



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월01일
(11) 등록번호 10-2653324
(24) 등록일자 2024년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/495 (2024.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2024.01)
C07K 14/715 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/495 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7017172
(22) 출원일자(국제) 2017년11월17일
심사청구일자 2020년11월12일
(85) 번역문제출일자 2019년06월14일
(65) 공개번호 10-2019-0077562
(43) 공개일자 2019년07월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/062358
(87) 국제공개번호 WO 2018/094244
국제공개일자 2018년05월24일
(30) 우선권주장
62/423,565 2016년11월17일 미국(US)
62/467,496 2017년03월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2009514541 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
2세븐티 바이오, 인코포레이티드
미국, 매사추세츠 02142, 캠브리지, 60 비니 스트리트
(72) 발명자
보열이나스 벤자민
미국, 매사추세츠 02446, 브루클라인, 아파트 1, 170 콜리지 스트리트
(74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 8 항

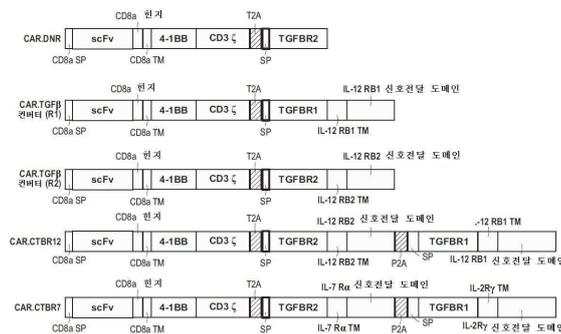
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 TGFβ 신호 컨버터

(57) 요약

본 개시내용은 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 및 면역결핍, 또는 이들과 관련된 병태 중 적어도 하나의 증상을 치료하거나, 예방하거나 또는 개선시키기 위한 양자 T 세포 요법을 위한 개선된 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/54 (2013.01)
C07K 14/5434 (2013.01)
C07K 14/7155 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C07K 2319/50 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02016122738 A1*
Liu X. et al, Cancer
Research, 76(6):pp.1578-1590 (2016. 3.15.)*
US20160075755 A1
US20180244797 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

다음을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 렌티바이러스 벡터:

(a) 하기 (i) 내지 (iii)을 포함하는 TGF β 2 폴리펩타이드:

- (i) TGF β 2의 세포외 TGF β 1-결합 도메인;
- (ii) IL-12R β 2 막관통 도메인; 및
- (iii) IL-12R β 2 세포내 신호전달 도메인

(b) 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및

(c) 하기 (i) 내지 (iii)을 포함하는 TGF β 1 폴리펩타이드:

- (i) TGF β 1의 세포외 TGF β 1-결합 도메인;
- (ii) IL-12R β 1 막관통 도메인; 및
- (iii) IL-12R β 1 세포내 신호전달 도메인.

청구항 7

제6항에 있어서, 융합 폴리펩타이드가 (i) 조작된 항원 수용체 및 (ii) 제2 폴리펩타이드 절단 신호 또는 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드를 더 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서, 조작된 항원 수용체가 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), DARIC 수용체 또는 이의 성분, 및 키메라 사이토카인 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되며; 선택적으로, 조작된 항원 수용체가 알파 엽산 수용체, 5T4, α v β 6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 패밀리, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 랩다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈(Survivin), TAG72, TEMs, VEGFR2, 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선

택된 항원을 인식하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 9

서열번호 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항의 렌티바이러스 벡터를 포함하는 세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포는

- (a) 조혈세포;
- (b) T 세포;
- (c) $CD3^+$, $CD4^+$, 또는 $CD8^+$ 세포;
- (d) 면역 효과기 세포;
- (e) 세포독성 T 림프구(CTL), 종양 침윤성 림프구(TIL) 또는 헬퍼 T 세포; 또는
- (f) 자연 살해(NK) 세포 또는 자연 살해 T(NKT) 세포인, 세포.

청구항 12

제10항의 세포를 포함하는, 암, 고형암, 혈액학적 악성종양, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 또는 면역결핍의 적어도 하나의 증상을 치료하는 데 사용하기 위한 조성물.

청구항 13

약제학적으로 허용가능한 담체 및 제10항의 세포를 포함하는, 암, 고형암, 혈액학적 악성종양, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 또는 면역결핍의 적어도 하나의 증상을 치료하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

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

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 미국 특허법(35 U.S.C. § 119(e)) 하에 2017년 3월 6일자로 출원된 미국 가출원 특허 제 62/467,496, 및 2016년 11월 17일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/423,565호의 우선권을 주장하며, 이들 각각은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] **서열목록에 관한 언급**

[0004] 본 출원과 관련된 서열목록은 종이 사본 대신에 텍스트 형식으로 제공되며, 여기서 본 명세서 내에 참고로 편입된다. 서열목록을 함유하는 텍스트 파일명은 BLBD_080_02WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 215KB이며, 2017년 11월 17일자로 생성되었고, 본 명세서의 출원과 동시에 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출 중에 있다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 개시내용은 개선된 양자 세포 요법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 개시내용은 개선된 신호전달 분자, 세포, 및 이를 이용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 암의 전세계적 부담은 1975 내지 2000년에 2배가 되었다. 암은 전세계적으로 이환율 및 사망률의 두 번째 주된 원인이며, 2012년에 대략 1천 4백 십만건의 새로운 사례 및 8백 2십만건의 암관련 사망이 있었다. 가장 통상적인 암은 유방암, 폐 및 기관지암, 전립선암, 결장 및 직장암, 방광암, 피부의 흑색종, 비호지킨 림프종, 갑상선암, 신장 및 신우암, 자궁내막암, 백혈병 및 췌장암이다. 새로운 암 사례의 수는 다음 20년 내에 2천 2백만건까지 상승할 것으로 추정된다.

[0008] 면역계는 인간암을 검출하고 이와 싸우는데 중요한 역할을 가진다. 다수의 형질전환된 세포는 면역 보조에 의해 빠르게 검출되며, 클론 발현된 T 세포 수용체(T cell receptor: TCR)를 통한 항원-특이적 T 세포의 활성화를 통해 파괴된다. 따라서, 암은 질환을 지속적으로 억제하고 제거하기 위한 필요한 항-종양 반응을 시작하기 위한 면역계의 부진인 면역학적 장애로 고려될 수 있다. 암과 더 효과적으로 싸우기 위해, 마지막 몇 십년에 걸쳐 진행된 특정 면역요법 개입은 T 세포 면역을 향상시키는 데 특별하게 중점을 두었다. 이들 치료는 질환 관해의 산발적 사례만을 수득하였고, 실질적인 전반적 성공을 갖지 않았다. T 세포 활성화를 저해하는 분자, 예컨대 CTLA-4 또는 PD-1를 표적화하는 단클론성 항체를 사용하는 더 최적의 요법은 더 실질적인 항 종양 효과를 나타내었지만; 그러나, 이들 치료는 또한 전신 면역계에 기인하여 실질적인 독성과 관련된다.

[0009] 더 최근에, T 세포의 단리, 변형, 확장 및 재주입에 기반한 적응 세포 면역요법 전략은 초기 임상 시험에서 연구되고 시험되었다. T 세포는 종종 그들의 선택적 인식 및 강력한 효과기 메커니즘에 기인하여 암에 대한 선택의 효과기 세포가 되었다. 이들 치료는 혼합된 비율의 성장을 나타내었지만, 소수의 환자는 T 세포 기반 면역요법에 대한 아직까지 실현되지 않은 잠재력을 강조하는 지속 가능한 관해를 경험하였다.

[0010] 세포용해 T 세포에 의한 종양 세포 관련 항원의 성공적인 인식은 표적화된 종양 용해를 개시하며, 임의의 효과적인 암 면역요법 접근을 뒷받침한다. 종양-침윤성 T 세포(Tumor-infiltrating T cell: TIL)는 TCR과 특별하게 관련된 종양-관련 항원을 발현시키지만; 그러나, TIL의 실질적인 수는 소수의 인간암으로 제한된다. 조작된 T

세포 수용체(TCR) 및 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)는 다수의 암 및 다른 면역 장애에 대한 T 세포-기반 면역요법의 적용 가능성을 잠재적으로 증가시킨다.

- [0011] 추가로, 당업계의 조작된 T 세포는 암세포, 면역억증 세포, 기질 세포 및 사이토카인으로 이루어진 복잡한 면역 억제 종양 미세환경에 의해 여전히 조절된다. 이들 성분 중에서, 암세포, 면역억증 세포 및 억제 사이토카인은 T 세포 표현형 및 기능에 유해하게 영향을 미친다. 총괄적으로, 종양 미세환경은 T 세포가 마지막에 고갈된 T 세포로 분화되도록 유도한다.
- [0012] T 세포 고갈은 저해 수용체의 증가된 발현 또는 저해 수용체의 증가된 신호전달; 감소된 효과기 사이토카인 생산; 및 암을 지속하고 제거하는 감소된 능력에 의해 나타난 만성 환경에서의 T 세포 기능 장애 상태이다. 고갈된 T 세포는 또한 계층적 방식으로 기능 상실을 나타낸다: 감소된 IL-2 생산 및 생체의 사멸 능력은 고갈의 초기 단계에서 상실되며, TNF- α 생산은 중기에 상실되고, IFN- γ 및 GzmB 생산은 진행된 고갈 단계에서 상실된다. 종양 미세환경에서 대부분의 T 세포는 고갈된 T 세포로 분화되며, 암을 제거하는 능력을 상실하고, 궁극적으로 클리어런스된다.
- [0013] 형질전환 성장인자 베타(TGF β)는 종양 미세환경에서 면역억제 신호전달 분자로서 연루된 다면발현성 사이토카인이다. TGF β 는 TGF β R1 및 TGF β R2 세린/트레오닌 키나제 수용체 복합체에 결합하여, 하류의 전사 인자 Smad2 및 Smad3의 수용체-매개 인산화를 초래한다. 다수의 종양은 TGF β R2 수용체 및/또는 하류의 Smad 신호전달 단백질에서 돌연변이를 획득함으로써 세포증식억제 및 항-증식 효과를 피한다. TGF β 는 IFN γ 분비를 비롯한, 시험관내 T 세포의 효과기 및 세포용해 활성화에 연루된 중요한 분자를 억제한다.
- [0014] 지금까지, 중성 Ab 또는 키나제 저해제를 이용하는 TGF β 신호전달의 저해와 관련된 임상 시도는 실망스러운 결과를 얻었고, 상당한 치료적 이점은 아직 보고되지 않았다.

발명의 내용

- [0015] 본 개시내용은 일반적으로, 부분적으로, 개선된 TGF β 신호 컨버터(TGF β signal convertor)(키메라 TGF β 수용체 또는 CTBR), 유전자 변형된 세포, 조성물, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.
- [0016] 다양한 실시형태에서, TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드가 상정된다.
- [0017] 추가적인 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체, 또는 톨-유사 수용체로부터 단리된다.
- [0018] 특정 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체, 또는 톨-유사 수용체로부터 단리된다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IL-12R β 2 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IL-12R β 1 세포내 신호전달 도메인이다. 다양한 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-12R β 2 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-12R β 1 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR12 또는 CTBR12 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0020] 소정의 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IL-12R β 1 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IL-12R β 2 세포내 신호전달 도메인이다. 추가적 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-12R β 1 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-12R β 2 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR12 또는 CTBR12 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0021] 추가적인 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인이다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-7R α 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-2R γ 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR7 또는 CTBR7 신호 컨버터로서 지칭된다.

다양한 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-1RAP 막관통 도메인을 포함한다. 추가적 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-1RL2 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR36 또는 CTBR36 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0032] 특정 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IL-1RL2 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인이다. 소정의 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-1RL2 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IL-1RAP 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR36 또는 CTBR36 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0033] 다양한 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IFNAR1 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IFNAR2 세포내 신호전달 도메인이다. 추가적 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IFNAR1 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IFNAR2 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBRIFN1 또는 CTBRIFN1 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0034] 다양한 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IFNAR2 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 IFNAR1 세포내 신호전달 도메인이다. 소정의 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IFNAR2 막관통 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 IFNAR1 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.IFN1 또는 CTBR.IFN1 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0035] 추가적 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR1 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR1 세포내 신호전달 도메인이다. 추가적인 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR1 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR1 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR1 또는 CTBR.TLR1 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0036] 특정 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR2 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR2 세포내 신호전달 도메인이다. 소정의 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR2 막관통 도메인을 포함한다. 추가적 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR2 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR2 또는 CTBR.TLR2 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0037] 다양한 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR3 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR3 세포내 신호전달 도메인이다. 추가적 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR3 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR3 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR3 또는 CTBR.TLR3 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0038] 다양한 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR4 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR4 세포내 신호전달 도메인이다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR4 막관통 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR4 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR4 또는 CTBR.TLR4 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0039] 추가적인 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR5 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR5 세포내 신호전달 도메인이다. 특정 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR5 막관통 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR5 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR5 또는 CTBR.TLR5 신호 컨버터로서 지칭된다.

[0040] 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR6 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR6 세포내 신호전달 도메인이다. 추가적 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR6 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR6 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR6 또

는 CTBR.TLR6 신호 컨버터로서 지칭된다.

- [0041] 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR7 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR7 세포내 신호전달 도메인이다. 다양한 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR7 막관통 도메인을 포함한다. 추가적 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR7 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR7 또는 CTBR.TLR7 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0042] 소정의 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR8 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR8 세포내 신호전달 도메인이다. 특정 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR8 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR8 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR8 또는 CTBR.TLR8 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0043] 다양한 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR9 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR9 세포내 신호전달 도메인이다. 추가적 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR9 막관통 도메인을 포함한다. 추가적인 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR9 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR9 또는 CTBR.TLR9 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0044] 소정의 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR10 세포내 신호전달 도메인이고, 제2 폴리펩타이드의 면역 수용체 세포내 신호전달 도메인은 TLR10 세포내 신호전달 도메인이다. 소정의 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR10 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드의 막관통 도메인은 TLR10 막관통 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR10 또는 CTBR.TLR10 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0045] 추가적 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성(self-cleaving) 폴리펩타이드이다.
- [0046] 다양한 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드이다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드는 구제역 바이러스(foot-and-mouth disease virus: FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(equine rhinitis A virus: ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(Thosea asigna virus: TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(porcine teschovirus-1: PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드, 및 뇌심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0048] 특정 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-12R β 2 막관통 도메인, 및 IL-12R β 2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-12R β 1 막관통 도메인, 및 IL-12R β 1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR12 또는 CTBR12 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0049] 다양한 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-12R β 1 막관통 도메인 및 IL-12R β 1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-12R β 2 막관통 도메인, 및 IL-12R β 2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR12 또는 CTBR12 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0050] 추가적인 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-7R α 막관통 도메인, 및 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-2R γ 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR7 또는 CTBR7 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0051] 특정 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-2R γ 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-7R α 막관통 도메인, 및 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인을 포함하는

TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR7 또는 CTBR7 신호 컨버터로서 지칭된다.

- [0052] 소정의 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-2R β 막관통 도메인, 및 IL-2R β 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-2R γ 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR15 또는 CTBR15 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0053] 다양한 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-2R γ 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-2R β 막관통 도메인, 및 IL-2R β 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR15 또는 CTBR15 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0054] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-21R 막관통 도메인, 및 IL-21R 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-2R γ 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR21 또는 CTBR21 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0055] 소정의 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-2R γ 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-21R 막관통 도메인, 및 IL-21R 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 TBR21 또는 CTBR21 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0056] 다양한 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-18R1 막관통 도메인, 및 IL-18R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-18RAP 막관통 도메인, 및 IL-18RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR18 또는 CTBR18 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0057] 추가적인 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-18RAP 막관통 도메인, 및 IL-18RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-18R1 막관통 도메인, 및 IL-18R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR18 또는 CTBR18 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0058] 특정 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-1R1 막관통 도메인, 및 IL-1R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-1RAP 막관통 도메인, 및 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR36 또는 CTBR36 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0059] 소정의 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-1RAP 막관통 도메인, 및 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IL-1R1 막관통 도메인, 및 IL-1R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR36 또는 CTBR36 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0060] 다양한 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IFNAR1 막관통 도메인, 및 IFNAR1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R2 폴리펩타이드; 바이러스 자기-절단성 2A 펩타이드; 및 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IFNAR2 막관통 도메인, 및 IFNAR2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 TGF β R1 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.IFN1 또는 CTBR.IFN1 신호 컨버터로서 지칭된다.
- [0061] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, IFNAR2 막관통 도메인, 및

폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 CTBR.TLR10 또는 CTBR.TLR10 신호 컨버터로서 지칭된다.

- [0072] 일부 실시형태에서, 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드, 및 뇌심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0073] 추가적 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 융합 폴리펩타이드는 조작된 항원 수용체 및 제2 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드를 추가로 포함한다.
- [0074] 소정의 실시형태에서, 제2 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드, 및 뇌심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0075] 특정 실시형태에서, 조작된 항원 수용체는 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), DARIC 수용체 또는 이의 성분, 및 키메라 사이토카인 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되되; 선택적으로, 조작된 항원 수용체는 알파 엽산 수용체, 5T4, $\alpha v \beta 6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 패밀리, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R $\alpha 2$, 람다, 루이스-Y, 카파, 메스텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEMs, VEGFR2 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선택된 항원을 인식한다.
- [0076] 추가적 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 서열번호 26 내지 35 중 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0077] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [0078] 추가적인 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 폴리뉴클레오타이드 또는 융합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 제공된다.
- [0079] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 융합 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 세포가 제공된다.
- [0080] 추가적 실시형태에서, 세포는 조혈세포이다.
- [0081] 소정의 실시형태에서, 세포는 T 세포이다.
- [0082] 다양한 실시형태에서, 세포는 CD3⁺, CD4⁺, 및/또는 CD8⁺ 세포이다.
- [0083] 일부 실시형태에서, 세포는 면역 효과기 세포이다.
- [0084] 추가적인 실시형태에서, 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), 중앙 침윤성 림프구(TIL) 또는 헬퍼 T 세포이다.
- [0085] 추가적 실시형태에서, 세포는 자연 살해(NK) 세포 또는 자연 살해 T(NKT) 세포이다.
- [0086] 특정 실시형태에서, 세포의 공급원은 말초혈액 단핵세포, 골수, 림프절 조직, 체대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 또는 종양이다.
- [0087] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 융합 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 조작된 항원 수용체를 추가로 포함한다.
- [0088] 다양한 실시형태에서, 조작된 항원 수용체는 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), DARIC 수용체 또는 이의 성분, 및 키메라 사이토카인 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0089] 추가적인 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 융합 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포를 포함하는 조성물이 제공된다.

- [0090] 특정 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 및 본 명세서에 상정된 용합 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0091] 소정의 실시형태에서, 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법은 대상체에게 유효량의 본 명세서에 상정된 조성물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0092] 일부 실시형태에서, 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 및 면역결핍, 또는 이들과 관련된 병태 중 적어도 하나의 증상을 치료, 예방 또는 개선시키는 방법은 대상체에게 유효량의 본 명세서에 상정된 조성물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0093] 추가적인 실시형태에서, 고형암을 치료하는 방법은 대상체에게 유효량의 본 명세서에 상정된 조성물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0094] 다양한 실시형태에서, 고형암은 간암, 췌장암, 폐암, 유방암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 뇌암, 육종, 두경부암, 골암, 갑상선암, 신장암 또는 피부암을 포함한다.
- [0095] 특정 실시형태에서, 고형암은 췌장암, 폐암 또는 유방암이다.
- [0096] 소정의 실시형태에서, 대상체에게 유효량의 본 명세서에 상정된 조성물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 혈액학적 악성종양을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0097] 다양한 실시형태에서, 혈액학적 악성종양은 백혈병, 림프종 또는 다발성 골수종이다.

도면의 간단한 설명

- [0098] **도 1**은 키메라 항원 수용체(CAR) 및 TGFβ 우성 음성 수용체(CAR.DNR); CAR 및 TGFβ R2 소단위(R2); CAR 및 CTBR12 신호 컨버터(CAR.CTBR12), 및 CAR 및 CTBR7 신호 컨버터(CAR.CTBR7)를 암호화하는 폴리펩타이드의 삽도를 도시한 도면.
- 도 2**는 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR, TGFβ R2 소단위 및 CTBR12 신호 컨버터와 조합하여 형질도입된 1차 인간 T 세포에서의 CAR 및 TGFβ R2 소단위 발현을 도시한 도면.
- 도 3**은 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR, TGFβ R2 소단위 및 CTBR12 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고, 비처리 세포에 비교되는 TGFβ1로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-SMAD2/3 발현을 도시한 도면.
- 도 4**는 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR, TGFβ R2 소단위 및 CTBR12 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고, IL-12(상부 행) 또는 TGFβ1(하부 행) 중 하나로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-STAT4 발현을 도시한 도면.
- 도 5**는 항-ROR1 CAR 및 CTBR12 신호 컨버터로 형질도입되고 IL-12(좌측 패널) 또는 TGFβ1(우측 패널) 중 하나로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-STAT4 및 포스포-STAT5 발현을 도시한 도면.
- 도 6**은 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 21일 동안 표적 세포를 발현시키는 ROR1에 의해 연속적으로 재자극된 CTBR12 신호 컨버터와 조합된 항-ROR1 CAR로 형질도입된 1차 인간 T 세포로부터의 유전자 발현 분석을 도시한 도면.
- 도 7**은 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR 또는 CTBR12 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고, CD3 또는 ROR1로 코팅된 플레이트 상에서 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 배양된 1차 인간 T 세포로부터의 IFNγ 분비를 도시한 도면.
- 도 8**은 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 표적 세포를 발현시키는 ROR1로 연속적으로 재자극된 TGFβ DNR 또는 CTBR12 신호 컨버터와 조합하여 형질도입된 1차 인간 T 세포에 대한 성장 곡선을 도시한 도면.
- 도 9**는 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR 및 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입된 1차 인간 T 세포에서의 CAR 및 TGFβ R2 소단위 발현을 도시한 도면.
- 도 10**은 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR 및 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고, TGFβ1로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-SMAD2/3 발현을 도시한 도면.
- 도 11**은 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR 및 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입된, 그리고 TGFβ1

로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-STAT5 발현을 도시한 도면.

도 12는 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR 및 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고 TGFβ1로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 BCL2 발현을 도시한 도면.

도 13은 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 TGFβ DNR 또는 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입된 1차 인간 T 세포에 대한 성장 곡선을 도시한 도면.

도 14는 항-ROR1 CAR 단독으로 그리고 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 표적 세포를 발현시키는 ROR1로 연속적으로 재자극된 TGFβ DNR 또는 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입된 1차 인간 T 세포에 대한 성장 곡선을 도시한 도면.

도 15는 항-EGFR CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR, CTBR12 신호 컨버터 및 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입된 1차 인간 T 세포에서의 CAR 및 TGFβR2 소단위 발현을 도시한 도면(상부 패널). 도 15는 항-EGFR CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR, CTBR12 신호 컨버터 및 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고 비처리 세포와 비교되는 TGFβ1로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-SMAD2/3 발현을 도시한 도면(하부 패널).

도 16은 항-EGFR CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR 및 CTBR12 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고, IL-12 또는 TGFβ1로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-STAT4 발현을 도시한 도면.

도 17은 항-EGFR CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR 및 CTBR7 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고, IL-7 또는 TGFβ1 중 하나로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-STAT5 발현을 도시한 도면.

도 18은 항-EGFR CAR 단독으로 그리고 TGFβ DNR 또는 CTBR12 신호 컨버터와 조합하여 형질도입되고, TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 EGFR (-) 또는 EGFR (+) 세포주와 함께 배양된 1차 인간 T 세포로부터의 IFNγ 분비를 도시한 도면.

도 19는 항-EGFR CAR 단독으로 그리고 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 EGFR 발현 표적 세포로 연속적으로 재자극된 TGFβ DNR, CTBR12 신호 컨버터 또는 CTBR7 신호 컨버터로 형질도입된 1차 인간 T 세포에 대한 성장 곡선을 도시한 도면.

도 20은 NY-ESO1(A2), NY-ESO1 TCR 및 TGFβ 우성 음성 수용체(NY-ESO1.DNR); NY-ESO1 TCR 및 CTBR7 신호 컨버터(NY-ESO1.CTBR7) 및 NY-ESO1 TCR 및 CTBR12 신호 컨버터(NY-ESO1.CTBR12)를 인식하는 T 세포 수용체(TCR)를 암호화하는 폴리펩타이드의 삽도를 도시한 도면.

도 21은 NY-ESO1 TCR, NY-ESO1.DNR, NY-ESO1.CTBR7 및 NY-ESO1.CTBR12로 형질도입되고 비처리 세포에 비교되는 TGFβ1로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-SMAD2/3 발현을 도시한 도면.

도 22는 NY-ESO1.CTBR7로 형질도입되고, IL-7 또는 TGFβ1 중 하나로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-STAT5 발현을 도시한 도면(상부 패널). 도 22는 또한 NY-ESO1.CTBR12로 형질도입되고 IL-12 또는 TGFβ1 중 하나로 처리된 1차 인간 T 세포에서의 포스포-STAT4 발현을 도시한 도면(하부 패널).

도 23은 NY-ESO1 TCR, NY-ESO1.DNR, NY-ESO1.CTBR7 및 NY-ESO1.CTBR12로 형질도입되고 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 A2(+).NY-ESO1(+) 세포주와 함께 배양시킨 1차 인간 T 세포로부터의 IFNγ 분비를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0099] 서열 식별자의 간단한 설명
- [0100] 서열번호 1은 인간 TGFβR1의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0101] 서열번호 2는 인간 TGFβR2의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0102] 서열번호 3은 인간 IL-12Rβ1(CD212)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다..
- [0103] 서열번호 4는 인간 IL-12Rβ2의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0104] 서열번호 5는 인간 IL-7Rα(CD127)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0105] 서열번호 6은 인간 IL-2Rγ(CD132)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다..
- [0106] 서열번호 7은 인간 IL-2Rβ(CD122)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.

- [0107] 서열번호 8은 인간 IL-21R(CD360)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0108] 서열번호 9는 인간 IL-18R1(CD218a)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0109] 서열번호 10은 인간 IL-18RAP (CD218b)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0110] 서열번호 11은 인간 IL-1R1(CD121a)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0111] 서열번호 12는 인간 IL-1RAP의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0112] 서열번호 13은 인간 IFNAR1의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0113] 서열번호 14는 인간 IFNAR2의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0114] 서열번호 15는 인간 IL-1RL2의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0115] 서열번호 16은 인간 TLR1(CD281)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0116] 서열번호 17은 인간 TLR2(CD282)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0117] 서열번호 18은 인간 TLR3(CD283)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0118] 서열번호 19는 인간 TLR4(CD284)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0119] 서열번호 20은 인간 TLR5(CD285)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0120] 서열번호 21은 인간 TLR6(CD286)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0121] 서열번호 22는 인간 TLR7(CD287)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0122] 서열번호 23은 인간 TLR8(CD288)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0123] 서열번호 24는 인간 TLR9(CD289)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0124] 서열번호 25는 인간 TLR10(CD290)의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0125] 서열번호 26은 인간 TGF β 1의 세포외 도메인 및 인간 IL-12R β 1의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0126] 서열번호 27은 인간 TGF β 2의 세포외 도메인 및 인간 IL-12R β 2의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0127] 서열번호 28은 인간 TGF β 2의 세포외 도메인 및 인간 IL-12R β 2의 막관통 및 세포내 도메인, 폴리펩타이드 절단 서열, 및 인간 TGF β 1의 세포외 도메인 및 인간 IL-12R β 1의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0128] 서열번호 29는 키메라 항원 수용체, 폴리펩타이드 절단 서열, 인간 TGF β 2의 세포외 도메인 및 인간 IL-12R β 2의 막관통 및 세포내 도메인, 폴리펩타이드 절단 서열, 및 인간 TGF β 1의 세포외 도메인 및 인간 IL-12R β 1의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0129] 서열번호 30은 키메라 항원 수용체, 폴리펩타이드 절단 서열, 인간 TGF β 2의 세포외 도메인 및 인간 IL-12R β 2의 막관통 및 세포내 도메인, 폴리펩타이드 절단 서열, 및 인간 TGF β 1의 세포외 도메인 및 인간 IL-12R β 1의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다. X는 임의의 scFv 서열을 나타낸다.
- [0130] 서열번호 31은 인간 TGF β 1의 세포외 도메인 및 인간 IL-2R γ 의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0131] 서열번호 32는 인간 TGF β 2의 세포외 도메인 및 인간 IL-7R α 의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0132] 서열번호 33은 인간 TGF β 2의 세포외 도메인 및 인간 IL-7R α 의 막관통 및 세포내 도메인, 폴리펩타이드 절단 서열, 및 인간 TGF β 1의 세포외 도메인 및 인간 IL-2R γ 의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.
- [0133] 서열번호 34는 키메라 항원 수용체, 폴리펩타이드 절단 서열, 인간 TGF β 2의 세포외 도메인 및 인간 IL-7R α 의

막관통 및 세포내 도메인, 폴리펩타이드 절단 서열, 및 인간 TGFβR1의 세포의 도메인 및 인간 IL-2Rγ의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.

[0134] **서열번호 35**는 키메라 항원 수용체, 폴리펩타이드 절단 서열, 인간 TGFβR2의 세포의 도메인 및 인간 IL-7Rα의 막관통 및 세포내 도메인, 폴리펩타이드 절단 서열, 및 인간 TGFβR1의 세포의 도메인 및 인간 IL-2Rγ의 막관통 및 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 서열을 제시한다.

[0135] **서열번호 36 내지 46**은 다양한 링커의 아미노산 서열을 제시한다.

[0136] **서열번호 47 내지 71**은 프로테아제 절단 부위 및 자기-절단성 폴리펩타이드 절단 부위의 아미노산 서열을 제시한다.

[0137] **A. 개요**

[0138] 키메라 항원 수용체 발현 T 세포(CAR T 세포)는 혈액학적 악성종양에서 상당한 항-종양 활성을 입증하였다. 그러나, 고형 종양 적응증에서의 활성은 면역억제 고형 종양 미세환경(TME)에 기인하여 부분적으로 제한된다. 종양 세포 및 종양-침윤성 림프구에 의해 TGFβ를 포함하는 면역억제 사이토카인의 과발현은 면역억제 종양 미세환경에 기여한다. TGFβ는 다양한 메커니즘을 통해 T 세포 기능을 저해한다. TGFβ는 종양 전이 및 침윤, 면역 세포 기능의 저해, 및 암을 갖는 환자에서의 불량한 예후와 빈번하게 관련된다. 종양-특이적 CTL에서 TGFβR2를 통한 TGFβ 신호전달은 종양에서 그들의 기능 및 빈도를 약화시키며, 단클론성 항체에 의한 CD8⁺ T 세포에 대한 TGFβ 신호전달의 차단은 더 빠른 종양 감시 및 종양 부위에서 다수의 더 많은 CTL의 존재를 초래한다. 지금까지, 임상 상황에서 TGFβ를 저해하기 위한 전략은 상당한 치료적 이점을 초래하지 않았다.

[0139] 본 개시내용은 일반적으로 면역억제 TGFβ 신호를 면역자극 신호로 전환시키는 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드를 발현시키는 세포에 관한 것이다. 임의의 특정 이론에 의해 구속되는 일 없이, 본 명세서에 상정된 폴리펩타이드는, 면역자극 엔도도메인에 연결되고 면역 효과기 세포에서 공동발현될 때, TGFβ 노출 시 면역억제 신호로부터 면역 효과기 세포 활성 및 기능을 자극하는 면역자극 신호로 전환시킬 수 있는 TGFβR1 및 TGFβR2의 TGFβ 결합 도메인을 포함하는 TGFβ 신호 컨버터이다. 면역 효과기 세포에서 TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드의 공동발현은, 예를 들어, 전염증 사이토카인 분비를 회복 또는 증가시킴으로써 TGFβ의 면역억제 충격에 대한 세포 내성을 제공한다. 특히 바람직한 실시형태에서, TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드는 키메라 TGFβ 수용체 또는 CTBR로서 지칭된다.

[0140] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용은, 부분적으로, 면역억제 TGFβ 신호를, 하나 이상의 면역 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 통해 또는 이에 의해 매개된 면역자극 신호로 전환시키는 폴리펩타이드를 상정한다.

[0141] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용은, 부분적으로, 면역억제 TGFβ 신호를, 하나 이상의 사이토카인 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 통해 또는 이에 의해 매개된 면역자극 신호로 전환시키는 폴리펩타이드를 상정한다.

[0142] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용은, 부분적으로, 면역억제 TGFβ 신호를, 하나 이상의 인터류킨 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 통해 또는 이에 의해 매개된 면역자극 신호로 전환시키는 폴리펩타이드를 상정한다.

[0143] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용은, 부분적으로, 면역억제 TGFβ 신호를, 하나 이상의 패턴 인식 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 통해 또는 이에 의해 매개된 면역자극 신호로 전환시키는 폴리펩타이드를 상정한다.

[0144] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용은 부분적으로, 면역억제 TGFβ 신호를, 하나 이상의 톨-유사 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 통해 또는 이에 의해 매개된 면역자극 신호로 전환시키는 폴리펩타이드를 상정한다.

[0145] 특정 실시형태에서, 본 개시내용은, 부분적으로, TGFβ에 결합하는 TGFβR1 세포의 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 면역 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 포함하는 폴리펩타이드; 및 TGFβ에 결합하는 TGFβR2 세포의 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 면역 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 상정한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 절단 신호, 예를 들어, 2A 폴리펩타이드 절단 신호에 의해 서로에 대해 연결된다.

[0146] 특정 실시형태에서, 본 개시내용은, 부분적으로, TGFβ에 결합하는 TGFβR1 세포의 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 면역 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 포함하는 폴리펩타이드; 및 TGFβ에 결합하는 TGFβR2 세포의 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 면역 수용체의 하나 이상의 세포내 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 발현시키는 면역 효과기 세포, 예를 들어, CAR T 세포를 상정한다.

- [0147] 특정 실시형태에서, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인은 IL-12 수용체, IL-7 수용체, IL-15 수용체, IL-21 수용체, IL-2 수용체, IL-1 수용체, IL-18 수용체, IL-36 수용체, I형 IFN 수용체, TLR1 수용체, TLR2 수용체, TLR3 수용체, TLR4 수용체, TLR5 수용체, TLR6 수용체, TLR7 수용체, TLR8 수용체, TLR9 수용체 또는 TLR10 수용체로부터 단리된다.
- [0148] 특정 실시형태에서, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인은 IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, IL-1RL2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 또는 TLR10으로부터 단리된다.
- [0149] 특정 실시형태의 실행은, 달리 대조적으로 구체적으로 표시되지 않는 한, 당업계의 기술 내인 화학, 생화학, 유기 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기법, 유전자학, 면역학 및 세포 생물학의 통상적인 방법을 사용할 것이며, 이들 중 다수는 예시의 목적을 위해 이하에 기재한다. 이러한 기법은 문헌에 완전하게 설명된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*];뿐만 아니라 문헌[*Advances in Immunology*]과 같은 저널 내의 모노그래프를 참조.
- [0150] **B. 정의**
- [0151] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 특정 실시형태의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 조성물, 방법 및 물질의 바람직한 실시형태가 본 명세서에 기재된다. 본 개시내용의 목적을 위해, 다음의 용어를 이하에 정의한다.
- [0152] 단수의 항목은 본 명세서에서 항목의 문법적 대상의 하나 이상(즉, 적어도 하나, 또는 하나 이상)을 지칭하기 위해 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.
- [0153] 대안의(예를 들어, "또는")의 사용은 대안 중 하나, 둘 다, 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0154] 용어 "및/또는"은 대안 중 하나, 또는 둘 다를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0155] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 양, 수준, 값, 숫자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%만큼 변하는 기준 양, 수준, 값, 숫자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 일 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 양, 수준, 값, 숫자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 \pm 15%, \pm 10%, \pm 9%, \pm 8%, \pm 7%, \pm 6%, \pm 5%, \pm 4%, \pm 3%, \pm 2% 또는 \pm 1%의 기준 양, 수준, 값, 숫자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이의 범위를 지칭한다.
- [0156] 본 명세서 전체적으로, 문맥에서 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)", "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"은 단계들 또는 요소들의 언급된 단계 또는 요소 또는 그룹의 포함하지만, 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 단계들의 제외는 아니라는 것을 나타내는 것으로 이해될 것이다. "이루어진"은 어구 "이루어진"에 따르는 것을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않음을 의미한다. 따라서, 어구 "이루어진"은 열거된 요소가 필요하거나 또는 필수라는 것, 다른 요소가 존재하지 않을 수도 있다는 것을 나타낸다. "본질적으로 이루어진"은 어구 다음에 열거된 임의의 요소를 포함하며, 열거된 요소에 대해 본 개시내용에서 구체화된 활성 또는 작용을 방해하지 않거나 또는 기여하지 않는 다른 요소로 제한되지 않음을 의미한다. 따라서, 어구 "본질적으로 이루어진"은 열거된 요소가 필요하거나 또는 필수이지만, 열거된 요소의 활성 또는 작용에 실질적으로 영향을 미치는 다른 요소가 존재하지 않는다는 것을 나타낸다.

- [0157] 본 명세서 전체적으로 "일 실시형태", "실시형태", "특정 실시형태", "관련된 실시형태", "특정 실시형태", "추가적인 실시형태" 또는 "추가 실시형태" 또는 이들의 조합에 대한 언급은 실시형태와 관련하여 기재된 특정 특성, 구조 또는 특징이 적어도 일 실시형태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체적으로 다양한 곳에서 앞서 언급한 어구의 출현은 반드시 모두 동일한 실시형태에 관한 것은 아니다. 더 나아가, 특정 특성, 구조 또는 특징은 하나 이상의 실시형태에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 또한 일 실시형태에서 특징의 긍정적 인용은 특정 실시형태에서의 특성을 제외하기 위한 기초로서 작용한다는 것이 이해된다.
- [0158] "항원(Ag)"은 동물에게 주사 또는 흡수되는 조성물(예컨대 암-특이적 단백질을 포함하는 것)을 비롯한, 동물에서의 항체 생성 또는 T 세포 반응을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 물질을 지칭한다. 예시적 항원은 지질, 탄수화물, 다당류, 당단백질, 펩타이드 또는 핵산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 항원은 이중성 항원, 예컨대 개시된 항원에 의해 유도되는 것을 포함하는, 특정 체액성 또는 세포성 면역의 산물과 반응한다.
- [0159] "표적 항원" 또는 "관심 대상의 표적 항원"은 본 명세서에 상정된 결합 도메인이 결합하도록 설계된 항원이다. 특정 실시형태에서, 표적 항원은 알파 염산 수용체, 5T4, $\alpha\gamma\beta 6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 패밀리, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α , GD2, GD3, 글리코칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R $\alpha 2$, 램다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, STn, TAG72, TEMs, VEGFR2 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0160] 일 실시형태에서, 항원은 MHC-펩타이드 복합체, 예컨대 클래스 I MHC-펩타이드 복합체 또는 클래스 II MHC-펩타이드 복합체이다.
- [0161] 본 명세서에서 사용되는 용어, "결합 도메인", "세포외 도메인", "항원 결합 도메인", "세포외 결합 도메인", "세포외 항원 결합 도메인", "항원-특이적 결합 도메인" 및 "세포외 항원 특이적 결합 도메인"은 상호 호환적으로 사용되고, 관심 대상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 결합 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 결합 도메인의 예시적 예는 항체 및 이의 항원 결합 단편, FN3 도메인 및 DARPin을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0162] 본 명세서에서 사용되는 용어 "특이적 결합 친화도" 또는 "특이적으로 결합하다" 또는 "특이적으로 결합된" 또는 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 표적화하다"는 배경 결합보다 더 큰 결합 친화도로 표적 항원에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 기재한다. 결합 도메인이, 예를 들어, 약 $10^5 M^{-1}$ 이상의 친화도 또는 K_d (즉, $1/M$ 의 단위로 특정 결합 상호작용의 평형 결합 상수)로 표적 항원에 결합하거나 또는 회합된다면, 결합 도메인은 표적 항원에 "특이적으로 결합한다". 특정 실시형태에서, 결합 도메인(또는 이의 용합 단백질)은 약 $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ 또는 $10^{13} M^{-1}$ 이상의 K_d 로 표적 부위에 결합한다. "고친화도" 결합 도메인(또는 이의 단일쇄 용합 단백질)은 적어도 $10^7 M^{-1}$, 적어도 $10^8 M^{-1}$, 적어도 $10^9 M^{-1}$, 적어도 $10^{10} M^{-1}$, 적어도 $10^{11} M^{-1}$, 적어도 $10^{12} M^{-1}$, 적어도 $10^{13} M^{-1}$ 이상의 K_d 를 갖는 해당 결합 도메인을 지칭한다.
- [0163] 대안적으로, 친화도는 M 단위(예를 들어, $10^{-5} M$ 내지 $10^{-13} M$ 이하)를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(K_d)로서 정의될 수 있다. 결합 도메인 폴리펩타이드의 친화도는 통상적인 기법을 이용하여, 예를 들어, 경쟁적 ELISA(효소-결합 면역흡착 분석)에 의해 또는 결합 회합, 또는 표지 리간드를 이용하는 변위 분석에 의해, 또는 표면-플라즈몬 공명 장치, 예컨대 뉴저지주 피츠카타웨이에 소재한 비아코어 인코포레이티드(Biacore, Inc.)로부터 입수 가능한 비아코어 T100(Biacore T100), 또는 광학 바이오센서 기법, 예컨대 코닝사(Corning) 및 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)로부터 각각 입수 가능한 EPIC 시스템 또는 엔스파이어(EnSpire)를 이용하여 용이하게 결정될 수 있다(또한, 예를 들어, 문헌[Scatchard *et al.* (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660]; 및 미국 특허 제5,283,173호; 제5,468,614호 또는 동등물 참조).
- [0164] 일 실시형태에서, 특이적 결합의 친화도는 배경 결합보다 약 2배 초과, 배경 결합보다 약 5배 초과, 배경 결합보다 약 10배 초과, 배경 결합보다 약 20배 초과, 배경 결합보다 약 50배 초과, 배경 결합보다 약 100배 초과 또는 배경 결합보다 약 1000배 초과 또는 그 이상이다.

- [0165] "항체"는 항원 에피토프, 예컨대 항원 결정소, 예컨대 면역 세포에 의해 인식되는 것을 함유하는 지질, 탄수화물, 다당류, 당단백질, 펩타이드 또는 핵산을 특이적으로 인식하고 결합하는 적어도 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 결합체를 지칭한다.
- [0166] "에피토프" 또는 "항원 결정소"는 결합체가 결합하는 항원의 영역을 지칭한다.
- [0167] 항체는 이의 항원 결합 단편, 예컨대 낙타 Ig, Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'₂ 단편, F(ab)'₃ 단편, Fv, 단일쇄 Fv 단백질("scFv"), 이중-scFv, (scFv)₂, 미니바디, 다이어바디, 트라이어바디, 테트라바디, 이황화물 안정화된 Fv 단백질("dsFv") 및 단일-도메인 항체(sdAb, 나노바디) 및 항원 결합을 초래하는 전장 항체의 일부를 포함한다. 상기 용어는 또한 유전자 조작된 형태, 예컨대 키메라 항체(예를 들어, 인간화된 무린 항체), 이형접합체 항체(예컨대, 이중특이성 항체) 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 또한, 문헌[Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997] 참조.
- [0168] 당업자에 의해 이해되고 본 명세서의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 완전한 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 각각의 중쇄는 가변 영역 및 제1, 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어진 한편, 각각의 경쇄는 가변 영역 및 불변 영역으로 이루어진다. 포유류 중쇄는 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로서 분류된다. 포유류 경쇄는 μ 또는 λ 로서 분류된다. α , δ , ϵ , γ , 및 μ 중쇄를 포함하는 면역글로불린은 면역글로불린(Ig)A, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로서 분류된다. 완전한 항체는 "Y" 형상을 형성한다. Y의 줄기는 함께 결합된 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역(IgE 및 IgM에 대해, 제4 불변 영역)으로 이루어지고, 이황화결합(쇄간)은 힌지에서 형성된다. 중쇄 γ , α 및 δ 는 가요성을 더하기 위해 3개의 탠덤(한 줄) Ig 도메인 및 힌지 영역으로 구성된 불변 영역을 가지고; 중쇄 μ 및 ϵ 은 4개의 면역글로불린 도메인으로 구성된 불변 영역을 가진다. 제2 및 제3 불변 영역은 각각 "CH2 도메인" 및 "CH3 도메인"으로서 지칭된다. Y의 각각의 아암은 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 항원 결합을 초래한다.
- [0169] 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"로도 불리는 3개의 초가변 영역으로 가로막히는 "프레임워크" 영역을 함유한다. CDR은 통상적인 방법, 예컨대 문헌[Kabat *et al.* (Wu, TT and Kabat, E. A., *J Exp Med.* 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E. A., *PNAS*, 84: 2440-2443(1987); (본 명세서에 참고로 편집된 문헌[Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991] 참조)에 따른 서열에 의해, 또는 문헌[Chothia *et al* (Chothia, C. and Lesk, A.M., *J Mol. Biol.*, 196(4): 901-917 (1987), Chothia, C. *et al*, *Nature*, 342: 877 - 883(1989))]에 따른 구조에 의해 정해지거나 또는 동정될 수 있다.
- [0170] 경쇄 CDR을 예측하기 위한 규칙의 예시적 예는 약 잔기 24에서 시작하고 Cys이 앞에 오며, 약 10 내지 17개의 잔기이고, Trp이 이어지는 CDR-L1(전형적으로 Trp-Tyr-Gln뿐만 아니라 Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu); CDR-L1의 단부 다음의 약 16개의 잔기에서 시작하고, 일반적으로 Ile-Tyr뿐만 아니라 Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe이 앞에 오고, 7개의 잔기인 CDR-L2; 및 CDR-L2의 단부 다음의 약 33개의 잔기에서 시작하고, Cys이 앞에 오고, 7 내지 11개의 잔기이며, Phe-Gly-XXX-Gly(XXX는 임의의 아미노산임)이 이어지는 CDR-L3[서열번호 73]을 포함한다.
- [0171] 중쇄 CDR을 예측하기 위한 규칙의 예시적 예는 약 잔기 26에서 시작하고 Cys-XXX-XXX-XXX(서열번호 74)가 앞에 오며, 약 10 내지 12개의 잔기이고, Trp(전형적으로 Trp-Val뿐만 아니라 Trp-Ile, Trp-Ala)이 이어지는 CDR-H1; CDR-H1 단부 다음의 약 15개의 잔기에서 시작하고 Leu-Glu-Trp-Ile-Gly(서열번호 75)가 앞에 오며, 약 16 내지 19개의 잔기이고, Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala이 이어지는 CDR-H2; 및 CDR-H2 단부 다음의 약 33개의 잔기에서 시작하고 Cys-XXX-XXX(전형적으로 Cys-Ala-Arg)가 앞에 오며, 약 3 내지 25개의 잔기이고, Trp-Gly-XXX-Gly(서열번호 76)이 이어지는 CDR-H3을 포함한다.
- [0172] 일 실시형태에서, 경쇄 CDR 및 중쇄 CDR은 카바트 방법에 따라 결정된다.
- [0173] 일 실시형태에서, 경쇄 CDR 및 중쇄 CDR2 및 CDR3은 카바트 방법에 따라 결정되고, 중쇄 CDR1은 카바트 및 코티아 방법 사이에 포함되는 AbM 방법에 따라 결정된다, 예를 들어, 문헌[Whitelegg N & Rees AR, *Protein Eng.* 2000 Dec;13(12):819-24 및 *Methods Mol Biol.* 2004;248:51-91] 참조. CDR을 예측하기 위한 프로그램은, 예를 들어, AbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/)로부터 공공연하게 입수 가능하다.
- [0174] 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역 서열은 인간과 같은 종 내에서 상대적으로 보존된다. 구성성분 경쇄

및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인 항체의 프레임워크 영역은 3차원 공간에서 CDR의 자리를 잡고 정렬하는 역할을 한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합을 초래한다. 각각의 쇠의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작해서 순차적으로 넘버링된 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 지칭되고, 또한 전형적으로 특정 CDR이 위치한 쇠에 의해 동정된다. 따라서, 항체 중쇄의 가변 도메인에 위치한 CDR은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3으로서 지칭되는 반면, 항체의 경쇄의 가변 도메인에 위치한 CDR은 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로서 지칭된다. 상이한 특이성을 갖는 항체(즉, 상이한 항원에 대한 상이한 조합 부위)는 상이한 CDR을 가진다. 이는 항체에 따라 다른 CDR이지만, CDR 내에서 제한된 수의 아미노산 위치만이 항원 결합에 직접적으로 연루된다. CDR 내의 이들 위치는 특이성 결정 잔기(specificity determining residue: SDR)로 불린다.

