP
HLA-A2 덱스트라머
B
살아있는 GFP+ 덱스트라머+ 세포 %
0
20
40
60
80
100
형질도입되지 않음
dCAR
CD28
작제물 1
작제물 2
작제물 3

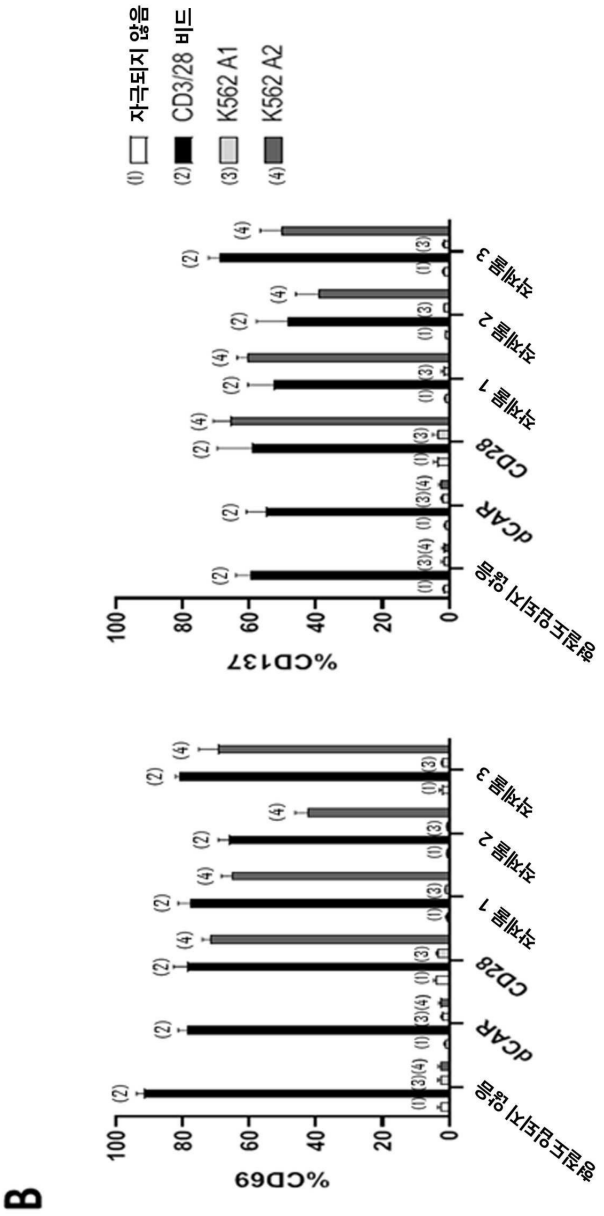
도면11


형질도입되지 않음
dCAR
CD28z
작제물 1
작제물 2
FOXP3
HELIOS
CTLA4
TIGIT
FSC
FSC
FSC
FSC
FSC

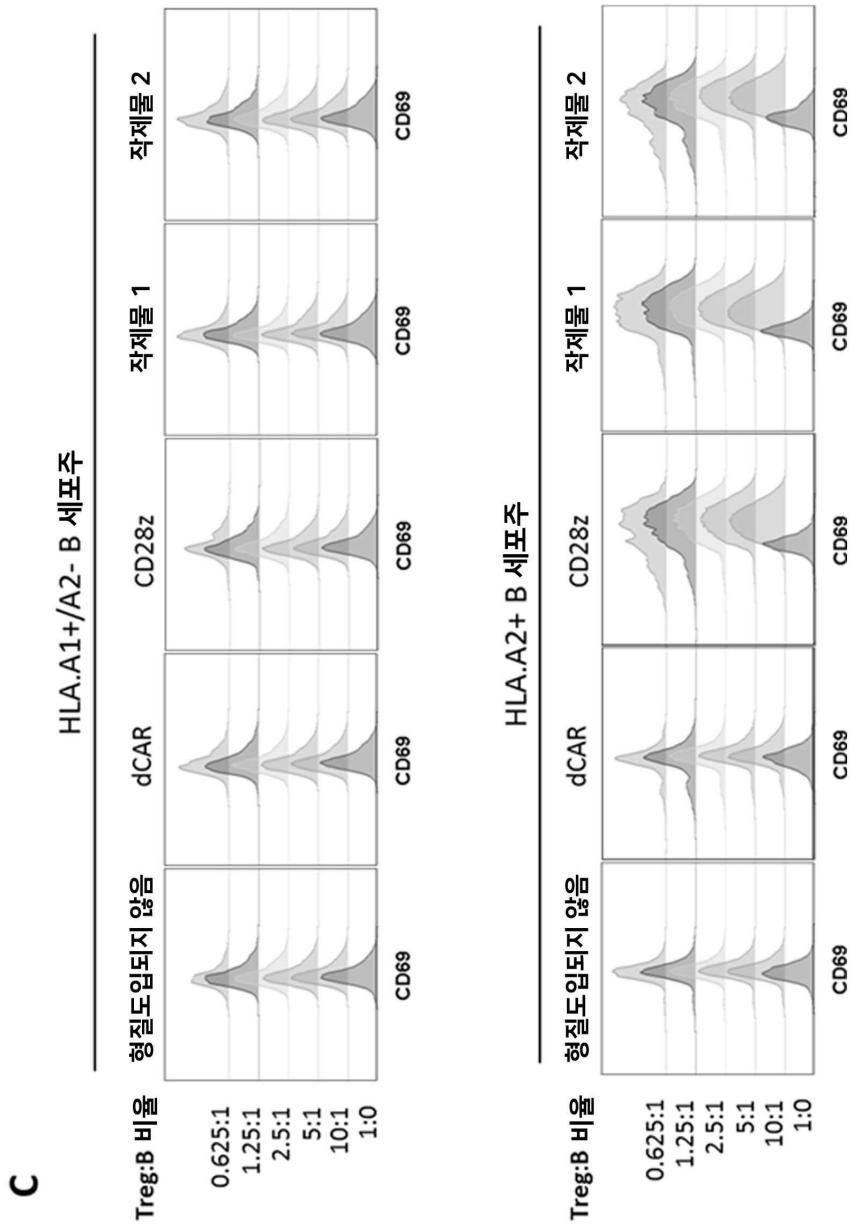
도면12a


A
K562 A1+
K562 A2+
K562 A1+
K562 A2+
형질도입되지 않음
dCAR
CD28
GFP
CD69
0.18
0.22
1.21
1.65
2.0
66.2
작제물 1
작제물 2
작제물 3
1.31
72.5
0.65
47.7
3.09
60.9

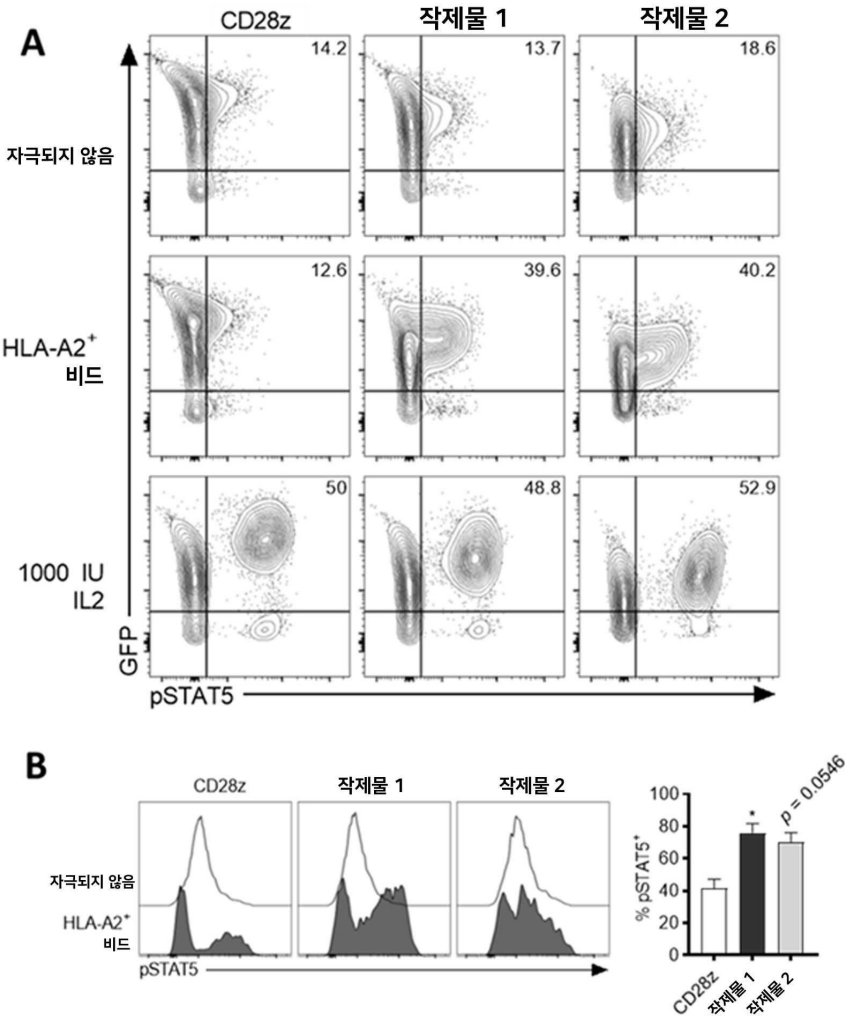
도면12b


B
(1) 자극되지 않음
(2) CD3/28 비드
(3) K562 A1
(4) K562 A2
%CD69
%CD137
형질도입되지 않음
dCAR
CD28
작제물 1
작제물 2
작제물 3
0
20
40
60
80
100

