



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0146032
(43) 공개일자 2023년10월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7029202
- (22) 출원일자(국제) 2022년02월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년08월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2022/000063
- (87) 국제공개번호 WO 2022/172085
국제공개일자 2022년08월18일
- (30) 우선권주장
63/149,628 2021년02월15일 미국(US)
63/306,836 2022년02월04일 미국(US)

- (71) 출원인
다케다 야쿠힌 고교 가부시키키가이샤
일본 오사카시 주오구 도쇼마찌 4-1-1
- (72) 발명자
쿤, 찬탈
미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜스다운 스트리트 40 다케다 야쿠힌 고교 가부시키키가이샤 (내)
샤피로, 개리
미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜스다운 스트리트 40 다케다 야쿠힌 고교 가부시키키가이샤 (내)
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

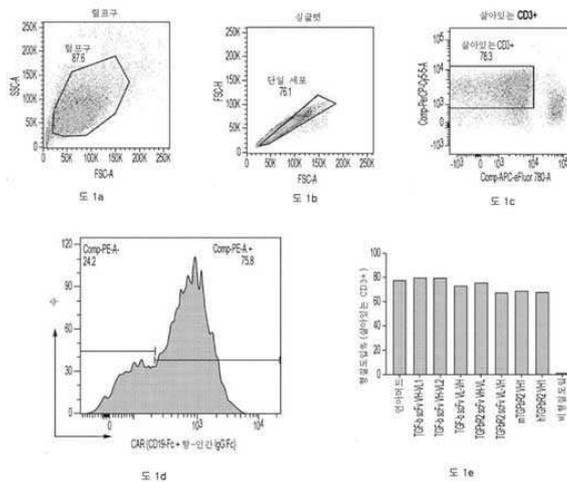
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 TGF-β 신호전달을 조절하기 위한 세포 치료 조성물 및 방법

(57) 요약

형질전환 성장 인자-β(TGFβ) 신호전달을 조절하기 위한 폴리펩티드(예를 들어, TGFβ 수용체, TGFβ 또는 TGFβ 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편)를 사용하는 방법이 제공된다. 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물 및 TGFβ 활성을 수반하는 질병의 치료를 위해 이를 사용하는 방법이 제공된다. 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 항원 결합 단편, 및 이들 항원 결합체 및 이의 단편을 포함하는 약학 조성물이 또한 개시된다. 본 발명은 또한 본원에 제공된 TGFβ 신호전달 조절제를 이용하는 치료 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/4637 (2023.05)
A61K 39/464412 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암 관련 항원을 인식하는 키메라 항원 수용체(CAR) 및 TGF β 신호전달 경로 조절제를 포함하는, 유전자 조작된 T 세포들의 집단.

청구항 2

제1항에 있어서, CAR은 ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, 거대세포바이러스(CMV) 감염된 세포 항원, CEACAM 5, Claudin 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 엽산 수용체-a, GCC(GUCY2C로도 알려짐), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, x-경쇄, KDR, LeY, LI 세포 부착 분자, MAGE-AI, MUC1, MUC13, 메소텔린, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 암태아 항원(h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2, 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선택된 항원을 인식하는, 세포들의 집단.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, TGF β 신호전달 경로 조절제는 TGF β 또는 TGF β 수용체에 결합하는, 세포들의 집단.

청구항 4

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, TGF β 신호전달 경로 조절제는 표 1로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 세포들의 집단.

청구항 5

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, CAR은 CD19 CAR 또는 GCC CAR인, 세포들의 집단.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포는 자가(autologous)인, 세포들의 집단.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 세포는 동종이계(allogeneic)인, 세포들의 집단.

청구항 8

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 핵산 및 TGF β 신호전달 경로 조절제를 인코딩하는 제2 핵산을 포함하는 벡터를 사용하여 유전자 변형되는, 세포들의 집단.

청구항 9

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 2개의 벡터를 사용하여 유전자 변형되고, 이 때 제1 벡터는 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하고 제2 벡터는 TGF β 신호전달 경로 조절제를 인코딩하는 핵산을 포함하는, 세포들의 집단.

청구항 10

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, CAR은 CD3 ζ 쇄, CD97, 2B4 GDI 1a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28 신호전달 도메인, 또는 이들의 조합 및 변형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 세포들의 집단.

청구항 11

진술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, CAR은 CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 막횡단 도메인으로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함하는, 세포들의 집단.

청구항 12

CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 핵산 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 인코딩하는 제2 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 내부 리보솜 진입 부위를 추가로 포함하는, 벡터.

청구항 14

제12항에 있어서, 2A 자가-절단 부위를 추가로 포함하는, 벡터.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 벡터로 변형된 면역세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 세포는 T 세포인, 면역 세포.

청구항 17

제1항에 따른 면역 세포들의 집단을 포함하는 약학 조성물.

청구항 18

숙주에서 면역 반응을 조절하는 방법으로서, 제1항에 따른 세포들의 집단을 숙주에게 투여하는 단계를 포함하고, 이 때 면역 반응의 조절은 숙주 면역 세포에 의한 다음: IFNγ 생산 증가; IL-2 생산 증가; 항원 제시 증가; 및 증식 증가 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 19

암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 제1항에 따른 세포들의 집단의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 암은 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수모세포성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단구성 백혈병, 급성 단구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병, 진성적혈구증가증, 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 중쇄 질병, 고형 종양, 육종, 암종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관내피육종, 활액종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포암종, 기저세포암종, 선암종, 땀샘암종, 피지선암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간암, 간세포 암종, 나일관 암종, 용모막 암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환 암, 폐암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 결장직장 암종, 상피 암종, 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두 개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 신경 모세포종, 망막모세포종, 및 이들의 전이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2021년 2월 15일에 출원된 미국 가출원 번호 63/149,628 및 2022년 2월 4일에 출원된 미국 가출원 번호 63/306,836에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 개시 내용은 그 전문이 참조로 본원에 포함된다.

배경 기술

[0003] **배경**

[0004] 암 특이적 항원을 표적으로 하는 조작된 세포를 사용하는 면역 요법은 일부 암 치료에 효능이 있는 것으로 나타났다. 그러나 악성 세포는 면역 인식 및 제거로부터 자신을 보호하기 위해 면역 억제 미세 환경을 생성하도록 적응한다. 종양 미세 환경에서 높은 수준의 TGFβ는 일부 유형의 암 세포의 유지 및 진행에 기여할 수 있다. 종양 미세 환경은 표적 세포 요법의 경우와 같이 면역 반응의 자극을 포함하는 치료 방법에 상당한 어려움을 제기한다. 따라서, 암을 치료하기 위한 새로운 치료 전략이 바람직하다.

발명의 내용

[0005] **요약**

[0006] 본 발명은 무엇보다도 암(예를 들어, 고형 종양)을 치료하는데 사용하기 위한 TGFβ 신호전달을 조절하기 위한 신규 시스템을 제공한다. 본 발명은 부분적으로 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β) 신호전달의 조절이 표적화 조작된 키메라 항원 수용체(CAR) 요법과 같은 입양 세포 요법 방법을 향상시킬 수 있다는 발견에 기초한다. 예를 들어, 본원에 기재된 TGF-βR2의 항체(예를 들어, 항-TGFβ 또는 항-TGFβR), 항원 결합 단편 또는 재조합 세포의 도메인의 시스템에 의해 영향을 받는 TGF-β 신호전달의 조절은 종양 내 면역억제 미세환경을 완화시키고 면역요법의 효능을 강화시킨다.

[0007] T 세포 기반 면역 요법은 합성 생물학의 새로운 영역이 되었다; 다중 프로모터 및 유전자 생성물들은 이러한 매우 강력한 세포들을 종양 미세 환경으로 유인하고, 이 때 T 세포가 음성 조절 신호를 회피하고 효과적인 종양 사멸을 중재할 수 있는 것으로 보인다. AP1903에 의한 유도성 카스파제 9 구조체들의 약물-유도 이량체화를 통해 원치 않는 T 세포를 제거하는 것은 T 세포 집단을 제어할 수 있는 강력한 스위치가 약리학적으로 개시될 수 있는 한 가지 방법을 보여준다(Di Stasi A 외 N Engl J Med. 2011;365(18):1673-83). 따라서, CAR이 내인성 T 세포 수용체와 유사한 방식으로 T 세포 활성화를 촉발할 수 있는 것으로 보이지만, 현재까지 이 기술을 임상 적용함에 있어 주요한 어려움은 CAR+ T 세포의 생체 내 확장, 주입 후 이 세포들의 빠른 소멸, 및 실망스러운 임상 활성에 제한되어 왔다. 따라서, 원치않는 효과(예를 들어, 높은 독성, 불충분한 효능) 없이 특이적이고 효과적인 항종양 효과를 나타낼 수 있는 접근법을 사용하여 암을 치료하는 신규 조성물 및 방법을 찾아내는 것에 대한 당업계의 시급한 수요가 존재한다.

[0008] 본 발명은 면역 세포(예를 들어, T 세포)에서 발현되는 CAR 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 포함하는 면역 조절 시스템을 제공함으로써 이러한 수요를 해결한다. 면역 조절 시스템을 포함하는 조성물 및 치료 방법은 암 및 기타 질병 및/또는 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 특히, 본 발명은 TGFβ의 조절이상 발현과 관련된 질병, 장애 또는 병태(예를 들어, 암, 고형 종양)의 치료에 사용될 수 있는 아머드 CAR(armored CAR)을 발현하는 조작된 면역 세포를 제공한다. TGFβ 조절제를 공동 발현하는 아머드 CAR T 세포는 형질도입된 T 세포에서 높은 CAR의 표면 발현과 향상된 암세포 세포용해를 나타낸다. 따라서, 본 발명은 TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 포함하는 면역 조절 시스템(예를 들어, 조작된 CAR T 세포)을 사용하여 암 및 병원체에 대한 면역 반응을 향상시키는 방법 및 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 부분적으로 암(예: 고형 종양 암) 치료를 위한, TGFβ 신호전달 경로 조절제를 포함하는 개선된 CAR 폴리펩티드, 이러한 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자, 개선된 CAR을 발현하도록 유전자 변형된 세포(예: T 세포) 및 입양 세포 요법에서 이러한 변형된 세포를 사용하는 방법을 제공한다.

[0010] 일부 실시형태에서, 본 발명은 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 발현하도록 변형되어 있는 CAR-T 세포(본원에서 "TGFβ 아머드 CAR-T 세포"라고도 지칭함)를 제공하여, TGFβ 신호전달 경로 조절제를 발현하지 않는 CAR-T 세포(본원에서 "언아머드 CAR-T 세포"라고도 함)에 비해 대상체에서 면역 반응을 유도할 수 있어야 한다.

[0011] 일부 양상에서, 본 발명은 항원 수용체를 보유하는 면역반응 세포(예를 들어, T 세포)를 제공하는데, 이는 TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)일 수 있다. 이러한 조작된 면역반응 세포(예: CAR-T 세포)는 항원-지시되어 면역억제에 저항하고/하거나 강화된 면역 활성화 특성을 가지고 있다.

- [0012] 한 양상에서, 본 발명은 암 관련 항원을 인식하는 키메라 항원 수용체(CAR) 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 포함하는, 유전자 조작된 T 세포의 집단을 제공한다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 상기 세포 집단은 ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, 거대세포바이러스(CMV) 감염된 세포 항원, CEACAM 5, Claudin 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 엽산 수용체-a, GCC (GUCY2C로도 알려짐), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, x-경쇄, KDR, LeY, LI 세포 부착 분자, MAGE-AI, MUC1, MUC13, 메소텔린, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 암태아 항원 (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2, 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선택된 항원을 인식하는 CAR을 포함한다.
- [0014] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 CD19 CAR 또는 GCC CAR을 포함한다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 TGFβ 또는 TGFβ 수용체에 결합하는 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 포함한다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 표 1로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 포함한다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 자가 세포이다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 동종이계이다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 일차 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포 집단은 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 유래된다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 핵산 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 인코딩하는 제2 핵산을 포함하는 벡터를 사용하여 유전자 변형된다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 2개의 벡터를 사용하여 유전자 변형되는데, 이 때 제1 벡터는 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하고 제2 벡터는 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 인코딩하는 핵산을 포함한다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 Crispr을 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시형태에서, 세포 집단은 레트로 바이러스 형질도입(g-레트로바이러스 포함), 렌티바이러스 형질도입, 트랜스포손 및 트랜스포사제(Sleeping Beauty 및 PiggyBac 시스템), 메신저 RNA 전달-매개 유전자 발현, 유전자 편집(유전자 삽입 또는 유전자 결실/과표), CRISPR-Cas9, ZFN(징크 핑거 뉴클레아제) 또는 TALEN(이펙터 뉴클레아제와 같은 전사 활성인자) 시스템을 사용하여 유전자 변형된다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 CD3ζ, CD97, 2B4, GDI 1a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28 신호전달 도메인, 또는 이들의 조합 및 변형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 포함한다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 세포 집단은 CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 막횡단 도메인으로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함하는 CAR을 포함한다.
- [0025] 한 양상에서, 본 발명은 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 핵산 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 인코딩하는 제2 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0026] 일부 실시형태에서, CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 핵산 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 인코딩하는 제2 핵산을 포함하는 벡터는 내부 리보솜 진입 부위를 포함한다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 벡터는 2A 리보솜 서열을 추가로 포함한다.
- [0028] 한 양상에서, 본 발명은 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 핵산 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 인코딩하는 제2 핵산을 포함하는 벡터로 변형된 면역 세포를 제공한다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T-세포이다.
- [0030] 한 양상에서, 본 발명은 숙주에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공하며, 이 방법은 암 관련 항원을 인식하는 키메라 항원 수용체(CAR) 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 포함하는 유전자 조작된 T 세포들의 집단을 숙주에 투여하는 단계를 포함하고, 이 때 면역 반응의 조절은 숙주 면역 세포에 의한 다음: IFNγ 생산 증가; IL-2 생산 증가; 항원 제시 증가; 및 증식 증가 중 하나 이상을 포함한다.
- [0031] 한 양상에서, 본 발명은 암 관련 항원을 인식하는 키메라 항원 수용체(CAR) 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를

포함하는, 유전자 조작된 T 세포의 집단을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

- [0032] 한 양상에서, 본 발명은 필요로 하는 대상체의 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 암 관련 항원 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 인식하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 유전자 조작된 T 세포 집단의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 암은 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수모세포성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단구성 백혈병, 급성 단구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병, 진성적혈구증가증, 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 중쇄 질병, 고형 종양, 육종, 암종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활액종, 중피종, 유양 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포암종, 기저세포암종, 선암종, 땀샘암종, 피지선암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간암, 간세포 암종, 나일관 암종, 용모막 암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 결장직장 암종, 상피 암종, 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 망막모세포종, 및 이들의 전이로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0034] 한 양상에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열; 및 TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드(예를 들어, TGFβ 신호 조절제)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 면역 조절 시스템을 제공한다.
- [0035] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 가변 중쇄(vH)를 포함한다.
- [0036] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 가변 중쇄(vH) 및 가변 경쇄(vL)를 포함한다.
- [0037] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 IgA 항체, IgG 항체, IgE 항체, IgM 항체, 이중-또는 다중-특이적 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 단리된 CDR 또는 이들의 세트; 단일 사슬 가변 단편(scFv), 폴리펩티드-Fc 융합, 단일 도메인 항체(sdAb), 낙타류 항체; 차폐 항체, 소분자 면역의약품(Small Modular ImmunoPharmaceuticals, "SMIPs™"), 단일 사슬, 탠덤 디아바디, VHH, 안티칼린, 나노바디, 휴머바디(humabody), 미니바디, BiTE, 안키린 반복 단백질, DARPIN, 아비머, DART, TCR 유사 항체, 애드넥틴, 에펠린, 트랜스-바디; 아피바디, 트리머X, 마이크로프로테인, 파이노머(Fynomer), 센티린(Centyrin); 및 KALBITOR 또는 이의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원 결합 분자를 포함한다.
- [0038] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 단일사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다. 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 단일 도메인 항체(sdAb)를 포함한다. 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 중쇄 전용 항체를 포함한다.
- [0039] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 표 1에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0040] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 이량체성 항원 결합제를 포함한다.
- [0041] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 TGF-β에 결합한다.
- [0042] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 TGF-β 수용체에 결합한다.
- [0043] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 TGF-β 수용체 2(TGF-βR2)에 결합한다.
- [0044] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 TGF-β 수용체 2(TGF-βR2) 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0045] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 TGF-βR2(TGF-βR2)의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0046] 일부 실시형태에서, CAR은 ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, 거대세포바이러스(CMV) 감염된 세포 항원, CEACAM 5, Claudin 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2.3,4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 엽산 수용체-a, GCC (또한 GUCY2C로도 알려짐), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, x-경쇄, KDR, LeY, LI 세포 부착 분자, MAGE-AI, MUC1, MUC13, 메소텔린, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 암태아 항원 (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2, 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 결합한다.
- [0047] 일부 실시형태에서, CAR은 CD19 또는 GCC에 결합한다.

- [0048] 일부 실시형태에서, CAR은 CD3ζ쇄, CD97, 2B4, GDI 1a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28 신호전달 도메인, 또는 이들의 조합 및 변형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0049] 진술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, CAR은 CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 막횡단 도메인으로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함한다.
- [0050] 특정 실시형태에서, 변형된 CD3z 폴리펩티드는 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)(이는 ITAM1, ITAM2 및 ITAM3입)의 전부 또는 일부가 결합되어 있다. 특정 실시형태에서, 변형된 CD3z 폴리펩티드는 염기성-풍부 스트레치(BRS, basic-rich stretch) 영역의 전부 또는 일부가 추가로 결합되어 있으며, 이 때 BRS 영역은 BRS1, BRS2 및 BRS3이다.
- [0051] 한 양상에서 본 발명은 본원에 기재된 면역 조절 시스템을 포함하는 핵산을 제공하며, 이 때 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 서열; TGF-b 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열은 단일 구조체에 존재한다.
- [0052] 일부 실시형태에서, 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 서열; 및 TGF-b 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열은 상이한 구조체들 상에 존재한다.
- [0053] 한 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 면역 조절 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0054] 일부 실시형태에서, 벡터는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 포함한다.
- [0055] 일부 실시형태에서, 벡터는 2A 리보솜 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 2A 리보솜 서열은 P2A 또는 T2A이다.
- [0056] 한 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 면역 조절 시스템을 포함하는 면역반응 세포를 제공한다.
- [0057] 한 양상에서, 본 발명은 중앙 관련 항원 또는 스트레스 리간드에 특이성을 갖는 표적화제 및 TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역반응 세포를 제공한다.
- [0058] 일부 실시형태에서, 표적화제는 MIC-A, MIC-B, ULBP1-6으로 이루어진 군으로부터 선택된 스트레스 리간드에 특이적으로 결합한다;
- [0059] 한 양상에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR); 및 TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역반응 세포를 제공한다.
- [0060] 일부 실시형태에서, CAR 및 TGF-b 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 동일한 폴리뉴클레오티드 상에 제공된다.
- [0061] 일부 실시형태에서, CAR 및 TGF-b 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 별도의 폴리뉴클레오티드 상에 제공된다.
- [0062] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드는 상기 세포로부터 분비된다.
- [0063] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드는 가변 중쇄(vH)를 포함한다.
- [0064] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드는 가변 중쇄(vH) 및 가변 경쇄(vL)를 포함한다.
- [0065] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드는 단일사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다.
- [0066] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드는 이량체성 항원 결합체를 포함한다.
- [0067] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 TGF-b에 결합한다.
- [0068] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드는 TGF-b 수용체 2(TGF-bR2) 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0069] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드는 TGF-bR2의 세포외 도메인을 포함한다.
- [0070] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 TGF-b 수용체에 결합한다.
- [0071] 일부 실시형태에서, TGF-b 신호전달을 조절하는 폴리펩티드는 TGF-b 수용체 2(TGF-bR2)에 결합한다.

- [0072] 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 백터로부터 또는 조작된 mRNA로부터 발현되거나, 또는 숙주 세포 염색체에 통합된 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 서열은 엔도뉴클레아제를 사용하여 숙주 세포 염색체에 통합된다. 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 서열은 Crispr/Cas9, Cas12a, 또는 Cas13을 사용하여 숙주 세포 염색체에 통합된다.
- [0073] 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 백터로부터 또는 조작된 mRNA로부터 발현되거나 숙주 세포 염색체에 통합되는 TGF- β 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열은 Crispr/Cas9, Cas12a, 또는 Cas13을 사용하여 숙주 세포 염색체에 통합된다.
- [0074] 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해(NK) T 세포, 감마 델타 T 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 조절 T 세포, 인간 배아 줄기 세포, B 세포, 대식세포, 및 림프구양 세포가 분화될 수 있는 다능성 줄기 세포(예를 들어, iPSC로부터 유도된 NK 또는 T 세포)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0075] 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 조작된 자가 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 조작된 동종 이계 세포이다.
- [0076] 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, 거대세포바이러스(CMV) 감염된 세포 항원, CEACAM 5, Claudin 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, 엽산 수용체-a, GCC (또한 GUCY2C로도 알려짐), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, x-경쇄, KDR, LeY, LI 세포 부착 분자, MAGE-A1, MUC1, MUC13, 메소텔린, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, 암태아 항원 (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2, 및 WT-1로 이루어진 군으로부터 선택된 중앙 항원에 결합하는 CAR을 포함한다.
- [0077] 일부 실시형태에서, CAR은 CD19 또는 GCC에 결합한다. 일부 실시형태에서, CAR은 GCC에 결합한다.
- [0078] 일부 실시형태에서, CAR은 CD3 ζ CD97, 2B4, GDI 1a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28 신호전달 도메인, 또는 이들의 조합 및 변형으로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0079] 일부 실시형태에서, CAR은 CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 막횡단 도메인으로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함한다.
- [0080] 특정 실시형태에서, 변형된 CD3 ζ 폴리펩티드는 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)(이는 ITAM1, ITAM2 및 ITAM3임)의 전부 또는 일부가 결합되어 있다. 특정 실시형태에서, 변형된 CD3 ζ 폴리펩티드는 염기성-풍부 스트레치(BRS, basic-rich stretch) 영역의 전부 또는 일부가 추가로 결합되어 있으며, 이 때 BRS 영역은 BRS1, BRS2 및 BRS3이다.
- [0081] 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 키메라 동시자극 수용체(CCR)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 공동 자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, CAR은 CD3 ζ 도메인을 포함하지 않는다.
- [0082] 일부 실시형태에서, TGF- β 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드는 면역반응 세포의 면역 반응을 향상시킨다.
- [0083] 한 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 면역 조절 시스템의 유효량을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0084] 한 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 면역 조절 시스템을 인코딩하는 핵산 서열의 유효량을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0085] 한 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 면역 조절 시스템을 인코딩하는 백터의 유효량을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0086] 한 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 면역반응 세포의 유효량을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0087] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0088] 한 양상에서, 본 발명은 암 치료용 키트를 제공하며, 이 때 키트는 키메라 항원 수용체(CAR); 및 TGF- β 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역반응 세포를 포함한다.
- [0089] 일부 실시형태에서, 키트는 본원에 기재된 면역 조절 시스템을 인코딩하는 핵산 또는 백터를 포함한다.
- [0090] 한 양상에서, 본 발명은 대상체에서 암 또는 이의 전이를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 이 방법은 키메라 항원 수용체(CAR); 및 TGF- β 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역반

응 세포의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

- [0091] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물은 조혈암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물은 고형 종양 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0092] 일부 실시형태에서, 암은 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수모세포성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단구성 백혈병, 급성 단구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병, 진성적혈구증가증, 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질병, 고형 종양, 육종, 암종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활액종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포암종, 기저세포암종, 선암종, 땀샘암종, 피지선암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간암, 간세포 암종, 나일관 암종, 용모막 암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 결장직장 암종, 상피 암종, 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 및 망막모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0093] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대상체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0094] 일부 실시형태에서, 제2 치료제는 대상체에게 전신 투여된다.
- [0095] 일부 실시형태에서, 제2 치료제는 CAR 및 TGF- β 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산과 별도로 투여된다.
- [0096] 일부 실시형태에서, 제2 치료제는 PD1/PD-L1, CXCR2 및/또는 IL-15를 표적으로 한다.
- [0097] 일부 실시형태에서, 제2 치료제는 PD1/PD-L1 억제제이다.
- [0098] 한 양상에서, 본 발명은 면역 세포의 활성을 조절하는 방법을 제공하며, 이 방법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산; 및 TGF- β 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0099] 한 양상에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)의 활성을 조절하는 방법을 제공하며, 이 방법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산; 및 TGF- β 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0100] 한 양상에서, 본 발명은 대상체에서 종양 부하를 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 본원에 기재된 핵산, 벡터 또는 면역반응 세포를 포함하는 면역 조절 시스템의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0101] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 종양 세포의 수를 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 종양 크기를 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대상체에서 종양을 박멸한다.
- [0102] 한 양상에서, 본 발명은 대상체에서 암세포에 반응하여 면역-활성화 사이토카인 생산을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 본원에 기재된 핵산, 벡터 또는 면역반응 세포를 포함하는 면역 조절 시스템을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0103] 한 양상에서, 본 발명은 항원-특이적 면역반응 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 이 방법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열; 및 TGF- β 신호전달을 조절하는 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 면역반응 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0104] 전술한 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명 모두는 단지 청구범위에 기재된 본 발명의 예시 및 설명을 위한 것이며 제한적인 의미가 아님을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

[0105] 본원에 포함된 도면은 다음과 같은 도면들로 구성되어 있으며 제한하고자 하는 것이 아니라 설명하기 위한 것이다.

도 1A-1E는 면역반응 세포(예를 들어, 형질도입된 T 세포)에서 CAR 및 TGF- β 신호전달 조절제의 예시적인 발현을 입증한다. **도 1A**는 림프구 집단을 도시하고, **도 1B**는 싱글렛을 도시하고, **도 1C**는 살아있는 CD3+ 세포의 집

단을 도시하고 **도 1D**는 TGF- β 를 발현하는 아머드 인간 CAR-T 세포에서 CAR 발현을 평가하는 예시적인 유동 세포 분석 결과를 보여준다. **도 1E**는 CD19 CAR만을 형질도입한 언아머드 세포, 및 TGFb scFv VH-VL1(서열번호 1), TGFb scFv VH-VL2(서열번호 2), TGFb scFv VL-VH(서열번호 3), TGFbR2 scFv VH-VL(서열번호 4), TGFbR2 scFv VL-VH(서열번호 5), mTGFbR2 VH1(서열번호 6) 및 hTGFbR2 VH1(서열번호 8)로 아머드된 CD19 CAR-T 세포 또는 비형질도입 세포를 사용하여 형질도입 효율을 CAR 염색에 대해 양성인 살아있는 세포 %로서 보여주는 막대 그래프를 도시한다.

도 2A-2B는 CD19 CAR만이 형질도입된 언아머드 세포, 그리고 TGFb scFv VH-VL1 (서열번호 1), TGFb scFv VH-VL2 (서열번호 2), TGFb scFv VL-VH (서열번호 3), TGFbR2 scFv VH-VL (서열번호 4), TGFbR2 scFv VL-VH (서열번호 5), mTGFbR2 VH1 (서열번호 6) 및 hTGFbR2 VH1 (서열번호 8)로 아머드된 CD19 CAR-T 세포 또는 비형질도입 세포의 표적에 대한 이펙터를 사용하여, 항-CD19 CAR 및 TGF- β 신호전달 조절제를 공동발현하는 면역반응 세포들의 CD19+ Raji 세포(**도 2A**) 및 CD19ko Raji 세포(**도 2B**)에 대한 예시적인 시험관내 사멸 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 3A는 TGF- β 결합체의 분비를 입증하는 예시적인 ELISA 결과를 도시하는 막대 그래프를 도시하고, **도 3B**는 인간 CAR-T 세포들에 의한 TGF β R2 결합체들의 분비 및 이들의 동족 항원에 결합하는 능력을 입증하는 예시적인 ELISA 결과를 도시하는 막대 그래프를 도시한다.

도 4는 구조체를 TGFb scFv VH-VL1(서열번호 1), TGFb scFv VH-VL2(서열번호 2), TGFb scFv VL-VH(서열번호 3), TGFbR2 scFv VH-VL(서열번호 4), TGFbR2 scFv VL-VH(서열번호 5), mTGFbR2 VH1(서열번호 6) 및 hTGFbR2 VH1(서열번호 8)을 분비하는 CAR-T 세포들로부터 얻은 상층액에 의해 TGF- β 신호전달의 억제를 평가하는 예시적인 루시페라제 분석 결과를 도시하는 막대 그래프를 도시한다.

도 5A는 TGFb-scFv VH-VL1 G4S 이량체(서열번호 17), TGFb-scFv VH-VL1 2xG4S 이량체(서열번호 18) TGFb-scFv VH-VL1 미니바디(서열번호 21), TGFb-scFv VH-VL1 미니바디+힌지(서열번호 19)를 분비하는 CAR-T 세포로부터 얻은 상층액에 의해 TGF- β 신호전달 억제를 평가하는 예시적인 루시페라제 분석 결과를 도시하는 막대 그래프를 도시한다. **도 5B**는 TGF- β 에 대한 다량체 결합체의 분비에 대해 루시페라제 리포터 분석법을 사용하여 설계되고 스크리닝된 예시적인 TGF- β 조절제의 개략도를 보여준다. **도 5C**는 VHH 결합 도메인을 포함하는 예시적인 TGF- β 조절제의 개략도를 보여준다.

도 6A는 단량체성 TGFb scFv VH-VL1(서열번호 1) 및 이량체성 TGFb-scFv VH-VL1 G4S 이량체(서열번호 17) 결합체를 공동발현하는 아머드 CAR T 세포의 상대 차단 활성을 CAR만을 발현하는 언아머드 세포들과 비교하여 평가하는 예시적인 루시페라제 분석 결과를 도시하는 막대 그래프를 보여준다. **도 6B**는 TGF β R2 VHH 및 scFv 단량체 및 이량체 구조체, 언아머드 CAR-T 세포, mTGFbR2 VH2 단량체, mTGFbR2 VH2 G4S 이량체, mTGFbR2 VH2 G4S 삼량체, hTGFbR2 VH2 단량체, hTGFbR2 VH2 G4S 이량체, hTGFbR2 VH3 단량체, hTGFbR2 VH3 G4S 이량체, hTGFbR2 scFv VH-VL 단량체, hTGFbR2 scFv VH-VL G4S 이량체들의 상대적인 차단 활성을 평가하기 위해 사용된 예시적인 루시페라제 분석 결과를 도시하는 막대 그래프를 보여준다.

도 7A 및 도 7B는 언아머드 CAR-T 세포, mTGFbR2 VH2 단량체, mTGFbR2 VH2 G4S 이량체, mTGFbR2 VH2 G4S 삼량체, hTGFbR2 VH2 단량체, hTGFbR2 VH2 G4S 이량체, hTGFbR2 VH3 단량체, hTGFbR2 VH3 G4S 이량체, hTGFbR2 scFv VH-VL 단량체, hTGFbR2 scFv VH-VL G4S 이량체에 대한 예시적인 ELISA 결과를 도시하는 막대 그래프를 도시하며, 이는 예시적인 TGFb 조절제가 인간 TGFbR2에는 결합하지만(**도 7A**) 마우스 TGFbR2에는 결합하지 않음(**도 7B**)을 입증한다.

도 8A는 실시예 6에 기재된 바와 같이 EMT6-hCD19-Fluc 종양 세포의 종양 성장을 평가하기 위한 예시적인 주사 타임라인을 보여준다. **도 8B**는 언아머드 CAR-T 또는 비형질도입 CAR-T 세포에 비해 TGF- β 결합체를 분비하는 CAR-T 세포를 투여받은 마우스에서 시간 경과에 따른 예시적인 종양 부피를 보여준다. **도 8C**는 언아머드 또는 비형질도입 CAR-T 세포에 비해 TGF- β 결합체를 분비하는 CAR-T 세포로 처리된 마우스에서 예시적인 간 전이를 입증한다. **도 8D**는 언아머드 또는 비형질도입 CAR-T 세포에 비해 TGF- β 결합체를 분비하는 CAR-T 세포로 처리된 마우스에서 예시적인 폐 전이를 입증한다. **도 8E**는 간 및 폐 조직에서 루시페라제 발현 종양 세포의 예시적인 이미징 결과를 입증한다.

도 9A 및 도 9B는 상이한 TGF-b 리간드 트랩(TGF-b scFv VH-VL1 대 TGFbR2 ECD 단량체, 동종이량체(**도 9A**) 및 이종이량체(**도 9B**))를 분비하는 아머드 마우스 CAR-T로부터 얻은 상층액을 언아머드 CAR-T 세포와 비교하는 예시적인 SBE-Luc TGF-b 리포터 분석 결과를 도시하는 막대 그래프를 도시한다.

도 10A는 EMT6-hCD19-Fluc 종양 세포의 종양 성장을 평가하기 위한 예시적인 주사 타임라인을 보여준다. 도 10B는 비형질도입 T 세포 또는 언아머드 CAR-T 세포(TGFβ 신호전달 조절제를 공동 발현하지 않는 CAR-T 세포)를 투여받은 마우스에서 시간 경과에 따른 예시적인 종양 부피를 보여준다. 도 10C는 TGFβR1+2ECD 이량체를 공동 발현하는 아머드 CAR-T 세포 또는 언아머드 CAR-T 세포(TGFβ 신호전달 조절제를 공동 발현하지 않는 CAR-T 세포)를 투여받은 마우스에서 시간 경과에 따른 예시적인 종양 부피를 보여준다. 도 10D는 전신 항-TGFβ 항체(1D11) 또는 언아머드 CAR-T 세포(TGFβ 신호전달 조절제를 공동 발현하지 않는 CAR-T 세포)를 투여받은 마우스에서 시간 경과에 따른 예시적인 종양 부피를 보여준다.

도 11은 CD19를 발현하는 MC38 세포로부터 발생된, 마우스에서의 예시적인 종양 부피를 시간 경과에 따라 나타내는 그래프를 도시한다. 비형질도입 T 세포, 언아머드 항CD19 CAR-T 세포 또는 TGF-β에 대한 억제 결합제(TGF-β scFv VH-VL1)를 분비하는 CAR-T 세포를 마우스에 투여했다.

도 12는 TGF-β에 대한 결합제(TGF-β scFv VH-VL1(서열번호 1))를 분비하는 CAR-T 세포에 의한 숙주 면역 반응의 향상된 활성화를 나타내는 예시적인 RNA Seq 분석을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 13은 TGF-β scFv VH-VL1(서열번호 1) 분비 CAR-T 세포를 투여받은 마우스의 종양에서 T 세포(CD3d+, CD3e+, CD3g+), CD8+ T 세포(CD8a+) 및 세포독성 T 세포(GzmB+)의 종양 침윤에 대한 예시적인 바이오마커 점수를 보여준다.

도 14는 TGF-β scFv VH-VL1(서열번호 1) 분비 CAR-T 세포를 투여받은 마우스의 종양에서 증가된 T 세포 시그니처 및 IFNγ 시그니처를 나타내는 농축 점수인 예시적인 단일 샘플 유전자 세트 농축 분석(GSEA)을 보여준다.

도 15는 비형질도입 대조군 T 세포, 언아머드 CD19 CAR-T 세포, 또는 TGF-β scFv VH-VL1(서열번호 1) 단량체 분비 CAR-T 세포를 투여받은 마우스에서 TCRα/b, CD8a, CD4, CD25, CD62L, CD11b, Gr1, CD11c, CD45.1 및 CD45를 포함하는 예시적인 표면 마커 분석을 보여준다.

도 16A 및 도 16B는 항-TGF-β 또는 항-TGFβR2 차단 항체로 아머드된 인간 GCC-CAR-T 세포의 개선된 기능을 나타내는 GSU 이중이식 모델에서의 예시적인 생체내 분석을 도시하는 그래프이다.

도 17A-17D는 항-Flag 면역 포획 LC/MS 분석을 사용하여 결정된, TGF-β scFv VH-VL1 및 TGFβR2 VHH를 공동 발현하는 항-GCC CAR-T 세포에 의해 분비된 TGFβ 조절제의 종양 및/또는 혈장 농도를 나타낸다.

도 18A-18C는 HT29-GCC 양성 세포에서 TGFβ의 부재시(도 18A) 및 TGFβ의 존재시(도 18B) 언아머드 항-GCC CAR-T 세포, 항-TGFβR2 VHH 단량체 아머드된 항-GCC CAR-T 세포 및 항-TGFβR2 VHH 이량체 아머드된 항-GCC CAR-T 세포를 사용한 예시적인 시험관내 사멸 분석 결과를 도시하는 그래프이다. 도 18C는 TGFβ의 존재 및 부재 시 CAR T 세포 증식을 보여준다.

도 19는 반복 항원 자극 후 세포에서 PD-1/Lag3 발현을 나타내는 예시적인 유동 세포 분석 결과를 도시한다.

도 20A-20C는 아머드 및 언아머드 CAR-T 세포 및 우성 음성 TGFβR2(dnTGFβR2)를 발현하는 CAR-T 세포로 처리된 세포 GSU(도 20A), HT55(도 20B), 및 MDA-MB-231-FP4 Luc(도 20C)를 발현하는 GCC의 (s.c.) 이중이식 모델을 도시한다.

도 21A-21C는 아머드 항-GCC CAR T 세포로 처리된 HT55 간 전이 모델의 예시적인 결과를 보여준다.

도 22A는 지시된 시점에서 수행된 FACS 표현형 분석 및 유동 세포 분석법에 의해 계수된 CAR-T 세포를 보여준다. 도 22B는 Msln에 대한 CAR을 공동-발현하는 항-Msln CAR-T 세포에서의 세포독성 백분율을 TGFβ 조절제(예를 들어, TGFβR2-VH 또는 dnTGFβR2) 또는 GFP에 대한 대조군 VH(Msln-대조군 VH)와 함께 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0106]

본 발명이 보다 용이하게 이해될 수 있도록, 이하에서 특정 용어를 먼저 정의한다. 다음 용어 및 기타 용어에 대한 추가 정의는 명세서를 통해 설명된다.

[0107]

본원 및 첨부된 청구범위에 사용되는 단수형 '하나' 및 '그것'은 내용에서 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "방법"에 대한 언급은 하나 이상의 방법 및/또는 본원에 기재된 및/또는 본 명세서 등을 읽을 때 당업자에게 명백해질 유형의 단계를 포함한다.

