



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월24일

(11) 등록번호 10-2745835

(24) 등록일자 2024년12월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) **A61K 39/39** (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/525 (2024.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7023430
- (22) 출원일자(국제) 2018년02월27일
 심사청구일자 2021년02월23일
- (85) 번역문제출일자 2019년08월08일
- (65) 공개번호 10-2019-0122667
- (43) 공개일자 2019년10월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/020037
- (87) 국제공개번호 WO 2018/157162
 국제공개일자 2018년08월30일
- (30) 우선권주장
 62/464,002 2017년02월27일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 W02016126608 A1

- (73) 특허권자
샤텍 랩스 인코포레이티드
 미국 텍사스 78701 오스틴 스위트 1200 500 웨스트 5번 스트리트
- (72) 발명자
슈레베르 테일러
 미국 텍사스주 78703 오스틴 3317 보먼 애비뉴
프롬 조지
 미국 텍사스주 78703 오스틴 3317 보먼 애비뉴
데 실바 수레시
 미국 텍사스주 78703 오스틴 3317 보먼 애비뉴
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 18 항

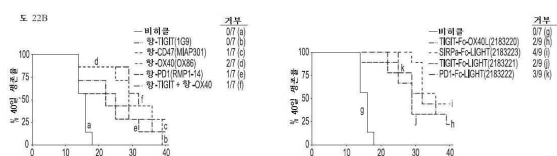
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 TIGIT- 및 LIGHT-기반 키메라 단백질

(57) 요약

본 발명은 특히 질환, 예컨대, 암 및 염증성 질환의 치료에서 사용되는 TIGIT- 및/또는 LIGHT-기반 키메라 단백질을 포함하는, 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/525 (2013.01)

A61K 2039/585 (2013.01)

A61K 2039/82 (2018.08)

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 단백질로서,

(A) 상기 키메라 단백질은 하기 일반 구조식:

$$N \text{ 말단} - (a) - (b) - (c) - C \text{ 말단}$$

(식 중,

(a)는 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인으로서, 상기 타입 I 막관통 단백질은 TIGIT이고,

(b)는 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커이며,

(c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인으로서, 상기 타입 II 막관통 단백질은 4-1BBL, GITRL, TL1A 및 LIGHT로부터 선택되되,

상기 링커는 상기 제1 도메인과 상기 제2 도메인을 연결하고, 그리고 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인 및 하나 이상의 접합 링커를 포함하되, 상기 접합 링커는 서열번호 49-63 및 65-95, GS, GGS 및 LE로부터 선택됨)

을 갖거나; 또는

(B) 상기 키메라 단백질은 하기 일반 구조식:

$$N \text{ 말단} - (a) - (b) - (c) - C \text{ 말단},$$

(식 중,

(a)는 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인으로서, 상기 타입 I 막관통 단백질은 PD-1, CD172a(SIRP α) 및 TIGIT로부터 선택되고,

(b)는 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커이며,

(c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인으로서, 상기 타입 II 막관통 단백질은 LIGHT이되,

상기 링커는 상기 제1 도메인과 상기 제2 도메인을 연결하고, 그리고 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인 및 하나 이상의 접합 링커를 포함하되, 상기 접합 링커는 서열번호 49-63 및 65-95, GS, GGS 및 LE로부터 선택됨)

을 갖는, 키메라 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (A)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖고, 상기 제2 도메인은 4-1BBL인, 키메라 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (A)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖고, 상기 제2 도메인은 GITRL인, 키메라 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (A)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖고, 상기 제2 도메인은 TL1A인, 키메라 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (A)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖고, 상기 제2 도메인은 LIGHT 인, 키메라 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (B)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖고, 상기 제1 도메인은 PD-1인, 키메라 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (B)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖고, 상기 제1 도메인은 CD172a(SIRP α)인, 키메라 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인은 IgG4로부터 유래되거나, 인간 IgG4로부터 유래되거나, 서열번호 46, 서열번호 47 또는 서열번호 48의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 링커는

2개 이상의 접합 링커를 포함하되, 각각의 접합 링커는 서열번호 49-63 및 65-95, GS, GGS 및 LE로부터 독립적으로 선택되고; 하나의 접합 링커는 상기 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인에 대해서 N 말단이고, 그리고 또 다른 접합 링커는 상기 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인에 대해서 C 말단인, 키메라 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 재조합 융합 단백질인, 키메라 단백질.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 키메라 단백질은 (A)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖고,

(a) 상기 키메라 단백질은 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인이되, 상기 막관통 단백질은 서열번호 10의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 TIGIT이고,

(b) 상기 키메라 단백질은 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커이되, 상기 링커는 서열번호 46, 서열번호 47 또는 서열번호 48의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 그리고

(c) 상기 키메라 단백질은 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인이되, 상기 막관통 단백질은 서열번호 13의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 4-1BBL, 서열번호 16의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GITRL, 서열번호 19의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 TL1A, 및 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 LIGHT로부터 선택되고,

상기 링커는 상기 제1 도메인 및 상기 제2 도메인을 연결하고 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인 및 하나 이상의 접합 링커를 포함하되, 상기 접합 링커는 서열번호 49-63 및 65-95, GS, GGS 및 LE로부터 선택되거나;

또는

상기 키메라 단백질은 (B)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖고,

(a) 상기 키메라 단백질은 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인이되, 상기 막관통 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 PD-1, 서열번호 7의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CD172a(SIRP α) 및 서열번호 10의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 TIGIT로부터 선택되고,

(b) 상기 키메라 단백질은 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커이되, 상기 링커는 서열번호 46, 서열번호 47 또는 서열번호 48의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 그리고

(c) 상기 키메라 단백질은 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하되, 상기 막관통 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 LIGHT이고,

상기 링커는 상기 제1 도메인 및 상기 제2 도메인을 연결하고 힌지-CH₂-CH₃ Fc 도메인 및 하나 이상의 접합 링커를 포함하되, 상기 접합 링커는 서열번호 49-63 및 65-95, GS, GGS 및 LE로부터 선택되는, 키메라 단백질.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 키메라 단백질은 (A)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖되, 상기 키메라 단백질은 서열번호 14, 17 또는 20 중 하나의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖거나, 또는

상기 키메라 단백질은 (B)로 특정된 바와 같은 일반 구조식을 갖되, 상기 키메라 단백질은 서열번호 5, 8 또는 11 중 하나의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 키메라 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 키메라 단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 키메라 단백질 또는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 키메라 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하며, 환자의 암 또는 염증성 질환의 치료 또는 환자의 면역 반응의 조절을 위한 약제학적 조성물.

청구항 15

암 또는 염증성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암 또는 염증성 질환을 치료하기 위하여 키메라 단백질을 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 키메라 단백질은,

(A)

(a) 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인으로서, 상기 타입 I 막관통 단백질은 TIGIT인, 상기 제1 도메인,

(b) 힌지-CH₂-CH₃ Fc 도메인 및 서열번호 49-63 및 65-95, GS, GGS 및 LE로부터 선택되는 하나 이상의 접합 링커를 포함하는 링커, 및

(c) 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인으로서, 상기 타입 II 막관통 단백질은 4-1BBL, GITRL, TL1A 및 LIGHT로부터 선택되는, 상기 제2 도메인을 포함하거나,

또는

(B)

(a) 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인으로서, 상기 타입 I 막관통 단백질은 PD-1, CD172a(SIRP α) 및 TIGIT로부터 선택되는, 상기 제1 도메인,

(b) 힌지-CH₂-CH₃ Fc 도메인 및 서열번호 49-63 및 65-95, GS, GGS 및 LE로부터 선택되는 하나 이상의 접합 링커를 포함하는 링커, 및

(c) 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인으로서, 상기 타입 II 막관통 단백질은 LIGHT인, 상기 제2 도메인을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 대상체의 T 세포는 상기 키메라 단백질의 상기 제2 도메인에 의해서 결합될 때 활성화될

것이고, 그리고 하기 (a) 내지 (f) 중 하나 이상의 특징을 갖는, 약제학적 조성물:

- (a) 상기 키메라 단백질의 상기 제1 도메인에 의해서 결합될 때 하나 이상의 종양 세포는 면역억제성 신호 전송이 방지될 것,
- (b) 상기 대상체의 말초 혈액에서 정량화 가능한 사이토카인 반응이 달성될 것,
- (c) 타입 I 또는 타입 II 단백질, 또는 이의 각각의 리간드 또는 수용체에 지향되는 항체로 치료된 대상체와 비교할 때, 종양 성장 감소를 필요로 하는 상기 대상체에서 종양 성장이 감소될 것,
- (d) LIGHT, 4-1BBL, GITRL 및 TL1A 중 하나 이상의 신호전달이 자극되고, 항원-제시 세포가 활성화될 것,
- (e) 미치로 대상체 또는 상기 타입 I 또는 타입 II 단백질 또는 이의 각각의 리간드 또는 수용체에 지향되는 항체로 치료된 대상체와 비교할 때, 조절 T 세포(Treg)의 양 또는 활성도가 감소될 것,
- (f) 미치로 대상체 또는 상기 타입 I 또는 타입 II 단백질 또는 이의 각각의 리간드 또는 수용체에 지향되는 항체로 치료된 대상체와 비교할 때, 상기 대상체의 드레이닝 림프절(drainage lymph node)에서 효과기 T 세포의 프라이밍(priming)이 증가될 것.

청구항 17

암의 치료를 위한, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 키메라 단백질을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

염증성 질환의 치료를 위한, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 키메라 단백질을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

선행기술

[0002]

본 출원은 2017년 2월 27일자로 출원된 미국 가출원 제62/464,002호의 이익 및 우선권을 주장하며, 이의 내용은 전체적으로 참고로 포함된다.

[0003]

전자적으로 제출된 텍스트 파일의 설명

[0004]

본 출원은 서열 목록을 포함한다. 이것은 파일명이 "SHK-001PC1_SequenceListing_ST25"인 ASCII 텍스트 파일로서 EFS-Web을 통해서 전자적으로 제출되었다. 서열 목록은 141,613바이트 크기이고, 2018년 2월 27일 즈음에 생성되었다. 서열 목록은 이의 전문이 참고로 포함된다.

[0005]

기술분야

[0006]

본 발명은 특히 질환, 예컨대, 암 및 자가면역을 위한 면역요법의 치료에서 사용되는 키메라 단백질을 포함하는, 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007]

면역계는 질환을 유발할 수 있는 외부 엔티티에 대한 신체의 반응에 중요하다. 그러나, 다수의 암은 예를 들어, 면역 저해 신호를 전달 또는 전파함으로써 면역계를 회피하는 기전을 발달시켰다. 따라서, 예를 들어, 면역 저해 신호를 반전시키고, 항암 면역 반응을 자극하는 다양한 기능을 갖는 요법을 개발할 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0008]

따라서, 다양한 양상에서, 본 발명은 암 면역요법에 유용한 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은, 부분적으로, 면역 활성화 및 공자극 신호를 제공하면서, 면역 저해 신호를 반전시키거나 또는 억제시키는 특이적 키메라 단백질에 관한 것이다. 중요하게는, 특히, 본 발명은 이론에 얽매이고자 함은 아니지만 하나 이상의 다이설파이드 결합을 포함하는 링커 영역에서의 안정화를 기초로 하는 안정적이고 생성 가능한 다량체 상태를 유지할 수 있는 개선된 키메라 단백질을 제공한다. 따라서, 본 조성물 및 방법은 이중특이적 작용제의 생산에서 다양한 결점을 극복한다.

[0009]

일부 양상에서, 키메라 단백질은 하기 일반 구조식을 갖는다: N 말단 - (a) - (b) - (c) - C 말단, 식 중, (a)는 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인이고, (b) 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커(비제한적으로, 인간 IgG4로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함함)이고, (c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인이고, 여기서 링커는 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하고, 선택적으로 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합 링커를 포함한다.

[0010]

예를 들어, 실시형태에서, 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인은 TIGIT(VSIG9, VSTM3)로부터 유래된다.

[0011]

실시형태에서, 키메라 단백질은 하기 일반 구조식을 갖는다: N 말단 - (a) - (b) - (c) - C 말단, 식 중, (a)는 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인이고, 막관통 단백질은 TIGIT이고, (b)는 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커(비제한적으로, 인간 IgG4로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함함)이고, (c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인이고, 여기서 링커는 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하고, 선택적으로 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합 링커를 포함한다.

파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커(비제한적으로, 인간 IgG4로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함함), (c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인이고, 막관통 단백질은 4-1BBL(TNFSF9), GITRL(TNFSF18), TL1A(TNFSF15) 및 LIGHT(TNFSF14)로부터 선택되고, 여기서 링커는 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하고, 선택적으로 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합 링커를 포함한다.

[0012] 예를 들어, 실시형태에서, 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인은 LIGHT로부터 유래된다.

[0013] 실시형태에서, 키메라 단백질은 하기 일반 구조식을 갖는다: N 말단 - (a) - (b) - (c) - C 말단, 식 중, (a)는 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인이고, 막관통 단백질은 PD-1, CD172a(SIRP α) 및 TIGIT로부터 선택되고, (b)는 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커(비제한적으로, 인간 IgG4로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함함), (c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인이고, 막관통 단백질은 LIGHT이고, 여기서 링커는 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하고, 선택적으로 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합 링커를 포함한다.

[0014] 일부 양상에서, 상기에 언급된 키메라 단백질의 약제학적 조성물을 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 암 또는 염증성 질환의 치료 방법을 제공한다. 실시형태에서, 대상체의 T 세포는, 키메라 단백질의 제2 도메인에 의해서 결합될 때 활성화되고, 그리고 (a) 상기 키메라 단백질의 상기 제1 도메인에 의해서 결합될 때 하나 이상의 종양 세포는 면역억제성 신호 전송이 예방되고/예방되거나 (b) 상기 대상체의 말초 혈액에서 정량화 가능한 사이토카인 반응이 달성되고/달성되거나 (c) 타입 I 또는 타입 II 단백질, 또는 이의 각각의 리간드 또는 수용체에 지향되는 항체로 치료된 대상체와 비교할 때, 종양 성장 감소를 필요로 하는 대상체에서 종양 성장이 감소된다. 실시형태에서, 방법은 LIGHT, 4-1BBL, GITRL 및 TL1A 중 하나 이상의 신호전달을 자극하고, 항원-제시 세포를 활성화시킨다. 실시형태에서, 방법은, 미치료 대상체 또는 타입 I 또는 타입 II 단백질 또는 이의 각각의 리간드 또는 수용체에 지향되는 항체로 치료된 대상체와 비교할 때, 조절 T 세포(Treg)의 양 또는 활성도를 감소시킨다. 실시형태에서, 방법은, 미치료 대상체 또는 타입 I 또는 타입 II 단백질 또는 이의 각각의 리간드 또는 수용체에 지향되는 항체로 치료된 대상체와 비교할 때 대상체의 드레이닝 림프절(drainage lymph node)에서 효과기 T 세포의 프라이밍(priming)을 증가시킨다. 실시형태에서, 방법은, 미치료 대상체 또는 타입 I 또는 타입 II 단백질 또는 이의 각각의 리간드 또는 수용체에 지향되는 항체로 치료된 대상체와 비교할 때, 면역억제성 세포의 전체 감소 및 더 염증성인 종양 환경으로의 이동을 초래한다.

[0015] 본 명세서에 기술된 임의의 양상 또는 실시형태는 본 명세서에 개시된 바와 같은 임의의 다른 양상 또는 실시형태와 조합될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] **도 1A** 내지 **도 1D**는 막관통 도메인 및 세포내 도메인을 제거하고, 링커 서열을 사용하여 접합시켜(**도 1B**) 단일 키메라 단백질을 생성하도록 타입 I 막 단백질 및 타입 II 막 단백질(**도 1A** 및 **도 1C**)을 조작할 수 있는 방법의 개략도(여기서 타입 I 막 단백질 및 타입 II 막 단백질의 세포외 도메인은 각각 단일 키메라 단백질에서 외부로 향함). **도 1B**는 각각의 단백질의 막관통 도메인 및 세포내 도메인의 제거에 의한 타입 I 막 단백질 및 타입 II 막 단백질의 연결부를 도시하며, 여기서 각각의 단백질로부터의 해방된 세포외 도메인(ECD)은 링커 서열에 의해서 접합되어 있다. 본 설명에서 ECD는 전형적으로는 세포막 외부에 국지화된 후보 타입 I 또는 타입 II 단백질의 전체 아미노산 서열, 또는 의도된 수용체 또는 리간드에 대한 결합을 유지하는 이의 임의의 부분을 포함할 수 있다. **도 1D**는 전형 작제물에서의 접합된 세포외 도메인을 도시하는데, 여기서 타입 I 막 단백질의 세포외 도메인은 작제물의 "좌"측을 향하고, 타입 II 막 단백질의 세포외 도메인은 작제물의 "우"측을 향한다.

도 2A는 예로서 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질을 사용하여, 종양 세포가 세포 표면 상에서 PD-L1을 발현할 수 있고, 이것이 T 세포에 의해서 발현된 PD-1에 결합할 수 있다는 것(**도 2B**)을 나타낸 도면. 이러한 상호작용이 T 세포의 활성화를 억제한다. OX40L의 세포외 도메인에 접합된, PD-1의 세포외 도메인을 포함하는 키메라 단백질은 종양 세포의 표면 상의 PD-L1에 결합하여, T 세포의 표면 상의 PD-1에 대한 결합을 예방할 수 있다(**도 2C**). 이어서 키메라 단백질은 종양 세포의 표면으로부터 "매달"릴 수 있고, 이어서 키메라 단백질의 OX40L 부분은 T 세포의 표면 상에 발현된 OX40에 결합할 수 있다. 이것은 저해 PD-L1 신호를 공자극 OX40 신호로 대체시켜 T 세포의 항종양 활성도를 향상시킬 것이다. **도 2D**는 종양 세포와 T 세포 사이에 키메라 단백질에 의해서 형성된 시냅스를 나타낸 도면. **도 2A** 내지 **도 2C**는 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질이 이의 표적 분자에 결합하여 세포 사이에 시냅스를 생성하는 기전을 도시하며; 따라서 PD-1-Fc-OX40L은 본 발명의 키메라 단백질이 작동하는 기전의

예시이다.

도 3A는 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개된 뮤린 TIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면.

도 3B는 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개된 인간 TIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면. 두 경우 모두에서, 각각의 도메인의 특이적 검출을 항-TIGIT, 항-Fc 및 항-OX40L 블롯에 의해서 나타낸다.

도 4A는 하기 조건 하에서 수행된 뮤린 TIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질의 ELISA를 나타낸 그래프: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(좌측 상단), CD155/PVR-His를 포획하고, IgG로 검출하였고(우측 상단), OX40-His를 포획하고, mOX40L에 지향되는 항체로 검출하였고(좌측 하단), 및 OX40-Fc를 포획하고, 재조합 CD155로 검출하였다(우측 하단). **도 4B**는 하기 조건 하에서 수행된 인간 TIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질의 ELISA를 나타낸 그래프: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(좌측 상단), CD155/PVR-His를 포획하고, IgG로 검출하였고(우측 상단), OX40-His를 포획하고, mOX40L에 지향되는 항체로 검출하였고(좌측 하단), 및 OX40-Fc를 포획하고, 재조합 CD155, CD112 또는 CD113로 검출하였다(우측 하단).

도 5A는 TIGIT 함유 작제물을 통해서 결합을 검출하는 데 사용될 수 있는 인간 PVR(CHOK1/PVR)을 과발현하도록 생성된 세포주를 나타낸 도면(**도 5A**에서, 염색되지 않음 및 아이소타입이 중첩됨).

도 5B는 TIGIT 함유 작제물을 통해서 결합을 검출하는 데 사용될 수 있는 벡틴-2(CHOK1/벡틴2)를 과발현하도록 생성된 세포주를 나타낸 도면.

도 5C는 TIGIT 함유 작제물을 통해서 결합을 검출하는 데 사용될 수 있는 벡틴-3(CHOK1/벡틴3)을 과발현하도록 생성된 세포주를 나타낸 도면(**도 5C**에서, 염색되지 않음, 아이소타입 및 검출 Ab가 중첩됨).

도 6은 마우스 PVR을 발현하는 CHO-K1 세포(좌측 상단), PVR이 결합된 모체 CHO-K1 세포(좌측 하단) 또는 마우스 OX40을 발현하는 CHO-K1 세포(우측)에 대한 마우스 TIGIT-Fc-OX40L의 결합을 나타낸 그래프.

도 7은 대략 6,000종의 인간 막 단백질을 함유하는 마이크로레이로부터의 인간 TIGIT-Fc-OX40L의 식별된 결합 파트너를 나타낸 결과의 표. 각각의 경우에, 각각의 후보 분자에 대한 예측된 결합 파트너를 스크린에 의해서 식별하였다. 다른 인간 단백질에 대한 비특이적 결합의 증거는 존재하지 않았고, 갈락틴-1에 대한 결합이 모든 Fc-함유 융합 단백질에 대한 스크린에서 인지된다.

도 8A는 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개된 뮤린 mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면.

도 8B는 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개된 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면.

도 9A는 하기 조건 하에서 수행된 뮤린 mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 ELISA를 나타낸 그래프: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(좌측 상단), CD47-His를 포획하고, IgG로 검출하였고(우측 상단), mLtBR-His를 포획하고, mLIGHT에 지향되는 항체로 검출하였고(좌측 하단), 및 LtBR His+GST를 포획하고, SIRP α에 지향되는 항체로 검출하였다(우측 하단). **도 9B**는 하기 조건 하에서 수행된 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 ELISA를 나타낸 그래프: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(좌측 상단), CD47-His를 포획하고, IgG로 검출하였고(우측 상단), 인간 LtBR-His를 포획하고, 인간 LIGHT에 지향되는 항체로 검출하였고(좌측 하단), 및 LtBR His+GST를 포획하고, SIRP α에 지향되는 항체로 검출하였다(우측 하단).

도 10A는 마우스 CD47을 발현하는 CHO-K1 세포(좌측) 또는 마우스 LtBr을 발현하는 CHO-K1 세포(우측)에 대한 마우스 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT의 결합을 나타낸 그래프. **도 10B**는 마우스 CD47을 발현하는 CHO-K1 세포에 대한 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT의 결합을 나타낸 그래프(검출 Ab 단독 대조군 피크는 가장 좌측에 존재하고, 나머지 피크는 농도 증가에 의해서 좌측에서 우측으로 분포된다(즉, 250이 가장 우측에 존재함)).

도 11a는 CD47 특이적 항체(클론 CC2C6 또는 CC900002)와 비교하여, 시노물거스 마카크 적혈구에 대한 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 CD172a(SIRP α)-Fc-CD40L의 결합을 나타낸 그래프, 좌측 상단. 각각의 처리 이후에 시노물거스 마카크 적혈구의 용해를 좌측 하단에 적정 곡선 위에 나타내고, 예시적인 플레이트를 우측에 나타낸다. 트리톤(Triton)-X를 양성 대조군으로서 사용하여 시노물거스 마카크 적혈구의 용해를 유발하였다(참조군의 경우, 상단 패널에서, X-축 지점 2nM에서, 상단에서 하단까지의 곡선은 항-CD47/IgG-APC, 항-CD47-FITC,

SIRP α -Fc-LIGHT 및 SIRP α -Fc-CD40L인 반면, 하단 패널에서 X-축 지점 2에서, 상단에서 하단까지의 곡선은 트리톤-X100, 항-CD47(CC2C6) 및 항-CD47(CC9002), SIRP α -Fc-LIGHT, 및 SIRP α -Fc-CD40L(모두 중첩됨)이다. **도 11b**는 CD47 특이적 항체(클론 CC2C6 또는 CC900002)와 비교하여, 3명의 상이한 인간 혈액 공여자 각각으로부터의 인간 적혈구에 대한 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 CD172a(SIRP α)-Fc-CD40L의 결합을 나타낸 그래프. **도 11c**는 각각의 처리 이후에 인간 적혈구의 용해를 좌측에 적정 곡선 위에 나타내고, 예시적인 플레이트를 우측에 나타낸다. 트리톤-X를 양성 대조군으로서 사용하여 시노물거스 마카크 적혈구의 용해를 유발하였다. 3명의 인간 적혈구 공여자에 대한 데이터를 나타낸다.

도 12A는 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개된 뮤린 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면. **도 12B**는 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개된 인간 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면.

도 13A는 하기 조건 하에서 수행된 뮤린 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 ELISA를 나타낸 그래프: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(좌측), mLTBR-His를 포획하고, mLIGHT에 지향되는 항체로 검출하였고(중간), 및 mPD-L1을 포획하고, mLIGHT에 지향되는 항체로 검출하였다(우측). **도 13B**는 하기 조건 하에서 수행된 인간 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 ELISA를 나타낸 그래프: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(좌측), hLTBR-Fc His를 포획하고, 바이오틴일화된 hLIGHT로 검출하였고(중간), 및 hPDL1-Fc를 포획하고, hLTBR-His/6x His-HRP로 검출하였다(우측).

도 14A는 마우스 PD-L1을 발현하는 CHO-K1 세포(좌측) 또는 마우스 LTbR을 발현하는 CHO-K1 세포(우측)에 대한 마우스 PD-1-Fc-LIGHT의 결합을 나타낸 그래프. **도 14B**는 인간 PD-L1을 발현하는 CHO-K1 세포에 대한 인간 PD-1-Fc-LIGHT의 결합을 나타낸 그래프.

도 15A는 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개된 뮤린 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면. **도 15B**는 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개된 인간 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면.

도 16A는 하기 조건 하에서 수행된 뮤린 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 ELISA를 나타낸 그래프: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(좌측), CD155/PVR을 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(중간), 및 mLTBR-His를 포획하고, mLIGHT에 지향되는 항체로 검출하였다(우측). **도 16B**는 하기 조건 하에서 수행된 인간 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 ELISA를 나타낸 그래프: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(좌측), CD155-His를 포획하고, IgG로 검출하였고(중간), hCD155-Fc를 포획하고, hLTBR-His/6x His-HRP로 검출하였다(우측).

도 17은 마우스 PVR을 발현하는 CHO-K1 세포(좌측) 또는 마우스 LTbR을 발현하는 CHO-K1 세포(우측)에 대한 마우스 TIGIT-Fc-LIGHT의 결합을 나타낸 그래프.

도 18A는 인간 LTbR에 대한 인간 TIGIT-Fc-LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 PD-1-Fc-LIGHT의 결합을 입증하는, 옥텟 시스템(Octet system)을 사용한 생물층 간섭계법(biolayer interferometry)을 사용함으로써 수집된 결합 친화도 측정치를 나타낸 그래프(모든 패널, 상단에서 하단으로: 30, 10, 3.3, 0). **도 18B**는 다양한 농도에 걸친 재조합 인간 PD-L1 및 PD-L2에 대한 인간 PD-1-Fc-LIGHT의 결합을 입증하는, 옥텟 시스템을 사용한 생물층 간섭계법에 의해서 수집된 결합 친화도 측정치를 나타낸 그래프(상단에서 하단으로: 500nM ARC x PD-L1, 500nM ARC x PD-L2, 166nM ARC x PD-L1, 166nM ARC x PD-L2, 56nM ARC x PD-L1, 56nM ARC x PD-L2, ARC 없음).

도 19A는 일측 TIGIT-Fc 융합 단백질 대조군과 비교할 때, 재조합 인간 CD155/PVR에 대한 인간 TIGIT-Fc-0X40L 및 TIGIT-Fc-LIGHT의 결합을 입증하는, 옥텟 시스템을 사용한 생물층 간섭계법을 사용함으로써 수집된 결합 친화도 측정치를 나타낸 그래프(상단에서 하단으로: TIGIT-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-0x40L, TIGIT-Fc). **도 19B**는 단일 측 CD172a(SIRP α)-Fc 대조군, 또는 두 CD47 특이적 항체 대조군 중 하나와 비교할 때, 재조합 인간 CD47에 대한 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT의 결합을 입증하는, 옥텟 시스템을 사용한 생물층 간섭계법을 사용함으로써 수집된 결합 친화도 측정치를 나타낸 그래프(상단에서 하단으로: SIRP α -Fc-LIGHT, 항-CD47, 항-CD47 CC2C6, 및 SIRP-Fc). **도 19C**는 단일 측 PD-1-Fc 대조군 또는 항-PD-L1 대조군(아테졸리주맵)과 비교할 때, 재조합 인간 PD-L1에 대한 인간 PD-1-Fc-LIGHT의 결합을 입증하는, 옥텟 시스템을 사용한 생물층 간섭계법을 사용함으로써 수집된 결합 친화도 측정치를 나타낸 그래프(상단에서 하단으로: PD-1-Fc-LIGHT, 항-PDL1 및 PD-1-Fc). **도 19D**는 단일 측 LIGHT-Fc 융합 단백질 대조군 또는 항-LTbR 항체와 비교할 때, 재조합 인간 LTbR에 대한 인간

CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT 또는 PD-1-Fc-LIGHT의 결합을 입증하는, 옥텟 시스템을 사용한 생물층 간섭계법을 사용함으로써 수집된 결합 친화도 측정치를 나타낸 그래프(상단에서 하단으로: TIGIT-Fc-LIGHT, Sirp1a-Fc-LIGHT, 항-LTbR, PD-1-Fc-LIGHT 및 LIGHT-Fc).

도 20a 및 **도 20b**는 스태필로코쿠스 엔테로톡신 B(staphylococcus enterotoxin B: SEB)에 의해서 활성화된 마우스 말초 혈액 백혈구에 대한 다양한 항체, 마우스 TIGIT-Fc-OX40L, 마우스 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, 마우스 TIGIT-Fc-LIGHT 및 마우스 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 효과를 입증하는 슈퍼항원 사이토카인 방출 검정을 나타낸 도면. **도 20a**는 IL2 분비를 검정하고, **도 20b**는 TNF α 분비를 검정한다. **도 20a** 및 **도 20b**의 경우, SEB의 각각의 농도에 대한 조건의 순서는 좌측에서부터 우측으로, 상단에서부터 하단으로 범례에 열거된 조건을 반영한다(예를 들어, α -PD-1(RMP1-14)은 범례에서 상단으로부터 세 번째이고, 따라서 그래프에서 좌측으로부터 세 번째이고, PD-1-Fc-LIGHT(10nM)은 범례에서 하단으로부터 세 번째이고, 따라서 그래프에서 우측으로부터 세 번째이고, 그 등등임). **도 20c**는 다양한 슈퍼항원(SEB) 농도에 걸친 데이터의 편집을 나타낸 도면(다시, SEB의 각각의 농도에 대한 조건의 순서는 좌측에서부터 우측으로, 상단에서부터 하단으로의 범례에 열거된 조건을 반영한다).

도 21A 내지 **도 21C**는 스태필로코쿠스 엔테로톡신 B(SEB)에 의해서 활성화된 인간 말초 혈액 백혈구에 대한 다양한 항체, 인간 TIGIT-Fc-LIGHT(**도 21A**), 인간 TIGIT-Fc-OX40L(**도 21B**), 인간 PD-1-Fc-LIGHT, 및 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT(**도 21C**) 키메라 단백질의 효과를 입증하는 슈퍼항원 사이토카인방출 검정을 나타낸 도면.

도 22A 내지 **도 22C**는 TIGIT, CD47, OX40, PD-1 또는 TIGIT와 OX40의 조합물에 대한 단클론성 항체와 비교하여, mTIGIT-Fc-OX40L, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, mTIGIT-Fc-LIGHT 및 mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 항종양 효능을 입증하는 생체내 종양 연구로부터의 결과를 나타낸 도면. 제시된 요법으로 처리하기 전에, CT26 종양을 Balb/c 마우스에 이식하였다. **도 22A**는 각각의 군에 대한 종양 접종 후 40일에 걸친 종양 크기의 발달을 나타낸 도면. **도 22B**는 종양 접종 후 40일 전체에서 마우스의 전체 생존 백분율을 나타내고, 완전 종양 거부자의 수를 포함한 표에 나타낸다. **도 22A** 및 **도 22B**에서, 처리 조건을 문자로 나타낸다.

도 23은 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질의 4가지의 잠재적인 구성을 나타낸 도면.

도 24는 비환원 조건, 환원 조건, 및 환원 조건 및 그 다음 펩타이드-N-글리코시다제 F(PNGaseF)로의 처리 하에서 SDS-PAGE 상에서 전개된 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸 도면.

도 25는 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 상에서 전개된 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질에 대한 크로마토그래피를 나타낸 도면.

도 26은 비환원 조건("-") 또는 환원 조건("+") 하에서 수행된 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질에 대한 SDS-PAGE 및 네이티브(비-SDS) PAGE 젤을 나타낸 도면.

도 27은 Fc 도메인이 결핍된 PD-1-No Fc-OX40L 키메라 단백질에 대한 네이티브(비-SDS) PAGE 젤을 나타낸 도면.

도 28은 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 육량체 및 콘카티머(concatemer)가 본 발명의 키메라 단백질로부터 형성되는 방법에 대한 모델을 나타낸 도면.

도 29A 내지 **도 29Q**는 웨스턴 블롯 분석에 의한 상이한 접합 링커 서열을 갖는 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질의 특징규명을 나타낸 도면. 상이한 접합 링커의 서열을 하기 실시예 섹션에 제공한다. 구체적으로, 융합 작제물의 각각의 개별 도메인을 α -PD-1, α -Fc, 또는 α -OX40L 항체를 사용하여 프로빙하였다. 각각의 도면에서, PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질의 미처리 샘플, 예를 들어, 대조군을 모든 블롯에서 레인 1에 적재하였다(β -머캅토에탄올 또는 PNGase 없음). 레인 2의 샘플을 환원제, β -머캅토에탄올로 처리한 반면, 레인 3의 샘플을 PNGase로 처리하였다.

도 30은 단백질의 중심 Fc 영역에 대해서 ELISA-기반 포획 및 검출 검정에 의한 상이한 접합 링커 서열을 갖는 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질의 특징규명을 나타낸 도면. 상이한 접합 링커 서열(#1 내지 #17)을 갖는 각각의 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질의 단백질 농도를 결정하였다.

도 31a 내지 **도 31p**는 PD-L1 또는 OX40에 대한 FACS에 의한 상이한 접합 링커 서열을 갖는 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질의 유세포 분석법 프로파일을 나타낸 도면. EC₅₀ 값을 상이한 접합 링커 서열을 갖는 각각의 PD-1-Fc-

OX40L 키메라 단백질에 대해서 계산하였다(#2 내지 #17 - 링커 동일성에 대해서는 하기 실시에서의 X-축 레이블 및 차트를 참고하기 바란다).

도 32는 예시적인 모듈식 링커에 조합될 수 있는 접합 링커 및 Fc 링커를 나타낸 표. 도시된 예시적인 모듈식 링커는 임의의 본 명세서에 기술된 타입 I 및 타입 II 단백질 및/또는 본 명세서에 기술된 타입 I 및 타입 II 단백질의 세포의 도메인과 조합되어 본 발명의 키메라 단백질을 형성할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은, 부분적으로, 키메라 단백질이, 이러한 단백질의 배향(예를 들어, 타입 I 대 타입 II)을 이용하여, 예를 들어, 구체적으로는 LIGHT- 및/또는 TIGIT-기반 키메라 단백질이 의학적 용도를 갖는 암의 치료에서 면역 저해 신호를 차폐하고, 그것을 면역 자극 신호로 대체하는 것을 비롯한, 면역 자극 및/또는 면역 저해 신호의 전달을 허용하는 방식으로, 면역-조정 막관통 단백질의 세포외, 또는 효과기, 영역으로부터 조작될 수 있다는 발견을 기반으로 한다.

[0018] 키메라 단백질

[0019] 일부 양상에서, 키메라 단백질은 하기 일반 구조식을 갖는다: N 말단 - (a) - (b) - (c) - C 말단, 식 중, (a)는 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인이고, (b) 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 갖는 링커(비제한적으로, 인간 IgG4로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함함)이고, (c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인이고, 여기서 링커는 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하고, 임의로 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합 링커를 포함하고, 여기서 제1 세포의 도메인 및 제2 세포의 도메인 중 하나는 면역 저해 신호이고, 제1 세포의 도메인 및 제2 세포의 도메인 중 하나는 면역 자극 신호이다.

[0020] 실시형태에서, 키메라 단백질은 재조합 융합 단백질, 예를 들어, 본 명세서에 기술된 세포외 도메인을 갖는 단일 폴리펩타이드를 지칭한다. 예를 들어, 실시형태에서, 키메라 단백질은 세포에서 단일 단위로 번역된다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 예를 들어, 생체내에서, 연결되어 단일 단위를 산출하는 다수의 폴리펩타이드의 재조합 단백질, 예를 들어, 본 명세서에 기술된 다수의 세포외 도메인(예를 들어, 본 명세서에 기술된 하나 이상의 합성 링커를 가짐)을 지칭한다.

[0021] 실시형태에서, 키메라 단백질은 하나의 폴리펩타이드로서 화학적으로 합성되거나 또는 각각의 도메인은 개별적으로 화학적으로 합성되고, 그 다음 조합될 수 있다. 실시형태에서, 키메라 단백질의 일부는 번역되고, 일부는 화학적으로 합성된다.

[0022] 실시형태에서, 세포외 도메인은 세포외 환경과 상호작용할 수 있는 막관통 단백질의 일부를 지칭한다. 실시형태에서, 세포외 도메인은 리간드 또는 수용체에 결합하여, 세포에 신호를 효과적으로 전송하기에 충분한 막관통 단백질의 일부를 지칭한다. 실시형태에서, 세포외 도메인은 세포 또는 세포막의 외부에 존재하는 막관통 단백질의 전체 아미노산 서열이다. 실시형태에서, 세포외 도메인은 세포외 도메인은 세포 또는 세포막의 외부에 존재하는 막관통 단백질의 아미노산 서열의 일부이며, 관련 기술 분야에 공지된 방법(예를 들어, 시험관내 리간드 결합 및/또는 세포 활성화 검정)을 사용하여 검정될 수 있는 바와 같이 신호 변환 및/또는 리간드 결합에 필요하다.

[0023] 실시형태에서, 면역 저해 신호는 면역 반응을 감소시키거나 제거하는 신호를 지칭한다. 예를 들어, 종양학과 관련하여, 이러한 신호는 항종양 면역을 감소시키거나 제거할 수 있다. 정상 생리학적 조건 하에서, 저해 신호는, 자기 관용의 유지(예를 들어, 자가면역의 예방)에 유용하며, 또한 면역계가 병원성 감염에 반응할 때 조직이 손상되는 것을 예방하는 데 유용하다. 예를 들어, 비제한적으로, 면역 저해 신호는, 이러한 저해 신호가 차단될 때, 세포 증식, 사이토카인 생산, 세포 사멸 활성화 또는 식세포 활성도의 증가를 검출함으로써 식별될 수 있다.

[0024] 실시형태에서, 면역 자극 신호는 면역 반응을 향상시키는 신호를 지칭한다. 예를 들어, 종양학과 관련하여, 이러한 신호는 항종양 면역을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 면역 자극 신호는 증식, 사이토카인 생산, 백혈구의 사멸 활성화 또는 식세포 활성도를 직접 자극함으로써 식별될 수 있다. 구체적인 예는 수용체 효능제 항체를 사용하거나 또는 이러한 수용체에 대한 리간드(각각 OX40L, LIGHT, 4-1BBL, TL1A)를 암호화하는 키메라 단백질을 사용하여 TNF 슈퍼패밀리 수용체, 예컨대, OX40, LTbR, 4-1BB 또는 TNFRSF25를 직접 자극하는 것을 포함한다. 이러한 수용체 중 임의의 하나로부터의 자극은 개별 T 세포 하위세트의 증식 및 사이토카인 생

산을 직접 자극할 수 있다. 또 다른 예는 이러한 면역 억제인자 세포의 활성도를 저해하는 수용체를 통해서 면역 억제 세포를 직접 자극하는 것을 포함한다. 이것은 예를 들어, GITR 효능제 항체 또는 GITRL 함유 키메라 단백질(이것은 종래의 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 증식을 억제하는 조절 T 세포의 능력을 감소시킬 것임)로의 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포의 자극을 포함할 것이다. 또 다른 예에서, 이것은 CD40 효능제 항체 또는 CD40L을 함유하는 키메라 단백질을 사용한 항원 제시 세포의 표면 상의 CD40의 자극을 포함할 것인데, 이것은 B7 또는 TNF 슈퍼패밀리에서의 것을 비롯한, 적절한 네이티브 공자극 분자와 관련하여 항원을 제시하는 이러한 세포의 향상된 능력을 비롯하여, 항원 제시 세포의 활성화를 유발할 것이다. 또 다른 예에서, 이것은 LIGHT 함유 키메라 단백질을 사용한, 림프계 또는 기질 세포의 표면 상의 LTBR의 자극을 포함할 것인데, 이것은 림프계 세포의 활성화 및/또는 전염증성 사이토카인 또는 케모카인의 생산을 유발하여 선택적으로 종양 내에서, 면역 반응을 추가로 자극할 것이다.

[0025] 막 단백질은 전형적으로 세포의 도메인, 하나 또는 일련의 막관통 도메인, 및 세포내 도메인으로 이루어진다. 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 막 단백질의 세포의 도메인은 가용성 또는 막 결합된 수용체 또는 리간드와의 상호작용에 대한 책임이 있다. 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 막관통 도메인(들)은 단백질을 원형질막에 국지화시키는 책임이 있다. 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 막 단백질의 세포내 도메인은 세포내 반응을 세포의 환경과 조정하기 위해 세포 신호전달 분자와의 상호작용을 조정하는 책임이 있다(또는 그 역). 2가지 유형의 단일-통과 막 단백질이 존재하는데, 세포의 아미노 말단 및 세포내 카복시 말단을 갖는 것(타입 I) 및 세포의 카복시 말단 및 세포내 아미노 말단을 갖는 것(타입 II)이다. 타입 I 막 단백질 및 타입 II 막 단백질 둘 다는 수용체이거나 또는 리간드일 수 있다. 타입 I 막 단백질의 경우, 단백질의 아미노 말단은 세포 외부로 향하고, 따라서 세포의 환경에서 다른 결합 파트너(리간드 또는 수용체)와 상호작용하는 책임이 있는 기능성 도메인을 함유한다. 타입 II 막 단백질의 경우, 단백질의 카복시 말단은 세포 외부로 향하고, 따라서 세포의 환경에서 다른 결합 파트너(리간드 또는 수용체)와 상호작용하는 책임이 있는 기능성 도메인을 함유한다. 따라서, 이러한 2가지 유형의 단백질은 서로에 대해서 상반된 배향을 갖는다.