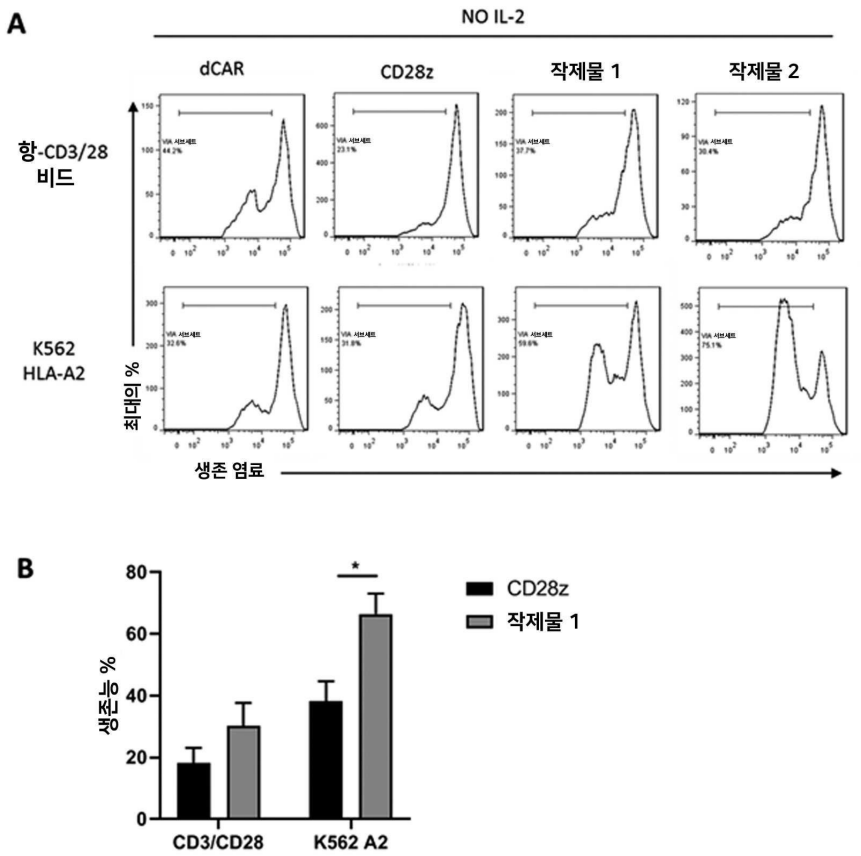
도면12c


C
HLA.A1+/A2- B 세포주
HLA.A2+ B 세포주
Treg:B 비율
0.625:1
1.25:1
2.5:1
5:1
10:1
1:0
형질도입되지 않음
dCAR
CD28z
작제물 1
작제물 2
CD69

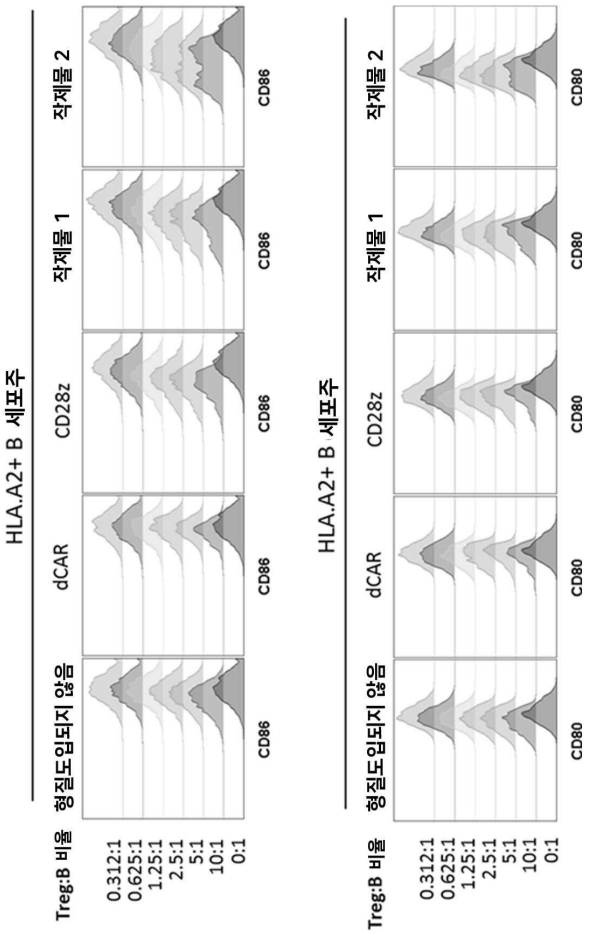
도면13


A
CD28z
작제물 1
작제물 2
14.2
13.7
18.6
자극되지 않음
12.6
39.6
40.2
HLA-A2+
비드
50
48.8
52.9
1000 IU
IL2
GFP
pSTAT5
B
CD28z
작제물 1
작제물 2
자극되지 않음
HLA-A2+
비드
pSTAT5
% pSTAT5+
100
80
60
40
20
0
*
p = 0.0546
CD28z
작제물 1
작제물 2

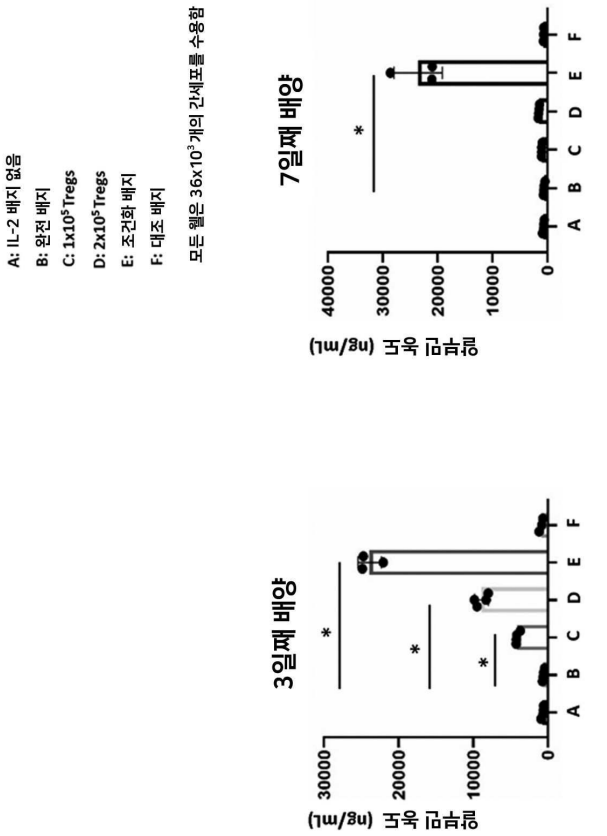
도면14


A
NO IL-2
dCAR
CD28z
작제물 1
작제물 2
항-CD3/28
비드
K562
HLA-A2
최대의 %
생존 염료
B
CD28z
작제물 1
생존능 %
80
60
40
20
0
*
CD3/CD28
K562 A2

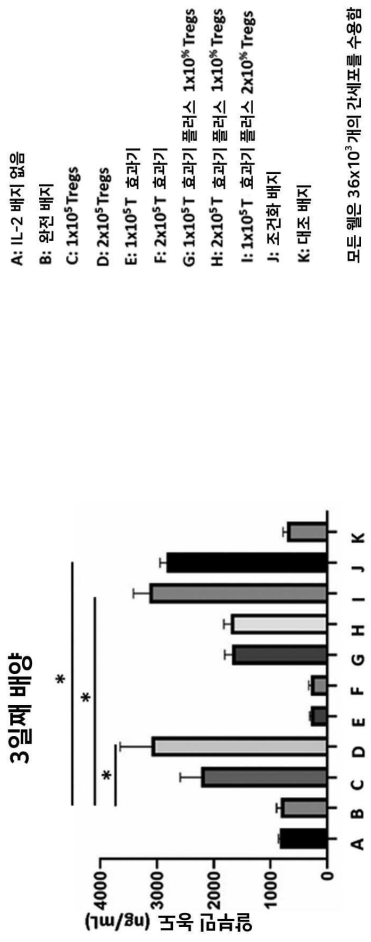
도면15


HLA.A2+ B 세포주
Treg:B 비율
형질도입되지 않음
dCAR
CD28z
작제물 1
작제물 2
0.312:1
0.625:1
1.25:1
2.5:1
5:1
10:1
0:1
CD86
CD80

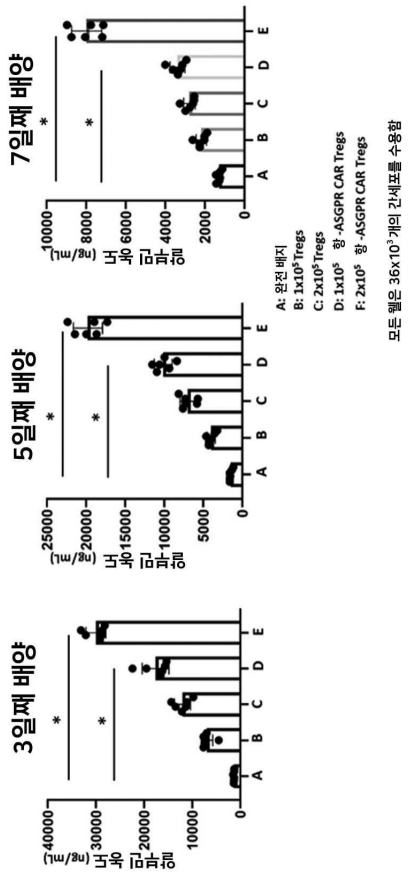
도면16


A: IL-2 배지 없음
B: 완전 배지
C: 1x10^5 Tregs
D: 2x10^5 Tregs
E: 조건화 배지
F: 대조 배지
모든 웰은 36x10^3 개의 간세포를 수용함
7일째 배양
3일째 배양
알부민 농도 (ng/mL)
0
10000
20000
30000
40000
A B C D E F
*