[0108]

- [0109] **투여하다:** 본원에서 사용되는, 대상체에게 조성물을 “투여하는 것”은 조성물을 대상체와 접촉시키거나, 대상체에 적용하거나 접촉되게 하는 것을 의미한다. 투여는 예를 들어, 국소, 경구, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내, 척수강내 및 피내와 같은 다수의 경로에 의해 달성될 수 있다.
- [0110] **입양 세포 요법:** 본원에서 상호교환적으로 사용되는, “입양 세포 요법” 또는 “입양 세포 전달” 또는 “세포 요법” 또는 “ACT”라는 용어는 세포, 예를 들어, 본원에 기재된 유전자 변형된 세포 집단을 이를 필요로 하는 환자에게 전달하는 것을 지칭한다. 세포는 이를 필요로 하는 환자로부터 유래 및 증식될 수 있거나(즉, 자가 세포) 환자가 아닌 공여체로부터 수득될 수 있다(즉, 동종이계 세포). 일부 실시형태에서, 세포는 본원에 기재된 CAR 및 TGFβ 신호전달 경로 조절제를 발현하도록 변형된 면역 세포, 예를 들어, 림프구(예를 들어, TGFβ 아머드 CAR-T 세포)이다. 자연 살해(NK) 세포, T 세포, CD8+ 세포, CD4+ 세포, 감마 델타 T 세포, 조절 T 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC), iPSC 유래 T 세포, iPSC 유래 NK 세포, 조혈 줄기 세포(HSC), 중간엽 줄기 세포(MSC) 및 말초 혈액 단핵 세포 등 다양한 세포 유형을 ACT에 사용할 수 있다.
- [0111] **친화도:** 본원에 사용된 용어 “친화도”는 결합 모이어티(예를 들어, 항원 결합제(예를 들어, 본원에 기재된 가변 도메인)와 표적(예를 들어, 항원(예를 들어, TGFβ 또는 TGFβR)) 사이의 결합 상호작용의 특성을 지칭하며 이러한 결합 상호작용의 강도를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 친화도의 척도는 해리 상수(K_d)로 표현된다. 이의 표적에 대한 항원 결합 단백질의 결합 친화도는 균등한 방법(예를 들어, 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 또는 방사선면역분석(RIA)), 동역학(예를 들어 BIACORE™ 분석), 또는 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0112] **결합력:** 본원에서 사용되는 용어 “결합력”은, 예를 들어, 상호작용의 원자가를 고려하여 다수의 부위에서 두 분자의 서로에 대한 결합 강도의 총합이다.
- [0113] **동물:** 본원에서 사용되는 용어 “동물”은 동물계의 임의의 구성원을 지칭한다. 일부 실시형태에서, “동물”은 임의의 발달 단계에 있는 인간을 지칭한다. 일부 실시형태에서, “동물”은 임의의 발달 단계에 있는 비-인간 동물을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 비-인간 동물은 포유동물(예를 들어, 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 및/또는 돼지)이다. 일부 실시형태에서, 동물은 포유동물, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충 및/또는 벌레를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 동물은 형질전환 동물, 유전자 조작 동물 및/또는 클론일 수 있다.
- [0114] **자가:** 본원에서 사용되는 용어 “자가”는 차후 개체에게 다시 도입될 개체와 동일한 개체로부터 유도된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0115] **동종이계:** 본원에서 사용되는 용어 “동종이계”는 물질이 도입되는 개체와 동일한 종의 다른 동물로부터 유도된 모든 물질을 지칭한다. 하나 이상의 유전자좌에 있는 유전자가 동일하지 않을 때 둘 이상의 개체는 서로 동종이계라고 한다. 일부 양상에서, 동일한 종의 개체의 동종이계 물질은 항원적으로 상호작용하기에 유전적으로 충분히 다를 수 있다.
- [0116] **항체 또는 항원 결합제:** 본원에서 사용되는 용어 “항체” 또는 “항원 결합제”는 특정 표적 항원에 대해 특이적 결합을 부여하기에 충분한 표준 면역글로불린 서열 요소들을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 당업자는 이 용어가 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 일부 실시형태에서, 본원에서 사용된 용어 “항체” 또는 “항원 결합제”는 또한 “항체 단편” 또는 “항체 단편들”을 지칭하며, 이는 온전한 항체의 일부, 예를 들어, 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. “항체 단편”의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 트리아바디; 테트라바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중-특이적 항체에 포함된 CDR-함유 모이어티를 포함한다. 당업자는 “항체 단편”이라는 용어가 임의의 특정 생성 방식을 암시하거나 이에 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 항체 단편은 온전한 항체의 절단, 화학적 합성, 재조합 생산 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 적절한 방법론을 사용하여 생산할 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 자연에서 생성된 온전한 항체는 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드(각각 약 50kD) 및 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드(각각 약 25kD)로 구성되어 일반적으로 “Y자형” 구조라 지칭되는 항체로 서로 회합하는, 대략 150kD의 사량체 체제이다. 각 중쇄는 최소 4개의 도메인(각각 약 110개 아미노산 길이), 즉, 아미노-말단 가변(V_H) 도메인(Y 구조의 끝 부분에 위치)과 3개의 불변 도메인: C_H1, C_H2, 및 카르복시-말단 C_H3 (Y 구조의 기저부에 위치)으로 구성된다. “스위치”로 알려진 짧은 영역은 중쇄 가변 영역과 불변 영역을 연결한다. “힌지”는 C_H2 및 C_H3 도메인을 항체의 나머지 부분에 연결한다. 이 힌지 영역에 있는 2개의 이황화 결합은 온전한 항체에서 2개의 중쇄 폴리펩티드를 서로 연결한다. 각 경쇄는 두 개의 도메인, 즉, 아미노-말단 가변(V_L) 도메인, 이

에 이은 카르복시-말단 불변(C_L) 도메인으로 구성되며 이들은 또 다른 “스위치”에 의해 서로 분리되어 있다. 온전한 항체 사량체는 중쇄와 경쇄가 단일 이황화 결합에 의해 서로 연결된 두 개의 중쇄-경쇄 이량체로 구성되는데; 두 개의 다른 이황화 결합이 중쇄 힌지 영역을 서로 연결하여 이량체가 서로 연결되고 사량체가 형성된다. 자연적으로 생성된 항체도 일반적으로 C_{H2} 도메인에서 당화된다. 천연 항체의 각 도메인은 서로에 대해 압축된 역평행 베타 배럴로 패키징된 2개의 베타 쉬트(예를 들어, 3-, 4- 또는 5-가닥 쉬트)로부터 형성된 “면역글로불린 접힘(immunoglobulin fold)”을 특징으로 하는 구조를 갖는다. 각 가변 도메인은 “보체 결정 영역”(CDR1, CDR2 및 CDR3)으로 알려진 3개의 추가 변 루프와 4개의 다소 불변하는 “프레임워크” 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함한다. 천연 항체가 접힐 때, FR 영역은 도메인에 대한 구조적 프레임워크를 제공하는 베타 쉬트를 형성하고 중쇄와 경쇄 모두의 CDR 루프 영역들은 3차원 공간에서 함께 회합되어 Y 구조의 끝에 위치한 단일 추가 변 항원 결합 부위를 생성한다. 항체 폴리펩티드 사슬들 간의 아미노산 서열 비교는 2개의 경쇄(κ 및 λ) 분류, 몇몇 중쇄(예를 들어, μ , γ , α , ϵ , δ) 분류 및 특정 중쇄 하위분류($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ 및 $\gamma 4$)를 정의하였다. 항체 분류(IgA[IgA1, IgA2 포함], IgD, IgE, IgG[IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 포함] 및 IgM)는 사용된 중쇄 서열들의 분류에 기반하여 정의된다.

[0117] 본 발명의 목적을 위해, 특정 실시형태에서, 천연 항체에서 발견되는 바와 같은 충분한 면역글로불린 도메인 서열들을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체는 이러한 폴리펩티드가 자연적으로 생성되었는지(예를 들어, 항원에 반응하는 유기체에 의해 생성됨), 또는 재조합 조작, 화학 합성 또는 기타 인공 시스템이나 방법론에 의해 생성되었는지 여부에 관계없이 “항체” 또는 “항원 결합체”로서 언급 및/또는 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 단클론이고; 일부 실시형태에서, 항체는 다클론이다. 일부 실시형태에서, 항체는 마우스, 토끼, 영장류 또는 인간 항체의 특징인 불변 영역 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 항체 서열 요소들은 당업계에 공지된 바와 같이 인간화, 영장류화, 키메라 등이다. 또한, 본원에서 사용되는 용어 “항체” 또는 “항원 결합체”는 (달리 언급되지 않거나 문맥상 명백하지 않는 한) 적절한 실시형태에서 다른 형태의 항체의 구조적 및 기능적 특징들을 포착하기 위해 상응 분야에서 공지되거나 개발된 임의의 구조체들 또는 형태들을 지칭하는 것을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 이 용어는 이중- 또는 다른 다중-특이성(예를 들어, 자이바디 등) 항체, 소분자 면역의약품(“SMIPs™”), 단일 사슬 항체, 낙타류 항체 및/또는 항체 단편들을 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 자연적으로 생성되는 경우에 가지게 되는 공유 변형(예를 들어, 글리칸의 부착)이 결여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 공유 변형(예를 들어, 글리칸의 부착, 페이로드[예를 들어, 검출가능한 모이어티, 치료 모이어티, 촉매 모이어티 등], 또는 다른 부착기[예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 등])을 포함할 수 있다.

[0118] **대략 또는 약:** 본 명세서에서 사용되는 하나 이상의 관심 값에 적용되는 “대략” 또는 “약”이라는 용어는 명시된 기준 값과 유사한 값을 의미한다. 특정 실시형태들에서, 용어 “대략” 또는 “약”은, 달리 언급이 없거나 내용으로부터 명확하지 않은 한, 어느 한 방향으로 (이상으로 또는 이하로) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만에 속하는 값들의 범위를 지칭한다 (이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외). 용어 “약” 또는 “대략”이 언급된 참조 값을 변형시키는 데 사용되는 경우, 언급된 참조 값 그 자체는 언급된 참조 값의 양쪽 중 어느 한 쪽에서 언급된 참조 값에 가까운 값들과 함께 포함되는 것으로 이해된다.

[0119] **아머드 CAR-T 세포:** 본원에서 사용되는 “아머드 CAR 세포” 또는 “아머드 CAR-T 세포”라는 용어는 종양 면역 억제 및 종양-유도 CAR-T 기능 저하를 회피하는 능력을 갖는 유전자 조작된 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 아머드 CAR T 세포는 암 관련 항원을 인식하는 키메라 항원 수용체(CAR) 및 TGF β 신호전달 경로 조절제를 포함한다.

[0120] **상보성 결정 영역(CDR):** 가변 도메인의 “CDR”은 Kabat, Chothia, Kabat과 Chothia 둘 모두의 축적, AbM, 접축 및/또는 구조적 정의 또는 당업계에 잘 알려진 임의의 CDR 결정 방법의 정의에 따라 식별되는 가변 영역 내의 아미노산 잔기이다. 항체 CDR은 원래 Kabat 외에 의해 정의된 추가 변 영역으로 식별될 수 있다. 예를 들어, Kabat 외, 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.를 참조하라. 예를 들어, Chothia 외, Nature 342:877-883, 1989를 참조하라. CDR 식별에 대한 다른 접근법에는 “AbM 정의”가 포함되며, 이는 Kabat과 Chothia 방식 사이의 절충안으로서, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어(현재 Accelrys®) 또는 MacCallum 외, J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996에 제시된 관찰된 항원 접촉에 기반한 CDR의 “접촉 정의”를 사용하여 유도된다. 본원에서 CDR의 “입체형태적 정의”로 지칭되는 또 다른 접근법에서, CDR의 위치는 항원 결합에 대한 엔탈피 기여를 하는 잔기로 식별될 수 있다. 예를 들어, Makabe 외, Journal of Biological Chemistry, 283: 1 156-1166, 2008을 참조하라. 또 다른

CDR 경계 정의는 위의 접근 방식 중 하나를 엄격하게 따르지 않을 수 있지만 그럼에도 불구하고 Kabat CDR의 적어도 일부와 중복될 것이나, 특정 잔기 또는 잔기 그룹 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 상당한 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험 결과에 비추어 단축되거나 연장될 수 있다. 본원에서 사용되는 CDR은 접근법들의 조합을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 접근법에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다. 본원에서 사용되는 방법은 이들 접근법들 중 어느 하나에 따라 정의된 CDR을 이용할 수 있다. 하나 이상의 CDR을 포함하는 임의의 주어진 실시형태에 있어서, CDR은 임의의 Kabat, Chothia, 확장, AbM, 접촉 및/또는 입체형태적 정의에 따라 정의될 수 있다.

[0121] **항체 의존성 세포 매개 세포독성** 또는 ADCC는, 특정 세포독성 세포(예를 들어, 자연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체(FcR)에 결합된 분비된 IG가 이들 세포독성 효과기 세포들을 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합시키고 후속적으로 세포독소로 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 형태를 지칭한다. 항체는 세포 독성 세포를 “아머드” 하며 이러한 메커니즘에 의해 표적 세포를 사멸시키는 데 필요하다. ADCC를 매개하는 일차 세포인, NK 세포는 오로지 Fc γ R111만을 발현시키는 반면, 단핵구는 Fc γ R1, Fc γ R2 및 Fc γ R111를 발현시킨다. 조혈 세포들에서 Fc 발현은 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92(1991)의 페이지 464의 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석에 유용한 이펙터 세포들은 말초 혈액 단핵 세포들(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포들을 포함한다. 대안으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은, 예를 들어, Clynes 외. PNAS USA 95, 652-656 (1998)에서 공개된 바와 같은 동물 모델에서 생체 내에서 평가될 수 있다.

[0122] **항원**: 본원에서 사용되는 “항원”이라는 용어는 면역 반응을 유도하는 제체를 의미하고; 및/또는 유기체에 노출되거나 투여될 때 T 세포 수용체에 의해 (예를 들어, MHC 분자에 의해 제시될 때) 또는 항체(예를 들어, B 세포에 의해 생성될 때)에 결합되는 제체를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 항원은 유기체에서 체액성 반응(예를 들어, 항원-특이적 항체의 생성을 포함함)을 유도하고; 대안적으로 또는 추가로, 일부 실시형태에서, 항원은 유기체에서 세포 반응(예를 들어, 이의 수용체가 항원과 특이적으로 상호작용하는 T-세포를 수반함)을 유도한다. 특정 항원이 표적 유기체(예: 마우스, 토끼, 영장류, 인간)의 하나 또는 여러 구성원에서 면역 반응을 유도할 수 있지만, 표적 유기체 종들의 모든 구성원에서는 그런 것은 아님을 당업자는 이해할 것이다. 일부 실시형태에서, 항원은 표적 유기체 종들의 적어도 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 구성원에서 면역 반응을 유도한다. 일부 실시형태에서, 항원은 항체 및/또는 T 세포 수용체에 결합하고 유기체에서 특정 생리학적 반응을 유도하거나 유도하지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 항원은 이러한 상호작용이 생체내에서 발생하는지 여부에 관계없이 시험관내에서 항체 및/또는 T 세포 수용체에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 이중 면역원에 의해 유도된 것들을 포함하는 특이적인 체액성 또는 세포성 면역의 산물과 반응한다.

[0123] **~와 관련된**: 하나의 존재, 수준 및/또는 형태가 다른 하나의 것과 상관관계가 있는 경우 두 개의 이벤트 또는 엔터티들은 서로 “관련”된다. 예를 들어, 특정 엔터티(예: 폴리펩티드)는 그 존재, 수준 및/또는 형태가 질병, 장애 또는 질병의 발생률 및/또는 감수성과 관련이 있는 경우 특정 질병, 장애 또는 상태(예: 관련 모집단 전체)와 관련이 있는 것으로 간주된다. 일부 실시예에서, 2개 이상의 엔터티는 이들이 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용한다면 서로 물리적으로 “관련”되어 서로 물리적으로 근접해 있고 유지된다. 일부 실시형태에서, 서로 물리적으로 관련된 2개 이상의 엔터티는 서로에 공유 결합되고; 일부 실시형태에서, 물리적으로 서로와 관련된 2개 이상의 엔터티는 서로 공유 결합되는 것이 아니라, 예를 들어, 수소 결합, 반 데르 발스 상호작용, 소수성 상호작용, 자성 및 이들의 조합에 의해 비공유 결합된다. 일부 실시형태에서, “암 세포와 관련된 항원”과 관련하여 “와 관련된”이라는 용어는 암 세포의 표면 상의 특정 항원의 존재를 지칭한다.

[0124] **결합**: 본원에서 사용되는 용어 “결합”은 전형적으로 2개 이상의 엔터티 사이의 비공유 결합을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. “직접” 결합은 엔터티 또는 모이어티 간의 물리적 접촉을 포함하며; 간접 결합에는 하나 이상의 중간 엔터티와의 물리적 접촉을 통한 물리적 상호 작용이 포함된다. 2개 이상의 엔터티 사이의 결합은 상호 작용하는 엔터티 또는 모이어티가 분리되어 연구되거나 보다 복잡한 시스템의 맥락에서 연구되는 경우를 포함하여 다양한 맥락에서 평가될 수 있다(예: 운반체 엔터티와 및/또는 생물학적 시스템 또는 세포에서 공유적으로 또는 그 외 다른 방식으로 관련됨). 본원에서 사용되는 “ K_a ”는 결합 모이어티/표적 복합체를 형성하기 위한 특정 결합 모이어티와 표적의 결합 속도를 지칭한다. 본원에서 사용되는 “ K_d ”는 특정 결합 모이어티/표적 복합체의 해리 속도를 지칭한다. 본 명세서에서 “ K_D ”는 K_d 와 K_a 의 비율(즉, K_d/K_a)로부터 얻어지는 해리 상수를

의미하며, 몰 농도(M)로 표시된다. K_D 값은, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명을 사용하거나 Biacore® 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하여 당업계에 잘 확립된 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

- [0125] **담체:** 본원에서 사용되는 용어 “담체”는 조성물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 일부 예시적인 실시형태들에서, 담체는, 예를 들어, 물, 그리고 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 출처의 오일을 비롯한 오일, 예를 들어, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등과 같은 멸균 액체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 담체는 하나 이상의 고체 성분이거나 이를 포함한다.
- [0126] **특징적인 부분:** 본원에서 사용되는 용어 “특징적인 부분”은, 가장 넓은 의미에서, 상응 물질의 존재(또는 부재)가 그 물질의 특정 특징, 속성 또는 활성의 존재(또는 부재)와 상관관계가 있는 물질의 일부를 지칭하기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 물질의 특징적인 부분은 상응 물질 및 특정 특징, 속성 또는 활성을 공유하는 관련 물질에서 발견되지만 특정 특징, 속성 또는 활성을 공유하지 않는 물질에서는 발견되지 않는 부분이다.
- [0127] **키메라 항원 수용체:** 본원에서 사용되는 용어 “키메라 항원 수용체” 또는 “CAR”은 하나 이상의 세포외 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체로부터 유도됨), 막횡단 영역, 및 하나 이상의 세포내 이펙터 도메인들로 구성된 조작된 수용체를 지칭한다. CAR은 일반적으로 원하는 세포 표면 항원 또는 MHC-펩티드 복합체에 대한 특이성을 재지시하기 위해 T 세포와 같은 면역 세포에 도입된다. 이러한 합성 수용체는 일반적으로 단일 융합 분자에서 가요성 링커를 통해 하나 이상의 신호전달 도메인과 관련된 표적 결합 도메인을 포함한다. 표적 결합 도메인은 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 병리학적 세포(예를 들어, 암 세포) 표면의 특정 표적으로 지시하기 위해 사용되며 신호전달 도메인은 면역 세포(예: T 세포) 활성화와 증식을 위한 분자 기계(molecular machinery)를 포함한다. 일반적으로 면역 세포(예: T 세포) 막을 통과하는(즉, 막횡단 도메인을 형성하는) 가요성 링커는 CAR의 표적 결합 도메인의 세포막 제시를 가능하게 한다. CAR은 성공적으로 면역 세포(예를 들어, T 세포)가 림프종 및 고형 종양을 포함하는 다양한 악성 종양으로부터의 종양 세포 표면에서 발현되는 항원에 대해 재지시되도록 하였다(Gross 외, (1989) *Transplant Proc.*, 21(1 Pt 1): 127-30; Jena 외, (2010) *Blood*, 116(7):1035-44). CAR의 세포외 결합 도메인은 쥐 또는 인간화 단일클론 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 영역을 융합하여 유래된 단일쇄 가변 단편(scFv)으로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 단일 도메인 항체를 포함한다. 대안적으로, (예를 들어 Fab 라이브러리로부터 얻은 항체 대신에) Fab로부터 유래된 scFv가 사용될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 이러한 scFv는 막횡단 도메인에 융합된 다음 세포내 신호전달 도메인에 융합된다.
- [0128] 적어도 3세대의 CAR이 개발되었다. 1세대 CAR은 CD3체타 또는 Fc 수용체 감마 사슬의 세포질 영역에서 과생된 신호전달 도메인에 부착된 표적 결합 도메인을 포함했다. 1세대 CAR은 T 세포를 선택된 표적에 성공적으로 재지시하는 것으로 나타났지만 생체 내에서 장기적인 확장 및 항종양 활성을 제공하지 못했다. 2세대 및 3세대 CAR은 CD28, OX-40(CD134) 및 4-1BB(CD137)와 같은 공동자극 분자를 포함시켜, 변형된 T 세포 생존을 강화하고 증식을 증가시키는 데 중점을 두었다. 본원에 기재된 실시형태는 부분적으로, 예를 들어, TGFβ 신호전달 경로 조절제로 CAR-T를 아머드시켜 상응 면역요법을 암, 특히, 고형 종양 암을 치료할 때 더 효과적이게 함으로써 CAR-T 함유 면역요법을 추가로 개선하는 데 초점을 둔다. 본원에서 제공되는 아머드 CAR은 언아머드 CAR-T 세포에 비해 적대적인 종양 미세환경에 직면하여 CAR-T 기능 및 생존을 개선하거나 향상시킨다.
- [0129] **코돈-최적화:** 본원에서 사용되는 “코돈-최적화된” 핵산 서열은 핵산 서열의 번역 및 생성된 단백질의 발현이 특정 발현 시스템에 대해 최적화되어 개선되도록 변경된 핵산 서열을 의미한다. “코돈-최적화” 핵산 서열은 “코돈-최적화” 핵산 서열이 기반으로 하는 최적화되지 않은 모 서열과 동일한 단백질을 인코딩한다. 예를 들어, 핵산 서열은 포유동물 세포(예를 들어, CHO 세포, 인간 세포, 마우스 세포 등), 박테리아 세포(예를 들어, 대장균), 곤충 세포, 효모 세포 또는 식물 세포에서의 발현을 위해 “코돈-최적화” 될 수 있다.
- [0130] **비등한:** 본원에서 사용된 “비등한”이라는 용어는 서로 동일하지 않을 수 있지만 관찰된 차이점이나 유사점을 기반으로 결론이 합리적으로 도출될 수 있도록 서로 간의 비교를 허용하기에 충분히 유사한 둘 이상의 제제, 엔티티, 상황, 조건들의 세트 등을 의미한다. 당업자는 2개 이상의 이러한 제제, 엔티티, 상황, 조건들의 세트 등이 비등한 것으로 간주되기 위해 임의의 주어진 상황에서 어느 정도의 동일성이 요구되는지를 상응 맥락에서 이해할 것이다.
- [0131] **~에 상응하는:** 본원에서 사용되는 “~에 상응하는”이라는 용어는 종종 관심 폴리펩티드에서 아미노산 잔기의 위치/동일성을 지정하기 위해 사용된다. 당업자는, 간결성을 위해 폴리펩티드 내의 잔기가 종종 참조 관련 폴리펩티드를 기반으로 하는 표준 넘버링 시스템을 사용하여 지정되며, 그리하여, 예를 들어 위치 190의 잔기에 “상응하는” 아미노산이 실제로 특정 아미노산 사슬의 190번째 아미노산일 필요는 없지만, 참조 폴리펩티드의

190번에서 발견되는 잔기에 상응하며; 당업자는 “상응하는” 아미노산을 식별하는 방법을 쉽게 이해할 것이다.

[0132] **~로부터 유래된:** 본원에 사용된 “~로부터 유래한” 또는 “지정된 서열에 특이적인”이라는 문구는, 예를 들어, 지정된 서열의 연속 영역에 상응하는, 즉, 연속 영역에 동일하거나 상보적인, 대략 적어도 6개의 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 아미노산, 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드 또는 적어도 3개의 아미노산, 적어도 약 10-12개의 뉴클레오타이드 또는 4개의 아미노산, 또는 적어도 약 15-21개의 뉴클레오타이드 또는 5-7개의 아미노산의 연속 서열을 포함하는 서열을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 이러한 서열은 지정된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 모두를 포함한다. 이러한 서열은 당업계에 공지된 기술로 결정하여 특정 서열에 고유한 서열 영역에 상보적이거나(폴리뉴클레오타이드 서열의 경우) 이와 동일할 수 있다. 서열들이 유래될 수 있는 영역은 특정 에피토프를 인코딩하는 영역, CDR을 인코딩하는 영역, 프레임워크 서열을 인코딩하는 영역, 불변 도메인 영역을 인코딩하는 영역, 가변 도메인 영역을 인코딩하는 영역 및 비변역 및/또는 비 전사 영역을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 유래된 서열은 반드시 연구 중인 관심 서열로부터 물리적으로 유래되어야 하는 것은 아니며, 폴리뉴클레오타이드가 유래된 영역(들)의 염기 서열에 의해 제공된 정보에 기초한 화학 합성, 복제, 역전사 또는 전사를 비롯한(그러나 이에 제한되지 않음) 임의의 방식으로 생성될 수 있다. 따라서, 이는 원래 폴리뉴클레오타이드의 센스 또는 안티센스 배향을 나타낼 수 있다. 또한, 지정된 서열의 영역에 상응하는 영역들의 조합은 당업계에 공지된 방식으로 의도한 용도와 일치하도록 변형되거나 조합될 수 있다. 예를 들어, 서열은 2개 이상의 연속 서열을 포함할 수 있는데, 이들 서열 각각은 지정된 서열의 일부를 포함하고 지정된 서열에 동일하지는 않지만 지정된 서열로부터 유도된 서열을 나타내는 영역에 의해 중단된다. 항체 분자와 관련하여, “이로부터 유래된”은 비교 항체와 기능적으로 또는 구조적으로 관련된 항체 분자를 포함하는데, 예를 들어, “이로부터 유래된”은 유사하거나 실질적으로 동일한 서열 또는 구조를 갖는, 예를 들어, 동일한 서열 또는 구조를 갖는, 예를 들어, 동일 또는 유사한 CDR, 프레임워크 또는 가변 영역을 갖는 항체 분자를 포함한다. 항체에 있어서 “이로부터 유래된”은 또한 잔기, 예를 들어, 하나 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 잔기를 포함하며, 이는 연속할 수도 있고 연속하지 않을 수도 있지만, 넘버링 체계 또는 일반적인 항체 구조에 대한 상동성 또는 비교 서열의, 즉, CDR 또는 프레임워크 영역 내에서의 3차원 근접성에 따라 정의되거나 식별된다. “이로부터 유래된”이라는 용어는 이로부터 물리적으로 유래된 것에 제한되지 않고, 예를 들어, 또 다른 항체를 설계하기 위해 비교 항체로부터의 서열 정보를 사용하는 것과 같은 임의의 방식에 의한 생성을 포함한다.

[0133] **결정하다:** 본원에 기재된 많은 방법론들은 “결정” 단계를 포함한다. 본 명세서를 읽는 당업자는 이러한 “결정”이, 예를 들어, 본원에 명시적으로 언급된 특정 기술을 비롯하여 당업자가 이용할 수 있는 다양한 기술들 중 어느 하나를 이용할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 실시형태에서, 결정은 물리적 샘플의 조작을 수반한다. 일부 실시형태에서, 결정은, 예를 들어, 관련 분석을 수행하도록 적응된 컴퓨터 또는 기타 처리 장치를 활용하는 데이터 또는 정보의 고려 및/또는 조작을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결정은 출처로부터 관련 정보 및/또는 자료를 받는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결정은 샘플 또는 엔터티의 하나 이상의 특징을 비교 가능한 참조와 비교하는 것을 수반한다.

[0134] **조작된:** 본원에 사용된 용어 “조작된”은 사람에 의해 설계 또는 변형된 및/또는 그 존재 및 생산이 사람의 개입 및/또는 활동을 필요로 하는 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩티드 또는 세포를 설명한다. 특정 효과를 도출하도록 의도적으로 설계되고 동일한 유형의 자연 발생 세포의 효과와 다른 조작된 세포가 그 예이다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 발현한다.

[0135] **이펙터 기능:** 본원에서 사용되는 용어 “이펙터 기능”은 본원에 기재된 항원 결합체에 기인하는 생물학적 활성을 의미한다. 항체 이펙터 기능들의 예에는 다음이 포함된다: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC); 식작용; 세포 표면 수용체들(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 그리고 B 세포 활성화. “감소되거나 최소화된” 항체 이펙터 기능은 야생형 또는 변형되지 않은 항체에서 적어도 50%(또는 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)만큼 감소되는 것을 의미한다. 항체 이펙터 기능의 결정은 당업자에 의해 쉽게 결정되고 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 보체 결합, 보체 의존성 세포독성 및 항체 의존성 세포독성의 항체 이펙터 기능이 영향을 받는다. 일부 실시형태에서, 이펙터 기능은 당화를 제거한 불변 영역에서의 돌연변이, 예를 들어, “무 이펙터 돌연변이”를 통해 제거된다. 한 양상에서, 무 이펙터 돌연변이는 CH2 영역의 N297A 또는 DANA 돌연변이(D265A+N297A)이다. Shields 외, J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604 (2001). 또는 이펙터 기능을 감소시키거나 제거하는 추가 돌연변이에는 K322A 및 L234A/L235A(LALA)가 포함된다. 대안적으로, 이펙터 기능은 당화되지 않는 숙주 세포(예: 대장균)에서의 발현, 또는 이펙터 기능을 촉진하는 데 효과가 없거나 덜 효과적인 변형된 당화 패턴을 생성(예를 들어, Shinkawa 외, J. Biol. Chem. 278(5):3466-3473(2003))하는 숙주 세포에서의 발현과 같은 생산 기술을 통해 감소되거나

제거될 수 있다.

- [0136] **에피토프:** 본원에서 사용되는 용어 “에피토프”는 면역글로불린(예를 들어, 항체 또는 수용체) 결합 성분에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 특이적으로 인식되는 임의의 모이어터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 에피토프는 항원 내의 복수의 아미노산으로 구성된다. 일부 실시형태에서, 이러한 아미노산 잔기는 항원이 관련된 3차원 형태를 채택할 때 표면 노출된다. 일부 실시형태에서, 아미노산 잔기는 항원이 이러한 입체형태를 채택할 때 공간적으로 서로 물리적으로 가깝거나 서로 윗쪽을 이룬다. 일부 실시형태에서, 아미노산의 적어도 일부는 항원이 대안적 입체형태를 채택할 때(예를 들어, 선형화됨, 예를 들어, 비선형 에피토프) 서로 물리적으로 분리된다.
- [0137] **부형제:** 본원에서 사용되는 용어 “부형제”는, 예를 들어, 원하는 점도 또는 안정화 효과를 제공하거나 이에 기여하기 위해 약학 조성물에 포함될 수 있는 비-치료제를 지칭한다. 적합한 약학 부형제는, 예를 들어, 전분, 포도당, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 및 등을 포함한다.
- [0138] **발현:** 용어 “발현” 또는 “발현된”은 본원에서 핵산과 관련하여 사용될 때 다음 사건들 중 하나 이상을 지칭한다: (1) DNA 템플릿의 RNA 전사체 생성(예: 전사에 의해); (2) RNA 전사체의 가공(예를 들어, 스플라이싱, 편집, 5' 캡 형성 및/또는 3' 말단 형성에 의해); (3) RNA를 폴리펩티드로 번역; 및/또는 (4) 폴리펩티드의 번역 후 변형.
- [0139] **생체 외:** 본원에서 사용되는 용어 “생체 외”는 세포들이 살아있는 유기체로부터 제거되어 유기체 외부(예를 들어, 시험관 내, 배양 백 내, 생물 반응기 내)에서 증식되는 과정을 의미한다.
- [0140] **융합 단백질:** 본원에서 사용되는 용어 “융합 단백질”은 2개의 상이한(예를 들어, 이종) 단백질들의 적어도 일부를 인코딩하는 핵산 서열들로부터 조작된 핵산 서열에 의해 인코딩되는 단백질을 지칭한다. 당업자는 의심의 여지없이 알고 있으므로, 융합 단백질을 생성하기 위해 생성된 관독값이 내부 정지 코돈을 포함하지 않도록 핵산 서열을 연결한다.
- [0141] **숙주:** 용어 “숙주”는 본원에서 인간 또는 임의의 비-인간 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말, 비인간 영장류) 또는 시스템(예를 들어, 세포 또는 세포주)을 지칭하기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 숙주는 본원에 기재된 CAR 및/또는 TGFβ 조절제를 발현하는 세포 또는 세포 집단이 투여되는 유기체이다. 일부 실시형태에서, 세포 집단을 투여하면 숙주에서 면역 반응이 개선된다.
- [0142] **숙주 세포:** 본원에서 사용되는 “숙주 세포”라는 문구는 외인성 DNA(재조합 또는 기타)가 도입되어 있는 세포를 지칭한다. 예를 들어, 숙주 세포는 표준 재조합 기술에 의해 본원에 기재된 바와 같이 변형된 CAR 분자를 생성하는 데 사용될 수 있다. 본 명세서를 읽을 때 당업자는 이러한 용어가 특정 대상 세포, 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손을 지칭함을 이해할 것이다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 특정 변형이 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본 명세서에 사용된 용어 “숙주 세포”의 범위 내에 여전히 포함된다.
- [0143] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 인간 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 외인성 DNA(예를 들어, 재조합 핵산 서열)를 발현하기에 적합한 임의의 원핵 및 진핵 세포를 포함한다. 예시적인 세포는 원핵생물 및 진핵생물의 세포(단일 세포 또는 다중 세포), 박테리아 세포(예를 들어, 대장균, 바실루스 종, 스트렙토마이세스 종 등의 균주), 마이코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포(예, S. 세레비시아에, S. 폼베, P. 파스토리스, P. 메타놀리카 등), 식물세포, 곤충세포(예, SF-9, SF-21, 배콜로바이러스 감염 곤충세포, 트리코플루시아 니(Trichoplusia ni) 등), 비인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 예를 들어, 하이브리도마 또는 퀴드로마와 같은 세포 융합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 래트 또는 마우스 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 진핵세포이고 하기 세포로부터 선택된다: CHO (예를 들어, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예를 들어, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장(예를 들어, HEK293, HEK293T, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (표피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, 세르틀리 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포, 및 전술한 세포로부터 유래된 세포주. 일부 실시형태에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포(예를 들어, PER.C6TM 세포)를 포함한다.
- [0144] **자가면역 반응:** 본원에서 사용되는 용어 “면역 반응”은 B 세포, T 세포, 수지상 세포, 대식세포 또는 다형핵

구와 같은 면역계 세포의 항원 또는 백신과 같은 자극에 대한 반응을 의미한다. 면역 반응은, 예를 들어, 인터페론 또는 사이토카인을 분비하는 상피 세포를 포함하여 숙주 방어 반응에 관여하는 임의의 신체 세포를 포함할 수 있다. 면역 반응은 선천적 및/또는 후천적 면역 반응을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 면역 반응을 측정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 림프구(예를 들어, B 또는 T 세포)의 증식 및/또는 활성화, 사이토카인 또는 케모카인의 분비, 염증, 항체 생산 등을 측정하는 것이 포함된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 본원에 기재된 아머드 또는 언아머드 CAR-T 세포의 투여 후에 관찰되는 면역 반응을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 아머드 CAR-T 세포의 투여 후 면역 반응은 CAR 발현 세포의 증식 증가, CAR 발현 세포에 의한 IFN γ 생산 증가, CAR 발현 세포의 IL-2 생산 증가, 숙주 면역 세포의 증식 증가, 숙주 면역 세포에 의한 IFN γ 생성 증가, 숙주 면역 세포의 IL-2 생산 증가, 숙주 항원 제시 세포에 의한 항원 제시 증가, 숙주 항원 제시 세포에 의한 공동자극 증가, 내피 활성화 증가 또는 면역 세포(예: NK 세포, T 세포, 대식세포)의 증양 귀소 증가 중 하나 이상에 의해 측정된다.

[0145] **시험관 내:** 본원에서 사용되는 용어 “시험관내”는 다세포 유기체 내부가 아닌, 인공 환경, 예를 들어, 시험관 또는 반응 용기, 세포 배양물, 등에서 발생하는 사건들을 지칭한다.

[0146] **생체 내:** 본원에서 사용되는 용어 “생체내”는 인간 및 비인간 동물과 같은 다세포 유기체 내에서 발생하는 사건을 의미한다. 세포 기반 시스템과 관련하여, 이 용어는 살아있는 세포 내에서 발생하는 사건을 지칭하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, 시험관 내 시스템과 반대).

[0147] **단리된:** 본원에서 사용된 용어 “단리된”은 (1) 초기에 생산되었을 때(자연에서 및/또는 실험 환경에서) 관련된 구성 요소들 중 적어도 일부로부터 분리된 및/또는 (2) 인간의 개입으로 설계, 생산, 준비 및/또는 제조된 물질 및/또는 엔터티를 의미한다. 단리된 물질 및/또는 엔터티는 이들이 처음에 결합되었던 다른 구성요소들 중 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 이상으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단리된 제제는 순도가 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 이상이다. 본원에서 사용될 때, 소정의 물질에 다른 성분들이 실질적으로 없는 경우 이 물질은 “순수”하다. 일부 실시형태에서, 당업자가 이해하는 바와 같이, 물질은, 예를 들어, 하나 이상의 담체 또는 부형제(예를 들어, 완충액, 용매, 물 등)와 같은 특정 다른 성분과 조합된 후에도 여전히 “단리된” 또는 심지어 “순수한” 것으로 간주될 수 있으며; 이러한 실시형태에서, 물질의 단리율 또는 순도는 이러한 담체 또는 부형제를 포함하지 않고 계산된다. 한 예를 제공하기 위해, 일부 실시형태에서, 자연에서 발생하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 생물학적 중합체는 a) 그 기원 또는 유래 출처로 인해 자연 상태에서의 그 본래 상태로 존재하는 구성요소들의 일부 또는 전부와 결합되지 않은 경우; b) 자연에서 그것을 생산하는 종에서 유래한, 동일한 종의 다른 폴리펩티드 또는 핵산이 실질적으로 없는 경우; c) 자연에서 그것을 생산하는 종의 것이 아닌 세포 또는 다른 발현 시스템으로부터의 구성요소들에 의해 발현되거나 그 외 다른 방식으로 관련되어 있는 경우 “단리된” 것으로 간주된다. 따라서, 예를 들어, 일부 실시형태에서, 화학적으로 합성되거나, 또는 자연에서 생산하는 것과 상이한 세포 시스템에서 합성되는 폴리펩티드는 “단리된” 폴리펩티드로 간주된다. 일부 실시형태에서, 세포는 세포에 자연적으로 수반되는 분자 및/또는 세포 성분들로부터 분리된 “단리된 세포”일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 일부 실시형태에서, 하나 이상의 정제 기술을 거친 세포는 a) 자연에서 이와 결합되어 있는/있거나 b) 처음 생산되었을 때 이와 결합되어 있었던 다른 성분들로부터 분리되어 있었던 정도까지 “단리된” 세포로 간주될 수 있다.