[0026] 타입 I 막 단백질 및 타입 II 막 단백질의 외부로 향하는 도메인이 상반되기 때문에, 분자의 '외부로 향하는' 도메인이 또한 서로에 상반된 배향으로 존재하도록 타입 I 막 단백질 및 타입 II 막 단백질의 세포의 도메인을 연결시키는 것이 가능하다(도 1D). 따라서 생성된 작제물은, 링커 서열을 사용하여 분자의 '우'측 상의 타입 II 막 단백질의 세포의 도메인에 연결된, 분자의 '좌'측 상의 타입 I 막 단백질의 세포의 도메인으로 이루어질 것이다. 이러한 작제물은 이러한 3개의 단편(타입 I 단백질의 세포의 도메인, 그 다음 링커 서열, 그 다음 타입 II 단백질의 세포의 도메인)을 벡터(플라스미드, 바이러스 또는 다른 것) 내에 클로닝함으로써 생산될 수 있는데, 여기서 완결된 서열의 아미노 말단은 타입 I 단백질을 함유하는 분자의 '좌'측에 상응하고, 완결된 서열의 카복시 말단은 타입 II 단백질을 함유하는 분자의 '우'측에 상응하였다. 따라서, 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 이와 같이 조작된다.

[0027] 실시형태에서, 세포의 도메인은 이러한 수용체의 리간드에 의한 신호전달을 경쟁적으로 저해하기 위해서 가용성 단백질을 생산하는 데 사용될 수 있다. 실시형태에서, 세포의 도메인은 인공 신호전달을 제공하기 위해서 사용될 수 있다.

[0028] 실시형태에서, 타입 I 막관통 단백질의 세포의 도메인은 면역 억제 신호이다. 실시형태에서, 타입 II 막관통 단백질의 세포의 도메인은 면역 자극 신호이다.

[0029] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 타입 I 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 타입 II 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 타입 I 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편, 및 타입 II 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.

[0030] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 비제한적으로, SLAMF4, IL-2 R α , 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R β , ALCAM, BTLA, B7-1, IL-4 R, B7-H3, BLAME/SLAMFS, CEACAM1, IL-6 R, IL-7 R α , IL-10R α , IL-10 R β , IL-12 R β 1, IL-12 R β 2, CD2, IL-13 R α 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CDS5j, ILT3/CDS5k, ILT4/CDS5d, ILT5/CDS5a, 루테그린(lutegrin) α 4/CD49d, CDS, 인테그린 α E/CD103, CD6, 인테그린 α M/CD 11b, CDS, 인테그린 α X/CD11c, 인테그린 β 2/CD1S, KIR/CD15S, CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD2S, KIR2DL3, CD30/TNFRSFS, KIR2DL4/CD15Sd, CD31/PECAM-1, KIR2DS4, CD40 리간드/TNFSF5, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CDS3, 류코트리엔 B4-R1, CDS4/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97, NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69, NTB-A/SLAMF6, 공통 γ χ /IL-2 R γ , 오스테오펀틴, CRACC/SLAMF7, PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4,

RANK/TNFRSF11A, CX3CR1, CX3CL1, L-셀렉틴, SIRP β 1, SLAM, TCCR/WSX-1, DNAM-1, 티모포이에틴, EMMPRIN/CD147, TIM-1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, Fas 리간드/TNFSF6, TIM-4, Fc γ RIII/CD16, TIM-6, TNFR1/TNFRSF1A, 그라눌리신, TNF RIII/TNFRSF1B, TRAIL R1/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAILR3/TNFRSF10C, IFN- γ R1, TRAILR4/TNFRSF10D, IFN- γ R2, TSLP, IL-1 R1, LIGHT, LTBR(TNFRSF3) 및 TSLP R의 세포의 도메인(해당되는 경우)을 비롯한, 인간 백혈구 상에 존재하는 1종 이상의 분자를 표적화하도록 조작될 수 있다.

- [0031] 조절 T 세포와 활성화는 공자극 및 공저해 신호에 의해서 상당히 영향을 받는다. 공자극 분자의 2개의 주요 패밀리는 B7 및 종양 괴사 인자(TNF) 패밀리를 포함한다. 이러한 분자는 각각 CD28 또는 TNF 수용체 패밀리에 속하는 T 세포 상의 수용체에 결합한다. 다수의 널리 정의된 공저해제 및 이의 수용체는 B7 및 CD28 패밀리에 속한다.
- [0032] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 예를 들어 TIGIT를 비롯한, 면역 저해에 관여되는 1종 이상의 분자를 표적으로 하도록 조작될 수 있다.
- [0033] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 예를 들어 TIGIT를 비롯한, 면역 저해제의 세포의 도메인을 포함한다.
- [0034] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 저해 특성을 갖는 타입 I 막 단백질의 세포의 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해 신호의 전달을 파괴, 차단, 감소 및/또는 저해하도록 조작된다.
- [0035] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LIGHT(CD258)인 면역 자극 신호의 세포의 도메인을 포함한다.
- [0036] 실시형태에서, 키메라 단백질은 이의 동족 수용체에 대한 저해 신호 리간드(예를 들어, CD155/PVR, 넥틴-2, 넥틴-3 및/또는 넥틴-4에 대한 TIGIT)의 결합을 자극하지만, 면역 세포(예를 들어, T 세포, 대식세포 또는 다른 백혈구)에 대한 저해 신호 전달을 저해한다.
- [0037] 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해 수용체 세포의 도메인 및 면역 자극 리간드 세포의 도메인을 포함하는데, 이것은 비제한적으로, 종양 세포의 면역 저해 신호를 차폐하면서, T 세포에 면역 자극을 전달할 수 있다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 T 세포 활성화의 실제 결과를 갖는 신호를 전달한다.
- [0038] 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해 신호의 수용체의 ECD인 면역 저해 신호를 포함하며, 이것은 면역 저해 신호의 동족 리간드를 보유하는 종양 세포 상에서 작용한다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 자극 신호의 리간드의 ECD인 면역 자극 신호를 포함하며, 이것은 면역 자극 신호의 동족 수용체를 보유하는 T 세포 상에서 작용한다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 (i) 면역 저해 신호의 수용체인 면역 저해 신호(그리고 이것은 면역 저해 신호의 동족 리간드를 보유하는 종양 세포 상에서 작용함) 및 (ii) 면역 자극 신호의 리간드인 면역 자극 신호(그리고 이것은 면역 자극 신호의 동족 수용체를 보유하는 T 세포 상에서 작용함) 둘 다를 포함한다.
- [0039] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 전문이 참고로 포함된 문헌[Mahoney, *Nature Reviews Drug Discovery* 2015;14:561-585]에 기술된 면역-조절제 중 1종 이상의 세포의 도메인을 포함한다.
- [0040] 실시형태에서, 키메라 단백질은 무린 리간드(들)/수용체(들)에 결합할 수 있다.
- [0041] 실시형태에서, 키메라 단백질은 인간 리간드(들)/수용체(들)에 결합할 수 있다.
- [0042] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 자극 특성을 갖는 타입 II 막 단백질의 세포의 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 자극 신호의 전달을 향상, 증가 및/또는 자극하도록 조작된다.
- [0043] 예를 들어, 실시형태에서, 타입 I 막관통 단백질의 세포의 도메인은 TIGIT로부터 유래된다.
- [0044] TIGIT는 면역글로불린 및 면역수용체 타이로신-기반 저해 모티프(ITIM) 도메인을 함유하는 T 세포 상에서 발현되는 면역수용체인, 폴리오바이러스 수용체(PVR)-유사 단백질이다. 이와 같이, TIGIT는 T 세포 및 자연 살해(NK) 세포 둘 다 상에서 저해 면역 관문으로서 작용하여, 적응(adaptive) 아암 및 내재(innate) 아암 둘 다를 표적화하는 기회를 제공한다.
- [0045] TIGIT는 NK 세포 및 활성화된 기억 및 조절 T 세포의 하위 세트 상에서, 특히 2차 림프 기관 내의 소포성(follicular) 헬퍼 T 세포 상에서 발현되며, CD155/PVR은 IFN-감마에 의해서 내피 세포 상에서 상향조절되고, 미성숙 흥선세포, 림프절 수지상 세포, 및 상피 및 뉴런 기원의 종양 세포 상에서 높게 발현된다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, TIGIT ECD를 포함함)은 바로 앞에(예를 들어, 면역 시냅스

와 관련하여) 기술된 세포 중 임의의 것을 조정한다.

- [0046] TIGIT는 CD155/PVR, 넥틴-2, 넥틴-3 및 넥틴-4에 결합한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, TIGIT ECD를 포함함)은 CD155/PVR에 대한 TIGIT의 결합을 조정한다(예를 들어, 결합 또는 신호 전달을 감소시키거나 또는 파괴한다). 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, TIGIT ECD를 포함함)은 넥틴-2에 대한 TIGIT의 결합을 조정한다(예를 들어, 결합 또는 신호 전달을 감소시키거나 또는 파괴한다). 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, TIGIT ECD를 포함함)은 넥틴-3에 대한 TIGIT의 결합을 조정한다(예를 들어, 결합 또는 신호 전달을 감소시키거나 또는 파괴한다). 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, TIGIT ECD를 포함함)은 넥틴-4에 대한 TIGIT의 결합을 조정한다(예를 들어, 결합 또는 신호 전달을 감소시키거나 또는 파괴한다).
- [0047] 실시형태에서, 키메라 단백질은 하기 일반 구조식을 갖는다: N 말단 - (a) - (b) - (c) - C 말단, 식 중, (a)는 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인이고, 막관통 단백질은 TIGIT이고, (b)는 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커(비제한적으로, 인간 IgG4로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함함), (c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인이고, 막관통 단백질은 4-1BBL, GITRL, TL1A 및 LIGHT로부터 선택되고, 여기서 링커는 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하고, 선택적으로 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합 링커를 포함한다.
- [0048] 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해제 TIGIT의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍을 이룬다: TIGIT/OX-40L; TIGIT/4-1BBL, TIGIT/LIGHT; TIGIT/GITRL; TIGIT/CD70; TIGIT/CD30L; TIGIT/CD40L; TIGIT/CD137L; TIGIT/TL1A; 및 TIGIT/OX40L. 실시형태에서 키메라 단백질은 TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-OX40L, 또는 TIGIT-Fc-TL1A이고, 여기서 Fc는 항체의 Fc 도메인의 적어도 일부를 포함하고, 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커를 나타낸다.
- [0049] 예를 들어, 실시형태에서, 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인은 LIGHT로부터 유래된다.
- [0050] 유도성 본성을 갖고, 헤르페스 바이러스 출입 매개인자(HVEM)/종양 괴사 인자(TNF)-관련 2에 대해서 단순 헤르페스 바이러스 당단백질 D와 경쟁할 수 있는 림프독소와 유사한 엔티티인 LIGHT(HVEM-L, TNFSF14, 또는 CD258)는 TNF 슈퍼패밀리 구성원이다. 그것은 29-kDa의 타입 II 막관통 단백질이며, 활성화된 T 세포뿐만 아니라 DC 상에서 동종삼량체로서 발현되고, 3종의 수용체, 즉, HVEM, LT-β 수용체(LTβR, TNFRSF3) 및 디코이(decoy) 수용체 3(DcR3)을 갖는다. 이론에 얽매이지 않음은 아니지만, 구별되는 세포 발현 패턴을 갖는 3종의 수용체는 활성화된 DC, T 및 B 세포, NK 세포, 단핵구 및 내피 세포 상에서 검출된 LIGHT: HVEM(TNFRSF14, CD270); 소포성 DC 및 기질 세포 상에서 발견된 LTβR(그리고 LIGHT에 결합함); 및 다양한 암 세포, 예컨대, 다발성 골수종 및 미만성 거대 B-세포 림프종 상에서 검출된 가용성 엔티티 디코이 수용체 3(DcR3)과 상호작용한다고 공지되어 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LIGHT와 이러한 3종의 수용체 중 1종 이상의 상호작용을 파괴하거나 또는 감소시킬 수 있다.
- [0051] LIGHT는 LTβR, 및 잠재적으로는 HVEM뿐만 아니라 DcR3에 결합한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, LIGHT ECD를 포함함)은 LTβR에 대한 LIGHT의 결합을 조정한다(예를 들어, 결합 또는 신호 전달을 증가시키거나 또는 촉진시킨다). LTβR은 림프구가 아닌 내장, 림프계, 및 다른 기질, 상피 및 골수 세포에 의해서 발현된다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, LIGHT ECD를 포함함)은 내장, 림프계, 및 다른 기질, 상피 및 골수 세포 중 하나 이상을 조정한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, LIGHT ECD를 포함함)은 HVEM에 대한 LIGHT의 결합을 조정한다(예를 들어, 결합 또는 신호 전달을 증가시키거나 또는 촉진시킨다). 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질(예를 들어, LIGHT ECD를 포함함)은 DcR3에 대한 LIGHT의 결합을 조정한다(예를 들어, 결합 또는 신호 전달을 증가시키거나 또는 촉진시킨다).
- [0052] 실시형태에서, 키메라 단백질은 하기 일반 구조식을 갖는다: N 말단 - (a) - (b) - (c) - C 말단, 식 중, (a)는 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제1 도메인이고, 막관통 단백질은 PD-1, CD172a(SIRPα) 및 TIGIT로부터 선택되고, (b)는 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커(비제한적으로, 인간 IgG4로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함함), (c)는 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 제2 도메인이고, 막관통 단백질은 LIGHT이고, 여기서 링커는 제1 도메인과 제2 도메인을 연결하고, 선택적으로 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 접합 링커를 포함한다.
- [0053] 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 자극제 LIGHT의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 저해제와 쌍을 이룬다: PD-1/LIGHT, CD172a(SIRPα)/LIGHT, 및 TIGIT/LIGHT. 실시형태에서 키메라 단백질은 PD-1-Fc-

LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, 및 TIGIT-Fc-LIGHT이고, 여기서 Fc는 항체의 Fc 도메인의 적어도 일부를 포함하고, 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커를 나타낸다.

[0054] 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해제의 세포외 도메인의 포함하고, 면역 자극제와 쌍을 이룬다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 약 1nM 내지 약 5nM, 예를 들어, 약 1nM, 약 1.5nM, 약 2nM, 약 2.5nM, 약 3nM, 약 3.5nM, 약 4nM, 약 4.5nM, 또는 약 5nM의 K_D 로 동족 수용체 또는 리간드에 결합한다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 약 5nM 내지 약 15nM, 예를 들어, 약 5nM, 약 5.5nM, 약 6nM, 약 6.5nM, 약 7nM, 약 7.5nM, 약 8nM, 약 8.5nM, 약 9nM, 약 9.5nM, 약 10nM, 약 10.5nM, 약 11nM, 약 11.5nM, 약 12nM, 약 12.5nM, 약 13nM, 약 13.5nM, 약 14nM, 약 14.5nM, 또는 약 15nM의 K_D 로 동족 수용체 또는 리간드에 결합한다.

[0055] 실시형태에서, 키메라 단백질은 향상된 안정성 및 단백질 반감기를 나타낸다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 높은 친화도로 FcRn에 결합한다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 약 1nM 내지 약 80nM의 K_D 로 FcRn에 결합할 수 있다. 예를 들어, 키메라 단백질은 약 1nM, 약 2nM, 약 3nM, 약 4nM, 약 5nM, 약 6nM, 약 7nM, 약 8nM, 약 9nM, 약 10nM, 약 15nM, 약 20nM, 약 25nM, 약 30nM, 약 35nM, 약 40nM, 약 45nM, 약 50nM, 약 55nM, 약 60nM, 약 65nM, 약 70nM, 약 71nM, 약 72nM, 약 73nM, 약 74nM, 약 75nM, 약 76nM, 약 77nM, 약 78nM, 약 79nM, 또는 약 80nM의 K_D 로 FcRn에 결합할 수 있다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 약 9nM의 K_D 로 FcRn에 결합할 수 있다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 효과기 기능을 갖는 다른 Fc 수용체(즉, FcRn이 아닌 것)에 실질적으로 결합하지 않는다.

[0056] 실시형태에서, 대상체에게 PD-1-Fc-LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, 및 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질 중 1종 이상을 투여함으로써 암 및/또는 염증성 질환(예를 들어, 본 명세서 다른 곳에 기술된 것 중 임의의 하나)을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 Fc는 항체의 Fc 도메인의 적어도 일부를 포함하고, 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커를 나타낸다. 실시형태에서, 방법은 예를 들어, 재발을 예방할 수 있는 기억 반응을 생성시킨다. 실시형태에서, 방법은, 예를 들어, 세포외 도메인 성분이 느린 오프 레이트(K_d 또는 K_{off})로 이의 각각의 결합 파트너에 결합하여 선택적으로 지속되는 음성 신호 차폐 효과 및/또는 더 긴 양성 신호 효과를 제공하여, 예를 들어, 효과기 세포가 항종양 효과를 위해서 적절하게 자극되도록 함으로써, PD-1-Fc-LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 TIGIT-Fc-LIGHT 중 1종 이상의 지속되는 치료 효과를 포함한다.

[0057] 실시형태에서, 대상체에게 TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-TL1A 및 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질 중 1종 이상을 투여함으로써 암 또는 염증성 질환(예를 들어, 본 명세서 다른 곳에 기술된 것 중 임의의 하나)을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 Fc는 항체의 Fc 도메인의 적어도 일부를 포함하고, 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 링커를 나타낸다. 실시형태에서, 방법은 예를 들어, 재발을 예방할 수 있는 기억 반응을 생성시킨다. 실시형태에서, 방법은, 예를 들어, 세포외 도메인 성분이 느린 오프 레이트(K_d 또는 K_{off})로 이의 각각의 결합 파트너에 결합하여 선택적으로 지속되는 음성 신호 차폐 효과 및/또는 더 긴 양성 신호 효과를 제공하여, 예를 들어, 효과기 세포가 항종양 효과를 위해서 적절하게 자극되도록 함으로써, TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-TL1A 및 TIGIT-Fc-LIGHT 중 1종 이상의 지속되는 치료 효과를 포함한다.

[0058] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 본 명세서에 기술된 세포외 도메인의 변이체, 예를 들어, 개시된 세포외 도메인, 예를 들어, 인간 세포외 도메인, 예를 들어, 서열번호 2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 27, 29, 31, 37 또는 41 중 1종 이상 중 임의의 것의 공지된 아미노산 서열 또는 핵산 서열과 적어도 약 60% 또는 적어도 약 61% 또는 적어도 약 62% 또는 적어도 약 63% 또는 적어도 약 64% 또는 적어도 약 65% 또는 적어도 약 66% 또는 적어도 약 67% 또는 적어도 약 68% 또는 적어도 약 69% 또는 적어도 약 70% 또는 적어도 약 71% 또는 적어도 약 72% 또는 적어도 약 73% 또는 적어도 약 74% 또는 적어도 약 75% 또는 적어도 약 76% 또는 적어도 약 77% 또는 적어도 약 78% 또는 적어도 약 79% 또는 적어도 약 80% 또는 적어도 약 81% 또는 적어도 약 82% 또는 적어도 약 83% 또는 적어도 약 84% 또는 적어도 약 85% 또는 적어도 약 86% 또는 적어도 약 87% 또는 적어도 약 88% 또는 적어도 약 89% 또는 적어도 약 90% 또는 적어도 약 91% 또는 적어도 약 92% 또는 적어도 약 93% 또는 적어도 약 94% 또는 적어도 약 95% 또는 적어도 약 96% 또는 적어도 약 97% 또는 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0059] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LIGHT(서열번호 2)의 세포외 도메인을 포함한다.

- [0060] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 PD-1(서열번호 4)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0061] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TIGIT(서열번호 10)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0062] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 CD172a(SIRP α)(서열번호 7)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0063] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LIGHT(서열번호 2)의 세포외 도메인 및 PD-1(서열번호 4)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0064] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LIGHT(서열번호 2)의 세포외 도메인 및 TIGIT(서열번호 10)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0065] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LIGHT(서열번호 2)의 세포외 도메인 및 CD172a(SIRP α)(서열번호 7)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0066] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 인간 IgG4 항체 서열(서열번호 46, 47 또는 48)로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함한다.
- [0067] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 인간 IgG4 항체 서열(서열번호 46, 47 또는 48)로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함하며, 이 서열은 SKYGPPCPSCP(서열번호 49), SKYGPPCPPCP(서열번호 50), IEGRMD(서열번호 52)로부터 선택된 적어도 1종의 접합 링커가 측면에 배치된다(선택적으로 SKYGPPCPSCP(서열번호 49) 또는 SKYGPPCPPCP(서열번호 50)는 N 말단이며, IEGRMD(서열번호 52) 중 하나는 C 말단임).
- [0068] 실시형태에서, 키메라 단백질은 도 32에 나타난 바와 같은 모듈식 링커를 포함한다.
- [0069] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 링커로서 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하는, LIGHT의 세포외 도메인 및 PD-1의 세포외 도메인을 포함한다(이러한 PD-1-Fc-LIGHT 키메라는 서열번호 5임).
- [0070] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 링커로서 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하는, LIGHT의 세포외 도메인 및 TIGIT의 세포외 도메인을 포함한다(이러한 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라는 서열번호 11임).
- [0071] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 링커로서 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하는, LIGHT의 세포외 도메인 및 CD172a(SIRP α)의 세포외 도메인을 포함한다(이러한 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라는 서열번호 8임).
- [0072] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TIGIT(서열번호 10)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0073] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 4-1BBL(서열번호 13)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0074] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 GITRL(서열번호 16)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0075] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TL1A(서열번호 19)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0076] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LIGHT(서열번호 2)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0077] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 OX40L(서열번호 22)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0078] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TIGIT(서열번호 10)의 세포외 도메인 및 4-1BBL(서열번호 13)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0079] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TIGIT(서열번호 10)의 세포외 도메인 및 GITRL(서열번호 16)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0080] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TIGIT(서열번호 10)의 세포외 도메인 및 TL1A(서열번호 19)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0081] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TIGIT(서열번호 10)의 세포외 도메인 및 LIGHT(서열번호 2)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0082] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TIGIT(서열번호 10)의 세포외 도메인 및 OX40L(서열번호 22)의 세포외 도메인을 포함한다.

- [0083] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 인간 IgG4 항체 서열(서열번호 46, 47 또는 48)로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함한다.
- [0084] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 인간 IgG4 항체 서열(서열번호 46, 47 또는 48)로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함하며, 이 서열은 SKYGPPCPSCP(서열번호 49), SKYGPPCPSCP(서열번호 50), IEGRMD(서열번호 52)로부터 선택된 적어도 1종의 접합 링커가 측면에 배치된다(선택적으로 SKYGPPCPSCP(서열번호 49) 또는 SKYGPPCPSCP(서열번호 50)는 N 말단이며, IEGRMD(서열번호 52) 중 하나는 C 말단임).
- [0085] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 링커로서 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하는, TIGIT의 세포외 도메인 및 4-1BBL의 세포외 도메인을 포함한다(이러한 TIGIT-Fc-4-1BBL 키메라는 서열번호 14임).
- [0086] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 링커로서 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하는, TIGIT의 세포외 도메인 및 GITRL의 세포외 도메인을 포함한다(이러한 TIGIT-Fc-GITRL 키메라는 서열번호 17임).
- [0087] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 링커로서 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하는, TIGIT의 세포외 도메인 및 TL1A의 세포외 도메인을 포함한다(이러한 TIGIT-Fc-TL1A 키메라는 서열번호 20임).
- [0088] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 링커로서 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하는, TIGIT의 세포외 도메인 및 LIGHT의 세포외 도메인을 포함한다(이러한 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라는 서열번호 11임).
- [0089] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 링커로서 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하는, TIGIT의 세포외 도메인 및 OX40L의 세포외 도메인을 포함한다(이러한 TIGIT-Fc-OX40L 키메라는 서열번호 23임).
- [0090] 실시형태에서, 키메라 단백질은 본 명세서에 식별된 또 다른 서열로부터의 세포외 도메인과 조합된 본 명세서에서 식별된 서열로부터의 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, TIGIT-Fc-TL1A 키메라 단백질의 서열은 서열번호 10으로 상기에 개시된 바와 같은 TIGIT의 세포외 도메인 및 서열번호 19로 상기에 개시된 바와 같은 TL1A의 세포외 도메인을 포함할 수 있다.
- [0091] 실시형태에서, 하기 추가적인 키메라 단백질 및 (예를 들어, 암을 치료하고/거나 염증성 질환을 치료하는 데 있어서) 추가적인 키메라 단백질을 사용하는 방법을 제공한다: TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-CD30L, TIGIT-Fc-FasL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-TL1A 및 TIGIT-Fc-TRAIL. 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A 및 TRAIL에 대한 아미노산 서열은 각각 서열번호 12, 26, 30, 15, 18 및 40을 포함한다. 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A 및 TRAIL의 세포외 도메인에 대한 아미노산 서열은 각각 서열번호 13, 27, 31, 16, 19 및 41이다.
- [0092] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 본 명세서에 기술된 변이체일 수 있고, 예를 들어, 본 발명의 키메라 단백질은 본 발명의 키메라 단백질의 아미노산 서열, 예를 들어, 서열번호 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 42, 43, 44 또는 45 중 하나 이상과 적어도 약 60% 또는 적어도 약 61% 또는 적어도 약 62% 또는 적어도 약 63% 또는 적어도 약 64% 또는 적어도 약 65% 또는 적어도 약 66% 또는 적어도 약 67% 또는 적어도 약 68% 또는 적어도 약 69% 또는 적어도 약 70% 또는 적어도 약 71% 또는 적어도 약 72% 또는 적어도 약 73% 또는 적어도 약 74% 또는 적어도 약 75% 또는 적어도 약 76% 또는 적어도 약 77% 또는 적어도 약 78% 또는 적어도 약 79% 또는 적어도 약 80% 또는 적어도 약 81% 또는 적어도 약 82% 또는 적어도 약 83% 또는 적어도 약 84% 또는 적어도 약 85% 또는 적어도 약 86% 또는 적어도 약 87% 또는 적어도 약 88% 또는 적어도 약 89% 또는 적어도 약 90% 또는 적어도 약 91% 또는 적어도 약 92% 또는 적어도 약 93% 또는 적어도 약 94% 또는 적어도 약 95% 또는 적어도 약 96% 또는 적어도 약 97% 또는 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 서열을 가질 수 있다.
- [0093] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 국제 특허 제PCT/US2016/054598호의 표 1에 제시된 바와 같은 인간 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 국제 특허 제PCT/US2016/054598호의 표 2에 제시된 바와 같은 인간 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 국제 특허 제PCT/US2016/054598호의 표 1에 제시된 바와 같은 타입 I 막관통 단백질의 세포외 도메인, 또는 이의 기능성 단편, 및 국제 특허 제PCT/US2016/054598호의 표 2에 제시된 바와 같은 타입 II 막관통 단백질의 세포외 도메인,

또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 국제 특허 제PCT/US2016/054598호의 전문은 참고로 포함된다.

- [0094] 실시형태에서, 키메라 단백질은 본 명세서에 기술된 단백질 서열 중 임의의 것에 비해서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 치환, 삽입, 결실, 및 절두로부터 독립적으로 선택될 수 있다.
- [0095] 실시형태에서, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이며, 보존적 및/또는 비보존적 치환을 포함할 수 있다.
- [0096] "보존적 치환"은 예를 들어, 포함된 아미노산 잔기의 극성, 전하, 크기, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 본성의 유사성을 기초로 수행될 수 있다. 20종의 자연 발생 아미노산은 하기 6종의 표준 아미노산 군으로 분류될 수 있다: (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5)쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0097] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "보존적 치환"은 아미노산을, 상기에 나타난 6종의 표준 아미노산 군 중 동일한 군에 열거된 또 다른 아미노산에 의해서 교환시키는 것으로서 정의된다. 예를 들어, Asp의 Glu에 의한 교환은 이렇게 변형된 폴리펩타이드에서 하나의 음전하를 보유한다. 또한, 글리신 및 프롤린은 α -나선을 파괴하는 이들의 능력을 기초로 또 다른 것에 대해서 치환될 수 있다.
- [0098] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "비-보존적 치환"은 아미노산을, 상기에 나타난 6종의 표준 아미노산 군 (1) 내지 (6) 중 상이한 군에 열거된 또 다른 아미노산에 의해서 교환시키는 것으로서 정의된다.
- [0099] 실시형태에서, 치환은 또한 비고전적 아미노산(예를 들어, 일반적으로 셀레노시스테인, 피로라이신, *N*-폼일메티오닌 β -알라닌, GABA 및 δ -아미노레불린산, 4-아미노벤조산(PABA), 일반적인 아미노산의 D-이성질체, 2,4-다이아미노부티르산, α -아미노 아이소부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노 부티르산, γ -Abu, ϵ -Ahx, 6-아미노 헥산산, Aib, 2-아미노 아이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르류신, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사르코슴(sarcosine), 시트룰린, 호모시트룰린, 시스테인산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, β -알라닌, 플루오로-아미노산, 디자인어(designer) 아미노산, 예컨대, β 메틸 아미노산, C α -메틸 아미노산, N α -메틸 아미노산, 및 아미노산 유사체)을 포함할 수 있다.
- [0100] 코돈 축퇴를 고려하는 것을 포함하는, 유전자 암호를 참고하여 키메라 단백질의 뉴클레오타이드 서열에 대해서 돌연변이가 또한 행해질 수 있다.
- [0101] 실시형태에서, 키메라 단백질은 링커를 포함한다. 실시형태에서, 링커는 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함한다. 본 명세서 다른 곳에 기술된 바와 같이, 이러한 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인 잔기는 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 키메라 단백질의 적절한 다량체 상태를 유지시켜, 효율적인 생산을 가능하게 하는 책임이 있다.
- [0102] 실시형태에서, 링커는 자연 발생 멀티-도메인 단백질로부터 유래될 수 있거나 또는 예를 들어, 전문이 참고로 포함된 문헌[Chichili *et al.*, (2013), Protein Sci. 22(2):153-167, Chen *et al.*, (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369]에 기술된 바와 같은 경험적 링커이다. 실시형태에서, 링커는 링커 설계 데이터베이스 및 컴퓨터 프로그램, 예컨대, 전문이 참고로 포함된 문헌[Chen *et al.*, (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369 및 Crasto *et al.*, (2000), Protein Eng. 13(5):309-312]에 기술된 것을 사용하여 설계될 수 있다.
- [0103] 실시형태에서, 링커는 합성 링커, 예컨대, PEG이다.
- [0104] 실시형태에서, 링커는 폴리펩타이드이다. 실시형태에서, 링커는 약 500개 미만의 아미노산 길이, 약 450개 미만의 아미노산 길이, 약 400개 미만의 아미노산 길이, 약 350개 미만의 아미노산 길이, 약 300개 미만의 아미노산 길이, 약 250개 미만의 아미노산 길이, 약 200개 미만의 아미노산 길이, 약 150개 미만의 아미노산 길이, 또는 약 100개 미만의 아미노산 길이이다. 예를 들어, 링커는 약 100개, 약 95개, 약 90개, 약 85개, 약 80개, 약 75개, 약 70개, 약 65개, 약 60개, 약 55개, 약 50개, 약 45개, 약 40개, 약 35개, 약 30개, 약 25개, 약 20개, 약 19개, 약 18개, 약 17개, 약 16개, 약 15개, 약 14개, 약 13개, 약 12개, 약 11개, 약 10개, 약 9개, 약 8개, 약 7개, 약 6개, 약 5개, 약 4개, 약 3개, 또는 약 2개 미만의 아미노산 길이일 수 있다. 실시형태에서, 링커는 가요성이다. 또 다른 실시형태에서, 링커는 강성이다.
- [0105] 실시형태에서, 링커는 글리신 및 세린 잔기(예를 들어, 약 30% 또는 약 40% 또는 약 50% 또는 약 60% 또는 약 70% 또는 약 80% 또는 약 90% 또는 약 95% 또는 약 97% 또는 약 98% 또는 약 99% 또는 약 100%의 글리신 및 세

린)로 실질적으로 구성된다.

[0106] 실시형태에서, 링커는 항체의(예를 들어, 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 및 IgA1 및 IgA2)를 포함하는, IgG, IgA, IgD, 및 IgE의) 힌지 영역이다. IgG, IgA, IgD, 및 IgE 부류 항체에서 발견된 힌지 영역은 가요성 스페이서로서 작용하여, Fab 부분이 공간에서 자유롭게 이동하는 것을 가능하게 한다. 불변 영역과 대조적으로, 힌지 도메인은 구조적으로 다양하며, 면역글로불린 부류 및 하위부류 사이에서 서열 및 길이 둘 다 다양하다. 예를 들어, 힌지 영역의 길이 및 가요성은 IgG 하위부류 중에서 다양하다. IgG1의 힌지 영역은 아미노산 216 내지 231을 포함하며, 그것은 자유롭게 가요성이기 때문에, Fab 단편은 이의 대칭축에 대해서 회전하여 2개의 중쇄간 다이설파이드 브리지 중 첫 번째 것에 중심이 있는 구체 내에서 이동할 수 있다. IgG2는 IgG1보다 더 짧은 힌지를 갖고, 12개의 아미노산 잔기 및 4개의 다이설파이드 브리지를 갖는다. IgG2의 힌지 영역은 글리신 잔기가 결핍되어 있고, 비교적 짧으며, 추가의 중쇄간 다이설파이드 브리지에 의해서 안정화된 강성 폴리-프롤린 이중 나선을 함유한다. 이러한 특성은 IgG2 분자의 가요성을 제한한다. IgG3은, 62개의 아미노산(21개의 프롤린 및 11개의 시스테인을 포함함)을 함유하고, 비가요성 폴리-프롤린 이중 나선을 형성하는, 이의 고유한 연장된 힌지 영역(IgG1 힌지의 약 4배 길이임)이 다른 하위부류와 상이하다. IgG3에서, Fab 단편은 Fc 단편으로부터 비교적 멀리 존재하여, 분자에 더 큰 가요성을 제공한다. IgG3 내의 연장된 힌지는 또한 다른 하위부류와 비교할 때 이의 더 높은 분자량에 대해서 책임이 있다. IgG4의 힌지 영역은 IgG1의 힌지 영역보다 더 짧고, 이의 가요성은 IgG1의 힌지 영역과 IgG2의 힌지 영역의 중간이다. 힌지 영역의 가요성은 보고된 바에 따르면 IgG3>IgG1>IgG4>IgG2의 순서로 감소된다. 실시형태에서, 링커는 인간 IgG4로부터 유래되고, 하나 이상의 돌연변이를 함유하여 이량체화(S228P를 포함함) 또는 FcRn 결합을 향상시킬 수 있다

[0107] 결정학 연구에 따르면, 면역글로불린 힌지 영역은 3개의 영역: 상부 힌지 영역, 코어 영역, 및 하부 힌지 영역으로 추가로 기능적으로 나눌 수 있다(문헌[Shin *et al.*, 1992 *Immunological Reviews* 130:87] 참고). 상부 힌지 영역은 C_{H1}의 카복실 단부에서부터 운동을 제한하는 힌지 내의 제1 잔기, 일반적으로는 2개의 중쇄 사이에서 쇠간 다이설파이드 결합을 형성하는 제1 시스테인 잔기까지의 아미노산을 포함한다. 상부 힌지 영역의 길이는 항체의 분절 가요성과 상관관계가 있다. 코어 힌지 영역은 중쇄간 다이설파이드 브리지를 함유하고, 하부 힌지 영역은 C_{H2} 도메인의 아미노 말단 단부에 결합되고, C_{H2} 내의 잔기를 포함한다. 상기와 동일하게, 야생형 인간 IgG1의 코어 힌지 영역은 서열 Cys-Pro-Pro-Cys을 함유하고, 이것은 다이설파이드 결합 형성에 의해서 이량체화되는 경우, 중심점으로서 작용한다고 여겨지는 환식 옥타펩타이드를 생성하여, 가요성을 부여한다. 실시형태에서, 본 발명의 링커는 임의의 항체의(예를 들어, 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 및 IgA1 및 IgA2)를 포함하는, IgG, IgA, IgD, 및 IgE의) 상부 힌지 영역, 코어 영역, 및 하부 힌지 영역 중 1개, 2개 또는 3개를 포함한다. 힌지 영역은 또한 하나 이상의 글리코실화 부위를 함유할 수 있는데, 이것은 탄수화물 부착을 위해서 다수의 구조적으로 구별되는 유형의 부위를 포함한다. 예를 들어, IgA1은 힌지 영역의 17-아미노산 분절 내에 5개의 글리코실화 부위를 함유하여, 분비성 면역글로불린에 대해서 이로운 특성인 것으로 간주되는, 장 프로테아제에 대한 힌지 영역 폴리펩타이드의 내성을 부여한다. 실시형태에서, 본 발명의 링커는 하나 이상의 글리코실화 부위를 포함한다.

[0108] 실시형태에서, 링커는 항체의(예를 들어, 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 및 IgA1 및 IgA2)를 포함하는, IgG, IgA, IgD, 및 IgE의) Fc 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 링커는 인간 IgG4 항체로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 링커는 인간 IgG1 항체로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함한다. 실시형태에서, Fc 도메인은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 증가된 친화도 및 향상된 결합을 나타낸다. 실시형태에서, Fc 도메인은 FcRn에 대한 친화도를 증가시키고, 이에 대한 결합을 향상시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, FcRn에 대한 증가된 친화도 및 향상된 결합은 본 발명의 키메라 단백질의 생체내 반감기를 증가시킨다고 여겨진다.

[0109] 실시형태에서, Fc 도메인 링커는 아미노산 잔기 250, 252, 254, 256, 308, 309, 311, 416, 428, 433 또는 434 (본 명세서에 명확하게 참고로 포함된 문헌[Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에서와 같은 카뎀 넘버링에 따름)에서 하나 이상의 아미노산 치환 또는 이의 등가물을 함유한다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 250에서의 아미노산 치환은 글루타민으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 252에서의 아미노산 치환은 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판 또는 트레오닌으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 254에서의 아미노산 치환은 트레오닌으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 256에서의 아미노산 치환은 세린, 아르기닌, 글루타민, 글루탐산, 아스파르트산 또는 트레오닌으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 308에서의 아미노산 치환은 트레오닌으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 309에서의 아미노산 치환은 프롤

린으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 311에서의 아미노산 치환은 세린으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 385에서의 아미노산 치환은 아르기닌, 아스파르트산, 세린, 트레오닌, 히스티딘, 라이신, 알라닌 또는 글리신으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 386에서의 아미노산 치환은 트레오닌, 프롤린, 아스파르트산, 세린, 라이신, 아르기닌, 아이소류신 또는 메티오닌으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 387에서의 아미노산 치환은 아르기닌, 프롤린, 히스티딘, 세린, 트레오닌 또는 알라닌으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 389에서의 아미노산 치환은 프롤린, 세린 또는 아스파라긴으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 416에서의 아미노산 치환은 류신으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 428에서의 아미노산 치환은 세린으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 433에서의 아미노산 치환은 아르기닌, 세린, 아이소류신, 프롤린 또는 글루타민으로의 치환이다. 실시형태에서, 아미노산 잔기 434에서의 아미노산 치환은 히스티딘, 페닐알라닌 또는 타이로신으로의 치환이다.

[0110] 실시형태에서, Fc 도메인 링커(예를 들어, IgG 불변 영역을 포함함)는 아미노산 잔기 252, 254, 256, 433, 434, 또는 436(본 명세서에 명확하게 참고로 포함된 문헌[Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에서와 같은 카뎃 넘버링을 따름)에서, 하나 이상의 돌연변이, 예컨대, 치환을 포함한다. 실시형태에서, IgG 불변 영역은 삼중 M252Y/S254T/T256E 돌연변이 또는 YTE 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 삼중 H433K/N434F/Y436H 돌연변이 또는 KFH 돌연변이를 포함한다. 추가 실시형태에서, IgG 불변 영역은 YTE 및 KFH 돌연변이를 조합하여 포함한다.

[0111] 실시형태에서, 본 발명의 변형된 인간화된 항체는 아미노산 잔기 250, 253, 307, 310, 380, 416, 428, 433, 434 및 435에서 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 IgG 불변 영역을 포함한다. 예시적인 돌연변이는 T250Q, M428L, T307A, E380A, I253A, H310A, R416S, M428L, H433K, N434A, N434F, N434S 및 H435A를 포함한다. 실시형태에서, IgG 불변 영역은 M428L/N434S 돌연변이 또는 LS 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 T250Q/M428L 돌연변이 또는 QL 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 N434A 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 T307A/E380A/N434A 돌연변이 또는 AAA 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 I253A/H310A/H435A 돌연변이 또는 IHH 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 H433K/N434F 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 M252Y/S254T/T256E 및 H433K/N434F 돌연변이를 조합하여 포함한다.

[0112] IgG 불변 영역에서의 추가로 예시적인 돌연변이는 예를 들어, 전문이 참고로 포함된 문헌[Robbie, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2013), 57(12):6147-6153, Dall'Acqua et al., JBC (2006), 281(33):23514-24, Dall'Acqua et al., Journal of Immunology (2002), 169:5171-80, Ko et al. Nature (2014) 514:642-645, Grevys et al. Journal of Immunology. (2015), 194(11):5497-508] 및 미국 특허 제 7,083,784호에 기술되어 있다.