도면17


A: IL-2 배지 없음
B: 완전 배지
C: 1x10⁵Tregs
D: 2x10⁵Tregs
E: 1x10⁵T 효과기
F: 2x10⁵T 효과기
G: 1x10⁵T 효과기 플러스 1x10⁵ Tregs
H: 2x10⁵T 효과기 플러스 1x10⁵ Tregs
I: 1x10⁵T 효과기 플러스 2x10⁵ Tregs
J: 조건화 배지
K: 대조 배지
모든 웰은 36x10³개의 간세포를 수용함
3일째 배양
알부민 농도 (ng/mL)
0
1000
2000
3000
4000
A B C D E F G H I J K
*
*
*

도면18



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> King's College London

<120> ENGINEERED REGULATORY T CELL

<130> 69.147001/01

<150> GB1912515.2

<151> 2019-08-30

<160> 175

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 291

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

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

1 5 10 15

Asp His His Gln Leu Arg Lys Gly Pro Pro Pro Pro Gln Pro Leu Leu

20 25 30

Gln Arg Leu Cys Ser Gly Pro Arg Leu Leu Leu Leu Ser Leu Gly Leu

35 40 45

Ser Leu Leu Leu Leu Val Val Val Cys Val Ile Gly Ser Gln Asn Ser

50 55 60

Gln Leu Gln Glu Glu Leu Arg Gly Leu Arg Glu Thr Phe Ser Asn Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Val Gly Arg Lys Met Lys Ser Leu Glu Ser Gln Leu Glu Lys Gln

100 105 110

Gln Lys Asp Leu Ser Glu Asp His Ser Ser Leu Leu Leu His Val Lys

115 120 125

Gln Phe Val Ser Asp Leu Arg Ser Leu Ser Cys Gln Met Ala Ala Leu

130 135 140

Gln Gly Asn Gly Ser Glu Arg Thr Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu

145 150 155 160

His Glu Arg Ser Cys Tyr Trp Phe Ser Arg Ser Gly Lys Ala Trp Ala

165 170 175

Asp Ala Asp Asn Tyr Cys Arg Leu Glu Asp Ala His Leu Val Val Val

180 185 190

Thr Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe Val Gln His His Ile Gly Pro Val

195 200 205

Asn Thr Trp Met Gly Leu His Asp Gln Asn Gly Pro Trp Lys Trp Val

210 215 220

Asp Gly Thr Asp Tyr Glu Thr Gly Phe Lys Asn Trp Arg Pro Glu Gln

225 230 235 240

Pro Asp Asp Trp Tyr Gly His Gly Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala

245 250 255

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

Pro Leu Leu
290

<210> 2
<211> 252
<212> PRT
<213> Human
<400> 2

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

165 170 175

Asp Gln Asn Gly Pro Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Glu Thr

180 185 190

Gly Phe Lys Asn Trp Arg Pro Glu Gln Pro Asp Asp Trp Tyr Gly His

195 200 205

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

210 215 220

Trp Asn Asp Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr Arg Trp Val Cys Glu Thr

225 230 235 240

Glu Leu Asp Lys Ala Ser Gln Glu Pro Pro Leu Leu

245 250

<210> 3

<211> 311

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Ala Lys Asp Phe Gln Asp Ile Gln Gln Leu Ser Ser Glu Glu Asn

1 5 10 15

Asp His Pro Phe His Gln Gly Glu Gly Pro Gly Thr Arg Arg Leu Asn

20 25 30

Pro Arg Arg Gly Asn Pro Phe Leu Lys Gly Pro Pro Pro Ala Gln Pro

35 40 45

Leu Ala Gln Arg Leu Cys Ser Met Val Cys Phe Ser Leu Leu Ala Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Glu Gly His Arg Gly Ala Gln Leu Gln Ala Glu Leu Arg Ser Leu

85 90 95

Lys Glu Ala Phe Ser Asn Phe Ser Ser Ser Thr Leu Thr Glu Val Gln

100 105 110

Ala Ile Ser Thr His Gly Gly Ser Val Gly Asp Lys Ile Thr Ser Leu

115 120 125

Gly Ala Lys Leu Glu Lys Gln Gln Gln Asp Leu Lys Ala Asp His Asp

130 135 140

Ala Leu Leu Phe His Leu Lys His Phe Pro Val Asp Leu Arg Phe Val

145 150 155 160

Ala Cys Gln Met Glu Leu Leu His Ser Asn Gly Ser Gln Arg Thr Cys

165 170 175

Cys Pro Val Asn Trp Val Glu His Gln Gly Ser Cys Tyr Trp Phe Ser

180 185 190

His Ser Gly Lys Ala Trp Ala Glu Ala Glu Lys Tyr Cys Gln Leu Glu

195 200 205

Asn Ala His Leu Val Val Ile Asn Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe Ile

210 215 220

Val Gln His Thr Asn Pro Phe Asn Thr Trp Ile Gly Leu Thr Asp Ser

225 230 235 240

Asp Gly Ser Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Arg His Asn Tyr

245 250 255

Lys Asn Trp Ala Val Thr Gln Pro Asp Asn Trp His Gly His Glu Leu

260 265 270

Gly Gly Ser Glu Asp Cys Val Glu Val Gln Pro Asp Gly Arg Trp Asn

275 280 285

Asp Asp Phe Cys Leu Gln Val Tyr Arg Trp Val Cys Glu Lys Arg Arg

290 295 300

Asn Ala Thr Gly Glu Val Ala

305 310

<210> 4

<211> 287

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Ala Lys Asp Phe Gln Asp Ile Gln Gln Leu Ser Ser Glu Glu Asn

1 5 10 15

Asp His Pro Phe His Gln Gly Pro Pro Pro Ala Gln Pro Leu Ala Gln
20 25 30
Arg Leu Cys Ser Met Val Cys Phe Ser Leu Leu Ala Leu Ser Phe Asn
35 40 45

Ile Leu Leu Leu Val Val Ile Cys Val Thr Gly Ser Gln Ser Ala Gln
50 55 60
Leu Gln Ala Glu Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ala Phe Ser Asn Phe Ser
65 70 75 80
Ser Ser Thr Leu Thr Glu Val Gln Ala Ile Ser Thr His Gly Gly Ser
85 90 95
Val Gly Asp Lys Ile Thr Ser Leu Gly Ala Lys Leu Glu Lys Gln Gln
100 105 110

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

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

Asp Asn Trp His Gly His Glu Leu Gly Gly Ser Glu Asp Cys Val Glu
245 250 255
Val Gln Pro Asp Gly Arg Trp Asn Asp Asp Phe Cys Leu Gln Val Tyr

260 265 270

Arg Trp Val Cys Glu Lys Arg Arg Asn Ala Thr Gly Glu Val Ala

275 280 285

<210> 5

<211> 292

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Ala Lys Asp Phe Gln Asp Ile Gln Gln Leu Ser Ser Glu Glu Asn

1 5 10 15

Asp His Pro Phe His Gln Gly Pro Pro Pro Ala Gln Pro Leu Ala Gln

20 25 30

Arg Leu Cys Ser Met Val Cys Phe Ser Leu Leu Ala Leu Ser Phe Asn

35 40 45

Ile Leu Leu Leu Val Val Ile Cys Val Thr Gly Ser Gln Ser Glu Gly

50 55 60

His Arg Gly Ala Gln Leu Gln Ala Glu Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ala

65 70 75 80

Phe Ser Asn Phe Ser Ser Ser Thr Leu Thr Glu Val Gln Ala Ile Ser

85 90 95

Thr His Gly Gly Ser Val Gly Asp Lys Ile Thr Ser Leu Gly Ala Lys

100 105 110

Leu Glu Lys Gln Gln Gln Asp Leu Lys Ala Asp His Asp Ala Leu Leu

115 120 125

Phe His Leu Lys His Phe Pro Val Asp Leu Arg Phe Val Ala Cys Gln

130 135 140

Met Glu Leu Leu His Ser Asn Gly Ser Gln Arg Thr Cys Cys Pro Val

145 150 155 160

Asn Trp Val Glu His Gln Gly Ser Cys Tyr Trp Phe Ser His Ser Gly

165 170 175

Lys Ala Trp Ala Glu Ala Glu Lys Tyr Cys Gln Leu Glu Asn Ala His

180 185 190

Leu Val Val Ile Asn Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe Ile Val Gln His

195 200 205

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

210 215 220

Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Arg His Asn Tyr Lys Asn Trp

225 230 235 240

Ala Val Thr Gln Pro Asp Asn Trp His Gly His Glu Leu Gly Gly Ser

245 250 255

Glu Asp Cys Val Glu Val Gln Pro Asp Gly Arg Trp Asn Asp Asp Phe

260 265 270

Cys Leu Gln Val Tyr Arg Trp Val Cys Glu Lys Arg Arg Asn Ala Thr

275 280 285

Gly Glu Val Ala

290

<210> 6

<211> 306

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Met Ala Lys Asp Phe Gln Asp Ile Gln Gln Leu Ser Ser Glu Glu Asn