[0148] **링커:** 본원에서 사용되는 용어 “링커”는 2개 이상의 폴리펩티드 또는 핵산을 공유적으로 부착시켜 이들이 서로 연결되도록 하는 작용기(예를 들어, 화학 물질 또는 폴리펩티드)를 지칭한다. 본원에서 사용되는 “펩티드 링커”는 2개의 단백질을 함께 커플링(예를 들어, VH 및 VL 도메인을 커플링)하는데 사용되는 하나 이상의 아미노산을 지칭한다.

[0149] **조절하다 또는 조절제:** 본원에서 사용되는 용어 “조절하다” 또는 “조절제”는 관련 기능을 긍정적으로 또는 부정적으로 변경하는 구성요소의 능력을 지칭한다. 예시적인 조절은 약 1%, 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 50%, 약 75%, 또는 약 100% 변화를 포함한다. 예를 들어, 본원에서는 TGF β 수용체가 신호전달을 변경하거나 방해할 수 있는 TGF β 신호전달 조절제를 제공한다. 당업자는 이것이 TGF β R의 신호전달을 활성화하는 사이토카인(즉, TGF β) 또는 수용체 자체(예를 들어, TGF β 항체 또는 이의 단편, TGFBR 항체 또는 이의 단편)에 결합함으로써 달성될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서 이 용어는 TGF β 에 결합하는 분자와 TGF β R에 결합하는 분자들 모두 포함한다. 한 실시형태에서, 본 발명의 조절제는 TGF β RII를 통해 TGF β 신호전달을 중화시킬 수 있다. “중화”는 TGF β 의 존재가 TGF β RII 신호전달에 대해 중립적인 효과를 갖도록 TGF β 의 정상적인 신호전달 효과가

차단됨을 의미한다. 일부 실시형태에서, TGFβ 조절제는 숙주에서 면역 반응을 향상시킨다.

[0150] 핵산: 본원에서 사용되는 문구 “핵산”은 올리고뉴클레오티드 사슬에 통합되거나 통합될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 포스포디에스테르 링키지를 통해 올리고뉴클레오티드 사슬에 통합되거나 통합될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 내용상 자명한 바와 같이, 일부 실시형태에서 “핵산”은 개별 핵산 잔기(예: 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)를 의미하고; 일부 실시형태에서 “핵산”은 개별 핵산 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오티드 사슬을 의미한다. 일부 실시형태에서, “핵산”은 RNA이거나 이를 포함하며; 일부 실시형태에서, “핵산”은 DNA이거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 천연 핵산 잔기이거나, 이를 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 핵산 유사체이거나, 이를 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 핵산 유사체는 포스포디에스테르 백본을 이용하지 않는다는 점에서 핵산과 상이하다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 핵산은 당업계에 공지되어 있고 백본에서 포스포디에스테르 결합 대신에 펩티드 결합을 갖는 핵산은 하나 이상의 “펩티드 핵산”이거나, 이를 포함하거나, 이들로 구성되며, 이는 본 발명의 범위에 속하는 것으로 고려된다. 대안적으로 또는 추가로, 일부 실시형태에서, 핵산은 포스포디에스테르 결합보다는 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 5'-N-포스포라미다이트 링키지를 갖는다. 일부 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 천연 뉴클레오시드(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우라실, 테옥시아데노신, 테옥시티미딘, 테옥시구아노신 및 테옥시시티딘)이거나, 이를 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 뉴클레오시드 유사체(예를 들어, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피콜로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우라실, 2-아미노아데노신, C5-브로모우라실, C5-플루오로우라실, C5-요오도우라실, C5-프로피닐-우라실, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-테아자아데노신, 7-테아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화된 염기, 삽입된 염기 및 이들의 조합)이거나 이를 포함하거나 이들로 구성된다. 일부 실시형태에서, 핵산은 천연 핵산과 비교하여 하나 이상의 변형된 당(예를 들어, 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-테옥시리보스, 아라비노스 및 핵소스)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 RNA 또는 단백질과 같은 기능적 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 인트론을 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 천연 공급원으로부터의 단리, 상보적 템플릿에 기초한 중합에 의한 효소 합성(생체내 또는 시험관내), 재조합 세포 또는 시스템에서의 재생산, 및 화학적 합성 중 하나 이상에 의해 제조된다. 일부 실시형태에서, 핵산은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000개 또는 그 이상 잔기 길이이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 단일 가닥이고; 일부 실시형태에서 핵산은 이중 가닥이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 폴리펩티드를 인코딩하는 적어도 하나의 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 가지거나, 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열의 상보체이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 효소 활성을 갖는다.

[0151] 약학적으로 허용되는 비히클: 본 발명에 유용한 약학적으로 허용되는 담체(비히클)는 통상적이다. 문헌 Remington's Pharmaceutical Sciences, by EW Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition(1975)은 하나 이상의 치료 조성물의 약학적 전달에 적합한 조성물 및 제형을 기술한다. 일반적으로 담체의 특성은 사용되는 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 비경구 제형은 일반적으로 비히클로서 물, 생리 식염수, 균형 염 용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등과 같은 약학적 및 생리학적으로 허용되는 유체를 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물(예를 들어, 분말, 알약, 정제 또는 캡슐 형태)의 경우, 통상적인 비독성 고체 담체는 예를 들어, 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 스테아르산마그네슘을 포함할 수 있다. 생물학적으로 중성인 담체 이외에, 투여되는 약학 조성물은 습윤제 또는 유화제, 방부제 및 pH 완충제 등, 예를 들어, 소듐 아세테이트 또는 소르비탄 모노라우레이트와 같은 비독성 보조 물질을 소량 함유할 수 있다.

[0152] 폴리펩티드: 일반적으로 “폴리펩티드”는 펩티드 결합에 의해 서로 결합된 적어도 2개의 아미노산의 스트링이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 적어도 3-5개의 아미노산을 포함할 수 있으며, 이들 각각은 적어도 하나의 펩티드 결합을 통해 다른 것에 부착된다. 당업자는 폴리펩티드가 때때로 “비-천연” 아미노산 또는 그럼에도 불구하고 선택적으로 폴리펩티드 사슬에 통합될 수 있는 다른 엔티티를 포함한다는 것을 인식할 것이다. 일부 실시형태에서, 용어 “폴리펩티드”는 항체, 키메라 항원 수용체 또는 공동자극 도메인 폴리펩티드 등과 같은 특정 기능적 부류의 폴리펩티드를 지칭하기 위해 사용된다. 각각의 이러한 부류에 대해, 본 명세서에서는 상응 부류에 속하는 공지된 예시적인 폴리펩티드의 아미노산 서열들의 몇 가지 예를 제공하고/하거나 당업계에 이러한 몇 가지 예가 알려져있으며; 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이러한 공지된 폴리펩티드는 상응 부류에 대한

참조 폴리펩티드이다. 이러한 실시형태에서, 용어 “폴리펩티드”는 관련 참조 폴리펩티드와 충분한 서열 상동성 또는 동일성을 나타내는 분류의 임의의 구성원을 지칭하며, 이는 상응 분류에 포함되어야 함을 당업자가 이해할 것이다. 많은 실시형태에서, 대표적인 분류의 구성원은 또한 참조 폴리펩티드와 상당한 활성을 공유한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 구성원 폴리펩티드는 적어도 약30-40%인 참조 폴리펩티드와의 전체 서열 상동성 또는 동일성 정도를 나타내며, 이는 종종 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 보다 크고 및/또는 매우 높은 서열 상동성, 종종 90% 초과 또는 심지어 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 매우 높은 서열 동일성을 보이는 적어도 하나의 영역(즉, 보존 영역, 종종 특징적 서열 요소 포함)을 포함한다. 이러한 보존된 영역은 일반적으로 적어도 3-4개, 종종 최대 20개 이상의 아미노산을 포함하고; 일부 실시형태에서, 보존된 영역은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 이상의 인접 아미노산의 적어도 하나의 스트레치를 포함한다.

[0153] 본 발명의 항체 및 항원 결합체는 추가의 보존적 또는 필수수 아미노산 치환을 가질 수 있으며, 이는 폴리펩티드 기능에 실질적인 영향을 미치지 않는 것으로 이해된다. 특정 치환이 허용되는지 여부, 즉, 결합 활성과 같은 원하는 생물학적 특성에 악영향을 미치지 않는지 여부는 Bowie, J U 외 Science 247:1306-1310 (1990) 또는 Padlan 외 FASEB J. 9:133-139 (1995)에 기재되어 있는 바와 같이 결정될 수 있다. “보존적 아미노산 치환”은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄들을 가지는 아미노산 잔기들의 패밀리가 당업계에 정의되어 있다. 이들 패밀리들은 염기성 측쇄(가령, 리산, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(가령, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띄지 않는 극성 측쇄(가령, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(가령, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-가치 측쇄(가령, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(가령, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가지는 아미노산들을 포함한다.

[0154] **예방:** 본원에 사용된 용어 “예방”은 예방, 질병 징후의 회피, 발병 지연, 및/또는 특정 질병, 장애 또는 병태(예를 들어, 암)의 하나 이상의 징후들의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 예방은 모집단 기준으로 평가되며, 특정 질병, 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상의 발생, 빈도 및/또는 강도에 있어서 통계적으로 유의한 감소가 이러한 질병, 장애 또는 병태에 민감한 집단에서 관찰되는 경우, 상응 제제가 이러한 질병, 장애 또는 병태를 “예방”하는 것으로 간주된다.

[0155] **순수한:** 본원에서 사용되는 제제 또는 엔터티는 다른 성분들이 실질적으로 없는 경우 “순수”하다. 예를 들어, 약 90% 이상의 특정 물질 또는 엔터티를 포함하는 제제는 일반적으로 순수 제제로 간주된다. 일부 실시형태에서, 제제 또는 엔터티는 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 순수하다.

[0156] **재조합체:** 본원에 사용된 용어 “재조합”은 재조합 수단에 의해 설계, 조작, 준비, 발현, 생성 또는 분리된 폴리펩티드(예를 들어, 본원에 기재된 폴리펩티드), 예를 들어, 숙주 세포에 형질감염시킨 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 폴리펩티드, 재조합체, 조합형의 폴리펩티드 라이브러리, 또는 선택된 서열 요소들을 서로에 대해 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 단리된 폴리펩티드를 지칭하는 것으로 한다. 일부 실시형태에서, 이러한 선택된 서열 요소들 중 하나 이상은 자연에서 발견된다. 일부 실시형태에서, 이러한 선택된 서열 요소 및/또는 이들의 조합 중 하나 이상은 인 실리코로 설계된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소들은 동일한 폴리펩티드에 자연적으로 존재하지 않는 다수(예를 들어, 2개 이상)의 공지의 서열 요소들의 조합으로부터 생성된다.

[0157] **참조:** 용어 “참조”는 표준 또는 대조군 제제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 가치를 설명하기 위해 본 명세서에서 종종 사용되며, 관심 대상의 제제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값이 이에 대해 비교된다. 일부 실시형태에서, 참조 제제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심 제제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값의 검사 또는 결정과 실질적으로 동시에 검사 및/또는 결정된다. 일부 실시형태에서, 참조 제제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은 선택적으로 유형의 매질(tangible medium)에서 구현된 역사적 참조이다. 전형적으로, 당업자가 이해하는 바와 같이, 참조 제제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심 제제, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값을 결정하거나 특성화하는 데 이용되는 것과 유사한 조건하에서 결정되거나 특성화된다.

[0158] **단일 도메인 항체:** 본원에 사용된 용어 “단일 도메인 항체(sdAb)”, “가변 단일 도메인” 또는 “면역글로불린 단일 가변 도메인(ISV)”, “단일 중쇄 가변 도메인(VH) 항체”는 표적 항원에 결합하는 항체의 단일 가변 단편을 지칭한다. 이러한 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. sdAb는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 단일 항원 결합 폴리펩티드이다. sdAb 단독은 상응하는 CDR 함유 폴리펩티드와 페어링하지 않고 항원에 결합

할 수 있다. 경우에 따라, 단일 도메인 항체는 낙타류 HCAb로부터 조작되며, 중쇄 가변 도메인은 “VHH” 라 지칭된다. 일부 VHH는 나노바디라고도 공지되어 있다. 낙타류 sdAb는 알려진 가장 작은 항원-결합 항체 단편 중 하나이다(예를 들어, Hamers-Casterman 외, Nature 363: 446-8 (1993); Greenberg 외, Nature 374: 168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh 외, Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013) 참조). 기본 VHH는 N-말단으로부터 C-말단으로 다음과 같은 구조를 가지며: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, 이 때 FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 나타내고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3을 나타낸다. 낙타 VHH 도메인은 당업계에서 이용 가능한 표준 기술에 따라 인간화될 수 있으며, 이러한 도메인은 “도메인 항체” 로 간주된다. 본원에 사용된 VH는 낙타류 VHH 도메인을 포함하고 VHH라는 용어는 중쇄만을 포함하는 인간 또는 낙타류 기원의 도메인 항체를 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 아래 설명된 바와 같이, 본 발명의 다양한 양상의 일부 실시형태는 경쇄의 부재시 TGFβ 항원에 결합하는 단일 중쇄 가변 도메인 항체/면역글로불린 중쇄 단일 가변 도메인을 포함하는 결합체에 관한 것이다.

[0159] **대상체:** 본원에서 사용되는 용어 “대상체” 는 인간을 포함하는 임의의 포유동물을 의미한다. 본 발명의 특정 실시형태에서 대상체는 성인, 청소년 또는 유아이다. 일부 실시형태에서, 용어 “개체” 또는 “환자” 가 사용되며 “대상체” 와 상호 교환 가능한 것으로 한다. 또한 약학 조성물의 투여 및/또는 자궁내 치료 방법의 수행이 본 발명에 의해 고려된다. 예를 들어, 대상체는 암(예를 들어, 위장관 기원), 암의 증상(이 때 적어도 일부 세포가 TGFβ를 발현함), 암(이 때 적어도 일부의 세포가 TGFβ를 발현함)에 대한 소인을 갖는 환자(예를 들어, 인간 환자 또는 수의과 환자)일 수 있다. 본 발명의 용어 “비인간 동물” 은, 달리 명시되지 않는 한, 모든 비인간 척추동물, 예를 들어, 비인간 포유동물 및 비인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은 비포유동물을 포함한다.

[0160] **실질적으로:** 본 명세서에서 사용되는 용어 “실질적으로” 는 관심 특성 또는 성질 전체를 또는 거의 전체 정도 또는 수준을 나타내는 정성적인 상태를 지칭한다. 생물학 분야의 숙련된 기술자는, 생물학적 및 화학적 현상들이, 좀처럼, 설명 있다 하더라도 완료되지 않고 및/또는 절대 결과를 완료하기 위해 진행 또는 구현 또는 회피하지 않음을 이해할 것이다. 그러므로 용어 “실질적으로” 는 본 명세서에서 많은 생물학적 및 화학적 현상에 고유한 완전성의 결핍 가능성을 포착하기 위해 사용된다.

[0161] **치료제:** 본원에서 사용되는 용어 “치료제” 는 생물학적 활성을 갖는 제제(예를 들어, 항원 결합제)를 지칭한다. 본원에서 상기 용어는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자 또는 생물학적 물질로부터 제조된 추출물을 나타내기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 치료제는 항암제 또는 화학요법제일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 “항암제” 또는 “화학요법제” 는 인간에서 신생물, 특히 암종, 육종, 림프종 또는 백혈병과 같은 악성(암성) 병변의 발생 또는 진행을 억제하는 기능적 특성을 갖는 제제를 지칭한다. 전이 또는 혈관신생의 억제는 종종 항암제 또는 화학요법제의 특성이다. 화학요법제는 세포독성제 또는 세포증식억제제일 수 있다. 용어 “세포증식억제제” 는 세포 성장 및/또는 세포 증식을 억제 또는 억제하는 제제를 의미한다.

[0162] **형질전환:** 본원에 사용되는 바와 같이, 외인성 DNA가 숙주 세포에 도입되는 임의의 과정을 지칭한다. 형질전환은 당업계에 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 자연적 또는 인공적 조건 하에서 일어날 수 있다. 형질전환은 외래 핵산 서열을 원핵 또는 진핵 숙주 세포에 삽입하기 위한 임의의 공지된 방법에 의존할 수 있다. 일부 실시형태에서, 특정 형질전환 방법론은 형질전환되는 숙주 세포에 기초하여 선택되며, 바이러스 감염, 전기천공, 짝짓기(mating), 리포펙션을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, “형질전환된” 세포는 삽입된 DNA가 자가 복제 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제가능하다는 점에서 안정적으로 형질전환된다. 일부 실시형태에서, 형질전환된 세포는 제한된 시간 동안 도입된 핵산을 일시적으로 발현한다.

[0163] **형질전환 성장 인자 β(TGFβ):** 본원에서 사용되는 용어 “TGF-베타”, “TGFβ”, “TGFβ” 및 “형질전환 성장 인자-베타” 는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며 인간으로부터의 임의의 TGF-베타의 전장 천연 아미노산 서열을 가지는 분자들의 패밀리를 지칭한다(전구체 및 성숙한 TGF-베타의 결합되거나 결합되지 않은 복합체 및 잠재적인 형태 (“latent TGF-beta”)를 포함). 본원에서 이러한 TGF-베타에 대한 언급은 TGF-베타1, TGF-베타2, TGF-베타3, TGF-베타4, 및 TGF-베타5를 비롯하여 현재 확인된 형태 및 이들의 잠재 버전들 중 어느 하나, 뿐만 아니라 임의의 공지된 TGF-베타의 서열로부터 유래되고 이러한 서열에 적어도 약 75%, 바람직하게는 적어도 약 80%, 보다 바람직하게는 적어도 약 85%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 90%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 95% 상동성인, 미래에 식별될 인간 TGF-베타 종들을 언급하는 것으로 이해될 것이다. 특정 용어 “TGF-베타1”, “TGF-베타2” 및 “TGF-베타3” 뿐만 아니라 “TGF-베타4” 및 “TGF-베타5” 는 예를 들어, 상기 Derynck 외, Nature, 상기 Seyedin 외, J. Biol. Chem., 262, 및 상기 deMartin 외의 문헌에 정의된 TGF-베타를 지칭한다.

용어 “TGF-베타” 는 인간 TGF-베타를 인코딩하는 유전자를 지칭한다. 바람직한 TGF-베타는 천연 서열 인간 TGF-베타이다.

[0164] TGF-베타 패밀리의 구성원은 분자의 성숙 부분에 9개의 시스테인 잔기를 갖고, 성숙 영역 내 다른 알려진 TGF-베타 서열에 적어도 65% 상동성을 공유하고, 동일한 수용체에 대해 경쟁할 수 있는 것으로 정의된다. 또한, 이들은 모두 N-말단 근처에서 높은 상동성 영역을 공유하는 더 큰 전구체로서 인코딩된 것으로 보이며 상응 전구체 부분에서 3개의 시스테인 잔기의 보존을 보여주는데, 이는 추후 가공에 의해 제거될 것이다. 게다가, TGF-베타는 아미노산이 4개 또는 5개인 가공 부위를 가지고 있는 것으로 보인다.

[0165] **형질전환 성장 인자-β 수용체(TGFβR):** 본원에서 사용되는, “TGF-βR” 또는 “TGF-β 수용체” 또는 “TGF-베타 수용체” 또는 “TGFβR” 이라는 용어는 TGFβR 계열의 모든 3가지 하위 유형(즉, TGFβR1, TGFβR2, TGFβR3)을 포함하기 위해 사용된다. TGFβ 수용체는 세린/트레오닌 키나제 활성을 특징으로 하며 동종이량체 또는 이종이량체일 수 있는 여러 가지 다른 이소형으로 존재한다.

[0166] **TGFβ 신호전달 경로 조절제 또는 TGFβ 조절제:** 본원에서 사용되는 용어 “TGFβ 신호전달 경로 조절제” 또는 “TGFβ 조절제” 는, 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, TGFβ 신호 전달 경로를 조절할 수 있는(예를 들어, 억제, 차단 또는 중화 효과를 갖는) 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)를 지칭하며, TGFβ 자체에 결합하거나 세포의 TGFβ 수용체에 결합할 수 있다. 두 경우 모두, 조절제는 (예를 들어, 사이토카인(즉, TGFβ) 자체에 결합함으로써) 또는 TGFβ에 대한 수용체에 결합함으로써 TGFβ 신호 전달 경로를 억제한다. 따라서 이 용어는 TGFβ에 결합하는 조절제와 TGFβ 수용체에 결합하는 조절제를 모두 포함한다. 본원에 기재된 다양한 실시형태에서 TGFβ 신호전달 경로 조절제는 변형된 면역 세포(예를 들어, CAR-T 세포)에서 키메라 항원 수용체와 함께 발현된다. 이러한 TGFβ 신호 전달 경로 조절제를 발현하는 CAR-T 세포는 본원에서 TGFβ 아머드 CAR-T 세포로 지칭된다.

[0167] **치료하다 또는 치료:** 본원에서 사용되는 용어 “치료하다” 또는 “치료” 는 대상체, 예를 들어, 환자에게 치료제를 투여하는 것 또는 대상체로 돌아갈 대상체로부터 단리된 조직 또는 세포에 투여하는 것, 예를 들어, 적용하는 것으로 정의된다. 일부 실시형태에서, 치료제는 아머드 CAR-T 세포(예를 들어, TGFβ 조절제를 공동-발현하는 조작된 CAR T 세포)이다. 치료는 장애, 장애의 증상 또는 장애, 예를 들어 암에 대한 소인을 완치, 치유, 경감, 완화, 변경, 치료, 개선, 완화, 향상 또는 영향을 주는 것일 수 있다. 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 치료는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 억제, 제거 또는 사멸을 야기하거나, 그렇지 않으면 세포, 예를 들어 비정상 세포가 장애, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 장애(예를 들어, 암)를 매개하는 능력을 감소시키는 것으로 생각된다.

[0168] 본원에 기재된 본 발명은 치료적, 예방적 또는 방지적 치료를 위한 “유효량” 으로 사용된다. 본원에 기재된 아머드 CAR-T 세포(예를 들어, CAR 및 TGFβ 신호전달 조절제를 공동-발현하는 조작된 세포)의 치료적 유효량은 질병(예를 들어, 암)의 하나 이상의 증상을 개선 또는 감소시키거나, 이를 예방 또는 치유하는데 유효한 양이다.

[0169] **가변 영역 또는 도메인:** 본원에서 사용되는 용어 항체의 “가변 영역” 또는 “가변 도메인” 은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 “VH” 및 “VL” 로 지칭될 수 있다. 이러한 도메인은 일반적으로 (동일 분류의 다른 항체들에 비해) 상응 항체의 가장 가변적인 부분이며 항원 결합 부위를 포함한다. 중쇄 전용 항체에는 단일 중쇄 가변 영역이 있다.

[0170] **벡터:** 본원에서 사용되는 용어 “벡터” 는 이것에 연결된 또다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 유형은 추가 DNA 분절이 결합될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 나타내는 “플라스미드” 이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 이 때 추가 DNA 분절은 바이러스 게놈에 결합될 수 있다. 특정 벡터(예를 들면, 세균 복제 기점을 갖는 세균 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터)는 그들이 도입되는 숙주 세포에서 자동 복제할 수 있다. 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 “발현 벡터” 로 지칭된다.

[0171] **특정 실시형태들의 상세한 설명**

[0172] 본 발명은 TGFβ 신호전달을 조절하는 폴리펩티드로 아머드된 변형된 면역 세포(예를 들어, CAR-T 세포)를 사용하여 암 및 병원체에 대한 면역 반응을 강화하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 설명된 특정 방법들 및 실험 조건들에 제한되는 것이 아니며, 이와 같은 방법 및 조건은 달라질 수 있다. 본 명세서에서 사용되

는 용어는 특정 실시형태들을 오직 설명하기 위한 것이며, 달리 언급이 없는 한 제한을 하고자 하는 것이 아니므로, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것임을 또한 이해하여야 한다.

[0173] **TGF- β /SMAD 신호전달**

[0174] 형질전환 성장 인자-베타(TGF- β)는 원래 정상 섬유아세포를 고정-독립적 성장이 가능한 세포로 형질전환시키는 능력으로 인해 명명된 다기능 사이토카인이다. TGF- β 신호전달은 증식, 분화, 생존, 이동 및 상피 중간엽 전이를 비롯한 많은 주요 세포 기능을 제어한다. 이것은 세포 외 기질 형성, 상처 치유, 배아 발달, 뼈 발달, 조혈, 면역 및 염증 반응, 및 악성 형질전환과 같은 다양한 생물학적 과정을 조절한다. TGF- β 의 탈조절은 선천적 결함, 암, 만성 염증, 자가면역 및 섬유성 질병과 같은 병리학적 상태를 유발한다.

[0175] 주로 조혈 세포 및 종양 세포에 의해 생산되는 TGF- β 는 다양한 정상 조직 및 신생물 조직 모두에서 유래한 세포들의 성장 및 분화를 조절, 즉 자극 또는 억제할 수 있으며(Spom 외, Science, 233: 532 (1986)) 다양한 간질 요소들의 형성과 정교화를 자극할 수 있다. TGF- β 는 세포 증식 및 분화, 배아 발달, 세포외 기질 형성, 뼈 발달, 상처 치유, 조혈, 면역 및 염증 반응과 같은 많은 증식 및 비증식 세포 과정에 관여한다.

[0176] TGF- β 는 또한 림프카인-활성 킬러(LAK) 및 세포독성 T 림프구(CTL) 억제, 억제된 B 세포 림프구 생성 및 카파 경쇄 발현, 조혈의 음성 조절, HLA-DR 발현의 하향 조절, B 세포 성장 인자에 반응하여 항원-활성화된 B 림프구의 증식 억제를 포함하는 면역억제 활성을 보유한다. 많은 인간 종양 및 많은 종양 세포주는 TGF- β 를 생산하며, 이는 이들 종양이 정상적인 면역학적 감시를 회피할 수 있는 가능한 메커니즘을 시사한다. 이러한 음성 면역조절은, 특정 형질전환 세포주가 자가분비 방식으로 TGF- β 에 반응하는 능력을 상실하고 TGF- β 가 간질 형성을 자극하여 종양의 면역 감시를 감소시킨다는 관찰결과와 더불어, 신생물 탈조절 및 증식에 대한 매력적인 모델을 제안한다.

[0177] TGF- β 신호전달은 건강한 세포와 암 조절 모두에 중요하기 때문에 TGF- β 를 전신적으로 표적하는 것은 원치 않는 부작용을 일으킬 수 있다. 특히 암과 관련하여, TGF- β 계열의 구성원들은 종양형성(혈관신생 포함) 및 전이와 관련된 많은 생물학적 활성들을 갖는 것으로 알려져 있다. TGF- β 는 모세혈관 내피 세포 및 평활근 세포를 포함한 많은 세포 유형들의 증식을 억제한다. TGF- β 는 인테그린 발현을 하향조절한다(내피 세포 이동에 관여하는 알파1베타1, 알파2베타1 및 알파v베타3). 인테그린은 전이성 세포를 포함한 모든 세포의 이동에 관여한다. TGF- β 는 혈관 신생 및 전이에 필요한 매트릭스 메탈로프로테이나제 발현을 하향 조절한다. TGF- β 는 혈관 신생 및 전이에 필요한 프로테이나제 캐스케이드를 억제하는 플라스미노겐 활성인자 억제제를 유도한다. TGF- β 는 정상 세포가 형질전환된 세포를 억제하도록 유도한다. 예를 들어, Yingling 외, Nature Reviews, 3(12): 1011-1022 (2004)를 참고하는데, 이 문헌은 TGF- β 의 탈조절이 암 및 섬유증을 비롯한 다양한 질병들의 병인에 관련되어 있음을 개시하며, TGF- β 신호전달 억제제를 암 치료제, 바이오마커/진단, 개발 중인 소분자 억제제의 구조, 개발에 적용 중인 표적 약물 발견 모델로서 평가하는 이론적 근거를 제시한다.

[0178] 본원에서 사용되는 “TGF- β 신호전달 경로”라는 용어는 TGF- β 및 TGF- β 유사 리간드로 인한 하류 신호전달 사건들을 설명하기 위해 사용된다. 예를 들어, 하나의 신호전달 경로에서 TGF- β 리간드는 유형 II TGF- β 수용체에 결합하여 이를 활성화한다. 유형 II TGF- β 수용체는 유형 I TGF- β 수용체를 동원하여 이와 이중이량체를 형성한다. 생성된 이중이량체는 유형 I 수용체를 인산화할 수 있으며, 이는 차례로 SMAD 계열 단백질들의 구성원을 인산화하고 활성화시킨다. 신호 캐스케이드가 촉발되고(이는 당업자에게 잘 알려져 있음), 궁극적으로 특히 세포 성장, 세포 분화, 종양 형성, 아포토시스 및 세포 항상성에 관여하는 매개체들의 발현을 제어하게 된다. 다른 TGF- β 신호전달 경로 또한 본 명세서에 기재된 방법에 따른 조작에 고려된다.

[0179] **TGF- β 신호전달 경로 조절제**

[0180] 본 발명은 TGF- β 신호전달 조절제(예를 들어, TGF- β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드 또는 TGF- β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드들을 인코딩하는 핵산 서열)를 포함하는 면역 조절 시스템을 제공한다. 일부 실시형태에서, TGF- β 신호전달 조절제는 TGF- β 또는 TGF- β 수용체에 결합시 세포 반응을 일으킨다. 일부 실시형태에서, TGF- β 신호전달 조절제는 세포로부터 분비된다.

[0181] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 TGF- β 신호 조절제와 함께 키메라 항원 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 제공한다. 이러한 조절제는 TGF- β 자체 또는 TGF- β 수용체에 결합할 수 있다. 이러한 조절제를 발현하는 CAR-T 세포는 본원에서 TGF- β 아머드 CAR-T 세포로 언급된다.

[0182] **항-TGF β 및 항-TGF β R2 항원 결합 분자**

- [0183] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제는 항원 결합 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)이다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)는 TGF-β에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)는 TGF-β 수용체(TGFβR)(예를 들어, TGFβR1, TGFβR2)에 특이적으로 결합한다.
- [0184] TGF-β 신호전달 조절제(예를 들어, 항-TGFβ 항체 분자 또는 항-TGFβR 항체 분자)는 본원에 기재된 CDR 또는 중쇄의 모두 또는 중쇄의 항원 결합 서브세트를 포함할 수 있다. 가변 영역을 포함하여 본원에 기재된 항-TGFβ 또는 항-TGFβR2 항원 결합체의 예시적인 아미노산 서열이 표 1에 제시되어 있다. 추가적인 항-TGFβ 또는 항-TGFβR2 항체는 또한 미국 특허 제 7,723,486 및 9,783,604; 미국 특허 출원 공개 공보 US20160017026A1 및 US20180105597, US20190119387; 및 국제 특허 출원 공개 공보 WO2012093125A1 WO2011/012609, WO 2017/141208 A1에 기재되어 있으며; 이들 각각의 전체는 본원에 참조로 포함된다. 본원에 기재된 면역 조절 시스템에 유용한 항원 결합체는 항원(예: TGFβR 에피토프)과 특이적으로 결합하는, 항체, (Fab')₂와 같은 2가 단편, Fab와 같은 1가 단편, 단일 사슬 항체, 단일 사슬 Fv(scFv), 단일 도메인 항체, 다가 단일 사슬 항체, 디아바디, 트리아바디 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0185] 일부 실시형태에서, 면역 조절 시스템은 표 1에 제공된 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TGF-β 신호전달 조절제(예를 들어, 항-TGFβ 또는 항-TGFβR2 항원 결합체)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 조절 시스템은 표 1에 기재된 항체 또는 이의 단편의 하나 이상의 CDR 서열들을 포함하는 TGF-β 신호전달 조절제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 TGF-β 신호전달 조절제는 표 1에 제공된 VH 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제의 VH는 단일 도메인 항체(VH)이다.
- [0186] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제는 리더 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제는 단량체이다. 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제는 이량체이다. 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제는 삼량체이다.
- [0187] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제는 도메인들을 직렬로 연결하기 위한 링커를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 GGGGS(서열번호 59)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 (GGGGS)_n(서열번호 59)를 포함하고, 이 때 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. 일부 실시형태에서, 링커는 GGGSGGGSGGGGS(서열번호 61)를 포함한다.
- [0188] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제는 표 1에 제공된 VL 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-TGFβ 항원 결합체는 표 1에 제공된 VH 서열과 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.
- [0189] 일부 실시형태에서, 본 발명의 TGF-β 신호전달 조절제는 표 1에 제공된 VH 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 TGF-β 신호전달 조절제는 표 1에 제공된 VH 서열과 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.
- [0190] 일부 실시형태에서, TGF-β 신호전달 조절제(예를 들어, 단일 도메인 항체)의 VH는 표 1에 제공된 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 리더 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, vH 항-TGFβ 항원 결합체(예를 들어, 단일 도메인 항체)는 표 1에 제공된 리더 서열을 포함한다.

[0191] 표 1. 예시적인 항-TGFβ 및 항-TGFβR2 항원 결합 분자

서열번호	서열
서열번호 1 TGFβ scFv VH-VL1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIA NYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQOKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYA DSPITFGQGTREIKR
서열번호 2 TGFβ scFv VH-VL2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIA NYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWY QOKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYADS PITFGQGTREIKR
서열번호 3 TGFβ scFv VL-VH	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRAPG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYADSPITFGQGTREIKRGGGGSGG GGGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEW MGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAM DYWGQGLVTVSS
서열번호 4 TGFβR2 scFv VH-VL	QLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIROPKGLWIGSFYYGE KTYYNP\$K\$RATISIDT\$K\$QFSLKLS\$VTAADTAVYYCPRGPTMIRGVISWVGQGL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWY QOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNW PPTFGQGTKVEIK
서열번호 5 TGFβR2 scFv VL-VH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGG SGGGGSQLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIROPKGLWIG \$FY\$YGEKTYYNP\$K\$RATISIDT\$K\$QFSLKLS\$VTAADTAVYYCPRGPTMIRGVISW

[0192]

	GQGLTVTVSS
서열번호 6 mTGFbR2 VH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYGMGWVVRQAPGKGLEWVSWIEKTGN KTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARHIKVRSRDFDYWGQ GTLTVTVSS
서열번호 7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYGMGWVVRQAPGKGLEWVSWIEKTGN KTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGRHIVRSRDFDYWG QGLTVTVSS
서열번호 8 hTGFbR2 VH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYW GQGLTVTVSS
서열번호 9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGLTVTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRP TGVSGETFYDYWGQGLTVTVSS
서열번호 10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGLTVTVSSggggsggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQ APGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSS
서열번호 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGLTVTVSSGGSEPKS&DKHTCPCPggs&gggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFCS&VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
서열번호 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGLTVTVSSGGSEPKS&DKHTCPCPggs&gggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV

[0193]

	SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsgggEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSS
서열번호 13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGTLVTVSSggggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC\$SVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
서열번호 14	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGTLVTVSSggggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC\$SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGggggsgggEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKR RPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSS
서열번호 15	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGTLVTVSSggggEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRP TGVSGTFYDYWGQGLTVTVSSggggEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTE QMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSS
서열번호 16	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGTLVTVSSggggEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRP TGVSGTFYDYWGQGLTVTVSSggggEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTE

	<p>QMWWVRQAPGKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMN\$SLRAE DTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLVTVSS\$EVQLLES\$GGGLVQPGGSLRL\$SCAA SGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYL QMN\$SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLVTVSS\$ggggsggggs\$EVQLLES GGGLVQPGGSLRL\$SCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLFVSRIDSPGGRTYYADS VKGRFTISRDN\$KNTLYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLVTV SS\$ggggsggggs\$EVQLLES\$GGGLVQPGGSLRL\$SCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGL FVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN\$KNTLYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAKRRPTGV SGTFYDYWGQGLVTVSS</p>
<p>서열번호 17</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV\$CKASGYTFSSN\$VISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIA NYAQRFKGRVTITADE\$STTYMEL\$SLRSEDTAVYYCA\$TLGLVLDAMDYWGQGLV TVSS\$GGGG\$GGGG\$GGGG\$SALETVLTQ\$SPGTL\$SL\$SPGERATL\$SCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRF\$SGSG\$SGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYA DSPITFGQGRLEIK\$gggg\$QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV\$CKASGYTFSSN\$VISWVRQ APGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADE\$STTYMEL\$SLRSEDTAVYYCAS TLGLVLDAMDYWGQGLVTVSS\$GGGG\$GGGG\$GGGG\$SALETVLTQ\$SPGTL\$SL\$SPGE RATL\$SCRASQSLGSSYLA\$WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRF\$SGSG\$SGTDFTL ISRLEPEDFAVYYCQQYAD\$SPITFGQGRLEIK</p>
<p>서열번호 18</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV\$CKASGYTFSSN\$VISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIA NYAQRFKGRVTITADE\$STTYMEL\$SLRSEDTAVYYCA\$TLGLVLDAMDYWGQGLV TVSS\$GGGG\$GGGG\$GGGG\$SALETVLTQ\$SPGTL\$SL\$SPGERATL\$SCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRF\$SGSG\$SGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYA DSPITFGQGRLEIK\$ggggsggggs\$QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV\$CKASGYTFSSN\$VIS WVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADE\$STTYMEL\$SLRSEDTAV YYCA\$TLGLVLDAMDYWGQGLVTVSS\$GGGG\$GGGG\$GGGG\$SALETVLTQ\$SPGTL\$S L\$SPGERATL\$SCRASQSLGSSYLA\$WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRF\$SGSG\$G TDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYAD\$SPITFGQGRLEIK</p>
<p>서열번호 19</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV\$CKASGYTFSSN\$VISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIA NYAQRFKGRVTITADE\$STTYMEL\$SLRSEDTAVYYCA\$TLGLVLDAMDYWGQGLV</p>

	<p>TVSSGGGGSGGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA DSPITFGQGTRLEIKGGSEPKS&DKHTHTCPCgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
<p>서열번호 20</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIA NYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTV TVSSGGGGSGGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA DSPITFGQGTRLEIKGGSEPKS&DKHTHTCPCgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGgggsggsgQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTT YMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGG SALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR APGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK</p>
<p>서열번호 21</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIA NYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTV TVSSGGGGSGGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA DSPITFGQGTRLEIKgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG</p>
<p>서열번호 22</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIA NYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTV TVSSGGGGSGGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA DSPITFGQGTRLEIKgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH</p>

[0194]

	<p>NHYTQKSLSLSPGgggggggQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFSSNVISWVR QAPGGGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCA STLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSALETVLQSPGTLSPG ERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTREIK</p>
<p>서열번호 23</p>	<p>QLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKLEWIGSFYYGE KTYYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLT VTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWY QQKPGQAPRLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNW PPTFGQGTKEIKgggggQLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQ PPGKLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCPRG PTMIRGVIDSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIK</p>
<p>서열번호 24</p>	<p>QLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKLEWIGSFYYGE KTYYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLT VTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWY QQKPGQAPRLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNW PPTFGQGTKEIKgggggggggQLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWG WIRQPPGKLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLSVTAADTAVYY CPRGPTMIRGVIDSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIK</p>
<p>서열번호 25</p>	<p>QLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKLEWIGSFYYGE KTYYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLT VTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWY QQKPGQAPRLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNW PPTFGQGTKEIKGGSEPKS&DKHTHTCPPCgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW</p>