[0113] 실시형태에서, 링커는 서열번호 46의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 또는 93% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99%의 동일성을 포함한다. 실시형태에서, 돌연변이가 서열번호 46에 대해서 수행되어 안정성 및/또는 반감기를 증가시킨다. 예를 들어, 실시형태에서, 링커는 서열번호 47의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 또는 93% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99%의 동일성을 갖는다. 실시형태에서, 링커는 서열번호 48의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90% 또는 93% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99%의 동일성을 포함한다.

[0114] 이론에 얽매이지 않음은 아니지만, 키메라 단백질에 Fc 도메인의 적어도 일부를 포함하는 링커를 포함시키는 것은, 불용성 및 가능하게는, 비기능성 단백질 콘카타머(concatamer) 및/또는 응집물의 형성을 회피하는 것을 돕는다. 이는 부분적으로는 키메라 단백질 간에 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 Fc 도메인 내의 시스테인의 존재로 인한 것이다.

[0115] 예시적인 Fc 안정화 돌연변이체는 S228P이다. 예시적인 Fc 반감기 연장 돌연변이체는 T250Q, M428L, V308T, L309P 및 Q311S이며, 본 발명의 링커는 이러한 돌연변이체 중 1개, 또는 2개, 또는 3개, 또는 4개, 또는 5개를 포함할 수 있다.

[0116] 추가로, 하나 이상의 접합 링커를 사용하여 링커 내의 Fc 도메인(예를 들어, 서열번호 46, 서열번호 47, 또는 서열번호 48 중 하나 이와 또는 적어도 90% 또는 93% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일성을 갖는 것)과 세포의 도메인을 연결할 수 있다. 예를 들어, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 또는 이의 변이체 중 임의의 하나는 본 명세서에 기술된 바와 같은 세포의 도메인과 본 명세서에 기술된 바와 같은 링커를 연결할 수 있다. 선택적으로, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호

호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 또는 이의 변이체 중 임의의 하나는 본 명세서에 기술된 바와 같은 세포의 도메인과 본 명세서에 기술된 바와 같은 링커 사이에 배치될 수 있다. 선택적으로, 서열번호 49 내지 95 중 임의의 하나 또는 이의 변이체는 본 명세서에 기술된 바와 같은 세포의 도메인 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 Fc 도메인 사이에 위치된다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 Fc 도메인 이전에 하나의 접합 링커를 포함하고, Fc 도메인 이후에 제2 접합 링커를 포함하고; 따라서, 키메라 단백질은 하기 구조를 포함할 수 있다:

[0117] ECD 1 - 접합 링커 1 - Fc 도메인 - 접합 링커 2 - ECD 2.

[0118] 실시형태에서, 제1 접합 링커 및 제2 접합 링커는 상이할 수 있거나 또는 이들은 동일할 수 있다.

[0119] 예시적인 링커의 아미노산 서열을 하기 표 1에 제공한다:

표 1

예시적인 링커(Fc 도메인 링커 및 접합 링커)

서열번호	서열
46	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK
47	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLGK
48	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLGK
49	SKYGPPCPSCP
50	SKYGPPCPPCP
51	SKYGPP
52	IEGRMD
53	GGGVPRDCG
54	IEGRMDGGGGAGGGG
55	GGSGGGG
56	GGSGGGGGSGGG
57	EGKSSGGSGSESKST
58	GGSG
59	GGSGGGGGSGGG
60	EAAAKEAAAKEAAK
61	EAAAREAAAREAAAREAAAR
62	GGGGSGGGSGGGGSAS
63	GGGGAGGGG
64	GS or GGS or LE
65	GSGSGS
66	GSGSGSGSGS
67	GGGGSAS
68	APAPAPAPAPAPAPAPAP
69	CPFC
70	GGGGS
71	GGGGSGGGGS
72	GGGGSGGGSGGGGS
73	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
74	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
75	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
76	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
77	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
78	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
79	GGGGGGG
80	GGGGGG
81	EAAAK
82	EAAAKEAAK
83	EAAAKEAAAKEAAK
84	AEAAAKEAAAKA

[0120]

85	AEAAAKEAAAKEAAAKA
86	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
87	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
88	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
89	PAPAP
90	KESGSVSSEQLAQFRSLD
91	GSAGSAAGSGEF
92	GGGSE
93	GSESG
94	GSEGS
95	GEGGSGEGSSGEGSSSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGS

[0121]

[0122]

추가로 예시적인 접합 링커는 서열 LE, GGGGS(서열번호 70), (GGGS)_n(n=1 내지 4)(서열번호 70 내지 73), (Gly)₈(서열번호 79), (Gly)₆(서열번호 80), (EAAAK)_n(n=1 내지 3)(서열번호 81 내지 83), A(EAAAK)_nA(n = 2-5)(서열번호 84 내지 87), AEAAAKEAAAKA(서열번호 84), A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A(서열번호 88), PAPAP(서열번호 89), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 90), EGKSSSGSGSESKST(서열번호 57), GSAGSAAGSGEF(서열번호 91), 및 (XP)_n(X는 임의의 아미노산, 예를 들어, Ala, Lys 또는 Glu를 나타냄)을 갖는 링커를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0123]

실시형태에서, 접합 링커는 글리신 및 세린 잔기(예를 들어, 약 30% 또는 약 40% 또는 약 50% 또는 약 60% 또는 약 70% 또는 약 80% 또는 약 90% 또는 약 95% 또는 약 97% 또는 약 98% 또는 약 99% 또는 약 100%의 글리신 및 세린)로 실질적으로 구성된다. 예를 들어, 실시형태에서, 접합 링커는 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ 이며, 여기서 n 은 약 1 내지 약 8, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8(각각 서열번호 70 내지 서열번호 77)이다. 실시형태에서, 접합 링커 서열은 GSGSGSGGGSGGGGS(서열번호 78)이다. 추가로 예시적인 접합 링커는 서열 LE, $(\text{Gly})_8$ (서열번호 79), $(\text{Gly})_6$ (서열번호 80), $(\text{EAAAK})_n$ ($n=1$ 내지 3)(서열번호 81 내지 서열번호 83), $\text{A}(\text{EAAAK})_n\text{A}$ ($n=2$ 내지 5)(서열번호 84 내지 서열번호 87), $\text{A}(\text{EAAAK})_4\text{ALEA}(\text{EAAAK})_4\text{A}$ (서열번호 88), PAPAP(서열번호 89), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 90), GSAGSAAGSGEF(서열번호 91), 및 $(\text{XP})_n$ (X 는 임의의 아미노산, 예를 들어, Ala, Lys 또는 Glu을 나타냄)를 갖는 링커를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 실시형태에서, 접합 링커는 GGS이다.

[0124]

실시형태에서, 접합 링커는 GGGSE(서열번호 92), GSESG(서열번호 93), GSEGS(서열번호 94), GEGSGEGSSGEGSSGEGGGSEGGGSEGGG(서열번호 95), 및 4개의 아미노산 간격마다 무작위로 위치한 G, S 및 E의 접합 링커 중 하나 이상이다.

[0125]

실시형태에서, 키메라 단백질은 도 32에 나타낸 바와 같은 모듈식 링커를 포함한다.

[0126]

실시형태에서, 링커는 가요성일 수 있고, 비제한적으로 상당히 가요성인 것을 포함한다. 실시형태에서, 링커는 강성일 수 있고, 비제한적으로 강성 알파 나선을 포함한다.

[0127]

실시형태에서, 링커는 기능성일 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 링커는 본 발명의 키메라 단백질의 폴딩 및/또는 안정성을 개선시키고/거나, 발현을 개선시키고/거나 약독학을 개선시키고/거나 생물활성도를 개선시키도록 기능할 수 있다. 또 다른 예에서, 링커는 키메라 단백질을 특정 세포 유형 또는 위치에 대해서 표적화하도록 기능할 수 있다.

[0128]

실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 (예를 들어, 종양에 대한) 면역 활성화를 촉진시키는 단계를 포함하는 방법에서 사용 가능하고, 사용될 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 (예를 들어, 종양이 생존하게 하는) 면역 저해를 억제시키는 단계를 포함하는 방법에서 사용 가능하고, 사용될 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 작제물의 키메라 본성에 의해서 제공되는 신호전달의 근접성으로 인해서 개선된 면역 활성화 및/또는 면역 저해의 개선된 억제를 제공한다.

[0129]

실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 반응의 정도를 조정하는, 예를 들어, 효과기 생산량의 수준을 조정하는 단계를 포함하는 방법에서 사용 가능하고, 사용될 수 있다. 실시형태에서, 예를 들어, 암의 치료를 위해서 사용되는 경우, 본 발명의 키메라 단백질은, 사이토카인 생산, 증식 또는 표적 사멸 가능성의 증가된 수준을 자극하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는, T 세포 반응의 크기를 증가시키기 위해서 면역 저해와 비교할 때 면역 자극의 정도를 변경한다.

- [0130] 실시형태에서 본 발명의 키메라 단백질은 실시형태에서 종양 세포의 표면 상의 저해 리간드를 차폐시키고, 면역 저해 리간드를 면역 자극 리간드로 대체하는 것을 포함하는 방법에서 사용 가능하거나 사용된다. 따라서, 본 발명의 키메라 단백질은 실시형태에서 저해 면역 신호를 감소 또는 제거하고/하거나 면역 자극 신호를 증가 또는 활성화시키는 것을 포함하는 방법에서 사용 가능하거나 사용된다. 예를 들어, 저해 신호를 보유하는(따라서 면역 반응이 회피된) 종양 세포는, 이후에 종양 세포를 공격할 수 있는 T 세포 상의 양성 신호 결합에 대해서 치환될 수 있다. 따라서, 실시형태에서, 저해 면역 신호는 본 발명의 작제물에 의해서 차폐되고, 자극 면역 신호가 활성화된다. 이러한 이로온 특성은 본 발명의 키메라 단백질의 단일 작제물 접근법에 의해서 향상된다. 예를 들어, 신호 대체는 거의 동시에 달성될 수 있고, 신호 대체는 임상적으로 중요한 부위(예를 들어, 종양 미세환경)에서 국지화되도록 적합하게 조정된다. 추가로 실시형태는 다른 키메라 단백질 작제물, 예컨대, 예를 들어, 특히 (i) TIGIT의 세포외 도메인 및 (ii) 4-1BBL의 세포외 도메인; (i) TIGIT의 세포외 도메인 및 (ii) GITRL의 세포외 도메인; (i) TIGIT의 세포외 도메인 및 (ii) TL1A의 세포외 도메인; (i) TIGIT의 세포외 도메인 및 (ii) LIGHT의 세포외 도메인; 및 (i) PD-1의 세포외 도메인 및 (ii) LIGHT의 세포외 도메인; 및 (i) CD172a(SIRP α)의 세포외 도메인 및 (ii) LIGHT의 세포외 도메인; 및 (i) TIGIT의 세포외 도메인 및 (ii) LIGHT의 세포외 도메인에 동일한 원칙을 적용한다.
- [0131] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 자극 수용체/리간드 쌍의 결합을 자극하거나 향상시키는 것을 포함하는 방법에서 사용 가능하거나 사용된다. 예시적인 T 세포 공자극 수용체 및 이의 리간드는 OX-40:OX40-L, CD27:CD70, CD30:CD30-L, CD40:CD40-L; CD137:CD137-L, HVEM:LIGHT, GITR:GITR-L, TNFRSF25:TL1A, DR5:TRAIL 및 BTLA:HVEM을 포함한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 저해 수용체/리간드 쌍의 결합을 저해하거나 감소시키는 것을 포함하는 방법에서 사용 가능하거나 사용된다. 예시적인 T 세포 공저해 수용체 및 이의 리간드는 특히 예를 들어, CTLA-4:CD80/CD86, PD-1:PD-L1/PD-L2, BTLA:HVEM, TIM-3:갈렉틴-9/포스파티딜세린, TIGIT/CD155 또는 CD112, VISTA/VSIG8, CD172a(SIRP α)/CD47, B7H3R/B7H3, B7H4R/B7H4, CD244/CD48, TMIGD2/HHLA2를 포함한다.
- [0132] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 PD-1 및 PD-L1 또는 PD-L2 및/또는 PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2의 결합을 차단하고/거나 감소시키고/거나 저해한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 CTLA-4의 활성화 및/또는 CTLA-4와, AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 및 PPP2R5A 중 1종 이상의 결합을 차단하고/거나 감소시키고/거나 저해한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 GITR 및/또는 GITR과, GITR 리간드 중 1종 이상의 결합을 증가시키고/거나 자극한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 OX40 및/또는 OX40과, OX40 리간드 중 1종 이상의 결합을 증가시키고/거나 자극한다.
- [0133] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 조절을 향상, 회복, 촉진 및/또는 자극하는 것을 포함하는 방법에서 사용 가능하거나 사용된다. 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 본 발명의 키메라 단백질은 T 세포, 세포독성 T 림프구, T 헬퍼 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 항종양 대식세포(예를 들어, M1 대식세포), B 세포 및 수지상 세포를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 종양 세포에 대한 1종 이상의 면역 세포의 활성화 또는 활성화를 회복, 촉진 및/또는 자극한다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 비제한적인 예의 방식으로 1종 이상의 T-세포 내인성 신호, 예컨대, 생존 촉진 신호(pro-survival signal); 자가 분비 또는 주변분비 성장 신호; p38 MAPK-, ERK-, STAT-, JAK-, AKT- 또는 PI3K-매개 신호; 항-사포사멸 신호; 및/또는 전염증성 사이토카인 생산 또는 T 세포 이동 또는 T 세포 종양 침윤 중 하나 이상을 촉진시키고/거나 이에 필수적인 신호를 포함하는, T 세포의 활성화 및/또는 활성화를 향상, 복귀, 촉진 및/또는 자극한다.
- [0134] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 종양 또는 종양 미세환경 내에서 T 세포(비제한적으로 포함함 세포독성 T 림프구, T 헬퍼 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포), B 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 수지상 세포, 단핵구, 및 대식세포(예를 들어, M1 및 M2 하나 이상) 중 1종 이상의 증가를 유발하는 것을 포함하는 방법에서 사용 가능하거나 사용된다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역억제성 세포(예를 들어, 골수-유래 억제인자 세포(MDSC), 조절 T 세포(Treg), 종양 연관된 호중구(TAN), M2 대식세포, 및 종양 연관 대식세포(TAM))의 종양 및/또는 종양 미세환경(TME)으로의 모집을 저해하고/거나 이의 모집의 감소를 유발하는 것을 포함하는 방법에서 사용 가능하거나 사용된다. 실시형태에서, 본 발명의 방법은 종양 부위 및/또는 TME에서 M1 대 M2 대식세포의 비율, M1 대식세포를 선호하도록 조정할 수 있다.
- [0135] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 유효량의 본 명세서에 기술된 키메라 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, T 세포 불활성화 및/또는 종양에 대한 면역 관용을 저해 및/또는 감소시키는 것을 포함하는 방법에서 사용 가능하고, 사용될 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F 및 IL-22 중 1종 이상을 포함하지만 이들로 제한되지 않

는 다양한 사이토카인의 혈청 수준을 증가시킬 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 치료된 대상체의 혈청에서 IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF α 또는 IFN γ 를 향상시킬 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질의 투여는 TNF α 분비를 향상시킬 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질의 투여는 백혈구에 의한 슈퍼항원 매개된 TNF α 분비를 향상시킬 수 있다. 이러한 사이토카인 반응의 검출은 제시된 키메라 단백질에 대한 최적의 투여 요법을 결정하기 위한 방법을 제공할 수 있다.

[0136] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 항종양 CD8 $^{+}$ 및/또는 CD4 $^{+}$ T 세포의 세포사를 저해, 차단 및/또는 감소시키거나; 또는 프로(pro)-종양 T 세포의 세포사를 자극, 유도 및/또는 증가시킨다. T 세포 고갈은 증식성 및 효과기 기능의 점진적인 손실을 특징으로 하는 T 세포 기능장애의 상태이며, 클론 결실로 이어진다. 따라서, 프로-종양 T 세포는 다수의 만성 감염 및 암 동안 발생하는 T 세포 기능장애의 상태를 지칭한다. 이러한 기능장애는 불량한 증식성 및/또는 효과기 기능, 저해 수용체의 지속되는 발현 및 기능성 효과기 또는 기억 T 세포의 것과 구별되는 전사 상태에 의해서 정의된다. 고갈은 감염 및 종양의 최적의 제어를 방해한다. 또한, 항종양 CD8 $^{+}$ 및/또는 CD4 $^{+}$ T 세포는 종양에 대한 면역 반응을 T 세포를 지칭한다. 예시적인 프로-종양 T 세포는 Treg, 1종 이상의 관문 저해 수용체를 발현하는 CD4 $^{+}$ 및/또는 CD8 $^{+}$ T 세포, Th2 세포 및 Th17 세포를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 관문 저해 수용체는 제어되지 않는 면역 반응을 방지 또는 저해하는 면역 세포 상에서 발현되는 수용체를 지칭한다.

[0137] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 효과기 T 세포 대 조절 T 세포의 비를 증가시키는 것을 포함하는, 방법에서 사용 가능하고, 사용될 수 있다. 예시적인 효과기 T 세포는 ICOS $^{+}$ 효과기 T 세포; 세포독성 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD8 $^{+}$, CD45RO $^{+}$); CD4 $^{+}$ 효과기 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$, CCR7 $^{+}$, CD62L고, IL-7R/CD127 $^{+}$); CD8 $^{+}$ 효과기 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD8 $^{+}$, CCR7 $^{+}$, CD62L고, IL-7R/CD127 $^{+}$); 효과기 기억 T 세포(예를 들어, CD62L저, CD44 $^{+}$, TCR, CD3 $^{+}$, IL-7R/CD127 $^{+}$, IL-15R $^{+}$, CCR7저); 중심 기억 T 세포(예를 들어, CCR7 $^{+}$, CD62L $^{+}$, CD27 $^{+}$; 또는 CCR7고, CD44 $^{+}$, CD62L고, TCR, CD3 $^{+}$, IL-7R/CD127 $^{+}$, IL-15R $^{+}$); CD62L $^{+}$ 효과기 T 세포; CD8 $^{+}$ 효과기 기억 T 세포(TEM), 예컨대, 초기 효과기 기억 T 세포(CD27 $^{+}$ CD62L $^{-}$) 및 후기 효과기 기억 T 세포 (CD27 $^{-}$ CD62L $^{-}$)(각각 TemE 및 TemL); CD127($^{+}$)CD25(저/-) 효과기 T 세포; CD127($^{-}$)CD25($^{-}$) 효과기 T 세포; CD8 $^{+}$ 줄기세포 기억 효과기 세포(TSCM)(예를 들어, CD44(저)CD62L(고)CD122(고)sca($^{+}$)); TH1 효과기 T-세포(예를 들어, CXCR3 $^{+}$, CXCR6 $^{+}$ 및 CCR5 $^{+}$; 또는 $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$, IL-12R $^{+}$, IFN γ R $^{+}$, CXCR3 $^{+}$), TH2 효과기 T 세포(예를 들어, CCR3 $^{+}$, CCR4 $^{+}$ 및 CCR8 $^{+}$; 또는 $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$, IL-4R $^{+}$, IL-33R $^{+}$, CCR4 $^{+}$, IL-17RB $^{+}$, CRTH2 $^{+}$); TH9 효과기 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$); TH17 효과기 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$, IL-23R $^{+}$, CCR6 $^{+}$, IL-1R $^{+}$); CD4 $^{+}$ CD45RO $^{+}$ CCR7 $^{+}$ 효과기 T 세포, CD4 $^{+}$ CD45RO $^{+}$ CCR7($^{-}$) 효과기 T 세포; 및 IL-2, IL-4 및/또는 IFN- γ 를 분비하는 효과기 T 세포를 포함한다. 예시적인 조절 T 세포는 ICOS $^{+}$ 조절 T 세포, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$ 조절 T 세포, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ 조절 T 세포, CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ 조절 T 세포, CD4 $^{+}$ CD25고 조절 T 세포, TIM-3 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 조절 T 세포, 림프구 활성화 유전자-3 (LAG-3) $^{+}$ 조절 T 세포, CTLA-4/CD152 $^{+}$ 조절 T 세포, 뉴로펩틴-1 (Nrp-1) $^{+}$ 조절 T 세포, CCR4 $^{+}$ CCR8 $^{+}$ 조절 T 세포, CD62L(L-셀렉틴) $^{+}$ 조절 T 세포, CD45RB저 조절 T 세포, CD127저 조절 T 세포, LRRC32/GARP $^{+}$ 조절 T 세포, CD39 $^{+}$ 조절 T 세포, GITR $^{+}$ 조절 T 세포, LAP $^{+}$ 조절 T 세포, 1B11 $^{+}$ 조절 T 세포, BTLA $^{+}$ 조절 T 세포, 타입 1 조절 T 세포(Tr1 세포), T 헬퍼 타입 3 (Th3) 세포, 자연 살해 T 세포 표현형의 조절 세포(NKTreg), CD8 $^{+}$ 조절 T 세포, CD8 $^{+}$ CD28 $^{-}$ 조절 T 세포 및/또는 IL-10, IL-35, TGF- β , TNF- α , 갈렉틴-1, IFN- γ 및/또는 MCP1을 분비하는 조절 T-세포를 포함한다.

[0138] 실시형태에서, 키메라 단백질은 예를 들어, 재발을 예방할 수 있거나 동물을 재감염으로부터 보호할 수 있는 기억 반응을 생성시킨다. 따라서, 키메라 단백질로 치료된 동물은 키메라 단백질로의 초기 치료 후에 재감염되는 경우, 이후에 종양 세포를 공격할 수 있고/거나 종양의 발달을 예방할 수 있다. 따라서, 본 발명의 키메라 단백질은 활성 종양 파괴 및 또한 종양 항원의 면역 인식(이것은 재발을 예방할 수 있는 기억 반응을 프로그래밍하는 데 필수적임) 둘 다를 자극한다.

[0139] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 약 12시간, 약 24시간, 약 48시간, 약 72시간 또는 약 96시간 또는

약 1주 또는 약 2주 이하 동안 효과기 T 세포를 일시적으로 자극하는 것을 포함하는, 방법에서 사용 가능하고, 사용될 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 약 12시간, 약 24시간, 약 48시간, 약 72시간 또는 약 96시간 또는 약 1주 또는 약 2주 이하 동안 조절 T 세포를 일시적으로 고갈시키거나 또는 저해하는 포함하는, 방법에서 사용 가능하고, 사용될 수 있다. 실시형태에서, 효과기 T 세포의 일시적인 자극 및/또는 조절 T 세포의 일시적인 고갈 또는 저해는 환자의 혈류에서 또는 특정 조직/위치, 예컨대, 림프계 조직, 예를 들어, 골수, 림프절, 비장, 흉선, 점막-연관 림프계 조직(MALT), 비-림프계 조직 등에서 또는 종양 미세환경에서 실질적으로 일어난다.

[0140] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 비제한적으로, 사용 용이성 및 생산 용이성을 포함하는 이점을 제공한다. 이는, 2종의 구별되는 면역치료제가 단일 제품 내에 조합되어, 이것이 2개의 독립적인 제조 공정 대신에 단일 제조 공정을 허용하기 때문이다. 또한, 2종의 개별 작용제 대신에 단일 작용제를 투여하는 것은 더 용이한 투여 및 더 높은 환자 순응도(patient compliance)를 가능하게 한다. 추가로, 예를 들어, 다수의 다이설파이드 결합 및 번역 후 변형, 예컨대, 글리코실화를 함유하는 큰 다량체 단백질인 단클론성 항체와 대조적으로, 본 발명의 키메라 단백질은 제조하기에 더 용이하고, 더 비용 효율적이다.

[0141] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 분비성 및 완전 기능성 단일 폴리펩타이드쇄로서 포유동물 숙주 세포에서 생산 가능하다.

[0142] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 예상치 못하게, 느린 오프 레이트(K_d 또는 K_{off})로 각각의 결합 파트너에 대한 세포외 도메인 성분의 결합을 제공한다. 실시형태에서, 이것은 리간드에 대한 수용체의 예기치 못한 긴 상호작용을 제공한다. 이러한 효과는 지속되는 음성 신호 차폐 효과를 가능하게 한다. 추가로, 실시형태에서, 이것은 예를 들어, 효과기 세포가 항종양 효과를 위해서 적절하게 자극되도록 하기 위해서, 더 긴 양성 신호 효과를 전달한다. 예를 들어, 본 발명의 키메라 단백질은, 예를 들어, 긴 오프 레이트 결합을 통해서, T 세포 증식을 제공하기 위한 충분한 신호 전달을 가능하게 하며, 항종양 공격을 가능하게 한다. 추가 예의 방식에 의해서, 본 발명의 키메라 단백질은, 예를 들어, 긴 오프레이트 결합을 통해서, 자극 신호, 예를 들어, 사이토카인 등의 방출을 제공하기 위한 충분한 신호 전달을 가능하게 한다.

[0143] 본 발명의 작용제(예를 들어, 음성 신호를 보유하는 종양 세포 및 종양을 공격할 수 있는 T 세포)에 의해서 촉진되는 세포의 안정적인 시냅스는, 종양 감소를 선호하는 공간적인 배향을 제공하며, 예컨대, 종양 세포를 공격하도록 T 세포를 배치하고/하거나 종양 세포가 본 발명의 키메라 단백질에 의해서 차폐되는 것을 초과하는 음성 신호를 비롯한, 음성 신호를 전달하는 것을 입체적으로 방지한다.

[0144] 실시형태에서, 이는 키메라 단백질의 혈청 $t_{1/2}$ 과 비교할 때 더 긴 온-타겟(예를 들어, 종양내) 반감기($t_{1/2}$)를 제공한다. 이러한 특성은 키메라 단백질의 전신 분포와 연관될 수 있는 오프-타겟 독성을 감소시키는 조합된 이점을 가질 수 있다.

[0145] 실시형태에서, 본 발명의 작용제는, TIGIT를 통한 신호를 차단함으로써 NK 세포 및/또는 활성화된 기억 및/또는 조절 T 세포, 및/또는 헬퍼 T 세포의 하위세트의 저해를 예방 및/또는 방해함으로써 특정 면역 세포가 예를 들어, 항종양 방식으로 작용하는 것을 가능하게 하며, 선택적으로, 4-1BBL-, 및/또는 GITRL-, 및/또는 TL1A-, 및/또는 LIGHT-기반 자극 신호전달을 통해서 추가 면역 반응을 생성시킨다.

[0146] 실시형태에서, 본 발명의 작용제는 예를 들어, 내장 및/또는 림프계 및/또는 다른 기질 및/또는 상피 및/또는 골수 세포 상에서 자극 LIGHT-기반 신호전달을 자극 및/또는 증가시킴으로써, 특정 면역 세포가 예를 들어, 항종양 방식으로 작용하는 것을 가능하게 하며, 선택적으로, PD-1-, 및/또는 CD172a(SIRP α) -, 및/또는 TIGIT-기반 저해 신호전달의 차단 또는 감소를 통해서 추가 면역 반응을 생성시킨다.

[0147] 추가로, 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 상승작용적 치료 효과를 제공하는데, 그 이유는 그것이 2종의 면역치료제의 개선된 부위 특이적 상호작용을 가능하게 하기 때문이다.

[0148] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 오프-사이트 및/또는 전신 독성 감소의 가능성을 제공한다.

[0149] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 현재 면역요법, 예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같은 관문 분자에 지향되는 항체에 비해서, 감소된 부작용, 예를 들어, GI 합병증을 제공한다. 예시적인 GI 합병증은 복통, 식욕 부진, 자가면역 효과, 변비, 경련, 탈수, 설사, 섭취 문제, 피로, 헛배, 복부의 유체 또는 복수, 위장(GI) 세균 불균형, GI 점막염, 염증성 장 질환, 과민성 장 증후군(IBS-D 및 IBS-C), 구역, 통증, 대변 및 소변 변화, 궤양성 장염, 구토, 체액 유지로부터의 체중 증가 및/또는 쇠약을 포함한다.

[0150] **질환; 치료 방법 및 환자 선택**

[0151] 실시형태에서, 본 발명은 암 및/또는 종양; 예를 들어, 암 및/또는 종양의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 본 명세서 다른 곳에 기술된 바와 같이, 암의 치료는 실시형태에서, 면역 저해보다 면역 자극을 선호하도록 면역계를 본 발명의 키메라 단백질로 조정하는 것을 포함할 수 있다.

[0152] 암 또는 종양은 신체 기관 및 시스템의 정상 기능을 방해하는 세포의 제어되지 않는 성장 및/또는 비정상적으로 증가된 세포 생존력 및/또는 세포자멸의 저해를 지칭한다. 양성 암 및 악성 암, 폴립, 이상증식뿐만 아니라 휴지기 종양 또는 소전이(micrometastas)가 포함된다. 또한, 면역계에 의해서 저지되지 않은 비정상적인 증식을 갖는 세포(예를 들어, 바이러스 감염된 세포)가 포함된다. 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다. 원발성 암은 임상적으로 검출 가능한 본래 부위에서의 암 세포의 면적일 수 있고, 원발성 종양일 수 있다. 이에 반해서, 전이성 암은 하나의 기관 또는 부위로부터 또 다른 비인접한 기관 또는 부위로의 질환의 확산일 수 있다. 전이성 암은 국지 영역에서 정상 조직 주변을 관통 및 침윤하여, 국소 전이성일 수 있는 새로운 종양을 형성하는 능력을 획득한 암 세포에 의해서 유발될 수 있다. 암은 또한 림프관 및/또는 혈관의 벽을 관통하는 능력을 획득한 암 세포에 의해서 유발될 수 있는데, 그 후 암 세포는 혈류를 통해서 신체의 다른 부위 및 조직으로 순환할 수 있다(이로 인해서 순환 종양 세포임). 암은 림프성 또는 혈행성 확산과 같은 과정으로 인한 것일 수 있다. 암은 또한 또 다른 부위에서 뿔쳐서, 혈관 또는 벽을 통해서 재침투하고, 증식을 계속하고, 결국 또 다른 임상적으로 검출 가능한 종양을 형성하는 종양 세포에 의해서 유발될 수 있다. 암은 이러한 새로운 종양일 수 있고, 이것은 전이성(또는 2차) 종양일 수 있다.

[0153] 암은 전이된 종양 세포에 의해서 유발될 수 있고, 이것은 2차 또는 전이성 종양일 수 있다. 종양의 세포는 본래 종양에서의 것과 유사할 수 있다. 예로서, 유방암 또는 결장암이 간으로 전이되면, 2차 종양은, 간에 존재하면서, 비정상적인 간세포가 아닌 비정상적인 유방 또는 결장 세포로 구성된다. 따라서 간에서의 종양은 간암이 아닌 전이성 유방암 또는 전이성 결장암일 수 있다.

[0154] 암은 임의의 조직으로부터의 기원을 가질 수 있다. 암은 각각 흑색종, 결장, 유방 또는 전립선으로부터 기원할 수 있고, 따라서 각각 본래 피부, 결장, 유방 또는 전립선에 존재하는 세포로 구성될 수 있다. 암은 또한 혈액 악성종양일 수 있고, 이것은 백혈병 또는 림프종일 수 있다. 암은 조직, 예컨대, 간, 폐, 방광 또는 장을 침범할 수 있다.

[0155] 본 발명의 대표적인 암 및/또는 종양은 기저 세포 암종, 담관암; 방광암; 골암; 뇌 및 중추 신경계암; 유방암; 복막암; 자궁경부암; 용모암; 결장 및 직장암; 결합조직암; 소화기계암; 자궁내막암; 식도암; 안암; 두경부암; 위암(위장암 포함); 교모세포종; 간 암종; 간세포암; 상피내 신생물; 신장 또는 콩팥암; 후두암; 백혈병; 간암; 폐암(예를 들어, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선종, 폐의 편평 암종); 흑색종; 골수종; 신경 모세포종; 구강암(입술, 혀, 입 및 인두); 난소암; 췌장암; 전립선암; 망막 모세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡기의 암; 타액선 암종; 육종; 피부암; 편평 세포암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁 또는 자궁 내막암; 비뇨기계의 암; 외음부암; 림프종, 예컨대, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종, 뿐만 아니라 B-세포 림프종(예컨대, 저등급/소포성 비호지킨 림프종(NHL); 소 림프성(SL) NHL; 중간 등급/소포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 고등급 림프구성 NHL; 고등급 소 비절단 세포 NHL; 벌키(bulky) 질환 NHL; 맨틀 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's Macroglobulinemia); 만성 림프구성 백혈병(CLL); 급성 림프구성 백혈병(ALL); 털세포 백혈병; 만성 모구성 백혈병; 뿐만 아니라 다른 암종 및 육종; 및 이식 후 림프증식성 장애(PTLD), 뿐만 아니라 모반증, 부종과 연관된 비정상적인 혈관 증식(예컨대, 뇌종양과 연관된 것), 및 메이그스 증후군(Meigs' syndrome)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0156] 실시형태에서, 키메라 단백질은 치료-난치성 암을 갖는 대상체를 치료하는 데 사용된다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 1종 이상의 면역-조정제에 난치성인 대상체를 치료하는 데 사용된다. 예를 들어, 실시형태에서, 키메라 단백질은 12주 정도의 치료 후에, 치료에 반응을 나타내지 않거나 심지어는 진행된 대상체를 치료하는 데 사용된다. 예를 들어, 실시형태에서, 대상체는 예를 들어, 니볼루맵(nivolumab)(ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), 펌브롤리주맵(pembrolizumab)(KEYTRUDA, MERCK), 피딜리주맵(pidilizumab)(CT-011, CURE TECH), MK-3475(MERCK), BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB), 이브루티닙(Ibrutinib)(PHARMACYCLICS/ABBVIE), 아테졸리주맵(TECENTRIQ, GENENTECH), 및/또는 MPDL3280A(ROCHE)-난치성 환자를 비롯하여, PD-1 및/또는 PD-L1 및/또는 PD-L2 작용제에 난치성이다. 예를 들어, 실시형태에서, 대상체는 항-CTLA-4 작용제에 대해서 난치성이고, 예를 들어, 이필리무맵(ipilimumab)(YERVOY)-난치성 환자(예를 들어, 흑색종 환자)이다. 따라서, 실시형태에서 본 발명은 1종 이상의 면역-조정제의 단일요법을 비롯하여, 다양한 요

법에 비반응성인 환자를 구제하는 암 치료 방법을 제공한다.

- [0157] 실시형태에서, 본 발명은 종양 미세환경 내의 세포 또는 조직을 표적으로 하는 키메라 단백질을 제공한다. 실시형태에서, 종양 미세환경 내의 세포 또는 조직은 키메라 단백질의 1종 이상의 표적 또는 결합 파트너를 발현한다. 종양 미세환경은 종양이 존재하는 세포, 분비된 단백질, 생리학적 소분자 및 혈관을 비롯한 세포 환경을 지칭한다. 실시형태에서, 종양 미세환경 내의 세포 또는 조직은 종양 맥관구조; 종양-침윤 림프구; 섬유모세포 망상 세포; 내피 조상 세포(EPC); 암-연관된 섬유모세포; 주연세포; 다른 기질 세포; 세포의 기질(ECM)의 구성성분; 수지상 세포; 항원 제시 세포; T-세포; 조절 T 세포; 대식세포; 호중구; 및 종양에 인접하게 위치한 다른 면역 세포 중 하나 이상이다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 암 세포를 표적으로 한다. 실시형태에서, 암 세포는 키메라 단백질의 표적 또는 결합 파트너 중 하나 이상을 발현한다.
- [0158] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 TIGIT를 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 CD155/PVR을 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 넥틴-2를 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 넥틴-3을 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 넥틴-4를 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다.
- [0159] 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LIGHT를 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 LTBR을 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 HVEM을 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 DcR3을 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포)를 표적으로 할 수 있다.
- [0160] 실시형태에서, 본 발명의 방법은 추가 작용제에 난치성인 환자를 키메라 단백질로 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 "추가 작용제"는 본 명세서 다른 곳에 기술되어 있고, 비제한적으로 본 명세서에 기술된 다양한 화학치료제를 비제한적으로 포함한다.
- [0161] 실시형태에서, 키메라 단백질은 1종 이상의 염증성 질환 또는 병태를 치료, 제어 또는 예방하는 데 사용된다. 염증성 질환의 비제한적인 예는, 여드름, 급성 염증, 알레르기성 비염, 천식, 죽상 동맥경화증, 아토피성 피부염, 자가면역 질환, 자가염증성 질환, 상염색체 열성 경련성 운동 실조증, 기관지 확장증, 셀리악병, 만성 담낭염, 만성 염증, 만성 전립선염, 장염, 게실염, 가족성 호산구증가증(fe), 사구체신염, 글리세롤 키나제 결핍, 한선염, 땀샘염, 과민증, 염증, 염증성 장 질환, 염증성 골반 질환, 간질성 방광염, 후두 염증성 질환, 레이 증후군(Leigh syndrome), 편평태선, 비만 세포 활성화 증후군, 비만세포증, 안구 염증성 질환, 이염, 통증, 골반 염증성 질환, 허혈재관류 손상, 호흡기 질환, 재협착증, 류마티스열, 류마티스 관절염, 비염, 사르코이드증, 폐혈증성 쇼크, 규폐증 및 기타 진폐증, 이식 거부, 결핵 및 혈관염을 포함한다.
- [0162] 실시형태에서, 염증성 질환은 자가면역 질환 또는 병태, 예컨대, 다발성 경화증, 진성 당뇨병, 루푸스, 셀리악병, 크론병, 궤양성 장염, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 경피증, 굿파스처 증후군(Goodpasture's syndrome), 베게너 육아종증, 자가면역 간질, 라스무스 뇌염(Rasmussen's encephalitis), 원발성 담즙 경화증, 경화성 담관염, 자가면역 간염, 애디슨병, 하시모토 갑상선염, 섬유근육종, 메니에르 증후군(Menier's syndrome); 이식 거부(예를 들어, 동종이식편 거부의 예방), 악성 빈혈, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 피부근염, 쇼그렌 증후군, 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 라이터 증후군(Reiter's syndrome), 그레이브병 및 다른 자가면역 질환이다.
- [0163] 일부 양상에서, 본 발명의 키메라 작용제는 세포내 병원체를 제거하는 데 사용된다. 일부 양상에서, 본 발명의 키메라 작용제는 하나 이상의 감염을 치료하는 데 사용된다. 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 바이러스 감염(예를 들어, HIV 및 HCV 포함), 기생충 감염(예를 들어, 말라리아 포함), 및 박테리아 감염의 치료 방법에 사용된다. 실시형태에서, 감염은 면역억제제를 포함한다. 예를 들어, HIV 감염은 흔히 감염된 대상체에서 면역억제제를 초래한다. 따라서, 본 명세서 다른 곳에 기술된 바와 같이, 이러한 감염의 치료는 실시형태에서, 면역저해보다 면역 자극을 선호하도록, 면역계를 본 발명의 키메라 단백질로 조정하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 발명은 면역활성화를 유도하는 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 장 기생충 감염은 만성 면역 활성화와 연관되었다. 이러한 실시형태에서, 이러한 감염의 치료는 면역 자극보다 면역 저해를 선호하도록, 면역계를 본 발명의 키메라 단백질로 조정하는 것을 포함할 수 있다.