[0175] "V_L" 또는 "VL"에 대한 언급은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 다른 항체를 포함하는 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0176] "V_H" 또는 "VH"에 대한 언급은 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 다른 항체 단편을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0177] "단클론성 항체"는 B 림프구의 단일 클론에 의해 또는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자가 형질감염된 세포에 의해 생성된 항체이다. 단클론성 항체는 당업자에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어, 면역 비장 세포와 골수종 세포의 융합으로부터의 혼성 항체-형성 세포를 생성함으로써 생성된다. 단클론성 항체는 인간화된 단클론성 항체를 포함한다.

[0178] "키메라 항체"는 인간과 같은 하나의 종으로부터의 프레임워크 잔기 및 마우스와 같은 다른 종으로부터의 CDR (일반적으로 항원 결합을 부여함)을 가진다. 특히 바람직한 실시형태에서, 항원-특이적 결합 도메인은 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0179] 특정 실시형태에서, 항체는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 인간 항체(예컨대 인간 단클론성 항체) 또는 이의 항원 결합 단편이다. 인간 항체는 인간-유래된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기 기재한 바와 같은 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 작제될 수 있다. 대안적으로, 인간 단클론성 항체는 혼성세포 방법에 의해 만들어질 수 있다. 인간 단클론성 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이형골수종 세포주는, 예를 들어, 문헌[Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001(1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)]에 의해 기재되었다. 추가로, 유전자이식 동물(예를 들어, 마우스)는 내인성 면역글로불린 생성의 부재 하에 인간 항체의 완전한 레퍼토리를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jakovovits *et al.*, *PNAS USA*, 90: 2551(1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33(1993)] 참조. 유전자 서플링은 또한 비인간으로부터의 인간 항체, 예를 들어, 설치류 항체를 유도하는 데 사용될 수 있으며, 인간 항체는 시작 비-인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 가진다. 1993년 4월 1일자에 공개된 국제 특허 출원 WO 93/06213 참조. CDR 접합에 의한 비-인간 항체의 전통적 인간화와 달리, 이 기법은 비인간 유래의 FR 또는 CDR 잔기가 없는 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0180] "인간화된" 항체는 인간 프레임워크 영역 및 비-인간(예를 들어, 마우스, 래트 또는 합성) 면역글로불린으로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린이다. CDR을 제공하는 비-인간 면역글로불린은 "공여자"로 칭해지며, 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린은 "억셉터"로 칭해진다. 일 실시형태에서, 모든 CDR은 인간화된 면역글로불린에서의 공여자 면역글로불린으로부터 유래된다. 불변 영역이 존재할 필요는 없지만, 그들이 있다면, 그들은 인간 면역글로불린 불변 영역과 실질적으로 동일, 즉, 적어도 약 85 내지 90%, 예컨대 약 95% 이상 동일하여야 한다. 따라서, 인간화된 면역글로불린의 모든 부분(가능하다면 CDR을 제외)은 천연 인간 면역글로불린 서열의 대응하는 부분에 실질적으로 동일하다. 인간화된 또는 다른 단클론성 항체는 항원 결합 또는 다른 면역글로불린 기능에 실질적으로 효과를 갖지 않는 추가적인 보존적 아미노산 치환을 가질 수 있다. 인간화된 항체는 유전자 조작에 의해 작제될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호 참조).

[0181] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "낙타 Ig" 또는 "낙타과 VH"는 중쇄 항체의 가장 작은 공지된 항원-결합 단위를 지칭한다(Koch-Nolte, *et al.*, *FASEB J.*, 21: 3490-3498(2007)). "중쇄 항체" 또는 "낙타과 항체"는 2개의 VH 도메인을 함유하고 경쇄가 없는 항체를 지칭한다(Riechmann L. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 231:25-38(1999); WO94/04678; WO94/25591; 미국 특허 제6,005,079).

[0182] "면역글로불린 신 항원 수용체"의 "IgNAR"은 하나의 가변적 신항원 수용체(VNAR) 도메인 및 5개의 불변 신항원

수용체(CNAR) 도메인의 동종이량체로 이루어진 상어 면역 레퍼토리로부터의 항체 부류를 지칭한다. IgNAR는 일부 가장 작은 것으로 알려진 면역글로불린-기반 단백질 스캐폴드를 나타내고, 고도로 안정하고, 효율적인 결합 특징을 가진다. 고유안정성은 (i) 뮤린 항체에서 발견된 통상적인 항체 VH 및 VL 도메인에 비해 상당한 수의 하전된 그리고 친수성 표면 노출 잔기를 제공하는 근본적인 Ig 스캐폴드; 및 (ii) 루프간 이황화 브리지, 및 루프 내 수소 결합의 패턴을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 루프에서 안정화시키는 구조적 특징 둘 다에 기여할 수 있다.

[0183] 항체의 파파인 분해는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편을 생성하며, 각각 단일 항원-결합 부위 및 잔여 "Fc" 단편을 가지며, 이의 명칭은 용이하게 결정화하는 그의 능력을 반영한다. 펩신 처리는 2개의 항원-조합 부위를 가지며 항원과 교차-연결할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 얻는다.

[0184] "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 일 실시형태에서, 2-쇄 Fv 중은 단단하게, 비공유 회합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 단일쇄 Fv(scFv) 종에서, 경쇄 및 중쇄가 2개의 쇠 Fv 종에서와 유사한 "이량체" 구조로 회합될 수 있도록, 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인은 가요성 펩타이드에 의해 공유 결합될 수 있다. 이는 이런 입체배치에서 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역(HVR)은 VH-VL 이량체의 표면 상의 항원-결합 부위를 정하도록 상호작용하는 것이다. 종합적으로, 6개의 HVR은 항체에 대한 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도에서라도, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 단지 3개의 HVR을 포함하는 Fv의 절반)조차 항원을 인식하고 결합하는 능력을 가진다.

[0185] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 소수의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유하는 Fab'에 대한 본 명세서의 표기이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 Fab' 단편의 쌍으로서 그들 사이의 시스테인을 생성하였다. 항체 단편의 다른 화학적 결합이 또한 공지되어 있다.

[0186] 용어 "다이어바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭하며, 이 단편들은 동일한 폴리펩타이드쇄에서 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다(VH-VL). 동일한 쇠 상에서 2개의 도메인 사이의 짝짓기를 허용하기에는 너무 짧은 링커를 이용함으로써, 도메인은 다른 쇠의 상보성 도메인과 짝짓도록 그리고 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강요된다. 다이어바디는 2가 또는 이중특이성일 수 있다. 다이어바디는, 예를 들어, 유럽 특허 제404,097호; WO 1993/01161; 문헌[Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 및 Hollinger *et al.*, *PNAS USA* 90: 6444-6448(1993)]에서 더 완전하게 기재된다. 트라이어바디 및 테트라바디는 또한 문헌[Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0187] "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb" 또는 "나노바디"는 항체 중쇄의 가변 영역(VH 도메인) 또는 항체 경쇄의 가변 영역(VL 도메인)으로 이루어진 항체 단편을 지칭한다(Holt, L., *et al*, *Trends in Biotechnology*, 21(11): 484-490).

[0188] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하되, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드쇄로 그리고 배향 중 하나로(예를 들어, VL-VH 또는 VH-VL) 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위해 요망되는 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는 VH와 VL 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해, 예를 들어, 문헌[**Pluckthün**, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315] 참조.

[0189] 단일쇄 항체는 목적으로 하는 표적에 특이적인 혼성세포의 V 영역 유전자로부터 클로닝될 수 있다. 이러한 혼성세포의 생성은 일상적이 되었다. 가변 영역 중쇄(V_H) 및 가변 영역 경쇄(V_L)를 클로닝하기 위해 사용될 수 있는 기법은, 예를 들어, 문헌[Orlandi *et al.*, *PNAS*, 1989; 86: 3833-3837]에 기재되었다.

[0190] "링커"는 분자의 적절한 간격 및 입체배치를 위해 첨가된 다양한 폴리펩타이드 도메인 사이의, 예를 들어, V_H와 V_L 도메인 사이의 복수의 아미노산 잔기를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 링커는 가변 영역 연결 서열이다. "가변 영역 연결 서열"은 얻어진 폴리펩타이드가 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 표적 분자에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하도록 V_H와 V_L 도메인을 연결하고, 2개의 서브-결합 도메인의 상호작용에 적합한 스페이스 기능을 제공하는 아미노산 서열이다. 특정 실시형태에서, 링커는 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 힌지 도메인, 다량체화 도메인, 막관통 도메인, 공자극 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인을

분리시킨다.

- [0191] 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 링커의 예시적 예는 다음의 아미노산 서열: GGG; DGGGS(서열번호 36); TGEKP(서열번호 37)(예를 들어, 문헌[Liu *et al.*, PNAS 5525-5530 (1997)] 참조); GRRR(서열번호 38)(Pomerantz *et al.* 1995, 상기 참조); (GGGS)_n, 여기서 n = 1, 2, 3, 4 또는 5(서열번호 39)(Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD(서열번호 40)(Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 41)(Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426), GRRRGGGS(서열번호 42); LRQRDGERP(서열번호 43); LRQKGGGSERP(서열번호 44); LRQK(GGG)₂ERP(서열번호 45)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 대안적으로, 가요성 링커는 DNA-결합 부위와 펩타이드 그 자체를 둘 다 모델링할 수 있는 컴퓨터 프로그램을 이용하여(Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103(1994) 또는 과거 디스플레이 방법에 의해 합리적으로 설계될 수 있다. 일 실시형태에서, 링커는 다음의 아미노산 서열을 포함한다: GSTSGSGKPGSGEGSTKG(서열번호 46)(Cooper *et al.*, Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).
- [0192] "스페이서 도메인"은 2개의 도메인을 분리시키는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일 실시형태에서, 스페이서 도메인은 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하기 위해 효과기 세포 표면으로부터 항원 결합 도메인이 떨어지게 이동시킨다(Patel *et al.*, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). 특정 실시형태에서, 스페이서 도메인은 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 다량체화 도메인, 막관통 도메인, 공자극 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인을 분리시킨다. 스페이서 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 스페이서 도메인은 하나 이상의 중쇄 불변 영역, 예를 들어, CH2 및 CH3을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 면역글로불린의 일부이다. 스페이서 도메인은 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0193] "힌지 도메인"은 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하기 위해 효과기 세포 표면으로부터 항원 결합 도메인이 떨어져서 자리잡는 데 어떤 역할을 하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드는 결합 도메인과 다량체화 도메인 사이, 결합 도메인과 막관통 도메인(TM) 사이 또는 다량체화 도메인과 막관통 도메인 사이에 하나 이상의 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 힌지 도메인은 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0194] "변경된 힌지 영역"은 (a) 30%까지의 아미노산 변화(예를 들어, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5%까지의 아미노산 치환 또는 결실)를 갖는 천연 유래 힌지 영역, (b) 30%까지의 아미노산 변화(예를 들어, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5%까지의 아미노산 치환 또는 결실)를 갖는 길이가 적어도 10개의 아미노산(예를 들어, 적어도 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산)인 천연 유래 힌지 영역의 일부, 또는 (c) (길이가 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15, 또는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산일 수 있는) 코어 힌지 영역을 포함하는 천연 유래 힌지 영역의 일부를 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역에서 하나 이상의 시스테인 잔기는 하나 이상의 다른 아미노산 잔기(예를 들어, 하나 이상의 세린 잔기)로 치환될 수 있다. 변경된 면역글로불린 힌지 영역은 대안적으로 또는 추가적으로 다른 아미노산 잔기(예를 들어, 세린 잔기)에 의해 치환된 야생형 면역글로불린 힌지 영역의 프롤린 잔기를 가질 수 있다.
- [0195] 본 명세서에서 사용되는 "다량체화 도메인"은 직접적으로 또는 브리징 분자를 통해 다른 상이한 폴리펩타이드와 우선적으로 상호작용하거나 또는 회합하는 폴리펩타이드를 지칭하되, 상이한 다량체화 도메인의 상호작용은 다량체화(즉, 이량체, 삼량체, 또는 동중이량체, 이형이량체, 동중삼량체, 이형삼량체, 동중다량체, 이형다량체일 수 있는 다중부 복합체의 형성)에 실질적으로 기여하거나 또는 이를 효율적으로 촉진시킨다. 다량체 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0196] 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 다량체화 도메인의 예시적 예는 FKBP 폴리펩타이드, FRB 폴리펩타이드, 칼시뉴린 폴리펩타이드, 사이클로필린 폴리펩타이드, 박테리아 DHFR 폴리펩타이드, PYL1 폴리펩타이드, ABI1 폴리펩타이드, GIB1 폴리펩타이드, GAI 폴리펩타이드 또는 이들의 변이체를 포함한다.
- [0197] "브리징 인자"는 2 이상의 다량체화 도메인과 회합되고 그 사이에 배치된 분자를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 다량체화 도메인은 브리징 인자의 존재하에서만 폴리펩타이드 복합체의 형성에 실질적으로 기여하거나 또는 이를 효율적으로 촉진시킨다. 특정 실시형태에서, 다량체화 도메인은 브리징 인자의 부재하에서 폴리펩타이드 복합체의 형성에 기여하지 않거나 또는 이를 효율적으로 촉진시키지 않는다. 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에

서 사용하는 데 적합한 브리징 인자의 예시적 예는 라파마이신(시롤리무스) 또는 이의 라팔로그, 쿠머마이신 또는 이의 유도체, 지베렐린 또는 이의 유도체, 아브시스산(ABA) 또는 이의 유도체, 메토틱렉세이트 또는 이의 유도체, 사이클로스포린 A 또는 이의 유도체, FKCsA 또는 이의 유도체, FKBP에 대한 트라이메토프림(Tmp)-합성 리간드(SLF) 또는 이의 유도체, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0198] 라파마이신 유사체(라팔로그)는 라팔로그의 구조가 본 명세서에 전문이 참고로 편집된 미국 특허 제6,649,595호에 개시된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 소정의 실시형태에서, 브리징 인자는 라파마이신에 비해 상당히 감소된 면역억제 효과를 갖는 라팔로그이다. 바람직한 실시형태에서, 라팔로그는 AP21967 유도체(또한 C-16-(S)-7-메틸인돌라파마이신, $IC_{50} = 10nM$, 화학적으로 변형된 비-면역억제 라파마이신 유사체로서 알려짐)이다.
- [0199] "실질적으로 감소된 면역억제 효과"는 임상적으로 또는 인간 면역억제 활성의 적절한 시험관내(예를 들어, T 세포 증식의 저해) 또는 생체내 대용물에서 측정된 동일 용량에 대해 관찰되거나 또는 예상된 면역억제 효과의 적어도 0.1 내지 0.005배 더 적음을 지칭한다.
- [0200] 본 명세서에서 사용되는, "고정 도메인"은 세포 표면에 대한 이량체화 가능한 수용체의 테더링, 고정 또는 회합을 촉진시키는 아미노산 서열 또는 다른 분자를 지칭한다. 예시적인 고정 도메인은 세포막에서 안정한 구조를 갖는 아미노산 서열 또는 당지질(또한 글리코실 포스파티딜이노시톨 또는 GPI로서 알려짐)의 첨가를 촉진시키는 아미노산 서열 등을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 앵커 도메인은 소수성 도메인(예를 들어, 막관통 도메인) 또는 GPI 신호 서열이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 앵커 도메인을 포함하되, 선택적으로 앵커 도메인은 GPI 분자이다.
- [0201] "막관통 도메인" 또는 "TM 도메인"은 세포의 혈장막에 폴리펩타이드를 고정시키는 도메인이다. TM 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0202] "세포내 신호전달 도메인"은 효과기 기능 신호를 전달하고 세포가 전문화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 보통 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있다면, 다수의 경우에, 전체 도메인을 사용하는 것은 필요하지 않다. 세포내 신호전달 도메인의 절단 부분이 사용되는 정도로, 이러한 절단된 부분은 그것이 효과기 기능 신호를 전달하는 한, 전체 도메인 대신에 사용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 전달하는 데 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.
- [0203] 용어 "효과기 기능" 또는 "효과기 세포 기능"은 면역 효과기 세포의 전문화된 기능을 지칭한다. 효과기 기능은 활성화, 사이토카인 생성, 증식 및 세포독성 인자의 방출을 포함하는 세포독성 활성화, 또는 면역 효과기 세포 상에서 발현된 수용체에 대한 항원 결합에 의해 유발된 다른 세포 반응을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0204] TCR 단독을 통해 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하다는 것과 2차 또는 공자극 신호가 또한 필요하다라는 것이 공지되어 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포내 신호전달 도메인의 2가지 별개의 부류(TCR을 통해 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 1차 신호전달 도메인(예를 들어, TCR/CD3 복합체) 및 2차 또는 공자극 신호를 제공하기 위한 항원-의존적 방식으로 작용하는 공자극 신호전달 도메인)에 의해 매개되는 것으로 언급될 수 있다.
- [0205] "1차 신호전달 도메인"은 자극 방법으로 또는 저해 방법으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절하는 신호전달 도메인을 지칭한다. 자극 방법으로 작용하는 1차 신호전달 도메인은 면역수용체 타이로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 1차 신호전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예시적 예는 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0206] 본 명세서에서 사용되는 용어 "공자극 신호전달 도메인" 또는 "공자극 도메인"은 공자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 지칭한다. 공자극 분자는 항원에 대한 결합 시 T 림프구의 효율적인 활성화 및 기능에 필요한 2차 신호를 제공하는 항원 수용체 또는 Fc 수용체 이외의 세포 표면 분자이다. 공자극 도메인으로부터 단리될 수 있는 이러한 공자극 분자의 예시적 예는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM 및 ZAP70을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0207] "면역 장애"는 면역계로부터 반응을 일으키는 질환을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 용어 "면역 장애"는 암, 자

가면역 질환 또는 면역결핍을 지칭한다. 일 실시형태에서, 면역 장애는 감염성 질환을 포함한다.

- [0208] 본 명세서에서 사용되는 용어 "암"은 일반적으로 비정상 세포가 제어 없이 분할되고 조직 근처에서 침윤할 수 있는 질환 또는 병태의 부류에 관한 것이다.
- [0209] 본 명세서에서 사용되는 용어 "악성종양"은 종양 세포의 그룹이 제어되지 않는 성장(즉, 정상 한계 이상의 분할), 침윤(즉, 인접한 조직 상의 침범 및 파괴) 및 전이(즉, 림프 또는 혈액을 통한 신체 내 다른 위치로의 확산) 중 하나 이상을 나타내는 암을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "전이하다"는 신체의 한 부분으로부터 다른 부분까지의 암의 확산을 지칭한다. 확산을 갖는 세포에 의해 형성된 종양은 "전이성 종양" 또는 "전이"로 불린다. 전이성 종양은 본래의(원발성) 종양에서와 유사한 세포를 함유한다.
- [0210] 본 명세서에서 사용되는 용어 "양성" 또는 "비악성"은 더 크게 성장할 수 있지만, 신체의 다른 부분으로 확산되지 않는 종양을 지칭한다. 양성 종양은 자기 제한적이며, 전형적으로 침윤하거나 또는 전이하지 않는다.
- [0211] "암세포"는 암성 성장의 개개 세포 또는 조직을 지칭한다. 암세포는 고형암과 액상암을 둘 다 포함한다. "종양" 또는 "종양 세포"는 일반적으로 양성, 전악성 또는 악성일 수 있는 세포의 비정상적 성장에 의해 형성되는 팽윤 또는 병변을 지칭한다. 대부분의 암은 종양을 형성하지만, 액상암, 예를 들어, 백혈병은 반드시 종양을 형성하지는 않는다. 종양을 형성하는 해당 암에 대해, 용어 암(세포)과 종양(세포)은 상호 호환적으로 사용된다. 개체에서 종양의 양은 종양의 수, 용적 또는 중량으로서 측정될 수 있는 "종양 부담"이다.
- [0212] 용어 "재발"은 개선 또는 관해 기가나 후에 암의 복귀, 또는 복귀의 징후 및 증상의 진단을 지칭한다.
- [0213] "관해"는 또한 "임상 관해"로서 지칭되고, 부분적 관해와 완전한 관해를 둘 다 포함한다. 특정 관해에서, 모두는 아니지만 일부 암 징후 및 증상은 사라졌다. 완전한 관해에서, 암이 여전히 신체에 있을 수도 있지만, 암의 모든 징후 및 증상은 사라졌다.
- [0214] "난치성"은 특정 치료제에 의하거나 요법에 대해 내성이 있거나 또는 비반응성인 암을 지칭한다. 암은 치료의 개시로부터 난치성(즉, 치료제에 대한 초기 노출에 대해 비반응성) 또는 제1 치료 기간 과정에 걸쳐 또는 후속적 치료 기간 동안에 치료제에 대해 발생하는 내성의 결과로서 난치성일 수 있다.
- [0215] "항원 음성"은 항원을 발현시키지 않거나 또는 무시할 만한 양의 검출 가능하지 않은 항원을 발현시키는 세포를 지칭한다. 일 실시형태에서, 항원 음성 세포는 항원에 관련된 수용체에 결합하지 않는다. 일 실시형태에서, 항원 음성 세포는 항원에 관련된 수용체에 실질적으로 결합하지 않는다.
- [0216] "자가면역 질환"은 신체가 그 자신의 조직의 일부 구성성분에 대해 면역원성(즉, 면역계) 반응을 생산하는 질환을 지칭한다. 다시 말해서, 면역계는 "자기" 및 표적으로서 신체 내의 일부 조직 또는 시스템을 인식하는 그의 능력을 상실하며, 그것이 외래 물질인 것처럼 공격한다. 자가면역 질환은 주로 하나의 기관이 영향받는 것(예를 들어, 용혈성 빈혈 및 항-면역 갑상선염) 및 자가면역 질환 과정이 다수의 조직을 통해 분산된 것(예를 들어, 전신 홍반 루푸스)로 분류될 수 있다. 예를 들어, 다발성 경화증은 뇌 및 척수의 신경섬유를 둘러싸는 수초를 공격하는 T 세포에 의해 야기되는 것으로 생각된다. 이는 협응의 상실, 쇠약 및 흐린 시력을 초래한다. 자가면역 질환은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 루푸스, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 용혈성 빈혈, 항면역 갑상선염, 전신 홍반성 루푸스, 셀리아병, 크론병, 결장염, 당뇨병, 경피증, 건선 등을 포함한다.
- [0217] "면역결핍"은 질환에 의해 또는 화학물질의 투여에 의해 면역계가 손상된 환자 상태를 의미한다. 이 병태는 시스템이 외래 물질을 방어하는 데 필요한 혈액 세포의 수 및 유형이 결여되게 한다. 면역결핍증 병태 또는 질환은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, AIDS(후천성 면역결핍 증후군), SCID(중증 합병 면역결핍 질환), 선택적 IgA 결핍증, 공통 가변 면역결핍증, X-연관 무감마글로불린혈증, 만성 육아종성 질환, 과-IgM 증후군 및 당뇨병을 포함한다.
- [0218] "감염성 질환"은 사람 간에 또는 유기체 간에 전염될 수 있고, 미생물 또는 바이러스 제체(예를 들어, 보통 감기)에 의해 야기되는 질환을 지칭한다. 감염성 질환은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 간염, 성적으로 전염되는 질환(예를 들어, 클라미디아, 임질), 결핵, HIV/AIDS, 디프테리아, 간염 B, 간염 C, 콜레라 및 인플루엔자를 포함한다.
- [0219] 본 명세서에서 사용되는 용어 "개체" 및 "대상체"는 종종 상호 호환적으로 사용되며, 본 명세서의 다른 곳에 상정된 조성물 및 방법으로 치료될 수 있는 암 또는 다른 면역 장애의 증상을 나타내는 임의의 동물을 지칭한다. 적합한 대상체(예를 들어, 환자)는 실험실 동물(예컨대, 마우스, 래트, 토끼 또는 기니픽), 농장 동물 및 가축

동물 또는 반려동물(예컨대, 고양이 또는 개)을 포함한다. 비인간 영장류 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체는 암 또는 다른 면역 장애로 진단되거나 또는 암 또는 다른 면역 장애를 가질 위험에 있는 인간 환자를 포함한다.

[0220] 본 명세서에서 사용되는 용어 "환자"는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 조성물 및 방법으로 치료될 수 있는 암 또는 다른 면역 장애로 진단된 대상체를 지칭한다.

[0221] 본 명세서에서 사용되는 "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 병리적 병태의 증상 또는 병리에 대한 임의의 유리한 또는 바람직한 효과를 포함하고, 치료 중인 질환 또는 병태 중 하나 이상의 측정 가능한 마커의 심지어 최소 감소를 포함할 수 있다. 치료는 선택적으로 질환 또는 병태의 감소 또는 질환 또는 병태 진행의 지연, 예를 들어, 종양 결과물의 지연을 수반할 수 있다. "치료"는 질환 또는 병태, 또는 이의 관련된 증상의 완전한 근절 또는 치유를 반드시 나타내지는 않는다.

[0222] 본 명세서에서 사용하는 바와 같은, "예방하다" 및 유사한 단어, 예컨대 "예방되는", "예방하는" 등은 질환 또는 병태의 발생 또는 재발 가능성을 예방하거나, 저해하거나 또는 감소시키기 위한 접근을 나타낸다. 또한 질환 또는 병태의 개시 또는 재발을 지연시키거나 또는 질환 또는 병태의 발생 또는 재발을 지연시키는 것을 지칭한다. 본 명세서에서 사용하는 바와 같은 "예방" 및 유사한 단어는 또한 질환 또는 병태의 개시 또는 재발 전에 질환 또는 병태의 강도, 효과, 증상 및/또는 부담을 감소시키는 것을 포함한다.

[0223] 본 명세서에서 사용되는 어구 "의 적어도 하나의 증상을 개선시키는"은 대상체에 대해 치료 중인 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상을 감소시키는 것을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 치료 중인 질환 또는 병태는 암이되, 개선될 하나 이상의 증상은 쇠약, 피로, 숨가쁨, 잦은 명 및 출혈, 빈번한 감염, 림프절 비대, 복부 팽창 또는 복부 통증(팽창된 복부 기관에 기인), 뼈 또는 관절 통증, 골절, 계획하지 않은 체중 감소, 식욕 부진, 도한, 지속적 미열 및 감소된 배뇨작용(손상된 신장 기능에 기인)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0224] "향상시키다" 또는 "촉진시키다" 또는 "증가시키다" 또는 "확장하다" 또는 "강화하다"는 일반적으로 비히클 또는 대조군 중 하나에 의해 야기되는 반응에 비해 더 큰 반응 생리적 반응(즉, 하류 효과)을 생산하거나, 유발하거나 또는 야기하기 위한 본 명세서에 상정된 조성물의 능력을 지칭한다. 측정 가능한 생리적 반응은, 특히 당 업계 및 본 명세서의 설명에서의 이해로부터 분명한 T 세포 확장, 활성화, 지속성, 사이토카인 분비의 증가 및/또는 암 세포 사멸 능력의 증가를 포함할 수 있다. "증가된" 또는 "향상된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이고, 비히클 또는 대조군에 의해 생산되는 반응의 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 이상(예를 들어, 500, 1000배)(그 사이의 그리고 1 초과의 모든 정수 및 소수점을 포함, 예를 들어, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등)인 증가를 포함할 수 있다.

[0225] "감소시키다" 또는 "낮추다" 또는 "줄이다" 또는 "줄어들게 하다" 또는 "없애다"는 일반적으로 비히클 또는 대조군 중 하나에 의해 야기되는 반응에 비해 더 적은 생리적 반응(즉, 하류 효과)을 생산하거나, 유발하거나 또는 야기하기 위한 본 명세서에 상정된 조성물의 능력을 지칭한다. "감소된" 또는 "줄어든" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이며, 비히클 또는 대조군 조성물에 의해 생산된 반응(기준 반응) 또는 특정 세포 계통에서의 반응의 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 이상(예를 들어, 500, 1000배)(그 사이의 그리고 1 초과의 모든 정수 및 소수점을 포함, 예를 들어, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등)인 감소를 포함할 수 있다.

[0226] "유지하다" 또는 "보존하다" 또는 "유지" 또는 "변화 없음" 또는 "통계학적 변화 없음" 또는 "실질적 감소 없음"은 일반적으로 비히클, 대조군 분자/조성물에 의해 야기되는 반응, 또는 특정 세포 계통에서의 반응에 비해, 세포에서 실질적으로 유사한 또는 비슷한 생리적 반응(즉, 하류 효과)를 생산하거나, 유발하거나 또는 야기하는 본 명세서에 상정된 조성물의 능력을 지칭한다. 비슷한 반응은 기준 반응과 유의하게 다르지 않거나 또는 측정 가능하게 다르지 않은 것이다.

[0227] C. TGFβ 신호 컨버터(키메라 TGFβ 수용체)

[0228] 특정 실시형태에서, TGFβ 1을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는 TGFβ에 대한 노출 시 면역자극 신호를 전달하는 TGFβ 신호 컨버터가 상정된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "TGFβ 신호 컨버터"는 종양 미세환경으로부터의 TGFβ 면역억제 신호를 T 세포에서 면역자극 신호로 전환시키는, 예를 들어, 면역 효과기 세포 활성화 및 기능을 자극하고, 전염증 사이토카인의 생산 및/또는 분비를 증가시키는 하나 이상의 비천연 유래 폴리펩타이드를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 용어 "TGFβ 신호 컨버터"는 용어 "키메라 TGFβ 수용체(들)" 또는 "CTBR" 또는 "CTBR 신호 컨버터"와 상호 호환적으로 사용된다.

- [0229] 특정 실시형태에서, CTBR 신호 컨버터는 TGF β R2의 세포외 TGF β -결합 도메인, 막관통 도메인, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체 및 톨-유사 수용체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 면역 수용체의 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R1의 세포외 TGF β -결합 도메인, 막관통 도메인, 및 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체 및 톨-유사 수용체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 면역 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 폴리펩타이드이다.
- [0230] 특정 실시형태에서, CTBR 신호 컨버터는 TGF β R2의 세포외 TGF β -결합 도메인, 막관통 도메인, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체 및 톨-유사 수용체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 면역 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R1의 세포외 TGF β -결합 도메인, 막관통 도메인, 및 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체 및 톨-유사 수용체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 면역 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 융합 폴리펩타이드이다.
- [0231] 다른 특정 실시형태에서, CTBR 신호 컨버터는 TGF β R2의 세포외 TGF β -결합 도메인, 막관통 도메인, 및 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체 및 톨-유사 수용체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 면역 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드; 및 TGF β R1의 세포외 TGF β -결합 도메인, 막관통 도메인, 및 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체 및 톨-유사 수용체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 면역 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다.
- [0232] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역 수용체"는 그의 동종 리간드에 결합 시 면역 반응을 조절하는 면역 세포 표면 상에서 발현되는 수용체를 지칭한다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 면역 수용체는 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 패턴 인식 수용체 및 톨-유사 수용체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않되, 면역 수용체를 통한 신호전달은 면역 반응을 자극한다.
- [0233] 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에서 사용될 수 있는 면역 수용체 막관통 및 세포내 신호전달 도메인의 예시적 예는 IL-12 수용체, IL-7 수용체, IL-15 수용체, IL-21 수용체, IL-2 수용체, IL-1 수용체, IL-18 수용체, IL-36 수용체, I형 IFN 수용체, TLR1 수용체, TLR2 수용체, TLR3 수용체, TLR4 수용체, TLR5 수용체, TLR6 수용체, TLR7 수용체, TLR8 수용체, TLR9 수용체, 또는 TLR10 수용체로부터 단리된 막관통 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0234] 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에서 사용될 수 있는 면역 수용체 막관통 및 세포내 신호전달 도메인의 추가적인 예시적 예는 IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, IL-1RL2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 또는 TLR10으로부터 단리된 막관통 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0235] 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에서 사용될 수 있는 사이토카인 수용체 막관통 및 세포내 신호전달 도메인의 예시적 예는 IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2 및 IL-1RL2로부터 단리된 막관통 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0236] 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에서 사용될 수 있는 인터류킨 수용체 막관통 및 세포내 신호전달 도메인의 예시적 예는 IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP 및 IL-1RL2로부터 단리된 막관통 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0237] 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에서 사용될 수 있는 톨-유사 수용체 막관통 및 세포내 신호전달 도메인의 예시적 예는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 및 TLR10으로부터 단리된 막관통 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0238] **1. CTBR12 신호 컨버터**
- [0239] 인터류킨-12(IL-12)는 부분적으로, IFN γ 발현을 증가시키고, T 세포 증식을 증가시키고, IL-12 신호전달을 강력하게 함으로써 T 세포 기능 및 활성을 촉진시키는 사이토카인이다. IL-12는 인터류킨 12 수용체, 베타 1(IL-12R β 1, 또한 CD212로서 알려짐) 및 인터류킨 12 수용체, 베타 2(IL-12R β 2)에 결합한다.
- [0240] IL-12R β 1 및 IL-12R β 2를 통한 IL-12 신호전달은 STAT3, STAT4 및 STAT5 인산화를 초래한다. 인산화된 STAT3/STAT4는 핵에 전위되고, IFN γ 프로모터에 결합하여 IFN γ 발현을 증가시켰다. 인산화된 STAT4는 또한 IFN γ 프로모터에 Jun 종양유전자(c-Jun)를 보충하여 IFN γ 발현을 증가시키고, IL-12R β 2의 전사를 증가시킴을

으로써 IL-12 신호전달을 강력하게 한다. STAT5 인산화는 T 세포 증식을 증가시킨다.

[0241] IL-12 신호전달은 IL-2R의 프로모터에 STAT4 및 c-Jun을 보충함으로써 인터류킨 2 수용체, 알파(IL-2R)의 발현을 증가시키고, 이에 의해 T 세포 증식을 향상시킨다.

[0242] 다양한 실시형태에서, 조작된 항원 수용체를 발현시키는 면역 효과기 세포를 포함하는 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR12 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR12 신호 컨버터 및 조작된 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다.

[0243] 특정 실시형태에서, CTBR12 신호 컨버터는 면역억제 TGFβ 신호를 IL-12-매개 면역자극 신호로 전환한다. 특정 실시형태에서 본 명세서에 상정된 CTBR12 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인 및 IL-12Rβ1 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-12Rβ2 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR12 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-12Rβ2 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인 및 IL-12Rβ1 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0244] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR12 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-12Rβ1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-12Rβ2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서 본 명세서에 상정된 CTBR12 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-12Rβ2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-12Rβ1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다.

[0245] 특정 실시형태에서, CTBR12 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인 및 IL-12Rβ1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-12Rβ2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다. 특정 실시형태에서, CTBR12 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-12Rβ2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인 및 IL-12Rβ1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다.

[0246] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR1 또는 TGFβR2의 막관통 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 IL-12Rβ1 또는 IL-12Rβ2의 막관통 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인 및 IL-12Rβ1 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인 및 IL-12Rβ2 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인 및 IL-12Rβ2 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인 및 IL-12Rβ1 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0247] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드; 더 바람직하게는, 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드; 및 더 바람직하게는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드, 및 너십근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 P2A 또는 T2A 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다.

[0248] **2. CTBR7 신호 컨버터**

[0249] 인터류킨-7(IL-7)은 부분적으로, T 세포 전구체 생존 및 증식을 개선시킴으로써 T 세포 기능 및 활성을 촉진시키는 사이토카인이다. IL-7은 인터류킨 7 수용체 알파(IL-7Rα, 또한 CD127로서 알려짐) 및 인터류킨 2 수용체, 공통 감마쇄(IL-2Rγ, 또한 CD132 및 γc로서 알려짐)에 결합한다. IL-7 신호전달은 JAK/STAT, PI-3K 및 Src 키나제 경로를 활성화시키고, 항-세포자멸사 유전자 및 T 세포 전구체의 증식을 촉진시키는 유전자의 전사를 초래한다.

- [0250] 다양한 실시형태에서, 조작된 항원 수용체를 발현시키는 면역 효과기 세포를 포함하는 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR7 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR7 신호 컨버터 및 조작된 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다.
- [0251] 특정 실시형태에서, TGF β 신호 컨버터는 면역억제 TGF β 신호를 IL-7-매개 면역자극 신호로 전환시킨다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR7 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR7 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0252] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR7 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR7 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 융합 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0253] 특정 실시형태에서, CTBR7 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다. 특정 실시형태에서, CTBR7 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-7R α 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다.
- [0254] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1 또는 TGF β R2의 막관통 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 IL-7R α 또는 IL-2R γ 의 막관통 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-7R α 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-2R γ 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-2R γ 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-7R α 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0255] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드; 더 바람직하게는, 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드; 및 더 바람직하게는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세야 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드 및 뇌심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 P2A 또는 T2A 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다.
- [0256] **3. CTBR15 신호 컨버터**
- [0257] 인터류킨-15(IL-15)는, 부분적으로, T 세포 전구체 생존 및 증식을 개선시킴으로써 T 세포 기능 및 활성을 촉진시키는 사이토카인이다. IL-15는 IL-15R α (또는 CD121로서 알려짐)에 대해 고친화도로 결합하는데, 이는 이어서 IL-2R β (또한 IL-15R β 및 CD122로서 알려짐) 및 IL-2R γ (또한 CD132 및 γ c로서 알려짐)를 포함하는 복합체와 회합되고, 동일한 세포(시스-제시) 또는 상이한 세포(트랜스-제시) 상에서 발현된다. IL-15 신호전달은 JAK/STAT, PI-3K 및 Src 키나제 경로를 활성화시키고, 항-세포자멸사 유전자 및 T 세포 전구체의 증식을 촉진시키는 유전자의 전사를 야기한다.
- [0258] 다양한 실시형태에서, 조작된 항원 수용체를 발현시키는 면역 효과기 세포를 포함하는 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR15 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터, 및 선택적으로, IL-15R α

폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR15 신호 컨버터 및 조작된 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터, 및 선택적으로, IL-15R α 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다.

[0259] 특정 실시형태에서, TGF β 신호 컨버터는 면역억제 TGF β 신호를 IL-15-매개 면역자극 신호로 전환시킨다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR15 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R β 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR15 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R β 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0260] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR15 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R β 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR15 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R β 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다.

[0261] 특정 실시형태에서, CTBR15 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R β 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다. 특정 실시형태에서, CTBR15 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R γ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2R β 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다.

[0262] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1 또는 TGF β R2의 막관통 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 IL-2R β 또는 IL-2R γ 의 막관통 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-2R β 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-2R γ 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-2R γ 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-2R β 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0263] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드; 더 바람직하게는, 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드; 및 더 바람직하게는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드 및 너심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 P2A 또는 T2A 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다.

[0264] **4. CTBR21 신호 컨버터**

[0265] 인터류킨-21(IL-21)은 T 세포 전구체 생존 및 증식을 부분적으로 개선시킴으로써 T 세포 기능 및 활성을 촉진시키는 사이토카인이다. IL-21은 인터류킨 21 수용체(IL-21R, 또한 CD360으로서 알려짐) 및 IL-2R γ (또한 CD132 및 γ c로서 알려짐)에 결합한다. IL-21 신호전달은 JAK/STAT, PI-3K 및 Src 키나제 경로를 활성화시키며, 항세포사멸사 유전자 및 T 세포 전구체의 증식을 촉진시키는 유전자의 전사를 초래한다.

[0266] 다양한 실시형태에서, 조작된 항원 수용체를 발현시키는 면역 효과기 세포를 포함하는 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR21 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR21 신호 컨버터 및 조작된 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다.

- [0267] 특정 실시형태에서, TGFβ 신호 컨버터는 면역억제 TGFβ 신호를 IL-21-매개 면역자극 신호로 전환시킨다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR21 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-21R 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2Rγ 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR21 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2Rγ 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-21R 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0268] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR21 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-21R 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2Rγ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR21 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2Rγ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-21R 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0269] 특정 실시형태에서, CTBR21 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-21R 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2Rγ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다. 특정 실시형태에서, CTBR21 신호 컨버터는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-2Rγ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-21R 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다.
- [0270] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR1 또는 TGFβR2의 막관통 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 IL-21R 또는 IL-2Rγ의 막관통 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인 및 IL-21R 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인 및 IL-2Rγ 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR1의 세포의 TGFβ1-결합 도메인 및 IL-2Rγ 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGFβR2의 세포의 TGFβ1-결합 도메인 및 IL-21R 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0271] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드; 더 바람직하게는, 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드; 및 더 바람직하게는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드 및 뇌심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 P2A 또는 T2A 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다.
- [0272] **5. CTBR18 신호 컨버터**
- [0273] 인터류킨-18(IL-18)은, 부분적으로, IFNγ 발현을 증가시키고, T 세포 증식을 증가시키며, 그리고 활성화 유도 세포사(AICD)에 대해 보호함으로써 T 세포 기능 및 활성을 촉진시키는 사이토카인이다. IL-18은 인터류킨 18 수용체 1, (IL-18R1, 또한 CD218a로서 알려짐) 및 인터류킨 18 수용체 부속 단백질(IL-18RAP, CD218b)에 결합한다.
- [0274] IL-18R1 및 IL-18RAP을 통한 IL-18 신호전달은 MyD88 어댑터 단백질 및 IRAK4 인산화를 통한 활성화를 초래한다. IRAK4의 인산화 및 IRAK1/2의 후속적 인산화는 IFNγ 발현을 증가시키기 위해 그리고 IL-12에 대한 민감성을 증가시키기 위해 NF-카파 B 및 AP-1 전사 인자의 활성화를 궁극적으로 야기한다. IL-18에 의해 유도된 전사 프로그램은 또한 T 세포 증식을 증가시키고 AICD에 대해 보호한다.
- [0275] 다양한 실시형태에서, 조작된 항원 수용체를 발현시키는 면역 효과기 세포를 포함하는 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR18 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR18 신호 컨버터 및 조작된 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다.

- [0276] 특정 실시형태에서, TGF β 신호 컨버터는 면역억제 TGF β 신호를 IL-18-매개 면역자극 신호로 전환시킨다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR18 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18RAP 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18R1 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR18 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18R1 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0277] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR18 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR18 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0278] 특정 실시형태에서, CTBR18 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다. 특정 실시형태에서, CTBR18 신호 컨버터는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-18RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다.
- [0279] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1 또는 TGF β R2의 막관통 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 IL-18R1 또는 IL-18RAP의 막관통 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-18RAP 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-18R1 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-18R1 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β R2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-18RAP 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0280] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드; 더 바람직하게는, 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드; 및 더 바람직하게는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드 및 뇌심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 P2A 또는 T2A 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다.
- [0281] **6. CTBR1 신호 컨버터**
- [0282] 인터류킨-1(IL-1)은, 부분적으로, IFN γ 발현을 증가시키고, T 세포 증식을 증가시킴으로써, 활성화 유도 세포사(AICD)에 대한 보호를 강력하게 함으로써 T 세포 기능 및 활성을 촉진시키는 사이토카인이다. IL-1은 인터류킨 1 수용체 1, (IL-1R1, 또한 CD121a로서 알려짐) 및 인터류킨 1 수용체 부속 단백질(IL-1RAP)에 결합한다.
- [0283] IL-1R1 및 IL-1RAP를 통한 IL-1 신호전달은 MyD88 어댑터 단백질 및 IRAK4 인산화를 통한 활성화를 초래한다. IRAK4의 인산화 및 IRAK1/2의 후속적 인산화는 IFN γ 발현을 증가시키고 IL-12에 대한 민감도를 증가시키기 위해 궁극적으로 NF- κ B 및 AP-1 전사 인자의 활성화를 야기한다. IL-1에 의해 유도된 전사 계층은 또한 T 세포 증식을 증가시키고, AICD에 대해 보호한다.
- [0284] 다양한 실시형태에서, 조작된 항원 수용체를 발현시키는 면역 효과기 세포를 포함하는 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR1 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR1 신호 컨버터 및 조작된 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다.
- [0285] 특정 실시형태에서, TGF β 신호 컨버터는 면역억제 TGF β 신호를 IL-1-매개 면역자극 신호로 전환시킨다. 특정

실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR1 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1R1 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR1 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1R1 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0286] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR1 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR1 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다.

[0287] 특정 실시형태에서, CTBR1 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다. 특정 실시형태에서, CTBR1 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1R1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 IL-1RAP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다.

[0288] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β 1 또는 TGF β 2의 막관통 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 IL-1R1 또는 IL-1RAP의 막관통 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-1RAP 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-1R1 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-1R1 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 IL-1RAP 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0289] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드; 더 바람직하게는, 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드; 및 더 바람직하게는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드 및 뇌심근염 바이러스 2A 펩타이드. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 P2A 또는 T2A 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다.

[0290] **7. CTBR.TLR 신호 컨버터**

[0291] 톨 유사 수용체(TLR1 내지 TLR10)는 침윤성 병원균을 검출하고 선천성 및 적응성 면역 반응을 활성화시키는 패턴 인식 수용체이다. 다양한 리간드에 의한 TLR의 활성화는 전염증 전사 프로그램의 유도 및 다중 염증 사이토카인의 발현을 야기한다.

[0292] TLR 신호전달은 MyD88 어댑터 단백질을 통한 활성화 및 IRAK4 인산화를 야기하는 TLR 신호전달 도메인의 동형이량체화를 통해 일어난다. IRAK4의 인산화 및 IRAK1/2의 후속적 인산화는 궁극적으로 염증성 사이토카인 생성을 증가시키고 증식을 유도하기 위해 NF- κ B 및 AP-1 전사 인자의 활성화를 유도한다. TLR 활성화는 또한 IRF3 및 IRF7 전사 인자의 활성화를 야기할 수 있다.