	QQGNVFCSCVMHEALHNHYTKSLSLSPG
서열번호 26	<p>QLQVQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGE</p> <p>KTYYNP\$LKSRATISIDT\$K\$QF\$KLS\$SVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVID\$SWGQTL</p> <p>VTVSSGGGGSGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL\$CRASQSVRSYLAWY</p> <p>QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS\$LEPEDFAVYYCQQR\$SNW</p> <p>PPTFGQGTKVEIKGGSEPK\$DKTHTCPPCgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTK</p> <p>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG\$FFLYSKLTVDKSRW</p> <p>QQGNVFCSCVMHEALHNHYTKSLSLSPGggggsggg\$QLQVQESGPGLVKVPSETLSLTC</p> <p>TVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNP\$LKSRATISIDT\$K\$QF\$</p> <p>LKLS\$SVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVID\$SWGQTLVTVSSGGGGSGGGGGGGSEI</p> <p>VLTQSPATLSLSPGERATL\$CRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA</p> <p>RFSGSGSGTDFTLTIS\$LEPEDFAVYYCQQR\$SNWPPTFGQGTKVEIK</p>
서열번호 27	<p>QLQVQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGE</p> <p>KTYYNP\$LKSRATISIDT\$K\$QF\$KLS\$SVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVID\$SWGQTL</p> <p>VTVSSGGGGSGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL\$CRASQSVRSYLAWY</p> <p>QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS\$LEPEDFAVYYCQQR\$SNW</p> <p>PPTFGQGTKVEIKgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</p> <p>VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG\$FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN</p> <p>HYTKSLSLSPG</p>
서열번호 28	<p>QLQVQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGE</p> <p>KTYYNP\$LKSRATISIDT\$K\$QF\$KLS\$SVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVID\$SWGQTL</p> <p>VTVSSGGGGSGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL\$CRASQSVRSYLAWY</p> <p>QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS\$LEPEDFAVYYCQQR\$SNW</p> <p>PPTFGQGTKVEIKgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</p> <p>VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG\$FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN</p> <p>HYTKSLSLSPGggggsggg\$QLQVQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGW</p> <p>RQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNP\$LKSRATISIDT\$K\$QF\$KLS\$SVTAADTAVYYCP</p> <p>RGPTMIRGVID\$SWGQTLVTVSSGGGGSGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERA</p> <p>TL\$CRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS\$S</p>

	EPEDFAVYYCQQR\$SNWPPTFGQGTKVEIK
서열번호 29	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS\$CAASGFTFGQESMYWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG</p> <p>STYYADSVKGRFTISRDN\$SKNTLYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAKSGTRIKQGF\$DYWGQ</p> <p>TLVTVSS</p>
서열번호 30	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS\$CAASGFTFEYRMWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHR</p> <p>TYYANSVGRFTISRDN\$SKNTLYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDL\$DY</p> <p>WGQGLTVTVSS</p>
서열번호 31	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS\$CAASGFTFGDQMWVRQAPGKLEFVSRIDSPGG</p> <p>RTYYANSVKGRFTISRDN\$SKNTLYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAKRQAPGV\$GKYVDYWG</p> <p>QGTLVTVSS</p>

[0195]

- [0196] 일부 실시형태에서, 항-TGF β 또는 항-TGF β R 항원 결합체는 항체이다. 자연 발생 포유동물 항체 구조 단위는 사량체로 대표된다. 각 사량체는 두 개의 폴리펩티드 사슬 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 “경쇄” (약 25kDa)와 하나의 “중쇄” (약 50-70kDa)를 가진다. 각 사슬의 아미노 말단 부분은 항원 인식을 주로 담당하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카르복시 말단 부분은 주로 이펙터 기능을 담당하는 불변 영역을 정의한다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류될 수 있다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로 분류되며 항체의 이소형은 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 분류될 수 있다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 “J” 영역에 의해 연결되며, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 “D” 영역을 포함한다. 일반적으로 *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))를 참조하라. 각 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. 항-TGF β 항체 분자에 대한 바람직한 이소형은 IgG 면역글로불린이며, 이는 상이한 감마 중쇄를 갖는 4개의 하위분류, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 분류될 수 있다. 대부분의 치료 항체는 IgG1 유형의 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 특정 실시형태에서, 항-TGF β 항체 분자는 IgG1 이소형을 갖는다.
- [0197] 각 중쇄 및 경쇄 쌍의 가변 영역은 항원 결합 부위를 형성한다. 따라서 온전한 IgG 항체에는 동일한 두 개의 결합 부위가 있다. 그러나 이중 기능 또는 이중 특이성 항체는 두 개의 다른 중쇄/경쇄 쌍을 가지고 있어 두 개의 다른 결합 부위를 생성하는 인공 하이브리드 구조체이다.
- [0198] 사슬들은 모두 상보성 결정 영역 또는 CDR이라고도 하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 동일한 일반 구조의 상대적으로 보존된 프레임워크 영역(FR)들을 나타낸다. 각 쌍의 두 사슬의 CDR들은 프레임워크 영역에 따라 정렬되어 특정 에피토프에 결합할 수 있다. N-말단에서 C-말단까지, 경쇄 및 중쇄는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각 도메인에 대한 아미노산의 지정은 문헌 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 또는 Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia 외, *Nature* 342:878-883 (1989)의 정의에 따른다. 본원에서 사용되는 CDR은 중쇄(HCDR1, HCDR2, HCDR3) 및 경쇄(LCDR1, LCDR2, LCDR3) 각각에 대해 언급된다.
- [0199] 따라서, 한 실시형태에서 항체 분자는 다음 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다:
- [0200] (a) 1개, 2개, 3개 또는 항원 결합 수의, 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구 또는 뮤린 항체 중 하나의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3). 실시형태들에서 CDR(들)은 다음과 같은 LCDR1-3 중 하나 이상 또는 이들 모두의 아미노산 서열을 포함할 수 있다: LCDR1, 또는 1 내지 7개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR1; LCDR2, 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR2; 또는 LCDR3, 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR3; 및
- [0201] (b) 1개, 2개, 3개 또는 항원 결합 수의, 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구 또는 뮤린 항체 중 하나의 중쇄 CDR(HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3). 실시형태들에서 CDR(들)은 다음과 같은 HCDR1-3 중 하나 이상 또는 이들 모두의 아미노산 서열을 포함할 수 있다: HCDR1, 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR1; HCDR2, 또는 1 내지 4개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR2; 또는 HCDR3, 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR3.
- [0202] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-TGF β 항체 분자 또는 항-TGF β R(예를 들어, 항-TGF β R2) 항체 분자는 TGF β 를 발현하는 세포, 예를 들어, 종양 세포에 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 유도할 수 있다. IgG1 및 IgG3 이소형을 가진 항체는 Fc 수용체에 결합하는 이의 능력으로 인해 항체 의존성 세포독성 능력에서 이펙터 기능을 유도하는 데 유용하다. IgG2 및 IgG4 이소형을 가진 항체는 Fc 수용체에 결합하는 능력이 낮기 때문에 ADCC 반응을 최소화하는 데 유용하다. 관련 실시형태에서, 항체의 Fc 영역에서의 치환 또는 당화 조성에 있어서의 변화, 예를 들어, 변형된 진핵 세포주에서의 성장에 의한 변화는, 항-TGF β 항체 또는 항-TGF β R(예를 들어, 항-TGF β R2) 항체들이 결합하는 세포의 세포독성을 인식, 결합 및/또는 매개하는 Fc 수용체들의 능력을 향상시키기 위해 이루어질 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제 7,317,091, 5,624,821 및 WO 00/42072, Shields, 외 *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazar 외 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:4005-4010 (2006), Satoh 외 *Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006)을 비롯한 간행물 참조). 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편(예를 들어, 인간 기원의 항체, 인간 항체)은 기능(예를 들어, 이펙터 기능)을 변경하거나 맞춤화하는 아미노산 치환 또는 교체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 기원의 불변 영역(예를 들어, γ 1 불변 영역, γ 2 불변 영역)은 보체 활성화 및/또는 Fc 수용체 결합을 감소시키도록 설계될 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 제 5,648,260(Winter 외), 미국 특허 제 5,624,821(Winter 외) 및 미국 특허 제 5,834,597(Tso 외) 참조, 이들은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함됨) 바람직하게는, 이러한 아미노산 치환 또는 교체를 함유하는 인간 기원

의 불변 영역의 아미노산 서열은 전체 길이에 걸쳐 인간 기원의 변경되지 않은 불변 영역의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일하며, 보다 바람직하게는 전체 길이에 걸쳐 인간 기원의 변경되지 않은 불변 영역의 아미노산 서열에 적어도 약 99% 동일하다. 추가적인 항-TGFβ 항원 결합 분자는 미국 특허 제 8,785,600(Nam 외)에 상세히 설명되어 있으며, 이 문헌은 그 전체가 본원에 참고문헌으로 포함된다.

[0203] 또 다른 실시형태에서, 이펙터 기능은 또한 항체의 당화 패턴을 조절함으로써 변경될 수 있다. 변경이란 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키는 것 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 당화 부위를 부가하는 것을 의미한다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 결여된 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항상된 ADCC 활성을 갖는 항체는 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0157108(Presta)에 기재되어 있다. 또한 미국 특허출원 공개 공보 제 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)을 참고하라. Glycofi는 또한 항체의 특정 글리코형을 생산할 수 있는 효모 세포주를 개발했다.

[0204] 부가적으로 또는 대안적으로, 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 저푸코실화된 항체 또는 증가된 이등분 GlcNac 구조를 갖는 항체와 같은 변경된 유형의 당화를 갖는 항체가 제조될 수 있다. 이러한 변경된 당화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 이러한 탄수화물 변형은, 예를 들어, 변경된 당화 기작 (glycosylation machinery)을 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 변경된 당화 기작을 갖는 세포가 당업계에서 설명된 바 있으며, 이는 본 발명의 제조항 항체를 발현하도록 조작되어 변경된 당화를 갖는 항체를 생산하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, Hang 등의 EP 1,176,195는 FUT8 유전자(푸코실 트랜스퍼라제를 인코딩함)가 기능적으로 파괴된 세포주를 설명하는데, 그 결과 이러한 세포주에서 발현된 항체들은 저푸코실화를 나타낸다. Presta의 PCT 공보 WO 03/035835는 푸코스를 Asn(297)-연결된 탄수화물에 부착시키는 능력이 감소되어 있고 또한 그 숙주 세포에서 발현된 항체의 저푸코실화를 야기하는 CHO 세포주의 변이체, Lec13 세포를 설명한다(또한 Shields, R. L. 외, 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 참조). Umana 외의 PCT 공개공보 WO 99/54342는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제(예를 들어, 베타(1,4)-N 아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII))을 발현하도록 조작된 세포주를 설명하는데, 그 결과 이러한 조작된 세포주에서 발현된 항체들은 양분 GlcNac 구조의 증가를 나타내고, 그 결과 항체의 ADCC 활성을 증가시킨다(또한 Umana 외, 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180 참조).

[0205] 인간화 항체는 또한 CDR 이식 접근법을 사용하여 만들 수 있다. 이러한 인간화 항체의 생성 기술은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 TGFβ에 결합하는 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 핵산 서열들을 획득하고, 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열에서 상보적 결정 영역 또는 “CDR” 을 식별하고, CDR 핵산 서열들을 인간 프레임워크 핵산 서열들에 이식함으로써 생산된다. (예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567 및 5,225,539 참조). CDR 및 프레임워크 잔기들의 위치가 결정될 수 있다(Kabat, E.A., 외 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 및 Chothia, C. 외 *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) 참조).

[0206] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역 조절 시스템은 표 1에 기재된 항체 분자로부터의 CDR을 포함하는 항-TGFβ 또는 항-TGFβR 항체 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표 1의 서열들은 본원에 기재된 치료 방법(예를 들어, 면역 조절 시스템, 면역반응 세포, 또는 이를 포함하는 치료 방법)에 사용하기 위해 TGFβ 또는 TGFβR을 인식하는 분자에 통합될 수 있다. 선택된 인간 프레임워크는 생체내 투여에 적합한 것으로, 이는 면역원성을 나타내지 않는다는 것을 의미한다. 예를 들어, 이러한 결정은 이러한 항체의 생체내 사용에 대한 이전의 경험 및 아미노산 유사성에 대한 연구에 의해 이루어질 수 있다. 적합한 프레임워크 영역은 공여체 항체, 예를 들어, 항-TGFβ 항체 분자의 상응하는 부분(예를 들어, 프레임워크 영역)의 아미노산 서열 내 프레임워크 영역 길이 전반에 걸쳐 적어도 약 65%의 아미노산 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 약 70%, 80%, 90% 또는 95%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 인간 기원의 항체로부터 선택될 수 있다. 기본 매개변수를 사용하여 CLUSTAL W와 같은 적합한 아미노산 서열 정렬 알고리즘을 사용하여 아미노산 서열 동일성을 결정할 수 있다. (Thompson J. D. 외, *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).)

[0207] 인간화될 클로닝된 항체의 CDR 및 FR이 식별되면, CDR을 인코딩하는 아미노산 서열들이 식별되고 상응하는 핵산 서열들이 선택된 인간 FR에 이식된다. 이것은 공지된 프라이머 및 링커를 사용하여 수행될 수 있으며, 이들의 선택은 당업계에 공지되어 있다. 특정 인간 항체의 모든 CDR은 비인간 CDR의 적어도 일부로 교체될 수 있거나 CDR 중 일부만이 비인간 CDR로 교체될 수 있다. 인간화 항체가 소정의 항원에 결합하는 데 필요한 CDR의 수만 교체하면 된다. CDR이 선택된 인간 FR에 이식된 후, 생성된 “인간화” 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열들이 발현되어 TGFβ 또는 TGFβR에 결합하는 인간화 Fv 또는 인간화 항체를 생성한다. 바람직하게는, CDR 이식된(예를 들어, 인간화) 항체는 공여체 항체와 유사하거나 실질적으로 동일하거나 더 우수한 친화도로 TGFβ 또는 TGFβR

에 결합한다. 전형적으로, 인간화 가변 중쇄 및 경쇄 서열은 인간 불변 도메인 서열과의 융합 단백질로서 발현되어 TGFβ에 결합하는 온전한 항체가 얻어진다. 그러나, 불변 서열들을 포함하지 않는 인간화 Fv 항체가 생성될 수 있다.

[0208] 또한 특정 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 인간화 항체가 본 발명의 범위에 속한다. 특히, 인간화 항체는 예를 들어, 항원에 대한 결합을 개선하기 위해 프레임워크 영역에서 아미노산 치환을 가질 수 있다. 예를 들어, 인간화 면역글로불린 사슬의 선택된 소수의 엑셉터(acceptor) 프레임워크 잔기들은 상응하는 공여체 아미노산으로 대체될 수 있다. 치환 위치는 CDR에 인접하거나 CDR과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기를 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제 5,585,089 또는 5,859,205 참조). 엑셉터 프레임워크는 성숙한 인간 항체 프레임워크 서열 또는 공통 서열일 수 있다. 본원에서 용어 “공통 서열”은 관련 계열 구성원들 중 한 영역의 서열에서 가장 빈번하게 발견되는 서열 또는 각 위치에서 가장 공통적인 잔기들로부터 고안된 서열을 의미한다. 인간 가변 영역의 상이한 하위그룹들에 대한 공통 서열들을 포함하는 다수의 인간 항체 공통 서열을 이용할 수 있다(Kabat, E.A., 외, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office(1991)). Kabat 데이터베이스 및 그 응용 프로그램은, 예를 들어, 메릴랜드 주 베세스다 소재 National Center for Biotechnology Information에서의 IgBLAST를 통해 온라인에서 무료로 사용할 수 있다(또한 Johnson, G. 및 Wu, T. T., *Nucleic Acids Research* 29:205-206 (2001) 참조).

[0209] 특정 실시형태에서, TGFβ 또는 TGFβR 항체 분자는 인간 항-TGFβ 또는 항-TGFβR IgG1 항체이다. 이러한 항체는 TGFβ 또는 TGFβR 분자에 대해 원하는 결합을 갖기 때문에, 이러한 항체 중 어느 하나는, 예를 들어, 여전히 동일한 가변 영역(항체의 특이성 및 친화성을 어느 정도까지는 정의함)을 보유하면서도 인간 IgG4 이소형을 생성하도록 용이하게 이소형 전환이 가능하다. 따라서, 상기 논의된 바와 같이 원하는 “구조적” 속성을 충족시키는 항체 후보가 생성됨에 따라, 이 항체 후보들에는 일반적으로 이소형 전환을 통해 원하는, 적어도 특정한 추가적인 “기능적” 속성이 제공될 수 있다.

[0210] 단일 사슬 항체

[0211] 단일 사슬 항체는 그것이 유래된 전체 항체들의 불변 도메인들의 일부 또는 전부가 결합되어 있다. 따라서 이 항체는 전체 항체 사용과 관련된 몇 가지 문제를 극복할 수 있다. 예를 들어, 단일 사슬 항체는 중쇄 불변 영역과 다른 생물학적 분자 사이의 특정 바람직하지 않은 상호 작용이 없는 경향이 있다. 또한 단일 사슬 항체는 전체 항체보다 상당히 작고 전체 항체보다 더 큰 투과성을 가질 수 있으므로, 단일 사슬 항체가 표적 항원 결합 부위에 보다 효율적으로 국소화되어 결합할 수 있다. 또한 단일 사슬 항체들의 크기가 상대적으로 작기 때문에 전체 항체보다 수용자에게 원치 않는 면역 반응을 유발할 가능성이 적다.

[0212] 일부 실시형태에서, TGFβ 신호전달 조절제는 TGFβ에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 항원 결합 분자(예를 들어, scFv)이다. 일부 실시형태에서, TGFβ 신호전달 조절제는 TGF-β 수용체(TGFβR)(예를 들어, TGFβR1, TGFβR2)에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 항원 결합 분자(예를 들어, scFv)이다.

[0213] 다수의 단일 사슬 항체(각각의 단일 사슬은 제1 펩티드 링커에 의해 공유 연결된 하나의 VH 및 하나의 VL 도메인을 가짐)는 적어도 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커에 의해 공유 연결되어 단일특이적 또는 다중특이적일 수 있는 다가 단일 사슬 항체를 형성할 수 있다. 다가 단일 사슬 항체의 각 사슬은 가변 경쇄 단편과 가변 중쇄 단편을 포함하고, 적어도 하나의 다른 사슬에 펩티드 링커에 의해 연결된다. 펩티드 링커는 적어도 15개의 아미노산 잔기로 구성된다. 링커 아미노산 잔기의 최대 수는 약 100개이다.

[0214] 2개의 단일 사슬 항체가 조합되어 2가 이량체라고도 알려진 디아바디를 형성할 수 있다. 디아바디는 2개의 사슬과 2개의 결합 부위를 가지며 단일특이성 또는 이중특이성이 될 수 있다. 디아바디의 각 사슬은 VL 도메인에 연결된 VH 도메인을 포함한다. 도메인은 동일한 사슬에 있는 도메인 간의 페어링을 방지하기에 충분히 짧은 링커들을 사용하여 연결되어 있으므로, 서로 다른 사슬들에 있는 상보적인 도메인들 간의 페어링을 유도하여 두 개의 항원 결합 부위를 다시 생성한다.

[0215] 3개의 단일 사슬 항체가 조합되어 3가 삼량체로도 알려진 트리아바디를 형성할 수 있다. 트리아바디는 VL 또는 VH 도메인의 카르복실 말단에 직접 융합된 VL 또는 VH 도메인의 아미노산 말단들을 사용하여, 즉, 임의의 링커 서열 없이 구성된다. 트리아바디는 3개의 Fv 헤드와 폴리펩티드가 헤드-투-테일 순환 방식 배열되어 있다. 트리아바디의 가능한 형태는 서로 120도 각도로 평면에 위치한 세 개의 결합 부위들을 가진 평면이다. 트리아바디는 단일특이성, 이중특이성 또는 삼중특이성일 수 있다.

- [0216] 단일-도메인 항체
- [0217] 단일 도메인 항체(sdAbs)는 단일 단량체 항체 가변 도메인을 가짐으로써 기존의 4-사슬 항체와 다르다. 예를 들어, 낙타와 상어는 자연적으로 경쇄가 없는 중쇄 전용 항체(HcAbs)라는 sdAbs를 생산한다. 낙타 중쇄 전용 항체의 각 팔에 있는 항원 결합 단편은 단일 중쇄 가변 도메인(VHH)을 가지고 있어 경쇄의 도움 없이도 항원에 대해 높은 친화성을 가질 수 있다. 낙타 VHH는 약 15kD의 분자량을 가진 가장 작은 기능적 항원 결합 단편으로 알려져 있다.
- [0218] 본원의 한 양상은 인간 TGFβR2와 같은 TGFβR에 특이적으로 결합하는 단리된 단일-도메인 항체(본원에서 “항-TGFβR sdAb”로 지칭됨)를 제공한다. 일부 실시형태에서, 항-TGFβR sdAb는 TGFβ 활성을 조절한다. 일부 실시형태에서, 항-TGFβ sdAb는 길항제 항체이다. 추가로 본원에 기재된 항-TGFβR sdAb 중 어느 하나로부터 유래된 항원-결합 단편, 및 본원에 기재된 항-TGFβR sdAb 중 어느 하나를 포함하는 항원 결합 단백질이 제공된다. 일부 실시형태에서, 항-TGFβR sdAb는 표 1에 제공된 1개, 2개 및/또는 3개의 CDR 서열을 포함한다. 예시적인 항-TGFβR sdAbs는 표 1에 제공된다.
- [0219] 일부 실시형태에서, 중쇄인 CDR 서열들의 일부 또는 전부는 또 다른 항원 결합제, 예를 들어, CDR 이식, 인간화 또는 키메라 항체 분자에서 사용될 수 있다. 실시형태는 TGFβ에 대한 결합을 허용하기에 충분한 CDR, 예를 들어, 상기 언급된 중쇄 가변 영역 중 하나로부터의 3개 CDR 모두를 포함하는 항체 분자를 포함한다.
- [0220] 일부 실시형태에서, CDR, 예를 들어, 모든 HCDR은 인간 또는 인간 유래 프레임워크 영역(들)에 내장된다. 인간 프레임워크 영역들의 예는 인간 생식계열 프레임워크 서열, (생체내 또는 시험관내에서) 친화성 성숙된 인간 생식계열 서열, 또는 합성 인간 서열, 예를 들어, 공통 서열을 포함한다. 실시형태에서 중쇄 프레임워크는 IgG1 또는 IgG2 프레임워크이다.
- [0221] 일부 실시형태에서, 본 발명의 TGFβ 조절제는 표 1에 제공된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-TGFβ 항원 결합제는 단일 도메인 중쇄만의 항체(예를 들어, 면역글로불린 경쇄를 포함하지 않는 항원 결합제)이다.
- [0222] 생체내 치료를 위한 또는 진단 용도의 항체 단편들은 혈청 반감기를 개선하는 변형들로부터 이익을 얻을 수 있다. 항체의 생체내 혈청 반감기를 증가시키기 위해 적합한 유기 모이어티는 친수성 중합체 기(예를 들어, 선형 또는 분지형 중합체(예를 들어, 폴리알칸 글리콜, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 등), 탄수화물(예: 텍스트란, 셀룰로오스, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체(예: 폴리리신, 폴리아스파테이트 등), 폴리알칸 옥사이드 및 폴리비닐 피롤리돈), 지방산 기(예: 모노카르복실산 또는 디카르복실산), 지방산 에스테르 기, 지질 기(예: 디아실글리세롤 기, 스펅고지질 기(예: 세라미딜)) 또는 인지질 기(예를 들어, 포스파티딜 에탄올아민기)로부터 선택된 하나, 둘 또는 그 이상의 선형 또는 분지형 모이어티를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 유기 모이어티는 예정된 부위에 결합되며, 여기서 유기 모이어티는 접합되지 않은 항체 모이어티와 비교하여 생성된 면역접합체의 기능을 손상(예를 들어, 항원 결합 친화도 감소)시키지 않는다. 유기 모이어티는 약 500 Da 내지 약 50,000 Da, 바람직하게는 약 2000, 5000, 10,000 또는 20,000 Da의 분자량을 가질 수 있다. 유기 모이어티들로 폴리펩티드, 예를 들어, 항체를 변형시키는 예 및 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제 4,179,337 및 5,612,460, PCT 공개공보 제 WO 95/06058 및 WO 00/26256, 및 미국 특허출원 공개 공보 제 20030026805에서 찾을 수 있다.
- [0223] **TGFβR 세포의 도메인**
- [0224] 본원에 기재된 면역 조절 시스템에서 사용하기 위해 고려되는 TGF-β 수용체는 액티빈-유사 키나제 계열(ALK), 골 형태 형성 단백질(BMP) 계열, 노드 계열, 성장 및 분화 인자 계열(GDF), 및 수용체의 TGF-β 수용체 계열로부터 온 것들을 비롯한 임의의 TGF-β 수용체일 수 있다. TGF-β 수용체는 세포의 다양한 성장 및 분화 경로에 영향을 미치는 세린/트레오닌 키나아제 수용체이다. 일부 실시형태에서, TGFβ 신호전달 조절제는 TGFβ 수용체(예를 들어, TGFβR1, TGFβR2)의 조작된 재조합 세포의 도메인(ECD)이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 면역 조절 시스템에 유용한 TGF-β 수용체는 유형 II TGF-β 수용체(예를 들어, TGF-βR2)이다.
- [0225] 일부 실시형태에서, TGFβ 조절제는 표 2에 제공된 TGFβR을 포함한다. 일부 실시형태에서, TGFβ 조절제는 표 2에 제공된 서열에 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0226]

표 2. 예시적인 TGFβR 세포의 도메인

<p>서열번호 32 mTGFβR2ECD (I24-K31,F57-L185)</p>	<p>I P P H V P K S D V E M E A Q K D A S I H L S C N R T I H P L K H F N S D V M A S D N G G A V K L P Q L C K F C D V R L S T C D N Q K S C M S N C S I T A I C E K P H E V C V A V W R K N D K N I T L E T V C H D P K L T Y H G F T L E D A A S P K C V M K E K K R A G E T F F M C A C N M E E C N D Y I I F S E E Y T T S S P D L</p>
<p>서열번호 33 huTGFβR1+2 ECD v1</p>	<p>L Q C F C H L C T K D N F T C V T D G L C F V S V T E T T D K V I H N S M C I A E I D L I P R D R P F V C A P S S K T G S V T T T Y C C N Q D H C N K I E L P T T V K S S P G L G P V E G G G G S T I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E E Y N T S N P D [hTGFβR1-ECD(L34-E125)-hTGFβR2-ECD(A44-D151)]</p>
<p>서열번호 34 huTGFβR1+2 ECD v2</p>	<p>Q C F C H L C T K D N F T C V T D G L C F V S V T E T T D K V I H N S M C I A E I D L I P R D R P F V C A P S S K T G S V T T T Y C C N Q D H C N G G G G S A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E [hTGFβR1-ECD(Q35-N107)-4GS-4GS-hTGFβR2-ECD(L34-E125)]</p>
<p>서열번호 35 mTGFβR1+2 ECD v1</p>	<p>L Q C F C H L C T K D N F T C E T D G L C F V S V T E T T D K V I H N S M C I A E I D L I P R D R P F V C A P S S K T G A V T T T Y C C N Q D H C N K I E L P T T G P F S E K Q S A G L G P V E L G G G G S I P P H V P K S V N S D V M A S D N G G A V K L P Q L C K F C D V R L S T C D N Q K S C M S N C S I T A I C E K P H E V C V A V W R K N D K N I T L E T V C H D P K L T Y H G F T L E D A A S P K C V M K E K K R A G E T F F M C A C N M E E C N D Y I I F S E E Y T T S S P D [mTGFβR1-ECD(L30-L126)-4GS-mTGFβR2-ECD(I24-K31,F57-D184)]</p>
<p>서열번호 36 huTGFβR1+2 ECD v2</p>	<p>Q C F C H L C T K D N F T C E T D G L C F V S V T E T T D K V I H N S M C I A E I D L I P R D R P F V C A P S S K T G A V T T T Y C C N Q D H C N G G G G S A V K L P Q L C K F C D V R L S T C D N Q K S C M S N C S I T A I C E K P H E V C V A V W R K N D K N I T L E T V C H D P K L T Y H G F T L E D A A S P K C V M K E [mTGFβR1-ECD(Q31-N107)-4GS-mTGFβR2-ECD(I24-K31,F57-E150)]</p>

[0227]

<p>서열번호 37</p> <p>IgKss가 있는 마우스 TGFβR2 ECD</p>	<p>METDTLLLWVLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPL</p> <p>KHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICE</p> <p>KPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPCKVMKEKKR</p> <p>AGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL</p>
<p>서열번호 38</p> <p>8(G4S)링커 및 IgKss가 있고 플래그 태그(flag tag)가 있는 마우스 TGFβR2 ECD 이량체</p>	<p>METDTLLLWVLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPL</p> <p>KHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICE</p> <p>KPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPCKVMKEKKR</p> <p>AGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDLGGGGSGGGSGGGSGGG</p> <p>GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSN</p> <p>RTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCS</p> <p>ITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPCKVM</p> <p>KEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDLGGGGG DYKDDDD</p> <p>K</p>

[0228] 키메라 항원 수용체

[0229] 일부 양상에서, 본 발명은 TGF-β 신호전달 조절제(예를 들어, TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드 또는 TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드들을 인코딩하는 핵산 서열) 및 관심 항원에 결합할 수 있는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역 조절 시스템을 제공한다. CAR은 다음 세 가지 필수 단위들을 포함하는 하이브리드 분자이다: (1) 세포외 항원 결합 모티프, (2) 연결/막횡단 모티프, 및 (3) 세포내 T 세포 신호전달 모티프 (Long A H, Haso W M, Orentas R J. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. Oncoimmunology. 2013; 2 (4):e23621). 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 N-말단으로부터 C-말단으로, 신호 또는 리더 펩티드, 항원 결합 도메인, 막횡단 및/또는 힌지 도메인, 공동자극 도메인 및 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 “1세대 CAR” 인데, 이는, 예를 들어, 항원 결합 시 CD3ζ 신호만을 제공하는 CAR을 포함하고, “2세대” CAR은 공동 자극(예를 들어, CD28 또는 CD137) 및 활성화(CD3ζ를 모두 제공하는 CAR을 포함한다. “3세대” CAR에는 다중 공동 자극(예: CD28 및 CD137) 및 활성화(CD3)를 제공하는 CAR이 포함된다. 다양한 실시형태에서, CAR은 항원에 대해 높은 친화도 또는 결합력을 갖도록 선택된다.

[0230] CAR의 항원 결합 모티프는 일반적으로 면역글로불린(Ig) 분자 또는 단일 도메인 항체의 최소 결합 도메인인 단일 사슬 단편 가변(ScFv)에 맞추어 형성된다(예: WO2018/028647A1). 수용체 리간드(즉, IL-13은 종양에서 발현된 IL-13 수용체에 결합하도록 조작됨), 온전한 면역 수용체, 라이브러리-유래 펩티드 및 선천적 면역 시스템 이펙터 분자(예를 들어, NKG2D)와 같은 대체 항원 결합 모티프도 조작된 바 있다. CAR 발현을 위한 대체 세포 표적(예: NK 또는 감마-텔타 T 세포)도 개발 중이다(Brown C E 외, Clin Cancer Res. 2012; 18(8):2199-209; Lehner M 외 PLoS One. 2012; 7 (2):e31210).

[0231] 일부 실시형태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 단일 사슬 가변 단편이다. 일부 실시형태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 단일 도메인 항체이다. 일부 실시형태에서, CAR은 N-말단으로부터 C-말단으로, 신호 또는 리더 펩티드, vH, CD28 막횡단 및 힌지, CD28 동시자극 도메인, 및 CD3 제타 세포내 도메인을 포함한다.

[0232] CAR의 연결 모티프는 IgG의 불변 도메인과 같은 상대적으로 안정적인 구조적 도메인이거나 확장된 가요성 링커가 되도록 설계될 수 있다. IgG 불변 도메인에서 유래된 것과 같은 구조적 모티프들은 ScFv 결합 도메인을 T 세포 원형질막 표면으로부터 멀리 확장시키는 데 사용될 수 있다. 이것은, 결합 도메인이 특히 종양 세포 표면 막에 가까이 있는 일부 종양 표적의 경우 중요할 수 있다(예를 들어, 디시알로강글리오사이드 GD2의 경우; Orentas 외, 미공개 관찰결과). 현재까지 CAR에 사용되는 신호 모티프는 항상 CD3-ζ 사슬을 포함하고 있는데, 이 핵심 모티프는 T 세포 활성화의 핵심 신호이기 때문이다. 처음으로 보고된 2세대 CAR은 CD28 신호전달 도메인과 CD28 막횡단 서열을 특징으로 한다. 이 모티프는 CD137(4-1BB) 신호전달 모티프를 포함하는 3세대 CAR에서

도 사용되었다(Zhao Y 외 J Immunol. 2009; 183 (9): 5563-74). 새로운 기술의 출현으로, 항-CD3 및 항-CD28 항체에 연결된 비드들을 이용한 T 세포의 활성화와 CD28의 표준 “신호 2”의 존재가 더 이상 CAR 자체에 의해 인코딩되는 것에 필요하지 않았다. 비드 활성화를 사용하여, 3세대 벡터는 시험관 내 분석에서 2세대 벡터보다 우수하지 않은 것으로 밝혀졌으며 백혈병 마우스 모델에서 2세대 벡터에 비해 명확한 이점을 제공하지 않았다 (Haso W, Lee D W, Shah N N, Stetler-Stevenson M, Yuan C M, Pastan I H, Dimitrov D S, Morgan R A, FitzGerald D J, Barrett D M, Wayne A S, Mackall C L, Orentas R J. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, Blood. 2013; 121 (7):1165-74; Kochenderfer J N 외 Blood. 2012; 119 (12):2709-20). 이것은 2세대 CD28/CD3-ζ D W 외 American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, La.; Dec. 7-10, 2013) 및 CD137/CD3-ζ 신호전달 형식(Porter D L 외 N Engl J Med. 2011; 365 (8): 725-33)에 존재하는 CD19-특이적 CAR의 임상적 성공에 의해 입증된다. CD137 외에도, OX40과 같은 다른 종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리 구성원들도 CAR-형질전환된 T 세포에서 중요한 지속성 신호를 제공할 수 있다(Yvon E 외, Clin Cancer Res. 2009; 15(18):5852-60). 마찬가지로 중요한 것은 CAR T 세포 집단이 배양된 배양 조건이다.

[0233] CAR의 특성들에는 선택된 표적에 대한 T 세포 특이성 및 반응성을 비-MHC 제한 방식으로 재지시하고 단일클론 항체의 항원 결합 특성들을 이용하는 능력이 포함된다. 비-MHC 제한 항원 인식은 CAR을 발현하는 T 세포가 항원 가공과 독립적으로 항원을 인식하는 능력을 부여하여 주된 종양 탈출 메커니즘을 우회하게 한다. 더욱이, T-세포에서 발현될 때, CAR은 유리하게는 내인성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 사슬과 이량체화하지 않는다.

[0234] 세포의 도메인

[0235] 본원에 기재된 바와 같이, CAR은 달리 항원 결합 도메인 또는 모이어티로 지칭되는 표적-특이적 결합 요소를 포함한다. 도메인의 선택은 표적 세포의 표면을 정의하는 리간드의 유형과 수에 따라 달라진다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 특정 질병 상태(예를 들어, 암)와 관련된 표적 세포에서 세포 표면 마커로 작용하는 리간드(예를 들어, 암 항원)를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서 CAR에서 항원 결합 도메인에 대한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예는 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염, 자가면역 질병 및 암 세포와 관련된 것들을 포함한다.

[0236] 일부 실시형태에서, CAR의 세포의 도메인은 암 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합체를 포함한다. 특정 실시 형태에서, CAR은 종양 항원에 결합한다. 임의의 종양 항원(항원성 펩티드)이 본원에 기재된 종양 관련 실시예에서 사용될 수 있다. 항원 공급원에는 암 단백질이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 항원은 펩티드 또는 온전한 단백질 또는 이의 일부로 발현될 수 있다. 온전한 단백질 또는 이의 일부는 천연이거나 돌연변이될 수 있다. 종양 항원의 비제한적 예에는 탄산 탈수효소 IX(CAIX), 암배아 항원(CEA), CD8, CD7, CD 10, CD 19, CD20, CD22, CD30, CD33, CLL1, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, CD123, CD44V6, 거대세포바이러스(CMV) 감염된 세포(예를 들어, 세포 표면 항원)의 항원, 상피 당단백질-2(EGP-2), 상피 당단백질-40(EGP-40), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 수용체 티로신-단백질 키나아제 erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), 염산 결합 단백질(FBP), 태아 아세틸콜린 수용체(AChR), 염산 수용체-a, 강글리오사이드 G2(GD2), 강글리오사이드 G3(GD3), 구아닐릴 사이클라제 C(GCC), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(ITER-2), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 인터루킨-13 수용체 서브유닛 알파-2 (IL- 13Rα2), k-경쇄, 키나제 삽입 도메인 수용체(KDR), 루이스 Y(LeY), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 흑색종 항원 계열 A1(MAGE-A1), 뮤신 16(MUC16), 뮤신 1(MUC1), 메소텔린(MSLN), ERBB2, MAGEA3, p53, MART1,GP100, 프로테이나제3(PR1), 티로시나제, 서바이빈, hTERT, EphA2, NKG2D 리간드, 암-고환 항원 NY-ESO-1, 암배아 항원(h5T4), 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), PTK7 ROR1, 종양-관련 당단백질 72(TAG-72), 혈관 내피 성장 인자 R2(VEGF-R2), 및 윌름스 종양 단백질(WT-1), BCMA, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, CD99, CD70, ADGRE2, CCR1, LILRB2, PRAME CCR4, CD5, CD3, TRBC1, TRBC2, TIM-3, 인테그린 B7, ICAM-1, CD70, Tim3, CLEC12A 및 ERBB가 포함된다.

[0237] 특정 실시형태에서, CAR은 CD19 폴리펩티드에 결합한다. 특정 실시형태에서, CAR은 인간 CD19 폴리펩티드에 결합한다. 특정 실시형태에서, CAR은 CD19 단백질의 세포의 도메인에 결합한다. 특정 실시형태에서, CD19 CAR은 표 3에 제공된 서열을 포함한다.

[0238] 특정 실시형태에서, CAR은 GCC 폴리펩티드에 결합한다. 특정 실시형태에서, CAR은 인간 GCC 폴리펩티드에 결합한다. 특정 실시형태에서, CAR은 GCC 단백질의 세포의 도메인에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항-GCC CAR은 표 3에 제공된 서열을 포함한다.