- [0164] 실시형태에서, 본 발명은 비제한적으로, 예를 들어, 기도, 또는 유두종 바이러스 감염, 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 감염, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염, 및 장기의 바이러스 감염, 예컨대, 간염 바이러스로의 감염의 급성 또는 만성 바이러스 감염을 비롯한 바이러스 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 실시형태에서, 바이러스 감염은 플라비바이러스과(family Flaviviridae)의 바이러스에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 플라비바이러스과의 바이러스는 황열 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 세인트 뇌염 바이러스, 및 C형 간염 바이러스로부터 선택된다. 실시형태에서, 바이러스 감염은 피코르니바이러스과(family Picornaviridae), 예를 들어, 폴리오바이러스, 리노바이러스, 콕사키바이러스의 바이러스에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 바이러스 감염은 오르토믹소바이러스과(Orthomyxoviridae)의 구성원, 예를 들어, 인플루엔자 바이러스에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 바이러스 감염은 레트로바이러스과, 예를 들어, 렌티바이러스의 구성원에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 바이러스 감염은 파라믹소바이러스과, 예를 들어, 호흡기 세포융합 바이러스, 인간 파라인플루엔자 바이러스, 이하선염바이러스(예를 들어, 뎀프스 바이러스), 홍역 바이러스, 및 인간 메타뉴모바이러스의 구성원에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 바이러스 감염은 부니아바이러스과, 예를 들어, 한타바이러스의 구성원에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 바이러스 감염은 레오바이러스과, 예를 들어, 로타바이러스의 구성원에 의해서 유발된다.
- [0165] 실시형태에서, 본 발명은 기생충 감염, 예컨대, 원생동물 또는 연충류 감염의 치료 방법을 제공한다. 실시형태에서, 기생충 감염은 원생동물 기생충에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 오리티지아(Oritiziab) 기생충은 장 원생동물, 조직 원생동물 또는 혈액 원생동물로부터 선택된다. 예시적인 원생동물 기생충은 엔타모에바 히스토리티카(*Entamoeba histolytica*), 지아디아 람블리아(*Giardia lamblia*), 크립토스포리듐 무리스(*Cryptosporidium muris*), 트리파노소마티다 감비엔스(*Trypanosomatida gambiense*), 트리파노소마티다 로데시엔스(*Trypanosomatida rhodesiense*), 트리파노소마티다 크루시(*Trypanosomatida cruzi*), 레쉬마니아 멕시카나(*Leishmania mexicana*), 레쉬마니아 브라질리엔시스(*Leishmania braziliensis*), 레쉬마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 레쉬마니아 도노바니(*Leishmania donovani*), 톡소플라즈마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 플라스모듐 비박스(*Plasmodium vivax*), 플라스모듐 오발레(*Plasmodium ovale*), 플라스모듐 말라리아(*Plasmodium malariae*), 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*), 및 히스토모나스 멜레아그리디스(*Histomonas meleagridis*)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 실시형태에서, 기생충 감염은 연충 기생충, 예컨대, 선충류(예를 들어, 쌍기충강(Adenophorea))에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 기생충은 쌍선충강(Secementea)(예를 들어, 트리추리스 트리치우라(*Trichuris trichiura*), 아스카리스 롬브리코이데스(*Ascaris lumbricoides*), 엔테로비우스 베르미쿨라리스(*Enterobius vermicularis*), 안킬로스토마 듀오테날레(*Ancylostoma duodenale*), 네카토 아메리카누스(*Necator americanus*), 스트롱글로이데스 스테르코칼리스(*Strongyloides stercoralis*), 울체레리아 반크로프티(*Wuchereria bancrofti*), 드라쿤쿨루스 메디넨시스(*Dracunculus medinensis*))으로부터 선택된다. 실시형태에서, 기생충은 흡충류(예를 들어, 혈액 흡충류, 간 흡충류, 장 흡충류 및 폐 흡충류)로부터 선택된다. 실시형태에서, 기생충은 스킴스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 스킴스토소마 헤마토비움(*Schistosoma haematobium*), 스킴스토소마 야포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 파스시올라 헤파티카(*Fasciola hepatica*), 파스시올라 기간티카(*Fasciola gigantica*), 헤테로피에스(*Heterophyes*), 파라고니무스 웨스터마니(*Paragonimus westermani*)로부터 선택된다. 실시형태에서, 기생충은 촌충류(예를 들어, 타에니아 솔리움(*Taenia solium*), 타에니아 사기나타(*Taenia saginata*), 하이메노레피스 나나(*Hymenolepis nana*), 에치노코쿠스 그라눌로수스(*Echinococcus granulosus*))로부터 선택된다.
- [0166] 실시형태에서, 본 발명은 박테리아 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 실시형태에서, 박테리아 감염은 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 호기성 및/또는 혐기성 박테리아에 의해서 유발된다. 실시형태에서, 박테리아는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*), 락토바실루스(*Lactobacillus*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 사르시나(*Sarcina*), 에스체리치아(*Escherichia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 프로테우스(*Proteus*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 시트로박터(*Citrobacter*), 니세리아(*Nisseria*), 바실루스(*Bacillus*), 박테로이데스(*Bacteroides*), 펩토코쿠스(*Peptococcus*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*), 세라티아(*Serratia*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 브루셀라(*Brucella*) 및 다른 유기체로부터 선택되지만 이들로 제한되지 않는다. 실시형태에서, 박테리아는 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 아시도보란스(*Pseudomonas acidovorans*), 슈도모나스알칼리게네스(*Pseudomonas alcaligenes*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 스테노트로포모나스 말토피라(*Stenotrophomonas maltophilia*), 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 아에로모나스 하

이드로필라(*Aeromonas hydrophilia*), 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 파라티피(*Salmonella paratyphi*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 쉬겔라 디센테리아에(*Shigella dysenteriae*), 쉬겔라 플렉네리(*Shigella flexneri*), 쉬겔라 손네이(*Shigella sonnei*), 엔테로박터 클로아카에(*Enterobacter cloacae*), 엔테로박터 아에로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 클레브시엘라 옥시토키(*Klebsiella oxytoca*), 세라티아 마르세스센스(*Serratia marcescens*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로비덴시아 알칼리파시엔스(*Providencia alcalifaciens*), 프로비덴시아 레트게리(*Providencia rettgeri*), 프로비덴시아 스투아르티(*Providencia stuartii*), 아시네토박터 바우만니(*Acinetobacter baumannii*), 아시네토박터 칼로아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 아시네토박터 헤몰리티쿠스(*Acinetobacter haemolyticus*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 예르시니아 슈도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*), 예르시니아 인터메디아(*Yersinia intermedia*), 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*), 보르데텔라 파라페르투스시스(*Bordetella parapertussis*), 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 헤모필루스 헤몰리티쿠스(*Haemophilus haemolyticus*), 헤모필루스 파라헤몰리티쿠스(*Haemophilus parahaemolyticus*), 헤모필루스 두크레이(*Haemophilus ducreyi*), 파스테우렐라 톨토시다(*Pasteurella multocida*), 파스테우렐라 헤몰리티카(*Pasteurella haemolytica*), 브란하멜라 카타르할리스(*Branhamella catarrhalis*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 캄필로박터 페투스(*Campylobacter fetus*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 나이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 킹겔라(*Kingella*), 모락셀라(*Moraxella*), 가르드네렐라 바기날리스(*Gardnerella vaginalis*), 박테로이데스 프라길리스(*Bacteroides fragilis*), 박테로이데스 디스타소니스(*Bacteroides distasonis*), 박테로이데스 3452A 동종 군, 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*), 박테로이데스 오발루스(*Bacteroides ovalus*), 박테로이데스 테타이오타오미크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*), 박테로이데스 유니포르미스(*Bacteroides uniformis*), 박테로이데스 에게르티(*Bacteroides eggerthii*), 박테로이데스 스플란크니쿠스(*Bacteroides splanchnicus*), 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*), 마이코박테륨 투베쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테륨 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테륨 인트라셀룰라에(*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테륨 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 코리네박테륨 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테륨 울세란스(*Corynebacterium ulcerans*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코쿠스 피요게네스(*Streptococcus pyogenes*), 엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코쿠스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스탕필로코쿠스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스탕필로코쿠스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스탕필로코쿠스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스탕필로코쿠스 하이쿠스 아종 하이쿠스(*Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*), 스탕필로코쿠스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스탕필로코쿠스 호미니스(*Staphylococcus hominis*) 또는 스탕필로코쿠스 사카롤리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*)로부터 선택되지만 이들로 제한되지 않는다.

[0167] 일부 양상에서, 본 발명의 하나 이상의 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용된다. 실시형태에서, 자가면역 질환 또는 장애의 치료는 면역 자극보다 면역 저해를 선호하도록, 면역계를 본 발명의 키메라 단백질로 조정하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 키메라 단백질로 치료 가능한 예시적인 자가면역 질환 또는 장애는 신체 자체의 항원이 면역 반응에 대한 표적이 되는 것, 예를 들어 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 진성 당뇨병, 강직성 척추염, 쇼그렌 증후군, 염증성 장 질환(예를 들어, 궤양성 대장염, 크론병), 다발성 경화증, 사르코이드증, 건선, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 건선, 과민성 반응(예를 들어, 알레르기, 고초열, 천식 및 급성 부종은 I형 과민성 반응을 야기함) 및 혈관염 등을 포함한다.

[0168] 추가의 또 다른 양상에서, 본 발명의 T 세포-매개된 질환 및 장애, 예컨대, 본 명세서에 다른 곳에 기술된 질환 또는 장애 및 염증성 질환 또는 장애, 이식편대숙주병(graft-versus-host disease: GVHD), 이식 거부, 및 T 세포 증식성 장애를 치료 및 예방하는 방법에 관한 것이다.

- [0169] 일부 양상에서, 본 발명의 키메라 작용제는 예를 들어, 면역 자극 신호를 갖는 세포의 도메인을 통해 T 세포를 활성화하는 방법에서 사용된다.
- [0170] 일부 양상에서, 본 키메라 작용제는 면역억제성 신호의 세포 전달을 예방하는 방법에서 사용된다.
- [0171] **병용 치료 및 조합**
- [0172] 실시형태에서, 본 발명은 키메라 단백질, 및 대상체에게 추가 작용제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법을 제공한다. 실시형태에서, 본 발명은 공동 투여(co-administration) 및/또는 공동 제형(co-formulation)에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 임의의 조성물은 공동 제형화 및/또는 공동 투여될 수 있다.
- [0173] 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질은 또 다른 작용제와 공동 투여될 때 상승작용적으로 작용하며, 이러한 작용제가 단일요법으로서 사용될 때 흔히 사용되는 용량보다 더 낮은 용량으로 투여된다. 실시형태에서, 본 명세서에 언급된 임의의 작용제는 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0174] 실시형태에서, 비제한적으로, 암 분야를 포함하여, 본 발명은 추가 작용제로서의 화학치료제에 관한 것이다. 화학치료제의 예는 알킬화제, 예컨대, 티오테파 및 CYTOXAN 사이클로스포스파마이드; 알킬 설포네이트, 예컨대, 부셀판, 임프로셀판 및 피포셀판; 아지리딘, 예컨대, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예컨대, 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포르아마이드, 트라이에틸렌티오포스포르아마이드 및 트라이메틸올로멜라민; 아세토게닌(예를 들어, 블라타신 및 블라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리 스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신(예를 들어, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB 1-TM1 포함); 엘루에테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕틴; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예컨대, 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스포마이드, 에스트라무스틴, 이포스포마이드, 멜클로레타민, 멜클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스포마이드, 유라실 머스타드; 나이트로소우레아, 예컨대, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대, 엔딘 항생제(예를 들어, 칼리키아미신, 특히 칼리키아미신 감말 및 칼리키아미신 오메갈(예를 들어, 문헌[Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참고); 다이네미산, 예컨대, 다이네미산 A; 비스포스포네이트, 예컨대, 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오킴지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 엔딘 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우쓰라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-다이아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN 독소루비신(모폴리노-독소루비신, 사이아노모폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시 독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대, 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대, 메토타렉세이트 및 5-플루오로유라실(5-FU); 엽산 유사체, 예컨대, 테노프테린, 메토타렉세이트, 프테로프테린, 트라이메타렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 사이타라빈, 다이데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토스테론; 항아드레날린, 예컨대, 미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예컨대, 프롤린산; 에세글라톤; 알도포스포마이드 글라이코사이드; 아미노레블린산; 에닐루라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데메콜신; 다이아지쿠온; 엘포르미틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대, 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라자이드; 프로카바진; PSK 폴리사카라이드 복합체(제이에이치에스 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products)(미국 오리건주 유진 소재)); 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트라이클로로트라이에틸아민; 트리코테센(예를 들어, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로스포스파마이드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 TAXOL 파클리탁셀(브리스톨-마이어스 스킵 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology)(뉴저지주 프린스턴), 파클리탁셀의 ABRAXANE Cremophor 미함유, 알부민 조작된 나노입자 제제(아메리칸 파마슈티컬 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 샤움베르크 111 소재)), 및 TAXOTERE 독세타셀(롱-프랑 로라(Rhone-Poulenc Rorer)(프랑스 안토니 소재)); 클로르암부실; GEMZAR 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토타렉세

이트; 백금 유사체, 예컨대, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파마이드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE, 비노렐빈; 노반트론; 테니포사이드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(Camptosar, CPT-11)(5-FU 및 류코보린에 의한 이리노테칸의 치료 요법 포함); 토포아이스머라제 저해제 RFS 2000; 다이플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예컨대, 레티노산; 카페시타빈; 콤프레타스타틴; 류코보린(LV); 옥살리플라틴 치료 섭생(FOLFOX)을 포함하는 옥살리플라틴; 라파티닙(TYKERB); 세포 증식을 감소시키는 PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR (예를 들어, 에를로티닙(Tarceva)) 및 VEGF-A의 저해제, 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 또한, 치료 방법은 방사선의 사용을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 치료 방법은 광역학 치료의 사용을 추가로 포함할 수 있다.

[0175] 실시형태에서, 제한 없이, 암 분야를 포함하여, 본 추가 물질은 PD-1 및 PD-L1 또는 PD-L2의 활성 및/또는 PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2(비제한적인 예로서, 니볼루맵(ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), 캠프롤리주맵(KEYTRUDA, Merck), MK-3475(MERCK), BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB), 아테졸리주맵(TECENTRIQ, GENENTECH), MPDL3280A(ROCHE) 중 하나 이상)과의 결합을 차단하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 저해하는 물질, CD137(4-1BB)의 활성 및/또는 4-1BB 리간드(비제한적인 예로서, 우렐루맵(BMS-663513 및 항-4-1BB 항체) 중 하나 이상과의 CD137(4-1BB)의 결합을 증가시키고/시키거나 자극하는 물질, 및 CTLA-4의 활성 및/또는 AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 및 PPP2R5A 중 하나 이상과의 CTLA-4의 결합 및/또는 OX40과 OX40L(비제한적인 예로서 GBR 830(GLENMARK), MEDI6469(MEDIMMUNE)과의 결합을 차단하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 저해하는 물질로부터 선택된 하나 이상의 면역조절제이다.

[0176] 실시형태에서, 비제한적으로, 감염성 질환 분야를 포함하여, 본 발명은 추가 작용제로서 항감염제에 관한 것이다. 몇몇 실시형태에서, 항감염제는 항바이러스제, 예컨대, 아바카버, 아시클로버, 아데포버, 암프레나버, 아타자나버, 시도포버, 다루나버, 텔라비르딘, 디다노신, 도코사놀, 에파비렌즈, 엘비테그라버, 엠트리시타빈, 엔푸비르티드, 에트라비린, 팜시클로버 및 포스카르네트를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 항바이러스제이다. 실시형태에서, 항감염제는 항박테리아제, 예컨대, 세팔로스포린 항생제(세팔렉신, 세푸록심, 세파드록실, 세파졸린, 세팔로틴, 세파클러, 세파만돌, 세폭시틴, 세프프로질 및 세프트비프롤); 플루오로퀴놀론 항생제(시프로, 레바퀴, 플록신, 테킨, 아벨록스 및 노르플록스); 테트라사이클린 항생제(테트라사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린 및 독시사이클린); 페니실린 항생제(아목시실린, 암피실린, 페니실린 V, 다이클록사실린, 카르베니실린 반코마이신 및 메티실린); 모노박탐 항생제(아즈트레오남); 및 카바페넴 항생제(에르타페넴, 도리페넴, 이미페넴/실라스타틴 및 메로페넴)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 항박테리아제이다. 실시형태에서, 항감염제는 항말라리아제(예를 들어, 클로로퀸, 퀴닌, 메플로퀸, 프리마퀸, 독시사이클린, 아르테메터/루메판트린, 아토바쿠온/프로쿠아닐 및 설과독신/피리메타민), 메트로니다졸, 티니다졸, 이베르멕틴, 피란텔 파모에이트 및 알벤다졸을 포함한다.

[0177] 실시형태에서, 비제한적으로, 자가면역 분야를 포함하여, 추가 작용제는 면역억제제이다. 몇몇 실시형태에서, 면역억제제는 소염제, 예컨대, 스테로이드성 소염제 또는 비스테로이드성 소염제(NSAID)이다. 스테로이드, 특히 부신 코티코스테로이드 및 이의 합성 유사체는 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 본 발명에 유용한 코티코스테로이드의 예는, 하이드록실트라이아미노놀론, 알파-메틸 텍사메타손, 베타-메틸 베타메타손, 베크로메타손 다이프로피오네이트, 베타메타손 벤조에이트, 베타메타손 다이프로피오네이트, 베타메타손 발러레이트, 클로베타솔 발러레이트, 데소나이드, 데스옥시메타손, 텍사메타손, 다이플로라손 다이아세테이트, 다이플루코르톨론 발러레이트, 플루아드레놀론, 플루클로롤론 아세토나이드, 플루메타손 피발레이트, 플루오시놀론 아세토나이드, 플루오시노나이드, 플루코르틴 뷰틸에스터, 플루오코르톨론, 플루프레드니텐(플루프레드닐리텐) 아세테이트, 플루란드레놀론, 할시노나이드, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손 뷰티레이트, 메틸프레드니솔론, 트라이아미노놀론 아세토나이드, 코르티손, 코르토독손, 플루세토니드, 플루드로코르티손, 다이플루오로손 다이아세테이트, 플루라드레놀론 아세토나이드, 메드리손, 암시나펜, 암시나피드, 베타메타손 및 이의 에스터의 발렌스, 클로로프레드니손, 클로코르텔론, 클레스시놀론, 다이클로리손, 다이플루프레드네이트, 플루클로로나이드, 플루니솔리드, 플루오로메탈론, 플루페롤론, 플루프레드니솔론, 하이드로코르티손, 메프레드니손, 파라메타손, 프레드니솔론, 프레드니손, 베크로메타손 다이프로피오네이트를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 본 발명에서 사용될 수 있는 (NSAIDS)는 살리실산, 아세틸 살리실산, 메틸 살리실레이트, 글라이콜 살리실레이트, 살리실마이드, 벤질-2,5-다이아세톡시벤조산, 이부프로펜, 풀린단, 나프록센, 케토프로펜, 에토포나메이트, 페닐부타존 및 인도메타신을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 실시형태에서, 면역억제제는 정균제, 예컨대, 알킬화제, 항대사물질(예를 들어, 아자티오프린, 메토폭렉세이트), 세포독성 항생제, 항체(예를 들어, 바실릭시맵, 다클리주맵 및 무로모넵), 항이뮤노필린(예를 들어, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 시클리무스), 인터페론, 오피

오이드, TNF 결합 단백질, 마이코페놀레이트 및 작은 생물체(예를 들어, 핑골리모드, 미리오신)일 수 있다.

[0178] 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 즉, 공유 부착이 조성물의 활성을 방해하지 않도록 조성물에 대한 분자의 임의의 유형의 공유 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 제한의 방식이 아니라, 예를 들어, 유도체는 특히 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형된 조성물을 포함한다. 임의의 다수의 화학 변형은 특이적 화학 절단, 아세틸화, 폼일화, 투리카마이신의 대사 합성 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 유도체는 하나 이상의 비전통적 아미노산을 함유할 수 있다. 추가의 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은, 예시적인 실시형태에서, 독소, 화학치료제, 방사선동위원소, 및 세포자멸 또는 세포사를 야기하는 물질을 포함하는 세포독성 물질을 추가로 포함한다. 이러한 작용제는 본 명세서에 기술된 조성물에 접합될 수 있다.

[0179] 본 명세서에 기술된 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 따라서 효과기 모이어티, 예컨대, 화학 링커, 검출 가능한 모이어티, 예를 들어 형광성 염료, 효소, 기질, 생물발광 물질, 방사능 물질, 및 화학발광 모이어티, 또는 기능성 모이어티, 예를 들어 스트렙타비딘, 아비딘, 바이오틴, 세포독소, 세포독성 물질, 및 방사능 재료 등을 첨가하도록 번역후 변형될 수 있다.

[0180] **제형**

[0181] 본 명세서에 기술된 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 약제학적으로 허용 가능한 염을 형성하기 위해서 무기산 또는 유기산과 반응할 수 있는 충분히 염기성인 작용기, 또는 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있는 카복실기를 보유할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 산 부가염은 관련 기술 분야에 공지된 바와 같이, 약제학적으로 허용 가능한 산으로부터 형성된다. 이러한 염은 예를 들어 문헌[Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977) 및 The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002](전문이 참고로 포함됨)에 기술된 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0182] 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태이다.

[0183] 추가로, 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 비히클을 포함하는 조성물의 성분으로서 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 적절한 투여를 위한 형태를 제공하도록 적합한 양의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 선택적으로 포함할 수 있다. 약제학적 부형제는 액체, 예컨대, 물 및 오일, 예컨대, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등일 수 있다. 약제학적 부형제는 예를 들어, 식염수, 아카시아 검, 젤라틴, 전분 페이스트, 활석, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 우레아 등일 수 있다. 또한, 보조제, 안정화제, 증점제, 활택제 및 착색제를 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 대상체에게 투여될 때 멸균성이다. 물은 본 명세서에 기술된 임의의 작용제가 정맥내로 투여될 때 유용한 부형제이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 구체적으로 주사용 용액을 위한 액체 부형제로서 또한 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 부형제는 또한 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카젤, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 본 명세서에 기술된 임의의 작용제는, 바람직한 경우, 또한 소량의 습윤 또는 유화 물질, 또는 pH 완충제를 포함할 수 있다.

[0184] 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 식염수 완충제(비제한적으로 TBS, PBS 등 포함) 중에 재현탁된다.

[0185] 실시형태에서, 키메라 단백질은 반감기를 연장하거나 또는 약물학적 및 약동학적 특성을 달리 개선시키도록 또 다른 작용제와 접합되고/되거나 융합될 수 있다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 PEG, XTEN(예를 들어, rPEG로서), 폴리스알산(폴리XEN), 알부민(예를 들어, 인간 혈청 알부민 또는 HAS), 엘라스틴 유사 단백질(ELP), PAS, HAP, GLK, CTP, 트랜스페린 등 중 하나 이상과 융합되거나 접합될 수 있다. 실시형태에서, 각각의 개별 키메라 단백질은 문헌[BioDrugs(2015) 29:215-239](이의 전문은 참고로 포함됨)에 기술된 작용제 중 하나 이상에 융합된다.

[0186] **투여, 투약 및 치료 요법**

[0187] 본 발명은 다양한 기술된 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)을 다양한 제형으로 포함한다. 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 용액, 현탁액, 에멀션, 드롭, 정제, 환제, 펠릿, 캡슐, 액체

함유 캡슐, 분말, 서방형 제형, 좌제, 에멀션, 에어로졸, 스프레이, 현탁액의 형태, 또는 사용에 적합한 임의의 다른 형태를 취할 수 있다. 단백질 서열을 암호화하는 DNA 또는 RNA 작제물을 또한 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 캡슐의 형태이다(예를 들어, 미국 특허 제5,698,155호). 적합한 약제학적 부형제의 다른 예는 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676(Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed. 1995)]에 기술되어 있다.

[0188] 필요한 경우, 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)을 포함하는 제형은 또한 가용화제를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 작용제는 관련 기술 분야에 공지된 바와 같은 적합한 비히클 또는 전달 장치에 의해 전달될 수 있다. 본 명세서에 기술된 병용 요법은 단일 전달 비히클 또는 전달 장치에서 공동 전달될 수 있다. 투여를 위한 조성물은 선택적으로 국소 마취제, 예컨대, 예를 들어, 주사의 부위에서 통증을 경감시키는 리그노카인을 포함할 수 있다.

[0189] 본 발명의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)을 포함하는 제형은 편리하게는 단위 제형으로 존재할 수 있고, 약학의 분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 치료제를 1종 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 회합시키는 단계를 포함한다. 전형적으로, 제형은 치료제를 액체 담체, 미분 고체 담체 또는 둘 다와 균일하고, 친밀하게 회합시키고, 이어서, 필요한 경우, 생성물을 목적하는 제형의 투여 형태로 성형(예를 들어, 습식 또는 건식 과립화, 분말 블렌드 등, 그 다음 관련 기술 분야에 공지된 종래의 방법을 이용한 타정)함으로써 제조된다.

[0190] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 본 명세서에 기술된 투여 방식에 채택된 조성물로서 일상적인 절차에 따라 제형화된다.

[0191] 투여 경로는 예를 들어 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외, 경구, 설하, 비강내, 대뇌내, 질내, 경피, 직장, 흡입, 또는 특히 귀, 코, 눈 또는 피부에 대해서 국소에 의한 것을 포함한다. 실시형태에서, 투여는 경구로 또는 비경구 주사에 의해 달성된다. 대부분의 경우에, 투여는 혈류로의 본 명세서에 기술된 임의의 물질의 방출을 조래한다.

[0192] 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 경구로 투여될 수 있다. 이러한 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 또한 임의의 다른 편리한 경로, 예를 들어 정맥내 점적주사 또는 볼러스 주사(bolus injection), 상피 또는 점막피부 내벽(예를 들어, 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 또 다른 생물학적으로 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소일 수 있다. 다양한 전달 시스템, 예를 들어 리포솜, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 캡슐 등 중의 캡슐화는 공지되어 있고, 투여에 사용될 수 있다.

[0193] 구체적인 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 면적에 국지적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 일 실시형태, 예를 들어 암의 치료에서, 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 종양 미세환경(예를 들어, 종양 세포를 둘러싸고/거나 영양을 공급하는 세포, 분자, 세포의 기질 및/또는 혈관, 예를 들어, 종양 맥관구조; 종양-침윤 림프구; 섬유모세포 망상 세포; 내피 조상세포(EPC); 암-연관 섬유모세포; 주연세포; 다른 기질 세포; 세포외 기질(ECM)의 구성성분; 수지상 세포; 항원 제시 세포; T-세포; 조절 T 세포; 대식세포; 호중구; 및 종양에 인접하게 위치한 다른 면역 세포) 또는 림프절에 투여되고/거나 종양 미세환경 또는 림프절을 표적으로 한다. 실시형태에서, 예를 들어 암의 치료에서, 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 종양내에 투여된다.

[0194] 다양한 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 종래의 면역치료(예를 들어, OPDIVO, KEYTRUDA, YERVOY 및 TECENTRIQ 중 하나 이상에 의한 치료)에 의해 인지되는 것보다 더 적은 부작용을 제공하는 이중 효과를 허용한다. 예를 들어, 본 발명의 키메라 단백질은 다양한 조직 및 기관, 예컨대, 피부, 위장관, 신장, 말초 및 중추 신경계, 간, 림프절, 눈, 체장 및 내분비계; 예컨대, 뇌하수체염, 대장염, 간염, 폐렴, 발진 및 류마티스성 질환에 영향을 미치는 일반적으로 관찰되는 면역 관련 부작용을 감소시키거나 예방한다. 추가로, 예를 들어 종양내와 같은 본 발명의 국소 투여는 종래의 면역치료(예를 들어, OPDIVO, KEYTRUDA, YERVOY 및 TECENTRIQ 중 하나 이상에 의한 치료)에서 사용되는 것과 같은 표준 전신 투여, 예를 들어 IV 주입에 의해 인지되는 부작용을 제거한다.

[0195] 비경구 투여(예를 들어, 정맥내, 근육내, 복강내, 피하 및 관절내 주사 및 주입)에 적합한 투여형은 예를 들어 용액, 현탁액, 분산액, 에멀션 등을 포함한다. 이들은 또한 사용 직전에 멸균 주사용 매질 중에 용해되거나 현탁될 수 있는 멸균 고체 조성물(예를 들어, 동결건조된 조성물)의 형태로 제조될 수 있다. 이들은 예를 들어 관련 기술 분야에 공지된 현탁제 또는 분산제를 함유할 수 있다.

- [0196] 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)의 투여량, 및 투여 스케줄은 치료하고자 하는 질환, 대상체의 일반적인 건강 및 투여하는 주치의의 결정을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다양한 매개변수에 따라 달라질 수 있다. 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질은 이를 필요로 하는 대상체에게 추가 작용제의 투여 이전에(예를 들어, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 전에), 동시에, 또는 이에 후속하여(예를 들어, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 후에) 투여될 수 있다. 실시형태에서 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질 및 추가 작용제는 1분 간격, 10분 간격, 30분 간격, 1시간 미만 간격, 1시간 간격, 1시간 내지 2시간 간격, 2시간 내지 3시간 간격, 3시간 내지 4시간 간격, 4시간 내지 5시간 간격, 5시간 내지 6시간 간격, 6시간 내지 7시간 간격, 7시간 내지 8시간 간격, 8시간 내지 9시간 간격, 9시간 내지 10시간 간격, 10시간 내지 11시간 간격, 11시간 내지 12시간 간격, 1일 간격, 2일 간격, 3일 간격, 4일 간격, 5일 간격, 6일 간격, 1주 간격, 2주 간격, 3주 간격, 또는 4주 간격으로 투여된다.
- [0197] 실시형태에서, 본 발명은 내재 면역 반응을 유도하는 키메라 단백질 및 적응 면역 반응을 유도하는 또 다른 키메라 단백질의 공동 투여에 관한 것이다. 이러한 실시형태에서, 내재 면역 반응을 유도하는 키메라 단백질은 적응 면역 반응을 유도하는 키메라 단백질의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 키메라 단백질은 1분 간격, 10분 간격, 30분 간격, 1시간 미만 간격, 1시간 간격, 1시간 내지 2시간 간격, 2시간 내지 3시간 간격, 3시간 내지 4시간 간격, 4시간 내지 5시간 간격, 5시간 내지 6시간 간격, 6시간 내지 7시간 간격, 7시간 내지 8시간 간격, 8시간 내지 9시간 간격, 9시간 내지 10시간 간격, 10시간 내지 11시간 간격, 11시간 내지 12시간 간격, 1일 간격, 2일 간격, 3일 간격, 4일 간격, 5일 간격, 6일 간격, 1주 간격, 2주 간격, 3주 간격 또는 4주 간격으로 투여될 수 있다. 예시적인 실시형태, 내재 면역 반응을 유도하는 키메라 단백질 및 적응 반응을 유도하는 키메라 단백질은 1주 간격으로 투여되거나, 또는 격주로 투여된다(즉, 내재 면역 반응을 유도하는 키메라 단백질의 투여는 적응 면역 반응을 유도하는 키메라 단백질의 투여 1주 후에 수행되며, 그 등등이다).
- [0198] 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)의 투여량은 예컨대, 병태의 중증도, 병태를 치료하고자 하는지 또는 예방하고자 하는지의 여부, 및 치료하고자 대상체의 연령, 체중 및 건강을 비롯한 몇몇 인자에 따라서 달라질 수 있다. 추가로, 특정한 대상체에 대한 파마코게놈(치료제의 약동학적, 약물학적 또는 효능 프로필에 대한 유전자형의 효과) 정보는 사용된 투여량에 영향을 미칠 수 있다. 추가로, 정확한 개별 투여량은 투여되는 물질, 투여 시간, 투여 경로, 제형의 본성, 배설 속도, 치료하고자 하는 특정한 질환, 장애의 중증도 및 장애의 해부학적 위치의 특정한 조합을 비롯한 다양한 인자에 따라 다소 조정될 수 있다. 투여량의 약간의 변동이 예상될 수 있다.
- [0199] 비경구 주사에 의한 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)의 투여를 위해서, 투여량은 약 0.1mg 내지 약 250mg/일, 약 1mg 내지 약 20mg/일, 또는 약 3mg 내지 약 5mg/일일 수 있다. 일반적으로, 경구 또는 비경구로 투여되는 경우, 본 명세서에 기술된 임의의 작용제의 투여량은 약 0.1mg 내지 약 1500mg/일, 또는 약 0.5mg 내지 약 10mg/일, 또는 약 0.5mg 내지 약 5mg/일, 또는 약 200 내지 약 1,200mg/일(예를 들어, 약 200mg, 약 300mg, 약 400mg, 약 500mg, 약 600mg, 약 700mg, 약 800mg, 약 900mg, 약 1,000mg, 약 1,100mg, 약 1,200mg/일)일 수 있다.
- [0200] 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)의 투여는 약 0.1mg 내지 약 1500mg/치료, 또는 약 0.5mg 내지 약 10mg/치료, 또는 약 0.5mg 내지 약 5mg/치료, 또는 약 200 내지 약 1,200mg/치료(예를 들어, 약 200mg, 약 300mg, 약 400mg, 약 500mg, 약 600mg, 약 700mg, 약 800mg, 약 900mg, 약 1,000mg, 약 1,100mg, 약 1,200mg/치료)의 투여량으로 비경구 주사에 의해서 수행된다.
- [0201] 실시형태에서, 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)의 적합한 투여량은 약 0.01mg/kg 내지 약 100mg/체중 kg, 또는 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/대상체의 체중 kg, 예를 들어, 약 0.01mg/kg, 약 0.02mg/kg, 약 0.03mg/kg, 약 0.04mg/kg, 약 0.05mg/kg, 약 0.06mg/kg, 약 0.07mg/kg, 약 0.08mg/kg, 약 0.09mg/kg, 약 0.1mg/kg, 약 0.2mg/kg, 약 0.3mg/kg, 약 0.4mg/kg, 약 0.5mg/kg, 약 0.6mg/kg, 약 0.7mg/kg, 약 0.8mg/kg, 약 0.9mg/kg, 약 1mg/kg, 약 1.1mg/kg, 약 1.2mg/kg, 약 1.3mg/kg, 약 1.4mg/kg, 약 1.5mg/kg, 약 1.6mg/kg, 약 1.7mg/kg, 약 1.8mg/kg, 약 1.9mg/kg, 약 2mg/kg, 약 3mg/kg, 약 4mg/kg, 약 5mg/kg, 약 6mg/kg, 약 7mg/kg, 약 8mg/kg, 약 9mg/kg, 약 10mg/체중 kg의 범위이고, 이들 값 및 이들 값 사이의 범위가 포함된다.
- [0202] 또 다른 실시형태에서, 전달은 소포, 특히 리포솜 중에서 수행될 수 있다(문헌[Langer, 1990, *Science*

249:1527-1533; Treat *et al.*, in *Liposomes in therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)] 참고).

[0203] 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 제어 방출형 또는 서방형 방출 수단 또는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 전달 장치에 의해 투여될 수 있다. 예는 미국 특허 제3,845,770호; 제3,916,899호; 제3,536,809호; 제3,598,123호; 제4,008,719호; 제5,674,533호; 제5,059,595호; 제5,591,767호; 제5,120,548호; 제5,073,543호; 제5,639,476호; 제5,354,556호; 및 제5,733,556호(이들 각각은 본 명세서에서 전문이 참고로 포함됨)에 기재된 것을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 이러한 투여형은 다양한 비율로 목적하는 방출 프로필을 제공하도록 예를 들어 하이드로프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 젤, 투과성 막, 삼투 시스템, 다층 코팅, 마이크로입자, 리포솜, 마이크로구체, 또는 이들의 조합을 사용하여 1종 이상의 활성 성분의 제어 방출 또는 서방 방출을 제공하기에 유용할 수 있다. 활성 성분의 제어 방출 또는 서방 방출은 pH의 변화, 온도의 변화, 적절한 광 파장에 의한 자극, 효소의 농도 또는 이용 가능성, 물의 농도 또는 이용 가능성, 또는 다른 생리학적 조건 또는 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 조건에 의해 자극될 수 있다.

[0204] 또 다른 실시형태에서, 중합체 물질을 사용할 수 있다(*Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61] 참고; 또한 문헌[Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105] 참고).

[0205] 또 다른 실시형태에서, 제어 방출 시스템은 치료하고자 하는 표적 면적에 인접하게 위치하여, 전신 용량의 분율만을 필요로 할 수 있다(예를 들어, 문헌[Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)]을 참고). 문헌[Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533]에 의해 검토에서 기재된 다른 제어 방출 시스템을 사용할 수 있다.

[0206] 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)의 투여는 독립적으로 매일 1회 내지 4회 또는 매월 1회 내지 4회 또는 매년 1회 내지 6회 또는 2년, 3년, 4년 또는 5년마다 1회일 수 있다. 투여는 1일 또는 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 1년, 2년, 3년의 기간 동안일 수 있고, 심지어는 대상체의 생애 동안일 수 있다.

[0207] 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)을 사용하는 투여 요법은 다양한 인자, 예컨대, 대상체의 유형, 종, 연령, 체중, 성별 및 의학적 상태; 치료하고자 하는 병태의 중증도; 투여 경로; 대상체의 신장 또는 간 기능; 개인의 과마코게놈 구성; 및 사용되는 본 발명의 특정 화합물에 따라 선택될 수 있다. 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 단일 1일 용량으로 투여될 수 있거나, 전체 1일 투여량은 1일 2회, 3회 또는 4회의 분할 용량으로 투여될 수 있다. 추가로, 본 명세서에 기술된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)은 투여 요법에 걸쳐 간헐적이지 아닌 연속적으로 투여될 수 있다.

[0208] 세포 및 핵산

[0209] 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 키메라 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 실시형태에서, 발현 벡터는 DNA 또는 RNA를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 발현 벡터는 포유동물 발현 벡터이다.

[0210] 원핵생물 및 진핵생물 벡터 둘 다 키메라 단백질의 발현에 사용될 수 있다. 원핵생물 벡터는 이. 콜라이 서열을 기반으로 하는 작제물을 포함한다(예를 들어, 문헌[Makrides, *Microbiol Rev* 1996, 60:512-538]을 참고). 이. 콜라이에서의 발현에 사용될 수 있는 조절 영역의 비제한적인 예는 lac, trp, lpp, phoA, recA, tac, T3, T7 및 λ P_L을 포함한다. 원핵생물 발현 벡터의 비제한적인 예는 λ gt 벡터 시리즈, 예컨대, λ gt11(Huynh *et al.*, in "DNA Cloning Techniques, Vol. I: A Practical Approach," 1984, (D. Glover, ed.), pp. 49-78, IRL Press, Oxford), 및 pET 벡터 시리즈(Studier *et al.*, *Methods Enzymol* 1990, 185:60-89)를 포함할 수 있다. 그러나, 원핵생물 숙주-벡터 시스템은 포유동물 세포의 번역후 가공을 많이 수행할 수 없다. 따라서, 진핵생물 숙주-벡터 시스템이 특히 유용할 수 있다. 다양한 조절 영역은 포유동물 숙주 세포에서의 키메라 단백질의 발현에 사용될 수 있다. 예를 들어, SV40 초기 및 후기 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 프로모터 및 라우스 육종 바이러스 긴 말단 반복부(RSV-LTR) 프로모터를 사용할 수 있다. 포유동물 세포에서 유용할 수 있는 유도성 프로모터는, 비제한적으로 메탈로티오네인 II 유전자, 마우스 유방 종양 바이러스 글루코코르티코이드 반응성 긴 말단 반복부(MMTV-LTR), β -인터페론 유전자 및 hsp70 유전자와 연관된 프로모터를 포함한다(문

현[Williams et al., Cancer Res 1989, 49:2735-42; 및 Taylor et al., Mol Cell Biol 1990, 10:165-75]을 참고). 열 충격 프로모터 또는 스트레스 프로모터는 재조합 숙주 세포에서의 키메라 단백질의 발현을 유도하기에도 또한 유리할 수 있다.

[0211] 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는, 포유동물 세포에서 기능성인 발현 제어 영역, 또는 이의 보체에 작동 가능하게 연결된, 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제) 또는 이의 보체를 암호화하는 핵산을 포함한다. 발현 제어 영역은, 차단제 및/또는 자극제가 발현 벡터에 의해 형질전환된 인간 세포에서 생성되도록, 핵산을 암호화하는 작동 가능하게 연결된 차단제 및/또는 자극제의 발현을 유도할 수 있다.

[0212] 발현 제어 영역은 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현에 영향을 미치는 조절 폴리뉴클레오타이드(때때로 본 명세서에서 요소라고 지칭됨), 예컨대, 프로모터 및 인핸서이다. 본 발명의 발현 벡터의 발현 제어 영역은 인간 세포에서 작동 가능하게 연결된 암호화 핵산을 발현할 수 있다. 실시형태에서, 세포는 종양 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 세포는 비종양 세포이다. 실시형태에서, 발현 제어 영역은 작동 가능하게 연결된 핵산에 제어 가능한 발현을 부여한다. 신호(때때로 자극이라 지칭함)는 이러한 발현 제어 영역에 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 신호에 반응하여 발현을 증가시키는 이러한 발현 제어 영역은 대개 유도성이라고 지칭된다. 신호에 반응하여 발현을 감소시키는 이러한 발현 제어 영역은 대개 억제성이라고 지칭된다. 전형적으로, 이러한 요소에 의해 부여되는 증가 또는 감소의 양은 존재하는 신호의 양에 비례하고, 신호의 양이 더 높을수록, 발현의 증가 또는 감소가 더 높다.

[0213] 실시형태에서, 본 발명은 신호에 반응하여 발현의 높은 수준을 일시적으로 실행할 수 있는 유도성 프로모터의 사용을 고려한다. 예를 들어, 종양 세포에 인접할 때, 이러한 발현 제어 서열을 포함하는 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)에 대한 발현 벡터에 의해서 형질전환된 세포는 형질전환된 세포를 적절한 신호에 노출시킴으로써 작용제의 높은 수준을 일시적으로 생성하도록 유도된다. 예시적인 유도성 발현 제어 영역은 신호에 의해 자극될 수 있는 유도성 프로모터를 포함하는 것, 예컨대, 소분자 화학 화합물을 포함한다. 특정 예는 예를 들어, 미국 특허 제5,989,910호, 제5,935,934호, 제6,015,709호 및 제6,004,941호에서 찾아볼 수 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 전문이 참고로 포함된다.

[0214] 발현 제어 영역 및 유전자와 제어 영역은 전장 프로모터 서열, 예컨대, 네이티브 프로모터 및 인핸서 요소, 및 하위서열 또는 폴리뉴클레오타이드 변이체(전장 또는 비변이체 기능의 전부 또는 일부를 보유함)를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "기능성" 및 이의 문법적 변형은, 핵산 서열, 하위서열 또는 단편과 관련하여 사용되는 경우, 그 서열이 네이티브 핵산 서열(예를 들어, 비변이체 또는 비변형된 서열)의 하나 이상의 기능을 갖는다는 것을 의미한다.

[0215] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "작동 가능한 연결부"는 이의 의도된 방식으로 이들이 기능하도록 허용하는 것으로 기술되는 성분의 물리적 병치를 의미한다. 핵산과 작동 가능한 연결부에서의 발현 제어 요소의 예에서, 관계는 제어 요소가 핵산의 발현을 조정하게 하는 것이다. 전형적으로, 전사를 조정하는 발현 제어 영역은 전사된 핵산의 5' 단부 근처에(즉, "상류에") 병치된다. 발현 제어 영역은 또한 전사된 서열의 3' 단부에(즉, "하류에") 또는 전사체 내에(예를 들어, 인트론 내에) 위치할 수 있다. 발현 제어 요소는 전사된 서열로부터 이격된 거리(예를 들어, 핵산으로부터 100개 내지 500개, 500개 내지 1000개, 2000개 내지 5000개, 또는 이것 초과 뉴클레오타이드)에 위치할 수 있다. 발현 제어 요소의 구체적인 예는 전사된 서열의 5'에 통상적으로 위치되는 프로모터이다. 발현 제어 요소의 또 다른 예는 전사된 서열의 5' 또는 3'에 또는 전사된 서열 내에 위치될 수 있는 인핸서이다.