[0293] 다양한 실시형태에서, 조작된 항원 수용체를 발현시키는 면역 효과기 세포를 포함하는 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR.TLR 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 면역 효과기 세포는 CTBR.TLR 신호 컨버터 및 조작된 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 변형된다.

[0294] 특정 실시형태에서, TGF β 신호 컨버터는 면역억제 TGF β 신호를 TLR-매개 면역자극 신호로 전환시킨다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR.TLR 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메

인, 및 TLR 세포내 신호전달 도메인; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 동일한 TLR 신호전달 도메인을 포함한다.

[0295] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR.TLR 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 TLR 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 폴리펩타이드 절단 신호; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 동일한 TLR 신호전달 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다.

[0296] 특정 실시형태에서, CTBR.TLR 신호 컨버터는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 TLR 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인, 막관통 도메인, 및 동일한 TLR 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드의 복합체이다.

[0297] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β 1 또는 TGF β 2의 막관통 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TLR의 막관통 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β 1의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 TLR 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 TGF β 2의 세포의 TGF β 1-결합 도메인 및 TLR 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0298] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드; 더 바람직하게는, 바이러스 자기-절단성 2A 폴리펩타이드; 및 더 바람직하게는 구제역 바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세아 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드 및 너심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드 절단 신호는 P2A 또는 T2A 바이러스 자기-절단성 폴리펩타이드이다.

[0299] **D. 조작된 항원 수용체**

[0300] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드는 조작된 항원 수용체, 폴리펩타이드 절단 신호 및 CTBR을 포함한다. 다른 특정 실시형태에서, CTBR을 암호화하는 폴리펩타이드 또는 벡터는 조작된 항원 수용체를 포함하는 면역 효과기 세포 내로 도입된다. 임의의 특정 이론에 의해 구속되는 일 없이, 특정 실시형태에서, 당업계에 공지된 임의의 메커니즘은 면역 효과기 세포의 내성을 증가시키기 위해 그리고 면역 효과기 세포 반응의 효율, 효능 및 지속능력을 강력하게 하고 증가시키기 위해 동일한 면역 효과기 세포 또는 세포 집단에서 조작된 항원 수용체 및 CTBR을 도입하고 공동발현시키는 데 사용될 수 있다는 것이 상정된다.

[0301] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 면역 효과기 세포는 조작된 항원 수용체 및 CTBR을 포함한다. 특정 실시형태에서, 조작된 항원 수용체는 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), DARIC 수용체 또는 이의 성분, 또는 제타카인이다.

[0302] **1. 조작된 TCR**

[0303] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 면역 효과기 세포는 조작된 TCR 및 CTBR 신호 컨버터를 포함한다. 일 실시형태에서, T 세포는 하나 이상의 폴리펩타이드 절단 신호에 의해 분리된 조작된 TCR 및 CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 조작된다. 일 실시형태에서, T 세포는 조작된 TCR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터 및 CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 조작된다. 일 실시형태에서, T 세포는 조작된 TCR을 발현시키도록 조작되고, CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 추가로 조작된다.

[0304] 천연 유래 T 세포 수용체는 2개의 소단위, 즉, 알파쇄 및 베타쇄 소단위를 포함하는데, 이들 각각은 각각의 T 세포 계능에서의 재조합 사건에 의해 생산되는 독특한 단백질이다. TCR의 라이브러리는 특정 표적 항원에 대한 그들의 선택성에 대해 선별될 수 있다. 이런 방식으로, 표적 항원에 대해 높은 결합활성 및 반응성을 갖는 천연 TCR이 선택, 클로닝되고, 후속적으로 양자 면역요법을 위해 사용되는 T 세포 집단 내로 도입될 수 있다.

[0305] 일 실시형태에서, T 세포는 TCR 소단위를 도입함으로써 변형되고, 표적 항원을 발현시키는 종양 세포에 T 세포에 대한 특이성을 부여하는 TCR을 형성하는 능력을 가진다. 특정 실시형태에서, 소단위가 TCR을 형성하는 능력을 보유하고, 형질감염된 T 세포에 표적 세포로 귀소하는 능력을 부여하며, 면역학적으로 적절한 사이토카인 신호전달에 참여하는 한, 소단위는 천연 유래 소단위에 비해 하나 이상의 치환, 결실, 삽입 또는 변형을 가진다.

조작된 TCR은 바람직하게는 또한 높은 결합활성을 갖는 적절한 종양-관련 펩타이드를 나타내는 표적 세포에 결합하고, 선택적으로 생체내에서 적절한 펩타이드를 제시하는 표적 세포의 효율적인 사멸을 매개한다.

[0306] 조작된 TCR을 암호화하는 핵산은 바람직하게는 T 세포의 (천연 유래) 염색체에서 그들의 천연 상황으로부터 단리되고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 적합한 벡터 내로 혼입될 수 있다. 핵산과 그들을 포함하는 벡터는 둘 다 세포, 바람직하게는 특정 실시형태에서 T 세포 내로 전달될 수 있다. 이어서, 변형된 T 세포는 형질도입된 핵산 또는 핵산들에 의해 암호화된 TCR의 하나 이상의쇄를 발현시킬 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 조작된 TCR은 특정 TCR을 정상적으로 발현시키지 않는 T 세포 내로 도입되기 때문에, 외인성 TCR이다. 조작된 TCR의 필수 양상은 구조적 적합 복합체(MHC) 또는 유사한 면역학적 성분에 의해 제시된 종양 항원에 대해 높은 결합활성을 가진다는 것이다. 조작된 TCR과 대조적으로, CAR은 MHC 독립적 방식으로 표적 항원에 결합하도록 조작된다.

[0307] TCR은 부착된 추가적인 폴리펩타이드가 작용성 T 세포 수용체 및 MHC 의존적 항원 인식을 형성하는 알파쇄 또는 베타쇄의 능력을 방해하지 않는 한, TCR의 알파쇄 또는 베타쇄의 아미노-말단 또는 카복실-말단 부분에 부착된 추가적인 폴리펩타이드에 의해 발현될 수 있다.

[0308] 특정 실시형태에서 상정된 조작된 TCR에 의해 인식되는 항원은 혈액학적 암 및 고형 종양 상의 항원을 포함하는, 암 항원을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 항원은 알파 엽산 수용체, 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 패밀 리, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α, IL-13R α2, 랩다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서비빈, TAG72, TEMs, VEGFR2 및 WT-1을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0309] **2. 키메라 항원 수용체**

[0310] 다양한 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 종양 세포를 향해 세포독성을 다시 보내는 CAR을 발현시킨다. CAR은 특이적 항-종양 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질 생성하기 위해 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메 인과 표적 항원(예를 들어, 종양 항원)에 대한 항원 기반 특이성을 결합하는 분자이다. 본 명세서에서 사용되는 용어, "키메라"는 상이한 단백질의 부분 또는 상이한 유래의 DNA로 구성 중이라는 것을 기재한다.

[0311] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 면역 효과기 세포는 CAR 및 CTBR 신호 컨버터를 포함한다. 일 실시형태 에서, T 세포는 하나 이상의 폴리펩타이드 절단 신호에 의해 분리된 CAR 및 CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴 리뉴클레오타이드 및 벡터를 도입함으로써 조작된다. 일 실시형태에서, T 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레 오타이드 및 벡터 또는 CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 벡터를 도입함으로써 조작된다. 일 실시형태에서, T 세포는 CAR을 발현시키도록 조작되고, 추가로 CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오 타이드 및 벡터를 도입함으로써 조작된다.

[0312] 다양한 실시형태에서, CAR은 특정 표적 항원에 결합하는 세포의 도메인(또한 결합 도메인 또는 항원-특이적 결합 도메인으로서 지칭됨), 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. CAR의 주요 특징은 면역 효과 기 세포 특이성을 다시 보냄으로써, 증식, 사이토카인 생산, 식세포작용 또는 구조적 적합성(MHC) 독립적 방식으 로 표적 항원 발현 세포의 세포사를 매개할 수 있는 분자의 생산을 촉발하는 그들의 능력, 단클론성 항체의 세 포 특이적 표적화 능력의 이용, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공수용체이다.

[0313] 특정 실시형태에서, CAR은 종양 세포 상에서 발현되는 표적 폴리펩타이드, 예를 들어, 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 결합 도메인을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어, "결합 도메인", "세포외 도메인", "세 포외 결합 도메인", "항원 결합 도메인", "항원-특이적 결합 도메인" 및 "세포외 항원 특이적 결합 도메인"은 상호 호환적으로 사용되고, 관심 대상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 키메라 수용체, 예를 들 어, CAR 또는 DARIC을 제공한다. 결합 도메인은 임의의 단백질, 폴리펩타이드, 올리고펩타이드 또는 생물학적 분자를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 펩타이드(예를 들어, 세포 표면 수용체 또는 종양 단백 질, 지질, 다당류, 또는 다른 세포 표면 표적 분자 또는 이의 성분)를 포함할 수 있다. 결합 도메인은 임의의 천연 유래, 합성, 반합성 또는 관심 대상의 생물학적 분자에 대한 재조합적으로 생산된 결합 상대를 포함한다.

[0314] 특정 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0315] "항체"는 표적 항원, 예컨대 펩타이드, 지질, 다당류, 또는 항원 결정소, 예컨대 면역 세포에 의해 인식되는 것 을 함유하는 핵산의 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 적어도 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 가변

영역을 포함하는 폴리펩타이드인 결합 제제를 지칭한다. 항체는 항원 결합 단편, 예를 들어, Camel Ig(낙타 항체 또는 이의 VHH 단편), Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단일쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv, (scFv)₂, 미니바디, 다이어바디, 트라이어바디, 테트라바디, 이황화 안정화된 Fv 단백질("dsFv") 및 단일-도메인 항체(sdAb, 나노바디) 또는 이의 다른 항체 단편을 포함한다. 상기 용어는 또한 유전자 조작된 형태, 예컨대 키메라 항체(예를 들어, 인간화된 무린 항체), 이형접합체 항체(예컨대, 이중특이성 항체) 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 또한, 문헌[Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997] 참조.

- [0316] 하나의 바람직한 실시형태에서, 결합 도메인은 scFv이다.
- [0317] 다른 바람직한 실시형태에서, 결합 도메인은 낙타과 항체이다.
- [0318] 특정 실시형태에서, CAR은 알파 엽산 수용체, 5T4, $\alpha v \beta 6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 패밀리를 포함하는 EGFR 패밀리를 포함하는 항체를 포함하는 항체와 동일한 표적 분자에 대해 특이적 결합 친화도를 보유하도록, 경쇄 가변 영역에 중쇄 가변 영역을 연결하고, 두 서브-결합 도메인의 상호 작용에 적합한 스페이스 기능을 제공하는 아미노산 서열이다. 특정 실시형태에서, CAR은 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 링커를 포함한다. 특정 실시형태에서, 링커의 길이는 약 1 내지 약 25개의 아미노산, 약 5 내지 약 20개의 아미노산, 또는 약 10 내지 약 20개의 아미노산 또는 아미노산의 임의의 개재 길이이다. 일부 실시형태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 이상의 아미노산 길이이다.
- [0319] 특정 실시형태에서, CAR은 세포의 결합 도메인, 예를 들어, 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하되, 항원은 MHC-펩타이드 복합체, 예컨대 클래스 I MHC-펩타이드 복합체 또는 클래스 II MHC-펩타이드 복합체이다.
- [0320] 특정 실시형태에서, CAR은 다양한 도메인 사이의 링커 잔기를 포함한다. "가변 영역 연결 서열"은 얻어진 폴리펩타이드가 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하는 항체와 동일한 표적 분자에 대해 특이적 결합 친화도를 보유하도록, 경쇄 가변 영역에 중쇄 가변 영역을 연결하고, 두 서브-결합 도메인의 상호 작용에 적합한 스페이스 기능을 제공하는 아미노산 서열이다. 특정 실시형태에서, CAR은 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 링커를 포함한다. 특정 실시형태에서, 링커의 길이는 약 1 내지 약 25개의 아미노산, 약 5 내지 약 20개의 아미노산, 또는 약 10 내지 약 20개의 아미노산 또는 아미노산의 임의의 개재 길이이다. 일부 실시형태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 이상의 아미노산 길이이다.
- [0321] 특정 실시형태에서, CAR의 결합 도메인 다음에 하나 이상의 "스페이스 도메인"이 이어지는데, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하도록 효과기 세포 표면으로부터 떨어져서 항원 결합 도메인을 이동시키는 영역을 지칭한다(Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). 스페이스 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 특정 실시형태에서, 스페이스 도메인은 하나 이상의 중쇄 불변 영역, 예를 들어, CH2 및 CH3을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 면역글로불린의 일부이다. 스페이스 도메인은 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0322] 일 실시형태에서, 스페이스 도메인은 IgG1, IgG4 또는 IgD의 CH2 및 CH3을 포함한다.
- [0323] 일 실시형태에서, CAR의 결합 도메인은 하나 이상의 "힌지 도메인"에 연결되는데, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하도록 효과기 세포 표면으로부터 떨어져서 항원 결합 도메인을 위치시키는 역할을 한다. CAR은 일반적으로 결합 도메인과 막관통 도메인(TM) 사이의 하나 이상의 힌지 도메인을 포함한다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 힌지 도메인은 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0324] 본 명세서에 기재된 CAR에서 사용하기에 적합한 예시적인 힌지 도메인은 이들 분자로부터의 야생형 힌지 영역일 수 있거나 또는 변경될 수 있는 1형 막 단백질, 예컨대 CD8 α , 및 CD4의 세포의 영역으로부터 유래된 힌지 영역을 포함한다. 다른 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 영역을 포함한다.
- [0325] 일 실시형태에서, 힌지는 PD-1 힌지 또는 CD152 힌지이다.
- [0326] "막관통 도메인"은 세포의 결합 부분에 융합하는 CAR의 부분 및 면역 효과기 세포의 혈장막에 CAR을 고정시키는 세포내 신호전달 도메인이다. TM 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다.

- [0327] 예시적인 TM 도메인은 T-세포 수용체, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154, AMN 및 PD-1의 알파 또는 베타쇄의 적어도 막관통 영역(들)으로부터 유래될 수 있다(즉, 포함한다).
- [0328] 일 실시형태에서, CAR은 CD8 α 로부터 유래된 TM 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CAR은 TM 도메인과 CAR의 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 CD8 α 및 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 바람직하게는 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산으로부터 유래된 TM 도메인을 포함한다. 글리신-세린 링커는 특히 적합한 링커를 제공한다.
- [0329] 특정 실시형태에서, CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. "세포내 신호전달 도메인"은 CAR-결합 표적 세포에 대한 세포독성 인자의 방출, 또는 세포의 CAR 도메인에 대한 항원 결합에 의해 유발된 다른 세포 반응을 포함하는 효과기 세포 기능, 예를 들어, 활성화, 사이토카인 생산, 증식 및 세포독성 활성을 유발하기 위해 면역 효과기 세포의 내부로 표적 항원에 대한 효과적인 CAR 결합의 전령을 형질도입하는 데 참여하는 CAR의 부분을 지칭한다.
- [0330] 용어 "효과기 기능"은 세포의 전문화된 기능을 지칭한다. T 세포의 효과기 기능은, 예를 들어, 세포용해 활성일 수 있거나 또는 사이토카인의 분비를 포함하는 활성을 돕는다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 효과기 작용 신호를 전달하고 전문화된 기능을 수행하기 위해 세포를 보내는 단백질의 일부를 지칭한다. 보통 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 다수의 경우에, 전체 도메인을 사용하는 것을 필수적이지 않다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 일부가 사용되는 정도로, 이러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 전달하는 한, 전체 도메인 대신에 사용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능 신호를 전달하는 데 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.
- [0331] TCR 단독을 통해 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하며, 2차 또는 공자극 신호가 또한 필요하다는 것이 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포내 신호전달 도메인의 2개의 별개의 부류(TCR(예를 들어, TCR/CD3 복합체)를 통해 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 1차 신호전달 도메인 및 2차 또는 공자극 신호를 제공하는 항원-독립적 방식으로 작용하는 공자극 신호전달 도메인)에 의해 매개되는 것으로 언급될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, CAR은 하나 이상의 "공자극 신호전달 도메인" 및 "1차 신호전달 도메인"을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0332] 1차 신호전달 도메인은 자극 방법으로 또는 저해 방법으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 신호전달 도메인은 면역수용체 타이로신계 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.
- [0333] 특정 실시형태에서 상정된 CAR에서 사용하기에 적합한 1차 신호전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예시적 예는 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래되는 것을 포함한다. 특정 바람직한 실시형태에서, CAR은 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공자극 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 1차 신호전달 및 공자극 신호전달 도메인은 막관통 도메인의 카복실 말단과 동시에 임의의 순서로 연결될 수 있다.
- [0334] 특정 실시형태에서, CAR은 T 세포 발현 CAR 수용체의 효능 및 확장을 향상시키기 위해 하나 이상의 공자극 신호전달 도메인을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어, "공자극 신호전달 도메인" 또는 "공자극 도메인"은 공자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 지칭한다.
- [0335] 특정 실시형태에서 상정된 CAR에서 사용하기에 적합한 이러한 공자극 분자의 예시적 예는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM 및 ZAP70을 포함한다. 일 실시형태에서, CAR은 CD28, CD137, 및 CD134, 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 공자극 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0336] 다양한 실시형태에서, CAR은 BCMA, CD19, CSPG4, PSCA, ROR1 및 TAG72로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 결합되는 세포의 도메인; CD4, CD8 α , CD154 및 PD-1로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드로부터 단리된 막관통 도메인; CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드로부터 단리된 하나 이상의 세포내 공자극 신호전달 도메인; 및 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드로부터 단리된 신호전달 도메인을 포함한다.

[0337] 3. DARIC

[0338] 특정 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 DARIC 수용체의 하나 이상의쇄를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "DARIC 수용체"는 다중쇄 조작된 항원 수용체를 지칭한다.

[0339] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 면역 효과기 세포는 DARIC 수용체 및 CTBR 신호 컨버터의 하나 이상의쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, T 세포는 하나 이상의 폴리펩타이드 절단 신호에 의해 분리된 DARIC 수용체 및 CTBR 신호 컨버터의 하나 이상의쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 조작된다. 일 실시형태에서, T 세포는 DARIC 수용체의 하나 이상의쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터 및 CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 조작된다. 일 실시형태에서, T 세포는 DARIC 수용체의 하나 이상의쇄를 발현시키도록 조작되고, CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 추가로 조작된다.

[0340] DARIC 구조 및 성분의 예시적 예는 국제 특허 공개 WO2015/017214 및 미국 특허 공개 제20150266973호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0341] 일 실시형태에서, 공여자 수선 주형은 다음의 DARIC 성분을 포함한다: 제1 다량체화 도메인, 제1 막관통 도메인, 및 하나 이상의 세포내 공자극 신호전달 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인을 포함하는 신호전달 폴리펩타이드; 및 결합 도메인, 제2 다량체화 도메인, 및 선택적으로 제2 막관통 도메인을 포함하는 결합 폴리펩타이드. 작용성 DARIC은 신호전달 폴리펩타이드 및 결합 폴리펩타이드의 다량체화 도메인과 결합되고 이들 사이에 배치된 브리징 인자(bridging factor)와의 세포 표면 상의 DARIC 수용체 복합체의 형성을 촉진하는 브리징 인자를 포함한다.

[0342] 특정 실시형태에서, 제1 및 제2 다량체화 도메인은 라파마이신 또는 이의 라팔로그, 쿠메르마이신 또는 이의 유도체, 지베렐린 또는 이의 유도체, 아비시스산(ABA) 또는 이의 유도체, 메토티렉세이트 또는 이의 유도체, 사이클로스포린 A 또는 이의 유도체, FKCsA 또는 이의 유도체, FKBP에 대한 트라이메토프림(Tmp)-함성 리간드(SLF) 또는 이의 유도체 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 브리징 인자와 결합된다.

[0343] 라파마이신 유도체(라팔로그)의 예시적 예는 미국 특허 제6,649,595호에 개시된 것을 포함하며, 라팔로그 구조는 본 명세서에 전문이 참고로 포함된다. 특정 실시형태에서, 브리징 인자는 라파마이신에 비해 실질적으로 감소된 면역억제 효과를 갖는 라팔로그이다. "실질적으로 감소된 면역억제 효과"는 임상적으로 또는 시험관내에서 적절하게(예를 들어, T 세포 증식의 저해) 또는 인간 면역억제 활성화의 생체내 대응으로 측정하여, 등몰량의 라파마이신에 대해 관찰되거나 또는 예상된 면역억제 효과의 적어도 0.1 내지 0.005 미만을 갖는 라팔로그를 지칭한다. 일 실시형태에서, "실질적으로 감소된 면역억제 효과"는 동일한 분석에서 라파마이신에 대해 관찰된 EC50 값보다 적어도 10 내지 250배 더 큰 이러한 시험관내 분석에서 EC50 값을 갖는 라팔로그를 지칭한다.

[0344] 라팔로그의 다른 예시적 예는 에베롤리무스, 노볼리무스, 피메크롤리무스, 리다포롤리무스, 타크롤리무스, 템시롤리무스, 유미놀리무스 및 조타롤리무스를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0345] 특정 실시형태에서, 다량체화 도메인은 라파마이신 또는 이의 라팔로그인 브리징 인자와 결합될 것이다. 예를 들어, 제1 및 제2 다량체화 도메인은 FKBP 및 FRB로부터 선택된 쌍이다. FRB 도메인은 FKBP 단백질 및 라파마이신 또는 이의 라팔로그와 삼중 복합체를 형성할 수 있는 폴리펩타이드 영역(단백질 "도메인")이다. FRB 도메인은 인간 및 다른 종으로부터의 mTOR 단백질(또한 문헌에서 FRAP, RAPT1 또는 RAFT로서 지칭됨); Tor1 및 Tor2를 포함하는 효모 단백질; 및 칸디다 FRAP 상동체를 포함하는 다수의 천연 유래 단백질에 존재한다. 뉴클레오타이드 서열, 클로닝 및 이들 단백질의 다른 양상에 관한 정보는 이미 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 mTOR에 대한 단백질 서열 수탁 번호는 젠뱅크 수탁 번호 L34075.1이다(Brown et al., Nature 369:756, 1994).

[0346] 본 명세서에 상정된 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 FRB 도메인은 일반적으로 적어도 약 85 내지 약 100 개의 아미노산 잔기를 함유한다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 융합 단백질에서 사용하기 위한 FRB 아미노산 서열은 젠뱅크 수탁 번호 L34075.1의 아미노산에 기반하여 93 아미노산 서열 11e-2021 내지 Lys-2113 및 T2098L의 돌연변이를 포함할 것이다. 특정 실시형태에서 상정된 DARIC에서 사용하기 위한 FRB 도메인은 라파마이신 또는 이의 라팔로그에 결합된 FKBP 단백질의 복합체에 결합할 것이다. 특정 실시형태에서, FRB 도메인의 펩타이드 서열은 (a) 인간 mTOR의 적어도 표시된 93개의 아미노산 영역에 걸쳐 있는 천연 유래 펩타이드 서열 또는 상동성 단백질의 대응하는 영역; (b) 천연 유래 펩타이드의 약 10개까지의 아미노산, 또는 약 1 내지 약 5 개의 아미노산 또는 약 1 내지 약 3개의 아미노산, 또는 일부 실시형태에서 단지 1개의 아미노산이 결실, 삽입 또는 치환된 천연 유래 FRB의 변이체; 또는 (c) 천연 유래 FRB 도메인을 암호화하는 DNA 분자에 선택적으로 혼

성화할 수 있는 핵산 분자에 의해 또는 천연 유래 FRB 도메인을 암호화하는 DNA 분자에 선택적으로 혼성화할 수 있는(그러나 유전자 암호의 축퇴를 위한) DNA 서열에 의해 암호화된 펩타이드를 포함한다.

- [0347] FKBP(FK506 결합 단백질)는 마크로라이드, 예컨대 FK506, FK520 및 라파마이신에 대한 사이토솔 수용체이고, 종계에 걸쳐 고도로 보존된다. FKBP는 라파마이신 또는 이의 라팔로그에 결합할 수 있고, 추가로 FRB-함유 단백질 또는 융합 단백질과 삼중 복합체를 형성할 수 있는 단백질 또는 단백질 도메인이다. FKBP 도메인은 또한 "라파마이신 결합 도메인"으로 지칭될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열, 클로닝 및 다양한 FKBP 종의 다른 양상에 관한 정보는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Staedert et al., Nature 346:671, 1990(인간 FKBP12); Kay, Biochem. J. 314:361, 1996] 참조). 다른 포유류 종에서, 효모에서 그리고 다른 유기체에서 상동성 FKBP 단백질은 또한 당업계에 공지되어 있으며, 본 명세서에 개시된 융합 단백질에서 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서 상정된 FKBP 도메인은 라파마이신 또는 이의 라팔로그에 결합할 수 있고, FRB-함유 단백질과 삼중 복합체로 참여할 수 있다(이러한 결합의 검출을 위해 임의의 수단에 의해, 직접 또는 간접적으로 결정될 수 있음).
- [0348] 특정 실시형태에서 상정된 DARIC에서 사용하기에 적합한 FKBP 도메인의 예시적 예는 천연 유래 FKBP 펩타이드 서열(바람직하게는 인간 FKBP12 단백질로부터 단리됨)(젠뱅크 수탁 번호 AAA58476.1) 또는 이로부터, 다른 인간 FKBP로부터, 뮤린 또는 다른 포유류 FKBP로부터, 또는 일부 다른 동물, 효모 또는 진균 FKBP로부터 단리된 펩타이드 서열; 천연 유래 펩타이드의 약 10까지의 아미노산, 또는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 또는 약 1 내지 약 3개의 아미노산, 또는 일부 실시형태에서 단지 1개의 아미노산이 결실, 삽입 또는 치환된 천연 유래 FKBP 서열의 변이체; 또는 천연 유래 FKBP를 암호화하는 DNA 분자에 선택적으로 혼성화할 수 있는 핵산 분자에 의해 또는 천연 유래 FKBP를 암호화하는 DNA 분자에 선택적으로 혼성화할 수 있는(그러나 유전자 암호의 축퇴를 위한) DNA 서열에 의해 암호화된 펩타이드 서열을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0349] 특정 실시형태에서 상정된 DARIC에서 사용하기에 적합한 다량체화 도메인 쌍의 다른 예시적 예는 FKBP 및 FRB, FKBP 및 칼시뉴린, FKBP 및 사이클로필린, FKBP 및 박테리아 DHFR, 칼시뉴린 및 사이클로필린, PYL1 및 ABI1, 또는 GIB1 및 GAI, 또는 이의 변이체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0350] 또 다른 실시형태에서, 항-브리징 인자는 신호전달 폴리펩타이드 및 결합 폴리펩타이드와 브리징 인자의 결합을 차단한다. 예를 들어, 사이클로스포린 또는 FK506은 라파마이신을 적정하기 위한 항-브리징 인자로서 사용될 수 있었고, 따라서 하나의 다량체화 도메인만이 결합되기 때문에 신호전달을 정지시킨다. 특정 실시형태에서, 항-브리징 인자(예를 들어, 사이클로스포린, FK506)는 면역억제제이다. 예를 들어, 면역억제 항-브리징 인자는 특정 실시형태에서 상정된 DARIC 성분의 기능을 차단하거나 또는 최소화하기 위해 그리고 동시에 임상 상황에서 원치않는 또는 병리학적 염증 반응을 저해하거나 또는 차단하기 위해 사용될 수 있다.
- [0351] 일 실시형태에서, 제1 다량체화 도메인은 FRB T2098L을 포함하고, 제2 다량체화 도메인은 FKBP12를 포함하며, 브리징 인자는 라팔로그 AP21967이다.
- [0352] 다른 실시형태에서, 제1 다량체화 도메인은 FRB를 포함하며, 제2 다량체화 도메인은 FKBP12를 포함하고, 브리징 인자는 라파마이신, 템시롤리무스 또는 에베롤리무스이다.
- [0353] 특정 실시형태에서, 신호전달 폴리펩타이드, 제1 막관통 도메인 및 결합 폴리펩타이드는 제2 막관통 도메인 또는 GPI 앵커를 포함한다. 제1 및 제2 막관통 도메인의 예시적 예는 CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154, AMN 및 PD-1로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 폴리펩타이드로부터 단리된다.
- [0354] 일 실시형태에서, 신호전달 폴리펩타이드는 하나 이상의 세포내 공자극 신호전달 도메인 및/또는 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0355] 특정 실시형태에서 상정된 DARIC 신호전달 성분에서 사용하기에 적합한 1차 신호전달 도메인의 예시적 예는 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것을 포함한다. 특정 바람직한 실시형태에서, DARIC 신호전달 성분은 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공자극 신호전달 도메인을 포함한다. 세포내 1차 신호전달 및 공자극 신호전달 도메인은 막관통 도메인의 카복실 말단과 동시에 임의의 순서로 연결될 수 있다.
- [0356] 특정 실시형태에서 상정된 DARIC 신호전달 성분에서 사용하기에 적합한 이러한 공자극 분자의 예시적 예는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM 및 ZAP70을 포함한다. 일 실시형태에서, DARIC 신호전달 성분은 CD28, CD137 및 CD134, 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인으로 이

루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공자극 신호전달 도메인을 포함한다.

- [0357] 특정 실시형태에서, DARIC 결합 성분은 결합 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0358] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표적 항원, 예컨대 펩타이드, 지질, 다당류, 또는 항원 결정소, 예컨대 면역 세포에 의해 인식되는 것을 함유하는 핵산의 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 적어도 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역을 포함한다. 항체는 항원 결합 단편, 예를 들어, Camel Ig(낙타 항체 또는 이의 VHH 단편), Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단일쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv, (scFv)₂, 미니바디, 다이어바디, 트라이어바디, 테트라바디, 이황화 안정화된 Fv 단백질("dsFv") 및 단일-도메인 항체(sdAb, 나노바디) 또는 이의 다른 항체 단편을 포함한다. 상기 용어는 또한 유전자 조작된 형태, 예컨대 키메라 항체(예를 들어, 인간화된 무린 항체), 이형접합체 항체(예컨대, 이중특이성 항체) 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 또한, 문헌[Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997] 참조.
- [0359] 하나의 바람직한 실시형태에서, 결합 도메인은 scFv이다.
- [0360] 다른 바람직한 실시형태에서, 결합 도메인은 낙타과 항체이다.
- [0361] 특정 실시형태에서, DARIC 결합 성분은 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 패밀리를 포함하는 EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서비빈, TAG72, TEMs, VEGFR2 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 결합하는 세포의 도메인을 포함한다.
- [0362] 일 실시형태에서, DARIC 결합 성분은 세포의 도메인, 예를 들어, MHC-펩타이드 복합체, 예컨대 클래스 I MHC-펩타이드 복합체 또는 클래스 II MHC-펩타이드 복합체에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0363] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 DARIC 성분은 2개의 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 도메인, 영역 또는 모티프를 연결하는 링커 또는 스페이서를 포함한다. 특정 실시형태에서, 링커는 약 2 내지 약 35개의 아미노산, 또는 약 4 내지 약 20개의 아미노산 또는 약 8 내지 약 15개의 아미노산 또는 약 15 내지 약 25개의 아미노산을 포함한다. 다른 실시형태에서, 스페이서는 특정 구조, 예컨대, 항체 CH2CH3 도메인, 힌지 도메인 등을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 스페이서는 IgG1, IgG4 또는 IgD의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.
- [0364] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 DARIC 성분은 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하도록 도메인을 위치시키는 역할을 하는 하나 이상의 "힌지 도메인"을 포함한다. DARIC은 결합 도메인과 다량체화 도메인 사이의 하나 이상의 힌지 도메인 및/또는 다량체화 도메인과 막관통 도메인 사이의 막관통 도메인(TM)을 포함할 수 있다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 제조함 공급원으로부터 유래될 수 있다. 힌지 도메인은 천연 유래 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 힌지는 CD8α 힌지 또는 CD4 힌지이다.
- [0365] 일 실시형태에서, DARIC은 FRB T2098L의 제1 다량체화 도메인, CD8 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인, 및 CD3ζ 1차 신호전달 도메인을 포함하는 신호전달 폴리펩타이드를 포함하고; 결합 폴리펩타이드는 CD19에 결합하는 scFv, FKBP12의 제2 다량체화 도메인 및 CD4 막관통 도메인을 포함하고; 브리징 인자는 라팔로그 AP21967이다.
- [0366] 일 실시형태에서, DARIC은 FRB, CD8 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인, 및 CD3ζ 1차 신호전달 도메인을 포함하는 제1 다량체화 도메인을 포함하는 신호전달 폴리펩타이드를 포함하고; 결합 폴리펩타이드는 CD19에 결합하는 scFv, FKBP12의 제2 다량체화 도메인 및 CD4 막관통 도메인을 포함하며; 브리징 인자는 라파마이신, 템시롤리무스 또는 에베롤리무스이다.
- [0367] **4. 제타카인**
- [0368] 다양한 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 중앙 세포를 향해 세포독성을 다시 보내는 키메라 사이토카인 수용체를 포함한다. 제타카인은 세포 표면, 막관통 영역 및 세포내 신호전달 도메인에 세포의 도메인을 테더링할 수 있는 지지 영역에 연결된 가용성 수용체 리간드를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 키메라 막관통 면역수용

체이다. T 림프구의 표면 상에서 발현된 제타카인은 T 세포 활성을 가용성 수용체 리간드에 특이적인 수용체를 발현시키는 해당 세포로 보낸다. 제타카인 키메라 면역수용체는, 특히 인간 악성종양에 의해 이용되는 자가분비/근거리분비 사이토카인 시스템을 통한 다양한 암 치료에 대한 적용에 의해 T 세포의 항원 특이성을 다시 보낸다.

- [0369] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 면역 효과기 세포는 제타카인 수용체 및 CTBR 신호 컨버터의 하나 이상의쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, T 세포는 하나 이상의 폴리펩타이드 절단 신호에 의해 분리된 제타카인 수용체 및 CTBR 신호 컨버터의 하나 이상의쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 조작된다. 일 실시형태에서, T 세포는 제타카인 수용체의 하나 이상의쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터 및 CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 조작된다. 일 실시형태에서, T 세포는 제타카인 수용체의 하나 이상의쇄를 발현시키도록 조작되고, CTBR 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입함으로써 추가로 조작된다.
- [0370] 특정 실시형태에서, 제타카인은 면역억제 사이토카인 또는 이의 사이토카인 수용체 결합 변이체, 링커, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0371] 특정 실시형태에서, 사이토카인 또는 이의 사이토카인 수용체 결합 변이체는 인터류킨-4(IL-4), 인터류킨-6(IL-6), 인터류킨-8(IL-8), 인터류킨-10(IL-10) 및 인터류킨-13(IL-13)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0372] 특정 실시형태에서, 링커는 CH2CH3 도메인, 힌지 도메인 등을 포함한다. 일 실시형태에서, 링커는 IgG1, IgG4 또는 IgD의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 링커는 CD8 α 또는 CD4 힌지 도메인을 포함한다.
- [0373] 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 T-세포 수용체, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154, AMN 및 PD-1의 알파 또는 베타쇄로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0374] 특정 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인 및/또는 공자극 도메인을 함유하는 ITAM으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0375] 특정 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0376] 특정 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM 및 ZAP70로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0377] 일 실시형태에서, 키메라 사이토카인 수용체는 CD28, CD137, 및 CD134, 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 공자극 신호전달 도메인을 포함한다.

[0378] **E. 폴리펩타이드**

- [0379] TGF β 신호 컨버터 폴리펩타이드, CTBR, 조작된 TCR, CAR, DARIC, 제타카인, 앞서 언급한 폴리펩타이드 및 이의 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 다양한 폴리펩타이드가 본 명세서에 상정된다. 바람직한 실시형태에서, 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 71 중 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은, 달리 대조적으로 구체화되지 않는 한, 상호 호환적으로 그리고 통상적인 의미에 따라, 즉, 아미노산 서열로서 사용된다. 일 실시형태에서, "폴리펩타이드"는 융합 폴리펩타이드 및 다른 변이체를 포함한다. 폴리펩타이드는 임의의 다양한 잘 공지된 제조법 및/또는 합성 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 폴리펩타이드는 특정 길이로 제한되지 않으며, 예를 들어, 그들은 전장 단백질 서열, 전장 단백질의 단편 또는 융합 단백질을 포함할 수 있고, 폴리펩타이드의 번역후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등뿐만 아니라 당업계에 공지된 다른 변형, 즉, 천연 유래와 비천연 유래 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0380] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "단리된 펩타이드" 또는 "단리된 폴리펩타이드" 등은 세포 환경으로부터 그리고 세포의 다른 성분과의 결합으로부터의 펩타이드 또는 폴리펩타이드 분자의 시험관내 단리 및/또는 정제를 지칭하며, 즉, 이는 생체내 물질과 상당히 관련되지 않는다.
- [0381] 폴리펩타이드는 "폴리펩타이드 변이체"를 포함한다. 폴리펩타이드 변이체는 하나 이상의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입에서 천연 유래 폴리펩타이드와 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 천연 유래일 수 있거나 또는, 예를

들어, 상기 폴리펩타이드 서열 중 하나 이상을 변형시킴으로써 합성에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 내로 하나 이상의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입을 도입함으로써 폴리펩타이드의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드는 본 명세서에 상정된 임의의 기준 서열에 대해 적어도 약 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 86%, 97%, 98% 또는 99%의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하며, 전형적으로 여기서 변이체는 기준 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다.

[0382] 폴리펩타이드 변이체는 생물학적으로 활성인 "폴리펩타이드 단편"을 포함한다. 생물학적으로 활성인 폴리펩타이드 단편의 예시적 예는 DNA 결합 도메인, 뉴클레아제 도메인 등을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "생물학적으로 활성인 단편" 또는 "최소 생물학적으로 활성인 단편"은 천연 유래 폴리펩타이드 활성의 적어도 100%, 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 40%, 적어도 30%, 적어도 20%, 적어도 10% 또는 적어도 5%를 보유하는 폴리펩타이드 단편을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 단편은 적어도 5 내지 약 1700개의 아미노산 길이의 아미노산 쇄를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700개 이상의 아미노산 길이라는 것이 인식될 것이다.

[0383] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제시된 폴리펩타이드는 "X"로서 나타내는 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. "X"가 아미노산 서열 번호에 존재한다면, 임의의 하나 이상의 아미노산을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질을 나타내는 서열번호는 임의의 아미노산 서열을 누적적으로 나타내는 연속적 X 잔기의 서열을 포함한다.

[0384] 상기 언급한 바와 같이, 폴리펩타이드는 아미노산 치환, 결실, 절단 및 삽입을 포함하는 다양한 방법으로 변경될 수 있다. 이러한 조작을 위한 방법은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 기준 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체는 DNA에서의 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 돌연변이유발 및 뉴클레오타이드 서열 변경을 위한 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488-492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382)], 미국 특허 제4,873,192호, 문헌[Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987)] 및 그에 인용된 참고문헌을 참조. 관심 대상의 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 가이드는 문헌[Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, D.C.)]의 모델에서 찾을 수 있다.

[0385] 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 포함한다. "보존적 치환"은 펩타이드 화학 분야의 당업자가 폴리펩타이드의 2차 구조 및 소수성 특성이 실질적으로 변하지 않는 것으로 예상하도록 아미노산이 유사한 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환되는 것이다. 변형은 특정 실시형태에서 상정된 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드의 구조에서 만들어질 수 있으며, 바람직한 특징을 갖는 변이체 또는 유도체 폴리펩타이드를 암호화하는 작용성 분자를 여전히 얻는다. 동등한, 또는 심지어 개선된 변이체 폴리펩타이드를 생성하기 위해 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 변경시키도록 요망될 때, 당업자는, 예를 들어, 표 1에 따라, 예를 들어 암호화 DNA 서열의 코돈 중 하나 이상을 변화시킬 수 있다.

[0386] [표 1]

아미노산 코돈

아미노산	1글자 암호	3글자 암호	코돈					
알라닌	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU		
시스테인	C	Cys	UGC	UGU				
아스파르트산	D	Asp	GAC	GAU				
글루탐산	E	Glu	GAA	GAG				
페닐알라닌	F	Phe	UUC	UUU				
글리신	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
히스티딘	H	His	CAC	CAU				
아이소류신	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
라이신	K	Lys	AAA	AAG				
류신	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
메티오닌	M	Met	AUG					
아스파라긴	N	Asn	AAC	AAU				
프롤린	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
글루타민	Q	Gln	CAA	CAG				
알기닌	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
세린	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
트레오닌	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
발린	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
트립토판	W	Trp	UGG					
타이로신	Y	Tyr	UAC	UAU				

[0387]

[0388]

생물학적 활성을 없애는 일 없이 아미노산 잔기가 치환, 삽입 또는 결실되는 것을 결정하는 가이드는 당업계에 잘 공지된 컴퓨터 프로그램, 예컨대 DNASTAR, DNA Strider, Geneious, Mac Vector, 또는 Vector NTI 소프트웨어를 이용하여 찾을 수 있다. 바람직하게는, 본 명세서에 개시된 단백질 변이체에서 아미노산 변화는 보존적 아미노산 변화, 즉, 유사하게 하전된 또는 비하전된 아미노산의 치환이다. 보존적 아미노산 변화는 그들의 측쇄와 관련된 아미노산 패밀리 중 하나의 치환을 수반한다. 천연 유래 아미노산은 일반적으로 4가지 패밀리로 분류된다: 산성(아스파르트레이트, 글루타메이트), 염기성(라이신, 알기닌, 히스티딘), 비극성(알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판) 및 비하전 극성(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 타이로신) 아미노산. 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신은 때때로 공통적으로 방향족 아미노산으로서 분류된다. 펩타이드 또는 단백질에서, 아미노산의 적합한 보존적 치환은 당업자에게 공지되어 있으며, 일반적으로 얻어진 분자의 생물학적 활성을 변경시키는 일 없이 이루어질 수 있다. 당업자라면 일반적으로, 폴리펩타이드의 비필수 영역 내 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변경시키지 않는다는 것을 인식한다(예를 들어, 문헌[Watson *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224] 참조).

[0389]

일 실시형태에서, 2 이상의 폴리펩타이드의 발현이 요망되는 경우, 그들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 본 명세서의 다른 곳에서와 같이 IRES에 의해 분리될 수 있다.

[0390]

특정 실시형태에서 상정된 폴리펩타이드는 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드 및 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 융합 폴리펩타이드 및 융합 단백질은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 폴리펩타이드 세그먼트를 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0391]

다른 실시형태에서, 2 이상의 폴리펩타이드는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같은 하나 이상의 자기-절단성 폴리펩타이드 서열을 포함하는 융합 단백질로서 발현될 수 있다.

- [0392] 융합 폴리펩타이드는 신호 펩타이드, 세포 침투성 펩타이드 도메인(CPP), DNA 결합 도메인, 뉴클레아제 도메인 등, 에피토프 태그(예를 들어, 말토스 결합 단백질("MBP"), 글루타티온 S 트랜스퍼라제(GST), HIS6, MYC, FLAG, V5, VSV-G 및 HA), 폴리펩타이드 링커 및 폴리펩타이드 절단 신호를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 하나 이상의 폴리펩타이드 도메인 또는 세그먼트를 포함할 수 있다. 융합 폴리펩타이드는, 그들이 또한 C-말단에서 C-말단으로, N-말단에서 N-말단으로, 또는 N-말단에서 C-말단으로 연결될 수 있지만, 전형적으로 C-말단에서 N-말단으로 연결된다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질의 폴리펩타이드는 임의의 순서일 수 있다. 융합 폴리펩타이드 또는 융합 단백질은 또한, 융합 폴리펩타이드의 목적으로 하는 활성이 보존되는 한, 보존적으로 변형된 변이체, 다형성 변이체, 대립유전자, 돌연변이체, 하위서열 및 중간 상동체를 포함할 수 있다. 융합 폴리펩타이드는 화학적 합성 방법에 의해 또는 두 모이어티 사이의 화학적 결합에 의해 생산될 수 있거나 또는 일반적으로 다른 표준 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 융합 폴리펩타이드를 포함하는 절찰된 DNA 서열은 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같은 적합한 전사 또는 번역 제어 요소에 작동 가능하게 연결된다.
- [0393] 융합 폴리펩타이드는 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 내의 도메인을 연결하기 위해 사용될 수 있는 링커를 선택적으로 포함할 수 있다. 펩타이드 링커 서열은 폴리펩타이드 도메인이 그들의 목적으로 하는 기능을 발휘하도록 각각의 폴리펩타이드가 그의 적절한 2차 및 3차 구조로 폴딩되는 것을 보장하는 데 충분한 거리만큼 임의의 2개 이상의 폴리펩타이드 성분을 분리시키는 데 사용될 수 있다. 이러한 펩타이드 링커 서열은 당업계의 표준 기법을 이용하여 융합 폴리펩타이드 내로 혼입된다. 적합한 펩타이드 링커 서열은 다음의 인자에 기반하여 선택될 수 있다: (1) 가요성의 연장된 입체배좌를 채택하는 그들의 능력; (2) 제1 및 제2 폴리펩타이드 상의 작용성 에피토프와 상호작용할 수 있는 2차 구조를 채택하는 그들의 불능; 및 (3) 폴리펩타이드 작용성 에피토프와 반응하는 소수성 또는 하전된 잔기의 결여. 바람직한 펩타이드 링커 서열은 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 함유한다. 다른 근처의 중성 아미노산, 예컨대 Thr 및 Ala은 또한 링커 서열에서 사용될 수 있다. 링커로서 유용하게 사용될 수 있는 아미노산 서열은 문헌[Maratea *et al.*, *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262, 1986]; 미국 특허 제4,935,233호 및 미국 특허 제4,751,180호에 개시된 것을 포함한다. 특정 융합 폴리펩타이드 세그먼트가 작용성 도메인을 분리시키고 입체 방해를 방지하기 위해 사용될 수 있는 비필수 N-말단 아미노산 영역을 함유할 때 링커 서열은 필요하지 않다. 바람직한 링커는 재조합 융합 단백질의 부분으로서 합성되는 전형적으로 가요성의 아미노산 하위서열이다. 링커 폴리펩타이드는 길이가 1 내지 200개의 아미노산, 길이가 1 내지 100개의 아미노산, 또는 길이가 1 내지 50개의 아미노산(그 사이의 모든 정수를 포함)일 수 있다.
- [0394] 예시적인 폴리펩타이드 절단 신호는 폴리펩타이드 절단 인식 부위, 예컨대 프로테아제 절단 부위, 뉴클레아제 절단 부위(예를 들어, 희귀 제한 효소 인식 부위, 자기-절단성 리보자임 인식 부위) 및 자기-절단성 바이러스 올리고펩타이드를 포함한다(문헌[deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26] 참조).
- [0395] 적합한 프로테아제 절단 부위 및 자기-절단성 펩타이드는 당업자에게 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Ryan *et al.*, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak *et al.* (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594] 참조). 예시적인 프로테아제 절단 부위는 포티바이러스 NIa 프로테아제(예를 들어, 담배 식각 바이러스), 포티바이러스 HC 프로테아제, 포티바이러스 P1(P35) 프로테아제, 비오바이러스 NIa 프로테아제, 비오바이러스 RNA-2-암호화된 프로테아제, 아프타바이러스 L 프로테아제, 엔테로바이러스 2A 프로테아제, 리노바이러스 2A 프로테아제, 피코르나 3C 프로테아제, 코모바이러스 24K 프로테아제, 네포바이러스 24K 프로테아제, RTSV (벼 통그로 구형 바이러스) 3C-유사 프로테아제, PYVF(파스닙 황색 얼룩 바이러스(parsnip yellow fleck virus)) 3C-유사 프로테아제, 헤파린, 트롬빈, 인자 Xa 및 엔테로키나제의 절단 부위를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 그의 고절단 엄격성에 기인하여, TEV(담배 식각 바이러스) 프로테아제 절단 부위는 일 실시형태, 예를 들어, EXXXYQ(G/S)(서열번호 47), 예를 들어, ENLYFQG(서열번호 48) 및 ENLYFQS(서열번호 49)에서 바람직하되, X는 임의의 아미노산을 나타낸다(TEV에 의한 절단은 Q와 G 또는 Q와 S 사이에서 생김).
- [0396] 특정 실시형태에서, 자기-절단성 폴리펩타이드 부위는 2A 또는 2A-유사 부위, 서열 또는 도메인을 포함한다(Donnelly *et al.*, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041). 특정 실시형태에서, 바이러스 2A 펩타이드는 아프타 바이러스 2A 펩타이드, 포티바이러스 2A 펩타이드, 또는 카디오바이러스 2A 펩타이드이다.
- [0397] 일 실시형태에서, 바이러스 2A 펩타이드는 구제역바이러스(FMDV)(F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV)(E2A) 펩타이드, 토세야 아시그나 바이러스(TaV)(T2A) 펩타이드, 돼지 테스코바이러스-1(PTV-1)(P2A) 펩타이드, 테일로바이러스 2A 펩타이드 및 뇌심근염 바이러스 2A 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0398] 2A 부위의 예시적인 예를 표 2에 제공한다.