[0239] 특정 실시형태에서, CAR은 메소텔린 폴리펩티드에 결합한다. 특정 실시형태에서, CAR은 인간 메소텔린 폴리펩티

드에 결합한다. 특정 실시형태에서, CAR은 메소텔린 단백질의 세포의 도메인에 결합한다.

[0240] 특정 실시형태에서, CAR은, 예를 들어, 면역손상된 대상체에서 병원체 감염 또는 다른 감염성 질병을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위해 병원체 항원에 결합한다. 병원체의 비제한적 예는 질병을 일으킬 수 있는 바이러스, 박테리아, 진균, 기생충 및 원생동물을 포함한다.

[0241] 바이러스의 비제한적인 예로는 레트로비리다에(Retroviridae)(예: 인간 면역결핍 바이러스, 예를 들어, HIV-1(HDTV-III, LAV 또는 HTLV-IIELAV 또는 HIV-III라고도 함); 및 다른 단리물, 예를 들어, HIV-LP); 피코르나비리다에(Picornaviridae)(예: 소아마비 바이러스, A형 간염 바이러스; 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 에코바이러스); 칼시비리다에(Calciviridae)(예: 위장염을 유발하는 균주); 토가비리다에(Togaviridae)(예: 말 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비리다에(Flaviridae)(예: 뎅기열 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로노비리다에(Coronaviridae)(예: 코로나바이러스); 랫도비리다에(Rhabdoviridae)(예: 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로비리다에(Filoviridae)(예: 에볼라 바이러스); 파라믹소피리다에(Paramyxoviridae)(예: 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스); 오르토믹소비리다에(Orthomyxoviridae)(예: 인플루엔자 바이러스); 분가비리다에(Bungaviridae)(예: 한탄 바이러스, 분가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이아 바이러스); 아레나 비리다에(Arena viridae)(출혈열 바이러스); 레오비리다에(Reoviridae)(예: 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스) 비르나비리다에 헤파드나비리다에(Birnaviridae Hepadnaviridae)(B형 간염 바이러스); 파르보비리다에(Parvovirida)(파코바이러스); 파포바비리다에(Papovaviridae)(유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리다에(Adenoviridae)(대부분의 아데노바이러스); 헤르페스비리다에(Herpesviridae)(단순 포진 바이러스(HSV) 1 및 2, 수두 대상 포진 바이러스, 거대세포바이러스(CMV), 헤르페스 바이러스; 포क्स비리다에(Poxviridae)(천두 바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스 바이러스) 및 이리도비리다에(Iridoviridae)(예: 아프리카 돼지 열병 바이러스); 및 분류되지 않은 바이러스(예: 델타 간염의 인자(B형 간염 바이러스의 결합이 있는 위성으로 생각됨), 비-A, 비-B형 간염의 인자(분류 1 = 내부 전염됨; 분류 2 = 비경구 전염됨(즉, C형 간염); 노워크 및 관련 바이러스 및 아스트로바이러스)가 포함된다.

[0242] 박테리아의 비제한적 예는 파스퇴르 엘라(Pasteur ella), 포도상구균(Staphylococci), 연쇄상구균(Streptococcus), 대장균(Escherichia coli), 슈도모나스 종(Pseudomonas species) 및 살모넬라 종(Salmonella species)을 포함한다. 감염성 박테리아의 구체적인 예는 헬리코박터 파일로리스(Helicobacter pyloris), 보렐리아 부르그도르페리(Borelia burgdorferi), 레지오넬라 뉴모필리아(Legionella pneumophila), 미코박테리아 종(Mycobacteria sps)(예를 들어 M. 투베르쿨로시스(M. tuberculosis), M. 아비움(M. avium), M. 인트라셀룰라레(M. intracellular e), M. 칸사이(M. kansasii), M. 고르도나에(M. gordonae)), 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 나이세리아 고노레아(Neisseria gonorrhoeae), 나이세리아 메닝기티디스(Neisseria meningitidis), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 스트렙토코쿠스 피오게네스(Streptococcus pyogenes)(A군 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(Streptococcus agalactiae)(B군 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스(Streptococcus)(비리단스 그룹), 스트렙토코쿠스 파에칼리스(Streptococcus faecalis), 스트렙토코쿠스 보비스(Streptococcus bovis), 스트렙토코쿠스(Streptococcus)(혐기성 종), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(Streptococcus pneumoniae), 병원성 캄필로박터 종(Campylobacter sp.), 엔테로코쿠스 종(Enterococcus sp.), 헤모필루스 인플루엔자에(Haemophilus influenzae), 바실루스 안트라시스(Bacillus anthracis), 코리네박테리움 디프테리아에(corynebacterium diphtheriae), 코리네박테리움 종(corynebacterium sp.), 에리시펠로트릭스 루시오파티아에(Erysipelothrix rhusiopathiae), 클로스트리디움 퍼프린젠스(Clostridium perfringers), 클로스트리디움 테타니(Clostridium tetani), 엔테로박터 아에로게네스(Enterobacter aerogenes), 클렙시엘라 뉴모니아에(Klebsiella pneumoniae), 파스투렐라 톨토시다(Pasturella multocida), 박테로이데스 종(Bacteroides sp.), 푸소박테리움 뉴클레아툼(Fusobacterium nucleatum), 스트렙토바실루스 모닐리포르미스(Streptobacillus moniliformis), 트레포네마 팔라듐(Treponema palladium), 트레포네마 페르테누에(Treponema pertenu), 렙토스피라(Leptospira), 리켓티시아(Rickettsia) 및 악티노마이세스 이스라엘리(Actinomyces israelii)를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0243] 특정 실시형태에서, 병원체 항원은 거대세포바이러스(CMV)에 존재하는 바이러스 항원, 엡스타인 바 바이러스(EBV)에 존재하는 바이러스 항원, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)에 존재하는 바이러스 항원, 또는 인플루엔자 바이러스에 존재하는 바이러스 항원이다.

[0244] 특정 실시형태에서, CAR의 세포의 도메인은 링커를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 GGGGS(서열번호 59)를

포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 (GGGS)_n (서열번호 59)를 포함하고, 이 때 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. 일부 실시형태에서, 링커는 GGGSGGGSGGGGS(서열번호 61)를 포함한다.

[0245] 일부 실시형태에서, 세포의 항원 결합 도메인은 IgA 항체, IgG 항체, IgE 항체, IgM 항체, 이중- 또는 다중-특이적 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 단리된 CDR 또는 이들의 세트; 단일 사슬 가변 단편(scFv), 폴리펩티드-Fc 융합, 단일 도메인 항체(sdAb), 낙타류 항체; 차폐 항체, 소분자 면역의약품 (Small Modular ImmunoPharmaceuticals, "SMIPs™"), 단일 사슬, 탠덤 디아바디, VHH, 안티칼린, 나노바디, 휴머바디(humabody), 미니바디, BiTE, 안키린 반복 단백질, DARPIN, 아비머, DART, TCR 유사 항체, 애드벡틴, 애플린, 트랜스-바디; 아피바디, 트리머X, 마이크로프로테인, 파이노머(Fynomer), 센티린(Centyrin); 및 KALBITOR 또는 이의 단편을 포함한다.

[0246] 일부 실시형태에서, CAR의 세포의 항원 결합 도메인은 단일사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR의 세포의 항원 결합 도메인은 단일 도메인 항체(sdAb)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단일 도메인 항체(sdAb),

[0247] *막횡단 도메인*

[0248] 본원에 기재된 바와 같이, CAR은 막횡단 도메인을 포함한다. 막횡단 도메인과 관련하여, CAR은 CAR의 세포의 항원 결합 도메인에 융합된 하나 이상의 막횡단 도메인을 포함한다. 막횡단 도메인은 천연 또는 합성 출처로부터 유도될 수 있다. 출처가 천연인 경우, 도메인은 막-결합 단백질 또는 막횡단 단백질에서 유래될 수 있다.

[0249] 본원에 기재된 CAR에서 특히 사용되는 막횡단 영역은 T-세포 수용체, CD28, CD3 입실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, 메소텔린, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 알파, 베타 또는 제타 사슬로부터 유래될 수 있다(즉, 적어도 이들 사슬의 막횡단 영역(들)을 포함할 수 있다). 대안적으로 막횡단 도메인은 합성일 수 있으며, 이 때 이는 주로 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함할 것이다. 일부 실시형태에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중항은 합성 막횡단 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 선택적으로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이의 링커가 막횡단 도메인과 CAR의 세포질 신호전달 도메인 사이의 링크지를 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 글리신-세린 더블릿 또는 트리플 알라닌 링커이다.

[0250] 일부 실시형태에서, CAR 내의 도메인들 중 하나와 자연적으로 결합되는 막횡단 도메인이 상기 기재된 막횡단 도메인에 더하여 사용된다. 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인은 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에 대한 이러한 도메인의 결합을 피하게 하여 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하도록 하기 위한 아미노산 치환에 의해 선택될 수 있다.

[0251] 일부 실시형태에서, 본 발명의 CAR에서 막횡단 도메인은 CD28 막횡단 도메인이다. 일부 실시형태에서, CD28 막횡단 도메인은 FWVLVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV 서열번호 42의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 막횡단 도메인은 서열번호 42의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막횡단 도메인은 서열번호 42의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형(예를 들어, 치환)을 가지지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 서열 또는 서열번호 42의 아미노산 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0252] CAR에서, 힌지 도메인으로도 지칭되는 스페이서 도메인은 세포의 도메인과 막횡단 도메인 사이, 또는 세포내 도메인과 막횡단 도메인 사이에 배열될 수 있다. 스페이서 도메인은 막횡단 도메인을 세포의 도메인과 및/또는 막횡단 도메인을 세포내 도메인과 연결하는 역할을 하는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 스페이서 도메인은 300개 이하의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100개의 아미노산, 가장 바람직하게는 25 내지 50개의 아미노산을 포함한다.

[0253] 여러 실시형태에서, 링커는 스페이서 요소를 포함할 수 있는데, 이것은, 존재하는 경우, 이펙터 분자 또는 검출 가능한 마커와 항체 또는 항원 결합 단편 사이의 거리가 증가되도록 링커의 크기를 증가시킨다. 예시적인 스페이서는 당업자에게 공지되어 있고 미국 특허 제 7,964,566, 7,498,298, 6,884,869, 6,323,315, 6,239,104, 6,034,065, 5,780,588, 5,665,860, 5,663,149, 5,635,483, 5,599,902, 5,554,725, 5,530,097, 5,521,284, 5,504,191, 5,410,024, 5,138,036, 5,076,973, 4,986,988, 4,978,744, 4,879,278, 4,816,444, 및 4,486,414, 그리고 미국 특허출원 공개공보 20110212088 및 20110070248에 나열된 스페이서들을 포함하며, 이들 문헌 각각은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

- [0254] 스페이스 도메인은 바람직하게는 항원과 CAR의 결합을 촉진하고 세포로의 신호 전달을 향상시키는 서열을 갖는다. 결합 촉진이 기대되는 아미노산의 예에는 하전된 아미노산인 시스테인, 잠재적 당화 부위의 세린 및 트레오닌 등이 포함되며, 이들 아미노산을 스페이스 도메인을 구성하는 아미노산으로서 사용할 수 있다.
- [0255] 일부 실시형태에서, CAR은 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (서열번호 41)의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형(예를 들어, 치환)을 가지지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 서열 또는 서열번호 41의 아미노산 서열에 95-99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0256] 일부 실시형태에서, 힌지 및 막횡단 도메인은 동일한 분자로부터 유래된다. 다른 실시형태에서, 힌지 및 막횡단 도메인은 상이한 분자(예를 들어, CD28에 융합된 CD8)로부터 유도된다. 일부 실시형태에서, CAR은 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWV L VVGGV LACYSLLVTVAFI IFWV (서열번호 43)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 43의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 서열번호 43의 아미노산 서열의 적어도 1, 2 또는 3개의 변형(예를 들어, 치환)을 가지지만 20, 10 또는 5개 이하의 변형(예를 들어, 치환)을 갖는 서열을 포함한다.
- [0257] 세포내 도메인
- [0258] CAR의 세포질 도메인 또는 그 외 세포내 신호전달 도메인은 CAR이 내부에 배치되어 있었던 면역 세포의 정상적인 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. “이펙터 기능”이라는 용어는 세포의 특화된 기능을 의미한다. 예를 들어, T 세포의 이펙터 기능은 사이토카인의 분비를 포함하는 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서 “세포내 신호전달 도메인”이라는 용어는 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 특화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질 부분을 의미한다. 일반적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우에 전체 사슬을 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 한, 이러한 절단된 부분은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한 온전한 사슬 대신에 사용될 수 있다. 따라서 용어 세포내 신호전달 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.
- [0259] CAR에서 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 예는 T 세포 수용체(TCR)의 세포질 서열 및 항원 수용체 결합 후 신호 전달을 개시하기 위해 함께 작용하는 보조수용체, 뿐만 아니라 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 가진 모든 합성 서열을 포함한다. TCR만으로 생성된 신호들은 T 세포의 완전한 활성화에는 불충분하며 이차 또는 공동 자극 신호도 필요하다. 따라서, T 세포 활성화는 2가지 별개 분류의 세포질 신호전달 서열: TCR(일차 세포질 신호전달 서열)을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 서열과 항원-독립 방식으로 작용하여 이차 또는 공동 자극 신호를 제공하는 서열(이차 세포질 신호전달 서열)에 의해 매개된다고 말할 수 있다.
- [0260] 일차 세포질 신호전달 서열은 자극 방식 또는 억제 방식으로 TCR 복합체의 일차 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 CAR에서 특히 사용되는 ITAM 함유 일차 세포질 신호전달 서열의 예는 TCR 제타(CD3 제타), FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 입실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래한 것들을 포함한다. ITAM의 구체적이고 비제한적인 예는 CD3.제타(NCBI RefSeq: NP.sub.--932170.1)의 아미노산 번호 51 내지 164, Fc.입실론.RI.감마.(NCBI RefSeq: NP.sub.--004097.1)의 아미노산 번호 45 내지 86, Fc.입실론.RI.베타.(NCBI RefSeq: NP.sub.--000130.1)의 아미노산 번호 201 내지 244, CD3.감마.(NCBI RefSeq: NP.sub.--000064.1)의 아미노산 번호 139 내지 182, CD3.델타.(NCBI RefSeq: NP.sub.--000723.1)의 아미노산 번호 128 내지 171, CD3.입실론.(NCBI RefSeq: NP.sub.--000724.1)의 아미노산 번호 153 내지 207, CD5(NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2)의 아미노산 번호 402 내지 495, 0022(NCBI RefSeq: NP.sub.--001762.2)의 아미노산 번호 707 내지 847, CD79a (NCBI RefSeq: NP.sub.--001774.1)의 아미노산 번호 166 내지 226, CD79b (NCBI RefSeq: NP.sub.--000617.1)의 아미노산 번호 182 내지 229, 및 CD66d (NCBI RefSeq: NP.sub.--001806.2)의 아미노산 번호 177 내지 252의 서열들을 갖는 펩티드, 및 이들 펩티드들이 가지는 것과 동일한 기능을 갖는 이들의 변이체들을 포함한다. 본원에 기재된 NCBI RefSeq ID 또는 GenBank의 아미노산 서열 정보에 기초한 아미노산 번호는 각 단백질의 전구체(신호 펩티드 서열 등을 포함함)의 전체 길이를 기초로 하여

넘버링된다. 한 실시형태에서, CAR 내의 세포질 신호전달 분자는 CD3 제타로부터 유래된 세포질 신호전달 서열을 포함한다.

- [0261] 일부 실시형태에서, CAR의 세포내 도메인은 그 자체로 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하거나 CAR과 관련하여 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합되도록 설계될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포내 도메인은 CD3 제타 사슬 부분 및 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 의미한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이러한 공동자극 분자의 예로는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등이 있다. 이러한 공동자극 분자의 구체적이고 비제한적인 예는 CD2(NCBI RefSeq: NP.sub.--001758.2)의 아미노산 번호 236 내지 351, CD4(NCBI RefSeq: NP.sub.--000607.1)의 아미노산 번호 421 내지 458, CD5(NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2)의 아미노산 번호 402 내지 495, CD8.알파.(NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3)의 아미노산 번호 207 내지 235, CD83(GenBank: AAA35664.1)의 아미노산 번호 196 내지 210, CD28(NCBI RefSeq: NP.sub.--006130.1)의 아미노산 번호 181 내지 220, CD137(4-1BB, NCBI RefSeq: NP.sub.--001552.2)의 아미노산 번호 214 내지 255, CD134(OX40, NCBI RefSeq: NP.sub.--003318.1)의 아미노산 번호 241 내지 277, 및 ICOS (NCBI RefSeq: NP.sub.--036224.1)의 아미노산 번호 166 내지 199의 서열을 갖는 펩티드, 및 이들 펩티드와 동일한 기능을 갖는 이들의 변이체를 포함한다. 따라서, 본원의 개시내용은 공동자극 신호전달 요소로서 주로 4-1BB를 예로 들지만, 다른 공동자극 요소들도 본 발명의 범위에 속한다.
- [0262] CAR의 세포질 신호전달 부분 내의 세포질 신호전달 서열은 서로 무작위 또는 특정 순서로 연결될 수 있다. 선택적으로, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2 내지 10개 아미노산 길이의 링커가 링키지를 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 글리신-세린 더블렛 또는 트리플 알라닌 링커이다.
- [0263] 일부 실시형태에서, 세포내 도메인은 CD28 공동자극 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, CAR의 세포내 도메인은 RSKRSRLHSDYMNMPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS(서열번호 44)에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0264] 일부 실시형태에서, 세포내 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다.
- [0265] 일부 실시형태에서, 세포내 도메인은 하나 이상의 변형된 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 갖는 CD3-제타를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 도메인은 3개의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM) 중 첫 번째가 변형되지 않고 두 번째 및 세 번째 ITAM이 변형된, "1XX" 로 명명된 CD3-제타를 포함한다. 일부 실시형태에서,

	CAR의	세포내	도메인은
RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR(서열번호 45)			

 에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0266] 일부 실시형태에서, CAR은 천연 ITAM1, 천연 BRS1, 천연 BRS2, 천연 BRS3, 2개의 기능 소실 돌연변이를 갖는 ITAM2 변이체, 및 2개의 기능 소실 돌연변이를 갖는 ITAM3 변이체를 포함하는 변형된 CD3z 폴리펩티드(예를 들어, 변형된 인간 CD3z 폴리펩티드)를 포함하는 세포내 신호전달 도메인, 및 CD28 폴리펩티드(예를 들어, 인간 CD28 폴리펩티드)를 포함하는 공동자극 신호전달 영역을 포함한다.
- [0267] 또 다른 실시형태에서, 세포내 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 또한 또 다른 실시형태에서, 세포내 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28과 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다.
- [0268] 일부 실시형태에서, CAR의 세포내 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다.
- [0269] 일부 실시형태에서, CAR은 표 3에 제공된 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0270]

표 3. 예시적인 키메라 항원 수용체

	서열
항-CD19 CAR	<p>MGTSLLCWMA LCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMN</p> <p>WVKQRPGKLEWIGRIYPGDEDTNYSGKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY</p> <p>FCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSIQLTQSPAIMSASPGEK</p> <p>VTMTCASASSVSYMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTSYFLTINN</p> <p>MEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA</p> <p>CRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM</p> <p>NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSRFTPIQEEQADA</p> <p>HSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPR</p> <p>RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHM</p> <p>QALPPR (서열번호 49)</p>
마우스 CD19 CAR	<p>METDTLLLWVLLLVWPGSTGEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVVK</p> <p>QRPGQGLEWIGQIYPGDGDNTYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFC</p> <p>ARKTISSVVDYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGD</p> <p>RVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGDFTLTIT</p> <p>NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKIEFMYPYLDNERSNGTIIHIKEHLCHT</p> <p>QSSPKLFWALVVVAGVLCYGLLVTVVLCVIWTNSRRNRLQLSDYMNMTPRRGLTRK</p> <p>PYQPYAPA R DFAAYRPRAKFSRSAAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKRRARD</p> <p>PEMGGKQQRNRPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGDGLYQGLSTAT</p> <p>KDTYDALHMQLAPR (서열번호 62)</p>
인간 CD19 CAR (CD3 -1xx 포함)	<p>MALPVTALLPLALLHAEVK LQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVVKQR</p> <p>PGQGLEWIGQIYPGDGDNTYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCAR</p> <p>KTISSVVDYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRV</p> <p>SVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGDFTLTITN</p> <p>VQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPYLDNEKSNGTIIHVKGK</p> <p>HLCPSPLFPGSPKPFVVLVWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR</p>

[0271]

	PGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR (서열번호 63)
V1-01 항-GCC CAR	MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQP AGKGLEWIGRIYPSGSTSYPNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDR STGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPS KPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDAL HMQALPPR (서열번호 47)
V51 항-GCC CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMTWVR QAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYC TRDYNKDYWGQGLTVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPF WVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALH MQALPPR (서열번호 48)
V5 항-GCC CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYC ATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGP SKPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY PYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTF DALHMQALPPR (서열번호 50)
V36 항-GCC CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMTWVR QAPGGRLWVAKIKYDGEKYYADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMDLSRAEDTAVYYC

[0272]

	<p>TRDYNKDYWGQGLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP SKPFWVWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRD PE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDT F DALHMQALPPR (서열번호 51)</p>
<p>V1 항-GCC CAR</p>	<p>MGWSCIIIFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGASISHYYWSWFRQ P AGKGLEWIGRIYPSGTSYNPSLKS RVAMSVDPK NQFSLNLSSVTAADTAVYCCARD R STGWSEWNSDLWGRGTLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLF PGPSKPFWVWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR PGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVL KRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLF QGLSTATKD TFDALHMQALPPR (서열번호 52)</p>
<p>V48 항-GCC CAR</p>	<p>MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWV R QAPGKLEWVAKIRHDGGEKYYPD SVKGRFTVSRD NAKNSLYLQMDNLRAEDTAMY Y CTRDYNKDLWGQGLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLF PG PSKPFWVWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGR REEYDVLKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRG KGGHDGLFQGLSTATKD TFDALHMQALPPR (서열번호 53)</p>
<p>V8 항-GCC CAR</p>	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKLEWVAKIKYD GSE KYVDSVKGRFTISRDN AKNSVYLQMNSLRAEDTG VYCATDFTRD VWGQ GTTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP GSKPFWVWLVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS RVKFSR SADAPAYQQGNQLYNELNL GRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKDKMAEAFSEIGMKG ERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (서열번호 54)</p>

<p>V9 항-GCC CAR</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGRGLEWVAKIRYDGGE KYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVGWGQTTVTYSS RAAAEIVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVWLVVGGVLACYSL VTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (서열번호 55)</p>
<p>V30 항-GCC CAR</p>	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVRQAPGKGREWVAKIKYDGSS EKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVGWGQTTVTYS S RAAAEIVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVWLVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (서열번호 56)</p>
<p>V31 항-GCC CAR</p>	<p>QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGREWVAKIKYDGSE KYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVGWGQTTVTYSS RAAAEIVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVWLVVGGVLACYSL VTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (서열번호 57)</p>

[0273] CAR의 기능적 특징

[0274] 또한 본원에 개시된 CAR의 기능적 부분들이 본 발명의 범위 내에 명시적으로 포함된다. CAR과 관련하여 사용되는 용어 “기능적 부분”은 본원에 개시된 하나 이상의 CAR의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하며, 이러한 부분 또는 단편(이는 CAR의 일부임)은 CAR(또는 CAR, parent CAR)의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 부분은, 예를 들어, 모 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하거나 질병을 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 보유하는 CAR의 부분을 포함한다. 모 CAR과 관련하여, 기능적 부분은, 예를 들어, 모 CAR의 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% 이상을 포함할 수 있다.

[0275] 기능적 부분은 이러한 부분의 아미노 또는 카르복시 말단, 또는 양쪽 말단에, 모 CAR의 아미노산 서열에서 발견되지 않는 추가 아미노산을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 추가 아미노산은 기능성 부분의 생물학적 기능, 예를 들어, 표적 세포 인식, 암 검출, 암 치료 또는 예방 등을 방해하지 않는다. 보다 바람직하게는, 추가 아미노산은 생물학적 활성을 모 CAR의 생물학적 활성과 비교하여 향상시킨다.

[0276] 본원에 개시된 CAR의 기능적 변이체가 본 발명의 범위에 포함된다. 본원에서 사용되는 용어 “기능적 변이체”는 모 CAR과 상당한 또는 유의미한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 CAR, 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭하며, 이러한 기능적 변이체(CAR의 변이체임)는 CAR의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 변이체는, 예를 들어, 모 CAR과 유사한 정도로, 동일한 정도로 또는 더 높은 정도로 표적 세포들을 인식하는 능력을 보유하는 본원에 기재된 CAR(또는 CAR)의 변이체를 포함한다. 모 CAR과 관련하여, 기능적 변이체는, 예를 들어, 모 CAR과 아미노산 서열이 적어도 약 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 98% 또는 그 이상 동일할 수 있다.

[0277] 기능적 변이체는, 예를 들어, 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 기능적 변이체는 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미

노산 서열을 포함할 수 있다. 이 경우, 비보존적 아미노산 치환이 기능성 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 이러한 비-보존적 아미노산 치환은 기능적 변이체의 생물학적 활성을 강화시킬 수 있으며, 그 결과 기능적 변이체의 생물학적 활성은 모 CAR의 활성과 비교하였을 때 증가된다.

- [0278] CAR의 아미노산 치환은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환이다. 보존적 아미노산 치환은 당업계에 공지되어 있고, 특정 물리적 및/또는 화학적 특성을 갖는 하나의 아미노산이 동일하거나 유사한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 교환되는 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 산성/음전하 극성 아미노산의 또 다른 산성/음전하 극성 아미노산(예: Asp 또는 Glu)으로의 치환, 비극성 측쇄를 가진 아미노산의 비극성 측쇄를 가진 또 다른 아미노산(예: Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val 등)으로의 치환, 염기성/양전하 극성 아미노산의 또 다른 염기성/양전하 극성 아미노산(예: Lys, His, Arg 등)으로의 치환, 극성 측쇄를 갖는 비하전 아미노산의 극성 측쇄를 갖는 또 다른 비하전 아미노산(예: Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr 등)으로의 치환, 베타-분지형 측쇄를 가진 아미노산의 베타-분지형 측쇄를 가진 또 다른 아미노산(예: Ile, Thr 및 Val)으로의 치환, 방향족 측쇄를 가진 아미노산의 방향족 측쇄를 가진 또 다른 아미노산(예: His, Phe, Trp 및 Tyr)으로의 치환 등 일 수 있다.
- [0279] CAR은 다른 구성요소, 예를 들어, 다른 아미노산이 기능적 변이체의 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않도록 본원에 기재된 특정 아미노산 서열 또는 서열들로 본질적으로 구성될 수 있다.
- [0280] CAR(기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 임의의 길이일 수 있다, 즉, CAR(또는 이의 기능적 부분 또는 기능적 변이체)이 이들의 생물학적 활성, 예를 들어, 특이적으로 항원에 결합하거나, 포유동물의 질병 세포를 검출하거나, 포유동물의 질병을 치료 또는 예방하는 등의 능력을 보유하는 한, 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, CAR은 약 50 내지 약 5000개의 아미노산 길이, 예컨대, 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 또는 그 이상의 아미노산 길이일 수 있다.
- [0281] CAR(본 발명의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 하나 이상의 자연 발생 아미노산 대신 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 상용 분야에 공지이며, 예를 들어, 아미노시클로헥산 카르복실산, 노르류신, α -아미노 n-데카논산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-하이드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카르복시페닐알라닌, β -페닐세린 β -하이드록시페닐알라닌, 페닐글리신, α -나프틸알라닌, 시클로헥실알라닌, 시클로헥실글리신, 인돌린-2-카르복실산, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N'-벤질-N'-메틸-리신, N',N'-디벤질-리신, 6- 하이드록시리신, 오르니틴, -아미노시클로헥탄 카르복실산, α -아미노시클로헥산 카르복실산, α -아미노시클로헥탄 카르복실산, α -(2-아미노-2-노르보만)-카르복실산, γ -디아미노부틸산, β -디아미노프로피온산, 호모페닐알라닌, 그리고 α -tert-부틸글리신을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0282] CAR(기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 당화, 아미드화, 카르복실화, 인산화, 에스테르화, N-아실화, 예를 들어, 이황화 가교를 통해 고리화될 수 있거나 산 부가 염으로 전환 및/또는 선택적으로 이량체화 또는 중합 또는 접합될 수 있다.
- [0283] 치환 및 변이체
- [0284] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 성질들을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 상기 항체를 인코딩하는 핵산 서열 내부에 적절한 변형을 도입시킴으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들면, 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구조체가 원하는 특성, 예를 들어, 항원 결합을 보유하는 한, 최종 구조체에 도달하기 위한 어떠한 결실, 삽입 및 치환의 조합이라도 이루어질 수 있다.
- [0285] a) 치환, 삽입, 및 결실 변이체
- [0286] 일부 실시형태들에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발에 대한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 이는 아미노산 측쇄 분류를 참조하여 이하에서 추가로 설명된다. 아미노산 치환을 관심 항체에 도입하고 원하는 활성, 예를 들어, 유지/개선 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 생성물을 스크리닝할 수 있다.
- [0287] 아미노산은 다음과 같이 공통적인 측쇄 성질들에 따라 그룹화될 수 있다:

- [0288] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0289] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0290] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0291] (4) basic: His, Lys, Arg;
- [0292] (5) 측쇄 방향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0293] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0294] 비-보존적 치환은 이들 분류들 중 하나의 구성원을 또 다른 분류로 바꾸게 될 것이다.
- [0295] 치환성 변이체의 한 가지 유형은 모 항체의 하나 또는 그 이상의 초가변적 영역 잔기의 치환 (예컨대, 인간화된 또는 인간 항체)과 관련된다. 일반적으로, 추가 연구를 위하여 선별된 생성된 변이체(들)은 모 항체와 비교하였을 때, 특정 생물학적 성질들 (예컨대, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형(예컨대, 개선)을 가지거나 및/또는 모 항체의 특정 생물학적 성질들을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화도 성숙 항체이며, 이는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이 기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있다. 간략하게 설명하자면, 하나 또는 그 이상의 HVR 잔기는 돌연변이되며, 변이체 항체는 파지 상에서 디스플레이되며, 그리고 특정 생물학적 활성 (예컨대, 결합 친화도)에 대하여 스크리닝된다.
- [0296] 예를 들어, 항체 친화도를 개선하기 위해 HVR에서 변경 (예를 들어, 치환)이 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR “핫스팟”, 즉, 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 거치는 코돈들에 의해 인코딩되는 잔기 (예를 들어, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008) 참고), 및/또는 SDR (a-CDR)에서 이루어질 수 있으며, 생성된 변이체 VH 또는 VL을 결합 친화도에 대해 검사한다. 제 2 라이브러리를 구축하고, 재선별함에 의한 친화도 성숙은 예를 들어, Hoogenboom 외. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 외, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))에서 설명되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시형태에서, 다양성은 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내부로 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 에러-프론 PCR, 사슬 서플링, 또는 올리고뉴클레오티드-지정 돌연변이유발)에 의해 도입된다. 이어서 제2 라이브러리가 생성된다. 이어서, 이 라이브러리를 스크리닝하여, 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 동정한다. 다양성을 도입시키는 또 다른 방법은 HVR-지시된 방법을 포함하는데, 이 때 몇 개의 HVR 잔기(가령, 한번에 4-6개 잔기)가 무작위 배정된다. 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기는 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 특이적으로 동정될 수 있다. 특히 CDR-H3 및 CDR-L3이 표적이 되는 경우가 많다.
- [0297] 일부 실시형태들에서, 치환, 삽입 또는 결실은 그러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 HVR 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에 제공된 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR “핫스팟” 또는 CDR 외부에 있을 수 있다. 상기에서 제시된 변이체 VHH의 일부 실시형태들에 있어서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0298] 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 식별하는데 유용한 방법은 “알라닌 스캐닝 돌연변이유발”로 지칭되며, Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085에 기재되어 있다. 이 방법에서, 표적 잔기 또는 표적 잔기들의 그룹 (예를 들어, 하전된 잔기, 가령 Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu)이 식별되고, 중성 또는 음 전하 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원과 항체의 상호작용이 영향을 받았는지를 판단한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에 추가 치환이 도입될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 사용하여 항체와 항원 사이의 접촉점을 식별한다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 치환 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체들이 원하는 성질을 포함하는지 여부를 결정하기 위해 이들을 스크리닝할 수 있다.
- [0299] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기에서 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 길이 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 상기 항체 분자의 다른 삽입 변이체들은 효소에 항체의 N- 또는 C-말단을 융합(예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 상기 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 항체의 N- 또는 C-말단을 융합하는 것을 포함한다.
- [0300] b) 당화 변이체

- [0301] 일부 실시형태들에서, 본원에서 제공된 항체는 이 항체가 당화되는 정도를 증가 또는 감소시키기 위하여 변경된다. 항체에 대한 당화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 당화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 이루어질 수 있다.
- [0302] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포들에 의해 만들어지는 천연 항체는 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-링키지에 의해 일반적으로 부착된 분지화된, 이측각성 (biantennary) 올리고당을 전형적으로 포함한다. 예를 들어, Wright 외 TIBTECH 15: 26-32 (1997)을 참조하라. 상기 올리고당은 다양한 탄수화물, 예를 들어, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산, 뿐만 아니라 상기 이측각성 올리고당 구조의 “스텝(stem)”에 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 본 발명의 항체에서 올리고당의 변형이 이루어질 수 있다.
- [0303] 일부 실시형태에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 없는 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들면, WO 2008/077546에서 설명된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광분석에 의해 측정하여, Asn 297에 부착된 모든 당구조 (예컨대, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조)의 합에 대한, Asn297에서 당 사슬 내부의 평균 푸코스 양을 계산함으로써 결정된다. Asn297은 Fc 영역에서 대략 위치 297 (Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 항체에서 소수의 서열 변이로 인하여 위치 297의 상류 또는 하류의 약 ± 3의 아미노산, 가령, 위치 294와 300 사이에 또한 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화는 개선된 ADCC 기능을 보유할 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 공보 제2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) 참조. “탈푸코실화” 또는 “푸코스-결핍” 항체 변이체들과 관련된 문헌들의 예는 다음을 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki 외 J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki 외 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예에는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (Ripka 외 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 미국 특허출원 US 2003/0157108 A1, Presta, L; 및 WO 2004/056312 A1, Adams 외), 및 녹아웃 세포주, 예를 들어, 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, Yamane-Ohnuki 외 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. 외, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); 및 WO2003/085107 참조)가 포함된다.
- [0304] 항체의 Fc 영역의 이측각성 올리고당이 GlcNAc에 의해 양분되어 있는, 양분된 올리고당을 가진 항체 변이체들이 추가로 제공된다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 변이체들의 예들은 예를 들어, WO 2003/011878 (Jean-Mairet 외.); 미국 특허 제6,602,684 (Umana 외.); 그리고 미국 2005/0123546 (Umana 외.)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당에 최소한 한 개의 갈락토스 잔기를 가진 항체 변이체들이 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체들은 개선된 CDC 기능을 보유할 수 있다. 이러한 항체 변이체들은 예로써, WO 1997/30087 (Patel 외.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 그리고 WO 1999/22764 (Raju, S.)에서 설명된다.
- [0305] CAR(이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 당업계에 공지된 방법에 의해 얻을 수 있다. CAR은 폴리펩티드 또는 단백질을 만드는 임의의 적합한 방법에 의해 만들어질 수 있다. 폴리펩티드 및 단백질을 신생 합성하는 적합한 방법은 Chan 외, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood 외, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001; 및 미국 특허 제 5,449,752에 기재되어 있다. 또한, 폴리펩티드 및 단백질은 표준 재조합 방법을 사용하여 본원에 기재된 핵산을 사용하여 재조합적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, Sambrook 외, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; 및 Ausubel 외, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, N Y, 1994를 참조하라. 또한, 일부 CAR(이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 식물, 박테리아, 곤충, 포유동물, 예를 들어, 쥐, 인간 등과 같은 공급원으로부터 단리 및/또는 정제될 수 있다. 단리 및 정제 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 CAR(이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)은 기업체들에 의해 상업적으로 합성될 수 있다. 이와 관련하여 CAR은 합성, 재조합, 단리 및/또는 정제될 수 있다.

[0306] **검출가능한 마커 및 태그**

[0307] 본원에 개시된 하나 이상의 항원에 특이적인 CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 단클론 항체, 이의 항원 결합 단편은 또한 태그 단백질과 함께 발현(예를 들어, 공동-발현)될 수 있다. 일부 실시형태에서, 태그 서열 및 CAR 서열의 동시 바이시스트론 발현을 위해 푸린(furin) 인식 부위 및 하류 2A 리보솜 서열이 설계되었다. 일부 실시형태에서, 2A 서열은 GSGATNFSLKQAGDVEENPGP 서열번호 58의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 푸린 및 P2A 서열은 서열번호 58의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, P2A 태그는 서열번호 58의 아미노산 서열 또는 이에 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0308] 본원에 개시된 하나 이상의 항원에 특이적인 CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 단클론 항체, 이의 항원 결합 단편은 또한 검출가능한 마커; 예를 들어, ELISA, 분광광도법, 유동 세포 분석법, 현미경 또는 진단 영상 기술(예: 컴퓨터 단층 촬영(CT), 컴퓨터 축 단층 촬영(CAT) 스캔, 자기 공명 영상(MRI), 핵 자기 공명 영상 NMRI), 자기공명단층촬영(MTR), 초음파, 광섬유 검사, 복강경 검사)로 검출할 수 있는 검출 가능한 마커와 접합될 수 있다. 검출가능한 마커의 구체적이고 비제한적인 예는 형광단, 화학발광제, 효소 결합, 방사성 동위원소 및 중금속 또는 화합물(예를 들어 MRI에 의한 검출을 위한 초상자성 산화철 나노결정)을 포함한다. 예를 들어, 유용한 검출 가능한 마커는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌술포닐 클로라이드, 피코에리트린, 란타나이드 인광체 등을 포함하는 형광 화합물을 포함한다. 루시페라제, 녹색 형광 단백질(GFP), 황색 형광 단백질(YFP)과 같은 생물발광 마커도 사용된다. CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 또한 검출에 유용한 효소, 예를 들어, 홀스래디시 퍼옥시다제, β-갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리 포스파타제, 글루코스 옥시다제 등과 접합될 수 있다. CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 검출 가능한 효소와 접합될 때, 이는 효소가 사용하는 추가 시약을 첨가하여 식별될 수 있는 반응 생성물을 생성하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제 제제가 존재할 때, 과산화수소와 디아미노벤지딘을 첨가하면 시각적으로 검출가능한 착색된 반응 생성물이 생성된다. CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 또한 비오틴과 접합될 수 있고, 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접 측정을 통해 검출될 수 있다. 아비딘 자체가 효소 또는 형광 표지와 접합될 수 있다는 점에 유의해야 한다.