[0216] 인간 세포에서의 발현 시스템 기능성은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있고, 바이러스 시스템을 포함한다. 일반적으로, 인간 세포에서의 프로모터 기능성은 포유동물 RNA 중합효소에 결합하고, mRNA로의 암호 서열의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 암호 서열의 5' 단부에 보통 인접하게 배치된 전사 개시 영역, 및 전형적으로 전사 개시 부위의 25개 내지 30개의 염기쌍 상류에 위치한 TATA를 가질 것이다. TATA 박스는 정확한 부위에서 RNA 합성을 시작하도록 RNA 중합효소 II를 지시하는 것으로 생각된다. 프로모터는, 전형적으로 TATA 박스의 100개 내지 200개의 염기쌍 상류에 위치한, 상류 프로모터 요소(인핸서 요소)를 또한 전형적으로 가질 것이다. 상류 프로모터 요소는 전사가 개시되고 어느 한 방향으로 작용할 수 있는 속도를 결정한다. 포유동물 바이러스 유전자로부터의 프로모터가 프로모터로서 특히 사용되는데, 이는 바이러스 유전자가 대개 고도로 발현되고 광범위한 숙주 범위를 갖기 때문이다. 예는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 단순 포진 바이러스 프로모터 및 CMV 프로모터를 포함한다.

- [0217] 전형적으로, 포유동물 세포에 의해 인식되는 전사 종결 및 폴리아데닐화 서열은 번역 중단 코돈에 3'에 위치한 조절 영역이고, 따라서, 프로모터 요소와 함께, 암호 서열에 축적한다. 성숙 mRNA의 3' 말단은 부위 특이적 번역후 절단 및 폴리아데닐화에 의해 형성된다. 전사 종결자 및 폴리아데닐화 신호의 예는 SV40으로부터 유래된 것을 포함한다. 인트론이 또한 발현 작제물에 포함될 수 있다.
- [0218] 생존 가능한 세포 내에 핵산을 도입하기 위해 사용 가능한 다양한 기술이 존재한다. 시험관내 포유동물 세포 내에 핵산을 운반하기에 적합한 기술은 리포솜의 사용, 전기천공, 마이크로주사, 세포 융합, 중합체 기반 시스템, DEAE-덱스트란, 바이러스 형질도입, 인산칼슘 침전 방법 등을 포함한다. 생체내 유전자 운반을 위해, 리포솜; 자연 중합체 기반 전달 비히클, 예컨대, 키토산 및 젤라틴을 포함하는 다수의 기술 및 시약을 또한 사용할 수 있고, 바이러스 벡터가 생체내 형질도입에 또한 적합하다. 몇몇 상황에서, 표적화제, 예컨대, 종양 세포 표면 막 단백질에 특이적인 항체 또는 리간드를 제공하는 것이 바람직하다. 리포솜이 사용되는 경우, 내포작용과 연관된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질, 예를 들어 특정 세포 유형에 특이적인 캡시드 단백질 또는 이의 단편, 순환에서 내재화를 겪는 단백질에 대한 항체, 세포내 내재화를 표적화하고 세포내 반감기를 증가시키는 단백질이 표적화에 그리고/또는 흡수를 촉진하도록 사용될 수 있다. 수용체 매개된 내포작용의 기술은 예를 들어 문헌[Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432(1987); 및 Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414(1990)]에 의해 기술되어 있다.
- [0219] 적절한 경우, 유전자 전달 물질, 예를 들어 통합 서열 등이 또한 사용될 수 있다. 다수의 통합 서열은 관련 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Nunes-Duby et al., Nucleic Acids Res. 26:391-406, 1998; Sadwoski, J. Bacteriol., 165:341-357, 1986; Bestor, Cell, 122(3):322-325, 2005; Plasterk et al., TIG 15:326-332, 1999; Kootstra et al., Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003]을 참고). 이것은 재조합 효소 및 트랜스포사제(transposase)를 포함한다. 예는 Cre(Sternberg and Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981), 람다(Nash, Nature, 247, 543-545, 1974), FIp(Broach, et al., Cell, 29:227-234, 1982), R(Matsuzaki, et al., J. Bacteriology, 172:610-618, 1990), cpC31(예를 들어, 문헌[Groth et al., J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004] 참조), 슬리핑 뷰티(sleeping beauty), 매리너 패밀리(mariner family)의 전이효소(상기 Plasterk 등의 문헌), 및 바이러스, 예컨대, AAV, 레트로바이러스, 및 바이러스 통합을 제공하는 성분을 갖는 항바이러스를 통합하기 위한 성분, 예컨대, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스의 LTR 서열 및 AAV의 ITR 서열(Kootstra et al., Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003)을 포함한다. 또한, 키메라 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 삽입하기 위해서 CRISPR/CAS9, 아연 핑거, TALEN 및 메가뉴클레아제 유전자 편집 기술을 비롯한 직접적인 및 표적화된 유전적 통합 전략을 사용할 수 있다.
- [0220] 일 양태에서, 본 발명은 바이러스 벡터인 키메라 단백질(및/또는 추가 작용제)의 발현을 위한 발현 벡터를 제공한다. 유전자 치료에 유용한 많은 바이러스 벡터가 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Lundstrom, Trends Biotechnol., 21: 1 17, 122, 2003]을 참고). 예시적인 바이러스 벡터는 안티바이러스(LV), 레트로바이러스(RV), 아데노바이러스(AV), 아데노 연관된 바이러스(AAV) 및 α 바이러스로부터 선택된 것을 포함하지만, 다른 바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있다. 생체내 사용을 위해서, 숙주 계통 내에 통합되지 않는 바이러스 벡터, 예컨대, α 바이러스 및 아데노바이러스가 사용하기에 적합하다. α 바이러스의 예시적인 유형은 신드비스 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염(VEE) 바이러스 및 샘리키 포레스트 바이러스(SFV)를 포함한다. 시험관내 사용을 위해서, 숙주 계통 내에 통합하는 바이러스 벡터, 예컨대, 레트로바이러스, AAV 및 안티바이러스가 적합하다. 일 실시형태에서, 본 발명은 생체내 고형 종양을 본 발명의 바이러스 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체내에서 인간 세포를 형질도입하는 방법을 제공한다.
- [0221] 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 키메라 단백질을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0222] 발현 벡터는 본 발명의 키메라 단백질을 제조하기 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 세포는 예를 들어, 시험관내에서 배양되거나 유전적으로 조작될 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포는, 비제한적으로, 인간, 원숭이 및 설치류로부터 유래된 세포를 포함한다(예를 들어, 문헌[Kriegler in "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual," 1990, New York, Freeman & Co.] 참고). 이들은 SV40에 의해서 형질전환된 원숭이 신장 세포주(예를 들어, COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장주(예를 들어, 현탁 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293, 293-EBNA 또는 293 세포, [Graham et al., J Gen Virol 1977, 36:59]); 아기 햄스터 신장 세포(예를 들어, BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포-DHFR(예를 들어, CHO, [Urlaub and Chasin, Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:4216]); DG44 CHO 세포, CHO-K1 세포, 마우스 세르톨리 세포(Mather, Biol Reprod 1980, 23:243-251); 마우스 섬유모세포 세포(예를 들어, NIH-3T3), 원숭이 신장 세포(예를 들어, CV1 ATCC CCL 70);

아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(예를 들어, VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(예를 들어, HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(예를 들어, MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(예를 들어, BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(예를 들어, W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(예를 들어, Hep G2, HB 8065); 및 마우스 유방 종양 세포(예를 들어, MMT 060562, ATCC CCL51)를 포함한다. 본 명세서에 기술된 키메라 단백질을 발현하기 위한 예시적인 암 세포 유형은 마우스 섬유모세포 세포주, NIH3T3, 마우스 루이스 폐암종 세포주, LLC, 마우스 비만세포종 세포주, P815, 마우스 림프종 세포주, EL4 및 이의 난알부민 형질감염체, E.G7, 마우스 흑색종 세포주, B16F10, 마우스 섬유육종 세포주, MC57, 및 인간 소세포 폐 암종 세포주, SCLC#2 및 SCLC#7을 포함한다.

[0223] 숙주 세포는 정상 또는 영향을 받은 대상체, 예컨대, 건강한 인간, 암 환자 및 감염성 질환을 갖는 환자, 개인 실험실 기탁물, 공공 배양 수집품, 예컨대, 미국 군주 은행(American Type Culture Collection), 또는 상업적인 공급원으로부터의 것으로부터 취득될 수 있다.

[0224] 시험관내, 생체의 및/또는 생체내에서 본 발명의 키메라 단백질을 제조하기 위해서 사용될 수 있는 세포는, 비제한적으로, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포, 섬유모세포, 근육 세포, 간세포; 혈액 세포, 예컨대, T 림프구, B 림프구, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거핵구, 과립구; 다양한 줄기 또는 전구체 세포, 특히 조혈 줄기 또는 전구체 세포(예를 들어, 골수로부터 취득되는 것과 같음), 제대혈, 말초 혈액, 태아 간 등을 포함한다. 세포 유형의 선택은 치료하거나 하는 또는 예방하고자 종양 또는 감염성 질환의 유형에 따라 달라지고, 관련 분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.

[0225] Fc-함유 마크로분자(예컨대, 단클론성 항체)의 생산 및 정제는 표준화 공정이며, 생성물에 따라서 약간 변형된다. 예를 들어, 다수의 Fc 함유 마크로분자를 인간 배아 신장(HEK) 세포(또는 이의 변이체) 또는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(또는 이의 변이체)에 의해서 또는 일부 경우에는 박테리아 또는 합성 방법에 의해서 생산한다. 생산 이후에, HEK 또는 CHO 세포에 의해서 분비된 Fc 함유 마크로분자를 단백질 A 칼럼에 대한 결합을 통해서 정제하고, 그 다음 다양한 방법을 사용하여 '폴리싱(polishing)'한다. 일반적으로, 정제된 Fc 함유 마크로분자를 일정 시간 기간 동안 액체 형태로 저장하거나, 연장된 시간 기간 동안 동결시키거나, 또는 일부 경우에는 동결건조시킨다. 실시형태에서, 본 발명에서 고려되는 키메라 단백질의 생산은 전통적인 Fc 함유 마크로분자와 비교할 때 고유한 특징을 가질 수 있다. 특정 예에서, 키메라 단백질은 특정 크로마토그래피 수지를 사용하거나 또는 단백질 A 포획에 좌우되지 않는 크로마토그래피 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 올리고머 상태 또는 다수의 올리고머 상태로 정제될 수 있고, 특정 방법을 사용하여 특정 올리고머 상태가 풍부해질 수 있다. 이론에 얽매이지 않음은 아니지만, 이러한 방법은 명시된 염 농도, pH 및 부가적 조성물을 포함하는 특정 완충제로의 처리를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 이러한 방법은 나머지 것보다 하나의 올리고머 상태를 선호하는 처리를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 취득된 키메라 단백질은 관련 기술 분야에 명시된 방법을 사용하여 추가로 "폴리싱"될 수 있다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 고도로 안정적이며, 광범위한 pH 노출(pH 3 내지 12)을 용인할 수 있고, 다수의 동결/해동 스트레스(3회 초과 동결/해동 사이클)를 용인할 수 있고, 고온에서 연장된 인큐베이션(40℃에서 2주 이상)을 용인할 수 있다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 이러한 스트레스 조건 하에서 열화, 탈아미드화 등의 증거 없이 손상되지 않고 유지되는 것으로 보인다.

[0226] **대상체 및/또는 동물**

[0227] 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 포유류, 예를 들어 인간, 마우스, 랫트, 기니피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 토끼, 양 또는 비인간 영장류, 예컨대, 원숭이, 침팬지 또는 개코원숭이이다. 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 비포유동물, 예를 들어 제브라피시이다. 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 (예를 들어, GFP를 사용하여) 형광성으로 태그화된 세포를 포함할 수 있다. 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 형질전환 동물은 형광성 세포를 포함하는 트랜스제닉 동물이다.

[0228] 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 인간이다. 실시형태에서, 인간은 소아 인간이다. 실시형태에서, 인간은 성인 인간이다. 실시형태에서, 인간은 노인 인간이다. 실시형태에서, 인간은 환자라고 지칭될 수 있다.

[0229] 특정 실시형태에서, 인간은 약 0개월 내지 약 6개월, 약 6 내지 약 12개월, 약 6 내지 약 18개월, 약 18 내지 약 36개월, 약 1세 내지 약 5세, 약 5 내지 약 10세, 약 10 내지 약 15세, 약 15 내지 약 20세, 약 20 내지 약 25세, 약 25 내지 약 30세, 약 30 내지 약 35세, 약 35 내지 약 40세, 약 40 내지 약 45세, 약 45 내지 약 50세, 약 50 내지 약 55세, 약 55 내지 약 60세, 약 60 내지 약 65세, 약 65 내지 약 70세, 약 70 내지 약 75세, 약 75 내지 약 80세, 약 80 내지 약 85세, 약 85 내지 약 90세, 약 90 내지 약 95세 또는 약 95 내지 약 100세 범위의 연령이다.

- [0230] 실시형태에서, 대상체는 비인간 동물이고, 따라서 본 발명은 수의학적 용도에 관한 것이다. 구체적인 실시형태에서, 비인간 동물은 애완동물이다. 또 다른 구체적인 실시형태에서, 비인간 동물은 가축 동물이다.
- [0231] **키트**
- [0232] 본 발명은 본 명세서에 기술된 임의의 작용제의 투여를 단순화할 수 있는 키트를 제공한다. 본 발명의 예시적인 키트는 단위 투여형으로 본 명세서에 기술된 임의의 조성물을 포함한다. 일 실시형태에서, 단위 투여형은 본 명세서에 기술된 임의의 작용제 및 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 비히클을 함유하는 용기, 예컨대, 멸균일 수 있는 사전-충전 주사기이다. 키트는 본 명세서에 기술된 임의의 작용제의 사용을 지시하는 레이블 또는 인쇄된 지시서를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 또한 뚜껑 검경, 국소 마취제 및 투여 위치를 위한 세정제를 포함할 수 있다. 키트는 본 명세서에 기술된 1종 이상의 추가 작용제를 또한 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 키트는 유효량의 본 발명의 조성물 및 유효량의 또 다른 조성물, 예컨대, 본 명세서에 기술된 것을 함유하는 용기를 포함한다.
- [0233] 본 명세서에 기술된 임의의 양상 또는 실시형태는 본 명세서에 개시된 바와 같은 임의의 다른 양상 또는 실시형태와 조합될 수 있다.
- [0234] 본 발명을 하기 실시예에 의해서 추가로 기술할 것이며, 이는 청구범위에 기술된 본 발명의 범주를 제한하지 않는다.
- [0235] **실시예**
- [0236] *실시예 1: TIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질의 특징규명*
- [0237] 본 실시예에서, TIGIT 및 OX40L 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 생화학적으로 그리고 기능적으로 특징규명하였다.
- [0238] 퓨린 TIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질 및 인간 TIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질을 제조하였고; 이의 개략도를 **도 3A** 및 **도 3B**의 상단에 나타낸다. mTIGIT-Fc-OX40L 및 hTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질을 환원 조건 하에서, N+0 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개시켰다. mTIGIT-Fc-OX40L 및 hTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질의 웨스턴 블롯은, 비환원 라인(**도 3A** 및 **도 3B**, 각각의 블롯에서 라인 2)에서 우세한 이량체 밴드의 존재를 나타내었는데, 이것은 환원제, β -머캅토에탄올의 존재 하에서 글리코실화된 단량체 밴드로 환원되었다(**도 3A** 및 **도 3B**, 각각의 블롯에서 라인 3). **도 3A** 및 **도 3B**, 각각의 블롯에서 라인 3에 나타난 바와 같이, 키메라 단백질을 환원제(β -머캅토에탄올) 및 엔도글리코시다제(PNGase) 둘 다의 존재 하에서 단량체로서 전개되었다.
- [0239] 이어서, mTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질 및 hTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질의 결합 능력을 검정하였다. 각각의 키메라 단백질에 대해서, ELISA를 하기 조건 하에서 수행하였다: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(**도 4A** 및 **도 4B**, 좌측 상단), CD155/PVR-His를 포획하고, IgG로 검출하였고(**도 4A** 및 **도 4B**, 우측 상단), OX40-His를 포획하고, mOX40L에 지향되는 항체로 검출하였다(**도 4A** 및 **도 4B**, 좌측 하단). mTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질은 OX40-Fc 포획되었고, 제조함 CD155로 검출되었으며(**도 4A**, 우측 하단, "이중 ELISA"), hTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질은 OX40-Fc 포획되었고, 제조함 CD155, CD112 또는 CD113 단백질로 검출되었다(**도 4A**, 우측 하단, "이중 ELISA"). 이러한 데이터는, mTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질 및 hTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질이 이의 표적 각각에 결합하고, 두 표적 모두에 동시에 결합할 수 있음을 나타낸다.
- [0240] mTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질이 살아 있는 세포의 표면 상의 이의 표적에 결합할 수 있는지를 결정하기 위해서 추가 분석을 수행하였다. 인간 PVR을 과발현하도록 세포주를 생성시켰는데(즉, CHOK1/PVR); 이 세포는 TIGIT-함유 작제물의 세포막-연관 PVR에 대한 결합을 검출하기에 유용하다(**도 5A** 참고). 넥틴-2를 과발현하도록 세포주를 생성시켰는데(즉, CHOK1/넥틴2); 이 세포는 TIGIT-함유 작제물의 세포막-연관 넥틴 2에 대한 결합을 검출하기에 유용하다(**도 5B** 참고). 넥틴-3을 과발현하도록 세포주를 생성시켰는데(즉, CHOK1/넥틴3); 이 세포는 TIGIT-함유 작제물의 세포막-연관 넥틴 3에 대한 결합을 검출하기에 유용하다(**도 5C** 참고). mOX40을 과발현하는 또 다른 세포주를 제조하였다(즉, CHOK1-mOX40). 세포주 각각은 중국 햄스터 난소 K1(CHOK1)을 기반으로 하였다.
- [0241] mTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질 또는 mPD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질을 모체 및 과발현 세포주와 함께 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 수집하고, 세척하고, 유세포 분석법에 의한 키메라 단백질 결합의 검출을 위해서 항체로 염색하였다. **도 6**(좌측 및 우측 하단)에 나타난 바와 같이 그리고 예측된 바와 같이, 키메라 단백질은

키메라 단백질의 어떠한 농도에서도 모체 세포주에 결합하지 않았다. 그러나, mTIGIT-Fc-OX40L은 CHOK1/PVR 조작된 세포주에 농도 의존적인 방식으로 결합하였는데; 이 데이터를 기초로 4.634nM의 EC₅₀ 값이 계산되었다(도 6(좌측 상단) 참고). 이에 반해서, mPD-1-Fc-OX40L은 어떠한 조작된 세포주에서 결합하지 않았다. CHOK1/PVR 조작된 세포주에서와 같이, mTIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질은 또한 CHOK1-mOX40 세포주에 농도 의존적인 방식으로 결합하였는데; 이 데이터를 기초로 1.7nM의 EC₅₀ 값이 계산되었다(도 6(우측) 참고). 이러한 데이터는, 키메라 단백질의 상이한 구성성분이 각각 살아있는 세포 상의 이의 각각의 수용체/리간드에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0242] 다음으로 마이크로어레이 스크린을 수행하여 hTIGIT-Fc-OX40L의 추가 결합 파트너를 식별하였다. 도 7은 (약 6,000종의 인간 막 단백질을 함유하는) 마이크로어레이로부터의 hTIGIT-Fc-OX40L의 식별된 결합 파트너를 나타낸 결과의 표이다. hTIGIT-Fc-OX40L에 대한 각각의 예측된 결합 파트너를 스크린에 의해서 식별하였다. 다른 인간 단백질에 대한 비특이적 결합의 증거는 존재하지 않았고, 갈렉틴-1에 대한 결합이 모든 Fc-함유 융합 단백질에 대한 스크린에서 인지된다.

[0243] 실시예 2: CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 특징규명

[0244] 본 실시예에서, LIGHT 및 CD172a(SIRP α) 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 생화학적으로 그리고 기능적으로 특징규명하였다.

[0245] 무린 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 제조하였고; 이의 개략도를 도 8A 및 도 8B의 상단에 나타낸다. mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 환원 조건 하에서, N+O 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개시켰다. mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯은, 비환원 라인(도 8A 및 도 8B, 각각의 블롯에서 라인 2)에서 우세한 이량체 밴드의 존재를 나타내었는데, 이것은 환원제, β-머캅토에탄올의 존재 하에서 글리코실화된 단량체 밴드로 환원되었다(도 8A 및 도 8B, 각각의 블롯에서 라인 3). 도 8A 및 도 8B, 각각의 블롯에서 라인 3에 나타난 바와 같이, 키메라 단백질을 환원제(β-머캅토에탄올) 및 엔도글리코시다제(PNGase) 둘 다의 존재 하에서 단량체로서 전개되었다.

[0246] 이어서, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 결합 능력을 검정하였다. 각각의 키메라 단백질에 대해서, ELISA를 하기 조건 하에서 수행하였다: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(도 9A 및 도 9B, 좌측 상단), CD47-His를 포획하고, IgG로 검출하였고(도 9A 및 도 9B, 우측 상단), 무린 LTBR-His를 포획하고, 무린 LIGHT에 지향되는 항체로 검출하였고(도 9A, 좌측 하단) 또는 인간 LTBR-His를 포획하고, 인간 LIGHT에 지향되는 항체로 검출하였고(도 9B, 좌측 하단), LTBR His+GST를 포획하고, SIRP α에 지향되는 항체로 검출하였다(도 9A 및 도 9B, 우측 하단, "이중 ELISA"). 이러한 데이터는, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질이 이의 표적 각각에 결합하고, 두 표적 모두에 동시에 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0247] mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질이 살아 있는 세포의 표면 상의 이의 표적에 결합할 수 있는지를 결정하기 위해서 추가 분석을 수행하였다. 무린 CD47을 발현하는 CHO-K1 세포(도 10A, 좌측) 또는 무린 LTbR을 발현하는 CHO-K1 세포(도 10A, 우측)를 제조하였다.

[0248] mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 모체 및 과발현 세포주와 함께 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 수집하고, 세척하고, 유세포 분석법에 의한 키메라 단백질 결합의 검출을 위해서 항체로 염색하였다. 도 10A(좌측)에 나타난 바와 같이 그리고 예측된 바와 같이, 키메라 단백질은 키메라 단백질의 어떠한 농도에서도 모체 세포주에 결합하지 않았다. 그러나, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT는 mCD47 조작된 세포주(도 10A, 좌측) 및 mLtBR 조작된 세포주(도 10A, 우측)에 농도 의존적인 방식으로 결합하였고; 이러한 데이터를 기초로 18nM의 CD47에 대한 EC₅₀ 값 및 24nM의 mCD172a(SIRP α)에 대한 값이 계산되었다. 추가로, hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 mCD47 과발현 세포주와 함께 인큐베이션시켰다. hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT는 mCD47 조작된 세포주(도 10B)에 농도 의존적인 방식으로 결합하였고; 이러한 데이터를 기초로 57nM의 EC₅₀ 값이 계산되었다. 이러한 데이터는, 키메라 단백질의 상이한 구성성분이 각각 살아있는 세포 상의 이의 각각의 수용체/리간드에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0249] 이어서, 적혈구에 결합하는 인간 TIGIT-Fc-OX40L 키메라 단백질의 무능력, 및 이로 인한 용혈 유발을 시험하였다. 여기서, hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40, 또는 CD47 특이적 항체(클론 CC2C6 또는

CC900002)를 시노몰거스 마카크 적혈구(RBC; **도 11a**, 좌측 상단 및 하단) 또는 인간 RBC(**도 11b** 및 **도 11c**, 모든 패널)와 접촉시켰다. 트리톤-X(양성 대조군으로서)로의 처리와 비교할 때, hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40은 시노몰거스 마카크 RBC의 상당한 용해를 유발하지 않았고(**도 11a**, 좌측 하단); 예시적인 플레이트를 나타낸다(**도 11a**, 우측). hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40은 인간 RBC에 유의하게 결합하지 않았다(**도 11b**, 모든 패널). 트리톤-X(양성 대조군으로서)로의 처리와 비교할 때, hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 또는 hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40은 거의 검출 가능하지 않은 수준의 인간 RBC의 용해를 유발하였고(**도 11c**, 모든 패널); 예시적인 플레이트를 나타낸다(**도 11c**, 우측). 이러한 데이터는, hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40이 원치않는 부작용으로서 인간 RBC의 용해를 유발하지 않음을 나타낸다.

[0250] 실시예 3: PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 특징규명

[0251] 본 실시예에서, LIGHT 및 PD-1 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 생화학적으로 그리고 기능적으로 특징규명하였다.

[0252] 무린 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 인간 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 제조하였고; 이의 개략도를 **도 12A** 및 **도 12B**의 상단에 나타낸다. mPD-1-Fc-LIGHT 및 hPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 환원 조건 하에서, N+0 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개시켰다. mPD-1-Fc-LIGHT 및 hPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯은, 비환원 레인(**도 12A** 및 **도 12B**, 각각의 블롯에서 레인 2)에서 우세한 이량체 밴드의 존재를 나타내었는데, 이것은 환원제, β -머캅토에탄올의 존재 하에서 글리코실화된 단량체 밴드로 환원되었다(**도 12A** 및 **도 12B**, 각각의 블롯에서 레인 3). **도 12A** 및 **도 12B**, 각각의 블롯에서 레인 3에 나타난 바와 같이, 키메라 단백질을 환원제(β -머캅토에탄올) 및 엔도글리코시다제(PNGase) 둘 다의 존재 하에서 단량체로서 전개되었다.

[0253] 이어서, mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 hPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 결합 능력을 검정하였다. 각각의 키메라 단백질에 대해서, ELISA를 하기 조건 하에서 수행하였다: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(**도 13A** 및 **도 13B**, 좌측 상단), 무린 LTBR-His를 포획하고, 무린 LIGHT에 지향되는 항체로 검출하였거나(**도 13A**, 우측 상단) 또는 인간 LTBR-His를 포획하고, 바이오틴일화된 인간 LIGHT로 검출하였고(**도 13B**, 우측 상단), mPD-L1을 포획하고, mLIGHT에 지향되는 항체로 검출하였거나(**도 13A**, 좌측 하단; "이중 ELISA") 또는 hPD-L1-Fc를 포획하였고, hLTBR-His/6x His-HRP로 검출하였다(**도 13A**, 좌측 하단; "이중 ELISA"). 이러한 데이터는, mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 hPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질이 이의 표적 각각에 결합하고, 두 표적 모두에 동시에 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0254] 무린 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질(**도 14A**) 또는 인간 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질(**도 14A**)이 살아있는 세포의 표면의 이의 표적에 결합할 수 있는지를 결정하기 위해서 추가적인 분석을 수행하였다. 무린 mPD-L1을 발현하는 CHO-K1 세포(**도 14A**, 좌측) 또는 무린 LTbR을 발현하는 CHO-K1 세포(**도 14A**, 우측) 및 인간 mPD-L1을 발현하는 CHO-K1 세포(**도 14B**, 좌측)를 제조하였다. mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 모체 및 과발현 세포주와 함께 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 수집하고, 세척하고, 유세포 분석법에 의한 키메라 단백질 결합의 검출을 위해서 항체로 염색하였다. **도 14A**(좌측 및 우측)에 나타난 바와 같이 그리고 예측된 바와 같이, mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질은 키메라 단백질의 어떠한 농도에서도 모체 세포주에 결합하지 않았다. 그러나, mPD-1-Fc-LIGHT는 mPD-L1 조작된 세포주(**도 14A**, 좌측) 및 mLTbR 조작된 세포주(**도 14A**, 우측)에 농도 의존적인 방식으로 결합하였다. 추가로, hPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 hPD-L1 과발현 세포주와 함께 인큐베이션시켰다. hPD-1-Fc-LIGHT는 hPD-L1 조작된 세포주(**도 14B**)에 농도 의존적인 방식으로 결합하였고; 이러한 데이터를 기초로 48nM의 EC₅₀ 값이 계산되었다. 이러한 데이터는, 키메라 단백질의 상이한 구성성분이 각각 살아있는 세포 상의 이의 각각의 수용체/리간드에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0255] 실시예 4: TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 특징규명

[0256] 본 실시예에서, TIGIT 및 LIGHT 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 생화학적으로 그리고 기능적으로 특징규명하였다.

[0257] 무린 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 인간 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 제조하였고; 이의 개략도를 **도 15A** 및 **도 15B**의 상단에 나타낸다. mTIGIT-Fc-LIGHT 및 hTIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 환원 조건 하에서, N+0 탈글리코실화 효소로 처리한 후 및/또는 비등 후 SDS-PAGE 상에서 전개시켰다. mTIGIT-Fc-LIGHT 및 hTIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 웨스턴 블롯은, 비환원 레인(**도 15A** 및 **도 15B**, 각각의 블롯에서 레인 2)에서

우세한 이량체 밴드의 존재를 나타내었는데, 이것은 환원제, β -머캅토에탄올의 존재 하에서 글리코실화된 단량체 밴드로 환원되었다(도 15A 및 도 15B, 각각의 블롯에서 라인 3). 도 15A 및 도 15B, 각각의 블롯에서 라인 3에 나타난 바와 같이, 키메라 단백질을 환원제(β -머캅토에탄올) 및 엔도글리코시다제(PNGase) 둘 다의 존재 하에서 단량체로서 전개되었다.

[0258] 이어서, mTIGIT-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 hTIGIT-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 결합 능력을 검정하였다. 각각의 키메라 단백질에 대해서, ELISA를 하기 조건 하에서 수행하였다: 중쇄+경쇄를 포획하고, Fc-HRP로 검출하였고(도 16A 및 도 16B, 좌측 상단), CD155/PVR을 포획하고, Fc-HRP로 검출하였거나(도 16A, 우측 상단) 또는 CD155-His를 포획하고, 검출하였고(도 16B, 우측 상단), mLtBR-His를 포획하고, mLIGHT에 지향되는 항체로 검출하였거나(도 16A, 좌측 하단) 또는 hCD155-Fc를 포획하고, hLTBR-His/6x His-HRP로 검출하였다(도 16B, 좌측 하단; "이중 ELISA"). 이러한 데이터는, mTIGIT-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 hTIGIT-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질이 이의 표적 각각에 결합하고, 적어도 hTIGIT-1-Fc-LIGHT는 표적 모두에 동시에 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0259] 무린 TIGIT-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질(도 17)이 살아있는 세포의 표면의 이의 표적에 결합할 수 있는지를 결정하기 위해서 추가적인 분석을 수행하였다.

[0260] mTIGIT-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질 또는 mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 무린 PVR을 발현하거나 또는 무린 벡틴-2를 발현하는 CHO-K1 세포(도 17, 좌측 상단), 무린 LtBr을 발현하는 CHO-K1 세포(도 17A, 우측), 또는 모체 CHO-K1 세포(도 17, 우측 및 좌측 하단)와 인큐베이션시켰다.

[0261] 도 17(좌측 하단)에 나타난 바와 같이 그리고 예측된 바와 같이, mTIGIT-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질 및 mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질은, 키메라 단백질의 최고 농도를 제외하고, 모체 세포주에 결합하지 않았다. 그러나, mTIGIT-1-Fc-LIGHT는 mPVR 조작된 세포주에 농도 의존적인 방식으로 결합하였는데; 이러한 데이터를 기초로 214.9nM의 EC_{50} 값이 계산되었다(도 17, 좌측 상단). mTIGIT-1-Fc-LIGHT은 또한 mLtBr 조작된 세포주에 농도 의존적인 방식으로 결합하였는데; 이러한 데이터를 기초로 11nM의 EC_{50} 값이 계산되었다(도 17, 우측). 이러한 데이터는, 키메라 단백질의 상이한 구성성분이 각각 살아있는 세포 상의 이의 각각의 수용체/리간드에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0262] 실시예 5: 키메라 단백질의 추가 특징규명

[0263] 본 실시예에서, 인간 TIGIT-Fc-LIGHT, 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, 인간 PD-1-Fc-LIGHT, 무린 PD-1-Fc-LIGHT, 인간 TIGIT-Fc-OX40L, 인간 TIGIT-Fc-LIGHT, 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 키메라 단백질을 사용하여 추가 실험을 수행하였다.

[0264] 인간 LtBr에 대한 인간 TIGIT-Fc-LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, 또는 PD-1-Fc-LIGHT의 결합 친화도 측정치를 옥텟 시스템을 사용하여 생물층 간섭계법에 의해서 수집하였다(도 18A, 모든 패널 참고). 다양한 농도에 걸친 재조합 인간 PD-L1 또는 PD-L2에 대한 인간 PD-1-Fc-LIGHT의 결합 친화도 측정치를 옥텟 시스템을 사용하여 생물층 간섭계법에 의해서 수집하였다(도 18B 참고).

[0265] 재조합 인간 CD155/PVR에 대한 인간 TIGIT-Fc-OX40L 및 TIGIT-Fc-LIGHT의 결합 친화도 측정치(일측 TIGIT-Fc 융합 단백질 대조군과 비교함)를 옥텟 시스템을 사용하여 생물층 간섭계법에 의해서 수집하였다(도 19A 참고). 재조합 인간 CD47에 대한 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT의 결합 친화도 측정치(단일 측 CD172a(SIRP α)-Fc 대조군, 또는 두 CD47 특이적인 항체 대조군 중 하나와 비교함)를 옥텟 시스템을 사용하여 생물층 간섭계법에 의해서 수집하였다(도 19B 참고). 재조합 인간 PD-L1에 대한 인간 PD-1-Fc-LIGHT의 결합 친화도 측정치(단일 측 PD-1-Fc 대조군 또는 항-PD-L1 대조군: 아테졸리주매파와 비교함)를 옥텟 시스템을 사용하여 생물층 간섭계법에 의해서 수집하였다(도 19C 참고). 재조합 인간 LtBr에 대한 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT, 또는 PD-1-Fc-LIGHT의 결합 친화도 측정치(단일 측 LIGHT-Fc 융합 단백질 대조군 또는 항-LtBr 항체와 비교함)를 옥텟 시스템을 사용하여 생물층 간섭계법에 의해서 수집하였다(도 19D 참고).

[0266] LIGHT 도메인-함유 키메라 단백질 또는 TIGIT 도메인-함유 키메라 단백질의 기능성 능력을 슈퍼항원 사이토카인 방출 검정으로 결정하였다. 여기서, 스타필로코쿠스 엔테로톡신 B(SEB)의 증가하는 농도를 사용하여 다양한 시험 작용제의 존재 하에서 인간 말초 혈액 백혈구를 활성화시켰다. 배양 상청액으로 분비되는 IL-2(도 20a) 또는 TNF α (도 20b)의 양을, 억제성 신호전달 사건을 차단하거나 또는 면역 활성화 신호를 공자극하는 시험 작용제의 능력의 기능성 판독치로서 모니터링하였다.

[0267] 도 20a 및 도 20b는 SEB에 의해서 활성화된 무린 말초 혈액 백혈구에 대한 다양한 항체, 무린 TIGIT-Fc-OX40L,

뮤린 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, 뮤린 TIGIT-Fc-LIGHT 및 뮤린 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 효과를 입증하는 슈퍼항원 사이토카인 방출 검정을 나타낸다. 도 20c는 다양한 슈퍼항원(SEB) 농도에 걸친 데이터의 편집을 나타낸다. 도 20a 및 도 20c에 나타난 바와 같이, 50 및 200ng/ml의 SEB가 투여되는 경우, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT 및 mPD-1-Fc-LIGHT에 대한 3가지의 농도 각각(10nM, 100nM, 및 250nM)은 모든 항체 대조군보다 상당히 더 많은 IL2의 분비를 제공하였다. 도 20b에 나타난 바와 같이, 50 및 200ng/ml의 SEB가 투여되는 경우, 100nm 또는 250nm 농도에서, mPD-1-Fc-LIGHT는 모든 항체 대조군보다 상당히 더 많은 TNF α 의 분비를 제공하였고; 200ng/ml의 SEB가 투여되는 경우, 모든 3가지 농도의 mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT는 모든 항체 대조군보다 상당히 더 많은 TNF α 의 분비를 제공하였다.

[0268] 더욱이, 도 21A 내지 도 21C는 SEB에 의해서 활성화된 인간 말초 혈액 백혈구에 대한 다양한 항체, 인간 TIGIT-Fc-LIGHT(도 21A), 인간 TIGIT-Fc-OX40L(도 21B), 인간 PD-1-Fc-LIGHT, 및 인간 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT(도 21C) 키메라 단백질의 효과를 입증하는 슈퍼항원 사이토카인 방출 검정을 나타낸다.

[0269] 따라서, 상기 데이터는, 본 명세서에 기술된 바와 같은 LIGHT 도메인-함유 키메라 단백질 및 TIGIT 도메인-함유 키메라 단백질이 이의 3종의 결합 파트너 각각에 결합할 수 있고; 이들은 1차 인간 백혈구 세포를 시험관내에서 기능적으로 활성화시킨다는 것을 입증한다.

[0270] 실시예 6: 키메라 단백질로의 처리로부터의 개선된 종양 사멸 및 증가된 생존

[0271] 뮤린 TIGIT-Fc-OX40L, 뮤린 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, 뮤린 TIGIT-Fc-LIGHT, 및 뮤린 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질의 생체내 항종양 활성도를 CT26 마우스 결장직장 종양 모델을 사용하여 분석하였다. 하나의 실험 세트에서, Balb/c 마우스를 CT26 종양으로 접종하였다. 종양이 4 내지 5mm의 직경에 도달했을 때, 마우스를 mTIGIT-Fc-OX40L, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, mTIGIT-Fc-LIGHT, 및 mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질 또는 항-TIGIT, 항-CD47, 항-OX40, 또는 항-PD-1 항체 또는 항-TIGIT와 항-OX40 항체의 조합물로 처리하였다.

[0272] 각각의 처리군에 대한 종양 성장을 도 22A(좌측 및 우측 패널)에 나타난 바와 같이 평가하였다. 구체적으로, 미처리 마우스는 종양이 신속하게 발달하였고, 항체 또는 항체들로의 처리는 종양의 발달을 약간 지연시키는 것으로 보였다. 이에 반해서, 마우스를 mTIGIT-Fc-OX40L, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, mTIGIT-Fc-LIGHT, 또는 mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질로 처리하는 것은 종양의 성장을 상당히 저해하였고/거나 종양의 발달을 지연시켰다.

[0273] 종양 접종 주 40일 전체에서 마우스의 전체 생존 백분율을 또한 평가하였다. 미처리 마우스 모두는 종양 접종 후 20일 이내에 사망하였고, 항체 또는 항체들 처리된 마우스는 25%를 초과하는 40일 생존 백분율을 가졌다(도 22B, 좌측 패널 참고). 유의하게, mTIGIT-Fc-OX40L, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, mTIGIT-Fc-LIGHT, 또는 mPD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질로 처리된 모든 마우스는 종양 접종 후 40일을 지나서까지 생존하였다(도 22B 참고, 우측 패널).

[0274] 이러한 데이터는, TIGIT-Fc-OX40L, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT, 또는 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질로의 생체내 처리가 종양 성장을 저해하고, 생존을 개선시킴을 나타낸다.

[0275] 실시예 7: 키메라 단백질의 기능성에 대한, 링커 내의 Fc 도메인의 기여의 특징규명

[0276] 본 실시예에서, 본 발명의 키메라 단백질의 기능성에 대한, 링커 내의 Fc 도메인의 기여를 검정하였다. 여기서, PD-1-Fc-OX40L을 Fc-함유 키메라 단백질에 대한 모델로서 사용하였다. 따라서, 하기에 나타난 데이터는 본 발명의 키메라 단백질과 관련된다.

[0277] 이의 네이티브 상태에서, PD-1은 단량체로서 존재하는 반면, OX40은 OX40 도메인들 간의 정전기적 상호작용으로 인해서 이량체화되는 경향이 있고; Fc 도메인은 다이설파이드 결합을 통해서, 예를 들어, 이의 시스테인 잔기(들)를 통해서 서로와 회합된다. 함께, 몇몇 분자간 상호작용이 PD-1-Fc-OX40L의 4차 구조에 기여할 수 있다. PD-1-Fc-OX40L의 적어도 4가지의 가능한 구성이 존재하는데, 키메라 단백질은 단량체, 이량체, 삼량체 또는 육량체로서 존재한다(도 23 참고).

[0278] 키메라 단백질을 환원 및 비환원 조건에 노출시키고, 이어서 단백질을 SDS-PAGE 상에서 전개시킴으로써 키메라 단백질의 단량체 및 이량체 구성의 존재를 시험하였다. 비환원 조건(환원: "-") 하에서, 키메라 단백질은 SDS-PAGE에서, 약 200kDa으로 이동하였다. 여기서, 웨스턴 블롯을 각각 도 24에 나타난 좌측, 중간 및 우측 블롯에서, PD-1, Fc, 또는 OX40에 대해서 지향되는 항체로 프로빙하였다. 키메라 단백질의 예측된 단량체 분자량은 57.6kDa이기 때문에, 200kDa 종은 적어도 이량체인 것으로 예측되었다. 그러나, (예를 들어, Fc 도메인 간의) 다이설파이드 결합을 환원시키는 환원 조건(환원: "+") 하에서, 키메라 단백질은 SDS-PAGE에서 약 100kDa으로

이동하였다. 100kDa 종은 예상된 것보다 더 무겁기 때문에, 추가 질량은 글리코실화로 인한 것이라고 예측되었다. 마지막으로, 키메라 단백질을 펩타이드-N-글리코시다제 F로 처리하였고(PNGaseF "+"), 환원 조건 하에서 SDS-PAGE 상에서 전개시켰다. 이러한 조건 하에서, 키메라 단백질은 약 57.6kDa으로 이동되었다. 이러한 데이터는, 키메라 단백질이 글리코실화되고, 자연에서 적어도 이량체로서 존재하는데; 이량체화는 예를 들어, 이의 시스테인 잔기(들)를 통한, Fc 도메인들 간의 다이설파이드 결합으로 인한 것이라는 것을 시사한다.