1 5 10 15

Asp His Pro Phe His Gln Gly Glu Gly Pro Gly Thr Arg Arg Leu Asn

20 25 30

Pro Arg Arg Gly Asn Pro Phe Leu Lys Gly Pro Pro Pro Ala Gln Pro

35 40 45

Leu Ala Gln Arg Leu Cys Ser Met Val Cys Phe Ser Leu Leu Ala Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ala Gln Leu Gln Ala Glu Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ala Phe Ser

85 90 95

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

Leu Leu His Ser Asn Gly Ser Gln Arg Thr Cys Cys Pro Val Asn Trp
165 170 175
Val Glu His Gln Gly Ser Cys Tyr Trp Phe Ser His Ser Gly Lys Ala
180 185 190
Trp Ala Glu Ala Glu Lys Tyr Cys Gln Leu Glu Asn Ala His Leu Val
195 200 205
Val Ile Asn Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe Ile Val Gln His Thr Asn
210 215 220

Pro Phe Asn Thr Trp Ile Gly Leu Thr Asp Ser Asp Gly Ser Trp Lys
225 230 235 240
Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Arg His Asn Tyr Lys Asn Trp Ala Val
245 250 255
Thr Gln Pro Asp Asn Trp His Gly His Glu Leu Gly Gly Ser Glu Asp
260 265 270
Cys Val Glu Val Gln Pro Asp Gly Arg Trp Asn Asp Asp Phe Cys Leu
275 280 285

Gln Val Tyr Arg Trp Val Cys Glu Lys Arg Arg Asn Ala Thr Gly Glu
290 295 300
Val Ala
305
<210> 7
<211> 284
<212> PRT
<213> Mouse

<400> 7

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

Asp Asn Trp Tyr Gly His Gly Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala His
245 250 255
Phe Thr Thr Asp Gly Arg Trp Asn Asp Asp Val Cys Arg Arg Pro Tyr
260 265 270
Arg Trp Val Cys Glu Thr Lys Leu Asp Lys Ala Asn
275 280

<210> 8
<211> 255
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 8

Met Thr Lys Asp Tyr Gln Asp Phe Gln His Leu Asp Asn Asp Asn Asp

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

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

130 135 140
Trp Thr Glu Ala Asp Lys Tyr Cys Gln Leu Glu Asn Ala His Leu Val
145 150 155 160
Val Val Thr Ser Arg Asp Glu Gln Asn Phe Leu Gln Arg His Met Gly

165 170 175

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

180 185 190

Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Glu Thr Gly Phe Gln Asn Trp Arg Pro

195 200 205

Glu Gln Pro Asp Asn Trp Tyr Gly His Gly Leu Gly Gly Gly Glu Asp

210 215 220

Cys Ala His Phe Thr Thr Asp Gly Arg Trp Asn Asp Asp Val Cys Arg

225 230 235 240

Arg Pro Tyr Arg Trp Val Cys Glu Thr Lys Leu Asp Lys Ala Asn

245 250 255

<210> 9

<211> 301

<212> PRT

<213> Mouse

<400>

9

Met Glu Lys Asp Cys Gln Asp Ile Gln Gln Leu Asp Ser Glu Glu Asn

1 5 10 15

Asp His Gln Leu Ser Gly Asp Asp Glu His Gly Ser His Val Gln Asp

20 25 30

Pro Arg Ile Glu Asn Pro His Trp Lys Gly Gln Pro Leu Ser Arg Pro

35 40 45

Phe Pro Gln Arg Leu Cys Ser Thr Phe Arg Leu Ser Leu Leu Ala Leu

50 55 60

Ala Phe Asn Ile Leu Leu Leu Val Val Ile Cys Val Val Ser Ser Gln

65 70 75 80

Ser Ile Gln Leu Gln Glu Glu Phe Arg Thr Leu Lys Glu Thr Phe Ser

85 90 95

Asn Phe Ser Ser Ser Thr Leu Met Glu Phe Gly Ala Leu Asp Thr Leu

100 105 110

Gly Gly Ser Thr Asn Ala Ile Leu Thr Ser Trp Leu Ala Gln Leu Glu

115 120 125

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

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

Pro Asp Asn Trp Gln Gly His Glu Gln Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala
260 265 270
Glu Ile Leu Ser Asp Gly His Trp Asn Asp Asn Phe Cys Gln Gln Val
275 280 285
Asn Arg Trp Val Cys Glu Lys Arg Arg Asn Ile Thr His
290 295 300

<210> 10
<211> 198
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 10

Met Glu Phe Gly Ala Leu Asp Thr Leu Gly Gly Ser Thr Asn Ala Ile
1 5 10 15

Leu Thr Ser Trp Leu Ala Gln Leu Glu Glu Lys Gln Gln Gln Leu Lys

20 25 30

Ala Asp His Ser Thr Leu Leu Phe His Leu Lys His Phe Pro Met Asp

35 40 45

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

50 55 60

Glu Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu Phe Gly Gly Ser Cys Tyr Trp

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Phe Val Val Lys His Arg Ser Gln Phe His Ile Trp Ile Gly Leu Thr

115 120 125

Asp Arg Asp Gly Ser Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Arg Ser

130 135 140

Asn Tyr Arg Asn Trp Ala Phe Thr Gln Pro Asp Asn Trp Gln Gly His

145 150 155 160

Glu Gln Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala Glu Ile Leu Ser Asp Gly His

165 170 175

Trp Asn Asp Asn Phe Cys Gln Gln Val Asn Arg Trp Val Cys Glu Lys

180 185 190

Arg Arg Asn Ile Thr His

195

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 11

Glu Lys Tyr Ala Met Ala

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 12

Arg Ile Ser Ala Arg Gly Val Thr

1 5

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 13

His Lys Arg His Glu His Thr Arg Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 14

Arg Tyr Thr Met Gly

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 16

Trp Val Met Leu Arg Gly Arg Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 17

Asp Tyr Gly Met Gly

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 18

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

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 19

Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Asn Thr Phe Thr Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 20

Ala Ala Gly Met Gly

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 21

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

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 22

Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Asn Thr Phe Thr Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg Trp Leu Leu

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Artificial Sequence

<400> 24

Pro Gly Ser Arg Leu Arg Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 25

Gln Gln Ala Tyr Ala Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg Trp Leu Leu

1 5 10

<210> 27

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 27

Pro Gly Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 28

Gln Gln Ala Tyr Gln Leu Pro Val Thr

1 5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg Trp Leu Leu

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 30

Pro Gly Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 31

Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 32

Arg Ala Ser Gly Asp Ile Gly His Ala Leu Trp

1 5 10

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 33

Arg Gly Gly Ser Ala Leu Gln Ser

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 34

Gly Gln Ser His Val Arg Pro Phe Thr

1 5

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 35

Gln Ala Ser Lys Asn Ile Gly Glu Arg Leu Val

1 5 10

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 36

Gly Phe Ala Ser Leu Leu Gln Ser

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 37

Gly Gln Tyr Arg Trp Val Pro Ala Thr

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 38

Ser Thr Tyr Pro Met His

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 39

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Asp Ser

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 40

Asn Ala Leu Arg Phe Asp Tyr

1 5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 41

Lys Pro Tyr Ala Met His

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 42

Ser Ile Ser Ser Thr Gly Leu Ser

1 5

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 43

Asp Ala Ser Arg Phe Arg Gln Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<

210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 44

Pro Lys Tyr Gly Met Ala

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 45

Arg Ile Gly Ala Thr Gly Ser Glu

1 5

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 46

His Arg Gly Thr Ala His Ser Ser Phe Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 47

Ser Ala Asn Gly Met His

1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 48

Val Ile Ser Ala Thr Gly Asp Gln

1 5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 49

Gly Tyr Asp Arg Arg His Arg Lys Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 50

Ala Asp Tyr Ser Met Tyr

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 51

Asp Ile Ser Pro Ser Gly Ser Met

1 5

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 52

Gly Leu Pro Gly Gln Asn Met His Val Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 53

Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg Trp Leu Leu

1 5 10

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 54

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 55

Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 56

Arg Ala Ser Met Ser Ile Asp Glu Ser Leu Trp

1 5 10

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 57

Arg Gly Gly Ser Gly Leu Gln Ser

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 58

Gly Gln Ala Ala Arg Arg Pro Tyr Thr

1 5

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 59

Arg Ala Ser His Tyr Ile Gly Asn Glu Leu Trp

1 5 10

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 60

Arg Arg Gly Ser Gly Leu Gln Ser

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 61

Gly Gln Ala Arg His Arg Pro Tyr Thr

1 5

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 62

Arg Ala Ser Ser Asn Ile Gly Arg Ser Leu Val

1 5 10

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 63

Ala Gly Gly Ser Leu Leu Gln Ser

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 64

Gly Gln Tyr Ala Glu Glu Pro Phe Thr

1 5

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 65

Arg Ala Ser Val Lys Ile Gly Glu Arg Leu Trp

1 5 10

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 66

Arg Asp Ala Ser Leu Leu Gln Ser

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 67

Gly Gln Ser Trp Met Arg Pro Tyr Thr

1 5

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 68

Arg Ala Ser Ser Tyr Ile Gly Gly Glu Leu Trp

1 5 10

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 69

Ser Gly Thr Ser Gly Leu Gln Ser

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 70

Gly Gln Ala Ala Lys Arg Pro Phe Thr

1 5

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 71

Arg Ala Ser Ser Trp Ile Asn Ser Asp Leu Val

1 5 10

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 72

Ala Gly Gly Ser Leu Leu Gln Ser

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 73

Gly Gln Tyr Leu Glu Glu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 74

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Ile Ser Ala Arg Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys His Lys Arg His Glu His Thr Arg Phe Asp Ser Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 75