[0399] [표 2]

서열번호 50	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
서열번호 51	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
서열번호 52	LLKQAGDVEENPGP
서열번호 53	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP
서열번호 54	EGRGSLTTCGDVEENPGP
서열번호 55	LLTCGDVEENPGP
서열번호 56	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
서열번호 57	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
서열번호 58	LLKLAGDVESNPGP
서열번호 59	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 60	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 61	LLKLAGDVESNPGP
서열번호 62	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 63	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 64	LLKLAGDVESNPGP
서열번호 65	NFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 66	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 67	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 68	VTELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
서열번호 69	LNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 70	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
서열번호 71	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0400]

[0401] 바람직한 실시형태에서, 폴리펩타이드는 CTBR 신호 컨버터 폴리펩타이드를 포함한다.

[0402] **F. 폴리뉴클레오타이드**

[0403] 특정 실시형태에서, TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드, CTBR, 조작된 TCR, CAR, DARIC, 제타카인, 앞서 언급한 폴리펩타이드 및 이의 단편을 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA) 및 DNA/RNA 혼성체를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥 또는 이중 가닥이고 재조합, 합성이거나, 또는 분리될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 전-전령 RNA(전-mRNA), 전령 RNA(mRNA), RNA, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로RNA(miRNA), 리보자임, 게놈 RNA(gRNA), 플러스 가닥 RNA(RNA(+)), 마이너스 가닥 RNA(RNA(-)), tracrRNA, crRNA, 단일 가이드 RNA(sgRNA), 합성 RNA, 합성 mRNA, 게놈 DNA(gDNA), PCR 증폭된 DNA, 상보성 DNA(cDNA), 합성 DNA 또는 재조합 DNA를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유형의 변형된 형태의 길이가 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 100, 적어도 200, 적어도 300, 적어도 400, 적어도 500, 적어도 1000, 적어도 5000, 적어도 10000, 또는 적어도 15000개 이상뿐만 아니라 모든 중간 길이인 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 지칭한다. 이와 관련하여 "중간 길이"는 인용된 값 사이의 임의의 길이, 예컨대 6, 7, 8, 9 등, 101, 102, 103 등; 151, 152, 153 등; 201, 202, 203 등을 의미한다. 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 변이체는 기준 서열에 대해 적어도 또는 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 가진다.

[0404] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 코돈-최적화될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "코돈-최적화

된"은 폴리펩타이드의 발현, 안정성 및/또는 활성을 증가시키기 위해 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 내 코돈을 치환하는 것을 지칭한다. 코돈 최적화에 영향을 미치는 인자는 (i) 둘 이상의 유기체 사이의 코돈 편향의 변형 또는 유전자 또는 합성으로 작제된 편향 표, (ii) 유기체, 유전자 또는 유전자 세트 내에서 코돈 편향 정도의 변형, (iii) 맥락을 포함하는 코돈의 체계적 변형, (iv) 그들의 탈암호 tRNA에 따른 코돈의 변형, (v) 전반적으로 또는 삼중 중 하나의 위치에서 GC%에 따른 코돈의 변형, (vi) 기준 서열, 예를 들어 천연 유래 서열과의 유사성 정도의 변형, (vii) 코돈 빈도 컷오프에서의 변형, (viii) DNA 서열로부터 전사된 mRNA의 구조적 특성, (ix) 코돈 치환 세트의 설계에 기반한 DNA 서열의 기능에 관한 사전 지식, (x) 각각의 아미노산에 대한 코돈 세트의 체계적 변형, 및/또는 (xi) 비논리적 번역 개시 부위의 단리된 제거를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0405] 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오타이드"는 포스포릴화된 당과의 N-글리코사이드 결합에서의 복소환식 질소 염기를 지칭한다. 뉴클레오타이드는 천연 염기 및 매우 다양한 기술-인식된 변형 염기를 포함하는 것으로 이해된다. 이러한 염기는 일반적으로 뉴클레오타이드 당 모이어티의 1' 위치에 위치된다. 뉴클레오타이드는 일반적으로 염기, 당 및 인산염기를 포함한다. 리보핵산(RNA)에서, 당은 리보스이며, 데옥시리보핵산(DNA)에서, 당은 데옥시리보스, 즉, 리보스에 존재하는 하이드록실기가 없는 당이다. 예시적인 천연 질소 염기는 퓨린, 아데노신(A) 및 구아니딘(G), 및 피리미딘, 사이티딘(C) 및 티미딘(T)(또는 RNA와 관련하여, 유라실(U))을 포함한다. 데옥시리보스의 C-1 원자는 피리미딘의 N-1 또는 퓨린의 N-9에 결합된다. 뉴클레오타이드는 보통 일, 이- 또는 삼인산염이다. 뉴클레오타이드는 당, 인산염 및/또는 염기 모이어티에서 비변형 또는 변형될 수 있다(또한 뉴클레오타이드 유사체, 뉴클레오타이드 유도체, 변형된 뉴클레오타이드, 비천연 뉴클레오타이드 및 비표준 뉴클레오타이드와 상호 호환적으로 지칭됨; 예를 들어, WO 92/07065 및 WO 93/15187). 변형된 핵산 염기의 예는 문헌[Limbach *et al.*, (1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183-2196)]에 의해 요약된다.

[0406] 뉴클레오타이드는 또한 당의 C-5에 부착된 하이드록실기 상에서 생기는 에스터화에 의한 뉴클레오사이드의 인산염 에스터로서 간주될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오사이드"는 당과의 N-글리코사이드 결합에서의 복소환식 질소 염기를 지칭한다. 뉴클레오사이드는 천연 염기를 포함하고 잘 공지된 변형된 염기를 포함하는 것으로 당업계에서 인식된다. 이러한 염기는 일반적으로 뉴클레오사이드 당 모이어티의 1' 위치에 위치된다. 뉴클레오사이드는 일반적으로 염기 및 당기를 포함한다. 뉴클레오사이드는 비변형이거나 또는 당 및/또는 염기 모이어티에서 변형될 수 있다(또한 뉴클레오사이드 유사체, 뉴클레오사이드 유도체, 변형된 뉴클레오사이드, 비천연 뉴클레오사이드 또는 비표준 뉴클레오사이드로서 상호 호환적으로 지칭됨). 또한 상기 언급한 바와 같이, 변형된 핵산 염기의 예는 문헌[Limbach *et al.*, (1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183-2196)]에 의해 요약된다.

[0407] 폴리뉴클레오타이드의 예시적 예는 서열번호 1 내지 71을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0408] 다양한 예시적 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 폴리뉴클레오타이드는 TGFβ 신호 컨버터, CTBR 신호 컨버터, 조작된 항원 수용체, 융합 폴리펩타이드 및 발현 벡터, 바이러스 벡터, 및 본 명세서에 상정된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 전달 플라스미드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0409] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오타이드 변이체" 및 "변이체" 등은 기준 폴리뉴클레오타이드 서열과 실질적인 서열 동일성을 나타내는 폴리뉴클레오타이드 또는 본 명세서에서 이후에 나타내는 엄격한 조건 하에 기준 서열과 혼성화되는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 이들 용어는 또한 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 첨가, 결실, 치환 또는 변형에 의해 기준 폴리뉴클레오타이드와 구별되는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 용어 "폴리뉴클레오타이드 변이체" 및 "변이체"는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 첨가되거나 또는 결실되거나, 또는 변형되거나 또는 상이한 뉴클레오타이드로 대체된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 이와 관련하여, 돌연변이, 첨가, 결실 및 치환을 포함하는 특정 변경은 기준 폴리뉴클레오타이드에 대해 이루어질 수 있고, 이에 의해 변경된 폴리뉴클레오타이드는 기준 폴리뉴클레오타이드의 생물학적 기능 또는 활성을 보유한다는 것이 잘 이해된다.

[0410] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 엄격한 조건 하에 표적 핵산 서열에 혼성화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. "엄격한 조건" 하에 혼성화하는 것은 서로에 대해 적어도 60% 동일한 뉴클레오타이드 서열이 혼성화된 채로 남아있는 혼성화 프로토콜을 기재한다. 일반적으로, 엄격한 조건은 정해진 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대해 열 용점(Tm)보다 약 5°C 더 낮아지도록 선택된다. Tm은 (정해진 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에) 표적 서열에 대해 상보성인 프로브의 50%가 평형 상태에서 표적 서열에 혼성화하는 온도이다. 표적 서열은 일반

적으로 과량으로 존재하기 때문에, T_m에서, 프로브의 50%는 평형상태에서 점유된다.

- [0411] 설명 "서열 동일성" 또는, 예를 들어, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "에 대해 50% 동일한 서열"을 포함하는 것은 서열이 비교창에 걸쳐 뉴클레오타이드 대 뉴클레오타이드 염기 기준 또는 아미노산 대 아미노산 기준과 동일한 정도를 지칭한다. 따라서, "서열 동일성의 백분율"은 비교창에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하는 단계, 매칭된 위치의 수를 획득하기 위해 동일한 핵산 염기(예를 들어, A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예를 들어, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 서열 둘 다에서 생기는 위치 수를 결정하는 단계, 매칭된 위치의 수를 비교창에서의 위치의 총수(즉, 창 크기)로 나누는 단계, 및 결과에 100을 곱하여서 서열 동일성의 백분율을 획득하는 단계에 의해 계산될 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 기준 서열에 대해 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 86%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드가 포함되며, 전형적으로 폴리펩타이드 변이체는 기준 폴리펩타이드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다.
- [0412] 2 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 사이의 서열 관계를 기재하기 위해 사용되는 용어는 "기준 서열", "비교창", "서열 동일성", "서열 동일성의 백분율" 및 "실질적인 동일성"을 포함한다. "기준 서열"은 길이가 적어도 12개이지만, 빈번하게는 15 내지 18개 및 종종 적어도 25개의 단량체 단위(뉴클레오타이드 및 아미노산 잔기를 포함)이다. 두 폴리뉴클레오타이드는 (1) 두 폴리뉴클레오타이드 사이의 유사한 서열(즉, 완전한 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부만), 및 (2) 두 폴리뉴클레오타이드 간에 다른 서열을 각각 포함할 수 있기 때문에, 2(이상의) 폴리뉴클레오타이드 사이의 서열 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국소 영역을 확인하고 비교하기 위해 "비교창"에 걸쳐 두 폴리뉴클레오타이드의 서열을 비교함으로써 수행된다. "비교창"은 적어도 6개의 인접한 위치, 보통 약 50 내지 약 100, 더 보통으로는 약 100 내지 약 150개의 개념적 세그먼트를 지칭하며, 이때 서열은 두 서열이 최적으로 정렬된 후에 동일한 수의 인접한 위치의 기준 서열과 비교된다. 비교창은 두 서열의 최적의 정렬을 위해 기준 서열(첨가 또는 결실을 포함하지 않음)에 비해 약 20% 이하의 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교창을 정렬하기 위한 서열의 최적의 정렬은 알고리즘의 컴퓨터화된 실행(위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지 릴리즈 7.0에서 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 미국 위스콘신주 메디슨 사이언스 드라이브 575에 소재한 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group))에 의해 또는 검사 및 선택된 임의의 다양한 방법에 의해 생성된 최적의 정렬(즉, 비교창에 걸쳐 가장 큰 백분율의 상동성을 초래)에 의해 수행될 수 있다. 또한, 예를 들어 문헌[Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389]에 의해 개시되는 바와 같이 프로그램의 BLAST 패밀리가 언급될 수 있다. 서열 분석의 상세한 논의는 문헌[Unit 19.3 of Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., 1994-1998, Chapter 15]에서 찾을 수 있다.
- [0413] 본 명세서에서 사용되는 "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 천연-유래 상태, 예를 들어, 단편에 정상적으로 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편에서 그것에 축적하는 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 또한 상보성 DNA(cDNA), 재조합 DNA 또는 천연에 존재하지 않고 사람의 손으로 만들어지는 다른 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0414] 다양한 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 상정된 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA를 포함한다. 소정의 실시형태에서, mRNA는 캡, 하나 이상의 뉴클레오타이드 및 폴리(A) 꼬리를 포함한다.
- [0415] 폴리뉴클레오타이드의 배향을 기재하는 용어는 하기를 포함한다: 5'(정상적으로는 유리 인산염기를 갖는 폴리뉴클레오타이드의 말단) 및 3'(정상적으로는 유리 하이드록실(OH) 기를 갖는 폴리뉴클레오타이드의 말단). 폴리뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 배향 또는 3'에서 5' 배향으로 주석이 달릴 수 있다. DNA 및 mRNA에 대해, 5'에서 3' 가닥은 "센스", "플러스" 또는 "암호" 가닥으로 표기되는데, 그의 서열이 전전령(전mRNA)의 서열과 동일하기 때문이다[DNA에서 티민(T)을 대신하는 RNA에서의 유라실(U)을 제외함]. DNA 및 mRNA에 대해, RNA 중합효소에 의해 전사되는 가닥인 상보성 3'에서 5' 가닥은 "주형", "안티센스", "마이너스" 또는 "비암호" 가닥으로 표기된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "역 배향"은 3'에서 5' 배향으로 기재된 5'에서 3' 서열 또는 5'에서 3' 배향으로 기재된 3'에서 5' 서열을 지칭한다.
- [0416] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 염기쌍 규칙과 관련된 폴리뉴클레오타이드(즉, 뉴클레오타이드의 서열)를 지칭한다. 예를 들어, DNA 서열 5' A G T C A T G 3'의 상보성 가닥은 3' T C A G T A C 5'이다. 후자의 서열은 종종 좌측 상에서 5' 말단 및 우측 상에서 3' 말단과 역 상보체로서 기재된다, 5' C A T G A C T 3'. 역 상보체와 동

일한 서열은 회문구조 서열인 것으로 언급된다. 상보성은 "부분적"일 수 있는데, 이때 핵산의 염기 중 일부만이 염기쌍 규칙에 따라 매칭된다. 또는, 핵산 사이의 "완전한" 또는 "총" 상보성이 있을 수 있다.

- [0417] 게다가, 유전자 암호 축퇴의 결과로서, 본 명세서에서 기재된 폴리펩타이드, 또는 이의 변이체의 단편을 암호화할 수 있는 다수의 뉴클레오타이드 서열이 있다는 것은 당업자에 의해 인식될 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드 중 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대해 최소 상동성을 보유한다. 그럼에도 불구하고, 코돈출현빈도의 차이에 기인하여 변하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 인간 및/또는 영장류 코돈 선택을 위해 최적화된 폴리뉴클레오타이드가 특이적으로 상정된다. 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 발현 및/또는 안정성에 대해 코돈 최적화된다. 추가로, 본 명세서에 제공된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전자의 대립유전자가 또한 사용될 수 있다. 대립유전자는 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 뉴클레오타이드의 결실, 첨가 및/또는 치환의 결과로서 변경된 내인성 폴리뉴클레오타이드 서열이다.
- [0418] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산 카세트" 또는 "발현 카세트"는 RNA, 및 후속적으로 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있는 벡터 내의 유전자 서열을 지칭한다. 일 실시형태에서, 핵산 카세트는 관심 대상의 유전자(들), 예를 들어, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드(들)를 함유한다. 다른 실시형태에서, 핵산 카세트는 하나 이상의 발현 제어 서열, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 폴리(A) 서열 및 관심대상의 유전자(들), 예를 들어, 관심대상의 폴리뉴클레오타이드(들)를 함유한다. 벡터는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 핵산 카세트를 포함할 수 있다. 카세트 내 핵산이 RNA로 전사될 수 있고, 필요할 때, 단백질 또는 폴리펩타이드로 번역되며, 형질전환 세포에서 활성에 필요한 적절한 번역후 변형을 겪으며, 적절한 세포내 구획에 대한 표적화 또는 세포의 구획으로의 분비에 의해 생물학적 활성을 위한 적절한 구획으로 전좌되도록, 핵산 카세트는 벡터 내에서 위치적으로 그리고 순차적으로 배향된다. 바람직하게는, 카세트는 벡터 내로 용이한 삽입에 적합한 그의 3' 및 5' 말단을 가지며, 예를 들어, 그는 각각의 말단에서 제한 엔도뉴클레아제 부위를 가진다. 바람직한 실시형태에서, 핵산 카세트는 유전 장애를 치료하거나, 예방하거나 또는 개선시키기 위해 사용되는 치료 유전자의 서열을 함유한다. 카세트는 제거될 수 있고, 단일 단위로서 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내로 삽입된다.
- [0419] 폴리뉴클레오타이드는 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드(들)를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "관심 대상의 폴리뉴클레오타이드"는 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 본 명세서에 상정된 저해 폴리뉴클레오타이드의 전사를 위한 주형으로서 작용하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0420] 암호 서열 그 자체의 길이와 상관없이, 본 명세서에 상정된 폴리뉴클레오타이드는 그들의 전체 길이가 상당히 다를 수 있도록, 본 명세서의 다른 곳에 개시되거나 또는 당업계에 공지된 바와 같이 다른 DNA 서열, 예컨대 프로모터 및/또는 인핸서, 비번역 영역(UTR), 신호 서열, 코작 서열, 폴리아데닐화 신호, 추가적인 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 내부 리보솜 유입 부위(IRES), 재조합효소 인식 부위(예를 들어, LoxP, FRT 및 Att 부위), 종결 코돈, 전사 종결 신호, 및 자기-절단성 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 에피토프 태그와 조합될 수 있다. 따라서 거의 임의의 길이의 폴리뉴클레오타이드 단편이 사용될 수 있으며, 총 길이가 제조의 용이함 및 의도된 재조합 DNA 프로토콜에서의 사용에 의해 바람직하게 제한된다는 것이 상정된다.
- [0421] 폴리뉴클레오타이드는 당업계에 공지되고 이용 가능한 임의의 다양한 잘 확립된 기법을 이용하여 제조되고/되거나 조작되고/되거나 발현되고/되거나 전달될 수 있다. 목적으로 하는 폴리펩타이드를 발현시키기 위해, 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 적절한 벡터 내로 삽입될 수 있다.
- [0422] 벡터의 예시적 예는 플라스미드, 자율적 복제 서열 및 전위요소, 예를 들어, 잠자는 미녀(Sleeping Beauty), 피기백(PiggyBac)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0423] 벡터의 추가적인 예시적 예는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 예컨대 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC) 또는 P1-유래 인공 염색체(PAC), 박테리오파지, 예컨대 람다 파지 또는 M13 파지 및 동물 바이러스를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0424] 벡터로서 유용한 바이러스의 예시적 예는 레트로바이러스(렌티바이러스를 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예를 들어, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바쿨로바이러스, 유두종바이러스 및 파보바이러스(예를 들어, SV40)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0425] 발현 벡터의 예시적 예는 포유류 세포에서 발현을 위한 pCIneo 벡터(프로메가(Promega)); 포유류 세포에서 렌티 바이러스-매개 유전자 전달 및 발현을 위한 pLenti4/V5-DEST(상표명), pLenti6/V5-DEST(상표명) 및 pLenti6.2/V5-GW/lacZ(인비트로젠(Invitrogen))를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 폴리펩타이드의 암호 서열은 포유류 세포에서 폴리펩타이드의 발현을 위해 이러한 발현 벡터

내로 결합될 수 있다.

- [0426] 특정 실시형태에서, 벡터는 에피솜 벡터 또는 염색체외로 유지되는 벡터이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "에피솜"은 숙주의 염색체 DNA 내로의 통합 없이 그리고 분할 숙주 세포로부터의 점진적 상실 없이 복제할 수 있는 벡터를 지칭하는데, 또한 이는 상기 벡터가 염색체외로 또는 에피솜으로 복제한다는 것을 의미한다.
- [0427] 발현 벡터에 존재하는 "발현 제어 서열", "제어 요소" 또는 "조절 서열"은 전사 및 번역을 수행하기 위해 숙주 세포 단백질화 상호작용하는 벡터의 해당 비번역 영역(복제기점, 선택 카세트, 프로모터, 인핸서, 번역 개시 신호(사인 달가노 서열 또는 코작 서열) 인트론, 폴리아데닐화 서열, 5' 및 3' 비번역 영역)이다. 이러한 요소는 그들의 강도 및 특이성이 다를 수 있다. 이용되는 벡터 시스템 및 숙주에 따라서, 편재성 프로모터 및 유도성 프로모터를 포함하는 다수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다.
- [0428] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 발현 벡터 및 바이러스 벡터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 벡터를 포함한다. 벡터는 하나 이상의 외인성, 내인성, 또는 이중성 제어 서열, 예컨대 프로모터 및/또는 인핸서를 포함할 수 있다. "내인성 제어 서열"은 게놈 내 주어진 유전자와 자연적으로 연결된 것이다. "외인성 제어 서열"은 해당 유전자의 전사가 연결된 인핸서/프로모터에 의해 지시되도록 유전자 조작 수단(즉, 분자 생물학 기법)에 의해 유전자에 대한 병렬 배치로 위치되는 것이다. "이중성 제어 서열"은 유전자 조작 중인 세포와 상이한 종으로부터 유래된 외인성 서열이다. "합성" 제어 서열은 하나 이상의 내인성 및/또는 외인성 서열의 요소, 및/또는 특정 요법에 대해 최적의 프로모터 및/또는 인핸서 활성을 제공하는 시험관내 또는 인실리코로 결정된 서열을 포함할 수 있다.
- [0429] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로모터"는 RNA 중합효소에 결합하는 폴리뉴클레오타이드(DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 지칭한다. RNA 중합효소는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드를 개시하고 전사시킨다. 특정 실시형태에서, 포유류 세포에서 작동성인 프로모터는 전사가 개시되는 부위로부터 상류의 대략 25 내지 30개 염기에 위치된 AT-풍부 영역 및/또는 전사 시작으로부터 상류의 70 내지 80개 염기로 발현되는 다른 서열, N이 임의의 뉴클레오타이드일 수 있는 CNCAAT 영역을 포함한다.
- [0430] 용어 "인핸서"는 향상된 전사를 제공할 수 있는 서열을 함유하는 DNA의 세그먼트를 지칭하며, 일부 예에서 다른 제어 서열에 비해 그들의 배향과 독립적으로 작용할 수 있다. 인핸서는 프로모터 및/또는 다른 인핸서 요소와 협응하여 또는 상가적으로 작용할 수 있다. 용어 "프로모터/인핸서"는 프로모터와 인핸서 기능을 둘 다 제공할 수 있는 서열을 함유하는 DNA의 세그먼트를 지칭한다.
- [0431] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 병렬배치를 지칭하되, 기재된 성분인 그들의 의도된 방식으로 작용하도록 하는 관계이다. 일 실시형태에서, 상기 용어는 핵산 발현 제어 서열(예컨대 프로모터, 및/또는 인핸서)과 제2 폴리뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드 사이의 작용성 결합을 지칭하되, 발현 제어 서열은 제2 서열에 대응하는 핵산의 전사를 지시한다.
- [0432] 본 명세서에서 사용되는 용어 "구성적 발현 제어 서열"은 작동 가능하게 연결된 서열의 전사를 계속해서 또는 지속적으로 허용하는 프로모터, 인핸서, 또는 프로모터/인핸서를 지칭한다. 구성적 발현 제어 서열은 매우 다양한 세포 및 조직 유형에서의 발현을 허용하는 "편재성" 프로모터, 인핸서, 또는 프로모터/인핸서 또는 제한된 각각 다양한 세포 및 조직 유형에서의 발현을 허용하는 "세포 특이적", "세포 유형 특이적", "세포 계통 특이적" 또는 "조직 특이적" 프로모터, 인핸서 또는 프로모터/인핸서일 수 있다.
- [0433] 특정 실시형태에서 사용하는 데 적합한 예시적 편재성 발현 제어 서열은 거대세포바이러스(CMV) 급초기 프로모터, 바이러스 유인원 바이러스 40(SV40)(예를 들어, 초기 또는 후기), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV) LTR 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR, 단순 포진 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터, 백시니아 바이러스로부터의 H5, P7.5 및 P11 프로모터, 신장 인자 1-알파(EF1a) 프로모터, 초기 성장 반응 1(EGR1), 페리틴 H(FerH), 페리틴 L(FerL), 글리세르알데하이드 3-인산염 탈수소효소(GAPDH), 진핵 번역 개시 인자 4A1(EIF4A1), 열 충격 70kDa 단백질 5(HSPA5), 열 충격 단백질 90kDa 베타, 구성원 1(HSP90B1), 열 충격 단백질 70kDa(HSP70), β -키네신(β -KIN), 인간 ROSA 26 좌위(Irions *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482 (2007)), 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 거대세포바이러스 인핸서/닭 β -액틴(CAG) 프로모터, β -액틴 프로모터 및 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 결실된 음성 대조 영역, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된(MND) 프로모터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다(Challita *et al.*, *J Virol.* 69(2):748-55 (1995)).
- [0434] 일 실시형태에서, 벡터는 MND 프로모터를 포함한다.

- [0435] 일 실시형태에서, 벡터는 인간 EF1a 유전자의 제1 인트론을 포함하는 EF1a 프로모터를 포함한다.
- [0436] 일 실시형태에서, 벡터는 인간 EF1a 유전자의 제1 인트론을 결여하는 EF1a 프로모터를 포함한다.
- [0437] 특정 실시형태에서, 목적으로 하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 세포 유형 특이적, 계통 특이적 또는 조직 특이적 발현을 달성하기 위해(예를 들어, 세포 유형, 세포 계통 또는 조직의 서브세트만의 또는 발생의 특정 단계 동안 폴리펩타이드를 암호화하는 특정 핵산을 발현시키기 위해) 세포, 세포 유형, 세포 계통 또는 조직 특이적 발현 제어 서열을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0438] 특정 실시형태에서, T 세포 특이적 프로모터의 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0439] 본 명세서에서 사용되는, "조건적 발현"은 유도성 발현; 억제성 발현; 특정 생리적, 생물학적 또는 질환 상태 등을 갖는 세포 또는 조직에서의 발현을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 유형의 조건적 발현을 지칭할 수 있다. 이 정의는 세포 유형 또는 조직 특이적 발현을 제외하는 것으로 의도되지 않는다. 특정 실시형태는 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드의 조건적 발현을 제공하며, 예를 들어, 발현은 세포, 조직, 유기체 등에 폴리뉴클레오타이드가 발현되도록 야기하거나 또는 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리뉴클레오타이드의 증가 또는 감소를 야기하는 처리 또는 조건을 실시함으로써 제어된다.
- [0440] 유도성 프로모터/시스템의 예시적 예는 스테로이드-유도성 프로모터, 예컨대 글루코코르티코이드 또는 에스트로겐 수용체를 암호화하는 유전자에 대한 프로모터(대응하는 호르몬에 의한 처리에 의한 유도성), 메탈로티오닌 프로모터(다양한 중금속에 의한 처리에 의한 유도성), MX-1 프로모터(인터페론에 의한 유도성), "진스위치(GeneSwitch)" 미페프리스톤-조절 가능 시스템(Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), 큐메이트 유도성 유전자 스위치(WO 2002/088346), 테트라사이클린-의존적 조절 시스템 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 유도체는 글루코코르티코이드, 에스트로겐, 미페프리스톤(RU486), 금속, 인터페론, 소분자, 큐메이트, 테트라사이클린, 독시사이클린 및 이들의 변이체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0441] 조건적 발현은 또한 부위 특이적 DNA 재조합효소를 이용함으로써 달성될 수 있다. 특정 실시형태에 따르면, 벡터는 부위 특이적 재조합효소에 의해 매개된 재조합을 위한 적어도 하나의(전형적으로 2개의) 부위(들)를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "재조합효소" 또는 "부위 특이적 재조합효소"는 하나 이상의 재조합 부위(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 30, 50개 등)를 수반하는 재조합 반응에 연루된 절단 또는 통합적 단백질, 효소, 보조 요소 또는 관련 단백질을 포함하는데, 이는 야생형 단백질(문헌[Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707(1993)] 참조) 또는 돌연변이체, 유도체(예를 들어, 재조합 단백질 서열 또는 이의 단편을 함유하는 융합 단백질), 이의 단편 및 변이체일 수 있다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 재조합효소의 예시적 예는 Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin, Tn3 위치특이성 재조합촉진효소, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 및 ParA를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0442] 폴리뉴클레오타이드는 임의의 매우 다양한 부위 특이적 재조합효소에 대한 하나 이상의 재조합 부위를 포함할 수 있다. 부위 특이적 재조합효소에 대한 표적 부위는 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 통합에 필요한 임의의 부위(들)에 추가된다는 것이 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "재조합 서열", "재조합 부위" 또는 "부위-특이적 재조합 부위"는 재조합효소가 인식하고 결합하는 특정 핵산 서열을 지칭한다.
- [0443] 예를 들어, Cre 재조합효소에 대한 하나의 재조합 부위는 8개의 염기쌍 코어 서열에 측접하는 2개의 13개 염기쌍 역위 반복부(재조합효소 결합 부위로서 작용)를 포함하는 34개의 염기쌍 서열인 loxP이다(문헌[Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527(1994)]의 도 1 참조). 다른 예시적인 loxP 부위는 lox511(Hoess *et al.*, 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171(Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer *et al.*, 2002), lox71(Albert *et al.*, 1995) 및 lox66(Albert *et al.*, 1995)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0444] FLP 재조합효소에 대한 적합한 인식 부위는 적합한 인식 부위는 FRT (McLeod, *et al.*, 1996), F₁, F₂, F₃(Schlake and Bode, 1994), F₄, F₅(Schlake and Bode, 1994), FRT(LE)(Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE)(Senecoff *et al.*, 1988)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0445] 인식 서열의 다른 예는 재조합효소 λ 인테그라제, 예를 들어, phi-c31에 의해 인식되는 attB, attP, attL, 및 attR 서열이다. ϕ C31 SSR은 이중성 부위 attB(길이가 34 bp)와 attP(길이가 39 bp)사이에서만 재조합을 매개한다(Groth *et al.*, 2000). 각각 박테리아 및 파지 계통 상의 파지 인테그라제에 대한 부착 부위에 대해 명명되는

attB 및 attP는 둘 다 ϕ C31 동종이량체에 의해 결합될 가능성이 있는 불완전한 역위 반복부를 함유한다(Groth *et al.*, 2000). 산물 부위인 attL 및 attR은 추가적인 ϕ C31-매개 재조합으로 효과적으로 비활성이 되어(Belteki *et al.*, 2003), 반응을 비가역적으로 만든다. 삽입을 촉매하기 위해, attB-보유 DNA는 attP가 게놈 attB 부위 내로 삽입되는 것보다 더 용이하게 게놈 attP 부위 내로 삽입한다는 것을 발견하였다(Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003). 따라서, 전형적인 전략은 정해진 좌위 내로 attP-보유 "도킹 부위"의 상동성 재조합에 의해 위치가 정해지며, 이는 이어서, 삽입을 위한 attB-보유 유입 서열과 짝지어진다.

[0446] 본 명세서에서 사용되는, "내부 리보솜 유입 부위" 또는 "IRES"는 시스트론(단백질 암호화 영역)의 개시 코돈, 예컨대 ATG에 대한 직접 내부 리보솜 유입을 촉진시킴으로써 유전자의 캡-독립적 번역을 야기하는 요소를 지칭한다. 예를 들어, 문헌[Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83] 및 Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000] 참조. 당업자에 의해 일반적으로 사용되는 IRES의 예는 미국 특허 제6,692,736호에 기재된 것을 포함한다. 당업계에 공지된 "IRES"의 추가적인 예는 피코르나 바이러스로부터 얻을 수 있는 IRES(Jackson *et al.*, 1990) 및 바이러스 또는 세포 mRNA 공급원, 예를 들어, 번역글로불린 중쇄 결합 단백질(BiP), 혈관 내피 성장인자(VEGF)(Huez *et al.*, 1998. *Mol. Cell. Biol.* 18(11):6178-6190), 섬유아세포 성장인자 2(FGF-2), 및 인슐린-유사 성장 인자(IGFII), 번역 개시 인자 eIF4G 및 효모 전사 인자 TFIID 및 HAP4, 노바겐(Novagen)으로부터 상업적으로 입수 가능한 뇌심근염 바이러스(EMCV)(Duke *et al.*, 1992. *J. Virol* 66(3):1602-9)로부터 얻을 수 있는 IRES 및 VEGF IRES(Huez *et al.*, 1998. *Mol Cell Biol* 18(11):6178-90)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. IRES는 또한 피코르나비리대(Picornaviridae), 디시스트로비리대(Dicistroviridae) 및 플라리비리대(Flaviviridae) 종의 바이러스 게놈에서 그리고 HCV, 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스(FrMLV) 및 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV)에서 보고되었다.

[0447] 일 실시형태에서, 본 명세서에서 상정된 폴리뉴클레오타이드에서 사용되는 IRES는 EMCV IRES이다.

[0448] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 공통 코작 서열을 갖고 목적으로 하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "코작 서열"은 리보솜에 대한 mRNA의 초기 결합을 크게 용이하게 하고 번역을 증가시키는 짧은 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 공통 코작 서열은 (GCC)RCCATGG (서열번호 72)이며, 여기서 R은 퓨린(A 또는 G)이다(Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92, 및 Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48).

[0449] 이중성 핵산 전사체의 효율적인 종결 및 폴리아데닐화를 지시하는 요소는 이중성 유전자 발현을 증가시킨다. 전사 종결 신호는 일반적으로 폴리아데닐화 신호의 하류에서 발견된다. 특정 실시형태에서, 백터는 발현될 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 폴리아데닐화 서열 3' 을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리A 부위 또는 "폴리A 서열"은 RNA 중합효소 II에 의한 초기 RNA 전사체의 종결과 폴리아데닐화를 둘 다 지시하는 DNA 서열을 의미한다. 폴리아데닐화 서열은 암호 서열의 3' 말단에 대한 폴리A 꼬리의 첨가에 의해 mRNA 안정성을 촉진시킬 수 있고, 따라서, 증가된 번역 효율에 기여한다. 절단 및 폴리아데닐화는 RNA에서 폴리(A) 서열에 의해 지시된다. 포유류 프레-mRNA에 대한 코어 폴리(A) 서열은 절단-폴리아데닐화 부위에 축적하는 2개의 인식 요소를 가진다. 전형적으로, 대부분의 비변이체 AAUAAA 핵사머는 U 또는 GU 잔기가 풍부한 더 가변적인 상류의 20 내지 50개 뉴클레오타이드에 놓인다. 초기 전사체의 절단은 이들 두 요소 사이에서 생기고, 5' 절단 생성물에 대한 250개까지의 아데노신의 첨가에 결합된다. 특정 실시형태에서, 코어 폴리(A) 서열은 이상적인 폴리A 서열(예를 들어, AATAAA, ATATAA, AGTAAA)이다. 특정 실시형태에서, 폴리(A) 서열은 SV40 폴리A 서열, 소 성장 호르몬 폴리A 서열(BGHpA), 토끼 β -글로빈 폴리A 서열(r β gpA), 또는 당업계에 공지된 다른 적합한 이중성 또는 내인성 폴리A 서열이다.

[0450] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 세포는 직접적인 독성 및/또는 비 제어 증식의 위험을 감소시키기 위해 유도성 자살 유전자를 포함하는 자살 유전자를 이용한다. 구체적 실시형태에서, 자살 유전자는 폴리뉴클레오타이드 또는 세포를 보유하는 숙주에 대해 면역원성이 아니다. 사용될 수 있는 자살 유전자의 특정 예는 카스파제-9 또는 카스파제-8 또는 사이토신 데아미나제이다. 카스파제-9는 이량체화(CID)의 특정 화학적 유도자를 이용하여 활성화될 수 있다.

[0451] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 면역 효과기 세포, 예를 들어, T 세포가 생체내 음성 선택을 허용하게 하는 유전자 세그먼트를 포함한다. "음성 선택"은 주입 세포가 개체의 생체내 조건의 변화 결과로서 제거될 수 있다는 것을 의미한다. 음성 선택 가능한 표현형은 투여되는 제제, 예를 들어, 화합물에 대한 민감성을 부여하는 유전자의 삽입으로부터 초래될 수 있다. 음성 선택 가능한 유전자는 당업계에 공지되어 있으며, 특히 다음을 포함한다: 간사이클로비어 민감성을 부여하는 단순 포진 바이러스 I형 티미딘 키나제(HSV-I TK) 유전자

(Wigler *et al.*, *Cell* 11:223, 1977); 세포의 하이포크산틴 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT) 유전자, 세포의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(APRT) 유전자 및 박테리아 사이토신 탈아미나제(Mullen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:33(1992)).

- [0452] 일부 실시형태에서, 유전자 변형된 면역 효과기 세포, 예컨대 T 세포는 시험관내에서 음성 선택 가능한 표현형의 세포 선택을 가능하게 하는 양성 마커를 더 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 양성 선택 가능 마커는 숙주 세포 내로 도입 시, 유전자를 운반하는 세포의 양성 선택을 허용하는 음성 표현형을 발현시키는 유전자일 수 있다. 이 유형의 유전자는 당업계에 공지되어 있으며, 특히, 하이그로마이신 B에 대한 내성을 부여하는 하이그로마이신-B 포스포트랜스퍼라제 유전자(hph), 항생제 G418에 대한 내성을 암호화하는 Tn5로부터의 아미노 글리코사이드 포스포트랜스퍼라제 유전자(neo 또는 aph), 다이하이드로엽산 환원효소(DHFR) 유전자, 아데노신 탈아미나제 유전자(ADA) 및 다제내성(MDR) 유전자를 포함한다.
- [0453] 일 실시형태에서, 양성 선택 가능 마커 및 음성 선택 가능 요소는 음성 선택 가능 요소의 상실이 또한 양성 선택 가능 마커의 상실을 수반하도록 연결된다. 특정 실시형태에서, 양성 및 음성 선택 가능 마커는 하나의 상실이 다른 것의 상실을 필수적으로 야기하도록 융합된다. 발현 산물로서 상기 기재한 목적으로 하는 양성 및 음성 선택 특징을 부여하는 폴리펩타이드를 수득하는 융합된 폴리뉴클레오타이드는 예는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 티미딘 키나제 융합 유전자(HyTK)이다. 이 유전자의 발현은 시험관내 양성 선택을 위해 하이그로마이신 B 내성, 및 생체내 음성 선택을 위해 간사이클로비어 민감성을 부여하는 폴리펩타이드를 수득한다. 또한 음성 양성 선택 가능 마커를 음성 선택 가능 마커와 융합시키는 것으로부터 유래된 2작용성 선택 가능 유전자의 용도를 기재하는 S. D. Lupton에 의한 PCT US91/08442 및 PCT/US94/05601의 공보를 참조한다.
- [0454] 바람직한 양성 선택 가능 마커는 hph, nco 및 gpt로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자로부터 유래되고, 바람직한 음성 선택 가능 마커는 사이토신 탈아미나제, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT 및 gpt로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자로부터 유래된다. 특정 실시형태에서 상정된 예시적인 2작용성 선택 가능한 융합 유전자는 유전자를 포함하지만, 이것으로 제한되지 않되, 양성 선택 가능 마커는 hph 또는 neo로부터 유래되고, 음성 선택 가능 마커는 사이토신 탈아미나제 또는 TK 유전자 또는 선택 가능한 마커로부터 유래된다.
- [0455] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 면역 효과기 세포, 예를 들어, T 세포 내로, 비바이러스 및 바이러스적 방법에 의해 도입될 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드의 전달은 동일한 방법에 의해 또는 상이한 방법에 의해, 그리고/또는 동일한 벡터에 의해 또는 상이한 벡터에 의해 제공될 수 있다.
- [0456] 용어 "벡터"는 다른 핵산 분자를 전달하거나 또는 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 전달된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결되고, 예를 들어, 이에 삽입된다. 벡터는 세포 내 자율 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있거나, 또는 숙주 세포 DNA 내로의 통합을 허용하기에 충분한 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 비바이러스 벡터는 본 명세서에 상정된 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 T 세포에 전달하는 데 사용된다.
- [0457] 비바이러스 벡터의 예시적 예는 플라스미드(예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 트랜스포존, 코스미드 및 박테리아 인공 염색체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0458] 특정 실시형태에서 상정된 폴리뉴클레오타이드의 비바이러스 전달의 예시적 방법은 전기천공법, 초음파천공법, 리포펙션, 미량주사법, 유전자총법, 마이크로솜, 리포솜, 면역리포솜, 나노입자, 다양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 비리온, DEAE-텍스트란-매개 전달, 유전자 총 및 열-충격을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0459] 특정 실시형태에 상정된 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 폴리뉴클레오타이드 전달 시스템의 예시적 예는 아막사 바이오시스템즈(Amaxa Biosystems), 맥스사이트 인코포레이티드(Maxcyte, Inc.), BTX 몰레큘러 딜리버리 시스템즈(BTX Molecular Delivery Systems) 및 코페르니쿠스 세라퓨틱스 인코포레이티드(Copernicus Therapeutics Inc.)에 의해 제공된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 리포펙션 시약은 상업적으로 시판된다(예를 들어, 트랜스펙탐(Transfectam)(상표명) 및 리포펙틴(Lipofectin)(상표명)). 폴리뉴클레오타이드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Liu *et al.* (2003) *Gene Therapy.* 10:180-187; 및 Balazs *et al.* (2011) *Journal of Drug Delivery.* 2011:1-12] 참조. 항체-표적화된, 박테리아 유래된, 살아있지 않은 나노세포-기반 전달이 또한 특정 실시형태에서 상정된다.

- [0460] 특정 실시형태에서 상정된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 벡터는 개개 환자에 대한 투여에 의해, 전형적으로 이하에 기재하는 바와 같이 전신 투여(예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 피하 또는 두개내 주입) 또는 국소 적용에 의해 생체내로 전달될 수 있다. 대안적으로, 벡터는 생체의 세포, 예컨대 개개 환자로부터 외식된 세포(예를 들어, 동원된 말초 혈액, 림프구, 골수 흡입물, 조직 생검 등) 또는 보존적 공여자 조혈 세포에 전달될 수 있고, 다음에 환자 내로 세포의 재이식이 이어진다.
- [0461] 일 실시형태에서, 뉴클레아제 변이체 및/또는 공여자 수선 주형을 포함하는 바이러스 벡터는 생체내 세포의 형질도입을 위해 유기체에 직접적으로 투여된다. 대안적으로, 네이키드 DNA가 투여될 수 있다. 투여는 주사, 주입, 국소 적용 및 전기천공법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 혈액 또는 조직 세포와의 궁극적 접촉으로 분자를 도입하기 위해 정상적으로 사용되는 임의의 경로에 의한다. 특정 조성물을 투여하기 위해 하나 초과와 경로의 사용될 수 있지만, 이러한 핵산을 투여하는 적합한 방법은 당업계에서 이용되고 잘 공지되어 있으며, 특정 경로는 종종 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있다.
- [0462] 특정 실시형태에 상정된 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 바이러스 벡터 시스템의 예시적 예는 아데노-연관 바이러스(AAV), 레트로바이러스, 단순 포진 바이러스, 아데노바이러스 및 백시니아 바이러스 벡터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0463] 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 이용하여 세포를 형질도입함으로써 면역 효과기 세포, 예를 들어, T 세포 내로 도입된다.
- [0464] AAV는 작은(대략 26nm) 복제-결함의, 주로 에피솅, 비외피 바이러스이다. AAV는 분할세포와 비분할 세포를 둘 다 감염시킬 수 있고, 숙주 세포 내로 그의 게놈을 혼입시킬 수 있다. 재조합 AAV(rAAV)는 전형적으로 최소, 이식유전자 및 그의 조절 서열, 및 5' 및 3' AAV 역위 말단 반복부(ITR)로 구성된다. ITR 서열은 길이가 약 145bp이다. 특정 실시형태에서, rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 또는 AAV10로부터 단리된 IRT 및 캡시드 서열을 포함한다.
- [0465] 일부 실시형태에서, 키메라 rAAV가 사용되며, ITR 서열은 하나의 AAV 혈청형으로부터 단리되고, 캡시드 서열은 상이한 AAV 혈청형으로부터 단리된다. 예를 들어, AAV2로부터 유래된 ITR 서열 및 AAV6로부터 유래된 캡시드 서열을 갖는 rAAV는 AAV2/AAV6로서 지칭된다. 특정 실시형태에서, rAAV 벡터는 AAV2로부터의 ITR, 및 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 또는 AAV10 중 어느 하나로부터의 캡시드 단백질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, rAAV는 AAV2로부터 유래된 ITR 서열 및 AAV6로부터 유래된 캡시드 서열을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, rAAV는 AAV2로부터 유래된 ITR 서열 및 AAV2로부터 유래된 캡시드 서열을 포함한다.
- [0466] 일부 실시형태에서, 조작 및 선택 방법은 관심 대상의 세포를 형질도입할 가능성을 더 만들기 위해 AAV 캡시드에 적용될 수 있다.
- [0467] rAAV 벡터의 구성, 이의 생산 및 정제는, 예를 들어, 미국 특허 제9,169,494호; 제9,169,492호; 제9,012,224호; 제8,889,641호; 제8,809,058호; 및 제8,784,799호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함된다.
- [0468] 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 레트로바이러스, 예를 들어, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 렌티바이러스를 이용하여 세포를 형질도입함으로써 면역 효과기 세포, 예를 들어, T 세포 내로 도입된다.
- [0469] 본 명세서에서 사용되는 용어 "레트로바이러스"는 그의 게놈 RNA를 선형 이중 가닥 DNA 복제물로 역전사시키고, 후속적으로 그의 게놈 DNA를 숙주 게놈 내로 공유적으로 통합시키는 RNA 바이러스를 지칭한다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 예시적인 레트로바이러스는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(M-MuLV), 몰로니 뮤린 육종 바이러스(MoMuSV), 하비 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스(MuMTV), 깃분 유인원 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(FLV), 스푸마바이러스, 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스, 뮤린 줄기 세포 바이러스(MSCV) 및 라우스 육종 바이러스(RSV)) 및 렌티바이러스를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0470] 본 명세서에서 사용되는 용어 "렌티바이러스"는 복잡한 레트로바이러스의 군(또는 속)을 지칭한다. 예시적인 렌티바이러스는 HIV(인간 면역결핍 바이러스; HIV 1형, 및 HIV 2형을 포함); 비스나-메디 바이러스(VMV) 바이러스; 염소 관절염-뇌염바이러스(CAEV); 마 전염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV);

소 면역 결핍 바이러스(BIV); 및 시미안 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일 실시형태에서, HIV 기반 벡터 골격(즉, HIV 시스-작용성 서열 요소)이 바람직하다.