[0279] SDS-PAGE 젤 방법은 상당히 하전되고/되거나 큰 분자량 단백질에 대해서 분자량을 정확하게 예측하지 않는다. 따라서, 키메라 단백질을 그 다음에 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 특징규명하였다. 옴으로 하전된 SDS가 펩타이드들 간의 전하-기반 상호작용을 감소시키는 SDS-PAGE와 달리, SEC는 세정제 또는 환원제를 사용하지 않는다. PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질을 SEC 상에서 전개시키는 경우, 피크 중 어느 것도 200kDa 근처에 존재하지 않았다. 이는, 본래, 키메라 단백질이 이량체로서 존재하지 않음을 시사한다. 대신, 670kDa을 초과하는 크기를 갖는 피크가 검출되었다(도 25 참고). 이러한 데이터 및 이전 데이터는, PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질이 이의 본래 상태에서 육량체로서 존재한다는 것을 시사한다.

[0280] 상기에 나타난 바와 같이, 비환원 조건 또는 환원 조건 하에서 SDS-PAGE 상에서 전개시키는 경우, 샘플 및/또는 전개 완충액에서 SDS는 육량체 PD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질을 환원제의 부재 및 존재 하에서 각각 우세한 이량체 또는 단량체로 전환시킨다(도 26 참고(좌측 젤)). 환원제의 부재 하에서 SDS이 결핍된 네이티브 PAGE 상에서 전개시키는 경우, 키메라 단백질은 육량체로서 존재한다. 그러나, 네이티브 PAGE 상에서 환원제(이것은 다이설파이드 결합을 환원시킴)의 존재 하에서 전개시키는 경우, 키메라 단백질은 예상된 것보다 더 무겁게 이동되었는데; 도 26(우측 젤, 라인 2)에 나타난 바와 같이, 키메라 단백질은 적재 웰로부터 실질적으로 이동하지 않았다. 이러한 데이터는, 키메라 단백질이 고차 단백질로 올리고머화되었다는 것을 시사한다. 따라서, 키메라 단백질에서, 다이설파이드 결합이 고차 올리고머화의 제어에 중요한 것으로 보인다.

[0281] 이를 추가로 확인하기 위해서, Fc 도메인이 결핍된 키메라 단백질, 예를 들어, "PD-1-No Fc-OX40L"을 작제하였다. 이러한 키메라 단백질은 상기에 기술된 바와 같이 키메라 단백질에서 Fc 도메인 간에 발생한 다이설파이드 결합을 갖지 않을 것이다. 도 27에 나타난 바와 같이, Fc 도메인이 결핍된 키메라 단백질을 네이티브 PAGE 상에서 전개시키는 경우, 단백질 중 어느 것도 이의 적재 웰로부터 실질적으로 이동하지 않았는데; 이는 다시 "No Fc" 키메라 단백질이 다수의 단백질을 포함하는 콘카티머-유사 복합체를 형성하였다는 것을 시사한다. 따라서, Fc 도메인의 누락은, 키메라 단백질이 단백질 응집물의 형성으로 이어진다. 이러한 데이터는, 예를 들어, 상이한 키메라 단백질 상의 Fc 도메인 간의 다이설파이드 결합이 키메라 단백질을 안정화시키고, 이것은 각각 고차 단백질/콘카티머로서가 아니라 육량체로서 존재하는 것을 보장한다는 것을 나타낸다. 즉, Fc 도메인은 놀랍게도 키메라 단백질 복합체를 유발한다. 라인 1 내지 4 각각은 2.5 μ g의 PD-1-No Fc-OX40L, 5 μ g의 PD-1-No Fc-OX40L, 2.5 μ g의 PD-1-No Fc-OX40L, 및 5 μ g의 PD-1-No Fc-OX40L을 포함한다.

[0282] 도 28에 상기 데이터를 요약하고, 육량체 및 콘카타머가 본 발명의 키메라 단백질로부터 형성되는 방법을 나타낸 모델을 나타낸다. 예시적인 키메라 단백질(PD-1-Fc-OX40L)은 본래 육량체로 형성된다(OX40L 도메인들 간의 정전기적 상호작용 및 Fc 도메인에 의한 이량체화로 인해서). 그러나, Fc 도메인들 간의 다이설파이드 결합의 제어 효과의 부재 하에서는, PD-1-Fc-OX40L 단백질의 경우 환원 조건 하에서 그리고 PD-1-No Fc-OX40L에서의 Fc 도메인의 부재로 인해서, 이러한 후자 키메라 단백질은 콘카타머를 형성한다.

[0283] 추가로, Fc 도메인(본 명세서에 기술된 바와 같음)을 피콜린(Ficolin)(이것은 키메라 단백질 간의 다이설파이드 결합에 필요한 시스테인 잔기가 결핍됨)으로 대체한 키메라 단백질을 작제하였다. No Fc 키메라 단백질 및 Fc를 포함하고, 네이티브 PAGE 상에서 환원제의 존재 하에서 전개된 키메라 단백질(이들 둘 다는 젤에서 이동하지 않는 응집물을 형성하였음)에서와 같이 피콜린을 포함하는 키메라 단백질은 고차 격자를 또한 형성하는 것으로 보이며, 이것은 젤에서 이동하지 않았다. 이러한 데이터는, 다이설파이드 결합이 본 발명의 키메라 단백질의 적절한 폴딩 및 기능에 중요하다는 결론을 지지한다.

[0284] 마지막으로, 코일형(coiled) Fc 도메인(CCDFc)을 사용하여 키메라 단백질을 제조하였다. 매우 적은 정제되지 않은 단백질을 기능성 평가 하에서 전달하였다.

[0285] 따라서, 키메라 단백질의 링커 내에 Fc 도메인을 포함시키는 것은(이것은 키메라 단백질 사이에 다이설파이드 결합을 형성할 수 있음), 불용성 및 가능하게는 비기능성 단백질 콘카타머 및/또는 응집물의 형성을 회피하는 것을 돕는다.

[0286] 실시예 8: 키메라 단백질에 대한 상이한 접합 링커 서열의 특징규명

[0287] 다양한 특징(길이, 용해도, 전하 및 가요성)을 갖는 상이한 고유한 접합 링커 서열(17종의 링커)을 식별하였다. 이어서 이들 17종의 접합 링커 서열 각각을 '링커 2' 위치에 혼입시켜 작제물을 합성하였는데, 여기서 키메라 단백질의 구성은 하기와 같다:

[0288] ECD 1 - 접합 링커 1 - Fc - 접합 링커 2 - ECD 2

[0289] 이러한 17종 작제물에 대한 생산 수준을 CHO 세포에서 시험하였다. 하기 표는 상이한 접합 링커 서열에 대한 요약, 이러한 접합 링커의 특징, 생산 수준(A280에 의함), 및 PD-L1 또는 OX40에 대한 FACS 분석을 기초로 한 결합 값(EC₅₀)을 제공한다. 특정 접합 링커 서열 간의 생산 수준 및 활성도의 일부 변화를 결정하였다.

표 2

선택적인 접합 링커 서열에 대한 요약

단백질 명칭	단백질 농도 A280	CHO-PD-L1 EC50 (nM)	HeLa- OX40 EC50 (nM)	접합 링커 2 서열	특징 규명
PD-1_IgG4_OX40L (1)	0.17	27	6	IEGRMD (서열 번호 52)	링커
PD-1_IgG4_OX40L (2)	0.12	23	67	SKYGPPCPPCP (서열 번호 50)	IgG4 힌지 영역
PD-1_IgG4_OX40L (3)	0.15	25	140	GGSGGGGS (서열 번호 55)	가요성
PD-1_IgG4_OX40L (4)	0.11	36	125	GGSGGGGGSG GG (서열 번호 56)	가요성
PD-1_IgG4_OX40L (5)	0.22	25	41	EGKSSGSGSES KST (서열 번호 57)	가요성 + 가용성
PD-1_IgG4_OX40L (6)	0.12	26	171	GGSG (서열 번호 58)	가요성
PD-1_IgG4_OX40L (7)	0.11	27	195	GGSGGGGGGG SG (서열 번호 59)	가요성
PD-1_IgG4_OX40L (8)	0.21	20	48	EAAAKEAAAKE AAAK (서열 번호 60)	강성 알파 나선
PD-1_IgG4_OX40L (9)	0.23	45	87	EAAAREAAARE AAAREAAAR (서열 번호 61)	강성 알파 나선
PD-1_IgG4_OX40L (10)	0.13	52	62	GGGGSGGGGS GGGGSAS (서열 번호 62)	가요성
PD-1_IgG4_OX40L (11)	0.07	25	100	GGGVPRDCG (서열 번호 53)	가요성
PD-1_IgG4_OX40L (12)	0.11	33	70	GGGGAGGGG (서열 번호 63)	가요성
PD-1_IgG4_OX40L (13)	0.12	38	60	GS (서열 번호 64)	상당히 가요성
PD-1_IgG4_OX40L (14)	0.18	25	70	SGSGGS (서열 번호 65)	상당히 가요성
PD-1_IgG4_OX40L (15)	0.19	24	67	SGSGSGSGGS (서열 번호 66)	상당히 가요성
PD-1_IgG4_OX40L (16)	0.11	34	77	GGGGSAS (서열 번호 67)	가요성
PD-1_IgG4_OX40L (17)	0.19	32	44	APAPAPAPAPA PAPAPAPAP (서열 번호 68)	강성

[0290]

[0291] 웨스턴 블롯 분석에 의한 상이한 접합 링커 서열(17종의 링커)을 갖는 PD-1-IgG4-OX40L 키메라 단백질의 특징규명을 도 29A 내지 도 29Q에 나타낸다. 구체적으로, 융합 작제물의 각각의 개별 도메인을 항-PD-1, 항-Fc, 또는 항-OX40L 항체를 사용하여 프로빙하였다. 결과는, 각각의 키메라 단백질에 걸쳐서 유사한 성능을 나타내었고, 이는 후보 접합 링커 서열 모두가 기능성임을 시사하였다.

[0292] 추가로, 상이한 링커 서열을 갖는 각각의 정제된 단백질을 또한 ELISA 검정(도 30), 뿐만 아니라 세포-기반 유세포 분석법 검정(도 31a 내지 도 31p)으로 PD-L1 또는 OX40에 대한 결합에 의해서 특징규명하였다.

- [0293] 실시예 9: 다른 타입 II 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 추가적인 TIGIT-함유 키메라 단백질의 생산
- [0294] 본 실시예에서, 추가적인 본 발명의 키메라 단백질을 기술한다. 이러한 추가적인 키메라 단백질은, TIGIT-Fc-OX40L, TIGIT-Fc-CD40L 또는 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질이 제조된 방법과 유사하게, 예를 들어, 상기 상세한 설명 및 본 출원인의 우선권 미국 특허 제U.S. 62/464,002호에 기술된 바와 같이 제조될 것이다.
- [0295] 이러한 추가적인 키메라 단백질은 하기 일반 화학식을 가질 것이다: ECD 1 - 접합 링커 1 - Fc 도메인 - 접합 링커 2 - ECD 2, 식 중, ECD 1은 TIGIT의 세포외 도메인이고, ECD 2는 CD40L, OX40L 또는 LIGHT가 아닌, 타입 II 단백질의 세포외 도메인이다. 예시적인 타입 II 단백질은 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A 및 TRAIL을 포함한다. 이러한 키메라 단백질은 접합 링커 중 하나 또는 둘 다가 결핍될 수 있다. 예시적인 접합 링커 1s, Fc 도메인, 및 접합 링커 2s를 상기 표 1에 기술하며; 키메라 단백질을 형성하는 데 유용하고, 특정 접합 링커 1s, Fc 도메인, 및 접합 링커 2s를 포함하는 모듈식 링커를 도 32에 나타낸다.
- [0296] 대안적으로, 추가적인 키메라 단백질은 하기 일반 화학식을 갖는 융합 단백질일 것이다: N 말단 - (a) - (b) - (c) - C 말단, 식 중, (a)는 TIGIT이고, (b)는 Fc 도메인의 적어도 일부를 포함하는 링커이고, (c)는 CD40L, OX40L 또는 LIGHT가 아닌, 타입 II 단백질의 세포외 도메인이다. 예시적인 타입 II 단백질은 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A 및 TRAIL을 포함한다. 예시적인 링커를 상기 표 1에 기술하며; 키메라 단백질을 형성하는 데 유용하고, 특정 접합 링커 1s, Fc 도메인, 및 접합 링커 2s를 포함하는 모듈식 링커를 도 32에 나타낸다.
- [0297] 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A 및 TRAIL에 대한 아미노산 서열은 각각 서열번호 12, 26, 30, 15, 18 및 40을 포함한다. 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A 및 TRAIL의 세포외 도메인에 대한 아미노산 서열은 각각 서열번호 13, 27, 31, 16, 19 및 41을 포함한다. TIGIT에 대한 아미노산 서열은 서열번호 9를 포함하고, TIGIT의 세포외 도메인은 서열번호 10을 포함한다. 키메라 단백질은 예를 들어, 상기에 언급된 서열과 적어도 약 95% 동일한 상기에 언급된 서열을 포함할 수 있다.
- [0298] 따라서, 본 발명은 하기 추가적인 키메라 단백질 및 (예를 들어, 암을 치료하고/거나 염증성 질환을 치료하는 데 있어서) 추가적인 키메라 단백질을 사용하는 방법을 추가로 포함한다: TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-CD30L, TIGIT-Fc-FasL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-TL1A 및 TIGIT-Fc-TRAIL.
- [0299] TIGIT-Fc-OX40L, TIGIT-Fc-CD40L 또는 TIGIT-Fc-LIGHT를 특징규명하는 데 필요한 것이 아닌 추가적인 키메라 단백질에 대해서 특이적인 시약(예를 들어, 결합 파트너, 재조합 표적 세포, 및 암 세포/종양 유형)이 존재하지만, 추가적인 키메라 단백질은 실시예 1 내지 8에서 TIGIT-Fc-OX40L, TIGIT-Fc-CD40L, 또는 TIGIT-Fc-LIGHT에 대해서 상기에 기술된 바와 같이 특징규명될 것이다. 따라서, 예로서, TIGIT-Fc-4-1BBL 및 TIGIT-Fc-CD40L을 사용하는 경우, 실시예 1과 유사한 TIGIT-Fc-4-1BBL의 특징규명은, TIGIT-Fc-CD40L에 대해서 필요한 항-TIGIT, 항-Fc, 및 항-CD40L 항체가 아니라 항-TIGIT, 항-Fc, 및 항-4-1BBL 항체를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0300] TIGIT-Fc-OX40L, TIGIT-Fc-CD40L, 또는 TIGIT-Fc-LIGHT 키메라 단백질과 같이, 추가적인 키메라 단백질은, TIGIT(이것은 면역 저해 신호의 전달을 저해함)를 차단하고, 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A 및 TRAIL 중 하나의 수용체/리간드의 활성화를 통해서 면역 자극 신호의 전달을 향상, 증가 및/또는 자극함으로써 암을 치료하는 데 그리고/또는 염증성 질환을 치료하는 데 효과적일 것이다. 더욱이, 추가적인 키메라 단백질은, 복수의 항체, 예를 들어, 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL 및 TRAIL 중 하나의 수용체/리간드에 대한 효능제 항체 및 차단 항체를 포함하는 치료로부터, 바람직하지 않은 부작용, 예를 들어, GI 합병증을 유발하지 않고 독성이 없이 암 및/또는 염증성 질환을 치료하는 데 효과적일 것이다.
- [0301] 실시예 10: 다른 타입 I 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 추가적인 LIGHT-함유 키메라 단백질의 생산
- [0302] 본 실시예에서, 추가적인 본 발명의 키메라 단백질을 기술한다. 이러한 추가적인 키메라 단백질은, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT, 또는 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질이 제조된 방법과 유사하게, 예를 들어, 상기 상세한 설명 및 본 출원인의 우선권 미국 특허 제U.S. 62/464,002호에 기술된 바와 같이 제조될 것이다.
- [0303] 이러한 추가적인 키메라 단백질은 하기 일반 화학식을 가질 것이다: ECD 1 - 접합 링커 1 - Fc 도메인 - 접합 링커 2 - ECD 2, 식 중, ECD 1은 CD172a(SIRP α), TIGIT, 또는 PD-1이 아닌 타입 I 단백질의 세포외 도메인이고, ECD 2는 LIGHT의 세포외 도메인이다. 예시적인 타입 I 단백질은 TIM3 및 BTLA를 포함한다. 이러한 키메라 단백질은 접합 링커 중 하나 또는 둘 다가 결핍될 수 있다. 예시적인 접합 링커 1s, Fc 도메인, 및 접합 링커 2s를 상기 표 1에 기술하며; 키메라 단백질을 형성하는 데 유용하고, 특정 접합 링커 1s, Fc 도메인, 및 접합 링커 2s를 포함하는 모듈식 링커를 도 32에 나타낸다.

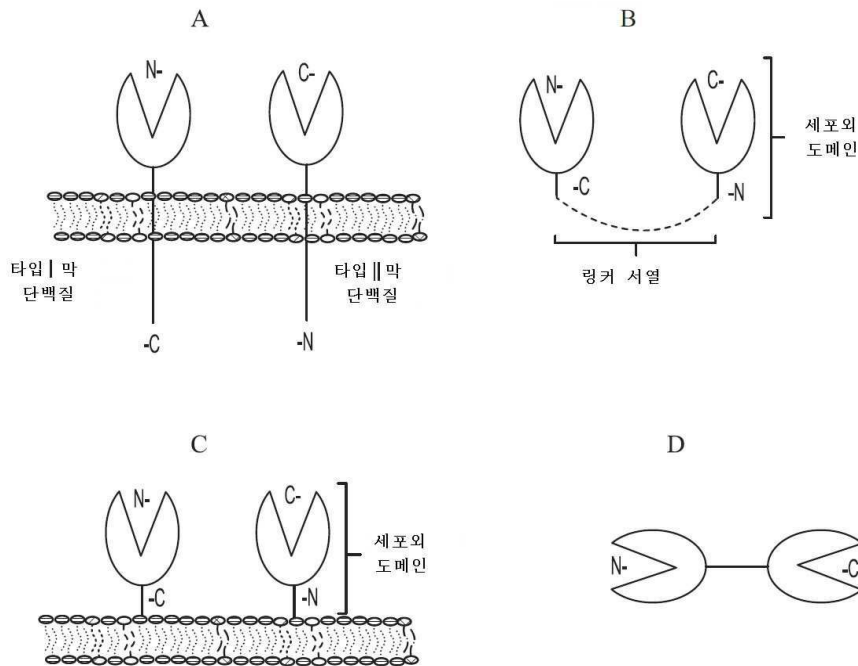
- [0304] 대안적으로, 추가적인 키메라 단백질은 하기 일반 화학식을 갖는 융합 단백질일 것이다: N 말단 - (a) - (b) - (c) - C 말단, 식 중, (a)는 CD172a(SIRP α), TIGIT 또는 PD-1이 아닌 타입 I 단백질의 세포외 도메인이고, (b)는 Fc 도메인의 적어도 일부를 포함하는 링커이고, (c)는 LIGHT의 세포외 도메인이다. 예시적인 타입 I 단백질은 TIM3 및 BTLA를 포함한다. 예시적인 링커를 상기 표 1에 기술하며; 키메라 단백질을 형성하는 데 유용하고, 특정 접합 링커 1s, Fc 도메인, 및 접합 링커 2s를 포함하는 모듈식 링커를 도 32에 나타낸다.
- [0305] TIM3 및 BTLA에 대한 아미노산 서열은 각각 서열번호 36 및 24를 포함한다. TIM3 및 BTLA의 세포외 도메인에 대한 아미노산 서열은 각각 서열번호 37 및 25를 포함한다. LIGHT에 대한 아미노산 서열은 서열번호 1을 포함하고, LIGHT의 세포외 도메인은 서열번호 2를 포함한다. 키메라 단백질은 예를 들어, 상기에 언급된 서열과 적어도 약 95% 동일한 상기에 언급된 서열을 포함할 수 있다.
- [0306] 따라서, 본 발명은 하기 추가적인 키메라 단백질 및 (예를 들어, 암을 치료하고/거나 염증성 질환을 치료하는 데 있어서) 추가적인 키메라 단백질을 사용하는 방법을 추가로 포함한다: TIM3-Fc-LIGHT 및 BTLA-Fc-LIGHT. TIM3-Fc-LIGHT 및 BTLA-Fc-LIGHT를 특징규명하는 데 필요한 것이 아닌 추가적인 키메라 단백질에 대해서 특이적인 시약(예를 들어, 결합 파트너, 제조합 표적 세포, 및 암 세포/종양 유형)이 존재하지만, 추가적인 키메라 단백질은 실시예 1 내지 8에서 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT 또는 PD-1-Fc-LIGHT에 대해서 상기에 기술된 바와 같이 특징규명될 것이며: 예로서, 실시예 2와 유사하게 TIM3-Fc-LIGHT의 특징규명은 CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT에 대해서 필요한 항-LIGHT, 항-Fc 및 항-CD172a(SIRP α) 항체가 아닌 항-LIGHT, 항-Fc 및 항-TIM3 항체를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0307] CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT 또는 PD-1-Fc-LIGHT 키메라 단백질과 같이, 추가적인 키메라 단백질은, TIM3 및 LIGHT(이것은 면역 저해 신호의 전달을 저해함)를 차단하고, LIGHT에 의한 수용체/리간드의 활성화를 통해서 면역 자극 신호의 전달을 향상, 증가 및/또는 자극함으로써 암을 치료하는 데 그리고/또는 염증성 질환을 치료하는 데 효과적인 것이다. 더욱이, 추가적인 키메라 단백질은, 복수의 항체, 예를 들어, TIM3 및 LIGHT 중 하나의 수용체/리간드에 대한 효능제 항체 및 차단 항체를 포함하는 치료로부터, 바람직하지 않은 부작용, 예를 들어, GI 합병증을 유발하지 않고 독성이 없이 암 및/또는 염증성 질환을 치료하는 데 효과적인 것이다.
- [0308] **등가물**
- [0309] 본 발명은 이의 구체적인 실시형태와 관련하여 기술되어 있지만, 이것은 추가로 변형될 수 있고, 본 발명이 속한 분야에서 공지되거나 또는 통상의 실시로 존재하는 바와 같은, 상기 본질적인 특징에 적용될 수 있는 바와 같은, 그리고 상기에 기술되고 첨부된 청구범위의 범주에 따르는 바와 같은 본 개시내용으로부터의 이러한 일탈을 포함하여, 일반적으로 본 발명의 원칙에 따라서 본 출원이 본 발명의 임의의 변동, 사용 또는 개작을 포괄하는 것으로 의도된다고 이해될 것이다.
- [0310] 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본 명세서에 구체적으로 기술된 구체적인 실시형태에 대한 다수의 균등물을 인식하거나 확인할 수 있다. 이러한 균등물은 하기 청구범위의 범주에 포함되도록 의도된다.
- [0311] **참고에 의한 포함**
- [0312] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 간행물은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0313] 본 명세서에 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 전에 단지 이의 개시내용에 대해 제공된다. 본 명세서에서의 어떤 것도 본 발명이 선행 발명에 의해 이러한 공개를 선행하는 자격이 없다는 인정으로서 해석되지 않아야 한다.
- [0314] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 모든 주제는 임의의 방식으로 본 개시내용을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 임의의 개별 섹션의 내용은 모든 섹션에 동등하게 적용 가능할 수 있다.
- [0315] **등가물**
- [0316] 본 발명은 이의 구체적인 실시형태와 관련하여 기술되어 있지만, 이것은 추가로 변형될 수 있고, 본 발명이 속한 분야에서 공지되거나 또는 통상의 실시로 존재하는 바와 같은, 상기 본질적인 특징에 적용될 수 있는 바와 같은, 그리고 상기에 기술되고 첨부된 청구범위의 범주에 따르는 바와 같은 본 개시내용으로부터의 이러한 일탈을 포함하여, 일반적으로 본 발명의 원칙에 따라서 본 출원이 본 발명의 임의의 변동, 사용 또는 개작을 포괄하는 것으로 의도된다고 이해될 것이다.

[0317]

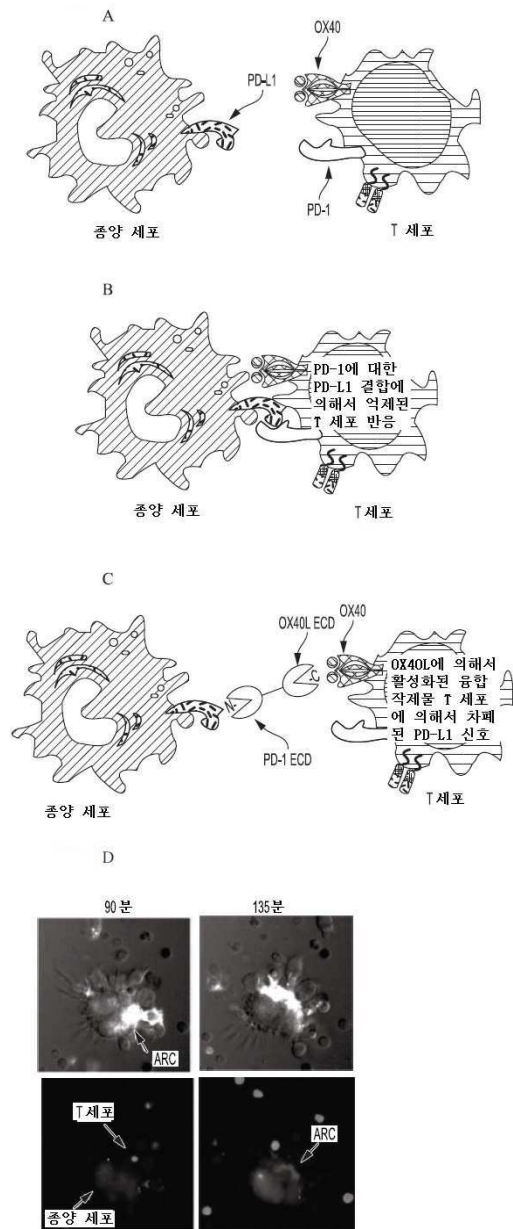
관련 기술 분야의 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본 명세서에 구체적으로 기술된 구체적인 실시형태에 대한 다수의 균등물을 인식하거나 확신할 수 있다. 이러한 균등물은 하기 청구범위의 범주에 포함되도록 의도된다.

도면

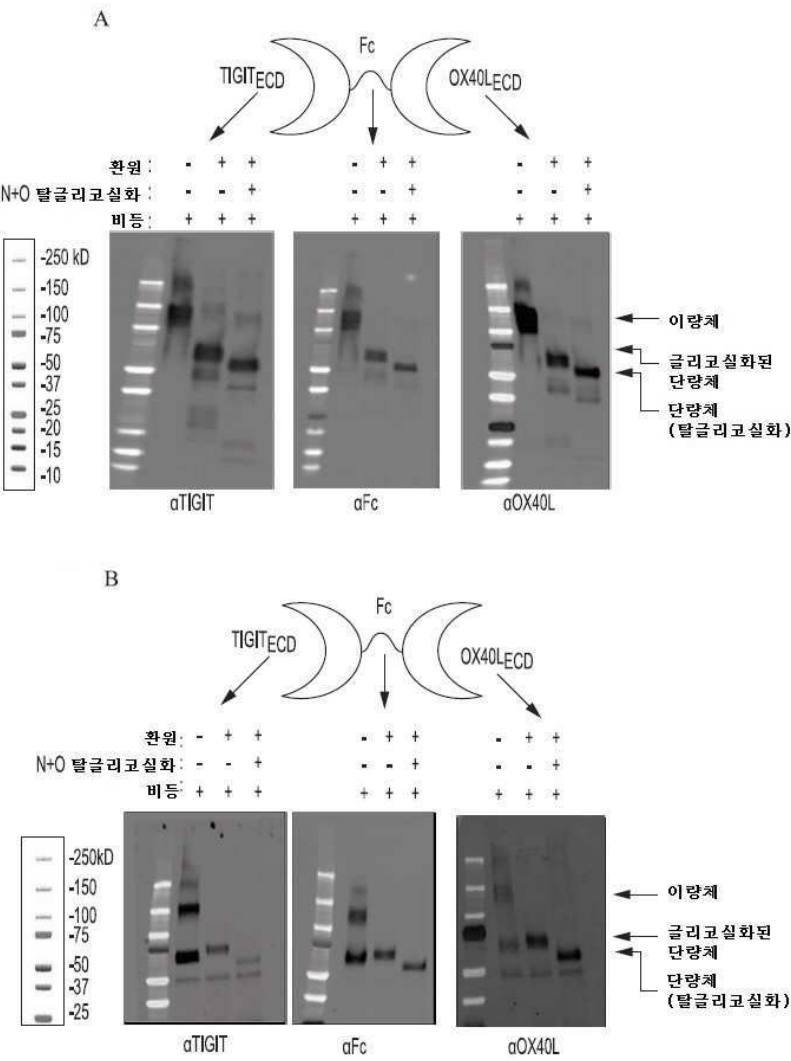
도면1



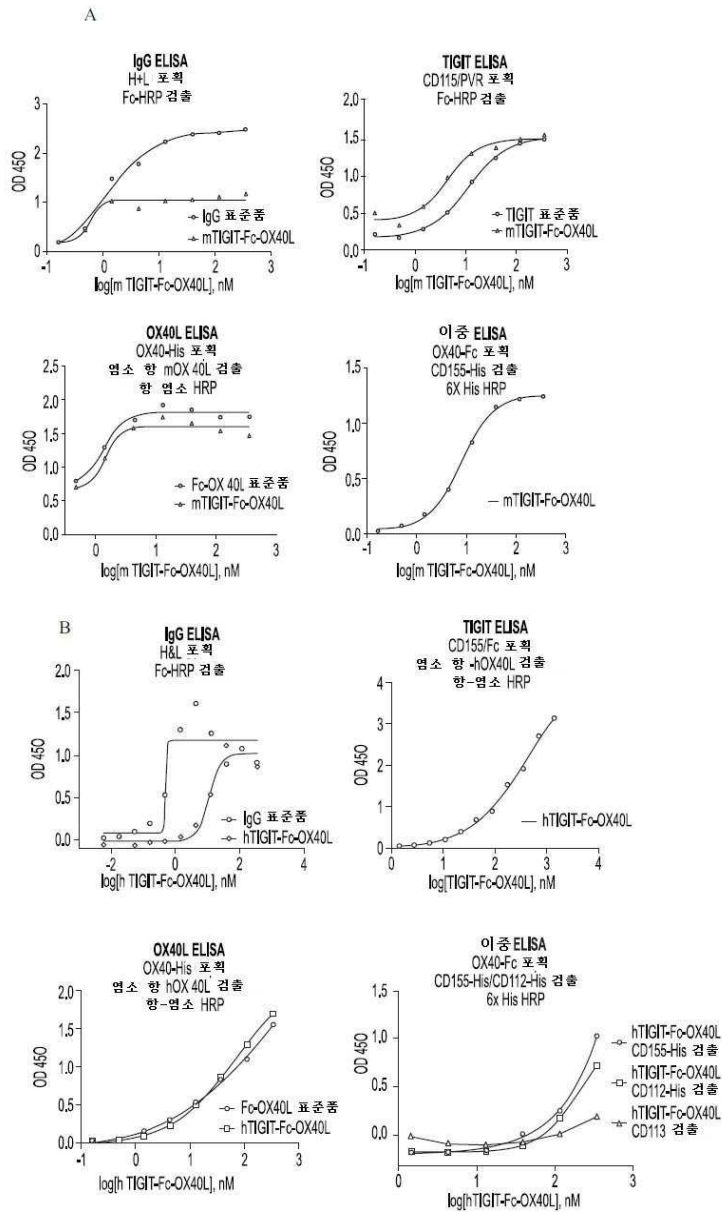
도면2



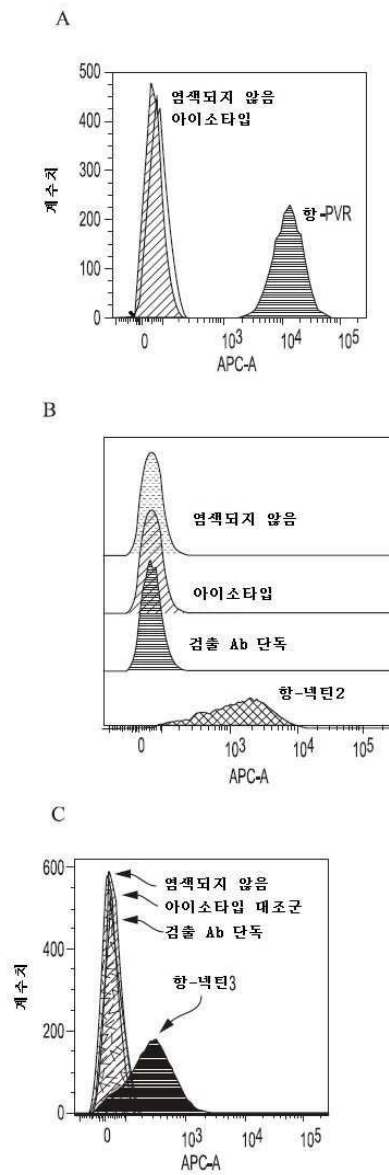
도면3



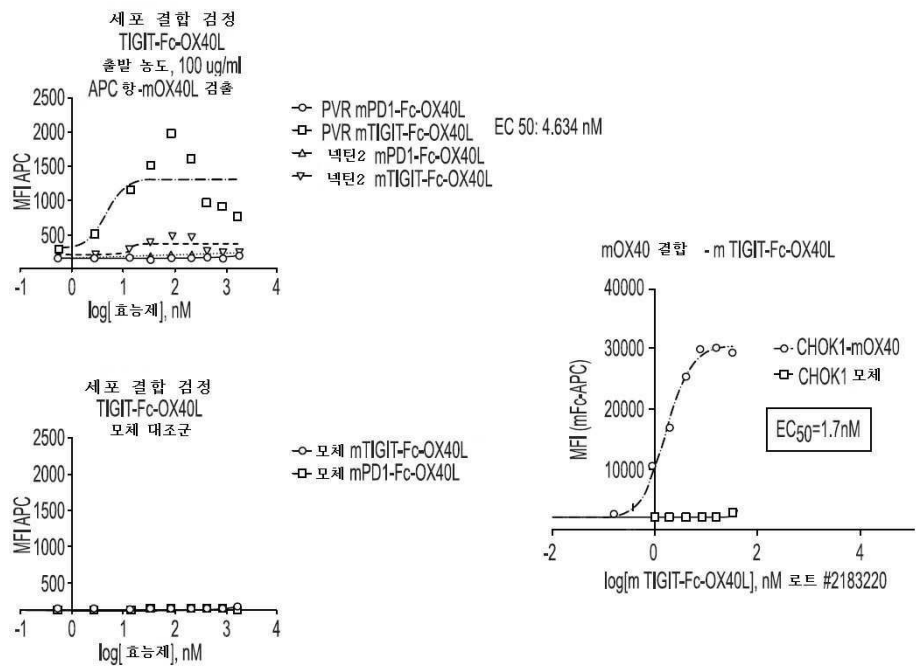
도면4



도면5



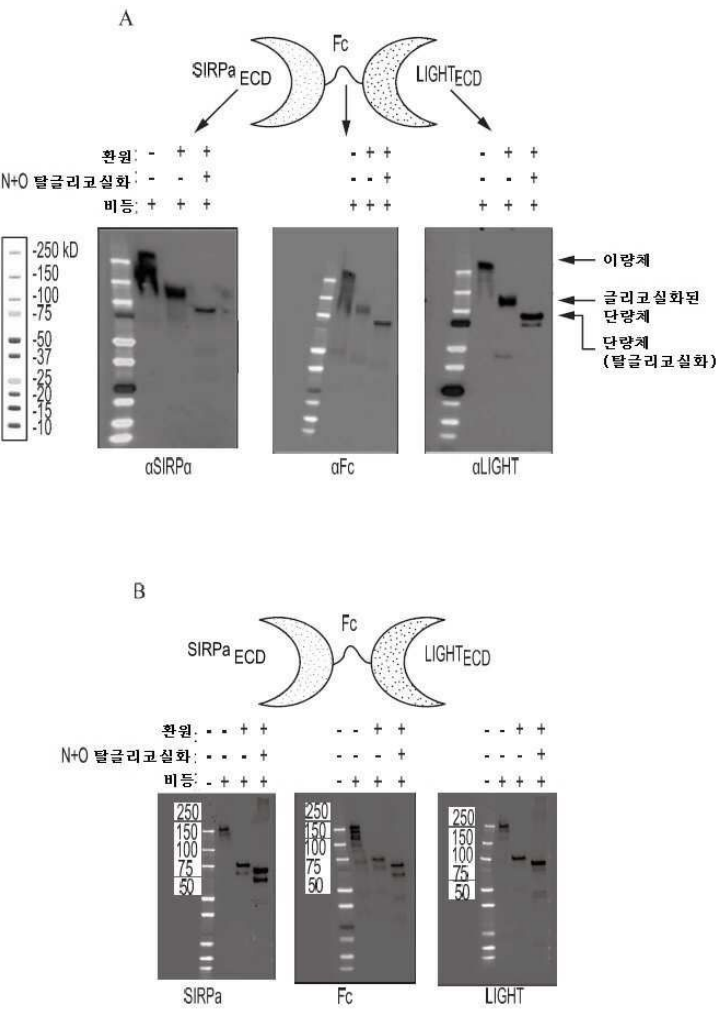
도면6



도면7

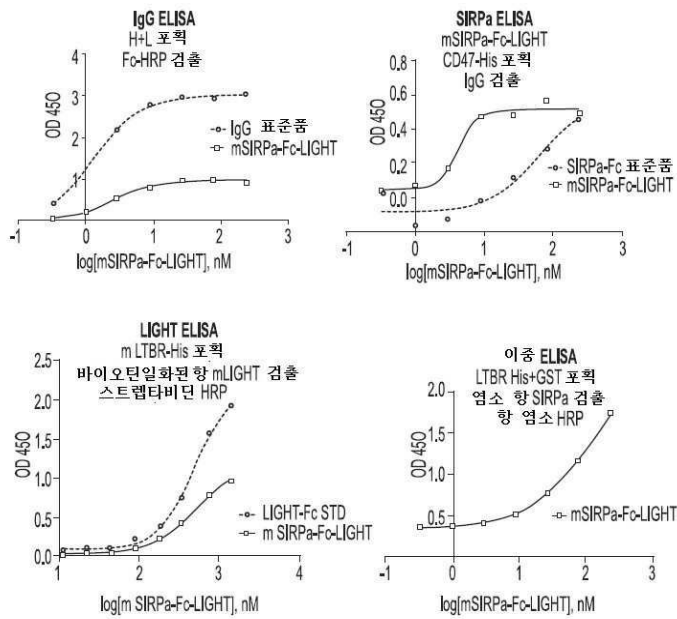
	유전자 Id	단백질 명칭	수탁	1차 스크린		확인 스크린		코멘트
TIGIT-Fc-OX40L	NECTIN4	넥틴 세포 접착 분자 4	BC010293	v. 약함	v. 약함	약함	약함	
	PVR	폴리오바이러스 수용체	BC015529	강함	강함	강함	강함	
	OX40	TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 4		해당 없음	해당 없음	강함	강함	
	TNFRSF4	TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 4	NM_003327.3	해당 없음	해당 없음	중간	중간/강함	캐노니컬 아이소폼
	LGALS1	갈락틴 1	BC001693	중간/강함	중간/강함	약함	약함	가용성: 다른 Fc 융합 단백질로 인지됨