[0309] CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 가돌리늄과 같은 상자성 제제와 접합될 수 있다. 초상자성 산화철과 같은 상자성 물질도 표지로 사용된다. 항체는 또한 란타나이드(예: 유로퓸 및 디스프로슘) 및 망간과 접합될 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편은 또한 2차 리포터(예: 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인식되는 미리 결정된 폴리펩티드 에피토프로 표지될 수 있다.

[0310] CAR, CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 또한 방사성표지된 아미노산과 접합될 수 있다. 방사성 표지는 진단 및 치료 목적 모두에 사용될 수 있다. 예를 들어, 방사성 표지는 본원에 개시된 하나 이상의 항원 및 x-선, 방출 스펙트럼 또는 기타 진단 기술에 의해 항원 발현 세포를 검출하는 데 사용될 수 있다. 또한, 방사성표지는, 예를 들어, 신경모세포종의 치료를 위해 대상체의 종양 치료를 위한 독소로서 치료적으로 사용될 수 있다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예는 다음 방사성 동위원소 또는 방사성 뉴클레오티드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I.

[0311] 이러한 검출가능한 마커를 검출하는 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 따라서, 예를 들어, 방사성 표지는 사진 필름 또는 신틸레이션 계수기를 사용하여 검출할 수 있고, 형광 마커는 방출된 조명을 검출하는 광검출기를 사용하여 검출할 수 있다. 효소 표지는 일반적으로 효소에 기질을 제공하고 기질에 대한 효소의 작용에 의해 생성된 반응 생성물을 검출함으로써 검출되며, 비색 표지는 착색된 표지를 단순히 시각화함으로써 검출된다.

[0312] **면역반응 세포 및 숙주 세포**

[0313] 본 출원의 한 양상은 조작된 면역 이펙터 세포(예를 들어, 면역반응 세포)를 제공한다. 본원에서 사용되는 “면역반응 세포”는 면역 반응에서 기능하는 세포 또는 이의 선조 또는 자손을 의미한다. 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 본원에 기재된 면역 조절 시스템을 포함한다(예를 들어, 종양 관련 항원 또는 스트레스 리간드에 특이성을 갖는 표적화제; 및 TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포). 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 본원에 기재된 면역 조절 시스템(예를 들어, 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열; 및 TGF-β 신호전달을 조절하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열)을 포함한다.

- [0314] 일부 실시형태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포, NK 세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포 또는 배아 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역반응 세포는 T 세포이다.
- [0315] 본원의 목적을 위해, T 세포는 임의의 T 세포, 예를 들어, 배양된 T 세포, 예를 들어, 1차 T 세포, 또는 배양된 T 세포주로부터의 T 세포, 예를 들어, Jurkat, SupT1 등, 또는 포유동물에서 얻은 T 세포일 수 있다. 포유동물로부터 얻은 경우, T 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선 또는 기타 조직이나 체액을 포함한(그러나 이에 제한되지 않음) 다양한 출처로부터 얻을 수 있다. T 세포는 또한 농축되거나 정제될 수 있다. T 세포는 인간 T 세포일 수 있다. T 세포는 인간으로부터 단리된 T 세포일 수 있다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있고 CD4+/CD8+ 이중 양성 T 세포, CD4+ 헬퍼 T 세포, 예를 들어, Th1 및 Th2 세포, CD8+ T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포), 중앙 침윤 세포, 기억 T 세포, 기억 줄기 세포, 즉, Tscm, 나이브 T 세포 등을 비롯한(그러나 이에 제한되는 것은 아님) 임의의 발달 단계의 것일 수 있다. T 세포는 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포일 수 있다.
- [0316] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CAR은 적합한 비-T 세포에서 사용될 수 있다. 이러한 세포는, 예를 들어, NK 세포 및 만능 줄기 세포로부터 생성된 T-유사 세포와 같은 면역 이펙터 기능을 갖는 세포이다.
- [0317] 한 실시형태는 본원에 기재된 임의의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 “숙주 세포”는 본 발명의 재조합 발현 벡터를 포함할 수 있는 모든 유형의 세포를 의미한다. 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어, 식물, 동물, 진균 또는 조류일 수 있거나, 원핵 세포, 예를 들어, 박테리아 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포는 배양 세포 또는 1차 세포, 즉, 유기체, 예를 들어, 인간으로부터 직접 단리된 세포일 수 있다. 숙주 세포는 부착 세포 또는 현탁 세포, 즉, 현탁액에서 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, DH5a 대장균 세포, 차이니즈 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HEK293 세포 등을 포함한다. 재조합 발현 벡터를 증폭 또는 복제하기 위해, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어, DH5a 세포일 수 있다. 재조합 CAR을 생산하기 위한 목적을 위해, 숙주 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 숙주 세포는 인간 세포일 수 있다. 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있고, 임의의 유형의 조직에서 기원할 수 있으며, 임의의 발달 단계일 수 있지만, 숙주 세포는 말초 혈액 림프구(PBL) 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)일 수 있다. 숙주 세포는 T 세포일 수 있다.
- [0318] 또한 한 실시형태에서 본원에 기재된 적어도 하나의 숙주 세포를 포함하는 세포 집단이 제공된다. 세포의 집단은 적어도 하나의 다른 세포, 예를 들어, 숙주 세포(예를 들어, T 세포) 이외에도 기재된 임의의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 이중 집단일 수 있으며, 이는 재조합 발현 벡터, 또는 T 세포 이외의 세포, 예를 들어, B 세포, 대식세포, 호중구, 적혈구, 간세포, 내피 세포, 상피 세포, 근육 세포, 뇌 세포 등을 포함하지 않는다. 대안적으로, 세포 집단은 재조합 발현 벡터를 포함하는 (예를 들어, 이들로 필수적으로 구성된) 숙주 세포를 주로 포함하는 실질적으로 균질한 집단일 수 있다. 이러한 집단은 또한 세포들의 클론 집단일 수 있으며, 여기서 상응 집단의 모든 세포는 재조합 발현 벡터를 포함하는 단일 숙주 세포의 클론이어서, 집단의 모든 세포가 재조합 발현 벡터를 포함한다. 본 발명의 한 실시형태에서, 세포 집단은 본원에 기재된 바와 같은 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 클론 집단이다.
- [0319] CAR(기능적 부분 및 이의 변이체 포함), 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포(이의 개체군 포함) 및 항체(이의 항원 결합 부분 포함)는 단리 및/또는 정제될 수 있다. 예를 들어, 정제된(또는 단리된) 숙주 세포 제제는 숙주 세포가 체내 자연 환경의 세포보다 더 순수한 제제이다. 이러한 숙주 세포는 예를 들어 표준 정제 기술에 의해 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포의 제제는 숙주 세포가 제제의 총 세포 함량의 적어도 약 50%, 예를 들어, 적어도 약 70%를 나타내도록 정제된다. 예를 들어, 순도는 적어도 약 50%일 수 있고, 약 60%, 약 70% 또는 약 80% 초과일 수 있거나, 약 100%일 수 있다.
- [0320] **핵산 및 발현 벡터**
- [0321] 본 발명의 실시형태에 의해 추가로 제공되는 것은 본원에 기재된 임의의 CAR, 항체 또는 이의 항원 결합 부분(기능적 부분 및 그의 기능적 변이체 포함)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산이다. 본 발명의 핵산은 본원에 기재된 임의의 리더 서열, 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인 및/또는 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0322] 일부 실시형태에서, 뉴클레오티드 서열은 코돈-변형될 수 있다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화는 mRNA 전사체의 번역 효율을 증가시키는 것으로 여겨진다. 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화는 동일한 아미노산을 인코딩하지만 세포 내에서 더 쉽게 이용 가능한 tRNA에 의해 번역될 수 있는 또 다른 코돈으로 천연 코돈을 치환하는 것을 포함할 수 있으며, 따라서 번역 효율을 증가시킨다. 뉴클레오티드 서열의 최적화

는 또한 번역을 방해하는 2차 mRNA 구조를 감소시켜 번역 효율을 증가시킬 수 있다.

- [0323] 본 발명의 실시형태에서, 핵산은 본 발명의 CAR의 항원 결합 도메인을 인코딩하는 코돈-변형된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 핵산은 본원에 기재된 임의의 CAR을 인코딩하는 코돈-변형된 뉴클레오티드 서열(이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)을 포함할 수 있다.
- [0324] 발현 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 코스미드, YAC, EBV 유래 에피솜 등을 포함한다. 편리한 벡터는 임의의 VH 또는 VL 서열이 쉽게 삽입되고 발현될 수 있도록 조작된 적절한 제한 부위를 가지는, 기능적으로 완전한 인간 CH 또는 CL 면역글로불린 서열을 인코딩하는 벡터이다. 이러한 벡터에서, 스플라이싱은 일반적으로 삽입된 J 영역의 스플라이스 공여체 부위와 인간 C 영역 앞의 스플라이스 억셉터 부위 사이에서 발생하며, 인간 CH 엑손 내에서 발생하는 스플라이스 영역에서도 발생한다. 적합한 발현 벡터는 다수의 구성요소, 예를 들어, 복제 기점, 선별 마커 유전자, 하나 이상의 발현 제어 요소, 예를 들어, 전사 제어 요소(예: 프로모터, 인핸서 또는 종결인자) 및/또는 하나 이상의 번역 신호, 신호 서열 또는 리더 서열 등을 함유할 수 있다. 폴리아데닐화 및 전사 종결은 코딩 영역들의 하류에 있는 천연 염색체 부위에서 발생한다. 생성된 키메라 항체는 임의의 강력한 프로모터에 연결될 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 벡터의 예는 포유동물 숙주에 적합하고 바이러스 복제 시스템에 기초한 것들, 예를 들어, 유인원 바이러스 40(SV40), 라우스 육종 바이러스(RSV), 아테노바이러스 2, 소 유두종 바이러스(BPV), 파포바바이러스 BK 돌연변이체(BKV), 또는 마우스 및 인간 거대세포바이러스(CMV) 및 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MMLV), 천연 Ig 프로모터 등을 포함한다. 단일 사본 또는 다중 사본들로 유지되거나, 또는, 예를 들어, LTR을 통해 또는 다중 통합 부위를 가지도록 조작된 인공 염색체를 통해 숙주 세포 염색체로 통합되는 벡터들을 비롯한, 다양한 적합한 벡터가 당업계에 공지되어 있다 (Lindenbaum 외, *Nucleic Acids Res.* 32:e172 (2004), Kennard 외, *Biotechnol. Bioeng.* Online May 20, 2009). 적합한 벡터들의 추가 예는 이후 섹션에 나열된다.
- [0325] 따라서, 본 발명은 항체, 항체의 항원-결합 단편(예를 들어, 인간, 인간화, 키메라 항체 또는 전술한 것들 중 어느 하나의 항원-결합 단편), 항체 사슬(예를 들어, 중쇄, 경쇄) 또는 TGF β 또는 TGF β R에 결합하는 항체 사슬의 항원 결합 부분을 인코딩하는 핵산을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 TGF β R의 핵산 세포의 도메인을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터를 제공한다.
- [0326] 진핵 숙주 세포에서의 발현은 이러한 세포가 원핵 세포에서보다 적절하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 조립하고 분비할 가능성이 더 높기 때문에 유용하다. 그러나 부적절한 폴딩으로 인해 비활성 상태로 생산된 항체는 공지의 방법들에 따라 재생 가능할 수 있다(Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, 459-89(1982)). 숙주 세포는 경쇄 이량체 또는 중쇄 이량체와 같은 온전한 항체의 일부를 생산할 수 있을 것이며, 이들 또한 본 발명에 따른 항체 동족체이다.
- [0327] 또한 본원에 기재된 CAR 구조체를 인코딩하는 임의의 핵산과 적어도 약 70% 이상, 예를 들어, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산이 제공된다.
- [0328] 한 실시형태에서, 핵산은 재조합 발현 벡터에 통합될 수 있다. 이와 관련하여, 실시형태는 임의의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 본원의 목적상, 용어 "재조합 발현 벡터"는 상응 구조체가 mRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 세포 내에서 mRNA, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 발현시키기에 충분한 조건하에서 상응 벡터가 세포와 접촉 될 때, 숙주 세포에 의한 mRNA, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 발현을 허용하는 유전자 변형된 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 구조체를 의미한다. 벡터는 전체적으로 자연적으로 발생하지 않는다.
- [0329] 그러나 벡터의 일부는 자연스럽게 발생할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 합성되거나 부분적으로 천연 출처로부터 수득될 수 있고, 천연, 비-천연 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있는 DNA 및 RNA를 비롯한(그러나 이에 제한되는 것은 아님) 임의의 유형의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 천연 발생 또는 비천연 발생 뉴클레오티드간 링키지, 또는 두 유형의 링키지를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비-천연 발생 또는 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드간 링키지는 상기 벡터의 전사 또는 복제를 방해하지 않는다.
- [0330] 한 실시형태에서, 재조합 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있고, 임의의 적합한 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 플라스미드 및 바이러스와 같이 증식 및 확장

을 위해 또는 발현을 위해 또는 둘 모두를 위해 설계된 것들을 포함한다. 벡터는 pUC 시리즈(Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), pBluescript 시리즈(Stratagene, LaJolla, CA), pET 시리즈(Novagen, Madison, WI), pGEX 시리즈(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 및 pEX 시리즈(Clontech, Palo Alto, Calif.)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

- [0331] 박테리오파지 벡터, 예를 들어, λ , λ ZapII (Stratagene), EMBL4, 및 λ NMI 149 또한 사용될 수 있다. 식물 발현 벡터의 예는 pBIO1, pBI101.2, pBH01.3, pBI121 및 pBIN19(Clontech)를 포함한다. 동물 발현 벡터의 예는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo(Clontech)를 포함한다. 재조합 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 계통의 적어도 일부로부터 유래된 벡터이며, 특히, Milone 외의 문헌, Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)에 제공된 자기-비활성화 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 임상에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는, 예를 들어, 제한 없이, Oxford BioMedica plc의 LENTIVECTOR® 유전자 전달 기술, Lentigen사의 LENTIMAX™ 벡터 시스템 등을 포함한다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터들도 이용 가능하며 당업자에게 공지되어 있을 것이다.
- [0332] 다수의 형질감염 기술이 일반적으로 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Graham 외, Virology, 52: 456-467 (1973); Sambrook 외, supra; Davis 외, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); 및 Chu et al, Gene, 13: 97 (1981) 참조).
- [0333] 형질감염 방법은 인산칼슘 공침전(예를 들어, 상기 Graham 외의 문헌 참조), 배양된 세포로의 직접 미세 주입(예를 들어, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980) 참조), 전기천공법(예를 들어, Shigekawa 외, BioTechniques, 6: 742-751 (1988) 참조), 리포솜 매개 유전자 전달(예를 들어, Mannino 외, BioTechniques, 6: 682-690 (1988) 참조), 지질 매개 형질도입(예를 들어, Feigner 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987) 참조), 및 고속 미세발사체를 이용한 핵산 전달(예를 들어, Klein et al, Nature, 327: 70-73 (1987) 참조)을 포함한다.
- [0334] 한 실시형태에서, 재조합 발현 벡터는 예를 들어, 상기 Sambrook 외의 문헌 및 상기 Ausubel 외의 문헌에 기재된 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 원형 또는 선형인 발현 벡터들의 구조체들은 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 기능하는 복제 시스템을 포함하도록 준비될 수 있다. 복제 시스템은, 예를 들어, ColE1, 2 μ 플라스미드, λ , SV40, 소 유두종 바이러스 등으로부터 유도될 수 있다.
- [0335] 재조합 발현 벡터는 벡터가 DNA 기반인지 RNA 기반인지 적절히 고려하여, 벡터가 도입될 숙주 세포의 유형(예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물)에 특이적인 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈과 같은 조절 서열을 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 클로닝을 촉진하기 위한 제한 부위를 포함할 수 있다.
- [0336] 재조합 발현 벡터는 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커 유전자를 포함할 수 있다. 마커 유전자는 살생제 내성, 예를 들어, 항생제, 중금속 등에 대한 내성, 원형양성을 제공하기 위한 영양요구성 숙주에서의 보완 등을 포함한다. 본 발명의 발현 벡터에 적합한 마커 유전자는, 예를 들어, 네오마이신/G418 내성 유전자, 하이그로마이신 내성 유전자, 히스티딘올 내성 유전자, 테트라사이클린 내성 유전자 및 암피실린 내성 유전자를 포함한다.
- [0337] 재조합 발현 벡터는 CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에(이의 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함), 또는 CAR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보적이거나 이에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 천연 또는 비천연 프로모터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 강한, 약한, 유도성, 조직 특이적 및 발달 특이적 프로모터의 선별은 당업자의 통상의 기술 범위에 속한다. 유사하게, 프로모터와 뉴클레오티드 서열의 조합도 당업자의 기술 범위에 속한다. 프로모터는 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 예를 들어, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터, 또는 뮤린 줄기 세포 바이러스의 긴-말단 반복부에서 발견되는 프로모터일 수 있다.
- [0338] 재조합 발현 벡터는 일시적인 발현, 안정적인 발현 또는 둘 다를 위해 설계될 수 있다. 또한, 재조합 발현 벡터는 항시적 발현 또는 유도적 발현을 위해 만들어질 수 있다.
- [0339] 또한, 재조합 발현 벡터는 자살 유전자를 포함하도록 만들어질 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 “자살 유전자”는 자살 유전자를 발현하는 세포의 사멸을 유발하는 유전자를 의미한다. 자살 유전자는 상응 유전자가 발현되는 세포에 제제, 예를 들어, 약물에 대한 민감성을 부여하고, 세포가 이러한 제제와 접촉하거나 이 제제에 노출될 때 세포의 사멸을 유발하는 유전자일 수 있다. 자살 유전자는 당업계에 공지되어 있으며(예를 들어, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer

Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004 참조), 예를 들어, 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 티미딘 키나아제(TK) 유전자, 시토신 다미나제, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 및 니트로리덕타제를 포함한다.

[0340] **치료 방법**

[0341] 본 발명은 대상체에게 항-TGFβ, 항-TGFβR 항원 결합 분자 또는 TGFβR의 세포외 도메인을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 CAR 및 항원 결합 분자는 포유동물에서 질병을 치료 또는 예방하는 방법에 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 한 실시형태는 포유동물의 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 포유동물에게 CAR, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포 집단, 항체 및/또는 이의 항원 결합 부분, 및/또는 약학적 조성물을 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는데 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0342] 일부 실시형태에서, CAR은 공여체 세포 상에서 발현되고 항-TGFβ, 항-TGFβR 항원 결합 분자 또는 TGFβR의 세포외 도메인은 이들 세포로부터 분비된다. 일부 실시형태에서, T 세포 요법에 사용하기 위한 공여체 T 세포는 (예를 들어, 자가 T 세포 요법을 위해) 환자로부터 얻는다. 다른 실시형태에서, T 세포 요법에 사용하기 위한 공여체 T 세포는 환자가 아닌 대상체로부터 얻는다(예를 들어, 동종 T 세포 요법). CAR+ T 세포는 치료적 유효량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, T 세포의 치료적 유효량은 적어도 약 10⁴개 세포, 적어도 약 10⁵개 세포, 적어도 약 10⁶개 세포, 적어도 약 10⁷개 세포, 적어도 약 10⁸개 세포, 적어도 약 10⁹개, 또는 적어도 약 10¹⁰개일 수 있다.

[0343] 일부 실시형태에서, T 세포의 치료적 유효량은 약 10⁴개 세포, 약 10⁵개 세포, 약 10⁶개 세포, 약 10⁷개 세포, 또는 약 10⁸개 세포이다. 일부 실시형태에서, CAR T 세포의 치료적 유효량은 약 2 X 10⁶개 세포/kg, 약 3 X 10⁶개 세포/kg, 약 4 X 10⁶개 세포/kg, 약 5 X 10⁶개 세포/kg, 약 6 X 10⁶개 세포/kg, 약 7 X 10⁶개 세포/kg, 약 8 X 10⁶개 세포/kg, 약 9 X 10⁶개 세포/kg, 약 1 X 10⁷개 세포/kg, 약 2 X 10⁷개 세포/kg, 약 3 X 10⁷개 세포/kg, 약 4 X 10⁷개 세포/kg, 약 5 X 10⁷개 세포/kg, 약 6 X 10⁷개 세포/kg, 약 7 X 10⁷개 세포/kg, 약 8 X 10⁷개 세포/kg, 또는 약 9 X 10⁷개 세포/kg이다. 일부 실시형태에서, CAR-양성 생존 T 세포의 치료적 유효량은 체중 1 kg 당 약 1 X 10⁶개 내지 약 2 X 10⁶개 CAR-양성 생존 T 세포, 최대 약 1 x 10⁸개의 최대 용량의 CAR-양성 생존 T 세포이다.

[0344] 일부 실시형태에서, CAR-양성 생존 T 세포의 치료적 유효량은 약 0.25 X 10⁶ 내지 2 X 10⁶개이다. 일부 실시형태에서, CAR-양성 생존 T 세포의 치료적 유효량은 약 0.25 x 10⁶개, 0.3 x 10⁶개, 0.4 x 10⁶개, 약 0.5 x 10⁶개, 약 0.6 x 10⁶개, 약 0.7 x 10⁶개, 약 0.8 x 10⁶개, 약 0.9 x 10⁶개, 약 1.0 x 10⁶개, 약 1.1 x 10⁶개, 약 1.2 x 10⁶개, 약 1.3 x 10⁶개, 약 1.4 x 10⁶개, 약 1.5 x 10⁶개, 약 1.6 x 10⁶개, 약 1.7 x 10⁶개, 약 1.8 x 10⁶개, 약 1.9 x 10⁶개, 또는 약 2.0 x 10⁶개의 CAR-양성 생존 T 세포이다.

[0345] 일부 실시형태에서, CAR-양성 생존 T 세포의 치료적 유효량은 약 0.4 x 10⁸개 내지 약 2 x 10⁸개 CAR-양성 생존 T 세포이다. 일부 실시형태에서, CAR-양성 생존 T 세포의 치료적 유효량은 약 0.4 x 10⁸개, 약 0.5 x 10⁸개, 약 0.6 x 10⁸개, 약 0.7 x 10⁸개, 약 0.8 x 10⁸개, 약 0.9 x 10⁸개, 약 1.0 x 10⁸개, 약 1.1 x 10⁸개, 약 1.2 x 10⁸개, 약 1.3 x 10⁸개, 약 1.4 x 10⁸개, 약 1.5 x 10⁸개, 약 1.6 x 10⁸개, 약 1.7 x 10⁸개, 약 1.8 x 10⁸개, 약 1.9 x 10⁸개, 또는 약 2.0 x 10⁸개 CAR-양성 생존 T 세포이다.

[0346] 한 실시형태는 본원에 개시된 CAR을 투여하기 전에 포유동물을 림프구 고갈시키는 단계를 추가로 포함한다. 림프구 고갈의 예에는 비골수 림프구 고갈 화학 요법, 골수 제거 림프구 고갈 화학 요법, 전신 방사선 조사 등이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0347] 숙주 세포 또는 세포 집단이 투여되는 방법의 목적을 위해, 세포는 포유동물에 대해 동종이계 또는 자가 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포는 포유동물의 자가 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 포유동물에 대해 동종이계이다. 본원에서 사용되는 용어 “동종이계”는 물질이 도입되는 개체와 동일한 종의 다른 동물로부터

유도된 모든 물질을 의미한다. 하나 이상의 유전자좌에 있는 유전자가 동일하지 않을 때 둘 이상의 개체는 서로 동종이계라고 한다. 일부 양상에서, 동일한 종의 개체의 동종이계 물질은 항원적으로 상호작용하기에 유전적으로 충분히 다를 수 있다. 본원에서 사용되는 “자가”는 차후 개체에게 다시 도입될 개체와 동일한 개체로부터 유도된 임의의 물질을 의미한다.

[0348] 본원에 언급된 포유동물은 임의의 포유동물일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 “포유동물”은 마우스 및 햄스터와 같은 설치류(Rodentia) 목의 포유동물 및 토끼와 같은 로고모르파(Logomorpha) 목의 포유동물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 고양이과(고양이) 및 개과(개)를 포함하는 식육(Carnivora) 목에 속할 수 있다. 포유동물은 소과(소) 및 돼지과(돼지)를 포함하는 우제목(order Artiodactyla) 또는 말 속(말)을 포함하는 기제목(order Perissodactyla)일 수 있다. 포유동물은 영장류, 세보이드, 또는 시모이드(원숭이) 목 또는 유인원(인간 및 유인원) 목일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 포유동물은 인간이다.

[0349] 이러한 방법과 관련하여, 암은 임의의 암일 수 있으며, 예를 들어, 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 형문근육종, 방광암(예: 방광 암종), 골암, 뇌암(예: 수모세포종), 유방암, 항문암, 항문관암 또는 항문직장암, 눈암, 간내 담관암, 관절암, 목암, 담낭암 또는 흉막암, 코암, 비강암 또는 중이암, 구강암, 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 섬유육종, 위장 카르시노이드 종양, 두경부암(예: 두경부 편평 세포 암종), 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 백혈병, 액체 종양, 간암, 폐암(예: 비소세포 폐암종 및 폐 선암종), 림프종, 증피종, 비만세포종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비-호지킨 림프종, B-만성 림프구성 백혈병, 털 세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 버킷림프종, 난소암, 췌장암, 복막암, 대장암, 및 장간막암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신장암, 피부암, 소장암, 연조직암, 고형종양, 윤향막육종, 위암, 고환암, 갑상선암, 요관암을 포함한다.

[0350] 특정 실시형태에서, 암은 위장관 암이다. 일부 실시형태에서, 암은 위암이다. 일부 실시형태에서, 암은 결장직장암이다. 일부 실시형태에서, 암은 결장암이다. 일부 실시형태에서, 암은 TGFβ의 비정상적 발현 또는 비정상적 TGFβ 신호전달을 갖는다.

[0351] 본원에서 사용된 용어 “치료하다” 및 “예방하다” 및 이로부터 파생된 단어는 반드시 100% 또는 완전한 치료 또는 예방을 의미하는 것은 아니다. 오히려, 당업자가 잠재적 이점 또는 치료 효과를 갖는 것으로 인식하는 다양한 정도의 치료 또는 예방이 존재한다. 이와 관련하여, 상기 방법은 포유동물에서 임의의 양 또는 임의의 수준의 암 치료 또는 예방을 제공할 수 있다.

[0352] 또한, 상기 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은 치료 또는 예방되는 질병, 예를 들어, 암의 하나 이상의 병태 또는 증상들의 치료 또는 예방을 포함할 수 있다. 또한, 본원의 목적에 있어서, “예방”은 질병, 또는 이의 증상 또는 병태의 개시를 지연시키는 것을 포함할 수 있다.

[0353] 표적 세포를 인식하는 능력 및 항원 특이성에 대해 CAR을 테스트하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Clay 외, J. Immunol, 163: 507-513 (1999)은, 사이토카인(예를 들어, 인터페론-γ, 과립구/단핵구 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 종양 괴사 인자 α(TNF-α) 또는 인터루킨 2(IL-2))의 방출을 측정하는 방법을 개시한다. 또한, CAR 기능은 Zhao et al, J. Immunol, 174: 4415-4423 (2005)에 기재된 바와 같은 세포상의 세포독성의 측정에 의해 평가될 수 있다.

[0354] 또 다른 실시형태는 포유동물의 증식성 장애, 예를 들어, 암의 치료 또는 예방을 위한 본 발명의 CAR, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포 집단, 항체 또는 이의 항원 결합 부분 및/또는 약학 조성물의 용도를 제공한다. 암은 본원에 기재된 임의의 암일 수 있다.

[0355] 본원에 개시된 치료제에 대해 국소 및 전신 투여를 포함하는 임의의 투여 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 국소, 경구, 혈관내, 예컨대, 정맥내, 근육내, 복강내, 비강내, 피내, 척수강내 및 피하 투여가 사용될 수 있다. 특정 투여 방식 및 투약 요법은 상응 사례의 세부사항(예를 들어 대상체, 질병, 관련된 질병 상태 및 치료가 예방적인지 여부)을 고려하여 담당 임상시에 의해 선택될 것이다. 하나 이상의 제제 또는 조성물이 투여되는 경우, 하나 이상의 투여 경로가 사용될 수 있다; 예를 들어, 화학요법제는 경구 투여될 수 있고 항체 또는 항원 결합 단편 또는 접합체 또는 조성물은 정맥내 투여될 수 있다. 투여 방법은 주사를 포함하며, 이 때 CAR, CAR T 세포, 접합체, 항체, 항원 결합 단편, 또는 조성물이 물, 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 5% 인간 혈청 알부민, 고정유, 에틸 올레이트 또는 리포솜과 같은 비독성의 약학적으로 허용되는 담체에 제공된다. 일부 실시형태에서, 개시된 화합물의 국소 투여는, 예를 들어, 종양이 제거되어 있는 조직의 영역 또는 종양 발생 경

향이 있는 것으로 의심되는 영역에 항체 또는 항원 결합 단편을 투여함으로써 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료적 유효량의 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 약학적 제제의 지속적인 중앙내(또는 중앙근처) 방출이 유익할 수 있다. 다른 예에서, 접합체는 각막에 국소적으로 점안액으로 적용되거나 눈에 유리체내로 적용된다.

[0356] 개시된 치료제는 정확한 투여량의 개별 투여에 적합한 단위 투여 형태로 제형화될 수 있다. 또한, 개시된 치료제는 단회 투여 또는 다회 투여 일정으로 투여될 수 있다. 다회 투여 일정은 일차 치료 과정이 1회 이상의 개별 투여, 예를 들어, 1 내지 10회 투여 후, 조성물의 작용을 유지하거나 강화하기 위해 필요에 따라 후속 시간 간격으로 제공되는 다른 투여량이 후속될 수 있는 것이다. 치료는 며칠 내지 몇 달 또는 심지어 몇 년에 걸쳐 화합물(들)을 매일 또는 여러 날 투여하는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 투여 섭생은 또한 적어도 부분적으로 치료받을 대상체의 특정한 필요에 기초하여 결정될 것이며 투여 의사(administering practitioner)의 판단에 의존할 것이다.

[0357] 항체 또는 접합체의 전형적인 투여량은 약 0.01 내지 약 30 mg/kg, 예를 들어, 약 0.1 내지 약 10 mg/kg 범위일 수 있다.

[0358] 특정 예에서, 대상체는 접합체, 항체, 조성물, CAR, CAR T 세포 또는 추가 제제 중 하나 이상을 포함하는 치료 조성물을 다회 일일 투여 일정, 예를 들어, 적어도 연속 2일, 연속 10일 등으로, 예를 들어, 몇 주, 몇 달 또는 몇 년의 기간 동안 투여받는다. 한 예에서, 대상체는 적어도 30일의 기간 동안, 예를 들어, 적어도 2개월, 적어도 4개월, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 적어도 24개월 또는 적어도 36개월 동안 접합체, 항체, 조성물 또는 추가 제제를 투여받는다.

[0359] 일부 실시형태에서, 개시된 방법은 개시된 항체, 항원 결합 단편, 접합체, CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포와 조합하여(예를 들어, 순차적으로, 실질적으로 동시에, 또는 동시에) 대상체에게 수술, 방사선 요법, 및/또는 화학요법제를 제공하는 단계를 포함한다. 이러한 제제 및 치료의 방법 및 치료 용량은 당업자에게 공지되어 있고, 숙련된 임상가에 의해 결정될 수 있다. 추가 제제에 대한 준비 및 투약 일정은 제조업체의 지침에 따라 또는 숙련된 의사가 경험적으로 결정한 바에 따라 사용될 수 있다. 이러한 화학요법을 위한 준비 및 투약 일정은 또한 Chemotherapy Service, (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md에도 기재되어 있다.

[0360] 일부 실시형태에서, 병용 요법은 치료적 유효량의 추가 암 억제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 병용 요법과 함께 사용될 수 있는 추가적인 치료제의 비제한적 예는 미세소관 결합체, DNA 인터칼레이터 또는 가교제, DNA 합성 억제제, DNA 및 RNA 전사 억제제, 항체, 효소, 효소 억제제, 유전자 조절제 및 혈관신생 억제제를 포함한다. (치료적 유효량으로 투여되는) 이러한 제제 및 치료제는 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 임의의 적합한 항암제 또는 항혈관형성제는 본원에 개시된 CAR, CAR-T 세포, 항체, 항원 결합 단편 또는 접합체와 함께 투여될 수 있다. 이러한 제제의 방법 및 치료 용량은 당업자에게 공지되어 있고, 숙련된 임상가에 의해 결정될 수 있다.

[0361] 추가 화학요법제는, 알킬화제, 예를 들어, 질소 머스타드(예: 클로람부실, 클로르메틴, 시클로포스파미드, 이포스파미드 및 멜팔란), 니트로소우레아(예: 카르무스틴, 포테무스틴, 로무스틴 및 스트렙토조신), 백금 화합물(예를 들어, 카르보플라틴, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 BBR3464), 부술판, 다카르바진, 메클로레타민, 프로카르바진, 테모졸로미드, 티오테파 및 우라무스틴; 항대사제, 예를 들어, 엽산(예: 메토틱세이트, 페메트렉시드 및 칼티트렉시드), 퓨린(예: 클라드리빈, 클로파라빈, 플루다라빈, 메르캅토피린 및 티오구아닌), 피리미딘(예: 카페시타빈), 시타라빈, 플루오로우라실 및 겐시타빈; 식물 알칼로이드, 예를 들어, 포도필륨(예를 들어, 에토포시드 및 테니포시드), 타산(예를 들어, 도세탁셀 및 파클리탁셀), 빈카(예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈); 세포독성/항종양 항생제, 예컨대 안트라사이클린 계열 구성원(예를 들어, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미톡산트론 및 발루비신), 블레오마이신, 리팜피신, 하이드록시우레아 및 미토마이신; 토포이소머라제 억제제, 예를 들어, 토포테칸 및 이리노테칸; 단클론 항체, 예를 들어, 알렘투주맙, 베마시주맙, 세툽시맙, 겐투주맙, 리툽시맙, 과니투무맙, 페르투주맙 및 트라스투주맙; 광감작제, 예를 들어, 아미노레블린산, 메틸 아미노레블리네이트, 포르피머 소듐 및 베르테포르핀; 및 기타 작용제, 예를 들어, 알리트레티노인, 알트레타민, 암사크린, 아나그렐리드, 아르세닉 트리옥사이드, 아스파라기나제, 악시티닙, 백사로텐, 베마시주맙, 보르테조미, 셀레코시브, 데닐류킨 디프티톡스, 에블로티닙, 에스트라무스틴, 제피티닙, 하이드록시카바마이드, 이마티닙, 라파티닙, 파조파닙, 펜토스타틴, 마소프로콜, 미토탄, 페가스파르가제, 타목시펜, 소라페닙, 수니티닙, 베무라피닙, 반데타닙 및 트레티노인을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 제제의 선별 및 치료 용량은 당업자에게 공지되어 있고, 숙련된 임상가에 의해 결정될 수

있다.

- [0362] 병용 요법은 “상승작용”을 제공하고 “상승적”인 것으로 입증될 수 있다, 즉, 활성 성분을 함께 사용할 때 달성되는 효과가 화합물을 개별적으로 사용하여 발생하는 효과의 합보다 더 크다. 상승적 효과는 활성 성분은: (1) 병용 단위 투여 제형으로 공동제화되어 동시에 투여 또는 전달될 때; (2) 별도 제형으로서 교대로 또는 병행하여 전달될 때; 또는 (3) 일부 다른 요법에 의해 얻을 수 있다. 교대로 전달되는 경우, 상승적 효과는, 화합물들을 순차적으로, 예를 들어, 별도의 주사기로 또는 별도의 알약 또는 정제로 서로 다른 주입에 의해 투여 또는 전달할 때 얻을 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안에는 각 활성 성분의 유효 투여량을 순차적으로, 즉, 순서대로 투여하는 반면, 병용 요법에서는 2개 이상의 활성 성분의 유효량을 함께 투여한다.
- [0363] 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 TGFβ 신호전달 조절제를 포함하는 면역 조절 시스템은 적어도 하나의 추가 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 치료 과정에 포함될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 TGFβ 신호전달 조절제를 포함하는 면역 조절 시스템과 병용하여 투여되는 추가 제제는 화학요법제일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합제와 조합하여 투여되는 추가 제제는 염증을 억제하는 제제일 수 있다.
- [0364] 일부 실시형태에서, TGFβ 신호전달 조절제는 인간 TGFβ에 대해 특이성을 갖는 단일 도메인 항체 또는 분비성 scFv이다. 일부 실시형태에서, TGFβ 신호전달 조절제는 인간 TGFβR에 대해 특이성을 갖는 단일 도메인 항체 또는 분비성 scFv이다. 일부 실시형태에서, TGFβ 신호전달 조절제는 인간 TGFβ를 발현하는 암세포에 결합하고, 이러한 암 세포에 치료제를 전달하고, 이러한 암세포를 사멸시키기 위해 치료제(예를 들어, 화학요법제 및 방사성 원자)에 접합(예를 들어, 연결)될 수 있다. 일부 실시형태에서, TGFβ 신호전달 조절제는 치료제에 연결된다. 일부 실시형태에서, 치료제는 화학요법제, 사이토카인, 방사성 원자, siRNA 또는 독소이다. 일부 실시형태에서, 치료제는 화학요법제이다. 일부 실시형태에서, 치료제는 방사성 원자이다.
- [0365] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 TGFβ 신호전달이 비정상인 장애에 대한 다른 요법과 함께 수행될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 화학요법과 동시에, 그 이전에 또는 이후에 대상에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 입양 요법 방법과 동시에, 그 이전에 또는 이후에 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0366] 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 TGFβ 신호전달 조절제를 포함하는 면역 조절 시스템과 함께 투여되는 추가 제제는 TGFβ 신호전달 조절제와 동시에, 같은 날에 또는 같은 주에 투여될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 TGFβ 신호전달 조절제와 함께 투여되는 추가 제제는 면역 조절 시스템과 함께 단일 제제로 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 TGFβ 신호전달 조절제 투여로부터 시간적으로 분리된 방식으로, 예를 들어, TGFβ 신호전달 조절제의 투여의 1시간 이상 이전 또는 이후, 1일 이상 이전 또는 이후, 1주 이상 이전 또는 이후, 또는 1개월 이상 이전 또는 이후에 투여된다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 추가 제제의 투여 빈도는 본원에 기재된 TGFβ 신호전달 조절제의 투여 빈도와 동일하거나, 유사하거나, 상이할 수 있다.
- [0367] 일부 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 추가 치료제, 예를 들어, 대상체에서 TGFβ-관련 장애(예를 들어, 암 또는 자가면역 장애)를 치료하거나 예방하기 위한 추가 요법과 함께 제형화될 수 있다. 대상체에서 TGFβ-관련 장애를 치료하기 위한 추가 제제는 치료되는 특정 장애에 따라 달라질 것이지만, 리톡시맙, 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손, 오스파미드, 카보플라틴, 에토포사이드, 텍사메타손, 시타라빈, 시스플라틴, 시클로포스파미드 또는 플루다라빈을 포함할 수 있으며 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0368] **조성물**
- [0369] 개시된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체, 항원 결합 단편, 접합체, CAR, 또는 본 명세서에 개시된 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 CAR을 발현하는 T 세포 중 하나 이상을 담체(약학적으로 허용되는 담체와 같은)에 포함하는, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 세포 요법에서 사용하기 위한 조성물이 본원에 제공된다. 이러한 조성물은 대상체에게 투여하기 위한 단위 투여 형태로 제조될 수 있다. 투여량 및 시기는 원하는 결과를 달성하기 위해 치료 임상에서의 재량에 따른다. 조성물은 전신(예를 들어, 정맥내) 또는 국소(예를 들어, 종양내) 투여를 위해 제형화될 수 있다. 한 예에서, 개시된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체, 항원 결합 단편, 접합체는 정맥내 투여와 같은 비경구 투여를 위해 제형화된다. 본원에 개시된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 접합체, 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 조성물은, 예를 들어, 종양, 예를 들어, 제한 없이, 신경 모세포종의 치료 및 검출을 위해 사용된다. 일부 실시예에서, 조성물은 암종의 치료 또는 검출에 유용하다. 본원에 개시된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 접합체, 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 조성물은 또한,

예를 들어, 병리학적 혈관신생의 검출을 위해 사용된다.