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 75

Glu Leu Gln Leu Leu Glu Phe Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Gly Pro Pro Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Trp Val Met Leu Arg Gly Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 76

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 77

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 77

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ala Ala
20 25 30

Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Asn Thr Phe Thr Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 78

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 78

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg Trp
20 25 30

Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Gly Pro Gly Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ala Trp Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 79
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence

<400> 79
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg Trp
20 25 30
Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys His Leu Ile
35 40 45
Gly Pro Gly Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 80
<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser His Val Arg Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 82
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Lys Asn Ile Gly Glu Arg

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 83
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 83

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Ala Lys Asn Ala Leu Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 84
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Pro Tyr
20 25 30

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

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

Ala Lys Asp Ala Ser Arg Phe Arg Gln Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 85
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 85
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Lys Tyr

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

85 90 95
Ala Lys His Arg Gly Thr Ala His Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 86

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Asn
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Ala Thr Gly Asp Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Tyr Asp Arg Arg His Arg Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 87

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ser Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Ser Pro Ser Gly Ser Met Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Gly Leu Pro Gly Gln Asn Met His Val Gly Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 88

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 89

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ala Ala Arg Arg Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 90

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Tyr Ile Gly Asn Glu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ala Arg His Arg Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 91

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Asn Ile Gly Arg Ser
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ala Gly Gly Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Tyr Ala Glu Glu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 92

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 92

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Val Lys Ile Gly Glu Arg

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Trp Met Arg Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 93

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 93

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Tyr Ile Gly Gly Glu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ala Ala Lys Arg Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 94

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Trp Ile Asn Ser Asp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ala Gly Gly Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Tyr Leu Glu Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
100 105

<210> 95

<

211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 95

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

35

<210> 96

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 97

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 98

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 98

Ile Glu Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Asp Asn

1 5 10 15

Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys

20 25 30

Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

35 40

<210> 99

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 99

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 100

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 100

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val

65

<210> 101

<211> 70

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 101

Ile Glu Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Asp Asn
1 5 10 15

Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys
20 25 30

Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val
35 40 45

Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala

50 55 60

Phe Ile Ile Phe Trp Val
65 70

<210> 102

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 102

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

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

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

35 40 45

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
50 55 60

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
65 70

<210> 103

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 103

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

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

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 104
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 104
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 105
<211> 48
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 105

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

20 25 30
Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
35 40 45

<210> 106
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 106
Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His
1 5 10 15
Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln

20 25 30
Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile
35 40

<210> 107
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 107
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 108
<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 108

Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn
1 5 10 15

Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg
20 25 30

Leu Thr Asp Val Thr Leu
35

<210> 109

<211> 197

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 109

Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro Ala Thr His Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro Pro Asp Ser Ser
35 40 45

Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser Trp Thr Pro Gly
50 55 60

Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val Thr Trp Ser Trp
65 70 75 80

Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala Ala Pro Thr Leu
85 90 95

Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met Leu Gln Pro Gly
100 105 110

Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys
115 120 125

Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val
130 135 140
Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys
145 150 155 160
Arg Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala
165 170 175

Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp Leu Arg Ser Arg
180 185 190
Leu Gln Arg Gly Pro
195

<210> 110
<211> 153
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 110

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

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

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
100 105 110
Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
115 120 125

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
130 135 140

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
145 150

<210> 111

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 111

Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn
1 5 10 15

Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly
20 25 30

Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe
35 40 45

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

50 55 60

Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu
65 70 75 80

Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn
85 90 95

Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala
100 105 110

Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp

115 120 125

Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln
130 135 140

Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp
145 150 155 160

Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro
165 170 175

Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro

180 185 190

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

195 200 205

Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro

210 215 220

Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro

225 230 235 240

Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu

245 250 255

Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu

260 265 270

Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

275 280 285

<210> 112

<211> 195

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 112

Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys

1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser

85 90 95

Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala

100 105 110

Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu

115 120 125

Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr

180 185 190

Gln Asn Gln

195

<210> 113

<211> 91

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 113

Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys

1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln

85 90

<210> 114

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 114

Lys Leu Ser Pro Arg Val Lys Arg Ile Phe Tyr Gln Asn Val Pro Ser
1 5 10 15
Pro Ala Met Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Ser Val His Asn Gly Asn Phe

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

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

145 150 155 160
Trp His Leu Ser Ala Leu Pro Gly Asn Thr Gln Ser Ser Gly Pro Ile
165 170 175
Pro Ala Leu Ala Cys Gly Leu Ser Cys Asp His Gln Gly Leu Glu Thr
180 185 190
Gln Gln Gly Val Ala Trp Val Leu Ala Gly His Cys Gln Arg Pro Gly

195 200 205

Leu His Glu Asp Leu Gln Gly Met Leu Leu Pro Ser Val Leu Ser Lys

210 215 220

Ala Arg Ser Trp Thr Phe

225 230

<210> 115

<211> 569

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 115

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser

1 5 10 15

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu

20 25 30

Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn

35 40 45

Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg

50 55 60

Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro

100 105 110

Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu

165 170 175

Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe

180 185 190

Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro

195 200 205

Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp

210 215 220

Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala

225 230 235 240

Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu

245 250 255

Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro

260 265 270

Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln

275 280 285

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

290 295 300

His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln

305 310 315 320

Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val

325 330 335

Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser

405 410 415

Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp

420 425 430

Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val

435 440 445

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu

450 455 460

Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr

465 470 475 480

Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser

485 490 495

Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly

500 505 510

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly

515 520 525

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly

530 535 540

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser

545 550 555 560

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser

565

<210> 116

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 116

Arg Phe Cys Gly Ile Tyr Gly Tyr Arg Leu Arg Arg Lys Trp Glu Glu

1 5 10 15

Lys Ile Pro Asn Pro Ser Lys Ser His Leu Phe Gln Asn Gly Ser Ala

20 25 30

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

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

Pro Pro Pro Gly Ser Leu Glu Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Gly Gly Gln
165 170 175
Val Gln Leu Val Pro Leu Ala Gln Ala Met Gly Pro Gly Gln Ala Val
180 185 190
Glu Val Glu Arg Arg Pro Ser Gln Gly Ala Ala Gly Ser Pro Ser Leu
195 200 205
Glu Ser Gly Gly Gly Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Pro Arg Val Gly
210 215 220

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

275 280 285

Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Lys Ser Gly Phe Glu
290 295 300
Gly Tyr Val Glu Leu Pro Pro Ile Glu Gly Arg Ser Pro Arg Ser Pro
305 310 315 320
Arg Asn Asn Pro Val Pro Pro Glu Ala Lys Ser Pro Val Leu Asn Pro
325 330 335
Gly Glu Arg Pro Ala Asp Val Ser Pro Thr Ser Pro Gln Pro Glu Gly
340 345 350

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

Leu Lys Gln Gln Asp Tyr Leu Ser Leu Pro Pro Trp Glu Val Asn Lys
420 425 430
Pro Gly Glu Val Cys
435

<210> 117
<211> 189
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 117
Arg His Glu Arg Ile Lys Lys Thr Ser Phe Ser Thr Thr Thr Leu Leu
1 5 10 15
Pro Pro Ile Lys Val Leu Val Val Tyr Pro Ser Glu Ile Cys Phe His
20 25 30

His Thr Ile Cys Tyr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Asn His Cys Arg Ser
35 40 45

Glu Val Ile Leu Glu Lys Trp Gln Lys Lys Lys Ile Ala Glu Met Gly
50 55 60

Pro Val Gln Trp Leu Ala Thr Gln Lys Lys Ala Ala Asp Lys Val Val
65 70 75 80

Phe Leu Leu Ser Asn Asp Val Asn Ser Val Cys Asp Gly Thr Cys Gly
85 90 95

Lys Ser Glu Gly Ser Pro Ser Glu Asn Ser Gln Asp Leu Phe Pro Leu
100 105 110

Ala Phe Asn Leu Phe Cys Ser Asp Leu Arg Ser Gln Ile His Leu His
115 120 125

Lys Tyr Val Val Val Tyr Phe Arg Glu Ile Asp Thr Lys Asp Asp Tyr
130 135 140

Asn Ala Leu Ser Val Cys Pro Lys Tyr His Leu Met Lys Asp Ala Thr
145 150 155 160

Ala Phe Cys Ala Glu Leu Leu His Val Lys Gln Gln Val Ser Ala Gly
165 170 175

Lys Arg Ser Gln Ala Cys His Asp Gly Cys Cys Ser Leu
180 185

<210> 118

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> F or L

<400> 118

Tyr Xaa Xaa Xaa

1

<210> 119

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 119

Tyr Cys Thr Phe

1

<210> 120

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 120

Tyr Phe Phe Phe

1

<210> 121

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 121

Tyr Leu Ser Leu

1

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 122

Tyr Leu Ser Leu Gln
1 5

<210> 123

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 123

Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro
20 25 30

Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser
35 40 45

Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys
50 55

<210> 124

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 124

Asn Pro Trp Phe Gln Arg Ala Lys Met Pro Arg Ala Leu Asp Phe Ser
1 5 10 15

Gly His Thr His Pro Val Ala Thr Phe Gln Pro Ser Arg Pro Glu Ser
20 25 30

Val Asn Asp Leu Phe Leu Cys Pro Gln Lys Glu Leu Thr
35 40 45

<210> 125

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 125

Gly Tyr Ile Cys Leu Arg Asn Ser Leu Pro Lys Val Leu Asn Phe His
1 5 10 15

Asn Phe Leu Ala Trp Pro Phe Pro Asn Leu Pro Pro Leu Glu Ala Met
20 25 30

Asp Met Val Glu Val Ile Tyr Ile Asn Arg
35 40

<210> 126

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 126

Pro Leu Lys Glu Lys Ser Ile Ile Leu Pro Lys Ser Leu Ile Ser Val
1 5 10 15

Val Arg Ser Ala Thr Leu Glu Thr Lys Pro Glu Ser Lys Tyr Val Ser
20 25 30

Leu Ile Thr Ser Tyr Gln Pro Phe Ser Leu
35 40

<210> 127

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 127

Arg Arg Arg Lys Lys Leu Pro Ser Val Leu Leu Phe Lys Lys Pro Ser
1 5 10 15

Pro Phe Ile Phe Ile Ser Gln Arg Pro Ser Pro Glu Thr Gln Asp Thr
20 25 30

Ile His Pro Leu Asp Glu Glu Ala Phe Leu Lys
35 40

<210> 128

<211> 45

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 128

Tyr Ile His Val Gly Lys Glu Lys His Pro Ala Asn Leu Ile Leu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ile Asn Phe Ile Thr Leu Asn Ile Ser Asp Asp Ser