도면8

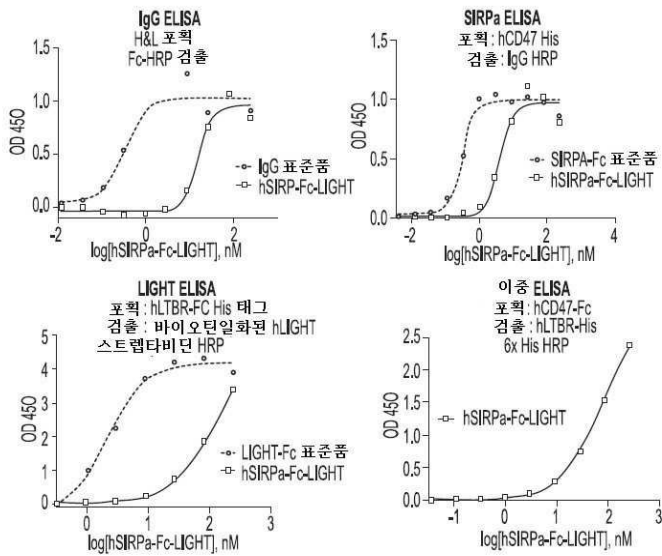


도면9

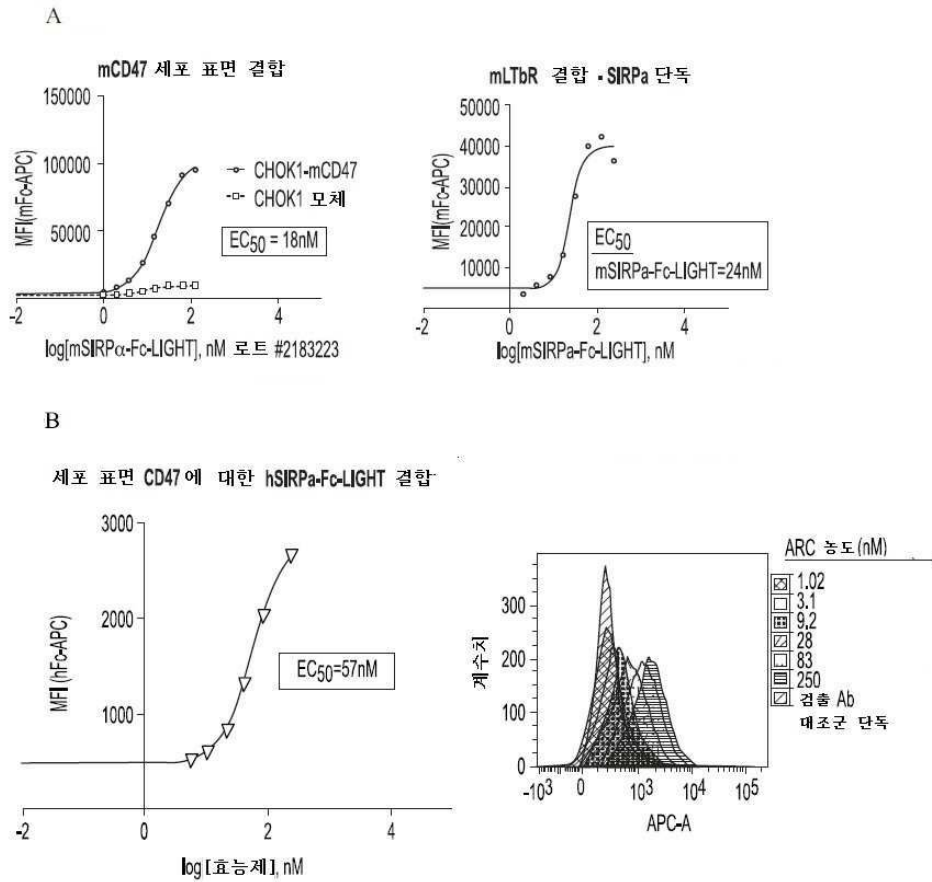
A



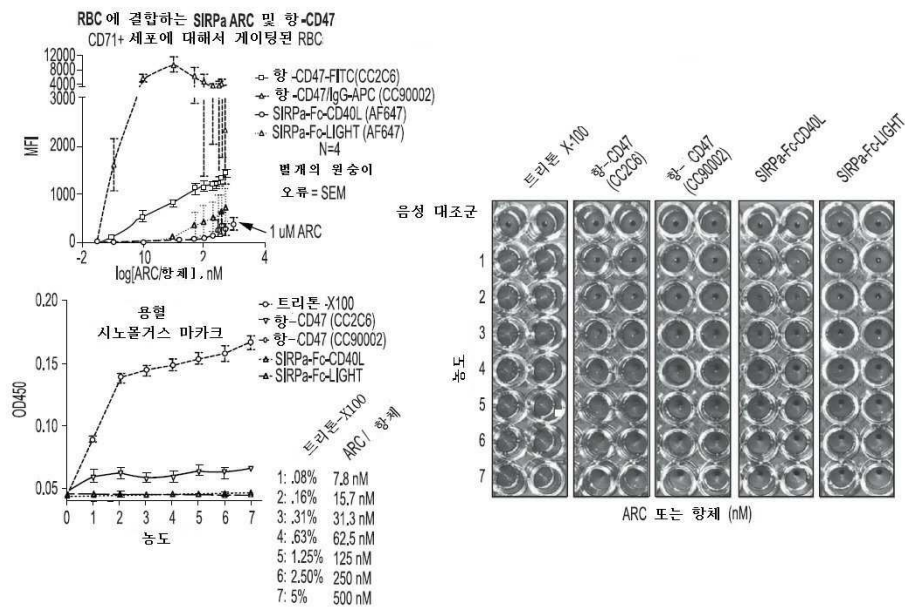
B



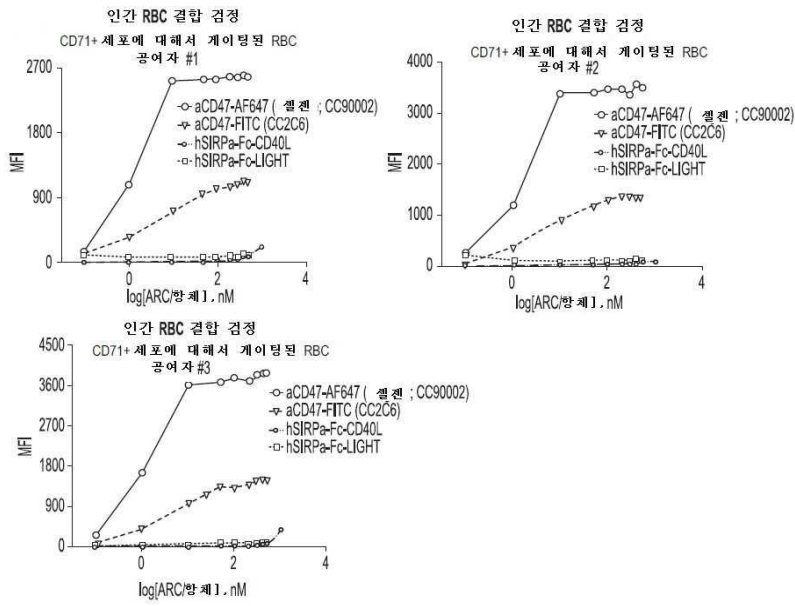
도면10



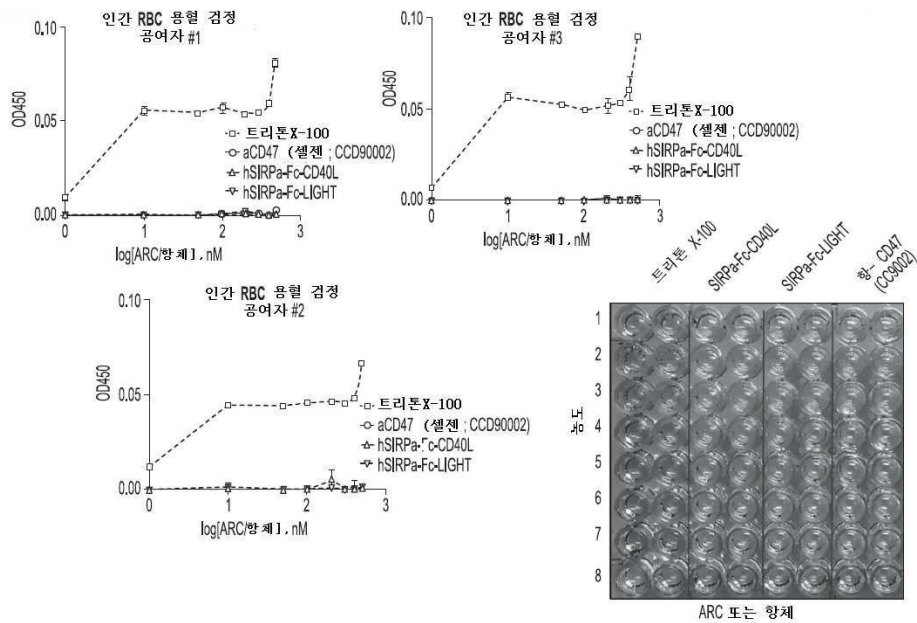
도면11a



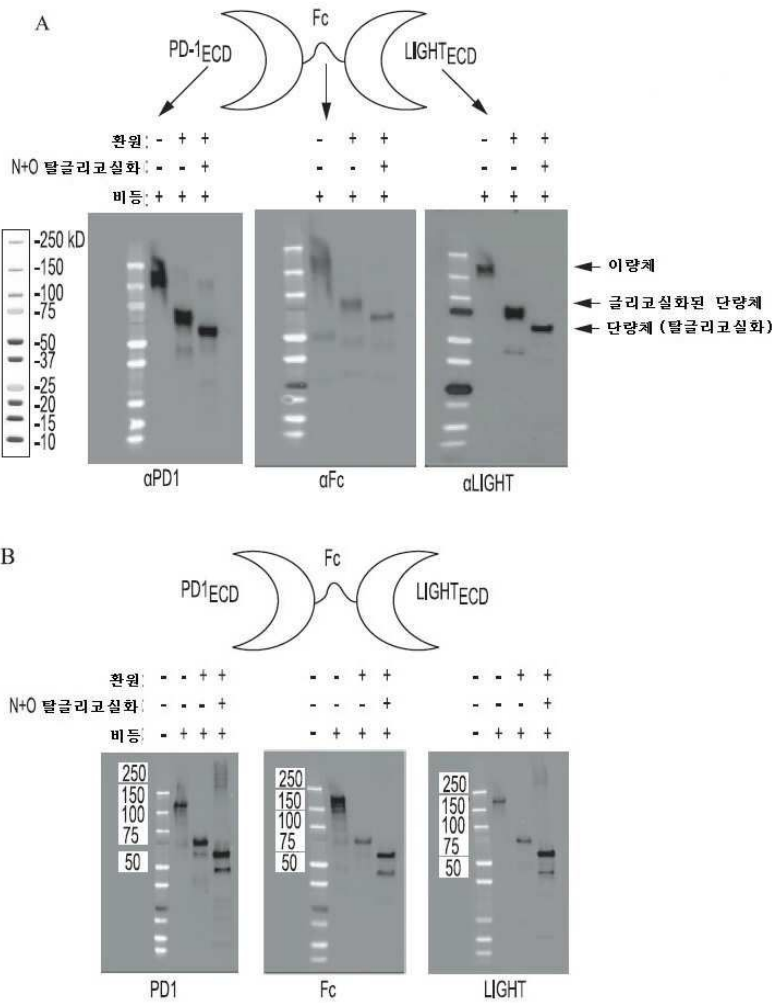
도면11b



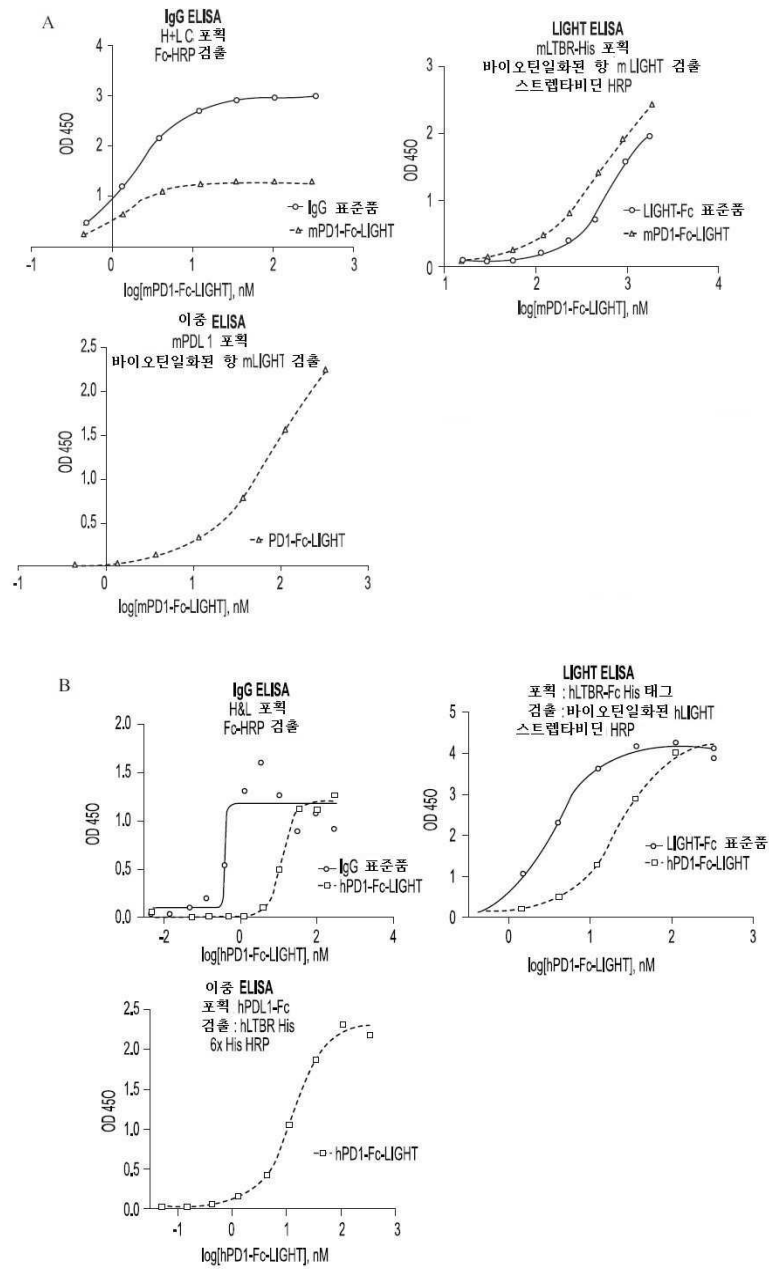
도면11c



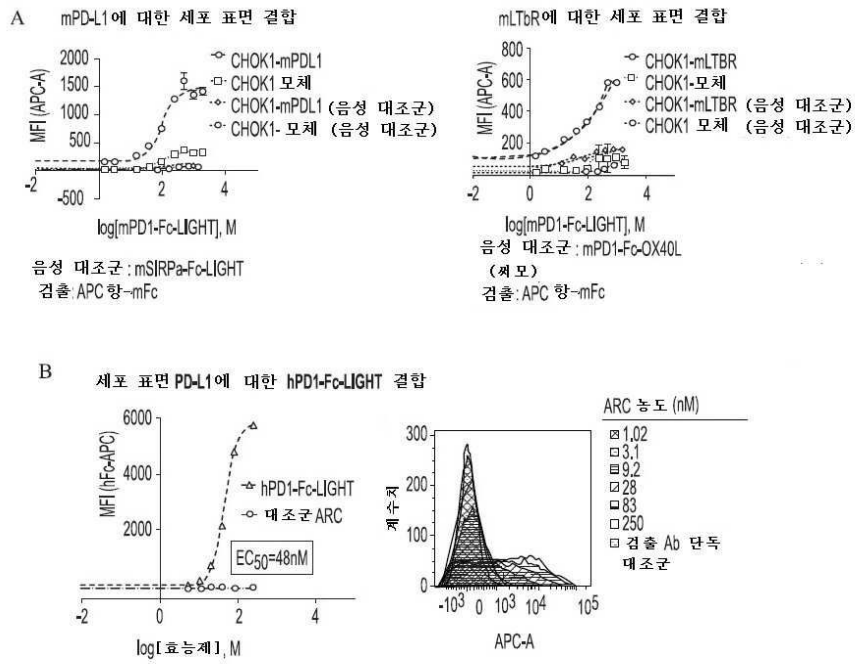
도면12



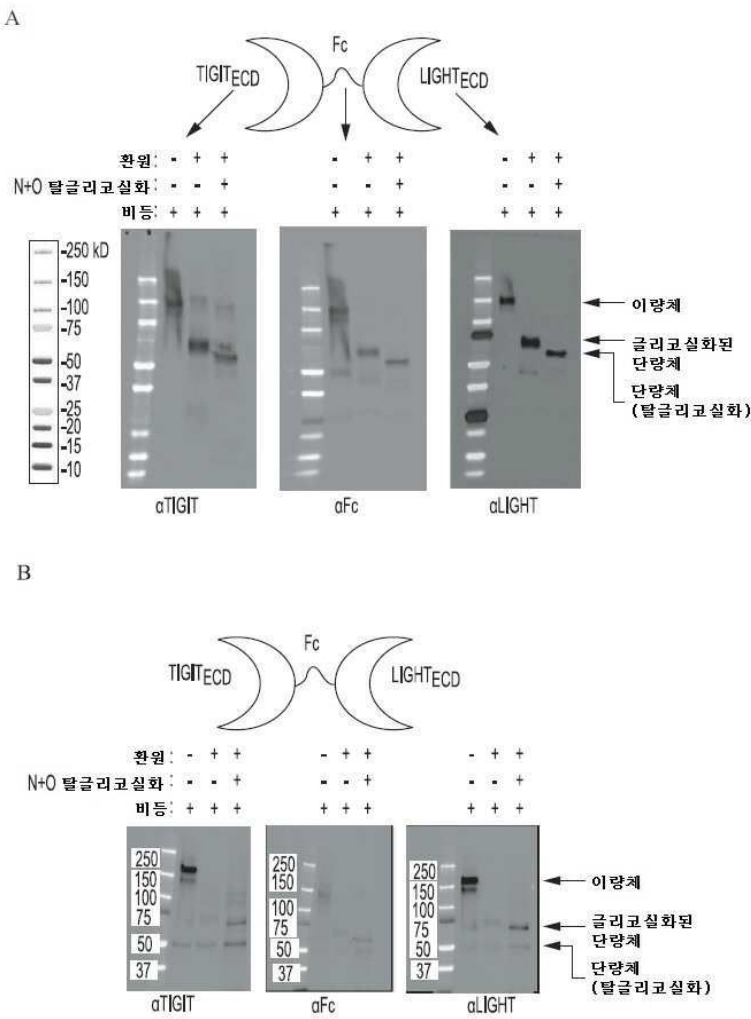
도면13



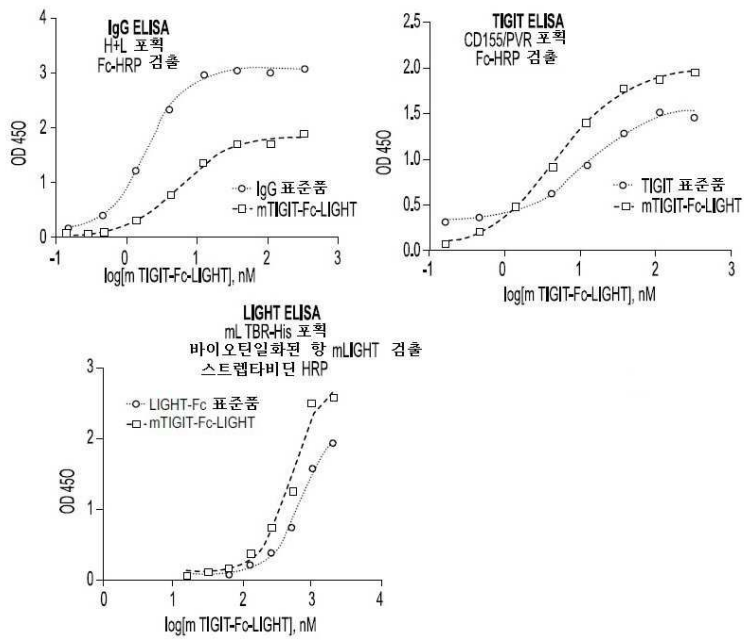
도면14



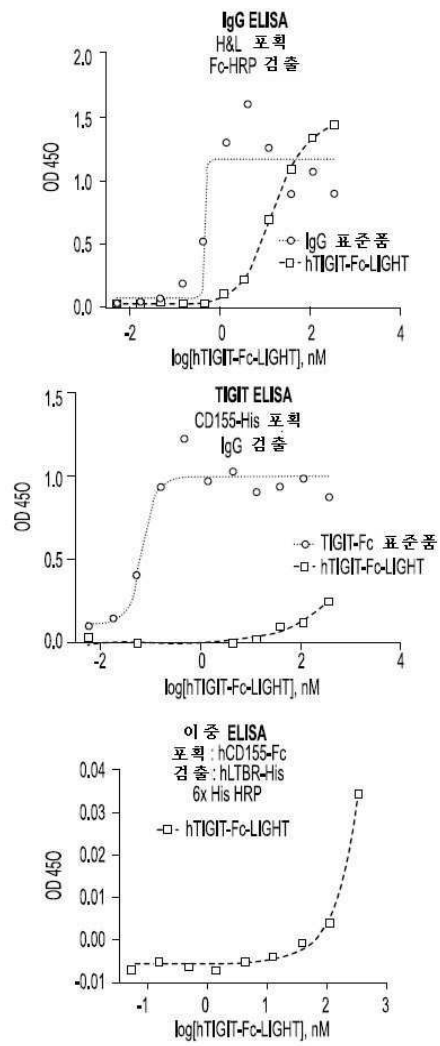
도면15



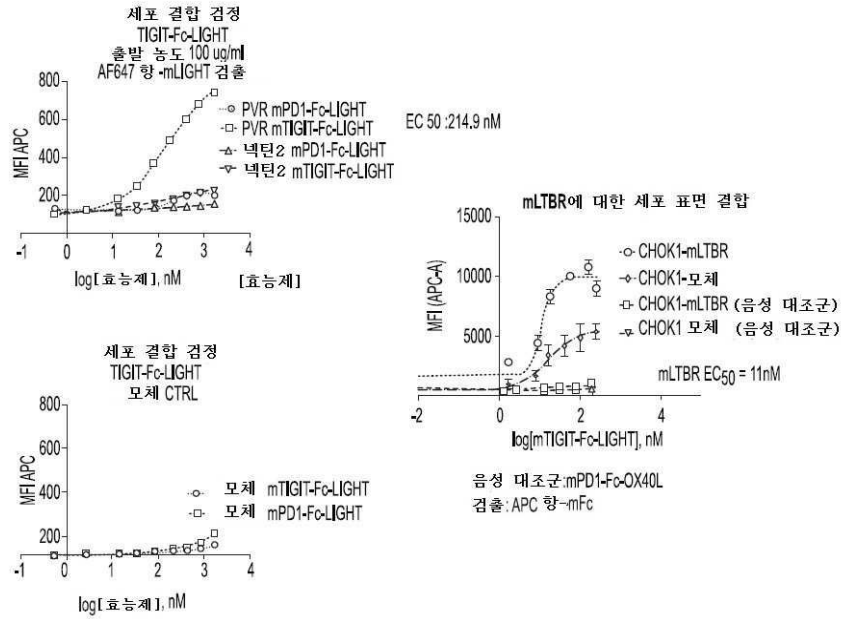
도면16a



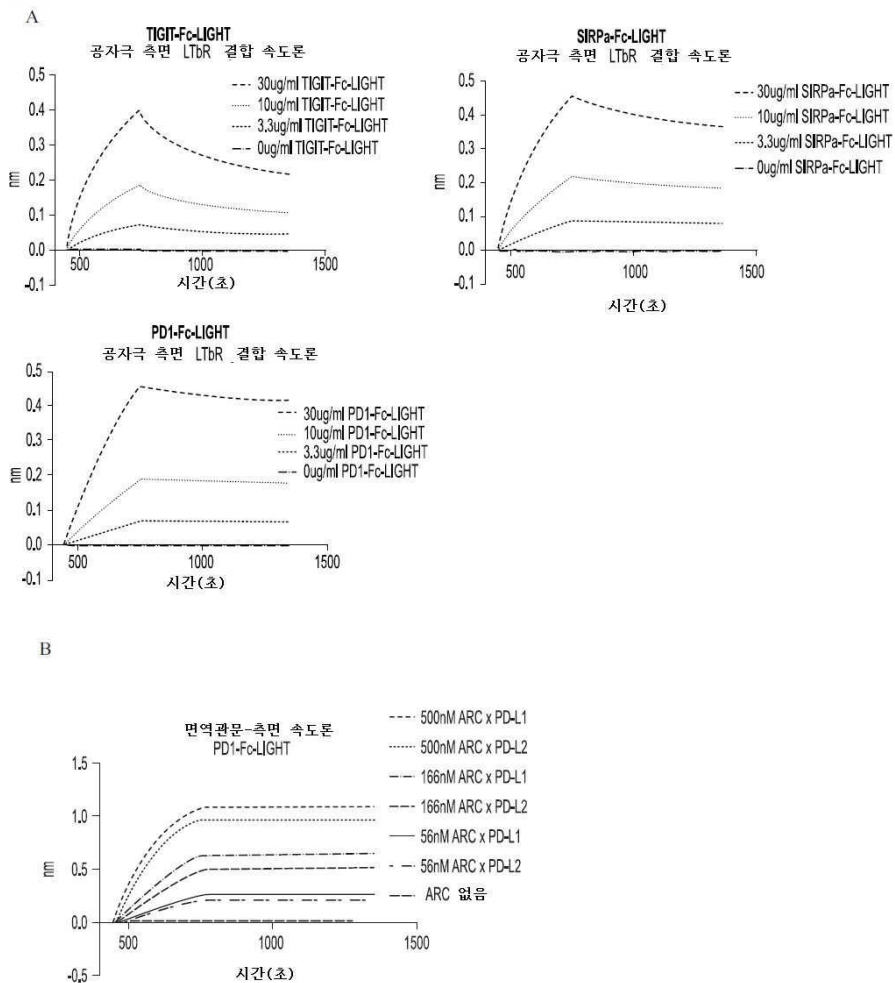
도면16b



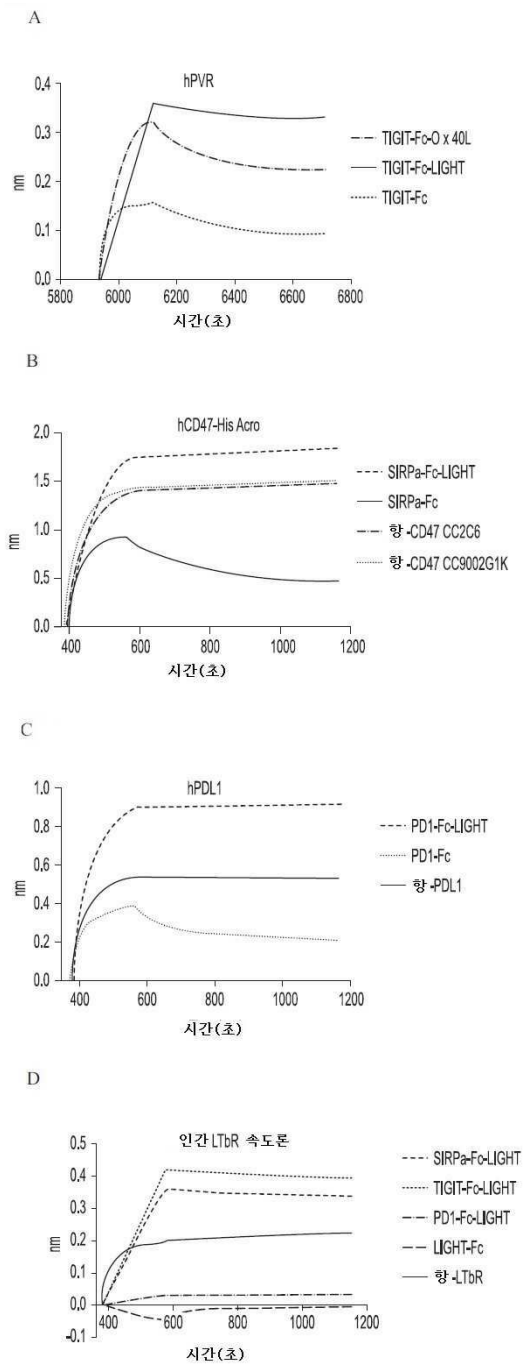
도면17



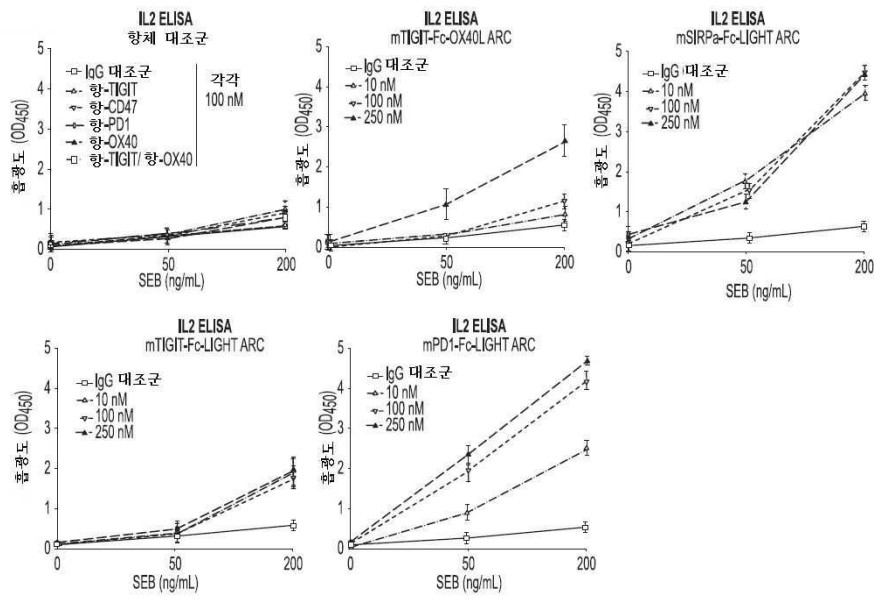
도면18



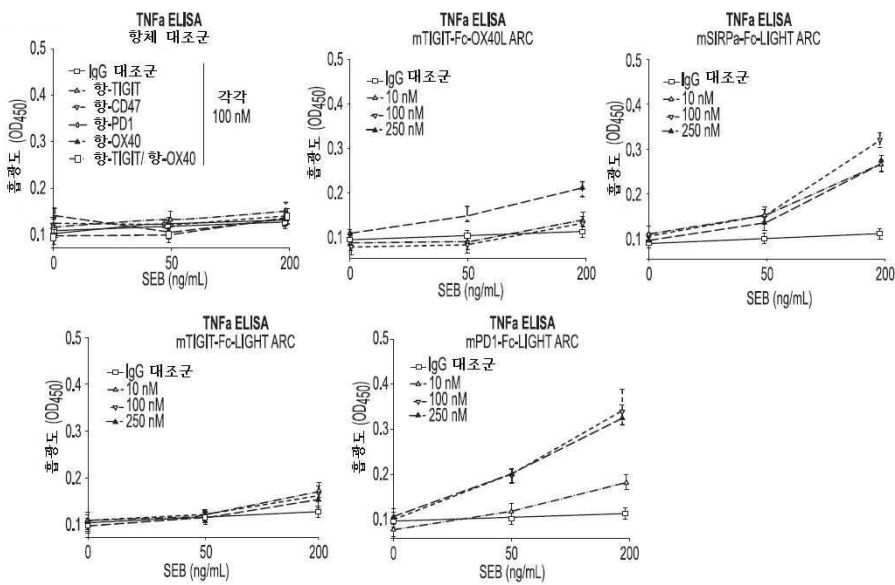
도면19



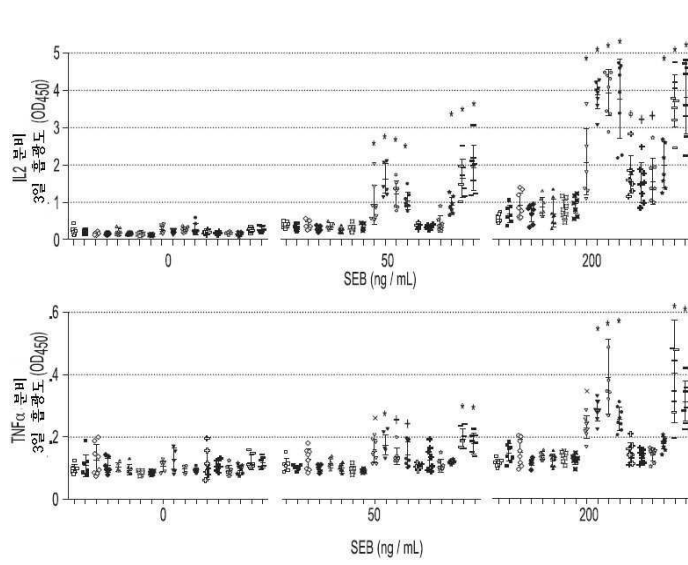
도면20a



도면20b

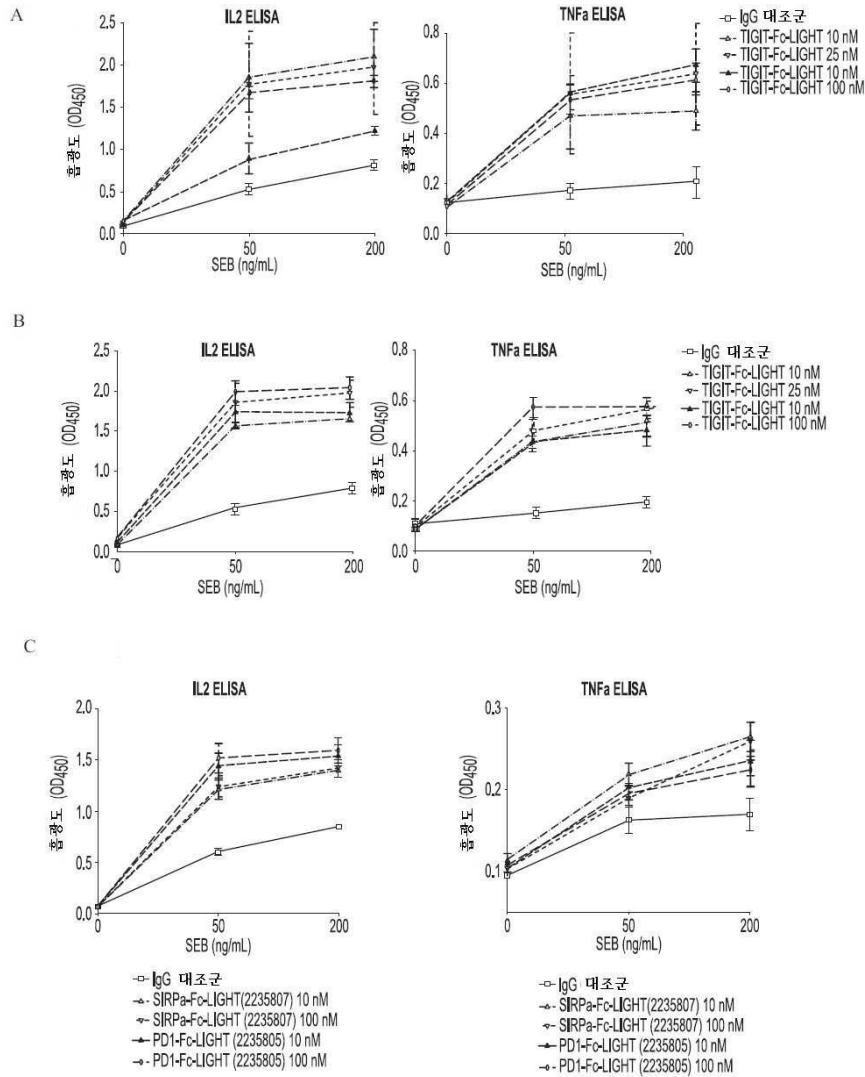


도면20c

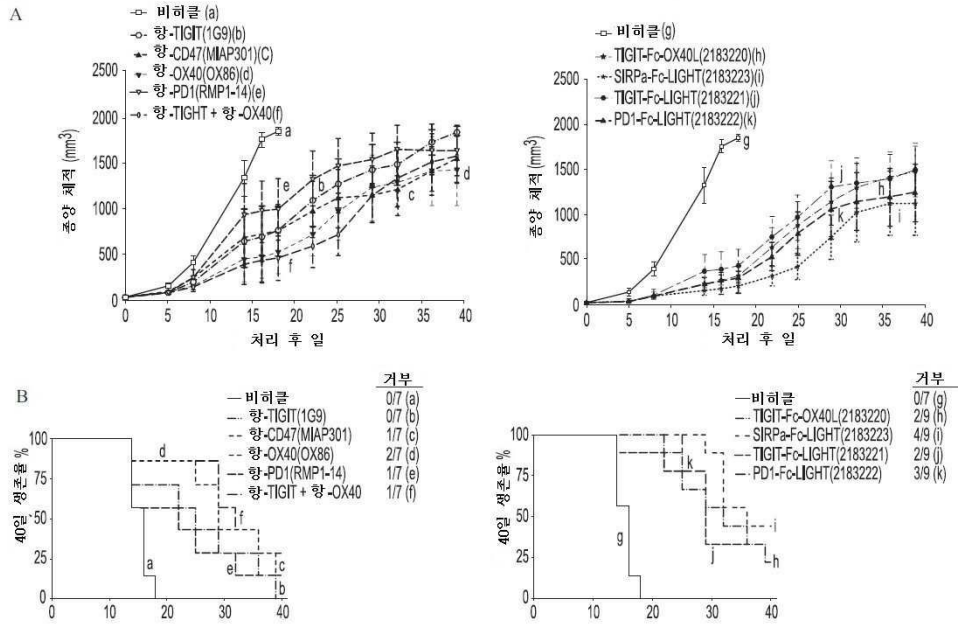


- IgG 음성 대조군
- α-CD47 (M1P301)
- α-PD1 (RMP1-14)
- α-OX40 (OX86)
- △ α-TIGIT (1G9)
- × α-TIGIT/α-OX40 Combo
- TIGIT-Fc-OX40L (10 nM)
- TIGIT-Fc-OX40L (100 nM)
- TIGIT-Fc-OX40L (250 nM)
- △ SIRPα-Fc-LIGHT (10 nM)
- × SIRPα-Fc-LIGHT (100 nM)
- SIRPα-Fc-LIGHT (250 nM)
- TIGIT-Fc-LIGHT (10 nM)
- △ TIGIT-Fc-LIGHT (100 nM)
- × TIGIT-Fc-LIGHT (250 nM)
- PD1-Fc-LIGHT (10 nM)
- PD1-Fc-LIGHT (100 nM)
- PD1-Fc-LIGHT (250 nM)
- 실험 횟수 = 2
- 총 반복 = 8
- 오류 = 표준편차
- * IgG 및 모든 항체 대조군에 대한 유의성 (단일요법 및 조합물)
p<.01 - p<.0001
- + IgG 및 모든 항체 대조군에 대한 유의성 (단일요법 및 조합물)
p<.01 - p<.001
- + IgG, α-CD47, α-OX40 에 대한 유의성
p<.05 - p<.01
- × IgG 및 모든 항체 대조군에 대한 유의성
α-PD1 제외
p<.05 - p<.001
일측 ANOVA