[0370] 투여용 조성물은 수성 담체와 같은 약학적으로 허용되는 담체에 용해된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 접합체, 항체 또는 항원 결합 단편의 용액을 포함할 수 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어, 완충 식염수 등이 사용될 수 있다. 이러한 용액은 무균이며 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 없다. 이들 조성물은 종래의 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 상기 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제, 보조제 등과 같이 생리적 조건에 근접하게 하는 데 필요한 약학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들어, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젖산나트륨 등을 함유할 수 있다. 이들 제형들에서 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 항원 결합 단편 또는 접합체의 농도는 광범위하게 변할 수 있고, 선택된 특정 투여 방식 및 대상체의 필요에 따라 주로 유체 부피, 점도, 체중 등에 기초하여 선택될 것이다. 유전자 요법, 면역요법 및/또는 세포 요법에 사용하기 위해 이러한 투여 형태를 제조하는 실제 방법은 공지되어 있거나 당업자에게 명백할 것이다.

[0371] 정맥내 투여를 위한 전형적인 조성물은 1일 1명의 대상체 당 약 0.01 내지 약 30 mg/kg의 항체 또는 항원 결합 단편 또는 접합체(또는 상응하는 용량의 CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 이러한 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 접합체)를 포함한다. 투여가능한 조성물을 제조하기 위한 실제 방법은 공지되어 있거나 당업자에게 명백할 것이며, Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)와 같은 간행물에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0372] 제어 방출형 비경구 제형은 임플란트, 유성 주사 또는 미립자 시스템으로 제조될 수 있다. 단백질 전달 시스템의 광범위한 개요는 Banga, A. J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995)를 참조하라. 미립자 시스템은 마이크로스피어, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 나노캡슐, 나노구 및 나노입자를 포함한다. 마이크로캡슐은 세포독소나 약물과 같은 치료용 단백질을 중심핵으로 함유하고 있다. 마이크로스피어에서 치료제는 입자 전체에 분산된다. 약 1 μm 보다 작은 입자, 마이크로스피어 및 마이크로캡슐은 일반적으로 각각 나노입자, 나노스피어 및 나노캡슐이라 지칭된다. 모세혈관은 직경이 약 5 μm 이므로, 나노입자만 정맥내 투여된다. 마이크로입자는 일반적으로 직경이 약 100 μm 이며 피하 또는 근육 내로 투여된다. 예를 들어, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 219-342 (1994); 및 Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y., pp. 315-339, (1992)를 참조하라.

[0373] 중합체는 본원에 개시된 CAR, 또는 CAR을 발현하는 T 세포, 항체 또는 항원 결합 단편 또는 접합체 조성물의 이온 제어 방출을 위해 사용될 수 있다. 제어된 약물 전달에 사용하기 위한 다양한 분해성 및 비분해성 중합체 매트릭스가 당업계에 공지되어 있다(Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993). 예를 들어, 블록 공중합체인 폴락사머 407은 저온에서는 점성이 있으나 유동적인 액체로 존재하지만 체온에서는 반고체 젤을 형성한다. 이는 제조합 인터루킨-2 및 유레이스(urease)의 제형화 및 지속 전달에 효과적인 비히클인 것으로 나타났다(Johnston 외, Pharm. Res. 9:425-434, 1992; and Pec 외, J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990). 대안적으로, 하이드록시아파타이트는 단백질의 제어 방출을 위한 마이크로담체로 사용되어 왔다(Ijntema 외, Int. J. Pharm. 112:215-224, 1994). 또 다른 양상에서, 리포솜은 지질-캡슐화된 약물의 약물 표적화, 뿐만 아니라 제어 방출을 위해 사용된다(Betageri 외, Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa. (1993)). 치료용 단백질의 제어 전달을 위한 수많은 또 다른 시스템들이 알려져 있다(미국 특허 제 5,055,303; 5,188,837; 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; 4,957,735; 5,019,369; 5,055,303; 5,514,670; 5,413,797; 5,268,164; 5,004,697; 4,902,505; 5,506,206; 5,271,961; 5,254,342 및 5,534,496 참조).

[0374] **키트**

[0375] 한 양상에서, 본원에 개시된 CAR을 사용하는 키트가 또한 제공된다. 대상체에서 종양을 치료하기 위한, 또는 본원에 개시된 하나 이상의 CAR을 발현하는 CAR T 세포를 제조하기 위한 키트가 그 예이다. 키트는 전형적으로 개시된 항체, 항원 결합 단편, 접합체, 핵산 분자, CAR 또는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 T 세포를 포함할 것이다. 하나 이상의 개시된 항체, 항원 결합 단편, 접합체, 핵산 분자, CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포가 키트에 포함될 수 있다.

[0376] 키트는 용기 및 용기 상에 또는 용기와 결합된 라벨 또는 약품 설명서를 포함할 수 있다. 적합한 용기에는, 예를 들어, 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 다양한 재료들, 가령, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 전형적으로 상기 개시된 항체, 항원 결합 단편, 접합체, 핵산 분자, CAR 또는 CAR을 발현하는

T 세포 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 수용한다. 몇몇 실시형태에서 용기는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개가 있는 바이알일 수 있음). 라벨 또는 약품 설명서에는 이 조성물이 특정 병태의 치료에 이용된다는 것이 명시되어 있다.

[0377] 라벨 또는 약품 설명서는 일반적으로 개시된 항체, 항원 결합 단편, 접합체, 핵산 분자, CAR 또는 CAR을 발현하는 T 세포를, 예를 들어, 종양을 치료 또는 예방하는 또는 CAR T 세포를 제조하는 방법에서 사용하는 것에 관한 지침들을 추가로 포함할 것이다. 약품 설명서는 일반적으로 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 투여량, 투여, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 포함하는 치료 제품의 상용 패키지에 관례적으로 포함되는 지침서를 포함한다. 지침 자료는 전자 형식(예: 컴퓨터 디스켓 또는 콤팩트 디스크)으로 작성되거나 시각적인 것일 수 있다 (예: 비디오 파일). 키트에는 키트가 설계된 목적인 특정 사용을 용이하게 하기 위한 추가 구성 요소가 포함될 수도 있다. 따라서, 예를 들어, 키트는 표지를 검출하는 수단(예: 효소 표지를 위한 효소 기질, 형광 표지를 검출하기 위한 필터 세트, 2차 항체와 같은 적절한 2차 표지 등)을 추가로 포함할 수 있다. 키트에는 특정 방법을 실행하는 데 일상적으로 사용되는 완충액 및 기타 시약이 추가로 포함될 수 있다. 이러한 키트 및 적절한 내용물은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0378] 달리 언급되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어 그리고 문구들은 상용 분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같은 동일한 의미를 가진다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 균등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 여기에 기재되어 있다. 본원에 언급된 모든 간행물은 참조로 본원에 포함된다.

[0379] 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 조직 배양 및 형질전환(예를 들어, 전기천공, 리포펙션)을 위한 표준 기술이 사용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조업체의 사양에 따라 또는 당업계에서 일반적으로 달성되거나 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 전술한 기술 및 절차는 일반적으로 당업계에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되고 논의된, 다양한 일반적이고 더 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, Sambrook 외 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))를 참고하며, 이 문헌은 본원에 어떤 목적으로든 참고문헌으로 포함된다.

[0380] 본원에서 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그 전체가 인용된다. 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더욱 완전히 이해될 것이다.

[0381] **실시예**

[0382] 이들 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제시된 것이지만, 어떤 식으로든 그 범위를 제한하고자 하는 것이 아니며 그렇게 해석되어서도 안 된다. 실시예는 당업자에게 잘 알려진 통상적인 방법(분자 클로닝 기술 등)의 상세한 설명을 포함하지 않는다.

[0383] 실시예 1. 키메라 항원 수용체(CAR) 및 TGF-β 신호전달 조절제를 공동 발현하는 면역반응 세포

[0384] 이 실시예는 인간 T 세포에서 면역 조절 시스템을 사용하여 TGF-β 신호전달 조절제와 CAR의 공동 발현을 설명한다. TGF-β 신호 조절제(예: 항-TGFβ 및 항-TGFβR2) 및 항-인간 CD19 CAR(SJ25C1 세포의 항원 결합 도메인)을 인코딩하는 면역 조절 구조체들을 레트로바이러스 전달을 위해 패키징했다. Phoenix A 레트로바이러스 패키징 세포주(ATCC)는 DMEM 20% FBS 및 Pen/Strep에서 50-70% 컨플루언스로 성장되었다. 제조업체의 프로토콜에 따라 TGF-β 신호전달 조절제 및 CAR 구조체를 인코딩하는 각각의 플라스미드, 헬퍼 플라스미드 gag-pol 및 pVSVG 및 형질도입 시약 Fugene HD(Promega)를 사용하여 DNA 복합체를 제조하였다. 형질감염 20-48시간 후, 바이러스 상층액을 수확하고, 분취하고, 추후 사용을 위해 동결시켰다.

[0385] 인간 PBMC는 밀도 구배를 사용하여 류코팩(Leukopaks)으로부터 단리하고 추후 사용시까지 동결시켰다. 이전에 동결된 PBMC로부터 자성 선별(T 세포 단리 키트; Stemcell)에 의해 인간 T 세포를 단리하였다. 정제된 인간 T 세포를 완전 Optimizer 배지(2ng/ml 인간 IL-2(Miltenyi) 및 T 세포 Transact 비드(Miltenyi)를 함유하는 Optimizer 기본 배지(ThermoFisher #A10221-01) + 26ml OptiMizer 보충제(ThermoFisher #A10484-02) + 20ml ICSR(CTS Immune Cell SR), ThermoFisher #A25961-01) + 10ml의 200mM L-글루타민(Gibco 25030-081) + PenStrep(Gibco 15140-122))에서 2일 동안 배양했다.

[0386] T 세포를 레트로벡터-코팅된 플레이트(Takara; 40ug/ml 레트로벡터)로 옮기고 적절한 양의 바이러스로 스핀-형질도입시켰다. 상이한 시점에서 유동 세포 분석법에 의해 형질도입을 확인하고 정량화하였다. 요약하면, 세포를 FACS 완충액에서 250ng hCD19-hFc 단백질(RnD Systems) 또는 자체 생산 hGCC-Fc 단백질과 함께 4°C에서 1시간

동안 인큐베이션했다. FACS 완충액으로 세척한 후 세포들을 실온에서 20분 동안 인간 FC(Biolegend)에 대한 2차 항체와 함께 재현탁시켰다. 일부 실험에서 CD4, CD8 또는 기타 표면 마커에 대한 항체가 추가되었다. 사멸 세포는 고정 가능한 생존도 염료(viability dye)(Thermofisher)를 사용한 분석에서 제외되었다. 유동 세포 분석법(FACS Fortessa, BD Biosciences)으로 분석하기 전에 세포를 PBS 2% FCS 4% 포름알데히드에 고정시켰다. 형질 도입 효율은 CAR 염색에 양성인 살아있는 세포%로 표시된다. 유동 세포 분석 결과는 87.6% 림프구, 76.1% 싱글렛, 78.3% 살아있는 CD3+ 세포 및 75.8% 세포들의 집단이 CAR 발현을 나타냄을 보여주었다(도 1A-1D). 형질도입 효율은 CAR 염색에 양성인 살아있는 세포%로 표시된다(도 1E).

[0387] 실시예 2. TGF-β 조절 인간 CAR-T 세포를 사용한 시험관내 사멸

[0388] 이 실시예는 TGF-β 신호전달 조절제를 공동 발현하는 인간 CAR-T 세포에 의한 시험관 내 사멸을 설명한다. 아마드 인간 CAR-T 세포에 의한 시험관내 사멸은 언아머드 CAR-T 세포와 비등하다.

[0389] Raji(ATCC CD19 양성) 또는 Raji CD19ko(인간 CD19에 대해 음성) 세포를 제조업체의 프로토콜에 따라 증식 염료 efluor 450(Thermofisher)으로 염색하고 96웰 플레이트에 플레이팅하고 2시간 후 실시예 1에 기재된 TGF-β 조절 CAR-T 세포를 추가하였다. CAR-T 세포를 이펙터:표적 비율 0:1, 0.3:1, 1:1, 3:1, 9:1로 첨가하고 T 세포만을 37° C에서 밤새 인큐베이션했다. 다음날 인간 CD107a(LAMP-1)(Biolegend), TCR α/β(Biolegend) 및 인간 CD4 항체(Biolegend)에 대한 형광색소 접합 항체들을 사용하여 FACS 염색을 수행했다. 세포를 4° C에서 30분 동안 항체와 함께 인큐베이션하고, PBS로 세척하고 제조업체의 프로토콜에 따라 고정 가능한 생존도 염료(Thermofisher)로 염색했다. 세포를 1x Annexin V 결합 완충액(Biolegend)으로 세척하고 Annexin V FITC로 염색했다. 세포는 FACS Fortessa(BD Biosciences)에서 획득하기 전에 cytofix(BD Biosciences)에 고정되었다. TGF-β 조절 CD19 CAR-T 세포는 CD19 양성 Raji 세포(도 2A)에 대해 표적 특이적 시험관내 사멸을 입증했지만 CD19 음성 대조군 세포(Raji CD19ko)에 대해서는 그렇지 않았다(도 2B).

[0390] 실시예 3. 면역반응 세포에서 TGF-β 조절제의 분비

[0391] 이 실시예는 TGF-β 조절 CAR-T 세포가 공동-발현된 TGF-β 조절제(예를 들어, TGF-β에 결합하는 항-TGF-β 및 TGF βR2에 결합하는 항-TGF βR2)를 분비함을 입증한다.

[0392] TGF-β 조절 CAR-T 세포의 상층액을 ELISA로 분석하여 항-TGF-β 및 항-TGF βR2 항체를 검출했다. Maxisorp 96 웰 플레이트를 코팅 완충액 100 μl에서 재조합 인간 TGF-β(4; RnD System μg/ml) 또는 hTGF βR2-Fc(0.1 mg/ml; RnD System)로 4° C에서 밤새 코팅했다. 플레이트를 1x 세척 완충액으로 세척하고 실온에서 시약 희석제로 1시간 동안 차단했다. CAR-T 상층액, 재조합 TGF βR2-플래그 또는 재조합 TGF-β-플래그 항체를 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0393] 또 다른 세척 단계 후, HRP-접합된 플래그-태그 항체를 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고 TMB 기질을 10-20분 동안 첨가했다. 중단 시약을 사용하여 반응을 중지하고 Pherastar 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서 플레이트를 판독했다. 코팅된 TGF-b를 사용한 ELISA는 결합제 검출을 위해 항-플래그 태그 HRP 항체를 사용한 TGF-b scFv VL-VH와 비교하여 높은 수준의 TGF-b scFv VH-VL1 및 TGF-b scFv VH-VL2를 검출했다(도 3A). 코팅된 TGFbR2-Fc를 사용한 ELISA는 인간 CAR-T로부터 높은 수준의 TGFbR2 scFv VH-VL, TGFbR2 scFv VL-VH 및 hTGFbR2 VH1을 검출했지만 mTGFbR2 VH1은 검출할 수 없었다(도 3b). TGF-β 결합제 및 TGF βR2 결합제는 TGF-β 조절 CAR-T 세포에 의해 분비되고 그들의 동족 항원에 결합한다.

[0394] 실시예 4. 인간 CAR-T 세포는 TGF-β/TGF βR2에 대한 중화 항체를 분비한다

[0395] 이 실시예는 TGF-β 조절 CAR-T 상층액 내 TGF-β/TGF βR2에 대한 중화 항체의 존재를 설명한다.

[0396] CAR-T 세포의 상층액에서 TGF-β 차단 결합제의 기능 평가는 TGF-β/SMAD 신호전달 경로의 활성을 모니터링하기 위해 설계된 SBE-Luc 리포터 세포(Smad Binding Element(SBE)(BPS Biosciences)의 제어 하에 반딧불이 루시페라제를 발현하는 HEK293 세포)를 사용하여 수행되었다. TGF-β 단백질은 세포 표면의 동족 수용체에 결합하여 SMAD2 및 SMAD3의 인산화 및 활성화를 유도하는 신호전달 캐스케이드를 개시하여 SMAD4와 복합체를 형성한다. SMAD 복합체는 핵으로 이동하여 SMAD 결합 요소(SBE)에 결합하여 TGF-β/SMAD 반응 유전자의 전사 및 발현을 유도한다. 차단 결합제의 존재는 SBE-Luc 리포터 세포에서 TGF-β 유도된 루시페라제 발현을 억제하는 능력에 의해 검출되었다. TGF-β-유도된 리포터 활성을 억제하는 효능을 평가하기 위한 예시적인 분석을 다음과 같이 수행하였다.

[0397] SBE-Luc 세포를 100 μl의 새로운 배지(1x Penn/Strep를 포함하는 X-VIVO15)에서 1x10⁵ 개 세포/웰의 농도로 풀

리-D 리신 코팅된 96-웰 플레이트에 시딩하고 37° C 및 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. CAR-T 세포의 상층액 또는 이의 희석액을 동등한 부피의 TGF-β(X-VIVO15에서 4ng/ml)와 혼합하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 TGF-β가 CAR-T 상층액에 함유된 TGF-b와 복합체를 형성하게 하였다. 100 μl의 혼합물을 SBE-Luc 리포터 세포에 이중으로 첨가하고 37° C 및 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션했다. TGF-β의 최종 농도는 1ng/ml이었다. 각 실험에는 1ng/ml TGF-β의 존재시 증가하는 희석의 TGF-β 항체(1D11(BioXcell) 또는 TGF-β 결합제 또는 TGF βR2 결합제)의 적정 곡선이 포함되었다.

[0398] 다음날 100 μl 배양 상층액을 제거하고 검출 시약을 함유하는 100 μl 루시페린-D(ONE-Step™ 루시페라제 분석 시스템)를 첨가했다. 세포를 재현탁하고 백색 검출 플레이트로 옮기고 발광을 Pherastar 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다. 루시페라제 활성은 CPM으로 기록되었다. MS Excel 또는 Graphpad 프리즘을 사용하여 데이터를 분석했다. Graphpad 프리즘의 S자형 용량-반응(가변 기울기)을 사용하여 비선형 회귀 피팅을 수행했다. IC50 값을 계산했다.

[0399] 억제 활성(%)은 다음 식을 사용하여 계산되었다:

[0400]
$$\text{억제}(\%) = (1 - \text{샘플의 CPM} / \text{TGF-}\beta(1\text{ng/ml}) \text{ 처리된 샘플의 최대 CPM}) \times 100$$

[0401] 결과는 구조체 TGF-β scFv VH-VL1(서열번호 1) 및 TGF-β scFv VH-VL2(서열번호 2)를 분비하는 CAR-T 세포로부터의 상층액이 TGF-β 신호전달을 억제함을 보여주었다(도 4). 추가 구조체들을 설계하고 루시페라제 리포터 분석을 사용하여 TGF-β 또는 TGF βR2에 대한 다량체 결합제들의 분비에 대해 스크리닝하였다(도 5 및 도 6). TGF-β 및 TGF βR2에 대해 다량체 항체를 분비하는 TGF-β 조절 CAR-T 세포를 식별하였다. 다량체 TGF-b 결합제는 인간 CAR-T 세포에 의해 분비될 수 있으며 링커에 관계없이 TGF-b 신호 전달을 억제한다. 아래 도면에서 보는 바와 같이 4개의 서로 다른 링커들을 분석했다. 인간 항-GCC CAR-T 세포를 사용하여 유사한 결과가 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음).

[0402] 실시예 5. TGF-B 조절 CAR-T 세포는 TGF-β 또는 TGF βR2에 대한 다량체 결합제를 분비한다

[0403] 이 실시예는 TGF-β 또는 TGF βR2에 대한 다량체 결합제를 분비하는 마우스 CAR-T 세포의 스크리닝 및 식별을 설명한다. 마우스 CAR-T 세포를 생성하기 위해, Platinum-E 레트로바이러스 패키징 세포주를 DMEM 20% FBS 및 Pen/Strep에서 50-70% 컨플루언스로 성장시켰다. DNA 복합체는 제조업체의 프로토콜에 따라 형질도입 시약 Fugene HD, 패키징 구조체 및 CAR 구조체 및 TGFβ 조절제(예: 항-TGF-b scFv 단량체, 항-TGF-b scFv 이량체)를 인코딩하는 면역 조절 시스템 플라스미드를 사용하여 제조되었다. 용액을 혼합하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션하고 세포 용기 10cm² 당 850 μl의 복합체를 첨가하였다. 마우스 T 세포는 각각 Balb/c 또는 C57BL/6 마우스의 비장으로부터 T 세포 분리 키트를 사용하여 자성 선별에 의해 분리되었다. 정제된 마우스 T 세포를 RPMI 10% 열 불활성화된 FCS, Pen/Strep 및 마우스 IL-2(30 U/ml)에서 마우스 T 세포 활성화제 비드와 함께(1:1 비율) 2일 동안 배양했다. 바이러스는 형질감염 후 약 48시간 후에 수확되었고 0.4 μm 주사기 필터를 통해 여과되었다. T 세포를 레트로벡틴(제조업체의 프로토콜에 따라 40 μg/ml 레트로벡틴으로 코팅됨) 코팅된 플레이트로 옮기고 적절한 양의 바이러스로 스핀-형질도입시켰다. 상이한 시점들에서 유동 세포 분석법에 의해 형질도입을 확인하고 정량화하였다.

[0404] 세포를 FACS 완충액에서 250ng hCD19-hFc 단백질과 함께 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션했다. FACS 완충액으로 세척한 후 세포들을 실온에서 20분 동안 인간 FC에 대한 2차 항체와 함께 재현탁시켰다. 일부 실험에서 CD4, CD8 또는 기타 표면 마커에 대한 항체가 추가되었다. 사멸 세포는 고정 가능한 생존도 염료(viability dye)를 사용한 분석에서 제외되었다. 유동 세포 분석법(FACS Fortessa)으로 분석하기 전에 세포를 PBS 2% FCS 4% 포름알데히드에 고정시켰다. 형질도입 효율은 CAR 염색에 양성인 살아있는 세포 퍼센트(%)로 표시된다.

[0405] 유동 세포 분석 결과는 언어머트 T 세포, TGF-β 단량체, TGF-β 이량체 및 비형질도입 세포의 상대적인 비율을 보여주었다. SBE-Luc TGF-b 리포터 분석(실시예 4에 기재된 방법)에서 형질도입 후 d+2일차에 수확된 마우스 CAR-T 세포로부터의 상층액을 TGF-b 신호전달의 억제에 대해 조사하였다. TGF-b scFv 단량체 및 이량체를 분비하는 마우스 CAR-T로부터의 상층액은 루시페라제 리포터 활성에 기초하여 TGF-b 신호전달을 억제하였다. TGF-β 및 TGF βR2에 대해 다량체 항체를 분비하는 마우스 CAR-T 세포를 식별하였다.

[0406] 형질도입 2일 후에 상층액을 수확하고 ELISA에 사용할 때까지 -80°C에서 동결시켰다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 ELISA를 수행하였다. 인간 제조합 TGFβR2-Fc 단백질은 인간 TGFβR2에 대한 결합제를 포획하기 위해 사용되었고 마우스 제조합 TGFβR2-Fc 단백질은 마우스 TGFβR2에 대한 TGFβR2 결합제의 결합을 조사하기 위해 사용되었

다. 항-플래그 HRP 항체 및 각각의 기질을 사용하여 결합을 검출하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 결합제 hTGFβR2-VH2 및 hTGFβR2-VH3 단량체와 이량체 및 TGFβR2 scFv VH-VL 단량체와 이량체의 분비 및 이들이 인간 TGFβR2에 결합함을 나타낸다. 마우스 TGFβR2에 결합된 테스트 상층액들로부터의 결합제들 중 어느 것도 인간 TGFβR2에 대한 특이성을 확인시켜주지 않았다.

[0407] 실시예 6. TGF-β 신호전달 조절제를 분비하는 CAR-T 세포의 생체내 항종양 효능

[0408] 이 실시예는 항-TGF-β mAb 분비 CAR-T 세포의 생체 내 항종양 효능을 설명한다. 마우스 아머드 CAR-T 세포(항-인간 CD19 CAR 및 TGFβ 신호전달 조절제를 공동 발현함)는 동계(syngeneic) EMT6-hCD19 종양의 성장을 언아머드 CAR-T 세포보다 더 잘 억제한다. 또한, 아머드 CAR-T 세포는 간 및 폐 전이를 감소시킨다. 반딧불이 루시페라제 및 CAR-T 표적 항원으로서 인간 CD19를 과발현하는 EMT6 유방 암종 세포주가 생성되었다. EMT6 세포에 EF1a 프로모터 및 퓨로마이신 내성의 제어하에 인간 CD19를 인코딩하는 플라스미드를 운반하는 바이러스를 형질 도입하였다. EMT6-hCD19 세포는 퓨로마이신을 사용하여 양성으로 선택되었고 FACS 분류에 의해 추가로 정제되었다. EMT6-hCD19 세포에 에서 EF1a 프로모터 및 5×10^7 IFU/mL; MOI = 10의 네오마이신(Amsbio) 내성의 제어하에 반딧불이 루시페라제를 인코딩하는 플라스미드를 운반하는 바이러스를 폴리브렌 존재하에서 형질도입하였다. EMT6-hCD19-Fluc 세포는 G418(500 μg/ml)을 사용하여 양성으로 선택되었다.

[0409] 6-16주령 암컷 Balb/c 마우스(Jackson Labs)에 0.2×10^6 개의 생존 가능한 EMT6-hCD19-Fluc 종양 세포를 유방 지방 패드(동소, orthotopic)에 접종했다. 이식 6일 후, 종양 크기가 약 50mm^3 에 도달했고 마우스들을 비슷한 평균 종양 크기(평균 $\sim 50\text{mm}^3$)를 가진 치료 그룹들로 무작위 배정하고 시클로포스파미드(CPA; 200mg/kg i.p.)로 치료했다. 다음날, 동족 CD45.1 Balb/c 마우스의 500,000개 마우스 CAR-T 세포들을 꼬리 정맥에 주사했다. 그룹 1은 비형질도입 T 세포를 받았고, 그룹 2는 CAR-T 세포를 받았고, 그룹 3은 항-TGF-β scFv VH-VL1 분비 CAR-T 세포를 받았다. 독성을 모니터링하기 위해 체중을 매주 2회 측정했다.

[0410] 종양 크기는 매주 2회 측정하고 종양 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: 종양 부피(mm^3) = 길이 x 너비 x 높이 x 0.5236(도 8). 종양이 2000mm^3 이상이거나 궤양성 종양이 있는 마우스들은 모두 희생시켰다. 비형질도입 T 세포를 주사한 대조군 마우스와 비교한 종양 크기의 감소로서 항-종양 효능을 평가하였다. 완전 반응자는 검출 가능한 종양이 없는 마우스로 정의되었다.

[0411] TGF-β 결합제를 분비하는 CAR-T 세포는 언아머드 CAR-T 또는 비형질도입 CAR-T 세포에 비해 높은 항종양 효능을 보였다. 간과 폐는 루시페린을 주입하고 IVIS로 이미징함으로써 종양 세포들을 발현하는 반딧불이 루시페라제에 대해 이미징되었다. D-루시페린 용액(D-루시페린, 칼륨 염 Vivo Glo tm 루시페린)은 15 mg/ml로 준비하여 150 mg/kg으로 사용하였다. TGF-β 결합제를 분비하는 CAR-T 세포로 처리된 마우스는 간 및 폐 전이를 감소시킬 수 있었다(도 8A-8E).

[0412] TGF-β(TGF-b scFv VH-VL1)에 대한 억제 항체를 분비하는 인간 CD19에 대한 마우스 CAR-T는 언아머드 CAR-T 세포보다 동계 EMT6-hCD19 종양의 성장을 더 잘 억제하고 간 및 폐 전이를 감소시킨다. CAR-T 세포의 수는 이전에 아머드 CAR-T 세포의 개선된 활성을 식별하기 위해 언아머드 CAR-T에 대한 준최적 효과를 제공하도록 적정되었다.

[0413] 실시예 7. TGFβR2 세포의 도메인(ECD)을 분비하는 아머드 마우스 CAR-T 세포는 TGFβ 신호전달을 억제한다

[0414] SBE-Luc TGF-β 리포터 분석은 상이한 TGF-β 리간드 트랩(TGF-β scFv VH-VL1 내지 TGFβR2 ECD 단량체, 동종 이량체(도 9A) 및 이종이량체(도 9B))을 분비하는 아머드 마우스 CAR-T로부터의 상층액을 언아머드 CAR-T와 비교하여 수행되었다. SBE-Luc TGF-β 리포터 분석은 TGFβR2 세포의 도메인(ECD) 이량체를 분비하지만 단량체는 분비하지 않는 인간 CD19에 대한 아머드 마우스 CAR-T로부터의 상층액이 잘 억제하고 TGF-β scFv VH-VL1 이량체와 비등한 억제를 보임을 보여주었다. 형질도입 2일 후에 상층액을 수확하였다. TGFβR2 ECD 및 TGFβR1 ECD를 포함하는 TGFβR2 ECD 이종이량체의 억제를 평가하였다. TGF-β scFV VH-VL1보다 더 강력하게 TGF-b 신호전달을 억제하는 TGFβR2 ECD 이종이량체를 식별하였다. 예시적인 TGFβR2 ECD 서열은 표 4에 제시되어 있다.

[0415]

표 4. 예시적인 TGFβR2 ECD 서열

TGFβR2 ECD 단량체
METDTLLLWVLLLVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQ LCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLYHGFTLEDAASPKCV MKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL (서열번호 37)
TGFβR2 ECD 이량체
METDTLLLWVLLLVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQ LCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLYHGFTLEDAASPKCV MKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSGGGGSIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTC DNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLYHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGET FMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL (서열번호 39)
mTGFβR2ECD 단량체 2 IPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLC KFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLYHGFTLEDAASPKCVM KEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL (서열번호 32)
huTGFβR1+2 ECD 이량체1
LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCPASSKTGSVTTTYCCNQDHCN KIELPTTVKSSPGLGPVEGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSN CSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECN DNIIFSEEYNTSNPD (서열번호 33)
huTGFβR1+2 ECD 이량체2
QCFCFLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCPASSKTGSVTTTYCCNQDHCN GGGGSAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD

[0416]

FILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSECDNDNIIFSE (서열번호 34)
mTGFbR1+2 ECD 이량체1
LQCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVFCAPSSKTGAVTTTYCCNQDHCN KIELPTTGPFSEKQSAGLGPVELGGGGSIPPHVPKSVNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSC MSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLYHGFTLEDAASPKCVMKEKCRAGETFFMCACN MEECNDYIIFSEETTSSPD (서열번호 35)
huTGFbR2 ECD 단량체1
LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVFCAPSSKTGAVTTTYCCNQDHCN KIELPTTVKSSPGLGPVE (서열번호 40)
huTGFbR2 ECD 단량체2
QCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVFCAPSSKTGAVTTTYCCNQDHCN GGGGSVAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLYHG FTLEDAASPKCVMKE (서열번호 36)

[0417] 실시예 8. TGF-β 신호전달 조절제를 분비하는 아머드 CAR-T 세포의 항종양 효능

[0418] 이 실시예는 항-TGFβ mAb 또는 TGFβ R2-ECD 분비 CAR-T 세포의 상대적 생체내 항종양 효능을 설명한다.

[0419] TGFβR2 ECD1+2 이량체를 분비하는 마우스 CAR-T는 언아머드 CAR-T 세포에 비해 개선된 생체내 항-종양 기능을 보여준다. 6-16주령 암컷 Balb/c 마우스(Jackson Labs)에 0.2 x 10⁶ 개의 생존 가능한 EMT6-hCD19-Fluc 종양 세포를 유방 지방 패드(동소, orthotopic)에 접종했다. 이식 6일 후, 종양 크기가 약 50mm³에 도달했고 마우스들을 비슷한 평균 종양 크기(평균 ~50mm³; 그룹 당 n=8)를 가진 치료 그룹들로 무작위 배정하고 시클로포스파미드(CPA; 200mg/kg i.p.)로 치료했다. 다음날, 동족 CD45.1 Balb/c 마우스의 2백만개 마우스 CAR-T 세포들을 꼬리 정맥에 주사했다. 그룹 1은 비형질도입 대조군 T 세포를 받았고, 그룹 2는 언아머드 CAR-T 세포를 받았고, 그룹 3은 TGFbR1+2 ECD 이량체 분비 CAR-T 세포를 받았고, 그룹 4는 전신 항-TGF-β 항체(클론 1D11.16.8; 10mg/kg, 3회 주사/주; i.v.)를 받았다. 독성을 모니터링하기 위해 체중을 매주 2회 측정했다. 종양 크기는 매주 2회 측정하고 종양 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: 종양 부피(mm³) = 길이 x 너비 x 높이 x 0.5236. 종양이 2000 mm³ 이상이거나 케양성 종양이 있는 마우스는 연구소의 동물 건강 프로토콜에 따라 희생되었다. 항-종양 효능은 비형질도입 T 세포를 주사한 대조군 마우스와 비교하여 종양 크기의 감소로서 평가하였다. 완전 반응자는 검출 가능한 종양이 없는 마우스로 정의되었다.

[0420] TGF-β 리간드 트랩(mTGFbR2 ECD1+2 이량체1)을 분비하는 인간 CD19에 대한 마우스 CAR-T는 동계 EMT6-hCD19 종양의 성장을, 언아머드 CAR-T 또는 비형질도입 T 세포를 받았거나 전신 항-TGF-β 항체(1D11, 10mg/kg, 주 3회 i.v.)로 처리된 대조군 마우스에서 완전 반응이 없는 것과 비교하여 3회의 완전 반응을 유도하여, 언아머드 CAR-T 세포보다 더 잘 억제한다. (도 10)

[0421] 실시예 9. 동계 종양 모델(MC38-hCD19)에서 TGF-β 신호전달 조절제를 분비하는 아머드 CAR-T 세포의 항종양 효능

[0422] 이 실시예는 항-TGFβ mAb 또는 TGFβ R2-ECD 분비 CAR-T 세포의 상대적 생체내 항종양 효능을 설명한다. 다른 동계 종양 모델(MC38-hCD19)에서 항-TGF-b mAb(TGF-b scFv VH-VL1)로 아머드된 마우스 CAR-T 세포의 기능이 항

상되었다.