35 40 45

<210> 129

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 129

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

1 5 10 15

Arg Val Leu Thr Phe Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln Glu His Val Leu

20 25 30

Ile Pro Val Phe Asp Leu Ser Gly Pro

35 40

<210> 130

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 130

Asn Tyr Val Phe Phe Pro Ser Leu Lys Pro Ser Ser Ser Ile Asp Glu

1 5 10 15

Tyr Phe Ser Glu Gln Pro Leu Lys Asn Leu Leu Leu Ser Thr Ser Glu
20 25 30
Glu Gln Ile Glu Lys Cys Phe Ile Ile Glu Asn
35 40

<210> 131
<211> 49
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 131
Tyr Trp Phe His Thr Pro Pro Ser Ile Pro Leu Gln Ile Glu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Lys Asp Pro Thr Gln Pro Ile Leu Glu Ala Leu Asp Lys Asp Ser
20 25 30
Ser Pro Lys Asp Asp Val Trp Asp Ser Val Ser Ile Ile Ser Phe Pro
35 40 45
Glu

<210> 132
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 132
Tyr Ala Phe Ser Pro Arg Asn Ser Leu Pro Gln His Leu Lys Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly His Pro His His Asn Thr Leu Leu Phe Phe Ser Phe Pro Leu
20 25 30
Ser Asp Glu Asn Asp Val Phe Asp Lys Leu Ser Val Ile Ala Glu Asp
35 40 45
Ser Glu Ser
50

<210> 133

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223

> any amino acid

<400> 133

Tyr Xaa Xaa Gln

1

<210> 134

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 134

Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn

1 5 10 15

Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly

20 25 30

Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn

85 90 95

Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala

100 105 110

Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro

165 170 175

Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro

180 185 190

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

195 200 205

Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro

210 215 220

Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro

225 230 235 240

Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu

245 250 255

Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu

260 265 270

Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

275 280 285

<210> 135

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 135

Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn

1 5 10 15

Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly

20 25 30

Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe

35 40 45

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

50 55 60

Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu

65 70 75 80

Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

85 90

<210> 136

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 136

Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn

1 5 10 15

Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly

20 25 30

Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe

35 40 45

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

50 55 60

Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser

65 70 75 80

Arg Asp Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser

85 90 95

Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met

100 105 110

Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro

115 120 125

Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro

130 135 140

Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala

145 150 155 160

Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln

165 170 175

Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala

180 185 190

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

195 200 205

<210> 137

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 137

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

1 5 10 15

Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys

20 25 30

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

35 40 45

Val Ser Glu Ile

50

<210> 138

<211> 86

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 138

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

1 5 10 15

Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr

65 70 75 80

Thr Leu Lys Pro Glu Thr

85

<210> 139

<211> 299

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 139

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile

35 40 45

Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn

50 55 60

Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln

65 70 75 80

Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Asn Cys Arg

85 90 95

Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp

100 105 110

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

115 120 125

Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly

130 135 140

Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys

145 150 155 160

Val Thr Gln Leu Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln

165 170 175

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

180 185 190

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

290 295

<210> 140

<211> 317

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 140

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

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

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

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

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

275 280 285

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser
290 295 300
Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
305 310 315

<210> 141
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 141
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 142
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 142
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

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

85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 143

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 143

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 144

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 144

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 145

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 145

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

1 5 10 15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 146

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 146

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

1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20 25

<210> 147

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> any amino acid

<400> 147

Arg Xaa Xaa Arg

1

<210> 148

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 148

Arg Arg Lys Arg

1

<210> 149

<211> 366

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 149

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Lys Arg His Glu His Thr Arg Phe

115 120 125

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp

210 215 220

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
340 345 350
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360 365

<210> 150
<211> 367
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 150
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Glu Lys Tyr Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Ser Ala Arg Gly Val Thr Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

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

165 170 175

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

Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg
245 250 255
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
260 265 270
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
275 280 285
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
290 295 300

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
305 310 315 320
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
325 330 335
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
340 345 350
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360 365

<210> 151
<211> 638
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 151

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

Thr Phe Glu Lys Tyr Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Ser Ala Arg Gly Val Thr Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

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

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

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly

370 375 380

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Thr Arg Gly Gly Gly Ala Thr Met

385 390 395 400

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

405 410 415

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

420 425 430

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

435 440 445

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu

450 455 460

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

465 470 475 480

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

485 490 495

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

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

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
530 535 540

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
545 550 555 560

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
565 570 575

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

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu Ser
595 600 605

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
610 615 620

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
625 630 635

<210> 152

<211> 639

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 152

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Glu Lys Tyr Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

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

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

165 170 175
Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val
180 185 190
Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
195 200 205
Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser
210 215 220
Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His

225 230 235 240
Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg
245 250 255
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
260 265 270
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
275 280 285
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro

290 295 300
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Arg Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala

370 375 380

Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Thr Arg Gly Gly Gly Ala Thr

385 390 395 400

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

405 410 415

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

420 425 430

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

435 440 445

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

450 455 460

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

465 470 475 480

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

485 490 495

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

500 505 510

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

515 520 525

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

530 535 540

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

545 550 555 560

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

565 570 575

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

580 585 590

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu

595 600 605

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

610 615 620

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

625 630 635

<210> 153

<211> 1101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 153

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggaggtgc agctgttgga gtctgggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgcgt 120

ctctcctgtg cagcctccgg attcaccttt gagaagtatg cgatggcgtg ggtccgccag 180

gccccaggga agggtctgga gtgggtctca cggatttcgg cgaggggtgt gacgacatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctcccgcg acaattccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gcgtgctgag gacaccgcgg tatattactg tgcgaaacat 360

aagcggcacg agcatactcg ttttgactcc tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 420

agcaccacga cgccagcgcc gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc 480

ctgtccctgc gcccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg 540

ctggacttcg cctgtgattt ctgggtgctg gtggtggtgg gcggcgtgct ggcctgctac 600

agcctgctgg tgaccgtggc cttcatcatc ttctgggtgc ggagcaagcg gagccggctg 660

ctgcacagcg actacatgaa catgaccccc cggcggcctg ggcccacccg caagcattac 720

cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg 780

agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 840

ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 900

ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 960

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1020

gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg 1080

caggccctgc cccctcgcta a 1101

<210> 154

<211> 1104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 154

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggaggtgc agctgttgga gtctgggggа ggcttggtac agcctggggg gtccctgcgt 120

ctctcctgtg cagcctccgg attcaccttt gagaagtatg cgatggcgtg ggtccgccag 180

gccccaggga agggtctgga gtgggtctca cggatttcgg cgaggggtgt gacgacatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctcccgcg acaattccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gcgtgctgag gacaccgcgg tatattactg tgcgaaacat 360

aagcggcacg agcatactcg ttttgactcc tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 420

agcgcggccg ccatcgaggt ggagcagaag ctgatcagcg aggaggacct gctggacaac 480

gagaagagca acggcaccat catccacgtg aagggcaagc acctgtgccc cagccccctg 540

ttccccggcc ccagcaagcc cttctgggtg ctggtggtgg tgggcggcgt gctggcctgc 600

tacagcctgc tggtgaccgt ggccttcatc atcttctggg tgcggagcaa gcggagccgg 660

ctgctgcaca gcgactacat gaacatgacc ccccggcggc ctgggcccac ccgcaagcat 720

taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 780

aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 840

ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 900

gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 960

aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1020

cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1080

atgcaggccc tgcccccctcg ctaa 1104

<210> 155

<211> 1917

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 155

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggaggtgc agctgttgga gtctgggggg ggcttggtac agcctggggg gtccctgcgt 120

ctctcctgtg cagcctccgg attcaccttt gagaagtatg cgatggcgtg ggtccgccag 180

gccccaggga agggtctgga gtgggtctca cggatttcgg cgaggggtgt gacgacatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctcccgcg acaattccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gcgtgctgag gacaccgcgg tatattactg tgcgaaacat 360

aagcggcacg agcatactcg ttttgactcc tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 420

agcaccacga cgccagcgcc gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc 480

ctgtccctgc gcccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg 540

ctggacttcg cctgtgattt ctgggtgctg gtggtggtgg gcggcgtgct ggcctgctac 600

agcctgctgg tgaccgtggc cttcatcatc ttctgggtgc ggagcaagcg gagccggctg 660

ctgcacagcg actacatgaa catgaccccc cggcggcctg ggcccacccg caagcattac 720

cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg 780

agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 840

ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 900

ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 960

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1020

gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg 1080

caggccctgc cccctcgcag gagaaaaaga ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg 1140

aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct ggacctacgc gtggaggtgg cgccaccatg 1200

gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca tcctggtcga gctggacggc 1260

gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc 1320

aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gcccaccctc 1380

gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgct accccgacca catgaagcag 1440

cacgacttct tcaagtccgc catgcccgaa ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc 1500

aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg 1560

aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag 1620

ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc 1680

atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac 1740

cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac 1800

ctgagcaccc agtccaagct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg 1860

ctggagttcg tgaccgccgc cgggatcact ctcggcatgg acgagctgta caagtaa 1917

<210> 156

<211> 1920

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 156

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggaggtgc agctgttgga gtctgggggg ggcttggtac agcctggggg gtccctgcgt 120

ctctcctgtg cagcctccgg attcaccttt gagaagtatg cgatggcgtg ggtccgccag 180

gccccaggga agggtctgga gtgggtctca cggatttcgg cgaggggtgt gacgacatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctcccgcg acaattccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gcgtgctgag gacaccgcgg tatattactg tgcgaaacat 360

aagcggcacg agcatactcg ttttgactcc tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 420

agcgcggccg ccatcgaggt ggagcagaag ctgatcagcg aggaggacct gctggacaac 480

gagaagagca acggcaccat catccacgtg aagggcaagc acctgtgccc cagccccctg 540

ttccccggcc ccagcaagcc cttctgggtg ctggtggtgg tgggcggcgt gctggcctgc 600

tacagcctgc tggtgaccgt ggccttcatc atcttctggg tgcggagcaa gcggagccgg 660

ctgctgcaca gcgactacat gaacatgacc ccccggcggc ctgggcccac ccgcaagcat 720

taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 780

aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 840

ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 900

gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 960

aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1020

cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1080

atgcaggccc tgcccccctcg caggagaaaa agaggaagcg gagctactaa cttcagcctg 1140

ctgaagcagg ctggagacgt ggaggagaac cctggaccta cgcgtggagg tggcgccacc 1200

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 1260

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 1320

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 1380

ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 1440

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 1500

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 1560

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 1620

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 1680

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 1740

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 1800

tacctgagca cccagtccaa gctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 1860

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 1920

<210> 157

<211> 431

<212> PRT

<213> Human

<400> 157

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala

20 25 30

Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg

35 40 45

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met

50 55 60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala

65 70 75 80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys
130 135 140
Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp

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

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

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

340 345 350
Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr
355 360 365
Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala

370 375 380

Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser

385 390 395 400

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys

405 410 415

Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro

420 425 430

<210> 158

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 158

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala

20 25 30

Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg

35 40 45

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met

50 55 60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala

65 70 75 80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala
165 170 175
Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro
180 185 190
Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe
195 200 205
Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu
210 215 220

Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln
225 230 235 240
Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met
245 250 255
Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val
260 265 270
Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln
275 280 285

Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser
290 295 300
Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr
305 310 315 320
Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met
325 330 335
Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu
340 345 350

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

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys
405 410 415

Arg Glu Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro
420 425 430

<210> 159

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 159

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala
20 25 30

Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg
35 40 45

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met
50 55 60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala
65 70 75 80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu
85 90 95

Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His
100 105 110

Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met
115 120 125

Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys
130 135 140

Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp
145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro

180 185 190

Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe

195 200 205

Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu

210 215 220

Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln

225 230 235 240

Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met

245 250 255

Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val

260 265 270

Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln

275 280 285

Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met

325 330 335

Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu

340 345 350

Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr

355 360 365

Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala

370 375 380

Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser

385 390 395 400

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys

405 410 415

Arg Ser Gln Arg Pro Ala Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro

420 425 430

<210> 160

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 160

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala
20 25 30

Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg
35 40 45

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met
50 55 60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala
65 70 75 80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu
85 90 95

Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His
100 105 110

Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met
115 120 125

Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys
130 135 140

Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp
145 150 155 160

Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala
165 170 175

Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro

180 185 190

Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe

195 200 205

Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu

210 215 220

Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln

225 230 235 240

Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met

245 250 255

Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val

260 265 270

Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln

275 280 285

Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met

325 330 335

Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu

340 345 350

Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr

355 360 365

Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala

370 375 380

Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser

385 390 395 400

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys

405 410 415

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

420 425 430

<210> 161

<211> 362

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 161

Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser
1 5 10 15

Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala Pro Ser Gly
20 25 30

Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu Gln Asp Arg
35 40 45

Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His Ala Arg Thr
50 55 60

Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met Ile Ser Leu
65 70 75 80

Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys Ala Arg Pro
85 90 95

Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp Val Ser Arg
100 105 110

Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala Pro Arg Lys
115 120 125

Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu Leu Ala
130 135 140

Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe Glu Glu Pro
145 150 155 160

Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu Asp Glu Lys
165 170 175

Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu Glu
180 185 190

Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His
195 200 205

Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val Ala Ser Ser
210 215 220
Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln Gly Pro Val
225 230 235 240

Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu Phe Ala
245 250 255
Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr Phe Pro Glu
260 265 270
Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met Arg Pro Pro
275 280 285
Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu Ala Pro Glu
290 295 300

Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr Arg Met Phe
305 310 315 320
Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala Ile Arg His
325 330 335
Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser Glu Lys Gly
340 345 350
Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe
355 360

<210> 162
<211> 441
<212
> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 162
Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15
Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala
20 25 30
Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg
35 40 45

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met

50 55 60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala

65 70 75 80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro

180 185 190

Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe

195 200 205

Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu

210 215 220

Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln

225 230 235 240

Ser Leu Glu Gln Val Glu Glu Leu Ser Ala Met Gln Ala His Leu Ala

245 250 255

Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val Ala Ser Ser Asp Lys

260 265 270

Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln Gly Pro Val Val Pro

275 280 285

Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu Phe Ala Val Arg

290 295 300

Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr Phe Pro Glu Phe Leu

305 310 315 320

His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met Arg Pro Pro Phe Thr

325 330 335

Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu Ala Pro Glu Lys Gln

340 345 350

Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr Arg Met Phe Ala Phe

355 360 365

Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala Ile Arg His Asn Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro Glu Gly Arg Gly Ser Leu