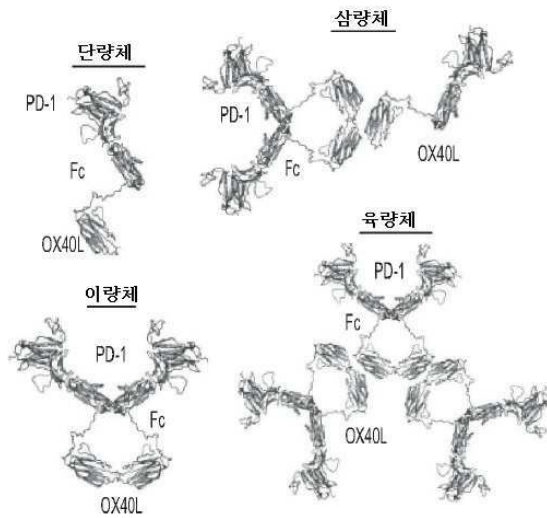
도면21



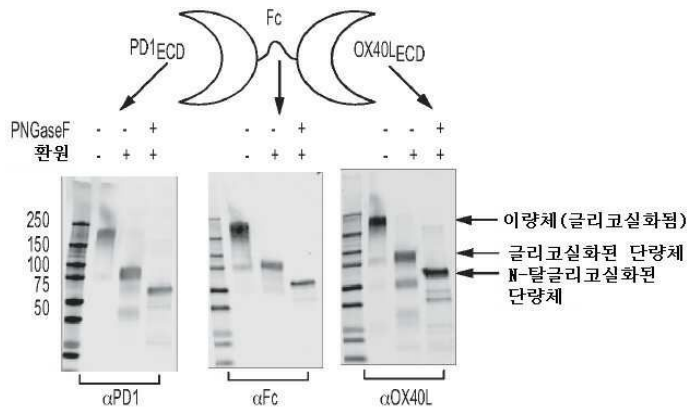
도면22



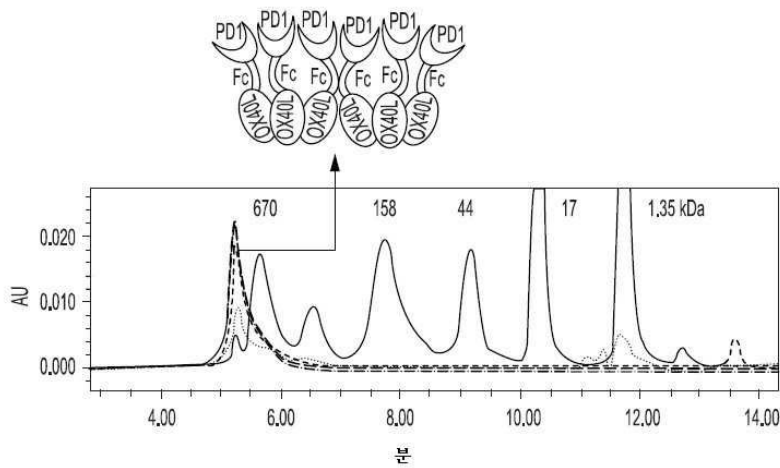
도면23



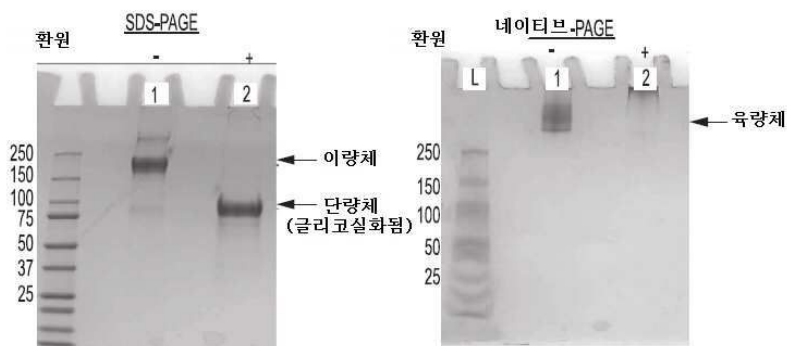
도면24



도면25

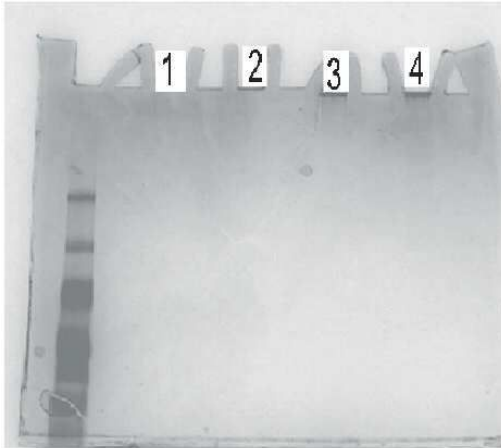


도면26

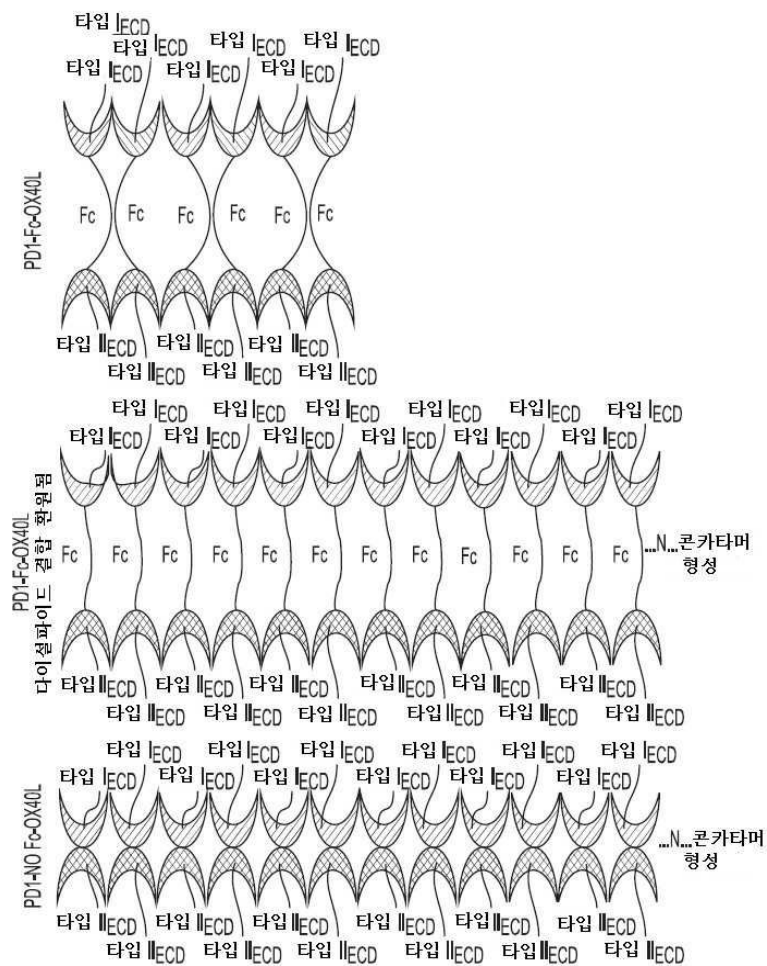


도면27

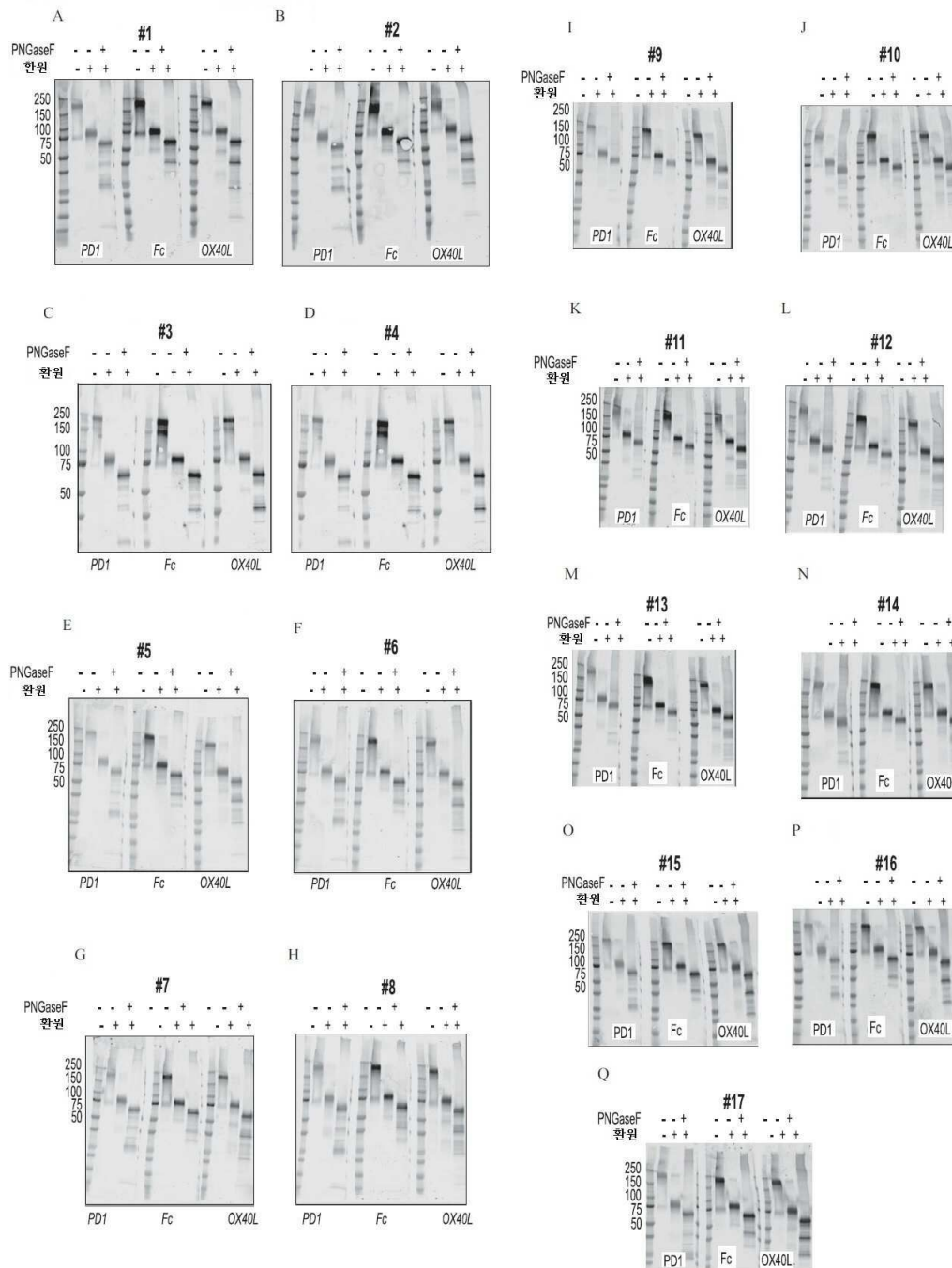
네이티브-Page



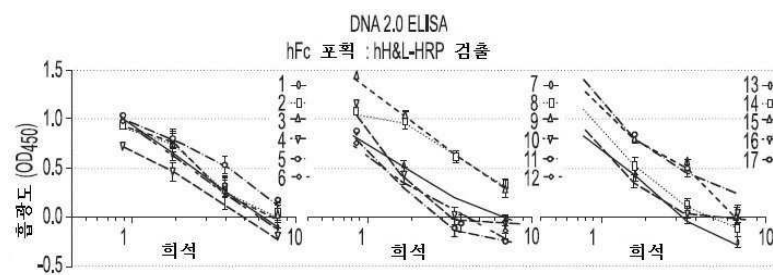
도면28



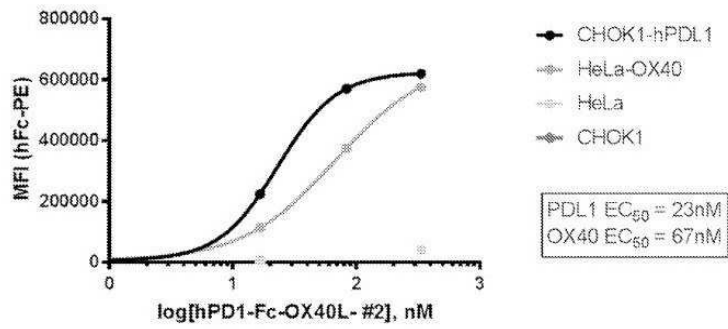
도면29



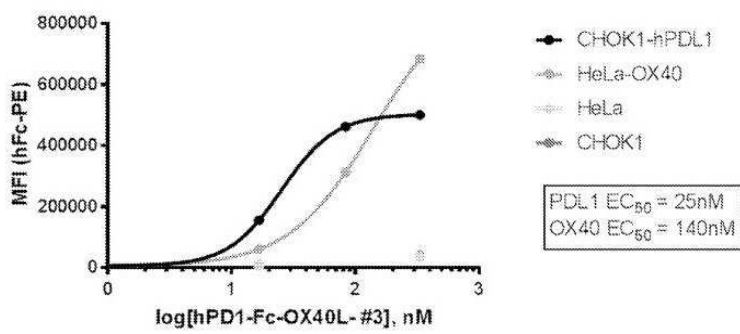
도면30



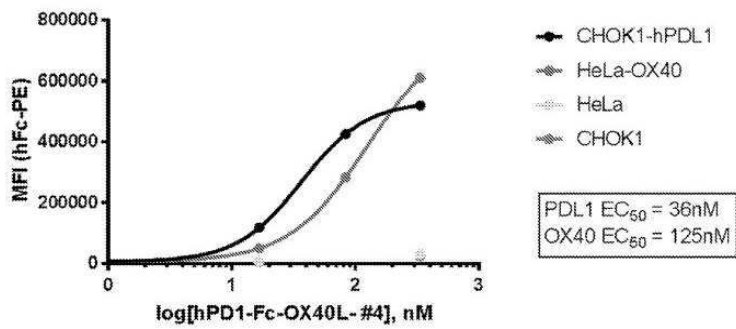
도면31a



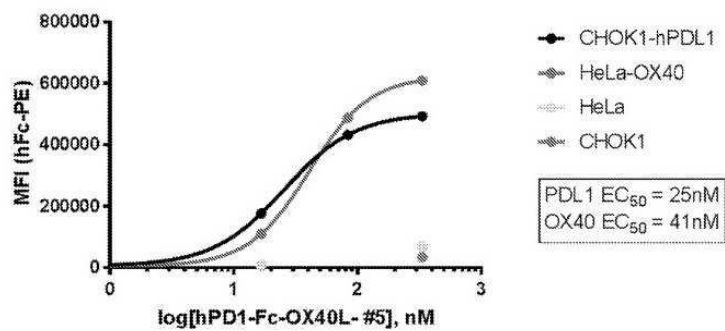
도면31b



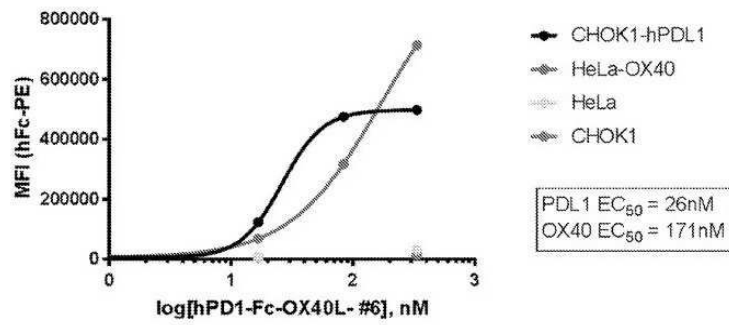
도면31c



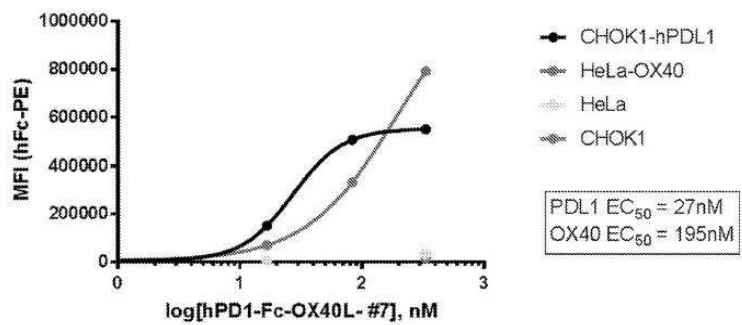
도면31d



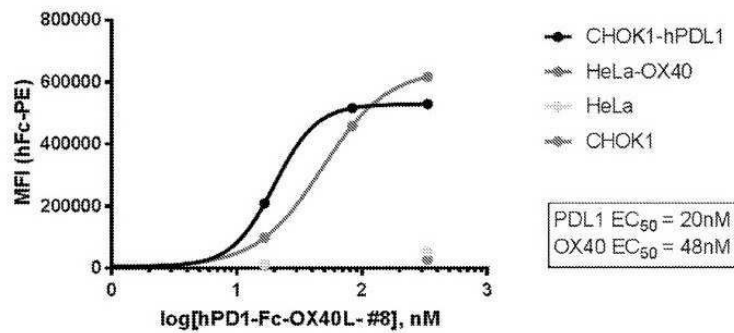
도면31e



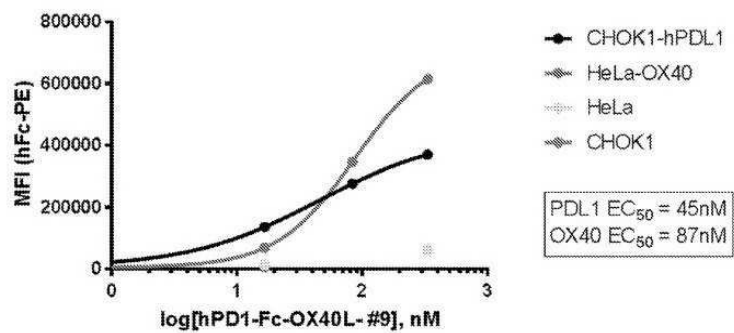
도면31f



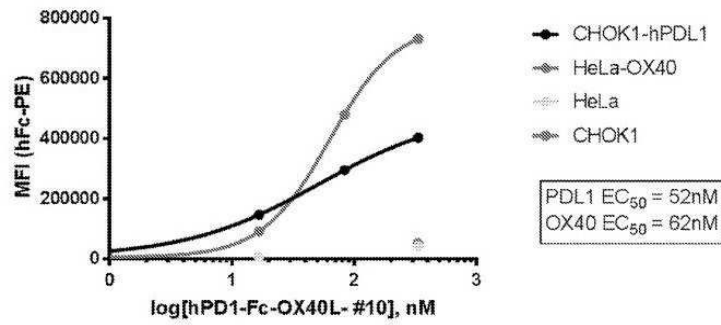
도면31g



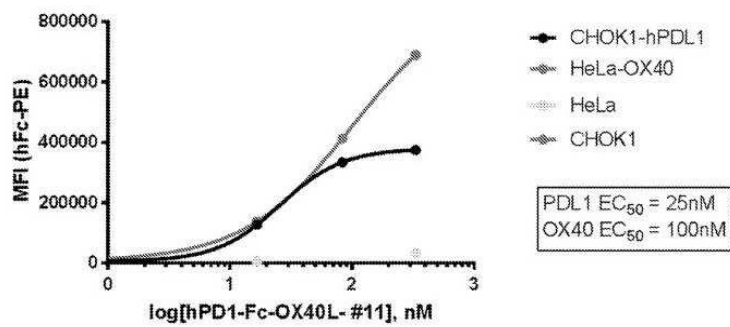
도면31h



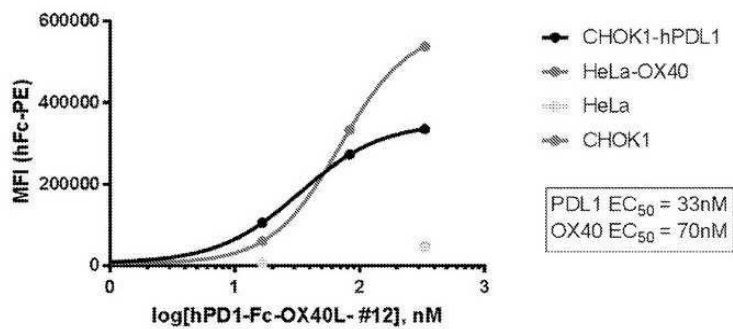
도면31i



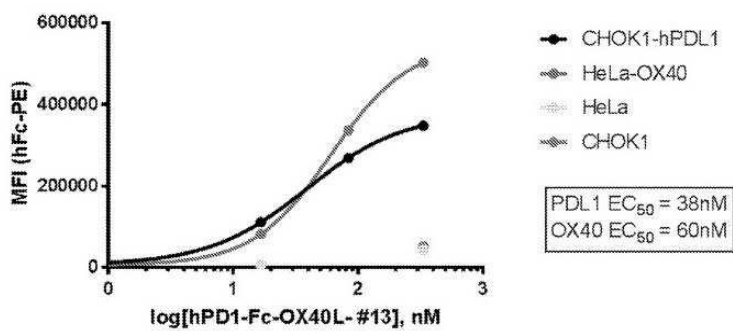
도면31j



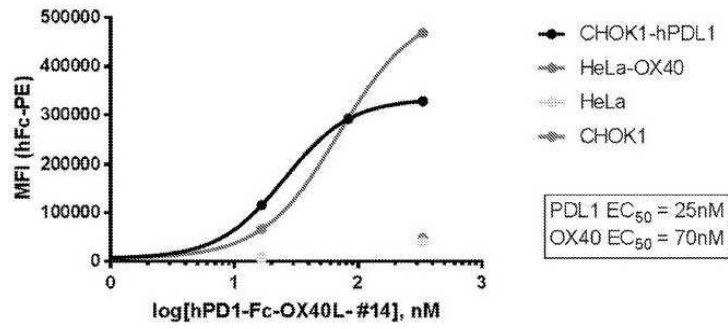
도면31k



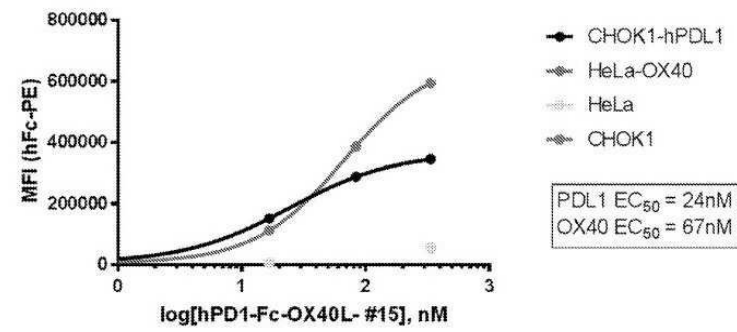
도면31l



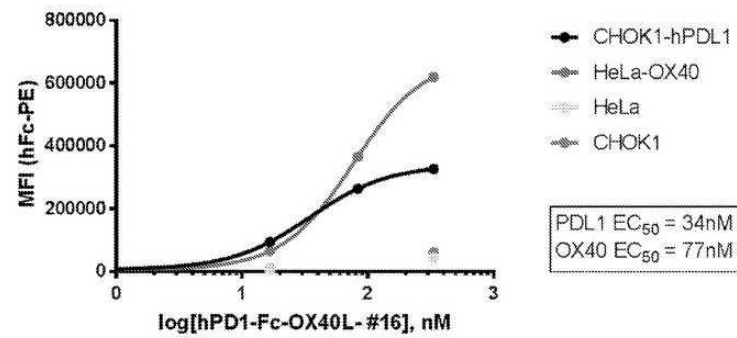
도면31m



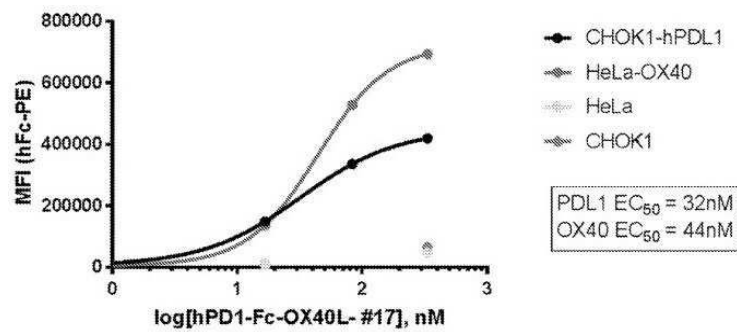
도면31n



도면31o



도면31p



도면32

접합 링커 1	Fc	접합 링커 2	Linker Module = 접합 링커 1 + Fc + 접합 링커 2
SKYGPPCPSCP (서열번호 49)	APEFLGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDSQ DEPQVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT LHQDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLTVDKSSWQEGNPFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID No: 46)	TEGRMD (서열번호 52)	SKYGPPCPSCPAPFELGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT LHQDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLT VDKSSWQEGNPFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID No: 96)
SKYGPPCPSCP (서열번호 49)	APEFLGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDSQ DEPQVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT PHSDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLTVDKSSWQEGNPFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID No: 47)	TEGRMD (서열번호 52)	SKYGPPCPSCPAPFELGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT PHSDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLT VDKSSWQEGNPFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID No: 97)
SKYGPPCPSCP (서열번호 49)	APEFLGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDSQ DEPQVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT LHQDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLTVDKSSWQEGNPFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID No: 48)	TEGRMD (서열번호 52)	SKYGPPCPSCPAPFELGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT LHQDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLT VDKSSWQEGNPFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID No: 98)
SKYGPPCPSCP (서열번호 50)	APEFLGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDSQ DEPQVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT LHQDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLTVDKSSWQEGNPFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID No: 46)	TEGRMD (서열번호 52)	SKYGPPCPSCPAPFELGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT LHQDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLT VDKSSWQEGNPFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID No: 99)
SKYGPPCPSCP (서열번호 50)	APEFLGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDSQ DEPQVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT PHSDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLTVDKSSWQEGNPFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID No: 47)	TEGRMD (서열번호 52)	SKYGPPCPSCPAPFELGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT PHSDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLT VDKSSWQEGNPFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID No: 100)
SKYGPPCPSCP (서열번호 50)	APEFLGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDSQ DEPQVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT PHSDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLTVDKSSWQEGNPFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID No: 48)	TEGRMD (서열번호 52)	SKYGPPCPSCPAPFELGGPSVFLFPKPKDQIMISRTPEVTCVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLT PHSDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTSNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLT VDKSSWQEGNPFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID No: 101)

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SHATTUCK LABS, INC.

<120> TIGIT- AND LIGHT-BASED CHIMERIC PROTEINS

<130> WO/2018/157162

<140> PCT/US2018/020037

<141> 2018-2-27

<150> US 62/464,002

<151> 2017-02-27

<160> 101

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 1

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln

1

5

10

15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser

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

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

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

210 215 220
Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
225 230 235 240

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 2

Leu Gln Leu His Trp Arg Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp

1 5 10 15

Gly Pro Ala Gly Ser Trp Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His

20 25 30

Glu Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr

35 40 45

Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys

85 90 95

Pro Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr

100 105 110

Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro

115 120 125

Cys Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe

130 135 140

Leu Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Gly Ala Phe Met Val

180

<210> 3

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 3

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60
 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95

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

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln
 165

<210> 4

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 4

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30
 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn

85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg

115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly

130 135 140

Gln Phe Gln

145

<210> 5

<211> 559

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 5

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala

1 5 10 15

Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe

20 25 30

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro

35 40 45

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln

50 55 60

Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg

65 70 75 80

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

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

 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 210 215 220
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly
 225 230 235 240
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 245 250 255
 Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 260 265 270

 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 275 280 285
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 290 295 300
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 305 310 315 320
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val

325	330	335
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu		
340	345	350
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
355	360	365
Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp Leu Gln Leu His Trp Arg Leu		
370	375	380
Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp Glu		
385	390	395
400		
Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala His		
405	410	415
Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu		
420	425	430
Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His		
435	440	445
Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser		
450	455	460
Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser Thr		
465	470	475
480		
Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu		
485	490	495
Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser Ser		
500	505	510
Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His Leu		
515	520	525
Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu Val		
530	535	540
Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val		
545	550	555
<210> 6		
<211> 373		

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 6

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys

1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu

20 25 30

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

35 40 45

Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly

50 55 60

Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile Tyr

65 70 75 80

Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp Leu

85 90 95

Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr

100 105 110

Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala

145 150 155 160

Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser

165 170 175

Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser

180 185 190

Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser

195 200 205

Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser

210 215 220
 Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu
 225 230 235 240
 Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu
 245 250 255
 Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr
 260 265 270
 Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu

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

340 345 350
 Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn
 355 360 365
 Glu Arg Asn Ile Tyr

370

<210> 7

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 7

Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro

20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu

35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 50 55 60
 Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys

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

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

 210 215 220
 Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
 225 230 235 240
 Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr
 245 250 255
 Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val
 260 265 270
 Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val

 275 280 285

Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu
 290 295 300
 His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
 325 330 335
 Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr
 340

<210> 8

<211> 759

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 8

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

Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu
 145 150 155 160
 Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser
 165 170 175
 Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val

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

 245 250 255
 Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val
 260 265 270
 Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val
 275 280 285
 Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu
 290 295 300
 His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser

 305 310 315 320
 Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
 325 330 335
 Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 340 345 350
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 355 360 365
 Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

 370 375 380
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

385 390 395 400
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 405 410 415
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 420 425 430
 Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

 435 440 445
 Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr
 450 455 460
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 465 470 475 480
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 485 490 495
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

 500 505 510
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 515 520 525
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 530 535 540
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 545 550 555 560
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met

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

 625 630 635 640

Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys
645 650 655
Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly
660 665 670
Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg
675 680 685
Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser
690 695 700
Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser
705 710 715 720
Phe Leu Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val
725 730 735
Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser
740 745 750
Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
755

<210> 9

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 9

Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala
1 5 10 15
Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn
20 25 30
Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser
35 40 45
Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln
50 55 60
Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser
65 70 75 80

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

115 120 125
Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
130 135 140

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 10

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
1 5 10 15
Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
35 40 45
Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
50 55 60
Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
65 70 75 80
Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
100 105 110
His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
115 120

<210> 11

<211> 536

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 11

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln

20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys

35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr

85 90 95

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

100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

180 185 190

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

195 200 205

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

210 215 220
 Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala
 225 230 235 240
 Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 245 250 255
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 260 265 270
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

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

 340 345 350
 Met Asp Leu Gln Leu His Trp Arg Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu
 355 360 365
 Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg
 370 375 380
 Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser
 385 390 395 400
 Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu

 405 410 415
 Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr
 420 425 430
 Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val
 435 440 445
 Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys
 450 455 460

Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln

465 470 475 480

Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser

485 490 495

Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val

500 505 510

Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg

515 520 525

Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val

530 535

<210> 12

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 12

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro

1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val

20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe

35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val

85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp

100 105 110

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

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

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

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 245 250

<210> 13

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 13

Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala

35 40 45
 Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
 50 55 60
 Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp

65 70 75 80
 Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
 85 90 95
 Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val

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

 165 170 175
 Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
 180 185 190
 Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 195 200 205
 <210> 14
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 14
 Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
 1 5 10 15

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

65	70	75	80
Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr			
	85	90	95
Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu			
	100	105	110
His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro			
	115	120	125
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
	130	135	140
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
	145	150	155
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe			
	165	170	175
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
	180	185	190
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
	195	200	205
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
	210	215	220
Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala			
	225	230	235
Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln			
	245	250	255
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
	260	265	270
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
	275	280	285
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
	290	295	300
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu			
	305	310	315
			320

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His
325 330 335

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg
340 345 350

Met Asp Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly
355 360 365

Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp
370 375 380

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
385 390 395 400

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
405 410 415

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
420 425 430

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
435 440 445

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
450 455 460

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
465 470 475 480

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
485 490 495

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
500 505 510

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
515 520 525

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
530 535 540

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
545 550 555

<210> 15

<211> 199

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 15

Met Thr Leu His Pro Ser Pro Ile Thr Cys Glu Phe Leu Phe Ser Thr

1 5 10 15

Ala Leu Ile Ser Pro Lys Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro

20 25 30

Leu Ser His Ser Arg Thr Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu

35 40 45

Trp Leu Phe Cys Ser Ile Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser

50 55 60

Trp Leu Ile Phe Ile Phe Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys

65 70 75 80

Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser

85 90 95

Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp

130 135 140

Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly

145 150 155 160

Thr Tyr Glu Leu His Val Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser

165 170 175

Glu His Gln Val Leu Lys Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu

180 185 190

Ala Asn Pro Gln Phe Ile Ser

195

<210> 16

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 16

Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu

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

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

<210> 17

<211> 482

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 17

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys			
1	5	10	15
Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln			
20	25	30	
Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys			

35 40 45
 Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

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

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

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

 245 250 255
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 260 265 270
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 275 280 285

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

<210> 18

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 18

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

1 5 10 15

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser

20 25 30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg

85 90 95

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn

100 105 110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr

115 120 125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser

130 135 140

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser

145 150 155 160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser

165 170 175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr

180 185 190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp

195 200 205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp

210 215 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys

225 230 235 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu

245

250

<210> 19

<211> 192

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 19

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

1 5 10 15

Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp

20 25 30

Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr

35 40 45

Gln His Phe Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu

50 55 60

Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu

65 70 75 80

Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe

85 90 95

Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro

100 105 110

Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser

115 120 125

Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu

130 135 140

Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser

145 150 155 160

Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu

165 170 175

Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu

180 185 190

<210> 20

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 20

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln

20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys

35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr

85 90 95

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

100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

180 185 190

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

195 200 205

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
210 215 220

Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala
225 230 235 240

Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
245 250 255

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
260 265 270

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
275 280 285

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
290 295 300

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
305 310 315 320

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His
325 330 335

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg
340 345 350

Met Asp Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu Ala Cys Val Gln Phe Gln
355 360 365

Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala
370 375 380

Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val
385 390 395 400

Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His
405 410 415

Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr
420 425 430

Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr
435 440 445

Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg

450 455 460
 Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr
 465 470 475 480
 Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr
 485 490 495

 Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu
 500 505 510
 Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val
 515 520 525
 Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe
 530 535 540
 Gly Ala Phe Leu Leu
 545
 <210> 21
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 21
 Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
 1 5 10 15
 Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
 20 25 30
 Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
 35 40 45
 Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
 50 55 60

 Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
 65 70 75 80
 Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
 85 90 95
 Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu

100 105 110
Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

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

<210> 22

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 22

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

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

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly

115

120

125

Glu Phe Cys Val Leu

130

<210> 23

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 23

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys

1

5

10

15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln

20

25

30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys

35

40

45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

50

55

60

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

65

70

75

80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr

85

90

95

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

100

105

110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165	170	175	
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
180	185	190	
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
195	200	205	
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
210	215	220	
Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala			
225	230	235	240
Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln			
245	250	255	
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
260	265	270	
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
275	280	285	
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
290	295	300	
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu			
305	310	315	320
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His			
325	330	335	
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg			
340	345	350	
Met Asp Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val			
355	360	365	
Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln			
370	375	380	
Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn			
385	390	395	400
Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu			
405	410	415	

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln

420 425 430
Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
435 440 445
Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
450 455 460
Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
465 470 475 480
Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
485

<210> 24

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 24

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

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

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser

115 120 125
 Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser
 130 135 140

Lys Asp Glu Met Ala Ser

145 150

<210> 25

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 25

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His
 1 5 10 15

Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr
 20 25 30

Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr
 35 40 45

Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn
 50 55 60

Ile Ser Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn
 65 70 75 80

Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser
 85 90 95

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

Pro Ser Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg
 115 120 125

<210> 26

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 26

Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly

1 5 10 15

Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly

20 25 30

Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu

35 40 45

Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg

50 55 60

Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly

65 70 75 80

Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys

85 90 95

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

100 105 110

Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp

115 120 125

Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln

130 135 140

Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu

145 150 155 160

Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val

165 170 175

Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln

180 185 190

Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val

195 200 205

Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val

210 215 220

Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp

225 230

<210> 27

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 27

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

1 5 10 15

Gly Gly Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro

20 25 30

Phe Lys Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys

35 40 45

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

50 55 60

Gln Asp Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile

65 70 75 80

Cys Gln Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu

85 90 95

Lys Leu Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val

100 105 110

Thr Val Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu

115 120 125

Ser Gln Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val

130 135 140

Asn Val Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu

145 150 155 160

Asn Val Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp

165 170

<210> 28

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 28

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu

20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg

35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val

50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser

65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys

85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 29

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 29

His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp

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

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

130 135 140
Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu
145 150 155 160
Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser
165 170 175

Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe
180 185 190
Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr
195 200 205
Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
210 215
<210> 30
<211> 281
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 30
Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp
1 5 10 15
Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys
20 25 30
Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro
35 40 45
Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro
50 55 60
Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly
65 70 75 80
Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly
85 90 95
Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala
100 105 110
Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu
115 120 125
Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg
130 135 140
Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu
145 150 155 160

Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr

165 170 175

Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr

180 185 190

Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser

195 200 205

His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met

210 215 220

Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala

225 230 235 240

Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His

245 250 255

Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser

260 265 270

Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu

275 280

<210> 31

<211> 179

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<

400> 31

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

1 5 10 15

Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Lys Gln Ile Gly His Pro

20 25 30

Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr

35 40 45

Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr

50 55 60

Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val

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

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

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<400> 34

000

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<211> 202

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 36

Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
20 25 30
Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
35 40 45
Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
50 55 60
Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
65 70 75 80
Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
85 90 95
Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
100 105 110
Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
115 120 125
Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
130 135 140
Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
145 150 155 160
Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
165 170 175
Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
180 185 190
Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly
195 200
<210> 37
<211> 181
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 37

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1 5 10 15
Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30
Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45
Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60
Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65 70 75 80
Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
85 90 95
Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110
Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125
Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140
Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160
Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175
Thr Ile Arg Ile Gly
180
<210> 38
<211> 150
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 38
Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Ala
1 5 10 15

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

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

85 90 95
Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys
100 105 110
Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile
115 120 125
Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg
130 135 140
Ile Ala Ser Phe Pro Gly
145 150

<210> 39

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 39

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

50						55						60					
Leu	Ser	Trp	Gln	Ala	Pro	Ser	His	Leu	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Pro	Val		
65			70			75			80								
Ser	Leu	Asn	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Val	Cys	Trp	Ala	Ala	Val	Glu	Ile		
85				90				95									
Pro	Glu	Leu	Glu	Glu	Ala	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr	Arg	Leu	Phe	Val	Asp		
100					105					110							
Pro	Asp	Asp	Pro	Thr	Gln	Asn	Arg	Asn	Arg	Ile	Ala	Ser	Phe	Pro	Gly		
115			120			125											
<210>	40																
<211>	281																
<212>	PRT																
<213>	Artificial Sequence																
<220><223>	Synthetic Polypeptide																
<400>	40																
Met	Ala	Met	Met	Glu	Val	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Gln	Thr	Cys		
1		5		10		15											
Val	Leu	Ile	Val	Ile	Phe	Thr	Val	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Cys	Val	Ala		
20				25				30									
Val	Thr	Tyr	Val	Tyr	Phe	Thr	Asn	Glu	Leu	Lys	Gln	Met	Gln	Asp	Lys		
35			40			45											
Tyr	Ser	Lys	Ser	Gly	Ile	Ala	Cys	Phe	Leu	Lys	Glu	Asp	Asp	Ser	Tyr		
50		55		60													
Trp	Asp	Pro	Asn	Asp	Glu	Glu	Ser	Met	Asn	Ser	Pro	Cys	Trp	Gln	Val		
65			70			75			80								
Lys	Trp	Gln	Leu	Arg	Gln	Leu	Val	Arg	Lys	Met	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser		
85				90				95									
Glu	Glu	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Glu	Lys	Gln	Gln	Asn	Ile	Ser	Pro		
100					105					110							
Leu	Val	Arg	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln	Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile	Thr	Gly		
115			120			125											
Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Asn	Glu		

130 135 140
Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
145 150 155 160

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

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

<210> 41
<211> 243
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 41

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

Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr

50

55

60

Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly

65

70

75

80

Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn

85

90

95

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys

100

105

110

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn

115

120

125

Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr

130

135

140

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

145

150

155

160

Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr

165

170

175

Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys

180

185

190

Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly

195

200

205

Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn

210

215

220

Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe

225

230

235

240

Leu Val Gly

<210> 42

<211> 543

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 42

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His

1 5 10 15

Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr

20 25 30

Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr

35 40 45

Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn

50 55 60

Ile Ser Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn

65 70 75 80

Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg Ser

115 120 125

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met

145 150 155 160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln

165 170 175

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

180 185 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr

195 200 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

245 250 255

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

260 265 270

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

275 280 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

290 295 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val

305 310 315 320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu

325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

340 345 350

Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp Leu Gln Leu His Trp Arg Leu

355 360 365

Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp Glu

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu

405 410 415

Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu

465 470 475 480

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

485 490 495
Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His Leu

500 505 510
Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu Val

515 520 525
Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val

530 535 540

<210> 43

<211> 838

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 43

Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro

35 40 45

Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg

100 105 110

Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg

115 120 125

Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr

130 135 140

Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
145 150 155 160
Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
165 170 175
Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
180 185 190
Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
195 200 205

Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
210 215 220
Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
225 230 235 240
Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
245 250 255
Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
260 265 270

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

Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe
340 345 350
Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro
355 360 365
Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys
370 375 380
Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
645 650 655

Leu Gln Leu His Trp Arg Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp
660 665 670

Gly Pro Ala Gly Ser Trp Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His
675 680 685

Glu Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr
690 695 700

Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe
705 710 715 720

Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala
725 730 735

Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys
740 745 750

Pro Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr
755 760 765

Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro
770 775 780

Cys Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe
785 790 795 800

Leu Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg
805 810 815

Val Leu Asp Glu Arg Leu Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr
820 825 830

Phe Gly Ala Phe Met Val
835

<210> 44

<211> 597

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 44

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro

1 5 10 15

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp

20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg

35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn

50 55 60

Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr

65 70 75 80

Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile

85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys

100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro

115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala

165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

180 185 190

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

195 200 205

Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

210 215 220

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

225 230 235 240

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

245 250 255

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

260 265 270

Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys

275 280 285

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln

290 295 300

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met

305 310 315 320

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

325 330 335

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

340 345 350

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

355 360 365

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

370 375 380

Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

385 390 395 400

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp Leu

405 410 415

Gln Leu His Trp Arg Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly

420 425 430

Pro Ala Gly Ser Trp Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu

435 440 445

Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly

450 455 460

Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu

465 470 475 480

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

485 490 495
Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro

500 505 510
Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro

515 520 525
Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys

530 535 540
Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu

545 550 555 560
Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val

565 570 575
Leu Asp Glu Arg Leu Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe

580 585 590
Gly Ala Phe Met Val

595

<210> 45

<211> 569

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 45

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
1 5 10 15
Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln

20 25 30
Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys

35 40 45
Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

50 55 60
Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn

65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr

85 90 95

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

100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

180 185 190

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

195 200 205

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

275 280 285

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

290 295 300

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

305 310 315 320

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His

325 330 335
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg

340 345 350
Met Asp His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His

355 360 365
Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu

370 375 380
Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu

385 390 395 400
Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu

405 410 415
Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala

420 425 430
His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp

435 440 445
Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu

450 455 460
Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr

465 470 475 480
Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro

485 490 495
Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile

500 505 510
Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln

515 520 525
Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser

530 535 540
Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly

545 550 555 560
Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu

565

<210> 46

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 46

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195				200				205							
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys							
210				215											
<210>				47											
<211>				217											
<212>				PRT											
<213>				Artificial Sequence											
<220><223>				Synthetic Polypeptide											
<400>				47											
Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
1				5				10				15			
Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
20				25				30							
Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
35				40				45							
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
50				55				60							
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Thr	Pro	His
65				70				75				80			
Ser	Asp	Trp	Leu	Ser	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Ser	Lys
85				90				95							
Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln
100				105				110							
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met
115				120				125							
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
130				135				140							
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
145				150				155				160			
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215
 <210> 48
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide

 <400> 48
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 49

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

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 50

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

<210> 51

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 51

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
1 5

<210> 52

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 52

Ile Glu Gly Arg Met Asp

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 53

Gly Gly Gly Val Pro Arg Asp Cys Gly

1 5

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 54

Ile Glu Gly Arg Met Asp Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 55

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210>

> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 56

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

1 5 10

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 57

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr

1 5 10

<210> 58

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic Polypeptide

<400> 58

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 59

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

1 5 10

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 60

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 61

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu

1 5 10 15

Ala Ala Ala Arg

20

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 62

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala

1 5 10 15

Ser

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 63

Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 65

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 66

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 67

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser

1 5

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 68

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro

20

<210> 69

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 69

Cys Pro Pro Cys

1

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 71

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 72

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

1 5 10 15

<210> 73

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 73

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 74

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 74

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 75

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 76

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Ser

35

<210> 77

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

35 40

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 78

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

1 5 10 15

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 81

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 82

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 83

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 84

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5 10

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 85

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Ala

<210> 86

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 86

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala

20

<210> 87

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 87

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

20 25

<210> 88

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 88

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala

20 25 30

Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

35 40 45

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 89

Pro Ala Pro Ala Pro

1 5

<210> 90

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 90

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

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 91

<211> 12

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 91

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe

1 5 10

<210> 92

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 92

Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 93

Gly Ser Glu Ser Gly

1 5

<210> 94

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 94

Gly Ser Glu Gly Ser

1 5

<210> 95

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 95

Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Ser Ser Gly Glu Gly Ser Ser Ser

1 5 10 15

Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu

20 25 30

Gly Gly Ser

35

<210> 96

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 96

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu

1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

35 40 45

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

50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser

85 90 95
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
225 230

<210> 97

<211> 234

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 97

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

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

50

55

60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

65

70

75

80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Thr Pro His Ser Asp Trp Leu Ser

85

90

95

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

100

105

110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

115

120

125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

130

135

140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

145

150

155

160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

165

170

175

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

180

185

190

Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

195

200

205

Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

210

215

220

Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp

225

230

<210> 98

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 98

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu

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

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

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

 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220
 Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
 225 230
 <210> 99
 <211> 234
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 99

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu

1 5 10 15
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

20 25 30
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

35 40 45
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

50 55 60
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

65 70 75 80
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser

85 90 95
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser

100 105 110
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

115 120 125
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

130 135 140
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

145 150 155 160
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

165 170 175
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

180 185 190
Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

195 200 205
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

210 215 220

Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp

225 230

<210> 100

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 100

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu

1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu

20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

35 40 45

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

50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Thr Pro His Ser Asp Trp Leu Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

165 170 175

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

180 185 190

Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
225 230

<210> 101
<211> 234
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 101

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

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

 210 215 220
 Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
 225 230