- [0471] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 렌티바이러스 벡터는 하나 이상의 LTR, 및 다음의 부속 요소: cPPT/FLAP, Psi(Ψ) 패키징 신호, 유출 요소, 폴리(A) 서열 중 하나 이상 또는 모두를 포함하고, 선택적으로 본 명세서의 다른 곳에 논의된 바와 같이 WPRE 또는 HPRE, 절연체 요소, 선택 가능한 마커, 및 세포 자살 유전자를 포함할 수 있다.
- [0472] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 렌티바이러스 벡터는 통합적 또는 비통합적 또는 통합 결함 렌티바이러스일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "통합 결함 렌티바이러스" 또는 "IDLV"는 숙주 세포의 게놈 내로 바이러스 게놈을 통합하는 능력을 결여하는 인테그라제를 갖는 렌티바이러스를 지칭한다. 통합-부적격 바이러스 벡터는 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 특허 출원 WO 2006/010834에 기재되어 있다.
- [0473] 인테그라제 활성을 감소시키는 데 적합한 HIV-1 pol 유전자에서의 예시적인 돌연변이는 H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A 및 K264H를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0474] 용어 "긴 말단 반복부(LTR)"는 그들의 천연 서열과 관련하여, 반복을 지시하고 U3, R 및 U5 영역을 함유하는 레트로바이러스 DNA의 말단에 위치한 염기쌍의 도메인을 지칭한다.
- [0475] 본 명세서에서 사용되는 용어 "FLAP 요소" 또는 "cPPT/FLAP"는 서열이 레트로바이러스, 예를 들어, HIV-1 또는 HIV-2의 중심 폴리푸린관 및 중심 종결 서열(cPPT 및 CTS)을 포함하는 핵산을 지칭한다. 적합한 FLAP 요소는 미국 특허 제6,682,907호에 그리고 문헌[Zennou, *et al.*, 2000, *Cell*, 101:173]에 기재되어 있다.
- [0476] 본 명세서에서 사용되는 용어 "패키징 신호" 또는 "패키징 서열"은 바이러스 캡시드 또는 입자 내로의 바이러스 RNA의 삽입에 필요한 레트로바이러스 게놈 내에 위치한 싸이[Ψ] 서열을 지칭한다, 예를 들어, 문헌[Clever *et al.*, 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109] 참조.
- [0477] 용어 "유출 요소"는 세포의 핵으로부터 세포질까지 RNA 전사체의 수송을 조절하는 시스-작용성 전사후 조절 요소를 지칭한다. RNA 유출 요소의 예는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) rev 반응 요소(RRE)(예를 들어, 문헌 [Cullen *et al.*, 1991. *J. Virol.* 65: 1053; 및 Cullen *et al.*, 1991. *Cell* 58: 423] 참조), 및 B형 간염 바이러스 전사후 조절 요소(HPRE)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0478] 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터 내 이중성 서열의 발현은 전사후 조절 요소, 효율적인 폴리아데닐화 부위, 및 선택적으로, 전사 종결 신호를 벡터 내로 혼입함으로써 증가된다. 다양한 전사후 조절 요소, 예를 들어, 마멋 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886); B형 간염 바이러스에 존재하는 전사후 조절 요소(HPRE)(Huang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); 등(Liu *et al.*, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766)은 단백질에서 이중성 핵산의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0479] 렌티바이러스 벡터는 바람직하게는 LTR을 변형시키는 결과로서 몇몇 안전한 향상을 함유한다. "자기-비활성화"(SIN) 벡터는 복제-결함 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 지칭하며, 예를 들어, 이때 U3 영역으로서 알려진 우측(3') LTR 인핸서-프로모터 영역은 바이러스 복제의 제1 라운드 이후의 바이러스 전사를 방지하기 위해 (예를 들어, 결실 또는 치환에 의해) 변형되었다. 자기-비활성화는 벡터 DNA, 즉, 벡터 RNA를 생성하기 위해 사용한 DNA의 3' LTR의 U3 영역에서 결실의 도입을 통해 바람직하게 달성된다. 따라서, 역전사 동안, 이 결실은 프로바이러스 DNA의 5' LTR로 전달된다. 특정 실시형태에서, 이는 LTR의 전사 활성을 함께 크게 감소시키거나 또는 없애기 위해 충분한 U3 서열을 제거함으로써, 형질도입 세포에서 전장 벡터 RNA의 생성을 크게 감소시키거나 또는 없애는 것이 바람직할 수 있다. HIV 기반 렌티벡터의 경우에, 벡터 역가의 상당한 감소 없이 이러한 벡터가 LTR TATA 박스의 제거(예를 들어, -418 내지 -18의 결실)를 포함하는 상당한 U3 결실을 용인한다는 것을 발견하였다.
- [0480] 추가적인 안전성 향상은 바이러스 입자의 생산 동안 바이러스 게놈의 전사를 유도하기 위해 5' LTR의 U3 영역을 이중성 프로모터로 대체함으로써 제공된다. 사용될 수 있는 이중성 프로모터의 예는, 예를 들어, 바이러스 유인원 바이러스 40(SV40)(예를 들어, 초기 또는 후기), 거대세포바이러스(CMV)(예를 들어, 급초기), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV), 라우스 육종 바이러스(RSV) 및 단순 포진 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터를

포함한다.

- [0481] 본 명세서에서 사용되는 용어 "위형" 또는 "위형별(pseudotyping)"은 바이러스 외피 단백질이 바람직한 특징을 갖는 다른 바이러스의 외피 단백질로 치환된 바이러스를 지칭한다. 예를 들어, HIV 외피 단백질(env 유전자에 의해 암호화)이 정상적으로는 바이러스를 CD4⁺ 제시 세포로 표적화하기 때문에, HIV가 매우 다양한 세포를 감염 시키도록 허용하는 수포성 구내염 바이러스 G-단백질(VSV-G) 외피 단백질에 의해 HIV는 위형화될 수 있다.
- [0482] 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 공지된 방법에 따라 생산된다. 예를 들어, 문헌[Kutner *et al.*, *BMC Biotechnol.* 2009;9:10. doi: 10.1186/1472-6750-9-10; Kutner *et al. Nat. Protoc.* 2009;4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22] 참조.
- [0483] 본 명세서에 상정된 특정 구체적 실시형태에 따르면, 대부분의 또는 모든 바이러스 벡터 골격 서열은 렌티바이러스, 예를 들어, HIV-1로부터 유래된다. 그러나, 레트로바이러스 및/또는 렌티바이러스 서열의 다수의 상이한 공급원이 사용되거나 또는 조합될 수 있고, 특정 렌티바이러스 서열의 수많은 치환 및 변경은 본 명세서에 기재된 기능을 수행하는 전달 벡터의 능력을 손상시키는 일 없이 수용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 게다가, 다양한 렌티바이러스 벡터는 당업계에 공지되어 있으며(문헌[Naldini *et al.*, (1996a, 1996b 및 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, 미국 특허 제6,013,516호; 및 제5,994,136호 참조), 이들 중 다수는 본 명세서에 상정된 바이러스 벡터 또는 전달 플라스미드를 생산하기에 적합할 수 있다.
- [0484] 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 아데노바이러스를 이용하여 세포를 형질도입함으로써 면역 효과기 세포 내로 도입된다.
- [0485] 아데노바이러스 기반 벡터는 다수의 세포 유형에서 매우 높은 형질도입 효율 능력이 있으며, 세포 분할을 필요로 하지 않는다. 이러한 벡터에 의해, 고역가 및 고수준의 발현이 얻어졌다. 이 벡터는 상대적으로 단순한 시스템에서 다량으로 생산될 수 있다. 이식유전자가 Ad E1a, E1b 및/또는 E3 유전자를 대체하고; 후속적으로 복제 결함 벡터가 도중에 결실된 유전자 기능을 공급하는 인간 293 세포에서 증식되도록 대부분의 아데노바이러스 벡터는 조작된다. Ad 벡터는 비분할, 분화 세포, 예컨대 간, 신장 및 근육에서 발견되는 것을 포함하는 생체내 다중 유형의 조직을 형질도입할 수 있다. 통상적인 Ad 벡터는 큰 운반 능력을 가진다.
- [0486] 복제 결여인 현재의 아데노바이러스 벡터의 생성 및 증식은 293으로 표기되는 독특한 헬퍼 세포주를 이용할 수 있는데, 이는 Ad5 DNA 단편에 의해 인간 배아 신장 세포로부터 형질전환되고, E1 단백질을 구성적으로 발현시킨다(Graham *et al.*, 1977). E3 영역은 아데노바이러스 계놈으로부터 필요 없기 때문에(Jones & Shenk, 1978), 293 세포의 도움으로 본 아데노바이러스 벡터는 E1, D3 중 하나 또는 영역 둘 다에서 외래 DNA를 운반한다(Graham & Prevec, 1991). 아데노바이러스 벡터는 진행 유전자 발현(Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) 및 백신 개발에서 사용되었다(Grunhaus & Horwitz, 1992; Graham & Prevec, 1992). 상이한 조직에 재조합 아데노바이러스를 투여하는 연구는 기관 점적(Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), 근육 주사(Ragot *et al.*, 1993), 말초 정맥내 주사(Herz & Gerard, 1993) 및 뇌 내로의 정위 접종(Le Gal La Salle *et al.*, 1993)을 포함한다. 임상 시험에서 Ad 벡터사용의 예는 근육내 주사에 의한 항종양 면역화를 위한 폴리뉴클레오타이드 요법을 수반하였다(Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9 (1998)).
- [0487] 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단순 포진 바이러스, 예를 들어, HSV-1, HSV-2를 이용하여 세포를 형질도입함으로써 면역 효과기 세포 내로 도입된다.
- [0488] 성숙 HSV 비리온은 152kb인 선형 이중 가닥 DNA 분자로 이루어진 바이러스 계놈과 함께 외피 이십면체 캡시드로 이루어진다. 일 실시형태에서, HSV 기반 바이러스 벡터는 하나 이상의 필수 또는 비필수 HSV 유전자에서 결여된다. 일 실시형태에서, HSV 기반 바이러스 벡터는 복제 결여이다. 대부분의 복제 결여 HSV 벡터는 복제를 방지하기 위해 하나 이상의 급초기, 초기 또는 후기 HSV 유전자를 제거하는 결실을 함유한다. 예를 들어, HSV 벡터는 ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 급초기 유전자가 결여될 수 있다. HSV 벡터의 이점은 장기간 DNA 발현을 초래할 수 있는 잠복기로 유입되는 그의 능력 및 25kB까지의 외인성 DNA 삽입물을 수용할 수 있는 그의 거대 바이러스 DNA 계놈이다. HSV-기반 벡터는, 예를 들어, 미국 특허 제 5,837,532호, 제5,846,782호 및 제5,804,413호 및 국제 특허 출원 WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 및 WO 99/06583에 기재되어 있고, 이들 각각은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0489] **G. 유전자 변형된 세포**
- [0490] 다양한 실시형태에서, 세포는 암 치료에서 사용하기 위한 본 명세서에 상정된 TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드,

CTBR, 조작된 TCR, CAR, DARIC, 제타카인 및 융합 단백질을 발현시키기 위해 변형된다. 세포는 본 명세서에 상정된 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 비유전자적으로 변형될 수 있고, 또는 특히 바람직한 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 상정된 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 유전자 변형될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "유전자 조작된" 또는 "유전자 변형된"은 세포 내 총 유전자 물질 내로 DNA 또는 RNA 형태로 여분의 유전자 물질의 첨가를 지칭한다. 용어, "유전자 변형된 세포", "변형된 세포" 및 "전향된 세포"는 특정 실시형태에서 상호 호환적으로 사용된다.

- [0491] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터 폴리펩타이드는 TGFβ에 의해 매개되는 TME에서 면역 억제 신호에 대한 세포의 내성을 개선시키기 위해 면역 효과기 세포에서 도입되고 발현된다. 특정 실시형태에서, CTBR 신호 컨버터 폴리펩타이드는 세포에서 조작된 항원 수용체를 공동발현시키는 것에 의해 표적 세포로 전향된 면역 효과기 세포에서 도입되고 발현된다.
- [0492] "면역 효과기 세포"는 하나 이상의 효과기 기능(예를 들어, 세포독성 세포 사멸 활성, 사이토카인의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는 면역계의 임의의 세포이다. 본 명세서에 상정된 예시적인 면역 효과기 세포는 T 림프구, 특히 세포독성 T 세포(CTL; CD8⁺ T 세포), TIL 및 헬퍼 T 세포(HTL; CD4⁺ T 세포)이다. 일 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 자연 살해 T(NKT) 세포를 포함한다. 면역 효과기 세포는 자가/자율("자기") 또는 비-자가("비-자기", 예를 들어, 동종이계, 동계 또는 이종성)일 수 있다.
- [0493] 본 명세서에서 사용되는 "자가"는 동일한 대상체로부터의 세포를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 "동종이계"는 비교하는 세포와 유전적으로 상이한 동일한 종의 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "동계"는 비교하는 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "이종성"은 비교하는 세포와 상이한 종의 세포를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 세포는 자가이다.
- [0494] 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터 폴리펩타이드를 도입하는 데 적합한 예시적인 면역 효과기 세포는 T 림프구를 포함한다. 용어 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 당업계에 인식되고, 흉선세포, 미숙 T 림프구, 성숙 T 림프구, 휴지 T 림프구 또는 활성화된 T 림프구를 포함하는 것으로 의도된다. T 세포는 T 헬퍼(Th) 세포, 예를 들어 T 헬퍼 1(Th1) 또는 T 헬퍼 2(Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 헬퍼 T 세포(HTL; CD4⁺ T 세포) CD4⁺ T 세포, 세포독성 T 세포(CTL; CD8⁺ T 세포), CD4⁺CD8⁺ T 세포, CD4⁻CD8⁻ T 세포, 또는 T 세포의 임의의 다른 서브 세트일 수 있다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 T 세포의 다른 예시적 집단은 미경험 T 세포 및 기억 T 세포를 포함한다.
- [0495] 당업계에 이해되는 바와 같이, 다른 세포는 또한 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터 폴리펩타이드와 함께 면역 효과기 세포로서 사용될 수 있다. 특히, 면역 효과기 세포는 또한 NK 세포, NKT 세포, 호중구 및 대식세포를 포함한다. 면역 효과기 세포는 또한 효과기 세포의 전구체를 포함하되, 이러한 전구체 세포는 생체내 또는 시험관내 면역 효과기 세포로 분화되도록 유도될 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 대상체에서 투여 시 성숙 면역 효과기 세포로 분화되거나, 또는 시험관내에서 성숙 면역 효과기 세포로 분화되도록 유도될 수 있는 제대혈, 골수 또는 이동된 말초 혈액으로부터 유래된 세포의 CD34⁺ 집단 내에 함유된 조혈 줄기 세포(HSC)와 같은 면역 효과기 세포의 전구체를 포함한다.
- [0496] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 특정 키메라 수용체를 함유하도록 유전자 조작된 면역 효과기 세포는 "항원 특이적 전향된 면역 효과기 세포"로서 지칭될 수 있다.
- [0497] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CD34⁺ 세포"는 그의 세포 표면 상에서 CD34 단백질을 발현시키는 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "CD34"는 종종 세포-세포 접촉 인자로서 작용하고 림프절 내로의 T 세포 유입에 연루된 세포 표면 당단백질(예를 들어, 시알로뮤신 단백질)을 지칭한다. CD34⁺ 세포 집단은 환자에게 투여 시 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 호중구 및 단핵/대식세포 계통의 세포를 포함하는 모든 조혈 계통으로 분화되고 이에 기여하는 조혈 줄기 세포(HSC)를 함유한다.
- [0498] 명세서에 상정된 TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드를 발현시키는 면역 효과기 세포의 제조 방법이 특정 실시형태에서 제공된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 면역 효과기 세포가 본 명세서에 상정된 바와 같은 하나 이상의 TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드를 발현시키도록 개체로부터 단리된 면역 효과기 세포를 형질감염 또는 형질도입하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 면역 효과기 세포가 본 명세서에 상정된 하나 이상의 TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드 및 조작된 항원 수용체를 발현시키도록 개체로부터 단리된 면역 효과기 세포를

형질감염 또는 형질도입하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 개체로부터 단리되고 시험관내 추가 조작 없이 유전자 변형된다. 이어서, 이러한 세포는 개체에게 직접 재투여될 수 있다. 추가적 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 처음 활성화되고, 유전자 변형되기 전에 시험관내에서 증식되도록 자극된다. 이와 관련하여, 면역 효과기 세포는 유전자 변형되기 전에 그리고/또는 후에 배양될 수 있다.

- [0499] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 면역 효과기 세포의 시험관내 조작 또는 유전자 변형 전에, 세포의 공급원은 대상체로부터 얻어진다. 특정 실시형태에서, 변형된 면역 효과기 세포는 T 세포를 포함한다.
- [0500] T 세포는 말초혈액 단핵세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다수의 공급원으로부터 얻을 수 있다. 소정의 실시형태에서, T 세포는 당업자에게 공지된 다수의 기법, 예컨대, 침강, 예를 들어, FICOLL(상표명) 분리를 이용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 얻을 수 있다.
- [0501] 다른 실시형태에서, T 세포의 단리 또는 정제된 집단이 사용된다. 일부 실시형태에서, PBMC의 단리 후에, 세포 독성과 헬퍼 T 림프구는 둘 다 활성화, 확장 및/또는 유전자 변형 전에 또는 후에 미경험, 기억 및 효과기 T 세포 하위집단으로 분류될 수 있다.
- [0502] 일 실시형태에서, T 세포의 단리된 또는 정제된 집단은 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 하나 이상의 마커를 발현시킨다.
- [0503] 소정의 실시형태에서, T 세포는 개체로부터 단리되고, TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 변형되기 전에 시험관내에서 증식하도록 처음 활성화되고 자극된다.
- [0504] 충분한 치료적 용량의 T 세포 조성물을 달성하기 위해, T 세포는 종종 자극, 활성화 및/또는 확장의 하나 이상의 라운드가 실시된다. T 세포는 일반적으로, 예를 들어, 각각 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 제 6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 및 제6,867,041호에 기재된 방법을 이용하여 활성화되고 확장될 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 TGFβ 신호 컨버터 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드의 도입 전에 약 6시간, 약 12시간, 약 18시간 또는 약 24시간 동안 선택적으로 본 명세서에 상정된 조작된 항원 수용체와 조합하여 활성화되고, 확장된다.
- [0505] 일 실시형태에서, T 세포는 그들이 변형되는 것과 동시에 활성화된다.
- [0506] 다양한 실시형태에서, 면역 효과기 세포를 생성하는 방법은 T 세포를 포함하는 세포 집단을 활성화하는 단계 및 T 세포 집단을 확장시키는 단계를 포함한다. T 세포 활성화는 T 세포 TCR/CD3 복합체를 통한 1차 자극 신호를 제공함으로써 그리고 부속 분자, 예를 들어, CD28을 통해 2차 공자극 신호를 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [0507] TCR/CD3 복합체는 T 세포를 적합한 CD3 결합제, 예를 들어, CD3 리간드 또는 항-CD3 단클론성 항체와 접촉시킴으로써 자극될 수 있다. CD3 항체의 예시적인 예는 OKT3, G19-4, BC3 및 64.1을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0508] TCR/CD3 복합체를 통해 제공된 1차 자극 신호에 추가로, T 세포 반응의 유도는 제2, 공자극 신호를 필요로 한다. 특정 실시형태에서, CD28 결합제는 공자극 신호를 제공하기 위해 사용될 수 있다. CD28 결합제의 예시적인 예는 천연 CD28 리간드, 예를 들어, CD28에 대한 천연 리간드(예를 들어, 단백질의 B7 패밀리의 구성원, 예컨대 B7-1(CD80) 및 B7-2(CD86); 및 항-CD28 단클론성 항체 또는 CD28 분자와 가교할 수 있는 이의 단편, 예를 들어, 단클론성 항체 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 및 EX5.3D10을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0509] 일 실시형태에서, 1차 자극 신호를 제공하는 분자, 예를 들어 TCR/CD3 복합체를 통한 자극을 제공하는 분자 및 공자극 분자는 동일한 표면에 결합된다.
- [0510] 소정의 실시형태에서, 자극 및 공자극 신호를 제공하는 결합제는 세포 표면 상에서 국소화된다. 이는 세포 표면 상에서 그의 발현에 적합한 형태로 결합제를 암호화하는 핵산으로 세포를 형질감염 또는 형질도입함으로써 또는 대안적으로 세포 표면에 결합제를 결합시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0511] 다른 실시형태에서, 1차 자극 신호를 제공하는 분자, 예를 들어 TCR/CD3 복합체를 통해 자극을 제공하는 분자 및 공자극 분자는 항원 제시 세포 상에 나타난다.

- [0512] 일 실시형태에서, 1차 자극 신호를 제공하는 분자, 예를 들어 TCR/CD3 복합체를 통해 자극을 제공하는 분자 및 공자극 분자는 별개의 표면 상에 제공된다.
- [0513] 소정의 실시형태에서, 자극 및 공자극 신호를 제공하는 결합제 중 하나는 가용성(용액 중에 제공됨)이며, 다른 제제(들)는 하나 이상의 표면 상에 제공된다.
- [0514] 특정 실시형태에서, 자극과 공자극 신호를 제공하는 결합제는 둘 다 가용성 형태로 제공된다(용액 중에 제공된다).
- [0515] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 T 세포의 제조 방법은 항-CD3 및 항-CD28 항체로 T 세포를 활성화시키는 단계를 포함한다.
- [0516] 일 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 방법에 의해 활성화된 T 세포를 확장시키는 것은 몇 시간(약 3시간) 내지 약 7일 내지 약 28일 또는 그 사이의 임의의 시간 정수 값 동안 T 세포를 포함하는 세포 집단을 배양시키는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, T 세포 조성물은 14일 동안 배양될 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 약 21일 동안 배양된다. 다른 실시형태에서, T 세포 조성물은 약 2 내지 3일 동안 배양된다. T 세포의 배양 시간이 60일 이상일 수 있도록 몇 주기의 자극/활성화/확장이 또한 요망될 수 있다.
- [0517] 특정 실시형태에서, T 세포 배양에 적절한 조건은 적절한 배지(예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 X-vivo 15(론자(Lonza))) 및 혈청(예를 들어, 소 태아 또는 인간 혈청), 인터류킨-2(IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β 및 TNF- α 또는 당업자에게 알려진 세포 성장에 적합한 임의의 다른 첨가제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 증식 및 생존에 필수적인 하나 이상의 인자를 포함한다.
- [0518] 세포 배양 배지의 추가적인 예시적 예는 적절한 양의 혈청(또는 혈장) 또는 정해진 세트의 호르몬, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 사이토카인(들)의 양으로 보충된 또는 무혈청인, 아미노산, 피루브산나트륨, 및 비타민이 첨가된, RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 및 X-Vivo 20, 옵티마이저를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0519] 항생제, 예를 들어, 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험 배양물에만 포함되고, 대상체에게 주입될 세포의 배양 물에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 뒷받침하기 위해 필요한 조건, 예를 들어, 적절한 온도(예를 들어, 37°C) 및 분위기(예를 들어, 공기 + 5% CO₂) 하에 유지된다.
- [0520] 특정 실시형태에서, PBMC 또는 단리된 T 세포는 자극제 및 공자극제, 예컨대 항-CD3 및 항-CD28 항체와 접촉되고, 일반적으로 적절한 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15가 있는 배양 배지에서, 비드 또는 다른 표면에 부착된다.
- [0521] 다른 실시형태에서, 인공 APC(aAPC)는 다양한 공자극 분자 및 사이토카인의 안정한 발현 및 분비를 지시하기 위해 K562, U937, 721.221, T2, 및 C1R 세포를 조합함으로써 만들어진다. 특정 실시형태에서 K32 또는 U32 aAPC는 AAPC 세포 표면 상에서 하나 이상의 항체-기반 자극 분자의 디스플레이를 지시하기 위해 사용된다. T 세포의 집단은 CD137L(4-1BBL), CD134L(OX40L), 및/또는 CD80 또는 CD86을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 공자극 분자를 발현시키는 aAPC에 의해 확장될 수 있다. 최종적으로, aAPC는 유전자 변형된 T 세포를 확장시키기 위해 그리고 CD8 T 세포 상에서 CD28 발현을 유지하기 위해 효율적인 플랫폼을 제공한다. WO 03/057171 및 US2003/0147869에서 제공된 aAPC는 본 명세서에서 그들의 전문이 참고로 편입된다.
- [0522] 특정 실시형태에서, TGF β 신호 컨버터 및 조작된 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 T 세포 집단 내로 도입된다. 특정 실시형태에서, TGF β 신호 컨버터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 조작된 항원 수용체를 발현시키는 T 세포 집단 내로 도입된다. 폴리뉴클레오타이드는 미세주입, 형질감염, 리포펙션, 열충격, 전기천공법, 형질도입, 유전자총, 미세주입, DEAE-텍스트란-매개 전달 등에 의해 T 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0523] 바람직한 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 바이러스 형질도입에 의해 T 세포 내로 도입된다.
- [0524] 면역 효과기 세포 또는 CD34⁺ 세포 내로 폴리뉴클레오타이드를 도입하기에 적합한 바이러스 벡터 시스템의 예시적 예는 유전자 전달을 위해 아데노-연관 바이러스(AAV), 레트로바이러스, 단순포진 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스 벡터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0525] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 AAV 형질도입에 의해 T 세포 내로 도입된다.

- [0526] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 레트로바이러스 형질도입에 의해 T 세포 내로 도입된다.
- [0527] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 렌티바이러스 형질도입에 의해 T 세포 내로 도입된다.
- [0528] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 아데노바이러스 형질도입에 의해 T 세포 내로 도입된다.
- [0529] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 단순포진바이러스 형질도입에 의해 T 세포 내로 도입된다.
- [0530] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 백시니아 바이러스 형질도입에 의해 T 세포 내로 도입된다.

[0531] **H. 조성물 및 제형**

[0532] 본 명세서에 상정된 조성물은 하나 이상의 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 벡터, 유전자 변형된 면역 효과기 세포 등을 포함할 수 있다. 조성물은 약제학적 조성물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. "약제학적 조성물"은 단독으로 또는 한 가지 이상의 치료 양상과 조합하여 세포 또는 동물에게 투여를 위한 약제학적으로 허용 가능한 또는 생리적으로 허용 가능한 용액 중에서 제형화된 조성물을 지칭한다. 또한 원한다면, 조성물은 마찬가지로 다른 제제, 예컨대 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 소분자, 화학치료제, 프로드러그, 약물, 항체 또는 다른 다양한 약제학적 활성제와 조합하여 투여될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 또한 조성물 중에 포함될 수 있는 다른 성분에 대한 제한은 사실상 없으며, 단, 추가적인 제제는 의도된 요법을 전달하기 위한 조성물의 능력에 유해하게 영향을 미치지 않는다.

[0533] 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 타당한 의학적 판단의 범주 내에서, 합리적인 유해/유익비에 비례하여 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 본 명세서에서 해당 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투약 형태를 지칭하기 위해 사용된다.

[0534] 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 벡터, 또는 유전자 변형된 면역 효과기 세포와 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 약제학적 담체의 예시적 예는 멸균 액체, 예컨대 세포 배양 배지, 물 및 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 유래의 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 팜유, 참깨유 등일 수 있다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 또한 액체 담체로서, 특히 주사용 용액으로 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 적합한 약제학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탭크, 염화나트륨, 건조탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 임의의 통상적인 배지 또는 제제가 활성 성분에 적합하지 않은 경우를 제외하고, 치료 조성물에서의 그의 용도가 상정된다. 보충적 활성 성분이 또한 조성물 내로 혼입될 수 있다.

[0535] 일 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 대상체에 대한 투여에 적합하다. 특정 실시형태에서, 담체를 포함하는 조성물은 비경구 투여, 예를 들어, 혈관내(정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여에 적합하다. 특정 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 심실내, 척수내 또는 척추강내에 적합하다. 약제학적으로 허용 가능한 담체 멸균 수용액, 세포 배양 배지 또는 분산물을 포함한다. 약제학적으로 활성인 물질에 대한 이러한 배지 및 제제의 사용은 당업계에 잘 공지되어 있다. 임의의 통상적인 배지 또는 제제가 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 벡터, 또는 유전자 변형된 면역 효과기 세포에 적합하지 않은 경우를 제외하고, 약제학적 조성물 중의 이의 용도가 상정된다.

[0536] 특정 실시형태에서, 본 명세서에서 상정되는 조성물은 유전자 변형된 T 세포 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 본 명세서에 상정된 세포 기반 조성물을 포함하는 조성물은 장용 또는 비경구 투여 방법에 의해 별개로 또는 목적으로 하는 치료 목적을 달성하기 위한 다른 적합한 화합물과 조합하여 투여될 수 있다.

[0537] 약제학적으로 허용 가능한 담체는 치료 중인 인간 대상체에 대한 투여에 적합하도록 충분히 고순도 그리고 충분히 낮은 독성을 가져야 한다. 추가로 조성물의 안정성을 유지하거나 또는 증가시켜야 한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 액체 또는 고체일 수 있고, 조성물의 다른 성분과 조합될 때 목적으로 하는 별크, 점조도 등을 제공하기 위해, 유념해둔 계획한 투여 방식으로 선택된다. 예를 들어, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 결합제(예를 들어, 전호화된 메이즈 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 등), 충전제(예를 들어, 락토스 및 다른 당, 미정질 셀룰로스, 펙틴, 젤라틴, 황산칼슘, 에틸 셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 인산 수소칼슘 등), 윤활제(예를 들어, 스테아르산마그네슘, 탭크, 실리카, 콜로이드 이산화규소, 스테아르산, 금속 스테아레이트, 수소화된 식물성유, 옥수수 전분, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨 등), 붕해제(예를 들어, 전분, 글리콜산나트륨전분 등) 또는 습윤제(예를 들어, 라우릴황산나트륨 등)일 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에 상정된 조성물에 대한 다른 적합한 약제학적으로 허용 가능한 담체는 물, 염

용액, 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 아밀로스, 스테아르산마그네슘, 톨크, 규산, 점성 파라핀, 하이드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0538] 이러한 담체 용액은 또한 완충제, 희석제 및 다른 적합한 첨가제를 함유할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "완충제"는 화학적 구성이 pH의 상당한 변화없이 산 또는 염기를 중화시키는 용액 또는 액체를 지칭한다. 본 명세서에 상정된 완충제의 예는 들베코 인산염 완충 식염수(PBS), 링거 용액, 수 중 5% 텍스트로스(D5W), 정상/생리식염수(0.9% NaCl)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0539] 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물의 pH를 약 7로 유지하기에 충분한 양으로 존재할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 약 6.8 내지 약 7.4, 예를 들어, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3 및 7.4 범위의 pH를 가진다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 약 7.4의 pH를 가진다.
- [0540] 본 명세서에 상정된 조성물은 비독성의 약제학적으로 허용 가능한 배지를 포함할 수 있다. 조성물은 현탁액일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "현탁액"은 세포가 고체 지지체에 부착되지 않는 비부착 상태를 지칭한다. 예를 들어, 현탁액으로서 유지된 세포는 교반되거나 또는 휘저어질 수 있고, 지지체, 예컨대 배양 접시에 부착되지 않는다.
- [0541] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 조성물은 변형된 T 세포가 정맥내(IV) 등에서 허용 가능한 액체 배지 또는 용액, 예를 들어, 식염수 또는 무혈청 배지 내에서 분산되는 현탁액 중에서 제형화된다. 허용 가능한 희석제는 물, 링거용액, 등장성 염화나트륨(식염수) 용액, 무혈청 세포 배양 배지 및 저온 저장에 적합한 배지, 예를 들어, Cryostor(등록상표) 배지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0542] 특정 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 인간 또는 동물 유래의 천연 단백질이 실질적으로 없고, 변형된 T 세포 집단을 포함하는 조성물을 저장하는 데 적합하다. 치료 조성물은 인간 환자에게 투여되도록 의도되고, 따라서 세포 배양 성분, 예컨대 소 혈청 알부민, 말 혈청 및 소태아 혈청이 실질적으로 없다.
- [0543] 일부 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 세포 배양 배지에서 제형화된다. 이러한 조성물은 인간 대상체에 대한 투여에 적합하다. 특정 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 세포 배양 배지는 무혈청 배지이다.
- [0544] 무혈청 배지는 단순화된 그리고 더 잘 한정된 조성물, 감소된 정도의 오염물질, 감염체의 잠재적 공급원의 제거 및 보다 저비용을 포함하는, 혈청 함유 배지 이상의 몇몇 이점을 가진다. 다양한 실시형태에서, 무혈청 배지는 무동물이며, 선택적으로 무단백질일 수 있다. 선택적으로, 배지는 생약제학적으로 허용 가능한 재조합 단백질을 함유할 수 있다. "무 동물" 배지는 성분이 비동물 공급원으로부터 유래된 배지를 지칭한다. 재조합 단백질은 무동물 배지에서 천연 동물 단백질을 대체하며, 영양분은 합성, 식물 또는 미생물 공급원으로부터 얻어진다. "무 단백질" 배지는 대조적으로 단백질이 실질적으로 없는 것으로 정의된다.
- [0545] 특정 조성물에서 사용되는 무혈청 배지의 예시적 예는 QBSF-60(켈러티 바이오로지컬 인코포레이티드(Quality Biological, Inc.)), 스템프로-34(StemPro-34)(라이프 테크놀로지스(Life Technologies)) 및 X-VIVO 10을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0546] 바람직한 실시형태에서, 변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 PlasmaLyte에서 제형화된다.
- [0547] 다양한 실시형태에서, 변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 동결보존 배지에서 제형화된다. 예를 들어, 동결보존제가 있는 동결보존 배지는 해동 후 높은 세포 생존도 결과를 유지하기 위해 사용될 수 있다. 특정 조성물에서 사용되는 동결보존 배지의 예시적 예는 CryoStor CS10, CryoStor CS5 및 CryoStor CS2를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0548] 일 실시형태에서, 조성물은 50:50 PlasmaLyte A 대 CryoStor CS10을 포함하는 용액에서 제형화된다.
- [0549] 특정 실시형태에서, 조성물은 마이코플라스마, 내독소 및 미생물 오염물질이 실질적으로 없다. 내독소와 관련하여 "실질적으로 없는"은 생물제제에 대해 FDA에 의해 허용되는 것(5 EU/kg 체중/일의 총 내독소, 평균 70kg의 사람은 세포의 총 용량 당 350 EU임)보다 세포의 용량 당 내독소가 더 적다는 것을 의미한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 형질도입된 조혈 줄기 또는 조상 세포를 포함하는 조성물은 약 0.5 EU/ml, 내지 약 5.0EU/ml, 또는 약 0.5EU/ml, 1.0EU/ml, 1.5EU/ml, 2.0EU/ml, 2.5EU/ml, 3.0EU/ml, 3.5EU/ml, 4.0EU/ml, 4.5 EU/ml, 또는 5.0 EU/ml, 를 함유한다.
- [0550] 특정 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 용액은, 예를 들어, 장용 및 비경구, 예를 들어, 혈관내,

정맥내, 동맥내, 골내, 심실내, 대뇌내, 두개내, 척수내, 척추강내 및 골수내 투여 및 제형을 포함하는 다양한 치료 요법에서 본 명세서에 기재된 특정 조성물을 이용하기 위한 적합한 투약 및 치료 요법의 개발과 같이, 당업자에게 잘 공지되어 있다. 본 명세서에 상정된 특정 실시형태는 다른 제형, 예컨대 약제학적 분야에 잘 공지되어 있고, 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, volume I and volume II. 22nd Edition. Edited by Loyd V. Allen Jr. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press; 2012]에 기재되어 있는 것을 포함할 수 있다는 것은 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0551] 특정 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터를 발현시키는 CAR T 세포를 포함하는 면역 효과기 세포의 양을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "양"은 임상 결과를 포함하는 유리한 또는 목적으로 하는 예방적 또는 치료적 결과를 달성하기 위해, 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터 등을 포함하는 세포의 "유효한 양" 또는 "유효량"을 지칭한다.

[0552] "예방적 유효량"은 목적으로 하는 예방적 결과를 달성하는 데 효과적인 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터 등을 포함하는 세포의 양을 지칭한다. 전형적으로, 반드시 아니지만, 예방적 용량은 질환의 초기 전에 또는 초기에 대상체에서 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적다.

[0553] "치료적 유효량"은 대상체(예를 들어, 환자)를 "치료하는데" 효과적인 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터를 포함하는 세포의 양을 지칭한다. 치료적 양이 표시될 때, 투여될 조성물의 정확한 양은 환자(대상체)의 연령, 체중, 중앙 크기, 감염 또는 전이 정도, 및 병태의 개체 차이를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 본 명세서에 기재된 면역 효과기 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 10^2 내지 10^{10} 개의 세포/kg 체중, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 개의 세포/kg 체중(해당 범위 내의 모든 정수값을 포함)의 투약량으로 투여될 수 있다는 것이 일반적으로 언급될 수 있다. 세포수는 그에 포함된 세포 유형에서 조성물에 의도된 궁극의 용도에 의도될 것이다. 본 명세서에 제공된 용도에 대해, 세포는 일반적으로 1리터 이하의 용적이고, 500ml 이하, 심지어 250ml 또는 100ml 이하일 수 있다. 따라서, 목적으로 하는 세포의 밀도는 전형적으로 10^6 개 초과인 세포/ml이고, 일반적으로 10^7 개 초과인 세포/ml, 일반적으로 10^8 개 이상의 세포/ml이다. 임상적으로 적절한 수의 면역 세포가 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} 또는 10^{12} 개의 세포와 누적적으로 동일하거나 또는 초과하는 다중 주입으로 배분될 수 있다. 일부 실시형태에서, 특히 모든 주입 세포가 특정 표적 항원으로 전향되기 때문에, 10^6 개/킬로그램의 범위(10^6 내지 10^{11} 개/환자)에서 더 적은 수의 세포가 투여될 수 있다. 원한다면, 치료는 또한 면역 반응의 유도를 향상시키기 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 미토겐(예를 들어, PHA) 또는 림포카인, 사이토카인 및/또는 케모카인(예를 들어, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-알파, IL-18 및 TNF-베타, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α 등)의 투여를 포함할 수 있다.

[0554] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포를 포함하는 조성물은 면역 손상된 개체에서 생기는 질환의 치료 및 예방에서 이용될 수 있다. 특히, 본 명세서에 상정된 조성물은 암 치료에서 사용된다. 특정 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 단독으로 또는 담체, 희석제, 부형제와 그리고/또는 다른 성분, 예컨대 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단과 조합하여 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다.

[0555] 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 조합된 유전자 변형 T 세포의 양을 포함한다.

[0556] 특정 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터를 단독으로 또는 하나 이상의 치료제, 예컨대 방사선 요법, 화학요법, 이식, 면역요법, 호르몬 요법, 광역학 요법 등과 조합하여 포함하는 유효량의 면역 효과기 세포를 포함한다. 조성물은 또한 항생제와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 치료제는 본 명세서에 기재된 특정 질환 상태, 예컨대 특정 암을 위한 표준 치료로서 당업계에서 허용될 수 있다. 상정된 예시적 치료제는 사이토카인, 성장 인자, 스테로이드, NSAID, DMARD, 항-염증제, 화학치료제, 방사선치료제, 치료적 항체 또는 다른 활성 및 보조제를 포함한다.

[0557] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터를 포함하는 면역 효과기 세포를 포함하는 조성물은 다수의 화학치료제와 함께 투여될 수 있다. 화학치료제의 예시적 예는 알킬화제, 예컨대 티오테과 및 사이클로포스파마이드(사이톡산(CYTOXAN)(상표명)); 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 유레도파; 에틸렌이민 및 알트레타민을 포함하는 메틸아멜라민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포르아마이드, 트라이에틸렌티오포스포르아마이드 및 트라

이메틸폴로멜라민 레주메; 질소 머스터드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파마이드, 에스트라무스틴, 이포스파마이드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노뎀비신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파마이드, 유라실 머스터드; 나이트로수레아, 예컨대 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-다이아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 무엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 유베니벡스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사제, 예컨대 메토티렉세이트 및 5-플루오로유라실(5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 테노프테린, 메토티렉세이트, 프테로프테린, 트라이메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자유리딘, 카모푸르, 사이타라빈, 다이데옥시유리딘, 독시플루리딘, 예노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-부신제, 예컨대 아미노글루테티마이드, 미토탄, 트라이오스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파마이드 글리코사이드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트라세이트; 데포파민; 데메콜신; 다이아지쿠온; 엘포미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시유레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 나이트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라자이드; 프로카바진; PSK(등록상표); 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아진산; 트리아아지쿠온; 2,2',2"-트라이클로로트라이에틸아민; 유레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파마이드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀(탁솔(TAXOL)(등록상표), 뉴저지주 프린스턴에 소재한 브리스톨-마이어드스 스킵 옹콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology)) 및 도세탁셀(탁소텔(TAXOTERE)(등록상표), 프랑스 앙토니에 소재한 론-플랑크 로어(Rhone-Poulenc Rorer)); 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파마이드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포아이스머라제 저해제 RFS 2000; 다이플루오로메틸로미틴(DMFO); 레티노산 유도체, 예컨대 타르그레틴(Targretin)(상표명)(백사로텐), 판레틴(Panretin)(상표명)(알리트리레티노인); ONTAK(상표명)(테니류킨 디프티톡스); 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 중 어떤 것의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한, 예를 들어 타목시펜, 랄록시펜, 방향화효소 저해 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트라이옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(파레스톤(Fareston)); 및 항-안드로겐, 예컨대 플루타마이드, 닐루타마이드, 바이칼루타마이드, 류프롤라이드 및 고세렐린; 및 상기 중 어떤 것의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함하는, 암에 대해 호르몬 작용을 조절하거나 또는 저해하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예컨대 항-에스트로겐이 본 정의에 포함된다.

[0558] 다양한 다른 치료제가 본 명세서에 기재된 조성물과 함께 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터를 포함하는 면역 효과기 세포를 포함하는 조성물은 항-염증제와 함께 투여된다. 항-염증제 또는 약물은 스테로이드 및 글루코코르티코이드(베타메타손, 부데소나이드, 텍사메타손, 하이드로코티손 아세테이트, 하이드로코티손, 하이드로코티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트리아미시놀론을 포함), 아스피린, 이부프로펜, 나프록센을 포함하는 비스테로이드 항-염증 약물(NSAIDS), 메토티렉세이트, 설파살라진, 레플루로마이드, 항-TNF 의약, 사이클로포스파마이드 및 마이코페놀레이트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0559] 다른 예시적 NSAID는 이부프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, Cox-2 저해제, 예컨대 VIOXX(등록상표)(레페록십) 및 셀레브렉스(CELEBREX)(등록상표)(셀레록십) 및 시알릴레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예시적인 진통제는 아세트아마노펜, 옥시코돈, 프로폭시펜 하이드로클로라이드의 트라마돌로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예시적인 글루코코르티코이드는 코티손, 텍사메타손, 하이드로코티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론 또는 프레드니손으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예시적인 생물학적 반응 변형제는 세포 표면 마커(예를 들어, CD4, CD5 등), 사이토카인 저해제, 예컨대 TNF 길항제(예를 들어, 에타너셉트(엔브렐(ENBREL)(등록상표)), 아달리무맙(휴미라(HUMIRA)(등록상표)) 및 이플릭시맙(레미케이드(REMICADE)(등록상표)), 케모카인 저해제 및 접착 분자 저해제에 관련된 분자를 포함한다. 생물학적 반응 변형제는 단클론성 항체 뿐만 아니라 분자의 재조합 형태를 포함한다. 예시적인 DMARD는 아자티오프린, 사이클로포스파마이드, 사이클로스포린, 메토티렉세이트, 페니실라민, 레플루노마이드, 설파살라진, 하이드록시클로로퀸, 골드(Gold)(경구(아우

라노핀) 및 근육내) 및 미노사이클린을 포함한다.

[0560] 본 명세서에 상정된 CTBR 신호 컨버터를 포함하는 변형된 T 세포와 조합하기에 적합한 치료 항체의 예시적 예는 바비투시맙, 베바시주맙(아바스틴), 비바투주맙, 블리나투모맙, 코나투무맙, 다라투무맙, 돌리고투맙, 다세투주맙, 달로투주맙, 엘로투주맙(HuLuc63), 겐투주맙, 이브리투모맙, 인다투시맙, 이노투주맙, 로르보투주맙, 루카투무맙, 밀라투주맙, 목세투모맙, 오카라투주맙, 오파투무맙, 리투시맙, 실투시맙, 테프로투무맙 및 유블리투시맙을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0561] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 사이토카인과 함께 투여된다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "사이토카인"은 세포내 매개체로서 다른 세포상에서 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반 용어를 의미한다. 이러한 사이토카인의 예는 림포카인, 모노카인 및 전통적 폴리펩타이드 호르몬이다. 사이토카인 중에서 성장 호르몬, 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 틸렉신; 프로틸렉신; 당단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체형성 호르몬(LH); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 필터-저해 물질; 마우스 성선자극호르몬-연관 펩타이드; 인히빈; 액티빈; 혈관내피성장인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자, 예컨대 NGF-베타; 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자(TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, 베타 및 -감마; 콜로니 자극 인자(CSF), 예컨대 대식세포-CSF(M-CSF); 과립구-대식세포-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터류킨(IL), 예컨대 IL-1, IL-1알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, 종양 괴사 인자, 예컨대 TNF-알파 또는 TNF-베타; 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함하는 다른 폴리펩타이드 인자가 포함된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 사이토카인은 천연 공급원으로부터의 또는 재조합 세포 배양물 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적으로 활성인 동등물로부터의 단백질을 포함한다.