420 425 430

Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn

435 440

<210> 163

<211> 1296

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 163

atgcccaacc ccaggcctgg caagccctcg gccccttcct tggcccttgg cccatcccca 60

ggagcctcgc ccagctggag ggctgcaccc aaagcctcag acctgctggg ggcccggggc 120

ccaggggggaa ccttccaggg ccgagatctt cgaggcgggg cccatgcctc ctcttcttcc 180

ttgaacccca tgccaccatc gcagctgcag ctgcccacac tgcccctagt catggtggca 240

ccctccgggg cacggctggg ccccttgccc cacttacagg cactcctcca ggacaggcca 300

catttcatgc accagctctc aacggtggat gcccacgccc ggacccctgt gctgcaggtg 360

caccccctgg agagcccagc catgatcagc ctcacaccac ccaccaccgc cactggggtc 420

ttctccctca aggcccggcc tggcctccca cctgggatca acgtggccag cctggaatgg 480

gtgtccaggg agccggcact gctctgcacc ttcccaaatc ccagtgcacc caggaaggac 540

agcacccttt cggctgtgcc ccagagctcc tacccactgc tggcaaatgg tgtctgcaag 600

tggcccggat gtgagaaggt cttcgaagag ccagaggact tcctcaagca ctgccaggcg 660

gaccatcttc tggatgagaa gggcagggca caatgtctcc tccagagaga gatggtacag 720

tctctggagc agcagctggt gctggagaag gagaagctga gtgccatgca ggcccacctg 780

gctgggaaaa tggcactgac caaggcttca tctgtggcat catccgacaa gggctcctgc 840

tgcatcgtag ctgctggcag ccaaggccct gtcgtcccag cctggtctgg cccccgggag 900

gcccctgaca gcctgtttgc tgtccggagg cacctgtggg gtagccatgg aaacagcaca 960

ttcccagagt tcctccacaa catggactac ttcaagttcc acaacatgcg acccccttc 1020

acctacgcca cgctcatccg ctgggccatc ctggaggctc cagagaagca gcggacactc 1080

aatgagatct accactggtt cacacgcatg tttgccttct tcagaaacca tcctgccacc 1140

tggaagaacg ccatccgcca caacctgagt ctgcacaagt gctttgtgcg ggtggagagc 1200

gagaaggggg ctgtgtggac cgtggatgag ctggagttcc gcaagaaacg gagccagagg 1260

cccagcaggt gttccaaccc tacacctggc ccctga 1296

<210> 164

<211> 1352

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 164

gaattcgtcg acatgcccaa ccccagaccc ggcaagcctt ctgcccttc tctggccctg 60

ggaccatctc ctggcgcctc cccatcttgg agagccgccc ctaaagccag cgatctgctg 120

ggagctagag gccctggcgg cacattccag ggcagagatc tgagaggcgg agcccacgcc 180

tctagcagca gcctgaatcc catgcccccct agccagctgc agctgcctac actgcctctc 240

gtgatggtgg cccctagcgg agctagactg ggccctctgc ctcatctgca ggctctgctg 300

caggaccggc cccactttat gcaccagctg agcaccgtgg acgcccacgc cagaacacct 360

gtgctgcagg tgcacccccct ggaaagccct gccatgatca gcctgacccc tccaaccaca 420

gccaccggcg tgttcagcct gaaggccaga cctggactgc cccctggcat caatgtggcc 480

agcctggaat gggtgtcccg cgaacctgcc ctgctgtgca ccttccccaa tcctagcgcc 540

cccagaaagg acagcacact gtctgccgtg ccccagagca gctatcccct gctggctaac 600

ggcgtgtgca agtggcctgg ctgcgagaag gtgttcgagg aacccgagga cttcctgaag 660

cactgccagg ccgaccatct gctggacgag aaaggcagag cccagtgcct gctgcagcgc 720

gagatggtgc agtccctgga acagcagctg gtgctggaaa aagaaaagct gagcgccatg 780

caggcccacc tggccggaaa gatggccctg acaaaagcca gcagcgtggc cagctccgac 840

aagggcagct gttgtatcgt ggccgctggc agccagggac ctgtggtgcc tgcttggagc 900

ggacctagag aggcccccga tagcctgttt gccgtgcgga gacacctgtg gggcagccac 960

ggcaactcta ccttccccga gttcctgcac aacatggact acttcaagtt ccacaacatg 1020

aggcccccct tcacctacgc caccctgatc agatgggcca ttctggaagc ccccgagaag 1080

cagcggaccc tgaacgagat ctaccactgg tttacccgga tgttcgcctt cttccggaac 1140

caccccgcca cctggaagaa cgccatccgg cacaatctga gcctgcacaa gtgcttcgtg 1200

cgggtggaaa gcgagaaggg cgccgtgtgg acagtggacg agctggaatt tcggaagaag 1260

cggtcccaga ggcccagccg gtgtagcaat cctacacctg gccctgaggg cagaggaagt 1320

ctgctaacat gcggtgacgt cgaggagaat cc 1352

<210> 165

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 165

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr

20

<210> 166

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 166

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly

35 40 45

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr

50 55 60

<210> 167

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 167

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Lys Arg His Glu His Thr Arg Phe

115 120 125

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Val Thr

130 135 140

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

145 150 155 160

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
225 230 235 240
Gln Pro Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ala Trp
245 250 255
Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala
260 265 270
Ala Ile Glu Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Asp
275 280 285

Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu
290 295 300
Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu
305 310 315 320
Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val
325 330 335
Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
340 345 350

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

405 410 415

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

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490 495

<210> 168
<211> 495
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 168

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Leu Gln Leu Leu Glu Phe Gly Gly Gly Leu
20 25 30

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Trp Val Met Leu Arg Gly Arg Phe Asp
115 120 125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Val Thr Val
130 135 140
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
165 170 175
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg
180 185 190
Trp Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys His Leu
195 200 205
Ile Gly Pro Gly Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
225 230 235 240
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Gln Leu Pro
245 250 255
Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
260 265 270
Ile Glu Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Asp Asn
275 280 285

Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys
290 295 300
Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val
305 310 315 320
Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
325 330 335
Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser
340 345 350

Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His

355 360 365

Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

<210> 169

<211> 499

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 169

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Asn Thr

115 120 125

Phe Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Lys Leu Leu Ile Gly Pro Gly Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

275 280 285

Leu Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly

290 295 300

Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe

305 310 315 320

Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
325 330 335
Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg
340 345 350
Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro

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

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

485 490 495
Pro Pro Arg

<210> 170
<211> 1488
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial Sequence
<400> 170
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccggaggtgc agctgttgga gtctgggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgcgt 120

ctctcctgtg cagcctccgg attcaccttt gagaagtatg cgatggcgtg ggtccgccag 180

gccccaggga agggtctgga gtgggtctca cggatttcgg cgaggggtgt gacgacatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctcccgcg acaattccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gcgtgctgag gacaccgcgg tatattactg tgcgaaacat 360

aagcggcacg agcatactcg ttttgactcc tggggtcagg gaaccctggt caccgtctcg 420

agcctggtga ccgtgagcag cggcggcgga ggcagcggtg gcggaggcag cggcggaggc 480

ggtagcgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 540

gtcaccatta cttgccgggc aagtcaggcg attgggcggt ggttattgtg gtatcagcag 600

aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc ggtccgggtt cccggttgcg aagtggggtc 660

ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtcta 720

caacctgaag attttgttac gtactactgt caacaggcgt atgcctggcc tccgacgttc 780

ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgg gcggccgcca tcgaggtgga gcagaagctg 840

atcagcgagg aggacctgct ggacaacgag aagagcaacg gcaccatcat ccacgtgaag 900

ggcaagcacc tgtgccccag ccccctgttc cccggcccca gcaagccctt ctgggtgctg 960

gtggtggtgg gcggcgtgct ggcctgctac agcctgctgg tgaccgtggc cttcatcatc 1020

ttctgggtgc ggagcaagcg gagccggctg ctgcacagcg actacatgaa catgaccccc 1080

cggcggcctg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca 1140

gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc 1200

cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 1260

aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 1320

ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg 1380

aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc 1440

accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgc 1488

<210> 171

<211> 1485

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 171

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggagttgc agctgttgga gtttgggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgcgt 120

ctctcctgta caacctccgg attcaccttt tcgaggtata ctatgggttg ggtccgccag 180

gctccaggga agggtctaga gtgggtctca gccattggcc cgcccgggtc gaacacatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg tcggttcacc atctcccgcg acaattccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gcgtgccgag gacaccgcgg tatattactg tgcgaaatgg 360

gtgatgttgc gggggcgctt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 420

ctggtgaccg tgagcagcgg cggcggaggc agcggtggcg gaggcagcgg cggaggcggt 480

agcgacatcc agatgaccca gtccccatcc tccctgtctg catctgtagg agaccgtgtc 540

accattactt gccgggcaag tcaggcgatt gggcggtggt tattgtggta tcagcagaaa 600

ccagggaaag cccctaagca cctgatcggt ccgggttccc ggttgcaaag tggggtccca 660

tcacgtttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa 720

cctgaagatt ttgctacgta ctactgtcaa caggcgtatc agctgcctgt cacgttcggc 780

caagggacca aggtggaaat caaacgggcg gccgccatcg aggtggagca gaagctgatc 840

agcgaggagg acctgctgga caacgagaag agcaacggca ccatcatcca cgtgaagggc 900

aagcacctgt gccccagccc cctgttcccc ggccccagca agcccttctg ggtgctggtg 960

gtggtgggcg gcgtgctggc ctgctacagc ctgctggtga ccgtggcctt catcatcttc 1020

tgggtgcgga gcaagcggag ccggctgctg cacagcgact acatgaacat gacccccggg 1080

cggcctgggc ccacccgcaa gcattaccag ccctatgccc caccacgcga cttcgcagcc 1140

tatcgctcca gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag 1200

aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag 1260

agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc 1320

ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa 1380

ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc agggtctcag tacagccacc 1440

aaggacacct acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctcgc 1485

<210> 172

<211> 1497

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 172

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggaggtgc agctgttgga gtctgggggg ggcttggtac agcctggggg gtccctgcgt 120

ctctcctgtg cagcctccgg attcaccttt gaggattatg gtatggggtg ggtccgccag 180

gctccaggaa agggtctaga gtgggtctca gcgattggcc gcaacgggtc gcagacatac 240

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctcccgcg acaattccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gcgtgccgag gataccgcgg tatattactg tgcgaaactt 360

cggaggggggc ggggtctgaa tacgtttacg ttagactact ggggtcaagg aaccctggtc 420

accgtctcaa gcctggtgac cgtgagcagc ggcggcggag gcagcggtgg cggaggcagc 480

ggcggaggcg gtagcgacat ccagatgacc cagtccccat cctccctgtc tgcatctgta 540

ggagaccgtg tcaccattac ttgccgggca agtcaggcga ttgggcggtg gttattgtgg 600

tatcagcaga aaccagggaa agcccctaag ctcctgatcg gtccgggttc ccggttgcaa 660

agtggggtcc catcacgttt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc 720

ggcagtctgc aacctgaaga ttttgctacg tactactgtc aacaggcgta tagtctgcct 780

ccgacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaacggg cggccgccat cgaggtggag 840

cagaagctga tcagcgagga ggacctgctg gacaacgaga agagcaacgg caccatcatc 900

cacgtgaagg gcaagcacct gtgccccagc cccctgttcc ccggccccag caagcccttc 960

tgggtgctgg tggtggtggg cggcgtgctg gcctgctaca gcctgctggt gaccgtggcc 1020

ttcatcatct tctgggtgcg gagcaagcgg agccggctgc tgcacagcga ctacatgaac 1080

atgaccccc ggcggcctgg gcccacccgc aagcattacc agccctatgc cccaccacgc 1140

gacttcgcag cctatcgctc cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgcgtac 1200

cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1260

gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1320

cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 1380

attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1440

agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgc 1497

<210> 173

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 173

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Ile Ser Ala Arg Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys His Lys Arg His Glu His Thr Arg Phe Asp Ser Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

195 200 205

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

210 215 220

Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ala Trp Pro Pro Thr Phe Gly

225 230 235 240

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

245

<210> 174

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 174

Glu Leu Gln Leu Leu Glu Phe Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Thr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Pro Pro Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
145 150 155 160

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg Trp Leu Leu Trp Tyr
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys His Leu Ile Gly Pro Gly Ser
180 185 190

Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
210 215 220

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Gln Leu Pro Val Thr Phe Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
245

<210> 175

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 175

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

65 70 75 80

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

Ala Lys Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Asn Thr Phe Thr Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

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

130 135 140

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
145 150 155 160

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Gly Arg Trp
165 170 175
Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190
Gly Pro Gly Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
195 200 205
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser Leu Gln Pro
210 215 220
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Pro
225 230 235 240
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
245 250