[0562] **I. 치료 방법**

[0563] 본 명세서에 상정된 CTBR을 포함하는 CAR T 세포를 포함하는, 면역 효과기 세포는 암의 예방, 치료 및 개선에서 사용하기 위한 또는 암과 관련된 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나 또는 개선시키기 위한 양자 면역요법의 개선된 방법을 제공한다.

[0564] 본 명세서에 상정된 조작된 수용체 및 CTBR을 포함하는 면역 효과기 세포는 암, GVHD, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 면역결핍의 적어도 하나의 증상의 예방, 치료 또는 개선에서 사용하기 위한 개선된 약물 제품을 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "약물 제품"은 본 명세서에 상정된 조성물 및 방법을 이용하여 생성된 변형된 세포를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 약물 제품은 CTBR 신호 컨버터를 발현시키도록 추가로 변형된 조작된 수용체 또는 CAR T 세포를 포함하는 유전자 변형된 면역 효과기 세포, T 세포를 포함한다. 게다가, 특정 실시형태에서 상정된 변형된 T 세포는 T 세포 고갈에 대한 내성이 있고 지속 요법을 야기할 수 있는 종양 미세환경에서 증가된 내구성 및 지속성을 나타내기 때문에 더 안전하고 더 효능있는 양자 세포 요법을 제공한다.

[0565] 특정 실시형태에서, 조작된 수용체 및 CTBR 신호 컨버터를 포함하는 유효량의 변형된 면역 효과기 세포 또는 T 세포는 암, GVHD, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 면역결핍의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나 또는 개선시키기 위해 대상체에게 투여된다.

[0566] 특정 실시형태에서, 암의 적어도 하나의 증상을 예방하거나, 치료하거나 또는 개선시키는 방법은 CTBR 신호 컨버터 및 조작된 TCR, CAR 또는 Daric, 또는 종양 또는 암에 대해 세포를 전향시키는 다른 치료적 이식유전자를 포함하는 유효량의 변형된 면역 효과기 세포 또는 T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 세포는 면역억제 TGFβ 신호를 면역자극 신호로 전환시킴으로써 종양 미세환경으로부터 면역억제 신호에 대해 더 내성이 되게 때문에 유전자 변형된 세포는 더 내구성있고 지속적인 약물이다.

[0567] 특정 실시형태에서, 변형된 본 명세서에 상정된 면역 효과기 세포는 고형 종양 또는 암의 치료에서 사용된다.

[0568] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 변형된 면역 효과기 세포는 부신암, 부신피질암종, 항문암, 맹장암, 별아교세포종, 비정형 유기형/간상 종양, 기저세포 암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌/CNS 암, 유방암, 기관지종양, 심장 종양, 자궁경부암, 담관암종, 연골육종, 척색종, 결장암, 결장직장암, 두개인두종, 관상피내암(DCIS) 자궁내막암, 상의세포종, 식도암, 감각신경모세포종, 유잉 육종, 두개의 생식세포종양, 성선의생식세포종양, 안암, 나팔관암, 섬유성 조직육종, 섬유육종, 담낭암, 위암, 위장유암종, 위장관기질 종양(GIST), 생식

세포 종양, 신경교종, 교모세포종, 두경부암, 혈관모세포종, 간세포 암, 식도암, 안구내 흑색종, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 평활근육종, 구순암, 지방육종, 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 폐유암종, 악성 중피종, 수질암종, 수모세포종, 뇌수막종, 흑색종, 머켈 세포 암종, 정중선관 암종, 구강암, 점액육종, 골수이형성 증후군, 골수증식성 신생물, 비강 및 부비동암, 비인두암, 신경아세포종, 핍지교종, 구강암, 구강암, 인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 췌장섬 세포 종양, 유두 암종, 부신결정종, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체종, 하수체종양, 흉막폐아세포종, 원발성 복막암, 전립선암, 직장암, 망막모세포종, 신세포 암종, 신우 및 요관암, 횡문근육종, 침샘암, 피지선암종, 피부암, 연조직 육종, 편평세포암종, 소세포폐암, 소장암, 위암, 담낭 암종, 혈막종, 고환암, 인후암, 흉선암, 갑상선암, 요도암, 자궁암, 자궁 육종, 질암, 혈관암, 외음부암 및 율름 종양을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 고행암 또는 암의 치료에서 사용된다.

- [0569] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 변형된 면역 효과기 세포는 간암, 췌장암, 폐암, 유방암, 방광암, 뇌암, 골암, 갑상선암, 신장암 또는 피부암을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 고행 종양 또는 암의 치료에서 사용된다.
- [0570] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 변형된 면역 효과기 세포는 췌장, 방광 및 폐를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 암의 치료에서 사용된다.
- [0571] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 변형된 면역 효과기 세포는 액상암 또는 혈액학적 암의 치료에서 사용된다.
- [0572] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 변형된 면역 효과기 세포는 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, B-세포 악성종양의 치료에서 사용된다.
- [0573] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 변형된 면역 효과기 세포는 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종: 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 골수아구성, 전골수구, 골수단핵구, 단핵구, 적백혈병, 모발세포 백혈병(HCL), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수단핵구 백혈병(CMML) 및 진성 다혈구증, 호지킨 림프종, 결절성 림프구-우세형 호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소형림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대B-세포 림프종, 여포성 림프종, 면역아세포 거대 세포 림프종, 전구체 B-림프아구성 림프종, 맨틀 세포 림프종, 변연대 림프종, 균상식육종, 역형성 대세포 림프종, 세자리 증후군, 전구체 T-림프아구성 림프종, 다발성 골수종, 현성 다발성 골수종, 비정형 다발성 골수종, 형질세포 백혈병, 비분비 골수종, IgD 골수종, 골경화증 골수종, 단독골형질세포종 및 골수의 형질세포종을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 액체암의 치료에서 사용된다.
- [0574] 본 명세서에 상정된 방법에서 사용하기 위한 바람직한 세포는 자가/자율("자기") 세포, 바람직하게는 조혈세포, 더 바람직하게는 T 세포, 및 더 바람직하게는 면역 효과기 세포를 포함한다.
- [0575] 특정 실시형태에서, 치료가 필요한 환자에게 치료적 유효량의 본 명세서에 상정된 변형된 면역 효과기 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 단독으로 또는 1종 이상의 치료제와 조합하여 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 세포는 암, GVHD, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 또는 면역결핍이 발생할 위험에 있는 환자의 치료에서 사용된다. 따라서, 특정 실시형태는 질환의 적어도 하나의 증상의 치료 또는 예방 또는 개선이 필요한 대상체에게 치료적 유효량의 본 명세서에 상정된 계승 편집된 세포를 투여하는 것을 포함하는 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 면역결핍 중 적어도 하나의 증상의 치료 또는 예방 또는 개선을 포함한다.
- [0576] 일 실시형태에서, 질환의 치료가 필요한 대상체에게 암, GVHD, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 면역결핍을 치료하는 방법은 유효량, 예를 들어, 치료적 유효량의 본 명세서에 상정된 변형된 면역 효과기 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 적절한 투약량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있다면, 투여량 및 빈도는 환자의 병태, 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.
- [0577] 일 예시적 실시형태에서, 대상체에게 제공되는 유효량의 변형된 면역 효과기 세포는 적어도 2×10^6 개의 세포/kg, 적어도 3×10^6 개의 세포/kg, 적어도 4×10^6 개의 세포/kg, 적어도 5×10^6 개의 세포/kg, 적어도 6×10^6 개의 세포/kg, 적어도 7×10^6 개의 세포/kg, 적어도 8×10^6 개의 세포/kg, 적어도 9×10^6 개의 세포/kg 또는 적어도 10×10^6 개의 세포/kg, 그 이상의 세포/kg(세포의 모든 개체 용량을 포함)이다.
- [0578] 다른 예시적 실시형태에서, 대상체에게 제공되는 유효량의 변형된 면역 효과기 세포는 약 2×10^6 개의 세포/kg,

약 3×10^6 개의 세포/kg, 약 4×10^6 개의 세포/kg, 약 5×10^6 개의 세포/kg, 약 6×10^6 개의 세포/kg, 약 7×10^6 개의 세포/kg, 약 8×10^6 개의 세포/kg, 약 9×10^6 개의 세포/kg 또는 약 10×10^6 개의 세포/kg, 또는 그 이상의 세포/kg(세포의 모든 개체 용량을 포함)이다.

[0579] 다른 예시적 실시형태에서, 대상체에게 제공되는 유효량의 변형된 면역 효과기 세포는 약 2×10^6 개의 세포/kg 내지 약 10×10^6 개의 세포/kg, 약 3×10^6 개의 세포/kg 내지 약 10×10^6 개의 세포/kg, 약 4×10^6 개의 세포/kg 내지 약 10×10^6 개의 세포/kg, 약 5×10^6 개의 세포/kg 내지 약 10×10^6 개의 세포/kg, 2×10^6 개의 세포/kg 내지 약 6×10^6 개의 세포/kg, 2×10^6 개의 세포/kg 내지 약 7×10^6 개의 세포/kg, 2×10^6 개의 세포/kg 내지 약 8×10^6 개의 세포/kg, 3×10^6 개의 세포/kg 내지 약 6×10^6 개의 세포/kg, 3×10^6 개의 세포/kg 내지 약 7×10^6 개의 세포/kg, 3×10^6 개의 세포/kg 내지 약 8×10^6 개의 세포/kg, 4×10^6 개의 세포/kg 내지 약 6×10^6 개의 세포/kg, 4×10^6 개의 세포/kg 내지 약 7×10^6 개의 세포/kg, 4×10^6 개의 세포/kg 내지 약 8×10^6 개의 세포/kg, 5×10^6 개의 세포/kg 내지 약 6×10^6 개의 세포/kg, 5×10^6 개의 세포/kg 내지 약 7×10^6 개의 세포/kg, 5×10^6 개의 세포/kg 내지 약 8×10^6 개의 세포/kg, 또는 6×10^6 개의 세포/kg 내지 약 8×10^6 개의 세포/kg(세포의 모든 개체 용량을 포함)이다.

[0580] 당업자는 특정 실시형태에서 상정된 조성물의 다중 투여가 목적으로 하는 요법을 달성하는 데 필요할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 조성물은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 5년, 10년 이상의 기간에 걸쳐 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 이상 투여될 수 있다.

[0581] 특정 실시형태에서, 대상체에게 활성화된 T 세포를 투여하는 것이 바람직할 수 있으며, 이어서, 후속적으로 혈액을 재채혈하고(또는 성분채집술이 수행됨), 이로부터 T 세포를 활성화시키며, 이들 활성화되고 확장된 T 세포를 환자에 재주입한다. 이 과정은 몇 주마다 다회 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 10cc 내지 400cc의 채혈로부터 활성화될 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 100cc, 150cc, 200cc, 250cc, 300cc, 350cc 또는 400cc 이상의 채혈로부터 활성화된다. 이론에 의해 구속되지 않고, 이런 다회 채혈/다중 재주입 프로토콜을 이용하는 것은 T 세포의 특정 집단을 선택하는 작용을 할 수 있다.

[0582] 일 실시형태에서, 암으로 진단된 대상체를 치료하는 방법은 대상체로부터 면역 효과기 세포를 제거하는 단계, 조작된 항원 수용체 및 TGFβ 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 벡터를 도입함으로써 면역 효과기 세포를 변형시키는 단계 및 변형된 면역 효과기 세포 집단을 생성하는 단계, 및 동일한 대상체에게 변형된 면역 효과기 세포의 집단을 투여하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 면역 효과기 세포는 T 세포를 포함한다.

[0583] 특정 실시형태에서 상정된 세포 조성물을 투여하는 방법은 생체의 변형된 면역 효과기 세포의 재도입에서 또는 대상체에 도입 시 성숙 면역 효과기 세포로 분화하는 면역 효과기 세포의 변형된 전구체의 재도입에 대한 결과에 효과적인 임의의 방법을 포함한다. 한 가지 방법은 조작된 항원 수용체 및 TGFβ 신호 컨버터를 암호화하는 하나 이상의 벡터를 도입함으로써 그리고 대상체 내로 형질도입 세포를 복귀시킴으로써 생체외에서 말초 혈액 T 세포를 변형시키는 단계를 포함한다.

[0584] 본 명세서의 모든 간행물, 특허 출원 및 공개된 특허는 각각의 개개 간행물, 특허 출원 또는 공개된 특허가 구체적이고 개별적으로 참고로 편입되도록 나타나는 것과 같이 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0585] 앞서 언급한 실시형태는 이해의 분명함을 목적을 위해 예시 및 실시예로 일부 상세하게 기재하였지만, 특정 변화 및 변형이 첨부된 청구범위의 정신 또는 범주로부터 벗어나는 일 없이 이루어질 수 있다는 것은 본 명세서에 상정된 교시에 비추어 당업자에게 용이하게 분명할 것이다. 다음의 실시예는 단지 예로서 제한의 방법에 의하지 않고 제공한다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 수득하기 위해 변화 또는 변형될 수 있는 다양한 중요하지 않은 매개변수를 용이하게 인식할 것이다.

[0586] 실시예

[0587] 실시예 1

[0588] TGFβ IL-12R 신호 컨버터(CTBR12) 및 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 T 세포

- [0589] 예시적인 TGFβ IL-12R 기반 신호 컨버터 작제물을 도 1에 나타낸 바와 같이 설계하였다.
- [0590] 최적의 IL-12 수용체 신호전달은 IL-12 결합 후 IL-12Rβ1 및 IL-12Rβ2 소단위의 세포내 도메인의 이량체화에 의해 개시된다. TGFβ에 대한 노출 후에 IL-12 수용체 신호전달을 유도하도록 TGFβ 신호를 전환하기 위해, TGFβ 수용체 1(TGFβR1) 및 TGFβ 수용체 2(TGFβR2)의 세포내 도메인을 각각 IL-12Rβ1 및 IL-12Rβ2 신호전달 도메인으로 대체하였다. IL-12Rβ1 및 IL-12Rβ2 막관통 및 신호전달 도메인을 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝시키고 나서, 2A 자기-절단성 폴리펩타이드 서열(CAR.CTBR12)에 의해 분리되었다.
- [0591] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGFβ 수용체(항-ROR1.DNR); (iii) 항-ROR1 CAR 및 TGFβR2 소단위; 또는 (iv) 항-ROR1 CAR 및 CTBR12(항-ROR1.CTBR12)를 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 항-ROR1 CAR 및 TGFβR2의 세포 표면 발현을 유세포분석에 의해 결정하였다. R-피코에리트린(R-PE)에 접합된 재조합 인간 ROR1 단백질을 사용하여 항-ROR1 CAR 발현 T 세포를 특이적으로 염색하였다. TGFβR2에 대해 상업적으로 입수 가능한 항체를 사용하여 CTBR12를 검출하였다. 대표적인 발현 데이터를 도 2에 나타낸다.
- [0592] 항-ROR1 CAR 및 CTBR12를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포의 50%를 항-ROR1 CAR 및 CTBR12와 공동발현시켰다(도 2의 가장 우측 패널). 대조적으로, 항-ROR1 CAR도 CTBR12도 비형질도입 T 세포에서 검출되지 않았는데, 이는 TGFβR2에 대한 항체가 내인성 TGFβR2를 검출하지 않았다는 것을 나타낸다.

[0593] 실시예 2

- [0594] CTBR12에 의해 저해된 면역억제성 TGFβ 신호전달
- [0595] TGFβR1의 2개 단위 및 TGFβR2의 2개 단위를 함유하는 사량체 복합체에 대한 TGFβ1 결합은 세포핵에 대한 면역억제 신호를 증식하기 위해 SMAD2 및 SMAD3 인산화를 유도한다. 절단된 TGFβR2(우성 음성 TGFβ 수용체 - DNR)의 과발현은 TGFβ 처리에 반응하여 SMAD2/3 인산화의 상실에 의해 나타내는 바와 같이 TGFβ에 대해 민감하지 않은 T 세포를 제공한다. 따라서, TGFβ 신호전달 경로 활성화의 정보를 얻기 위해 포스포-SMAD2/3 발현을 사용하였다.
- [0596] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGFβ 수용체(항-ROR1.DNR); (iii) 항-ROR1 CAR 및 TGFβR2 소단위; 또는 (iv) 항-ROR1 CAR 및 CTBR12(항-ROR1.CTBR12)를 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 배양물을 20분 동안 10ng/ml의 재조합 인간 TGFβ1로 처리하였다. SMAD2/3 인산화를 인산화된 SMAD2/3에 특이적인 항체로 평가하였다. CTBR12 또는 DNR 중 하나를 발현시키는 T 세포를 SMAD2/3의 인산화로부터 완전히 보호하였다(도 3). 이들 데이터는 CTBR12의 발현이 TGFβ 면역억제 신호전달에 비민감성인 항-ROR1 CAR T 세포를 제공하였다는 것을 입증하였다.

[0597] 실시예 3

- [0598] CTBR12는 TGFβ1에 대한 노출 시 IL-12R 신호를 변환시킨다
- [0599] IL-12에 대한 세포 반응은 STAT4 및 STAT5의 수용체 이량체화 및 인산화에 의해 개시된다. 따라서, 포스포-STAT4 및 포스포-STAT5 발현을 사용하여 IL-12 수용체 신호전달 경로 활성화를 평가하였다.
- [0600] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGFβ 수용체(항-ROR1.DNR); (iii) 항-ROR1 CAR 및 TGFβR2 소단위; 또는 (iv) 항-ROR1 CAR 및 CTBR12(항-ROR1.CTBR12)를 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 배양물을 20분 동안 50ng/ml의 재조합 인간 IL-12로 또는 10ng/ml의 재조합 인간 TGFβ1로 처리하였다.
- [0601] 항-ROR1 CAR 세포를 발현시키는 T 세포는 증가된 수준의 인산화된 STAT4를 나타내었다(도 4, 상부 행, 가장 우측의 4개 패널을 비형질도입 대조군(UTD)과 비교함). CTBR12를 발현시키는 CAR T 세포만이 재조합 인간 TGFβ1로 처리하였을 때 검출 가능한 수준의 포스포-STAT4를 나타내었다(도 4, 하부 행, 가장 우측 패널을 다른 패널과 비교함). 대조적으로, 신호 컨버터의 TGFβR2 부분만을 발현시키는 CAR T 세포는 TGFβ 처리에 반응하여 STAT4를 인산화시키지 않았다(도 4, 하부 행, 우측으로부터 4번째 패널).
- [0602] CTBR12를 발현시키는 CAR T 세포는 또한 IL-12 또는 TGFβ1 중 하나로 처리하였을 때, 검출 가능한 수준의 포스

포-STAT5를 나타내었는데, 이는 전환된 TGFβ 신호가 내인성 IL-12 수용체 신호전달을 유도한다는 것을 확인한다(도 5).

[0603] 항-ROR1.CTBR12를 발현시키는 CAR T 세포의 유전자 전달을 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에서 항원-유도 연속 확장 분석에서 측정하였다. 간략하게, 인간 ROR1 항원을 발현시키는 GFP-표지된 K562 표적 세포를 사용하여 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 CAR T 세포를 연속적으로 확장시켰다. 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 7일마다 1회로 1:1의 비로 표적 세포로 CAR T 세포를 자극하였다. T 세포를 채취하고 나서, 유전자 발현 분석에 대한 mRNA를 초기 자극 후 제21일에 단리시켰다. 나노스트링(Nanostring) 면역 프로파일링 패널을 이용하여 유전자 발현 분석을 수행하였다. TGFβ1 처리에 의해 유도된 상당한 유전자 발현 변화를 공지된 IL-12R-조절 전사체 IFNG, SELL, IL18RAP, IL18R1 및 IL21R의 상호 조절(도 6, 우측 패널)을 비롯하여, 항-ROR1.CTBR12 발현 세포에서 동정하였다(도 6, 좌측 패널).

[0604] 실시예 4

[0605] CTBR12를 발현시키는 CAR T 세포는 항원 및 TGFβ1에 대한 노출 시 증가된 IFNγ를 분비한다

[0606] 인간 T 세포에서 IL-12 수용체 신호전달은 TH1 분화를 유도하고 효과기 기능을 증가시켰다. IL-12 수용체 신호전달은 항원 자극에 대한 반응에서 IFNγ의 방출을 증가시키기 위해 TCR 신호와 협응할 수 있다.

[0607] T 세포가 재조합 인간 TGFβ1의 존재 하에 TCR 또는 CAR을 통해 자극되었을 때, R2/R1 신호 컨버터는 IFNγ 생성을 증폭시켰다. 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGFβ 수용체(항-ROR1.DNR); 또는 (iii) 항-ROR1 CAR 및 CTBR12(항-ROR1.CTBR12)를 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 세포를 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 플레이트-결합 항-CD3 항체(1μg/ml) 또는 재조합 인간 ROR1 단백질(100 ng/ml) 중 하나에 세포를 플레이팅하였다. 플레이팅 48시간 후에, 상청액을 수집하고 나서, 루미넥스(Luminex)를 통해 가용성 사이토카인 함량에 대해 분석하였다.

[0608] CTBR12 발현 세포는 재조합 인간 TGFβ1의 존재 하에 TCR 또는 CAR 중 하나를 통해 자극하였을 때 다른 세포 유형보다 상당히 더 많은 양의 IFNγ를 생성하였다(도 7).

[0609] 실시예 5

[0610] CTBR12를 발현시키는 CAR T 세포는 TGFβ1 면역억제 신호에 내성이 있다

[0611] TGFβ 신호전달은 항원 자극에 반응하여 T 세포 확장을 감소시킨다. 대조적으로, IL-12 신호전달은 T 세포 증식을 증가시키고, 만성 항원 노출로부터 초래된 T 세포 기능저하를 감소시킨다.

[0612] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)으로 활성화시키고 나서, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGFβ 수용체(항-ROR1.DNR); 또는 (iii) 항-ROR1 CAR 및 CTBR12(항-ROR1.CTBR12)를 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 세포에 시험관내 연속적 재자극 분석을 실시하였다.

[0613] 간략하게, 인간 ROR1 항원을 발현시키는 GFP-표지된 K562 표적 세포를 사용하여 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 CAR T 세포를 연속적으로 확장시켰다. 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 7일마다 1회로 1:1의 비로 표적 세포로 CART 세포를 자극하였다. 대조군 항-ROR1 CAR-T 세포는 분석 과정에 걸쳐 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 하에 최소 확장을 나타내었다. 대조적으로, TGFβ DNR 또는 CTBR12 중 하나를 공동 발현시키는 항-ROR1 CAR T 세포는 면역억제 TGFβ1 매개 신호전달로부터 상당히 보호되었다. 도 8. 이들 결과는 SMAD 인산화를 차단하는 DNR의 능력과 CTBR12의 능력 둘 다와 상관관계가 있었다(도 8).

[0614] 실시예 6

[0615] TGFβ-IL-7R 신호 컨버터 R2/R1(CTBR7) 및 A 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 T 세포

[0616] 예시적인 TGFβ IL-7R 기반 신호 컨버터(CTBR7) 작제물을 도 1에 나타낸 바와 같이 설계하였다.

[0617] IL-7 결합 후에 IL-7Rα 및 공통 감마쇄(γc; IL-2Rγ)의 세포내 도메인의 이량체화에 의해 최적의 IL-7 수용체 신호전달을 개시한다. TGFβ에 대한 노출 후에 IL-7 수용체 신호전달을 유도하도록 TGFβ 신호를 전환시키기 위해, TGFβ 수용체 1(TGFβR1) 및 TGFβ 수용체 2(TGFβR2)의 세포내 도메인을 IL-2Rγ 및 IL-7Rα 신호전달 도메인으로 각각 대체하여 IL-7 신호전달 키메라 TGFβ 수용체(CTBR7)을 생성하였다. IL-2Rγ 및 IL-7Rα 막관통

및 신호전달 도메인을 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 클로닝시키고 나서, 2A 자기-절단성 폴리펩타이드 서열(CAR.CTBR7)에 의해 분리시켰다.

[0618] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1 μ g/ml) 및 항-CD28(5 μ g/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGF β 수용체(항-ROR1.DNR); (iii) 항-ROR1 CAR 및 CTBR7(항-ROR1.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 항-ROR1 CAR 및 TGF β 2의 세포 표면 발현을 유세포 분석에 의해 결정하였다. R-피코에리트린(R-PE)에 접합된 재조합 인간 ROR1 단백질을 사용하여 항-ROR1 CAR 발현 T 세포를 특이적으로 염색하였다. TGFBR2에 대해 상업적으로 입수 가능한 항체를 사용하여 CTBR7을 검출하였다. 대표적인 발현 데이터를 도 9에 나타낸다.

[0619] 항-ROR1 CAR 및 CTBR7을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입한 T 세포의 40%를 항-ROR1 CAR 및 CTBR7과 공동발현시켰다(도 9의 가장 우측 패널). 대조적으로, 항-ROR1 CAR도 CTBR7도 비형질도입 T 세포에서 검출되지 않았는데, 이는 TGFBR2에 대한 항체가 내인성 TGFBR2를 검출하지 않았다는 것을 나타낸다.

[0620] 실시예 7

[0621] CTBR7에 의해 저해된 면역억제성 TGF β 신호전달

[0622] TGF β 1의 2개 단위 및 TGF β 2의 2개 단위를 함유하는 사량체 복합체에 대한 TGF β 1 결합은 세포핵에 대한 면역억제 신호를 증식하기 위해 SMAD2 및 SMAD3 인산화를 유도한다. 절단된 TGF β 2(우성 음성 TGF β 수용체 - DNR)의 과발현은 TGF β 처리에 반응하여 SMAD2/3 인산화의 상실에 의해 나타내는 바와 같이 TGF β 에 대해 민감하지 않은 T 세포를 제공한다. 따라서, TGF β 신호전달 경로 활성화의 정보를 얻기 위해 포스포-SMAD2/3 발현을 사용하였다.

[0623] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1 μ g/ml) 및 항-CD28(5 μ g/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGF β 수용체(항-ROR1.DNR); (iii) 항-ROR1 CAR 및 CTBR7(항-ROR1.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 배양물을 20분 동안 10ng/ml의 재조합 인간 TGF β 1로 처리하였다. SMAD2/3 인산화를 인산화된 SMAD2/3에 특이적인 항체로 평가하였다. CTBR7 또는 DNR 중 하나를 발현시키는 T 세포를 SMAD2/3의 인산화로부터 완전히 보호하였다(도 10). 이들 데이터는 CTBR7의 발현이 TGF β 면역억제 신호전달에 비민감성인 항-ROR1 CAR T 세포를 제공하였다는 것을 입증하였다.

[0624] 실시

[0625] CTBR7은 TGF β 1에 노출 시 IL-7R 신호를 변환시킨다

[0626] IL-7에 대한 세포 반응은 STAT5의 수용체 이량체화 및 인산화에 의해 개시된다. 따라서, 포스포-STAT5 발현을 사용하여 CTBR7을 발현시키는 T 세포에 대한 IL-7 수용체 신호전달 경로 활성화를 평가하였다.

[0627] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1 μ g/ml) 및 항-CD28(5 μ g/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGF β 수용체(항-ROR1.DNR); (iii) 항-ROR1 CAR 및 CTBR7(항-ROR1.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 배양물을 10ng/ml의 재조합 인간 TGF β 1로 20분 동안 처리하였다. CTBR7을 발현시키는 CAR T 세포만이 재조합 인간 TGF β 1로 처리하였을 때 검출 가능한 수준의 포스포-STAT5 발현을 나타내었다(도 11, 가장 우측 패널을 다른 패널과 비교).

[0628] 전환된 IL-7R 신호전달의 정보를 추가로 얻기 위해, 지속적 TGF β 1 노출에 반응하여 Bcl-2 단백질 발현을 상향 조절하는 CTBR7 발현 세포의 능력을 결정하였다. DNR(항-ROR1.DNR) 또는 CTBR7(항-ROR1.CTBR7) 중 하나를 공동 발현시키는 대조군 CAR T 세포 또는 CAR T 세포에 외인성 사이토카인 지지체의 부재 하에 또는 TGF β 1의 존재 또는 부재 하에 항원-유도 연속 확장 분석을 실시하였다. 간략하게, 인간 ROR1 항원을 발현시키는 GFP-표지 K562 표적 세포를 사용하여 재조합 인간 TGF β 1의 존재 또는 부재 하에 CAR T 세포를 연속적으로 확장시켰다. 5ng/ml 재조합 인간 TGF β 1의 존재 또는 부재 하에 7일마다 1회로 1:1의 비로 표적 세포로 CAR T 세포를 자극하였다. 제2 자극 후 6일에, 항-ROR1 CAR, 항-ROR1 CAR.DNR 또는 항-ROR1 CAR.CTBR7 T 세포를 유세포분석에 의해 Bcl-2 단백질 발현에 대해 정보를 얻었다. CTBR7을 발현시키는 CAR T 세포만이 TGF β 1의 존재 하에 확장될 때 증가된 수준의 Bcl-2 단백질 발현을 입증하였다(도 12).

[0629]

실시예 9

[0630]

CTBR7을 공동발현시키는 CAR T 세포는 외인성 IL-2의 부재 및 TGFβ1의 존재 하에 지속된 효과기 활성을 입증한다

[0631]

TGFβ 신호전달은 항원 자극에 반응하여 T 세포 확장을 감소시킨다. 대조적으로, IL-7 신호전달은 T 세포 증식 및 생존, 기억 T 세포 집단에 대해 특히 분명한 활성을 유도할 수 있다. CTBR7 신호전달이 TGFβ1의 존재 하에 CAR T 세포 효과기 활성을 증가시킬 수 있었는지의 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 외인성 IL-2 사이토카인 지지체가 제공되지 않은 연속적 재자극 분석에서 대조군 CAR 및 CAR.DNR T 세포에 대해 CAR.CTBR7 확장 및 항-종양 활성을 비교하였다.

[0632]

건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시켰고, (i) 항-ROR1 CAR; (ii) 항-ROR1 CAR 및 우성 음성 TGFβ 수용체(항-ROR1.DNR); 또는 (iii) 항-ROR1 CAR 및 CTBR7(항-ROR1.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 배양 10일 후에, 세포에 외인성 IL-2 사이토카인 지지체의 부재 하에 시험관내 연속적 재자극 분석을 실시하였다.

[0633]

간략하게, 인간 ROR1 항원을 발현시키는 GFP-표지된 K562 표적 세포를 사용하여 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 CAR T 세포를 연속적으로 확장시켰다. 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 7일마다 1회로 1:1 비로 표적 세포로 CAR T 세포를 자극하였다. 외인성 IL-2는 이 분석에서 근거로 사용하지 않았다. 대조군 항-ROR1 CAR T 세포는 분석 과정에 걸쳐 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 하에 최소 확장을 나타내었다. DNR을 공동발현시키는 CAR T 세포는 또한 TGFβ1의 존재 하에 확장될 때 감소된 확장을 입증하였다. 대조적으로, CTBR7을 공동발현시키는 항-ROR1 CAR T 세포는 TGFβ1의 부재 하에 확장된 동일 세포에 비해 향상된 확장을 입증하였다(도 13). 이들 데이터는 활성 CTBR7 신호전달이 CAR 단독에 비해 T 세포 확장을 증가시켰다는 것을 입증하였다.

[0634]

CTBR7을 공동발현시키는 CAR T 세포는 IL-2 지지체가 없는 상기 기재한 연속적 재자극 분석에서 배양물로부터 종양 세포를 없앤다. 자극의 제2 라운드 후에, CTBR7을 공동발현시키고 TGFβ1로 처리된 CAR T 세포만이 종양 집단을 완전히 없앤다(배양물에 남아있는 GFP 양성 종양 세포의 존재에 의해 모니터링)(도 13). 이들 데이터는 CAR 신호전달 단독이 충분하지 않은 조건에서 CTBR7 신호전달이 효과기 기능을 뒷받침하기에 충분하다는 것을 입증하였다.

[0635]

실시예 10

[0636]

키메라 항원 수용체(CAR) 및 CTBR12 또는 CTBR7을 발현시키는 T 세포

[0637]

예시적인 TGFβ IL-12R 또는 TGFβ IL-7R 신호 컨버터 작제물을 도 1에 나타낸 바와 같이 설계하였다.

[0638]

IL-12Rβ1 및 IL-12Rβ2 막관통 및 신호전달 도메인을 항-EGFR CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝시키고 나서, 2A 자기-절단성 폴리펩타이드 서열(항-EGFR.CTBR12)에 의해 분리시켰다.

[0639]

IL-2Rγ 및 IL-7Rα 막관통 및 신호전달 도메인을 항-EGFR CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝시키고 나서, 2A 자기-절단성 폴리펩타이드 서열(항-EGFR.CTBR7)에 의해 분리시켰다.

[0640]

건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-EGFR CAR; (ii) 항-EGFR CAR 및 우성 음성 TGFβ 수용체(항-EGFR.DNR); (iii) 항-EGFR CAR 및 CTBR12(항-EGFR.CTBR12); 및 (iv) 항-EGFR CAR 및 CTBR7(항-EGFR.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 항-EGFR CAR 및 TGFβR2의 세포 표면 발현을 유세포 분석에 의해 결정하였다. 대표적인 발현 데이터를 도 15에 나타낸다(상부 패널).

[0641]

실시예 11

[0642]

항-EGFR CAR 및 CTBR12 또는 항-EGFR CAR 및 CTBR7을 발현시키는 T 세포에 의해 저해된 면역억제성 TGFβ 신호전달

[0643]

건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-EGFR CAR; (ii) 항-EGFR CAR 및 우성 음성 TGFβ 수용체(항-EGFR.DNR); (iii) 항-EGFR CAR 및 CTBR12(항-EGFR.CTBR12); 및 (iv) 항-EGFR CAR 및 CTBR7(항-EGFR.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 배양물을 20분 동안 10ng/ml의 재조합

인간 TGFβ1로 처리하였다. SMAD2/3 인산화를 인산화된 SMAD2/3에 특이적인 항체로 평가하였다. DNR, CTBR12 또는 CTBR7 중 하나를 발현시키는 T 세포를 SMAD2/3의 인산화로부터 완전히 보호하였다(도 15, 하부 패널). 이들 데이터는 CTBR12 또는 CTBR7 중 하나의 발현이 TGFβ 면역억제 신호전달에 비민감성인 항-EGFR CAR T 세포를 제공하였다는 것을 입증하였다.

[0644] 실시

[0645] CTBR은 TGFβ1에 대한 노출 시 IL-R 신호를 변환시킨다

[0646] IL-12에 대한 세포 반응은 STAT4 및 STAT5의 수용체 이량체화 및 인산화에 의해 개시된다. 포스포-STAT4 발현을 사용하여 항-EGFR.CTBR12를 발현시키는 T 세포에 대한 IL-12 수용체 신호전달 경로 활성화를 평가하였다.

[0647] IL-7에 대한 세포 반응은 STAT5의 수용체 이량체화 및 인산화에 의해 개시된다. 따라서, 포스포-STAT5 발현을 사용하여 항-EGFR.CTBR7을 발현시키는 T 세포에 대한 IL-7 수용체 신호전달 경로 활성화를 평가하였다.

[0648] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-EGFR CAR; (ii) 항-EGFR CAR 및 CTBR12 (항-EFGR.CTBR12); 및 (iii) 항-EGFR CAR 및 CTBR7(항-EFGR.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, T 세포 배양물을 20분 동안 재조합 인간 IL-12 또는 재조합 인간 TGFβ1로 처리하거나(도 16) 또는 20분 동안 재조합 인간 IL-7 또는 재조합 인간 TGFβ1로 처리하였다(도 17).

[0649] 항-EGFR CAR 또는 항-EFGR.CTBR12를 발현시키는 T 세포는 IL-12의 존재 하에 증가된 수준의 인산화된 STAT4를 나타내었지만(도 16, 좌측 패널), 항-EFGR.CTBR12를 발현시키는 T 세포만이 TGFβ1의 존재 하에 증가된 수준의 인산화된 STAT4를 나타낸다(도 16, 하부 우측 패널).

[0650] 항-EGFR CAR 또는 항-EFGR.CTBR7을 발현시키는 T 세포는 IL-7의 존재 하에 증가된 수준의 인산화된 STAT5를 나타내었지만(도 17, 좌측 패널), 그러나 항-EFGR.CTBR7을 발현시키는 T 세포만이 TGFβ1의 존재 하에 증가된 수준의 인산화된 STAT4를 나타낸다(도 17, 하부 우측 패널).

[0651] 실시에 13

[0652] CTBR12를 발현시키는 CAR T 세포는 항원 및 TGFβ1에 대한 노출 시 증가된 IFNγ를 분비한다

[0653] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포는 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화되고, (i) 항-EGFR CAR; (ii) 항-EGFR CAR 및 음성 TGFβ 수용체(항-EGFR.DNR); 또는 (iii) 항-EGFR CAR 및 CTBR12 (항-EFGR.CTBR12)를 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입되었다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, CAR 및 CTBR 발현 T 세포를 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 Jurkat 세포(EGFR(-)), A549 세포(EGFR(+)) 또는 HT1080 세포(EGFR(+))와 함께 배양시켰다. 상청액을 수집하고 나서 루미넥스를 통해 가용성 사이토카인 함량에 대해 분석하였다.

[0654] 재조합 인간 TGFβ1의 존재 하에 EGFR(-) 세포주에 비해 EGFR(+) 세포주와 함께 배양시켰을 때 CTBR12 발현 세포는 상당히 더 많은 양의 IFNγ를 생성하였다(도 18).

[0655] 실시에 14

[0656] CTBR을 공동발현시키는 항-EGFR CAR T 세포는 외인성 IL-2의 부재 및 TGFβ1의 존재 하에 지속된 효과기 활성을 입증한다

[0657] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) 항-EGFR CAR; (ii) 항-EGFR CAR 및 음성 TGFβ 수용체(항-EGFR.DNR); (iii) 항-EGFR CAR 및 CTBR12 (항-EFGR.CTBR12); 및 (iv) 항-EGFR CAR 및 CTBR7(항-EFGR.CTBR7)를 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 세포에 외인성 IL-2 사이토카인 지지체의 부재 하에 시험관내 연속 재자극 분석을 실시하였다.

[0658] 간략하게, 인간 EGFR 항원을 발현시키는 GFP-표지된 표적 세포를 사용하여 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 CAR T 세포를 연속적으로 확장시켰다. 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 7일마다 1회 1:1의 비로 CAR T 세포를 표적 세포로 자극하였다. 이 분석에서의 근거에 대해 외인성 IL-2를 사용하지 않았다. 대조군 항-EGFR CAR T 세포는 제1 자극을 통해 5ng/ml 재조합 인간 TGFβ1의 존재 하에 최소 확장을 나타내었고, 추가로 배양시키지 않았다. DNR을 공동발현시키는 CAR T 세포는 또한 TGFβ1의 존재 하에 확장될

때 감소된 확장을 입증하였다. 대조적으로, CTBR12 또는 CTBR7를 공동발현시키는 항-EGFR CAR T 세포는 TGF β 1의 부재 하에 확장된 동일한 세포에 비해 향상된 확장을 입증하였다(도 19). 이들 데이터는 활성 CTBR12 또는 CTBR7 신호전달이 CAR 단독에 비해 T 세포 확장을 증가시켰다는 것을 입증하였다.

[0659] 실시예 15

[0660] CTBR을 공동발현시키는 NY-ESO1 TCR T 세포는 외인성 IL-2의 부재 및 TGF β 1의 존재 하에 지속된 효과기 활성을 입증한다

[0661] 예시적인 TCR-기반 TGF β IL-12R 및 TGF β IL-R 신호 컨버터 작제물을 도 20으로서 설계하였다.

[0662] IL-12R β 1 및 IL-12R β 2 막관통 및 신호전달 도메인을 항-NY-ESO1 TCR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝시키고 나서, 2A 자기-절단성 폴리펩타이드 서열(NY-ESO1.CTBR12)에 의해 분리하였다.

[0663] IL-2R γ 및 IL-7R α 막관통 및 신호전달 도메인을 NY-ESO1 TCR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝시키고 나서, 2A 자기-절단성 폴리펩타이드 서열(NY-ESO1.CTBR7)에 의해 분리하였다.

[0664] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) NY-ESO1 TCR; (ii) NY-ESO1 TCR 및 우성 음성 TGF β 수용체(NY-ESO1.DNR); (iii) NY-ESO1 TCR 및 CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); 및 (iv) NY-ESO1 TCR 및 CTBR7(NY-ESO1.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, NY-ESO1 TCR 및 TGF β 2의 세포 표면 발현을 유세포분석에 의해 결정하였다. 모든 작제물을 발현시켰다.

[0665] 실시예 16

[0666] NY-ESO TCR 및 CTBR12 또는 NY-ESO TCR 및 CTBR7을 발현시키는 T 세포에 의해 저해된 면역억제성 TGF β 신호전달

[0667] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) NY-ESO1 TCR; (ii) NY-ESO1 TCR 및 우성 음성 TGF β 수용체(NY-ESO1.DNR); (iii) NY-ESO1 TCR 및 CTBR12(NY-ESO1.CTBR12); 및 (iv) NY-ESO1 TCR 및 CTBR7(NY-ESO1.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, 배양물을 20분 동안 10ng/ml의 재조합 인간 TGF β 1로 처리하였다. SMAD2/3 인산화를 인산화된 SMAD2/3에 특이적인 항체로 평가하였다. DNR, CTBR12 또는 CTBR7을 발현시키는 T 세포를 SMAD2/3의 인산화로부터 완전히 보호하였다(도 21). 이들 데이터는 CTBR12 또는 CTBR7 중 하나의 발현이 TGF β 면역억제 신호전달에 민감하지 않은 NY-ESO1 TCR T 세포를 제공하였다는 것을 입증한다.

[0668] 실시예 17

[0669] CTBR은 TGF β 1에 대한 노출 시 IL-R 신호를 변환시킨다

[0670] IL-12에 대한 세포 반응은 STAT4 및 STAT5의 수용체 이량체화 및 인산화에 의해 개시된다. 포스포-STAT4 발현을 사용하여 NY-ESO1.CTBR12를 발현시키는 T 세포에 대한 IL-12 수용체 신호전달 경로 활성화를 평가하였다.

[0671] IL-7에 대한 세포 반응은 STAT5의 수용체 이량체화 및 인산화에 의해 개시된다. 따라서, 포스포-STAT5 발현을 사용하여 NY-ESO1.CTBR7을 발현시키는 T 세포에 대한 IL-7 수용체 신호전달 경로 활성화를 평가하였다.

[0672] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) NY-ESO1 TCR 및 CTBR12(NY-ESO1.CTBR12); 및 (ii) NY-ESO1 TCR 및 CTBR7(NY-ESO1.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, T 세포 배양물을 20분 동안 재조합 인간 IL-7 또는 재조합 인간 TGF β 1로 처리하거나(도 22, 상부 패널) 또는 20분 동안 재조합 인간 IL-12 또는 재조합 인간 TGF β 1로 처리하였다(도 22, 하부 패널).

[0673] 실시예 18

[0674] CTBR12를 발현시키는 CAR T 세포는 항원 및 TGF β 1에 대한 노출 시 증가된 IFN γ를 분비한다

[0675] 건강한 공여자 PBMC로부터의 1차 인간 T 세포를 가용성 항-CD3(1μg/ml) 및 항-CD28(5μg/ml)로 활성화시키고 나서, (i) NY-ESO1 TCR; (ii) NY-ESO1 TCR 및 우성 음성 TGF β 수용체(NY-ESO1.DNR); (iii) NY-ESO1 TCR 및 CTBR12(NY-ESO1.CTBR12); 및 (iv) NY-ESO1 TCR 및 CTBR7(NY-ESO1.CTBR7)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터 또는 비히클로 형질도입하였다. IL-2 함유 성장 배지에서 10일의 배양 후에, CAR 및 CTBR 발현 T 세포를 5ng/ml 재조

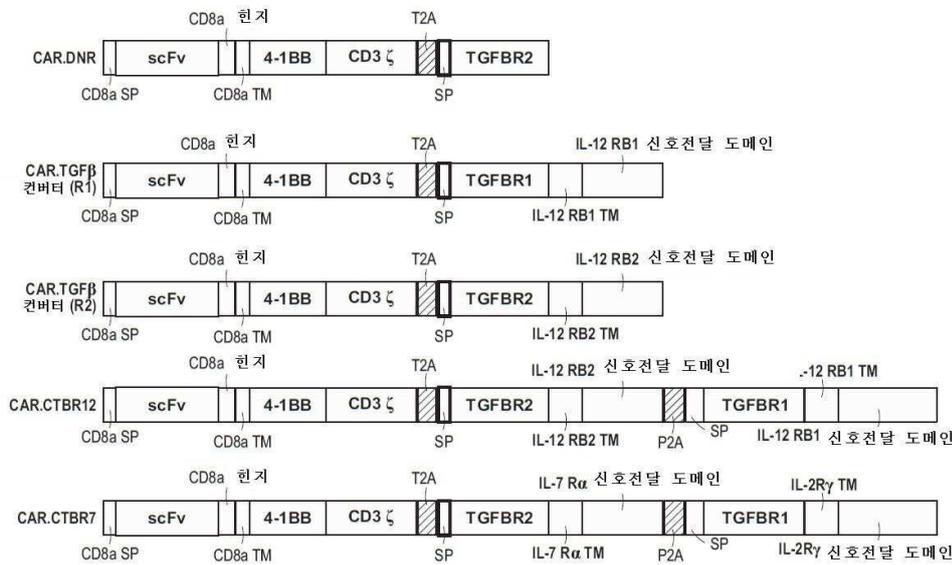
합 인간 TGFβ1의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 T 세포 대 표적 세포의 5:1 비로 SaOs2 세포(A2, NY-ES01(+)) 또는 A549.A2.NY-ES01 세포(A2, NY-ES01(+))와 함께 배양시켰다. 상청액을 수집하고 나서, 루미렉스를 통해 가용성 사이토카인 함량에 대해 분석하였다.

[0676] A2 및 NY-ES01(+) 세포주에 비해 재조합 인간 TGFβ1의 존재 하에 A2 및 NY-ES01(+) 세포주와 함께 배양시켰을 때 CTBR12 발현 세포는 상당히 더 많은 양의 IFNγ를 생성하였다(도 23). CTBR 발현 세포는 면역억제 TGFβ 신호전달에 대한 내성을 입증한다.

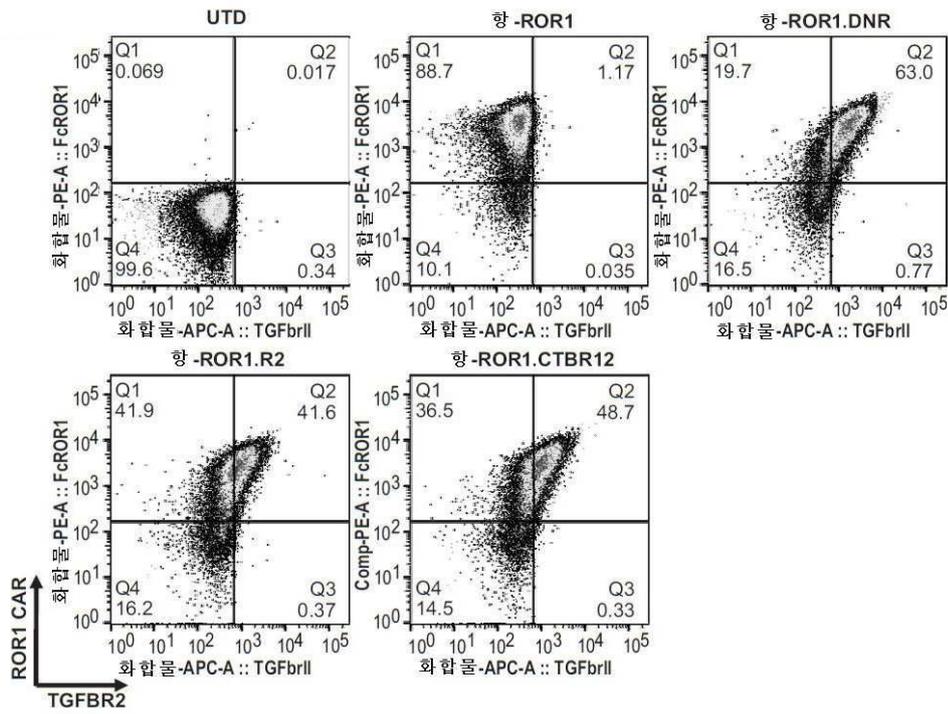
[0677] 일반적으로, 다음의 청구범위에서, 사용하는 용어는 본 명세서 및 청구범위에 개시된 구체적 실시형태로 청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되며, 이러한 청구범위가 자격을 부여하는 균등론의 완전한 범주와 함께 모든 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 청구범위는 본 개시내용에 의해 제한되지 않는다.

도면

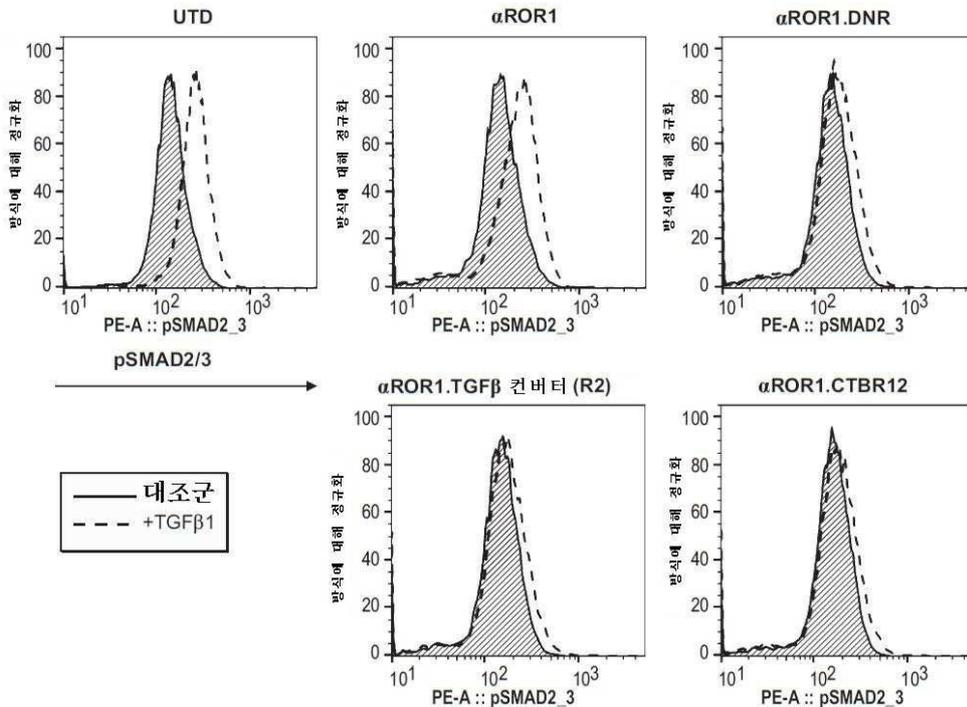
도면1



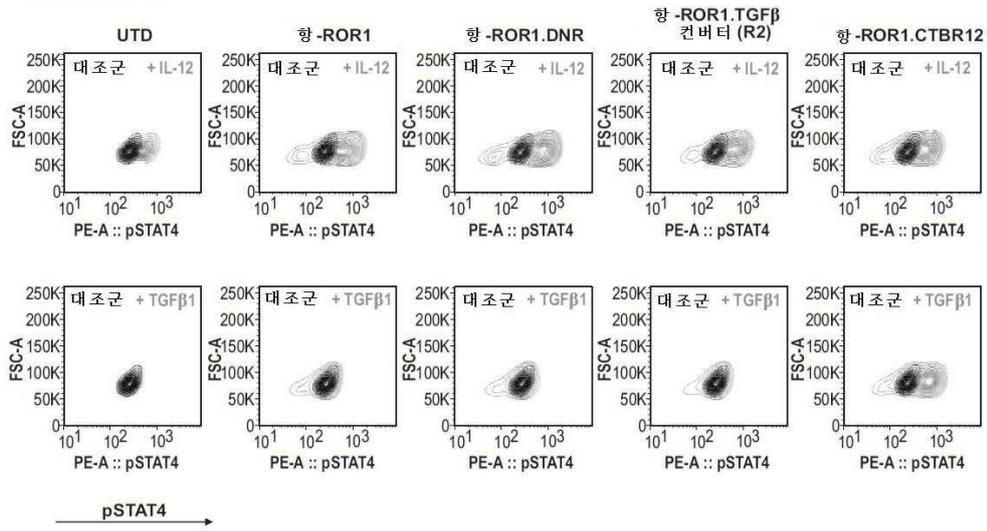
도면2



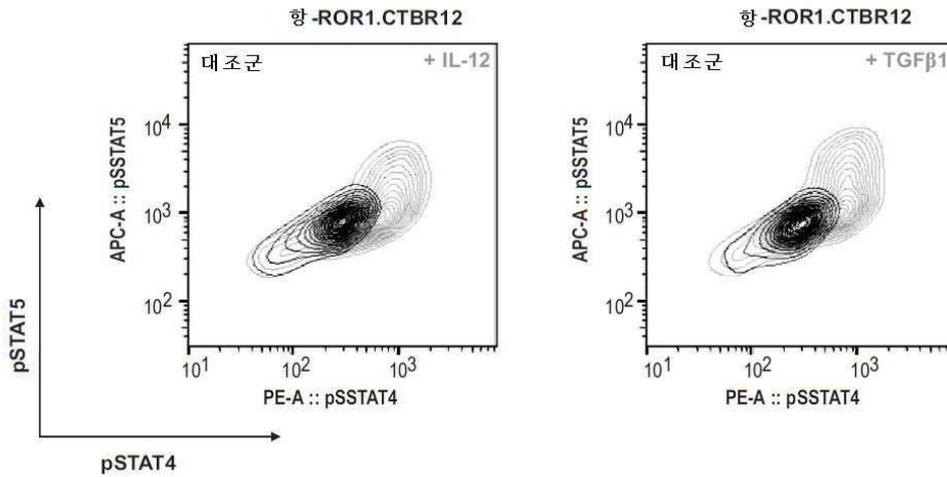
도면3



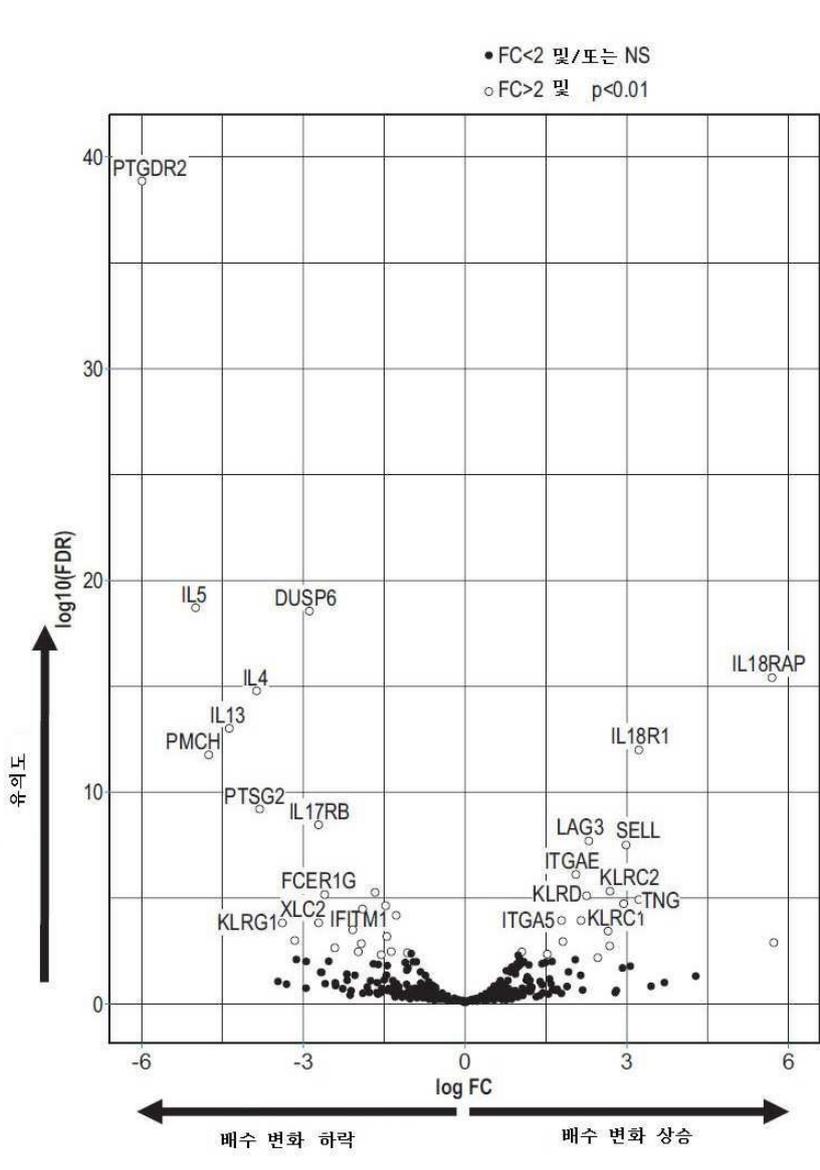
도면4



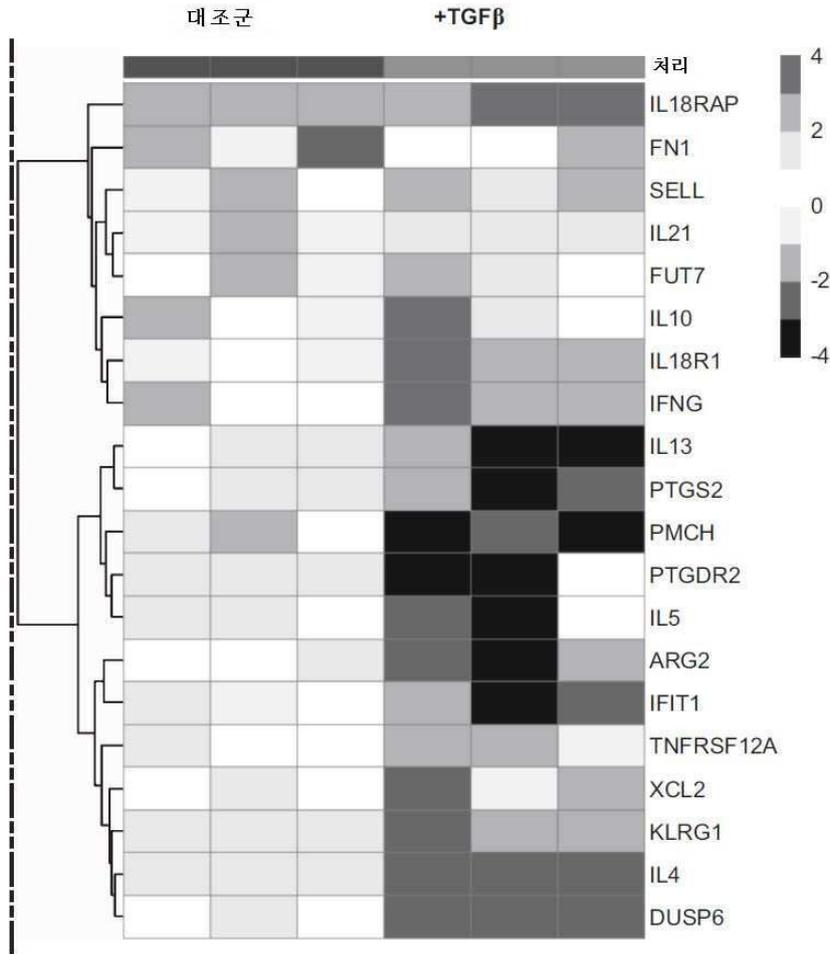
도면5



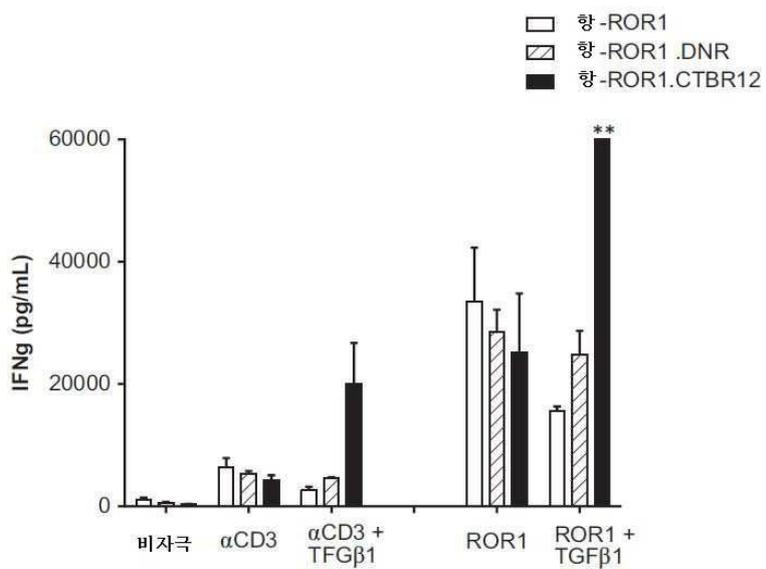
도면6a



도면6b

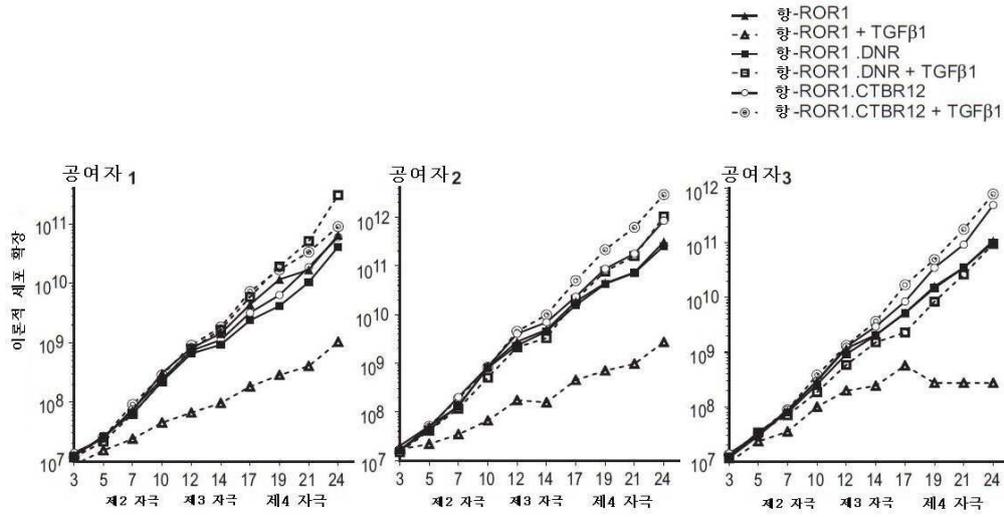


도면7

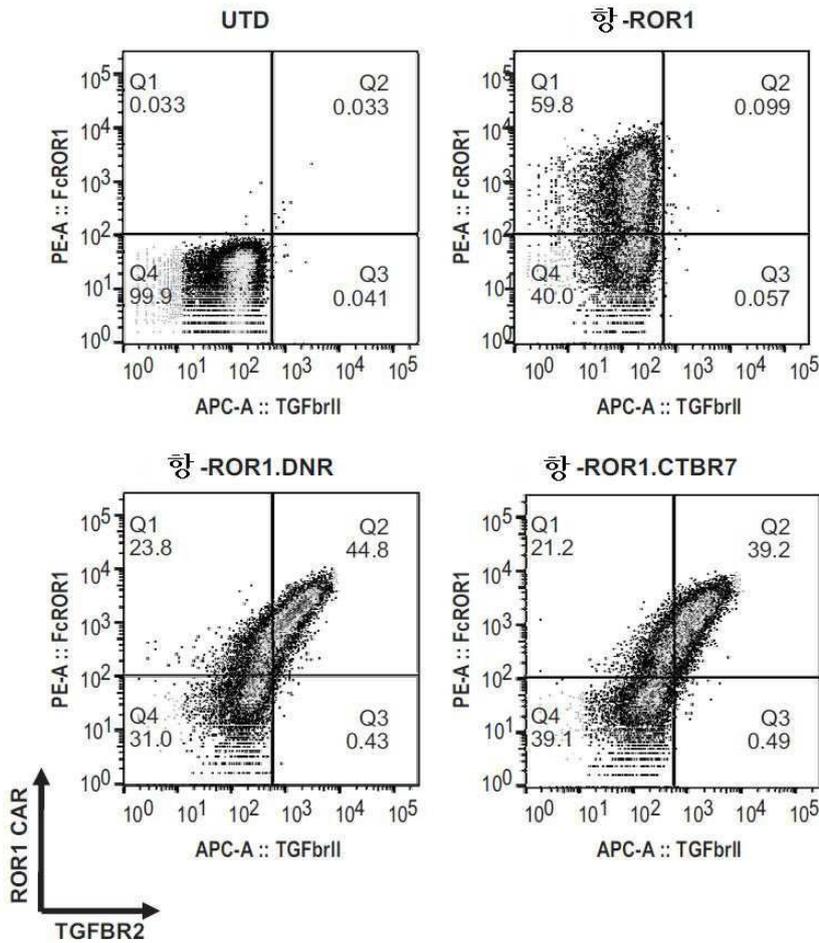


* 3명의 공여자로부터의 편집 데이터
 ** 펄류 오프 규모 - 선형 분석 범위 밖

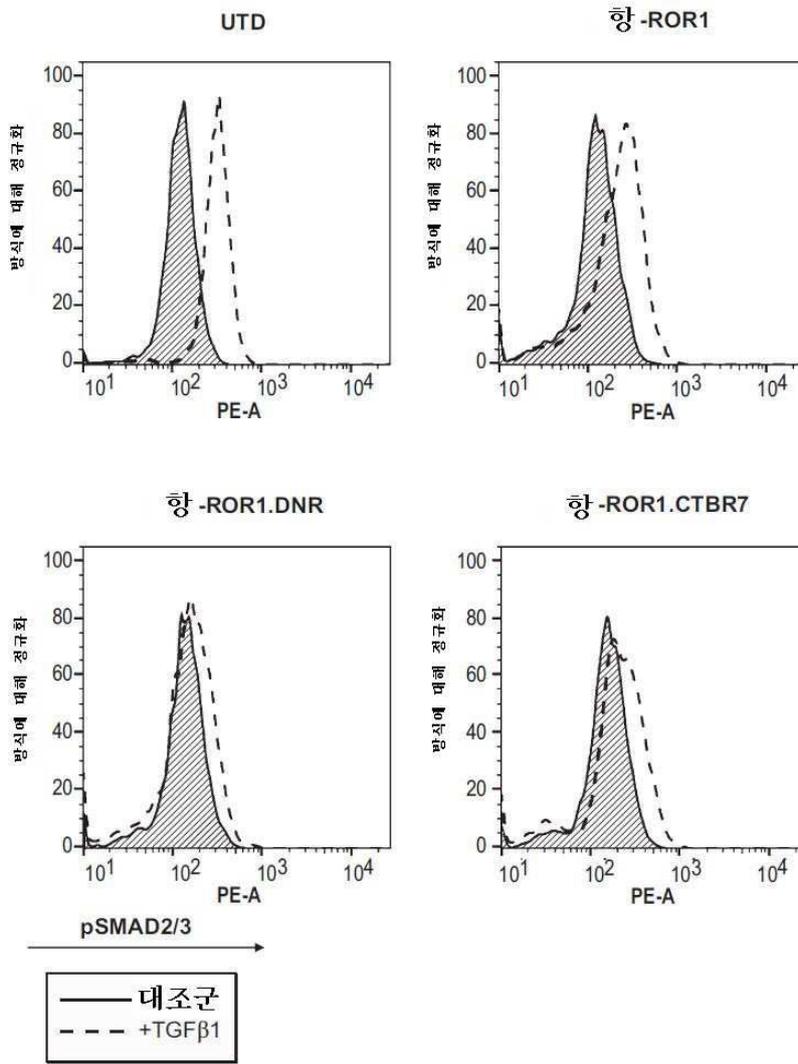
도면8



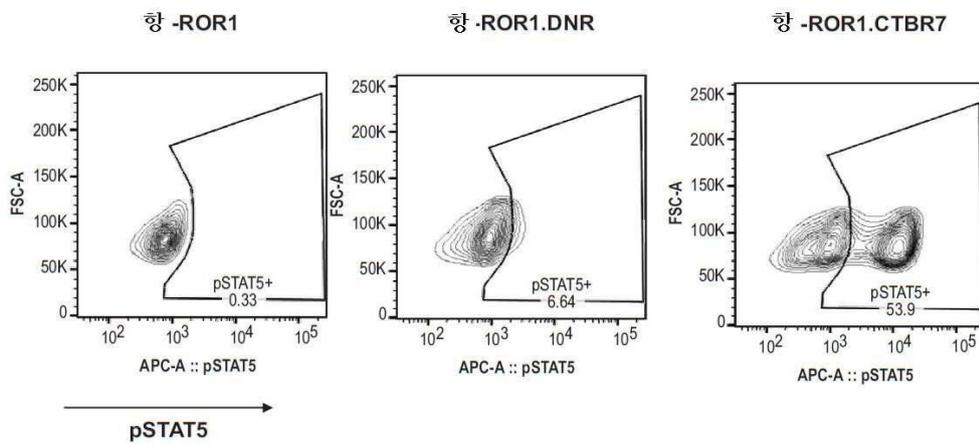
도면9



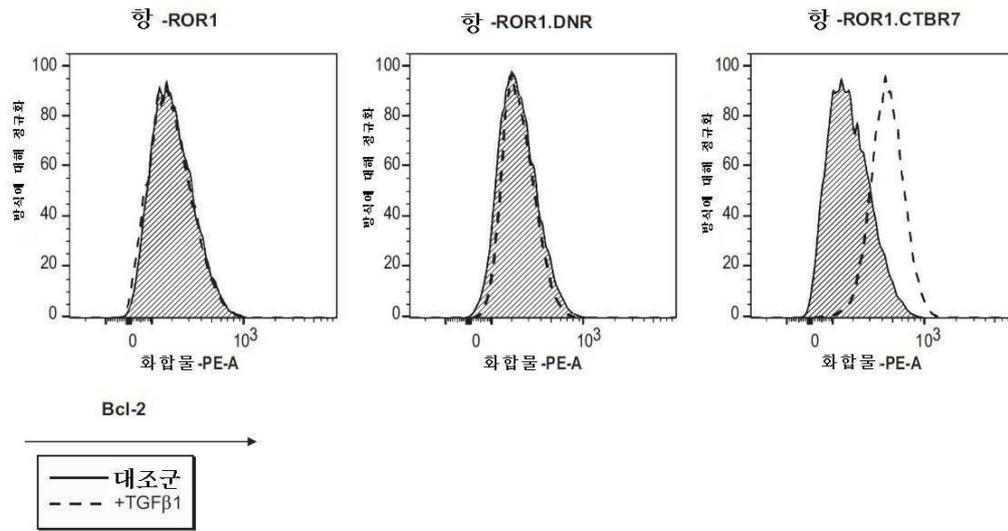
도면10



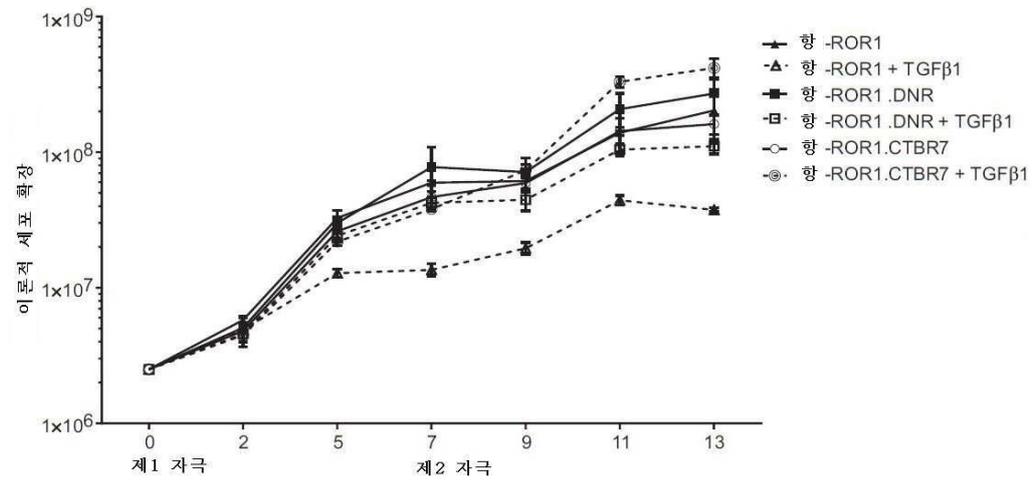
도면11



도면12

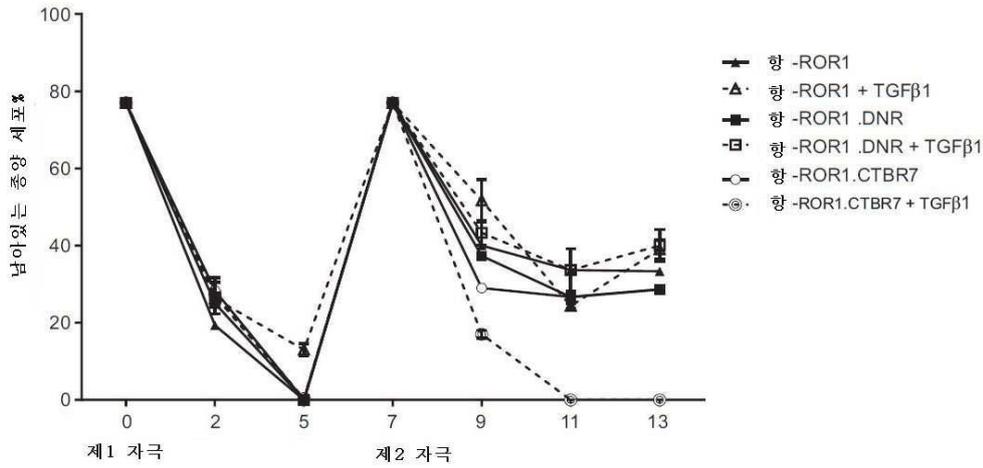


도면13



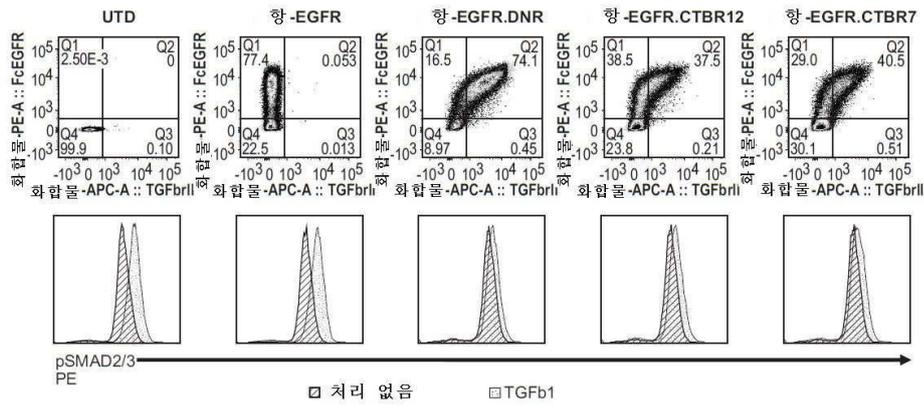
*3명의 공여자로부터의 조합 데이터

도면14

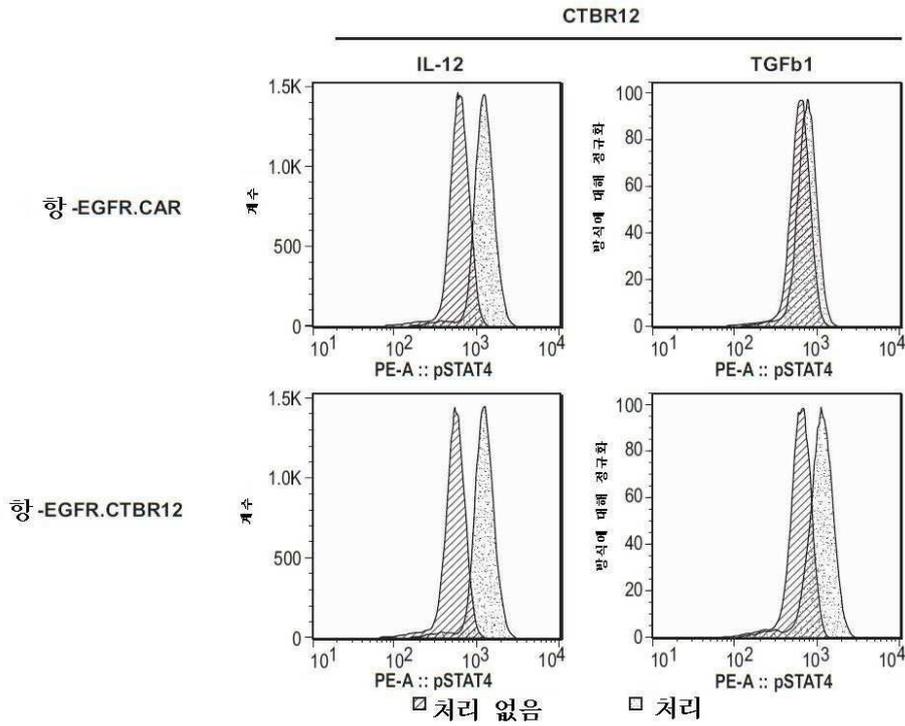


* 3명의 공여자로부터의 조합 데이터

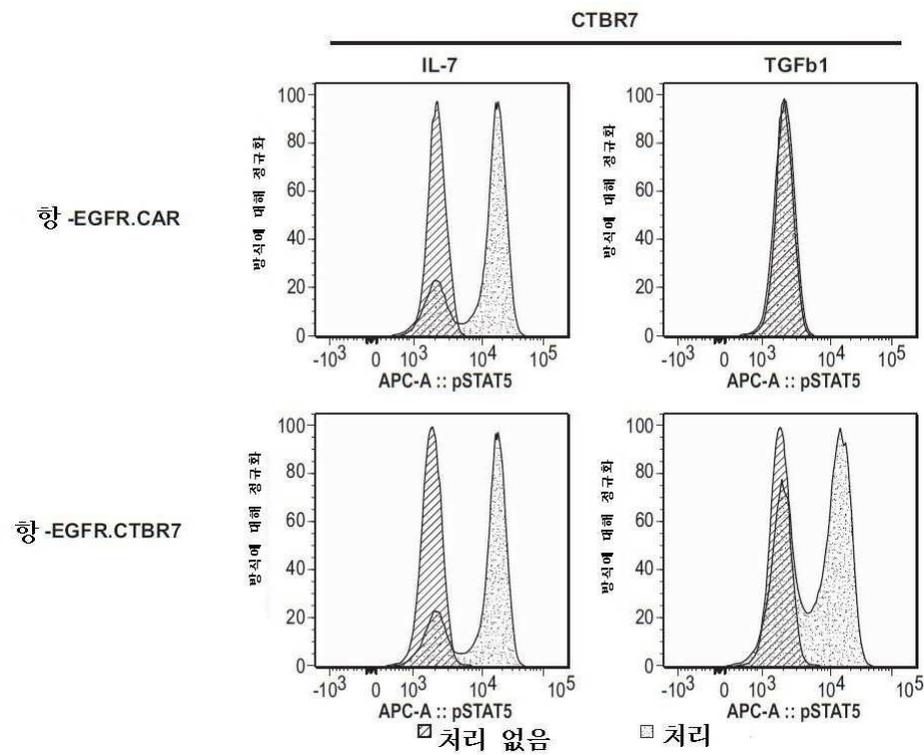
도면15



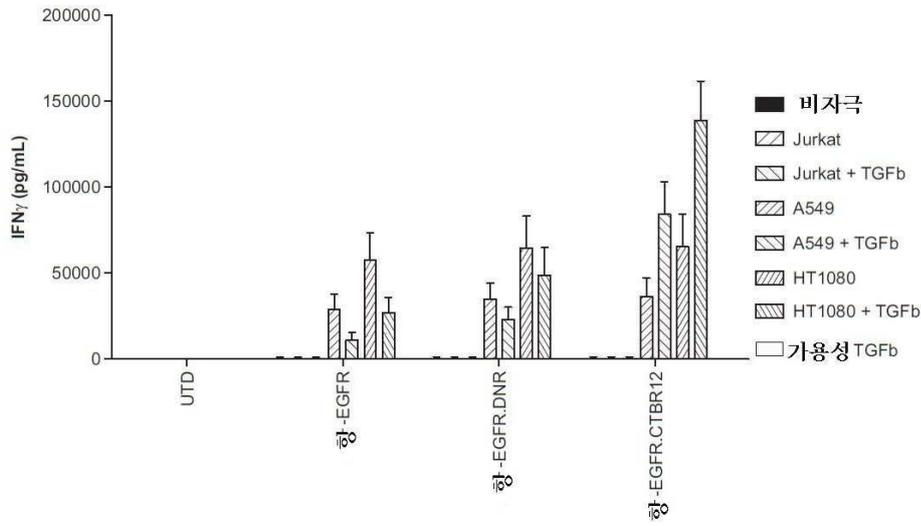
도면16



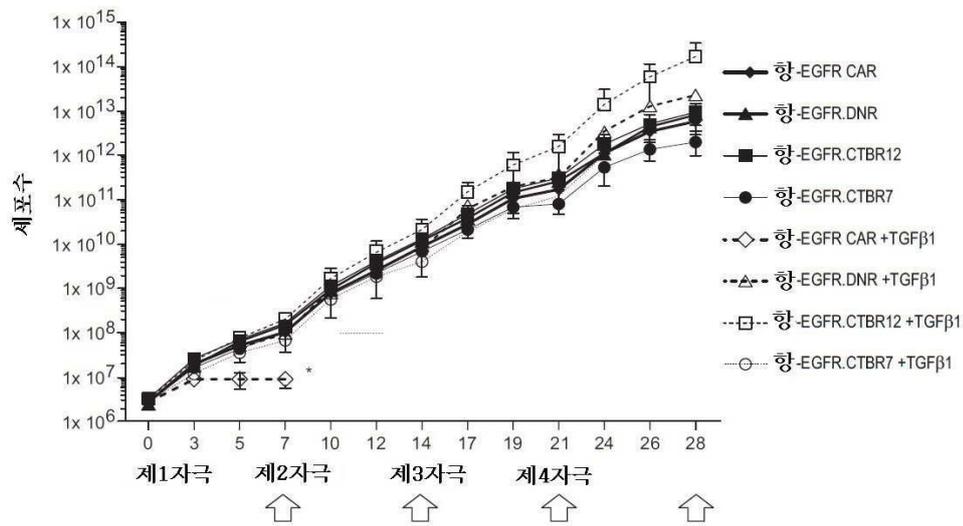
도면17



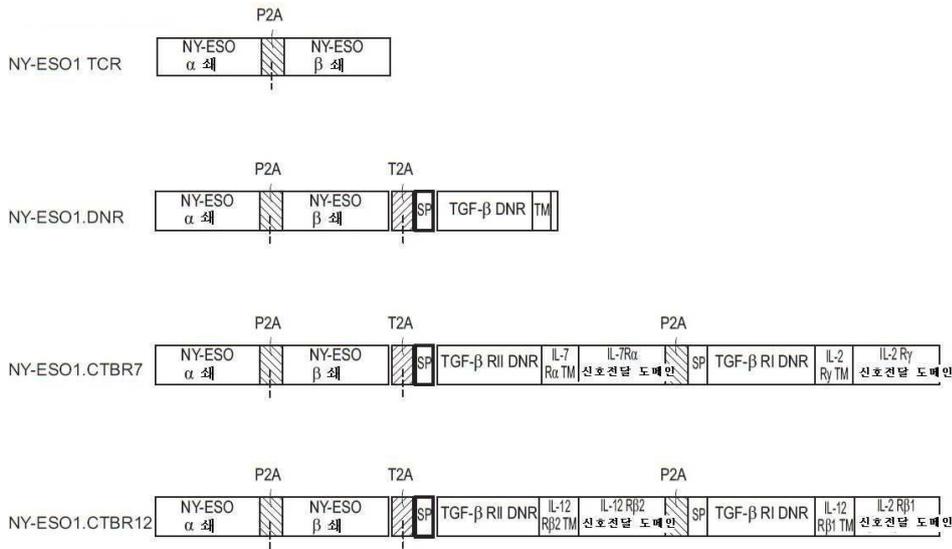
도면18



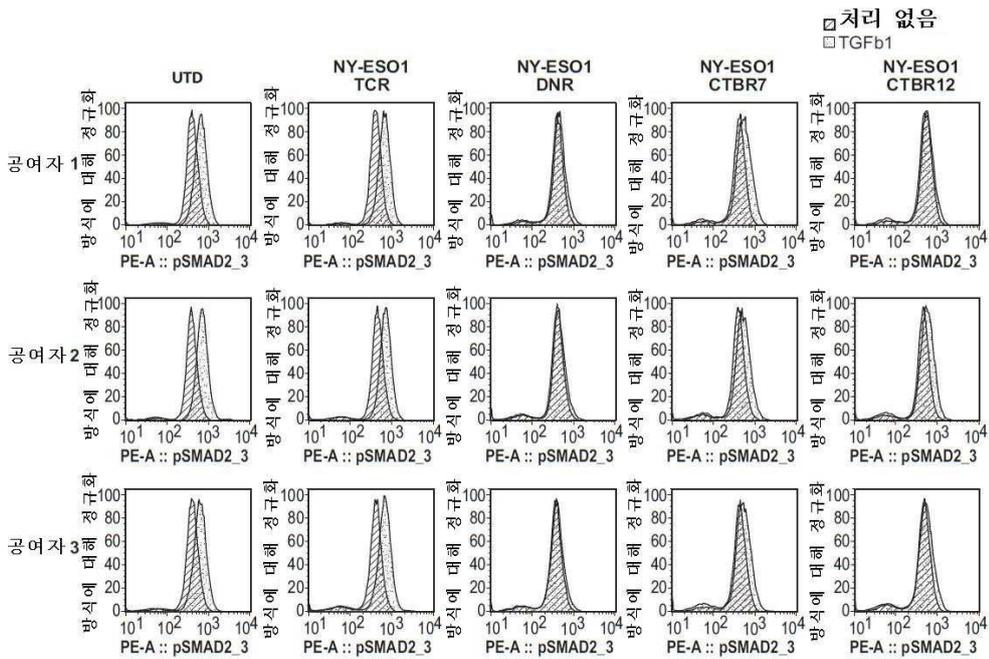
도면19



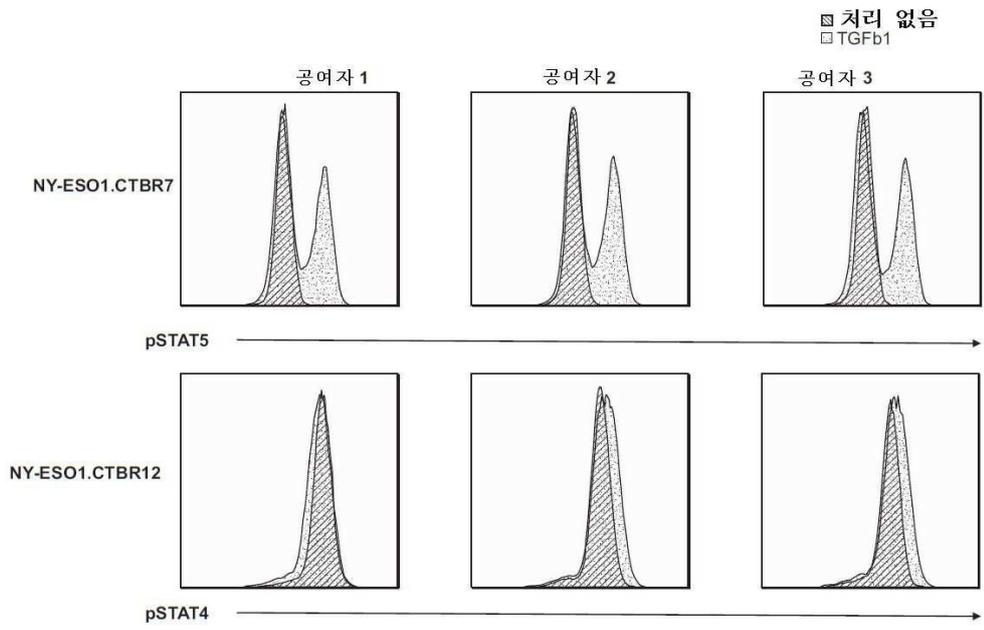
도면20



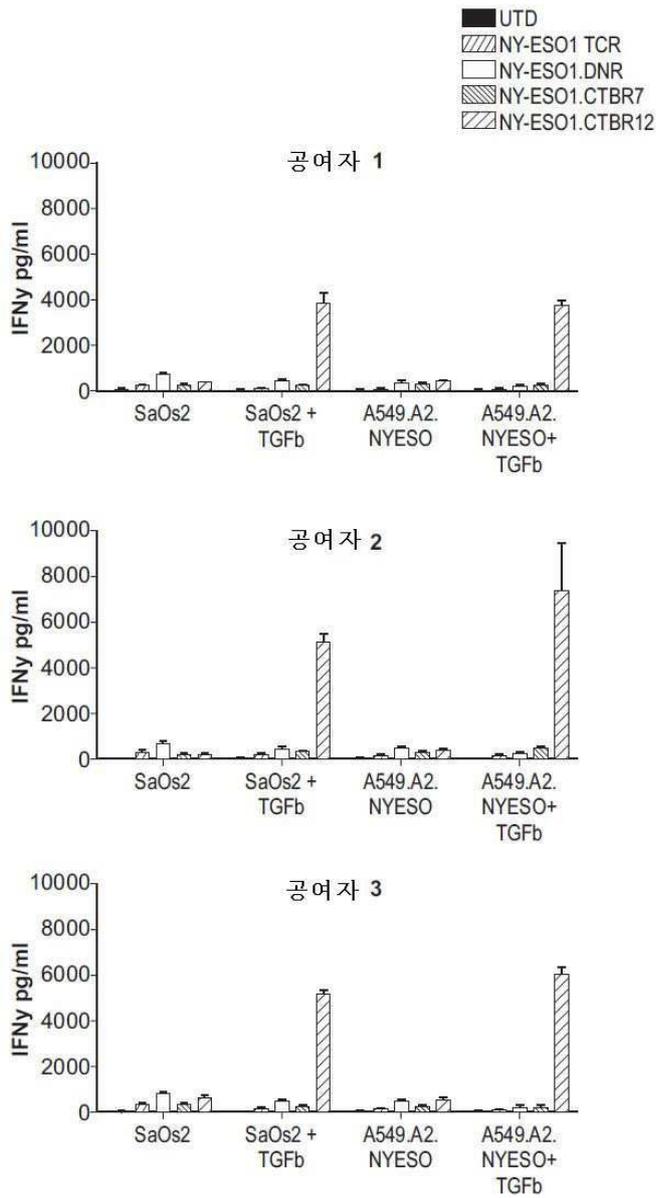
도면21



도면22



도면23



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> BLUEBIRD BIO, INC.
- <120> TGFβ SIGNAL CONVERTOR
- <130> IPA190626-US
- <150> US 62/423,565
- <151> 2016-11-17
- <150> US 62/467,496
- <151> 2017-03-06
- <160> 76
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 507

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val

1 5 10 15

Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr

 20 25 30

Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys

 35 40 45

Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys

 50 55 60

Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Leu Met Leu Met Val Tyr Ile Cys His Asn Arg Thr Val Ile His His

145 150 155 160

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

 165 170 175

Glu Gly Thr Thr Leu Lys Asp Leu Ile Tyr Asp Met Thr Thr Ser Gly

 180 185 190

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

 195 200 205

Ile Val Leu Gln Glu Ser Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp

Cys Glu Ala Leu Arg Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr
 465 470 475 480

Ala Asn Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu
 485 490 495

Ser Gln Leu Ser Gln Gln Glu Gly Ile Lys Met
 500 505

<210> 2

<211> 567

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
 1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
 20 25 30

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 35 40 45

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

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
 65 70 75 80

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
 85 90 95

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
 100 105 110

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
 115 120 125

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
 130 135 140

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu
 145 150 155 160

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

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

 Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile
 290 295 300
 Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln
 305 310 315 320
 Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr
 325 330 335
 Leu Thr Arg His Val Ile Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser
 340 345 350

 Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys
 355 360 365
 Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn
 370 375 380
 Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu
 385 390 395 400
 Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser

Leu Ser Cys Pro Cys Lys Ala Lys Ala Thr Arg Thr Leu His Leu Gly
 290 295 300
 Lys Met Pro Tyr Leu Ser Gly Ala Ala Tyr Asn Val Ala Val Ile Ser
 305 310 315 320
 Ser Asn Gln Phe Gly Pro Gly Leu Asn Gln Thr Trp His Ile Pro Ala
 325 330 335
 Asp Thr His Thr Glu Pro Val Ala Leu Asn Ile Ser Val Gly Thr Asn
 340 345 350

 Gly Thr Thr Met Tyr Trp Pro Ala Arg Ala Gln Ser Met Thr Tyr Cys
 355 360 365
 Ile Glu Trp Gln Pro Val Gly Gln Asp Gly Gly Leu Ala Thr Cys Ser
 370 375 380
 Leu Thr Ala Pro Gln Asp Pro Asp Pro Ala Gly Met Ala Thr Tyr Ser
 385 390 395 400
 Trp Ser Arg Glu Ser Gly Ala Met Gly Gln Glu Lys Cys Tyr Tyr Ile
 405 410 415

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

 Tyr Val Val Arg Cys Arg Asp Glu Asp Ser Lys Gln Val Ser Glu His
 485 490 495
 Pro Val Gln Pro Thr Glu Thr Gln Val Thr Leu Ser Gly Leu Arg Ala
 500 505 510
 Gly Val Ala Tyr Thr Val Gln Val Arg Ala Asp Thr Ala Trp Leu Arg
 515 520 525
 Gly Val Trp Ser Gln Pro Gln Arg Phe Ser Ile Glu Val Gln Val Ser

530 535 540

Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu

545 550 555 560

Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His

565 570 575

Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe

580 585 590

Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln

595 600 605

Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp

610 615 620

Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly

625 630 635 640

Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp

645 650 655

Arg Cys Lys Ala Lys Met

660

<210> 4

<211> 776

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 4

Met Ala His Thr Phe Arg Gly Cys Ser Leu Ala Phe Met Phe Ile Ile

1 5 10 15

Thr Trp Leu Leu Ile Lys Ala Lys Ile Asp Ala Cys Lys Arg Gly Asp

20 25 30

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

35 40 45

Ile Thr Cys Ser Leu Lys Pro Arg Gln Gly Cys Phe His Tyr Ser Arg

50 55 60

Arg Asn Lys Leu Ile Leu Tyr Lys Phe Asp Arg Arg Ile Asn Phe His

Pro Thr Gly Met Leu Asp Val Trp Tyr Met Lys Arg His Ile Asp Tyr
 325 330 335
 Ser Arg Gln Gln Ile Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ser Val Ser Glu
 340 345 350
 Ala Arg Gly Lys Ile Leu His Tyr Gln Val Thr Leu Gln Glu Leu Thr
 355 360 365
 Gly Gly Lys Ala Met Thr Gln Asn Ile Thr Gly His Thr Ser Trp Thr
 370 375 380

 Thr Val Ile Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ala Val Ala Val Ser Ala Ala
 385 390 395 400
 Asn Ser Lys Gly Ser Ser Leu Pro Thr Arg Ile Asn Ile Met Asn Leu
 405 410 415
 Cys Glu Ala Gly Leu Leu Ala Pro Arg Gln Val Ser Ala Asn Ser Glu
 420 425 430
 Gly Met Asp Asn Ile Leu Val Thr Trp Gln Pro Pro Arg Lys Asp Pro
 435 440 445

 Ser Ala Val Gln Glu Tyr Val Val Glu Trp Arg Glu Leu His Pro Gly
 450 455 460
 Gly Asp Thr Gln Val Pro Leu Asn Trp Leu Arg Ser Arg Pro Tyr Asn
 465 470 475 480
 Val Ser Ala Leu Ile Ser Glu Ile Pro Tyr Arg Val Ser Gln Asn Ser
 485 490 495
 His Pro Ile Asn Ser Leu Gln Pro Arg Val Thr Tyr Val Leu Trp Met
 500 505 510

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

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser
 370 375 380
 Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val
 385 390 395 400
 Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro
 405 410 415
 Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala
 420 425 430

Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala
 435 440 445
 Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
 450 455

- <210> 6
- <211> 369
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
 20 25 30

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

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

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

 Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
 225 230 235 240

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

Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His
 290 295 300
 Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro
 325 330 335
 Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn
 340 345 350

Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu
 355 360 365

Thr

- <210> 7
- <211> 551
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 7

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

<211> 538

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

465 470 475 480
 Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
 485 490 495
 Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp

 500 505 510
 Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
 515 520 525
 Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
 530 535
 <210> 9
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val
 1 5 10 15
 Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu

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

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

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

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

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

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

385 390 395 400
 Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Glu

 405 410 415
 Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His Ser Leu

 420 425 430
 Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser Tyr Met

 435 440 445
 Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu Ala Leu

 450 455 460
 Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro Val Thr

465 470 475 480
 Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser His Arg

 485 490 495
 Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Arg Phe

 500 505 510
 Trp Lys Asn Leu Leu Tyr Leu Met Pro Ala Lys Thr Val Lys Pro Gly

 515 520 525
 Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu Ser Glu Ser

 530 535 540
 <210> 10

<211> 599

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Cys Leu Gly Trp Ile Phe Leu Trp Leu Val Ala Gly Glu Arg

1 5 10 15

Ile Lys Gly Phe Asn Ile Ser Gly Cys Ser Thr Lys Lys Leu Leu Trp

20 25 30

Thr Tyr Ser Thr Arg Ser Glu Glu Glu Phe Val Leu Phe Cys Asp Leu

35 40 45

Pro Glu Pro Gln Lys Ser His Phe Cys His Arg Asn Arg Leu Ser Pro

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Ala Val Leu Ala Ala Ser Ala Leu Leu Tyr Arg His
 370 375 380
 Trp Ile Glu Ile Val Leu Leu Tyr Arg Thr Tyr Gln Ser Lys Asp Gln
 385 390 395 400
 Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asp Phe Asp Ala Phe Val Ser Tyr Ala Lys
 405 410 415
 Trp Ser Ser Phe Pro Ser Glu Ala Thr Ser Ser Leu Ser Glu Glu His
 420 425 430

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Cys Asp Ile Phe Val Phe Lys Val Leu Pro Glu Val Leu Glu
 405 410 415

Lys Gln Cys Gly Tyr Lys Leu Phe Ile Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val
 420 425 430

Gly Glu Asp Ile Val Glu Val Ile Asn Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg
 435 440 445

Arg Leu Ile Ile Ile Leu Val Arg Glu Thr Ser Gly Phe Ser Trp Leu
 450 455 460

Gly Gly Ser Ser Glu Glu Gln Ile Ala Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln
 465 470 475 480

Asp Gly Ile Lys Val Val Leu Leu Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr
 485 490 495

Glu Lys Met Pro Glu Ser Ile Lys Phe Ile Lys Gln Lys His Gly Ala
 500 505 510

Ile Arg Trp Ser Gly Asp Phe Thr Gln Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr
 515 520 525

Arg Phe Trp Lys Asn Val Arg Tyr His Met Pro Val Gln Arg Arg Ser
 530 535 540

Pro Ser Ser Lys His Gln Leu Leu Ser Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu
 545 550 555 560

Gln Arg Glu Ala His Val Pro Leu Gly
 565

<210> 12

<211> 570

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Thr Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu
 1 5 10 15

Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met
 20 25 30

Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro

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

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

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

 Leu Val Val Leu Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu
 465 470 475 480
 Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Arg Gly Asn Ile
 485 490 495
 Asn Val Ile Leu Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys
 500 505 510
 Glu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly
 515 520 525

 Glu Lys Ser Lys Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val

530 535 540
 Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln
 545 550 555 560
 Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val
 565 570
 <210> 13
 <211> 557
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Met Met Val Val Leu Leu Gly Ala Thr Thr Leu Val Leu Val Ala Val
 1 5 10 15

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

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

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

Glu Glu Arg Ile Glu Asn Ile Tyr Ser Arg His Lys Ile Tyr Lys Leu
 180 185 190
 Ser Pro Glu Thr Thr Tyr Cys Leu Lys Val Lys Ala Ala Leu Leu Thr
 195 200 205

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

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

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

 Val Tyr Cys Val Lys Ala Arg Ala His Thr Met Asp Glu Lys Leu Asn
 405 410 415
 Lys Ser Ser Val Phe Ser Asp Ala Val Cys Glu Lys Thr Lys Pro Gly

Val Val Lys Asn Cys Ala Asn Thr Thr Arg Ser Phe Cys Asp Leu Thr
 85 90 95
 Asp Glu Trp Arg Ser Thr His Glu Ala Tyr Val Thr Val Leu Glu Gly
 100 105 110
 Phe Ser Gly Asn Thr Thr Leu Phe Ser Cys Ser His Asn Phe Trp Leu
 115 120 125
 Ala Ile Asp Met Ser Phe Glu Pro Pro Glu Phe Glu Ile Val Gly Phe
 130 135 140
 Thr Asn His Ile Asn Val Met Val Lys Phe Pro Ser Ile Val Glu Glu
 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Phe Asp Leu Ser Leu Val Ile Glu Glu Gln Ser Glu Gly
 165 170 175
 Ile Val Lys Lys His Lys Pro Glu Ile Lys Gly Asn Met Ser Gly Asn
 180 185 190
 Phe Thr Tyr Ile Ile Asp Lys Leu Ile Pro Asn Thr Asn Tyr Cys Val
 195 200 205
 Ser Val Tyr Leu Glu His Ser Asp Glu Gln Ala Val Ile Lys Ser Pro
 210 215 220
 Leu Lys Cys Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Glu Ser Glu Ser Ala Glu
 225 230 235 240
 Ser Ala Lys Ile Gly Gly Ile Ile Thr Val Phe Leu Ile Ala Leu Val
 245 250 255
 Leu Thr Ser Thr Ile Val Thr Leu Lys Trp Ile Gly Tyr Ile Cys Leu
 260 265 270
 Arg Asn Ser Leu Pro Lys Val Leu Asn Phe His Asn Phe Leu Ala Trp
 275 280 285
 Pro Phe Pro Asn Leu Pro Pro Leu Glu Ala Met Asp Met Val Glu Val
 290 295 300
 Ile Tyr Ile Asn Arg Lys Lys Lys Val Trp Asp Tyr Asn Tyr Asp Asp
 305 310 315 320
 Glu Ser Asp Ser Asp Thr Glu Ala Ala Pro Arg Thr Ser Gly Gly Gly

325 330 335
 Tyr Thr Met His Gly Leu Thr Val Arg Pro Leu Gly Gln Ala Ser Ala

340 345 350
 Thr Ser Thr Glu Ser Gln Leu Ile Asp Pro Glu Ser Glu Glu Glu Pro

355 360 365
 Asp Leu Pro Glu Val Asp Val Glu Leu Pro Thr Met Pro Lys Asp Ser

370 375 380
 Pro Gln Gln Leu Glu Leu Leu Ser Gly Pro Cys Glu Arg Arg Lys Ser

385 390 395 400
 Pro Leu Gln Asp Pro Phe Pro Glu Glu Asp Tyr Ser Ser Thr Glu Gly

405 410 415
 Ser Gly Gly Arg Ile Thr Phe Asn Val Asp Leu Asn Ser Val Phe Leu

420 425 430
 Arg Val Leu Asp Asp Glu Asp Ser Asp Asp Leu Glu Ala Pro Leu Met

435 440 445
 Leu Ser Ser His Leu Glu Glu Met Val Asp Pro Glu Asp Pro Asp Asn

450 455 460
 Val Gln Ser Asn His Leu Leu Ala Ser Gly Glu Gly Thr Gln Pro Thr

465 470 475 480
 Phe Pro Ser Pro Ser Ser Glu Gly Leu Trp Ser Glu Asp Ala Pro Ser

485 490 495
 Asp Gln Ser Asp Thr Ser Glu Ser Asp Val Asp Leu Gly Asp Gly Tyr

500 505 510
 Ile Met Arg

515

<210> 15

<211> 575

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Trp Ser Leu Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ile Ala Leu Pro Leu Ser

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

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

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

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

Asn Thr Asn Leu Arg Cys Trp Arg Val Asn Asn Thr Leu Val Asp Asp
 260 265 270

Tyr Tyr Asp Glu Ser Lys Arg Ile Arg Glu Gly Val Glu Thr His Val
 275 280 285

Ser Phe Arg Glu His Asn Leu Tyr Thr Val Asn Ile Thr Phe Leu Glu
 290 295 300

Val Lys Met Glu Asp Tyr Gly Leu Pro Phe Met Cys His Ala Gly Val
 305 310 315 320

Ser Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Gln Leu Pro Ala Pro Asp Phe Arg Ala
 325 330 335

Tyr Leu Ile Gly Gly Leu Ile Ala Leu Val Ala Val Ala Val Ser Val
 340 345 350

Val Tyr Ile Tyr Asn Ile Phe Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg
 355 360 365

Ser Ala Phe His Ser Thr Glu Thr Ile Val Asp Gly Lys Leu Tyr Asp
 370 375 380

Ala Tyr Val Leu Tyr Pro Lys Pro His Lys Glu Ser Gln Arg His Ala
 385 390 395 400

Val Asp Ala Leu Val Leu Asn Ile Leu Pro Glu Val Leu Glu Arg Gln
 405 410 415

Cys Gly Tyr Lys Leu Phe Ile Phe Gly Arg Asp Glu Phe Pro Gly Gln
 420 425 430

Ala Val Ala Asn Val Ile Asp Glu Asn Val Lys Leu Cys Arg Arg Leu
 435 440 445

Ile Val Ile Val Val Pro Glu Ser Leu Gly Phe Gly Leu Leu Lys Asn
 450 455 460

Leu Ser Glu Glu Gln Ile Ala Val Tyr Ser Ala Leu Ile Gln Asp Gly
 465 470 475 480

Met Lys Val Ile Leu Ile Glu Leu Glu Lys Ile Glu Asp Tyr Thr Val
 485 490 495

Met Pro Glu Ser Ile Gln Tyr Ile Lys Gln Lys His Gly Ala Ile Arg

500 505 510
 Trp His Gly Asp Phe Thr Glu Gln Ser Gln Cys Met Lys Thr Lys Phe
 515 520 525

Trp Lys Thr Val Arg Tyr His Met Pro Pro Arg Arg Cys Arg Pro Phe
 530 535 540
 Pro Pro Val Gln Leu Leu Gln His Thr Pro Cys Tyr Arg Thr Ala Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu Leu Gly Ser Arg Arg Lys Lys Cys Thr Leu Thr Thr Gly
 565 570 575

<210> 16
 <211> 786
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Met Thr Ser Ile Phe His Phe Ala Ile Ile Phe Met Leu Ile Leu Gln

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

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

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

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

 260 265 270
 Val Trp Tyr Phe Ser Ile Ser Asn Val Lys Leu Gln Gly Gln Leu Asp
 275 280 285
 Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ser Gly Thr Ser Leu Lys Ala Leu Ser Ile
 290 295 300
 His Gln Val Val Ser Asp Val Phe Gly Phe Pro Gln Ser Tyr Ile Tyr
 305 310 315 320
 Glu Ile Phe Ser Asn Met Asn Ile Lys Asn Phe Thr Val Ser Gly Thr

 325 330 335
 Arg Met Val His Met Leu Cys Pro Ser Lys Ile Ser Pro Phe Leu His
 340 345 350
 Leu Asp Phe Ser Asn Asn Leu Leu Thr Asp Thr Val Phe Glu Asn Cys
 355 360 365
 Gly His Leu Thr Glu Leu Glu Thr Leu Ile Leu Gln Met Asn Gln Leu
 370 375 380

Lys Glu Leu Ser Lys Ile Ala Glu Met Thr Thr Gln Met Lys Ser Leu

 385 390 395 400
 Gln Gln Leu Asp Ile Ser Gln Asn Ser Val Ser Tyr Asp Glu Lys Lys
 405 410 415
 Gly Asp Cys Ser Trp Thr Lys Ser Leu Leu Ser Leu Asn Met Ser Ser
 420 425 430
 Asn Ile Leu Thr Asp Thr Ile Phe Arg Cys Leu Pro Pro Arg Ile Lys
 435 440 445
 Val Leu Asp Leu His Ser Asn Lys Ile Lys Ser Ile Pro Lys Gln Val

 450 455 460
 Val Lys Leu Glu Ala Leu Gln Glu Leu Asn Val Ala Phe Asn Ser Leu
 465 470 475 480
 Thr Asp Leu Pro Gly Cys Gly Ser Phe Ser Ser Leu Ser Val Leu Ile
 485 490 495
 Ile Asp His Asn Ser Val Ser His Pro Ser Ala Asp Phe Phe Gln Ser
 500 505 510
 Cys Gln Lys Met Arg Ser Ile Lys Ala Gly Asp Asn Pro Phe Gln Cys

 515 520 525
 Thr Cys Glu Leu Gly Glu Phe Val Lys Asn Ile Asp Gln Val Ser Ser
 530 535 540
 Glu Val Leu Glu Gly Trp Pro Asp Ser Tyr Lys Cys Asp Tyr Pro Glu
 545 550 555 560
 Ser Tyr Arg Gly Thr Leu Leu Lys Asp Phe His Met Ser Glu Leu Ser
 565 570 575
 Cys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val Thr Ile Val Ala Thr Met Leu Val

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

625 630 635 640
 Ile Ser Tyr Ser Gly His Asp Ser Phe Trp Val Lys Asn Glu Leu Leu

645 650 655
 Pro Asn Leu Glu Lys Glu Gly Met Gln Ile Cys Leu His Glu Arg Asn

660 665 670
 Phe Val Pro Gly Lys Ser Ile Val Glu Asn Ile Ile Thr Cys Ile Glu

675 680 685
 Lys Ser Tyr Lys Ser Ile Phe Val Leu Ser Pro Asn Phe Val Gln Ser

690 695 700
 Glu Trp Cys His Tyr Glu Leu Tyr Phe Ala His His Asn Leu Phe His

705 710 715 720
 Glu Gly Ser Asn Ser Leu Ile Leu Ile Leu Leu Glu Pro Ile Pro Gln

725 730 735
 Tyr Ser Ile Pro Ser Ser Tyr His Lys Leu Lys Ser Leu Met Ala Arg

740 745 750
 Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Pro Lys Glu Lys Ser Lys Arg Gly Leu Phe

755 760 765
 Trp Ala Asn Leu Arg Ala Ala Ile Asn Ile Lys Leu Thr Glu Gln Ala

770 775 780
 Lys Lys

785

<210> 17

<211> 784

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Pro His Thr Leu Trp Met Val Trp Val Leu Gly Val Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Leu Ser Lys Glu Glu Ser Ser Asn Gln Ala Ser Leu Ser Cys Asp Arg
 20 25 30

Asn Gly Ile Cys Lys Gly Ser Ser Gly Ser Leu Asn Ser Ile Pro Ser

Leu Asn Gly Val Gly Asn Phe Arg Ala Ser Asp Asn Asp Arg Val Ile
 290 295 300

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

 Glu Asn Leu Met Val Glu Glu Tyr Leu Lys Asn Ser Ala Cys Glu Asp
 370 375 380
 Ala Trp Pro Ser Leu Gln Thr Leu Ile Leu Arg Gln Asn His Leu Ala
 385 390 395 400
 Ser Leu Glu Lys Thr Gly Glu Thr Leu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Thr
 405 410 415
 Asn Ile Asp Ile Ser Lys Asn Ser Phe His Ser Met Pro Glu Thr Cys
 420 425 430

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

 Leu Leu Pro Met Leu Leu Val Leu Lys Ile Ser Arg Asn Ala Ile Thr
 500 505 510
 Thr Phe Ser Lys Glu Gln Leu Asp Ser Phe His Thr Leu Lys Thr Leu
 515 520 525
 Glu Ala Gly Gly Asn Asn Phe Ile Cys Ser Cys Glu Phe Leu Ser Phe

<210> 18

<211> 904

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Arg Gln Thr Leu Pro Cys Ile Tyr Phe Trp Gly Gly Leu Leu Pro

1 5 10 15

Phe Gly Met Leu Cys Ala Ser Ser Thr Thr Lys Cys Thr Val Ser His

20 25 30

Glu Val Ala Asp Cys Ser His Leu Lys Leu Thr Gln Val Pro Asp Asp

35 40 45

Leu Pro Thr Asn Ile Thr Val Leu Asn Leu Thr His Asn Gln Leu Arg

50 55 60

Arg Leu Pro Ala Ala Asn Phe Thr Arg Tyr Ser Gln Leu Thr Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Leu Pro Met Leu Lys Val Leu Asn Leu Gln His Asn Glu Leu Ser

100 105 110

Gln Leu Ser Asp Lys Thr Phe Ala Phe Cys Thr Asn Leu Thr Glu Leu

115 120 125

His Leu Met Ser Asn Ser Ile Gln Lys Ile Lys Asn Asn Pro Phe Val

130 135 140

Lys Gln Lys Asn Leu Ile Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ile Lys Glu Phe Ser Pro Gly Cys Phe His Ala Ile Gly Arg Leu Phe
 210 215 220
 Gly Leu Phe Leu Asn Asn Val Gln Leu Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys
 225 230 235 240
 Leu Cys Leu Glu Leu Ala Asn Thr Ser Ile Arg Asn Leu Ser Leu Ser
 245 250 255
 Asn Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ser Asn Thr Thr Phe Leu Gly Leu Lys
 260 265 270
 Trp Thr Asn Leu Thr Met Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Asn Val
 275 280 285
 Val Gly Asn Asp Ser Phe Ala Trp Leu Pro Gln Leu Glu Tyr Phe Phe
 290 295 300
 Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln His Leu Phe Ser His Ser Leu His Gly
 305 310 315 320
 Leu Phe Asn Val Arg Tyr Leu Asn Leu Lys Arg Ser Phe Thr Lys Gln
 325 330 335
 Ser Ile Ser Leu Ala Ser Leu Pro Lys Ile Asp Asp Phe Ser Phe Gln
 340 345 350
 Trp Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Asn Met Glu Asp Asn Asp Ile Pro
 355 360 365
 Gly Ile Lys Ser Asn Met Phe Thr Gly Leu Ile Asn Leu Lys Tyr Leu
 370 375 380
 Ser Leu Ser Asn Ser Phe Thr Ser Leu Arg Thr Leu Thr Asn Glu Thr
 385 390 395 400
 Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu His Ile Leu Asn Leu Thr Lys
 405 410 415
 Asn Lys Ile Ser Lys Ile Glu Ser Asp Ala Phe Ser Trp Leu Gly His
 420 425 430
 Leu Glu Val Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Gly Gln Glu Leu Thr
 435 440 445
 Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu Ser

450 455 460
 Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Arg Asn Ser Phe Ala Leu Val Pro

 465 470 475 480
 Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp
 485 490 495
 Ser Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu Asp
 500 505 510
 Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly
 515 520 525
 Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg

 530 535 540
 Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Ile Tyr Phe Leu Lys Gly
 545 550 555 560
 Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu
 565 570 575
 Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Lys Ile Ile Asp
 580 585 590
 Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asn Asn

 595 600 605
 Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser
 610 615 620
 Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Thr Glu Leu
 625 630 635 640
 Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp
 645 650 655
 Phe Val Asn Trp Ile Asn Glu Thr His Thr Asn Ile Pro Glu Leu Ser

 660 665 670
 Ser His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro Pro His Tyr His Gly Phe Pro Val
 675 680 685
 Arg Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu Leu
 690 695 700

Met Met Ser Ala Ser Arg Leu Ala Gly Thr Leu Ile Pro Ala Met Ala

1 5 10 15

Phe Leu Ser Cys Val Arg Pro Glu Ser Trp Glu Pro Cys Val Glu Val

 20 25 30

Val Pro Asn Ile Thr Tyr Gln Cys Met Glu Leu Asn Phe Tyr Lys Ile

 35 40 45

Pro Asp Asn Leu Pro Phe Ser Thr Lys Asn Leu Asp Leu Ser Phe Asn

 50 55 60

Pro Leu Arg His Leu Gly Ser Tyr Ser Phe Phe Ser Phe Pro Glu Leu

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Tyr Gln Ser Leu Ser His Leu Ser Thr Leu Ile Leu Thr Gly Asn

 100 105 110

Pro Ile Gln Ser Leu Ala Leu Gly Ala Phe Ser Gly Leu Ser Ser Leu

 115 120 125

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

130 135 140

Pro Ile Gly His Leu Lys Thr Leu Lys Glu Leu Asn Val Ala His Asn

145 150 155 160

Leu Ile Gln Ser Phe Lys Leu Pro Glu Tyr Phe Ser Asn Leu Thr Asn

 165 170 175

Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Ser Asn Lys Ile Gln Ser Ile Tyr Cys

 180 185 190

Thr Asp Leu Arg Val Leu His Gln Met Pro Leu Leu Asn Leu Ser Leu

195 200 205

Asp Leu Ser Leu Asn Pro Met Asn Phe Ile Gln Pro Gly Ala Phe Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Asn Val Met Lys Thr Cys Ile Gln Gly Leu Ala Gly Leu Glu Val His

Asn Leu Thr Phe Leu Asp Leu Ser Gln Cys Gln Leu Glu Gln Leu Ser
 500 505 510
 Pro Thr Ala Phe Asn Ser Leu Ser Ser Leu Gln Val Leu Asn Met Ser
 515 520 525
 His Asn Asn Phe Phe Ser Leu Asp Thr Phe Pro Tyr Lys Cys Leu Asn
 530 535 540
 Ser Leu Gln Val Leu Asp Tyr Ser Leu Asn His Ile Met Thr Ser Lys
 545 550 555 560
 Lys Gln Glu Leu Gln His Phe Pro Ser Ser Leu Ala Phe Leu Asn Leu
 565 570 575
 Thr Gln Asn Asp Phe Ala Cys Thr Cys Glu His Gln Ser Phe Leu Gln
 580 585 590
 Trp Ile Lys Asp Gln Arg Gln Leu Leu Val Glu Val Glu Arg Met Glu
 595 600 605
 Cys Ala Thr Pro Ser Asp Lys Gln Gly Met Pro Val Leu Ser Leu Asn
 610 615 620
 Ile Thr Cys Gln Met Asn Lys Thr Ile Ile Gly Val Ser Val Leu Ser
 625 630 635 640
 Val Leu Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys Phe Tyr Phe
 645 650 655
 His Leu Met Leu Leu Ala Gly Cys Ile Lys Tyr Gly Arg Gly Glu Asn
 660 665 670
 Ile Tyr Asp Ala Phe Val Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Glu Asp Trp Val
 675 680 685
 Arg Asn Glu Leu Val Lys Asn Leu Glu Glu Gly Val Pro Pro Phe Gln
 690 695 700
 Leu Cys Leu His Tyr Arg Asp Phe Ile Pro Gly Val Ala Ile Ala Ala
 705 710 715 720
 Asn Ile Ile His Glu Gly Phe His Lys Ser Arg Lys Val Ile Val Val
 725 730 735
 Val Ser Gln His Phe Ile Gln Ser Arg Trp Cys Ile Phe Glu Tyr Glu

740 745 750
 Ile Ala Gln Thr Trp Gln Phe Leu Ser Ser Arg Ala Gly Ile Ile Phe

755 760 765
 Ile Val Leu Gln Lys Val Glu Lys Thr Leu Leu Arg Gln Gln Val Glu

770 775 780
 Leu Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Glu Asp Ser

785 790 795 800
 Val Leu Gly Arg His Ile Phe Trp Arg Arg Leu Arg Lys Ala Leu Leu

805 810 815
 Asp Gly Lys Ser Trp Asn Pro Glu Gly Thr Val Gly Thr Gly Cys Asn

820 825 830
 Trp Gln Glu Ala Thr Ser Ile

835

<210> 20

<211> 858

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Gly Asp His Leu Asp Leu Leu Leu Gly Val Val Leu Met Ala Gly
 1 5 10 15

Pro Val Phe Gly Ile Pro Ser Cys Ser Phe Asp Gly Arg Ile Ala Phe
 20 25 30

Tyr Arg Phe Cys Asn Leu Thr Gln Val Pro Gln Val Leu Asn Thr Thr
 35 40 45

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

50 55 60

Ser Phe Pro Phe Leu Glu Gln Leu Gln Leu Leu Glu Leu Gly Ser Gln
 65 70 75 80

Tyr Thr Pro Leu Thr Ile Asp Lys Glu Ala Phe Arg Asn Leu Pro Asn
 85 90 95

Leu Arg Ile Leu Asp Leu Gly Ser Ser Lys Ile Tyr Phe Leu His Pro
 100 105 110

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

Asn Phe Val Gln Ser Glu Trp Cys His Tyr Glu Leu Tyr Phe Ala His
 705 710 715 720
 His Asn Leu Phe His Glu Gly Ser Asn Asn Leu Ile Leu Ile Leu Leu

 725 730 735
 Glu Pro Ile Pro Gln Asn Ser Ile Pro Asn Lys Tyr His Lys Leu Lys
 740 745 750
 Ala Leu Met Thr Gln Arg Thr Tyr Leu Gln Trp Pro Lys Glu Lys Ser
 755 760 765
 Lys Arg Gly Leu Phe Trp Ala Asn Ile Arg Ala Ala Phe Asn Met Lys
 770 775 780
 Leu Thr Leu Val Thr Glu Asn Asn Asp Val Lys Ser

 785 790 795
 <210> 22
 <211> 1049
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Met Val Phe Pro Met Trp Thr Leu Lys Arg Gln Ile Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15
 Asn Ile Ile Leu Ile Ser Lys Leu Leu Gly Ala Arg Trp Phe Pro Lys
 20 25 30
 Thr Leu Pro Cys Asp Val Thr Leu Asp Val Pro Lys Asn His Val Ile
 35 40 45

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Thr Ser Arg Thr Met Glu Ser Glu Ser Leu Arg Thr Leu
 610 615 620

Glu Phe Arg Gly Asn His Leu Asp Val Leu Trp Arg Glu Gly Asp Asn
 625 630 635 640

Arg Tyr Leu Gln Leu Phe Lys Asn Leu Leu Lys Leu Glu Glu Leu Asp
 645 650 655

Ile Ser Lys Asn Ser Leu Ser Phe Leu Pro Ser Gly Val Phe Asp Gly
 660 665 670

Met Pro Pro Asn Leu Lys Asn Leu Ser Leu Ala Lys Asn Gly Leu Lys
 675 680 685

Ser Phe Ser Trp Lys Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asn Leu Glu Thr Leu
 690 695 700

Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Thr Thr Val Pro Glu Arg Leu Ser Asn
 705 710 715 720

Cys Ser Arg Ser Leu Lys Asn Leu Ile Leu Lys Asn Asn Gln Ile Arg
 725 730 735

Ser Leu Thr Lys Tyr Phe Leu Gln Asp Ala Phe Gln Leu Arg Tyr Leu
 740 745 750

Asp Leu Ser Ser Asn Lys Ile Gln Met Ile Gln Lys Thr Ser Phe Pro
 755 760 765

Glu Asn Val Leu Asn Asn Leu Lys Met Leu Leu Leu His His Asn Arg
 770 775 780

Phe Leu Cys Thr Cys Asp Ala Val Trp Phe Val Trp Trp Val Asn His
 785 790 795 800

Thr Glu Val Thr Ile Pro Tyr Leu Ala Thr Asp Val Thr Cys Val Gly
 805 810 815

Pro Gly Ala His Lys Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Asp Leu Tyr Thr
 820 825 830

Cys Glu Leu Asp Leu Thr Asn Leu Ile Leu Phe Ser Leu Ser Ile Ser
 835 840 845

Val Ser Leu Phe Leu Met Val Met Met Thr Ala Ser His Leu Tyr Phe

850 855 860
 Trp Asp Val Trp Tyr Ile Tyr His Phe Cys Lys Ala Lys Ile Lys Gly
 865 870 875 880

 Tyr Gln Arg Leu Ile Ser Pro Asp Cys Cys Tyr Asp Ala Phe Ile Val
 885 890 895
 Tyr Asp Thr Lys Asp Pro Ala Val Thr Glu Trp Val Leu Ala Glu Leu
 900 905 910
 Val Ala Lys Leu Glu Asp Pro Arg Glu Lys His Phe Asn Leu Cys Leu
 915 920 925
 Glu Glu Arg Asp Trp Leu Pro Gly Gln Pro Val Leu Glu Asn Leu Ser
 930 935 940

 Gln Ser Ile Gln Leu Ser Lys Lys Thr Val Phe Val Met Thr Asp Lys
 945 950 955 960
 Tyr Ala Lys Thr Glu Asn Phe Lys Ile Ala Phe Tyr Leu Ser His Gln
 965 970 975
 Arg Leu Met Asp Glu Lys Val Asp Val Ile Ile Leu Ile Phe Leu Glu
 980 985 990
 Lys Pro Phe Gln Lys Ser Lys Phe Leu Gln Leu Arg Lys Arg Leu Cys
 995 1000 1005

 Gly Ser Ser Val Leu Glu Trp Pro Thr Asn Pro Gln Ala His Pro
 1010 1015 1020
 Tyr Phe Trp Gln Cys Leu Lys Asn Ala Leu Ala Thr Asp Asn His
 1025 1030 1035
 Val Ala Tyr Ser Gln Val Phe Lys Glu Thr Val
 1040 1045
 <210> 23
 <211> 1041
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Met Glu Asn Met Phe Leu Gln Ser Ser Met Leu Thr Cys Ile Phe Leu

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

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

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

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

Cys Pro Arg Cys Phe Asn Ala Pro Phe Pro Cys Val Pro Cys Asp Gly
 260 265 270

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

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

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

 Ser Asn Phe Tyr His Phe Thr Arg Pro Leu Ile Lys Pro Gln Cys Ala
 465 470 475 480
 Ala Tyr Gly Lys Ala Leu Asp Leu Ser Leu Asn Ser Ile Phe Phe Ile
 485 490 495
 Gly Pro Asn Gln Phe Glu Asn Leu Pro Asp Ile Ala Cys Leu Asn Leu

Lys Ser Ala Leu Glu Thr Lys Thr Thr Thr Lys Leu Ser Met Leu Glu
 755 760 765
 Leu His Gly Asn Pro Phe Glu Cys Thr Cys Asp Ile Gly Asp Phe Arg
 770 775 780

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

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

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

 Phe Ile Leu Leu Glu Pro Val Leu Gln His Ser Gln Tyr Leu Arg Leu
 980 985 990
 Arg Gln Arg Ile Cys Lys Ser Ser Ile Leu Gln Trp Pro Asp Asn Pro

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

Val Leu Arg Leu Arg Asp Asn Tyr Leu Ala Phe Phe Lys Trp Trp Ser
 660 665 670
 Leu His Phe Leu Pro Lys Leu Glu Val Leu Asp Leu Ala Gly Asn Gln
 675 680 685
 Leu Lys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Leu Pro Ala Gly Thr Arg Leu Arg
 690 695 700
 Arg Leu Asp Val Ser Cys Asn Ser Ile Ser Phe Val Ala Pro Gly Phe
 705 710 715 720
 Phe Ser Lys Ala Lys Glu Leu Arg Glu Leu Asn Leu Ser Ala Asn Ala
 725 730 735
 Leu Lys Thr Val Asp His Ser Trp Phe Gly Pro Leu Ala Ser Ala Leu
 740 745 750
 Gln Ile Leu Asp Val Ser Ala Asn Pro Leu His Cys Ala Cys Gly Ala
 755 760 765
 Ala Phe Met Asp Phe Leu Leu Glu Val Gln Ala Ala Val Pro Gly Leu
 770 775 780
 Pro Ser Arg Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Leu Ser
 785 790 795 800
 Ile Phe Ala Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Ala Leu Ser Trp
 805 810 815
 Asp Cys Phe Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Leu Gly Leu Gly Val
 820 825 830
 Pro Met Leu His His Leu Cys Gly Trp Asp Leu Trp Tyr Cys Phe His
 835 840 845
 Leu Cys Leu Ala Trp Leu Pro Trp Arg Gly Arg Gln Ser Gly Arg Asp
 850 855 860
 Glu Asp Ala Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Thr Gln
 865 870 875 880
 Ser Ala Val Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Gly Gln Leu Glu
 885 890 895
 Glu Cys Arg Gly Arg Trp Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp

His Asn Arg Ile Gln Gln Leu Asp Leu Lys Thr Phe Glu Phe Asn Lys
 85 90 95
 Glu Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asn Arg Leu Lys Ser Val Thr
 100 105 110
 Trp Tyr Leu Leu Ala Gly Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Ser Phe Asn Asp
 115 120 125
 Phe Asp Thr Met Pro Ile Cys Glu Glu Ala Gly Asn Met Ser His Leu
 130 135 140
 Glu Ile Leu Gly Leu Ser Gly Ala Lys Ile Gln Lys Ser Asp Phe Gln
 145 150 155 160
 Lys Ile Ala His Leu His Leu Asn Thr Val Phe Leu Gly Phe Arg Thr
 165 170 175
 Leu Pro His Tyr Glu Glu Gly Ser Leu Pro Ile Leu Asn Thr Thr Lys
 180 185 190
 Leu His Ile Val Leu Pro Met Asp Thr Asn Phe Trp Val Leu Leu Arg
 195 200 205
 Asp Gly Ile Lys Thr Ser Lys Ile Leu Glu Met Thr Asn Ile Asp Gly
 210 215 220
 Lys Ser Gln Phe Val Ser Tyr Glu Met Gln Arg Asn Leu Ser Leu Glu
 225 230 235 240
 Asn Ala Lys Thr Ser Val Leu Leu Leu Asn Lys Val Asp Leu Leu Trp
 245 250 255
 Asp Asp Leu Phe Leu Ile Leu Gln Phe Val Trp His Thr Ser Val Glu
 260 265 270
 His Phe Gln Ile Arg Asn Val Thr Phe Gly Gly Lys Ala Tyr Leu Asp
 275 280 285
 His Asn Ser Phe Asp Tyr Ser Asn Thr Val Met Arg Thr Ile Lys Leu
 290 295 300
 Glu His Val His Phe Arg Val Phe Tyr Ile Gln Gln Asp Lys Ile Tyr
 305 310 315 320
 Leu Leu Leu Thr Lys Met Asp Ile Glu Asn Leu Thr Ile Ser Asn Ala

Ala Leu Leu Ile Val Thr Ile Val Val Ile Met Leu Val Leu Gly Leu
 580 585 590

Ala Val Ala Phe Cys Cys Leu His Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Leu Arg
 595 600 605

Met Leu Gly Gln Cys Thr Gln Thr Trp His Arg Val Arg Lys Thr Thr
 610 615 620

Gln Glu Gln Leu Lys Arg Asn Val Arg Phe His Ala Phe Ile Ser Tyr
 625 630 635 640

Ser Glu His Asp Ser Leu Trp Val Lys Asn Glu Leu Ile Pro Asn Leu
 645 650 655

Glu Lys Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ile Cys Leu Tyr Glu Ser Tyr Phe
 660 665 670

Asp Pro Gly Lys Ser Ile Ser Glu Asn Ile Val Ser Phe Ile Glu Lys
 675 680 685

Ser Tyr Lys Ser Ile Phe Val Leu Ser Pro Asn Phe Val Gln Asn Glu
 690 695 700

Trp Cys His Tyr Glu Phe Tyr Phe Ala His His Asn Leu Phe His Glu
 705 710 715 720

Asn Ser Asp His Ile Ile Leu Ile Leu Leu Glu Pro Ile Pro Phe Tyr
 725 730 735

Cys Ile Pro Thr Arg Tyr His Lys Leu Lys Ala Leu Leu Glu Lys Lys
 740 745 750

Ala Tyr Leu Glu Trp Pro Lys Asp Arg Arg Lys Cys Gly Leu Phe Trp
 755 760 765

Ala Asn Leu Arg Ala Ala Ile Asn Val Asn Val Leu Ala Thr Arg Glu
 770 775 780

Met Tyr Glu Leu Gln Thr Phe Thr Glu Leu Asn Glu Glu Ser Arg Gly
 785 790 795 800

Ser Thr Ile Ser Leu Met Arg Thr Asp Cys Leu
 805 810

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<400> 26

Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr
 20 25 30

Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys
 35 40 45

Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys
 50 55 60

Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg
 65 70 75 80

Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr
 85 90 95

Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro
 100 105 110

Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Trp Leu
 115 120 125

Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu Leu Val Gly
 130 135 140

Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His Leu Cys Pro
 145 150 155 160

Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe Pro Gly Gly
 165 170 175

Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln Glu Glu Ala
 180 185 190

Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp Lys Gly Glu
 195 200 205

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

210 215 220
 Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp Arg Cys Lys
 225 230 235 240

Ala Lys Met

<210> 27

<211> 406

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - synthesized fusion protein

<400> 27

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
 1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
 20 25 30

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 35 40 45

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

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
 65 70 75 80

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
 85 90 95

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
 100 105 110

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
 115 120 125

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
 130 135 140

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Val Ile Phe Gln Trp Met Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys

<210> 28

<211> 671

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<400> 28

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

1 5 10 15
Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val

 20 25 30
Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro

 35 40 45
Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln

 50 55 60
Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro

65 70 75 80
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr

 85 90 95
Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile

 100 105 110
Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys

 115 120 125
Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn

 130 135 140
Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu

145 150 155 160
Leu Leu Val Ile Phe Gln Trp Met Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys

 165 170 175
Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln

 180 185 190
Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys

450 455 460

Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly

465 470 475 480

Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn

485 490 495

Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe

500 505 510

Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys

515 520 525

Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Lys

530 535 540

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

545 550 555 560

Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr

565 570 575

Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr

580 585 590

Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp

595 600 605

Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp Arg Cys Lys Ala Lys Met

660 665 670

<210> 29

<211> 1183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<400> 29

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr

50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala

85 90 95

Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Arg Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

180 185 190

Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Gly Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala

195 200 205

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn

210 215 220

Thr Val Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Thr Ile Asp Ala Arg Arg Phe Asp
 245 250 255
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr

465 470 475 480
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Glu Gly
 485 490 495
 Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 500 505 510
 Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
 515 520 525
 Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val

 530 535 540
 Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 545 550 555 560
 Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln
 565 570 575
 Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
 580 585 590
 Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr

 595 600 605
 Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
 610 615 620
 Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
 625 630 635 640
 Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
 645 650 655
 Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu

 660 665 670
 Leu Leu Val Ile Phe Gln Trp Met Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys
 675 680 685
 Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln
 690 695 700
 Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg
 705 710 715 720

Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile
 725 730 735
 Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp
 740 745 750
 Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro Leu Val Ile Ser Glu Val Leu His
 755 760 765
 Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln
 770 775 780
 Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met
 785 790 795 800
 His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro Pro Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ser
 805 810 815
 Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp
 820 825 830
 Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly
 835 840 845
 Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu
 850 855 860
 Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro
 865 870 875 880
 Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu
 885 890 895
 Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg
 900 905 910
 Cys Asp Ser Leu Met Leu Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
 915 920 925
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Glu Ala Ala
 930 935 940
 Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala
 945 950 955 960
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 30

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Xaa Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

 20 25 30

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys

 85 90 95

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

 100 105 110

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

 115 120 125

Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro

 130 135 140

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly

Gly Ile Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu
 450 455 460

Ala Ala Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala
 465 470 475 480

Asn Ser Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln
 485 490 495

Leu Pro Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro
 500 505 510

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

Arg His Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln
 530 535 540

Gly His Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro
 545 550 555 560

Pro Pro Pro Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu
 565 570 575

Tyr Lys Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro
 580 585 590

Ala Cys Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp
 595 600 605

Gly Tyr Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro
 610 615 620

Leu Ala Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser
 625 630 635 640

Val Phe Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp
 645 650 655

Lys Leu Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
 660 665 670

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 675 680 685

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro

<210> 31

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<400> 31

Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val

1 5 10 15

Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr

20 25 30

Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys

35 40 45

Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys

50 55 60

Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys Val Tyr

130 135 140

Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu

145 150 155 160

Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly

165 170 175

Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg

180 185 190

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

195 200 205

Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro

210 215 220

Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

225 230

<210> 32

<211> 386

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<400> 32

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val

20 25 30

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro

35 40 45

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln

50 55 60

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro

65 70 75 80

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr

85 90 95

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile

100 105 110

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys

115 120 125

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Leu Val Ile Phe Gln Pro Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<400> 33

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
 1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
 20 25 30

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 35 40 45

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

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
 65 70 75 80

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
 85 90 95

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
 100 105 110

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
 115 120 125

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
 130 135 140

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Val Ile Phe Gln Pro Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser
 165 170 175

Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys
 180 185 190

Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys
 195 200 205

Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser
 210 215 220

465 470 475 480
 Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro
 485 490 495
 Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp
 500 505 510
 His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly
 515 520 525

 Leu Gly Pro Val Glu Leu Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu
 530 535 540
 Ile Ile Ser Leu Leu Cys Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro
 545 550 555 560
 Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser
 580 585 590

 Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro
 595 600 605
 Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn
 610 615 620
 Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu
 625 630 635 640
 Thr

<210> 34

<211> 1153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<400> 34

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Glu Gly
 485 490 495

Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 500 505 510

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln
 770 775 780

Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe
 785 790 795 800

Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys
 805 810 815

Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser
 820 825 830

Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly
 835 840 845

Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile
 850 855 860

Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu
 865 870 875 880

Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln
 885 890 895

Asn Gln Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly
 900 905 910

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro
 915 920 925

Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 930 935 940

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
 945 950 955 960

Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val
 965 970 975

Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile
 980 985 990

Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro
 995 1000 1005

Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln

1010 1015 1020

Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Lys Ser Ser

1025 1030 1035

Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Val Val Ile Ser Val Gly Ser

1040 1045 1050

Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys Val Tyr Phe Trp Leu Glu

1055 1060 1065

Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu

1070 1075 1080

Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser

1085 1090 1095

Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala

1130 1135 1140

Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

1145 1150

<210> 35

<211> 907

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Synthesized fusion protein

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 35

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Xaa Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu Trp Thr Arg Ile Ala Ser

275 280 285

Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val

290 295 300

Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys

305 310 315 320

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn

325 330 335

Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala

340 345 350

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His

355 360 365

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser

370 375 380

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe

385 390 395 400

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser

405 410 415

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

420 425 430

Pro Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu

435 440 445

Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile

450 455 460

Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys

465 470 475 480

Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe

485 490 495

Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu

500 505 510

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

Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu
 770 775 780

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

785 790 795 800

Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
 805 810 815

Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys
 820 825 830

Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp
 835 840 845

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

850 855 860

Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
 865 870 875 880

Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
 885 890 895

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 900 905

<210> 36

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 36

Gly Gly Gly

1

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 37

Asp Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 38

Thr Gly Glu Lys Pro

1 5

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 39

Gly Gly Arg Arg

1

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 41

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp

1 5 10

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 42

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

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 43

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 44

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro

1 5

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 45

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

1 5 10

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary linker sequence

<400> 46

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

1 5 10 15

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cleavage sequence by TEV protease

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = Gly or Ser

<400> 47

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cleavage sequence by TEV protease

<400> 48

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cleavage sequence by TEV protease

<400> 49

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1 5

<210> 50

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 50

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210

> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 51

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 52

Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

1 5 10

<210> 53

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 53

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

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 54

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 55

Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

1 5 10

<210> 56

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala

1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

 20 25

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 60

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

 20

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 61

Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

1 5 10

<210> 62

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 62

Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 63

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site
 <400> 63
 Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
 1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site
 <400> 64

Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 1 5 10

<210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site
 <400> 65

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

Pro

<210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site
 <400> 66

Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 67

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 67

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 68

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 68

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro

1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys

20

25

30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr

35

40

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 69

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

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 70

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 70

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val

1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

20 25 30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

35 40

<210> 71

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Self-cleaving polypeptide comprising 2A site

<400> 71

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro

<210> 72

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus Kozak sequence

<400> 72

gccrccatgg

10

<210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary rule for determining light chain CDR-L3 motif

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 73

Phe Gly Xaa Gly

1

<210> 74

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary rule for determining heavy chain CDR-H1 motif

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(4)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 74

Cys Xaa Xaa Xaa

1

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary rule for determining heavy chain CDR-H2 motif

<400> 75

Leu Glu Trp Ile Gly

1

5

<210> 76

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary rule for determining heavy chain CDR-H3 motif

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 76

Trp Gly Xaa Gly

1