- [0423] 반딧불이 루시페라제 및 CAR-T 표적 항원으로서 인간 CD19를 과발현하는 MC38 결장직장암 세포주가 생성되었다. 요약하면, MC38 세포에 EF1a 프로모터 및 퓨로마이신 내성의 제어하에 인간 CD19를 인코딩하는 플라스미드 (CD19_FL_WT_pLVX-EF1a-IRES-Puro)를 운반하는 바이러스를 형질도입하였다. MC38-hCD19 세포는 퓨로마이신을 사용하여 양성으로 선별되었다. MC38-hCD19 세포에 EF1a 프로모터 및 네오마이신(Amsbio, CAT# LVP435-PBS, 5×10^7 IFU/mL; MOI = 10) 내성의 제어하에 반딧불이 루시페라제를 인코딩하는 플라스미드를 운반하는 바이러스를 폴리브렌 존재하에서 형질도입하였다. MC38-hCD19-Fluc 세포들은 G418(제네티신)을 사용하여 양성으로 선별되었다.
- [0424] 6-16주령 암컷 C57BL/6 마우스(Jackson Labs)에 0.2×10^6 개의 생존성 MC38-hCD19-Fluc 종양 세포 sc를 s.c. 접종하였다. 이식 7일 후, 종양 크기가 약 50mm^3 에 도달했고 마우스들을 비슷한 평균 종양 크기(평균 $\sim 50\text{mm}^3$; 그룹 당 n=8)를 가진 치료 그룹들로 무작위 배정하고 시클로포스파미드(CPA; 200mg/kg i.p.)로 치료했다. 다음 날 동족 CD45.1 C57BL/6 마우스의 100,000개 마우스 CAR-T 세포(또는 음성 대조군으로서 비형질도입 T 세포)를 꼬리 정맥에 주사했다. 그룹 1은 비형질도입 T 세포를 받았다. 그룹 2는 언아머드 CAR-T 세포를 받았다. 그룹 3은 항-TGF- β 분비 CAR-T 세포(TGF-b scFv VH-VL1)를 받았다. 독성을 모니터링하기 위해 체중을 매주 2회 측정했다. 종양 크기는 매주 2회 측정하고 종양 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: 종양 부피(mm^3) = 길이 x 너비 x 높이 x 0.5236. 종양이 2000mm^3 이상이거나 케양성 종양이 있는 마우스는 연구소의 동물 건강 프로토콜에 따라 희생되었다. 항-종양 효능은 비형질도입 T 세포를 주사한 대조군 마우스와 비교하여 종양 크기의 감소로서 평가하였다. 완전 반응자는 검출 가능한 종양이 없는 마우스로 정의되었다.
- [0425] TGF- β (TGF-b scFv VH-VL1)에 대한 억제성 결합제를 분비하는 CAR-T 세포는 언아머드 CAR-T에 비해 우수한 효능을 보였는데, 8마리의 처리된 마우스 중에서 7마리가 완전 반응을 유도한 반면, 동일한 양의 언아머드 CAR-T 또는 비형질도입 T 세포를 받은 대조군에서는 완전 반응이 없었다. (도 11)
- [0426] 실시예 10. TGF- β 신호전달 조절제를 분비하는 CAR-T 세포는 숙주 면역 반응의 활성화를 향상시킨다.
- [0427] 이 실시예는 RNA Seq가 TGF- β 에 대한 결합제를 분비하는 CAR-T 세포에 의한 숙주 면역 반응의 향상된 활성화를 보여주었다는 것을 입증한다.
- [0428] 6-16주령 암컷 Balb/c 마우스(Jackson Labs)에 0.2×10^6 개의 생존 가능한 EMT6-hCD19-Fluc 종양 세포를 유방 지방 패드(동소, orthotopic)에 접종했다. 이식 6일 후, 종양 크기가 약 50mm^3 에 도달했고 마우스들을 비슷한 평균 종양 크기(평균 $\sim 50\text{mm}^3$; 그룹 당 n=8)를 가진 치료 그룹들로 무작위 배정하고 시클로포스파미드(CPA; 200mg/kg i.p.)로 치료했다. 다음날, 동족 CD45.1 Balb/c 마우스의 2백만개 마우스 CAR-T 세포들을 꼬리 정맥에 주사했다. 그룹 1은 비형질도입 대조군 T 세포를 받았고, 그룹 2는 언아머드 CAR-T 세포를 받았고, 그룹 3은 항-TGF- β scFv VH-VL1 분비 CAR-T 세포를 받았다. 그룹 4는 전신 항-TGF- β 항체(클론 1D11.16.8; BioXcell; 10mg/kg; 주 3회 i.v.)로 치료받았고 그룹 5는 이소형 대조군 항체(클론 MOPC21; BioXcell; 10mg/kg; 주 3회 i.v.)를 받았다. 독성을 모니터링하기 위해 체중을 매주 2회 측정했다. 종양 크기는 매주 2회 측정하고 종양 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: 종양 부피(mm^3) = 길이 x 너비 x 높이 x 0.5236.
- [0429] 마우스를 +12일차에 안락사시키고 종양을 수확하고 급속 냉동하고 -80°C 에서 보관하였다. 도 12서 보는 바와 같이, RNA를 추출하고 RNA-Seq에 이은 전산 분석을 수행하였다.
- [0430] CAR-T를 분비하는 TGF- β scFv VH-VL1을 받은 마우스의 종양은 다른 그룹의 마우스들과 비교하여 종양 침윤 T 세포(CD3d+, CD3e+, CD3g+), 특히, CD8+ T 세포(CD8a+) 및 세포독성 T 세포(GzmB+)에 대한 점수가 상당히 증가했다(도 13)
- [0431] ssGSEA 농축 점수는 CAR-T를 분비하는 TGF- β scFv VH-VL1을 받은 마우스의 종양에서 T 세포 시그니처 및 IFN γ 시그니처의 증가를 보여주었는데, 이는 CAR-T 세포의 침윤 증가 및/또는 내인성 면역 시스템의 활성화를 나타낸다. CAR-T를 분비하는 TGF- β scFv VH-VL1을 받은 마우스의 종양에서 활성화된 내피, 공동자극 및 항원 제시에 대한 시그니처 증가는 내인성 면역 시스템의 활성화를 명확하게 보여준다. 따라서, 적어도 부분적으로는 내인성 면역 반응을 개선함으로써 TGF- β 경로 항종양 효능을 억제하는 차단 항체(또는 다른 결합제)로 CAR-T 세포를 아머드한다. (도 14)

[0432] 실시예 11. 언아머드 CAR-T 세포로 처리된 EMT6-hCD19 마우스의 종양 샘플의 FACS

[0433] 6-16주령 암컷 Balb/c 마우스(Jackson Labs)에 0.2×10^6 개의 생존 가능한 EMT6-hCD19-Fluc 종양 세포를 유방 지방 패드(동소, orthotopic)에 접종했다. 이식 6일 후, 종양 크기가 약 50mm^3 에 도달했고 마우스들을 비슷한 평균 종양 크기(평균 $\sim 50\text{mm}^3$; 그룹 당 $n=8$)를 가진 치료 그룹들로 무작위 배정하고 시클로포스파미드(CPA; 200mg/kg i.p.)로 치료했다. 다음날, 동족 CD45.1 Balb/c 마우스의 2백만개 마우스 CAR-T 세포들을 꼬리 정맥에 주사했다. 그룹 1은 비형질도입 대조군 T 세포를 받았고, 그룹 2는 언아머드 CAR-T 세포를 받았고, 그룹 3은 항-TGF- β scFv VH-VL1 단량체 분비 CAR-T 세포를 받았다. 독성을 모니터링하기 위해 체중을 매주 2회 측정했다. 종양 크기는 매주 2회 측정하고 종양 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: 종양 부피(mm^3) = 길이 x 너비 x 높이 x 0.5236.

[0434] 마우스를 +7일차에 안락사시키고, FACS 분석을 위해 종양을 수확하고, 계량하고, 가공하였다. 요약하면, 종양을 작은 조각으로 자르고 제조업체의 지침에 따라 마우스 종양 분리 키트(Miltenyi)를 사용하여 분해시켰다. 샘플을 PBS 2% FCS에 재현탁하고 여과하고 FACS 염색을 위해 96웰 플레이트에 플레이팅했다. Fc 수용체를 차단하고 (TruStain FcX(항-마우스 CD16/32) 항체; Biolegend) CAR을 rhuCD19(RnD Systems)를 사용하여 4°C에서 1시간 동안 표지한 후 항-인간 IgG Fc 항체, TCR α/β , CD8 α , CD4, CD25, CD62L, CD11b, Gr1, CD11c, CD45.1 및 CD45를 포함하는 표면 마커를 사용하여 hCD19-Fc에 대해 표지했으며, 살아있는 세포는 고정 가능한 생존도 염료(ebioscience)를 사용하여 염색되었고 GzmB, Ki67 및 FoxP3를 포함하는 세포내 항원들은 eBioscience Foxp3/전사 인자 염색 완충액 세트(ThermoFisher)를 사용하여 염색되었다. 샘플들을 여과하고 유동 세포 분석기 BD Fortessa에서 수집되었다.

[0435] 도 15에서 보는 바와 같이, 15, FACS 염색은 비형질도입 세포 또는 언아머드 CAR-T를 받은 대조군과 비교하여 TGF- β scFv VH-VL을 분비하는 CAR-T를 받은 마우스로부터 얻은 샘플에서 hCD19+ 종양 세포의 감소 및 T 세포 침윤의 증가(종양 조직 mg 당)를 보여주었다. CD45.1+ 및 CD45.1- T 세포에 대한 게이팅 결과는 특히 내인성 T 세포 침윤(CD45.1-)의 증가를 보여준다. 이들 샘플로부터 전달된 CAR-T 세포(CD45.1+)는 더 높은 CAR 발현 수준을 가졌고 CD8+ T 세포는 더 높은 CD25 발현을 보였는데, 이는 활성화 증가를 나타내는 것이다. 숙주 T 세포(CD45.1-)의 CD8+ T 세포는 GzmB 발현이 더 높았는데, 이는 더 높은 세포독성을 나타내는 것이다. 요약하면, 이러한 FACS 데이터는 TGF- β 에 대한 결합제를 사용한 CAR-T 세포의 아머링(armoring)이 CAR-T 세포의 기능과 내인성 면역 반응을 향상시킨다는 것을 나타낸다.

[0436] 실시예 12. 이중이식 모델은 항-TGF- β 또는 항-TGF β R2 차단 항체로 아머드된 인간 GCC-CAR-T 세포의 향상된 기능을 보여준다.

[0437] 6 내지 16주령의 암컷 NSG 마우스(Jackson Labs)에 2×10^6 개의 생존 가능한 GSU 종양 세포를 피하 접종하였다. 이식 7일 후, 종양 크기가 약 50mm^3 에 도달했고 마우스들을 비슷한 평균 종양 크기(평균 $\sim 50\text{mm}^3$; 그룹 당 $n=6$)를 가진 치료 그룹들로 무작위 배정하였다. 다음날 500,000개 또는 100,000개의 인간 GCC CAR-T 세포를 꼬리 정맥에 주사했다. 그룹 1은 비형질도입 대조군 T 세포, 그룹 2는 언아머드 CAR-T 세포, 그룹 3은 항-TGF- β scFv VH-VL1 단량체 분비 CAR-T 세포, 그룹 4는 항-TGF β R2 VH3 단량체 및 그룹 5는 항-TGF β R2 VHH 이량체 분비 CAR T 세포를 받았다. 독성을 모니터링하기 위해 체중을 매주 2회 측정했다. 종양 크기는 매주 2회 측정하고 종양 부피는 다음 식을 사용하여 계산했다: 종양 부피(mm^3) = 길이 x 너비 x 높이 x 0.5236. 항-TGF- β 또는 항-TGF β R2 차단 항체로 아머드된 GCC-CAR-T 세포는 500,000개의 전달된 세포에서 언아머드 대조군 CAR-T보다 더 빠른 반응을 보였고 100,000개의 전달된 CAR-T 세포에서 향상된 항종양 효능을 보였다. (도 16).

[0438] 항-플래그 면역 포획 LC/MS 분석을 사용하여 TGF β 조절제의 종양 및 혈장 농도를 측정하였다. 도 17A-17D에서 보는 바와 같이, 아머드 CAR-T 세포로 처리된 마우스의 순환계에서 소량의 분비된 TGF- β 항체 또는 항-TGF β R2 항체가 존재하였다. 혈장은 EDTA 튜브를 사용하여 지정된 양의 아머드 또는 언아머드 항-GCC CAR-T 세포로 처리된 마우스로부터 수집되었다.

[0439] 도 20A-20C에서 보는 바와 같이, 아머드 CAR-T 세포는 또한 GCC 양성 GSU, HT55 및 MDA-MB-231-FP4 Luc 이중이식 모델에서 항종양 활성을 입증했다.

[0440] HT55 종양 세포의 비장내 주사 후 CAR-T 세포의 정맥내 주사를 사용하여 간 전이를 평가하였다. 아머드 CAR-T

세포는 이소타입 대조군에 비해 간으로의 전이를 늦추었다(도 21A-21C).

[0441]

실시예 13. GCC 양성 종양에서 반복 항원 자극

[0442]

100,000개의 언아머드 또는 아머드(항-GCC CAR 및 TGFβ 조절제(예: TGFβR2-VHH)를 공동 발현) 항-GCC CAR-T 세포는 TGF-β(1ng/ml 또는 10ng/ml)의 존재 또는 부재하에 200,000개의 HT29-GCC 또는 HT29 모(GCC 음성) 종양 세포와 중복으로 공동-배양되었다. 3-4일마다 웰 당 CAR-T 세포의 절반을 동일한 조건(TGF-β 1ng/ml 또는 10ng/ml 포함 또는 포함하지 않음)하에 새로운 종양 세포 플레이트로 옮겼다. 차후 평가를 위해 상층액을 수확하고 동결시켰다. 세포 계수 및 FACS 염색 분석을 위해 세포를 평가했다.

[0443]

제조업체의 프로토콜에 따라 CellTiterGlo(Promega)를 사용하여 종양 세포를 평가했다. Pherastar 플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 분석했다. 사멸 퍼센트는 다음 식을 사용하여 평가되었다:

[0444]

$$\text{사멸\%} = (1 - (\text{테스트 웰로부터의 신호} / \text{대조군 웰로부터의 신호})) * 100$$

[0445]

대조군 웰은 CAR-T 세포에 사용된 것과 동일한 공여체로부터 얻은 비형질도입 T 세포와 공동 배양된 종양 세포를 포함했다. FACS 염색은 인간 CD4, CD8, CD25에 대한 형광색소 접합 항체 및 소진 마커 PD-1, TIM-3, Lag-3 및 TIGIT 항체(Biolegend)를 사용하여 일주일에 한 번 수행되었다. 고정 가능한 생존도 염료 eFluor 506(Thermofisher; 제조업체의 프로토콜에 따름)을 사용하여 사멸 세포를 배제시켰다. CAR 발현 세포를 4°C에서 1시간 동안 GCC-hFc와 함께 인큐베이션하고, PBS 2% FCS로 세척하고, 2차 마우스 항-인간 IgG 항체로 검출하였다(30분, 4°C).

[0446]

만성 항원 활성화를 시뮬레이션하는 표적 세포로 몇 차례 재자극한 후, TGF-β는 CAR-T 세포 기능의 억제를 유도한다. TGFβ 조절제(예: TGFβR2 VHH 이량체)를 분비하는 CAR-T 세포만이 TGF-β(1ng/ml 또는 10ng/ml) 자극의 억제 효과로부터 보호된다(도 18A-18C). CAR-T 살해에 대한 억제 효과는 증식 억제 및 소진 마커 Lag3의 유도와 관련이 있다.

[0447]

실시예 14. 메소텔린(Msln) 양성 종양에서 항원 자극 반복

[0448]

Msln에 대한 CAR을 TGFβ 조절제(예: TGFβR2-VH 또는 dnTGFβR2) 또는 GFP에 대한 대조군 VH(Msln-대조군 VH)와 함께 공동 발현하는 약 100,000개의 iPSC 유래 항-Msln CAR-T 세포를 TGF-β(R&D Systems, 10ng/ml)의 존재 또는 부재 하에 인간 Msln을 과발현하는 40,000개의 MiaPaca-2 종양 세포와 중복으로 공동배양하였다. TGFβR2-VH는 CAR-T 세포로부터 분비되는 반면 dnTGFβR2는 CAR-T 세포의 막에 결합되어 있었다. 3-4일마다 웰 당 CAR-T 세포의 절반을 동일한 조건(TGF-β 10ng/ml 포함 또는 포함하지 않음)하에 새로운 종양 세포 플레이트로 옮겼다. 차후 평가를 위해 상층액을 수확하고 동결시켰다. CAR-T 세포를 유동 세포 분석법으로 계수하고 FACS 표현형 분석을 선택된 시점에서 수행하였다(도 22A).

[0449]

제조업체의 프로토콜에 따라 CellTiterGlo(Promega)를 사용하여 종양 세포의 생존력을 평가했다. Pherastar 플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 분석했다. 사멸 퍼센트는 다음 식을 사용하여 평가되었다:

[0450]

$$\text{사멸\%} = 1 - \left[\frac{(\text{테스트 웰의 신호})}{(\text{대조군 웰의 신호})} \right] \times 100$$

[0451]

대조군 웰은 이펙터(즉, CAR-T) 세포 없이 종양 세포만을 함유하였다. 세포독성 퍼센트는 도 22B에 도시되어 있다.

[0452]

Sytox Red 염료(Thermofisher, 제조업체의 프로토콜에 따름)를 사용하여 사멸 세포를 제외시켜 세포 수를 측정하고 HTS 장치를 사용하여 Fortessa 유동 세포 분석기(BD Biosciences)에서 동일한 부피의 세포 현탁액을 획득했다. 살아있는 CAR-T 세포는 살아있는 세포, 단일 세포 및 크기에 대한 게이팅에 의해 계산되었다. 결과를 외삽하여 웰당 세포 수를 얻었다.

[0453]

만성 항원 활성화를 시뮬레이션하는 표적 세포로 여러 회차를 재자극한 후, TGF-β는 CAR-T 세포 기능의 억제(즉, 사멸)를 유도하고 CAR-T 세포의 증식을 억제하는 것으로 관찰되었다. TGFβ 조절제(예를 들어, TGFβR2 VH 이량체의 분비 또는 막 결합된 dnTGFβR2의 발현)를 발현하는 CAR-T 세포만이 TGF-β(10ng/ml)의 억제 효과로부터 보호되었지만 대조군 VH는 그렇지 않았다.

[0454]

서열 표

[0455] 아래 표 5는 본원에 개시된 설명 및 서열들을 제공한다.

[0456] 표 5. 서열 표

설명/서열 번호	서열
서열번호 1 TGFb scFv VH-VL1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI ANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVTSSGGGGGGGGGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAW YQKPKGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYADS PITFGQGTREIKR
서열번호 2 TGFb scFv VH-VL2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI ANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVTSSGGGGGGGGGGGGSETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWY QKPKGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYADSPI TFGQGTREIKR
서열번호 3 TGFb scFv VL-VH	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQKPKGQAPRLLIYGASSRAPGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYADSPITFGQGTREIKRGGGGGGGG SGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMG GVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDY WGQGTLVTVSS
서열번호 4 TGFbR2 scFv VH-VL	QLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGK TYYNPSLKSRTISIDTSKSKQFLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVDSWGQGLVT VSSGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQK PKGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF GQGTKVEIK

[0457]

서열번호 5 TGFbR2_scFv_VL-V H	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKEIKGGGGSGGGGS GGGGSQLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSF YYGEKTYYNPSLKSRAISIDTSKIQFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQ GTLTVSS
서열번호 6 mTGFbR2_VH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYGMGWVRQAPGKGLEWVSWIEKTGN KTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARHIKVRSRDFDYWG QGTLTVSS
서열번호 7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYGMGWVRQAPGKGLEWVSWIEKTGN KTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGRHIKVRSRDFDYW GQGTLTVSS
서열번호 8 hTGFbR2_VH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYW GQGTLTVSS
서열번호 9 TGFbR2_VHH 이량체	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGTLTVSSsggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRP TGVSGTFYDYWGQGTLTVSS
서열번호 10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGTLTVSSsgggsggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVR

[0458]

	QAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSS
서열번호 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGLTVTVSSGGSEPKSsDKHTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPsDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
서열번호 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGLTVTVSSGGSEPKSsDKHTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPsDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGgggsggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSS
서열번호 13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGLTVTVSSgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPsDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
서열번호 14	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGLTVTVSSgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPsDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGgggsggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVR QAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKRRPTGVSGTFYDYWGQGLTVTVSS

<p>서열번호 15</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGTLVTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRP TGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTE QMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSS</p>
<p>서열번호 16</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWG QGTLVTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRP TGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTE QMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSVVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggsEVQLLE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRIDSPGGRTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLV TVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK LEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTG VSGTFYDYWGQGTLVTVSS</p>
<p>서열번호 17 TGFb-scFv VH-VL1 G4S 이량체</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIV DI ANYAQRFKGRVTITADESTSTYMESSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LTVSSGGGGGGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEFAVYYCQYADS</p>

	<p>PITFGQGTRLEIKggggsQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSSNVISWVRQAP GQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTL GLVLDAMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERA TLSCRASQSLGSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQYADSPITFGQGTRLEIK</p>
<p>서열번호 18 TGFb-scFv VH-VL1 2xG4S 이량체</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI ANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGL VTVSSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAW YQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYADS PITFGQGTRLEIKggggsggggsQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSSNVISW VRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVY YCASTLGLVLDAMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSL SPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQYADSPITFGQGTRLEIK</p>
<p>서열번호 19 TGFb-scFv VH-VL1 미니바디 + 힌지</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI ANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGL VTVSSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAW YQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYADS PITFGQGTRLEIKGGSEPKSsDKHTHTCPPCgggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
<p>서열번호 20 TGFb-scFv VH-VL1 미니바디 + 힌지 이 량체</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI ANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGL VTVSSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAW YQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYADS</p>

	<p>PITFGQGTRLEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKN</p> <p>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQ</p> <p>GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGgggssggsgQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC</p> <p>KASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTY</p> <p>MELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSA</p> <p>LETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGI</p> <p>PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK</p>
<p>서열번호 21</p> <p>TGFb-scFv VH-VL1</p> <p>미니바디</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI</p> <p>ANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT</p> <p>VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAW</p> <p>YQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADS</p> <p>PITFGQGTRLEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</p> <p>VEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN</p> <p>HYTQKSLSLSPG</p>
<p>서열번호 22</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI</p> <p>ANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT</p> <p>VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAW</p> <p>YQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADS</p> <p>PITFGQGTRLEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</p> <p>VEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN</p> <p>HYTQKSLSLSPGgggssggsgQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSNVISWVR</p> <p>QAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYC</p> <p>ASTLGLVLDAMDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSP</p> <p>GERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTL</p> <p>TISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK</p>
<p>서열번호 23</p>	<p>QLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEK</p>

[0459]

	<p>TYYNPSLKSRATISIDTSKSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF GQGTKVEIKggggsQLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGK GLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRATISIDTSKSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRG VIDSWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYY CQQRSNWPPTFGQGTKVEIK</p>
서열번호 24	<p>QLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEK TYYNPSLKSRATISIDTSKSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF GQGTKVEIKgggsggggsQLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIR QPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRATISIDTSKSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRG PTMIRGVIDSWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPE DFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK</p>
서열번호 25	<p>QLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEK TYYNPSLKSRATISIDTSKSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF GQGTKVEIKGGSEPKSsDKHTHTPCgggsgggsgGQPREPVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPsDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
서열번호 26	<p>QLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEK TYYNPSLKSRATISIDTSKSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLVT</p>

	<p>VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF GQGTKVEIKGGSEPKSsDKHTCPCgggssgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVS GGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLS SVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQ SPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK</p>
<p>서열번호 27</p>	<p>QLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEK TYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF GQGTKVEIKgggssgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG</p>
<p>서열번호 28</p>	<p>QLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEK TYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGLTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF GQGTKVEIKgggssgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGggggsggsQLQVQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIR QPPGKGLEWIGSFYYGEKTYNPSLKSRAISIDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCPRG PTMIRGVIDSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPE</p>

	DFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
서열번호 29 TGFbR2 VH2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQESMYWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGTRIKQGFQDYWGQG TLVTVSS
서열번호 30 TGFbR2 hVH2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEYRMWWVRQAPGKGLEWVSAIEPIGHR TYYANSVVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDY WGQGTLLVTVSS
서열번호 31 TGFbR2 VH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTDQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGG RTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRQPAGVSGKYVDYW GQGTLLVTVSS
서열번호 32 mTGFbR2ECD (I24-K31,F57-L185)	IPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCF VRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLYHGFTL EDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL
서열번호 33 huTGFbR1+2 ECD v1	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCA PSSKT GSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVEGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDN NGAVKFPQLCKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKQEVCAVWRKNDENITLET VCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNP D [hTGFbR1-ECD(L34-E125)- hTGFbR2-ECD(A44-D151)]
서열번호 34 huTGFbR1+2 ECD v2	QCFCCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCA PSSKTG SVTTTYCCNQDHCNNGGGSVAVKFPQLCKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKQ EVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSS DECNDNIIFSE

	[hTGFbR1-ECD(Q35-N107)-4GS- 4GS-hTGFbR2-ECD(L34-E125)]
서열번호 35 mTGFbR1+2 ECD v1	LQCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVFCAPSSKTG AVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTGPFSKQSAGLGPVELGGGGSIPPHVPKSVNSDVMAS DNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNIT LETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTT SSPD [mTGFbR1-ECD(L30-L126)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-K31,F57-D184)]
서열번호 36 huTGFbR1+2 ECD v2	QCFCCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVFCAPSSKTG AVTTTTYCCNQDHCNCGGGGSAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKP HEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKE [mTGFbR1-ECD(Q31-N107)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-K31,F57-E150)]
서열번호 37 IgKss가 있는 마우 스 TGFbR2 ECD	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKND KNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSE EYTTSSPDL
서열번호 38 8(G4S)릴커 및 IgK ss가 있고 플래그 태그(flag tag)가 있 는 마우스 TGFbR2 ECD 이량체	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKND KNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSE EYTTSSPDLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG KSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTC DNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASP KVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEYTTSSPDLGGGGG DYKDDDDK
서열번호 39 TGFbR2 ECD 이량 체	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKND KNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSE

[0460]

R	DRSTGWSEWNSDLWGRGTLTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLF GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTAT KDTFDALHMQUALPPR
서열번호 48 V51 항-GCC CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCTRDNKDYWGQGLTVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDT FDALHMQUALPPR
서열번호 49 항-CD19 scFv	MGTSLLCWMLCILLGADHADAQVQLQSQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWM NWVKQRPG KGLEWIGRIYPGDEDTNYSQKFKDKATLTADKSTTAYMQLSSLTSEDS AVYFCARSLLYGDY LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGQIVLTQSPAIMSA SPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPRDFSGSGSGTS YFLTINMEAE DAATYYCQQWNINPLTF GAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVL WGGVLACYSLLVTVAFI IFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR SRDQRLPPDAHKPPG GGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGL Y QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
V5 항-GCC CAR 서열번호 50	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWV RQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCATDYTRDVGQGTAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFL PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR

	KHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLST ATKDTFDALHMQALPPR (서열번호)
V36 항-GCC CAR 서열번호 51	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGGRELEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVY YCTRDNKDYWGQGLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFL PGPSKPFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLST ATKDTFDALHMQALPPR (서열번호)
V1 항-GCC CAR 서열번호 52	MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYSWFRQ PAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCAR DRSTGWSEWNSDLWGRGTLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG PTRKHQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGL STATKDTFDALHMQALPPR (서열번호)
V48 항-GCC CAR 서열번호 53	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTA MYYCTRDNKDLWGQGLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGL STATKDTFDALHMQALPPR (서열번호)
V8 항-GCC CAR 서열번호 54	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIKYDG SEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNLSRAEDTGYYCATDFTRDVWGQTTVT

	[hTGfB1-ECD(Q35-N107)-4GS- 4GS-hTGfB2-ECD(L34-E125)]
서열번호 35 mTGfB1+2 ECD v1	LQCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVFCAPSSKTG AVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTGPFSKQSAGLGPVELGGGGSIPPHVPKSVNSDVMAS DNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNIT LETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTT SSPD [mTGfB1-ECD(L30-L126)-4GS-mTGfB2-ECD(I24-K31,F57-D184)]
서열번호 36 huTGfB1+2 ECD v2	QCFCCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVFCAPSSKTG AVTTTTYCCNQDHCNCGGGSVAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKP HEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKE [mTGfB1-ECD(Q31-N107)-4GS-mTGfB2-ECD(I24-K31,F57-E150)]
서열번호 37 IgKs가 있는 마우 스 TGfB2 ECD	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKND KNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSE EYTTSSPDL
서열번호 38 8(G4S)릭커 및 IgK ss가 있고 플래그 태그(flag tag)가 있 는 마우스 TGfB2 ECD 이량체	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKND KNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSE EYTTSSPDLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG KSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTC DNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASP KVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEYTTSSPDLGGGGG DYKDDDDK
서열번호 39 TGfB2 ECD 이량 체	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKND KNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSE

[0461]

R	DRSTGWSEWNSDLWGRGTLTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLF GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTAT KDTFDALHMQUALPPR
서열번호 48 V51 항-GCC CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCTRDNKDYWGQGLTVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDT FDALHMQUALPPR
서열번호 49 항-CD19 scFv	MGTSLLCWMLCILLGADHADAQVQLQSQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWM NWVKRPG KGLEWIGRIYPGDEDTNYSQKFKDKATLTADKSTTAYMQLSSLTSEDS AVYFCARSLLYGDY LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGQIVLTQSPAIMSA SPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPRDFSGSGSGTS YFLTINMEAE DAATYYCQWNINPLTF GAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVL WGGVLACYSLLVTVAFI IFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR SRDQRLPPDAHKPPG GGFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGL Y QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
V5 항-GCC CAR 서열번호 50	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWV RQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCATDYTRDVGQGTAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFL PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR

	KHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLST ATKDTFDALHMQALPPR (서열번호)
V36 항-GCC CAR 서열번호 51	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGGRELEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVY YCTRDYNDKYWGQGLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLF PGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLST ATKDTFDALHMQALPPR (서열번호)
V1 항-GCC CAR 서열번호 52	MGWSCIILFVATATGVHSQVQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQ PAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMSVDTPKNQFSLNLSVTAADTAVYYCAR DRSTGWSEWNSDLWGRGLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGL STATKDTFDALHMQALPPR (서열번호)
V48 항-GCC CAR 서열번호 53	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTA MYCYTRDYNDLWQGLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGL STATKDTFDALHMQALPPR (서열번호)
V8 항-GCC CAR 서열번호 54	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIKYDG SEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNLSRAEDGVYYCATDFTRDVWGQTTVT

	VSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVWLVVGGVLA CYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS R VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (
V9 항-GCC CAR 서열번호 55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGRGLEWVAKIRYDGG EKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVGQGTITV SS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVWLVVGGVLAC YSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL FNEHQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (
V30 항-GCC CAR 서열번호 56	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVRQAPGKGREWVAKIKYD GSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVGQGTITV TVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVWLVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (
V31 항-GCC CAR 서열번호 57	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGREWVAKIKYD SEKYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVGQGTITV VSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVWLVVGGVLA CYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS R VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (
서열번호 58	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

P2A	
서열번호 59 G4S 링커	GGGGS
서열번호 60 2x G4S 링커	GGGGSGGGGS
서열번호 61	GGGGSGGGGSGGGGS
마우스 CD19 CAR 서열번호 62	METDTLLLWVLLLVPGSTGEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNW VKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSA VYFCARKTISVVDYFDYWGGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFM5 TSVGDVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDRFTGSGSG TDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKIEFMYPYLDNERSNGTIIHI KEKHLCHTQSSPKLFWLVVAVGLFCYGLLVTVLVCVIWNTNSRRNRLLQSDYMNMT PRRPLTRKPYQPYAPA RDAAYRPRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEY DVLEKRRARDPGEMGGKQRRRNPQEGVYNALQDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQLAPR
인간 CD19 CAR (C D3-1xx 포함) 서열번호 63	MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFC ARKTISVVDYFDYWGGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMST5VG DRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDRFTGSGSGTDFTL TITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPYLDNEKSNGTIIH VKGKHLCPSPKPFVWLVVGGVLCYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRR EEYDVLDRRGRDPGEMGGKRRRNPQEGFLNELQDKMAEAFSEIGMKGERRRGK HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQLAPR

[0462] **균등물 및 범위**

[0463] 상용 기술 분야의 숙련된 기술자들은 통상적인 실험을 통해 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 실시형태들에 대한 많은 균등예들을 인식 또는 알 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 설명에 제한되지 않으며, 그보다는 다음 청구범위에 제시된 바와 같다.

[0464] 본 발명의 적어도 하나의 실시형태의 여러 양상들을 설명하였지만, 다양한 변경, 수정 및 개선이 당업자에게 명백할 것이라는 것이 이해되어야 한다. 이러한 변경, 수정 및 개선은 본 발명의 일부인 것으로 하며 본 발명의 사상 및 범위에 속하는 것으로 한다. 따라서, 전술한 설명 및 도면은 단지 예로서 제공되며 본 발명은 다음 청구범위에 의해 상세하게 설명된다.

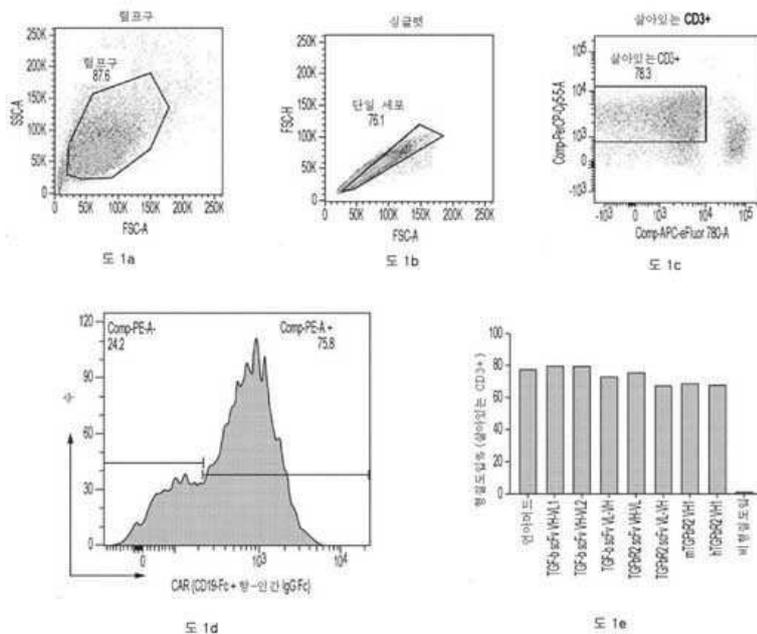
[0465] 청구범위 구성요소를 수정하기 위해 클레임에서 “제1”, “제2”, “제3” 등과 같은 서수 용어를 사용하는 것은 그 자체로 하나의 청구범위 구성요소가 다른 구성요소에 대한 어떠한 우선도, 우선 순위 또는 순서 또는 상용 방법의 활동들이 수행되는 시간상의 순서를 의미하는 것은 아니며, 단순히 특정 이름을 갖는 하나의 청구범위 구성요소를 동일한 명칭을 갖는 다른 구성요소와 구별하기 위한 표지로만 사용된다(단, 서수 용어 사용).

[0466] 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 관사 “a” 및 “an”은 명백히 달리 나타내지 않는 한 복수 지시 대상을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 그룹의 하나 또는 그 이상의 구성원들 사이에 “또는”을 포함하는 청구범위 또는 상세한 설명은, 내용상 역으로 명시되지 않거나 달리 내용으로부터 자명하지 않는 한, 그룹 구성원들 중 하나, 하나 이상, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 과정에서 존재하거나, 사용되거나, 또는 다른 방식으로 관련되는 경우 만족되는 것으로 고려된다. 본 발명은 그룹 중 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 과정

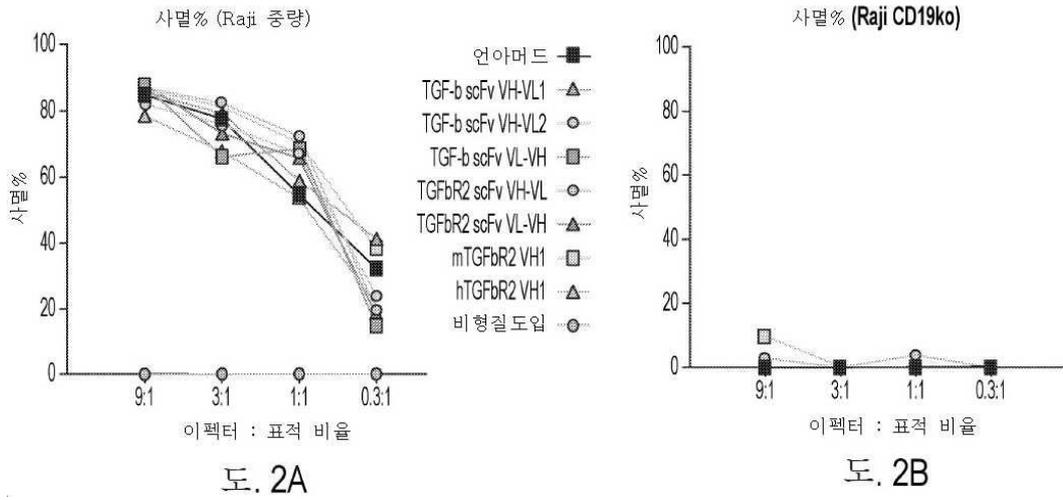
에서 존재하거나, 사용되거나, 또는 다른 방식으로 관련되는 실시형태들을 포함한다. 본 발명은 또한 그룹 구성원들 중 하나 이상 또는 모두가 주어진 생성물 또는 과정에서 존재하거나, 사용되거나, 또는 다른 방식으로 관련되는 실시형태들을 포함한다. 또한, 달리 명시되지 않는 한, 또는 모순이나 불일치가 발생한다는 것이 당업자에게 명백하지 않는 한, 본 발명은 나열된 하나 이상의 청구항들로부터의 하나 이상의 제한, 구성요소, 절, 설명적 용어 등이 동일한 기본 청구항(또는 관련도에 따라 임의의 다른 청구항)에 따라 또 다른 청구항에 도입됨을 이해하여야 한다. 구성요소들이 목록으로 제시되는 경우(예: Markush 그룹 또는 이와 유사한 형식) 구성요소의 각 하위 그룹도 개시되는 것이며 모든 구성요소(들)는 상용 그룹에서 제거될 수 있음을 이해해야 한다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 양상이 특정 요소, 특징 등을 포함하는 것으로 지칭되는 경우, 본 발명의 특정 실시형태 또는 본 발명의 양상들은 이러한 구성요소, 기능 등으로 구성되거나 본질적으로 구성됨을 이해해야 한다. 단순함을 위해, 이러한 실시형태들은 모든 경우에 본원에서 그리 상세히 구체적으로 설명되지 않았다. 또한, 본 발명의 임의의 실시형태 또는 양상들은 구체적인 배제가 명세서에 언급되는지 여부에 관계없이 청구범위에서 명시적으로 배제될 수 있음을 이해해야 한다. 본 발명의 배경을 설명하고 그 실시와 관련한 추가 세부 사항을 제공하기 위해 본원에서 참조된 간행물, 웹사이트 및 기타 참고 자료는 본원에 참고로 포함된다.

도면

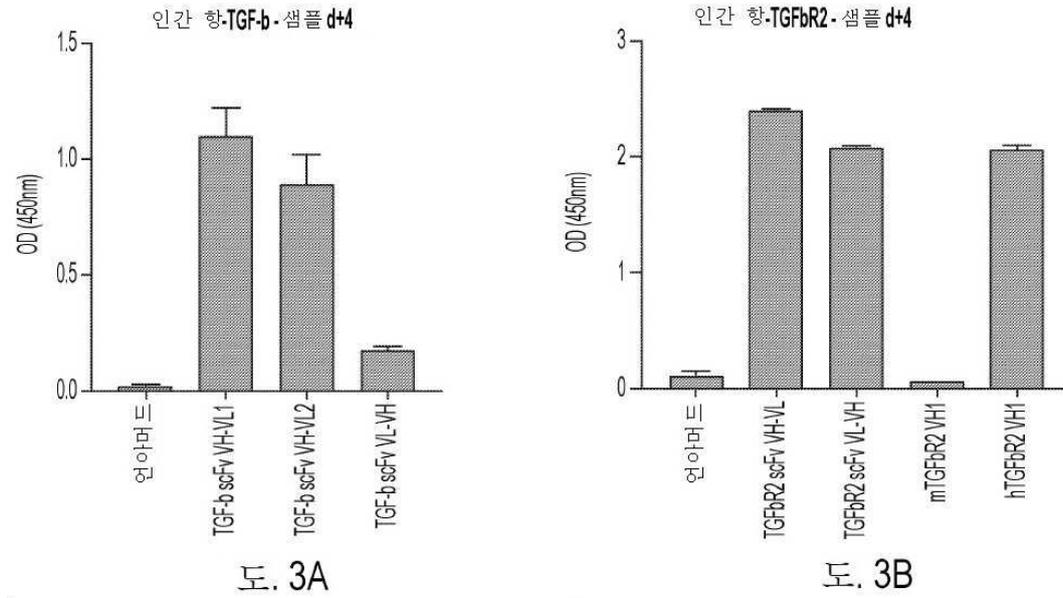
도면1



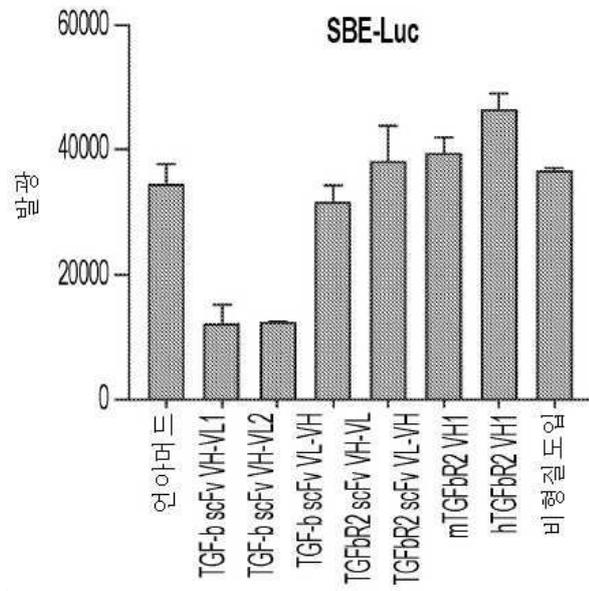
도면2



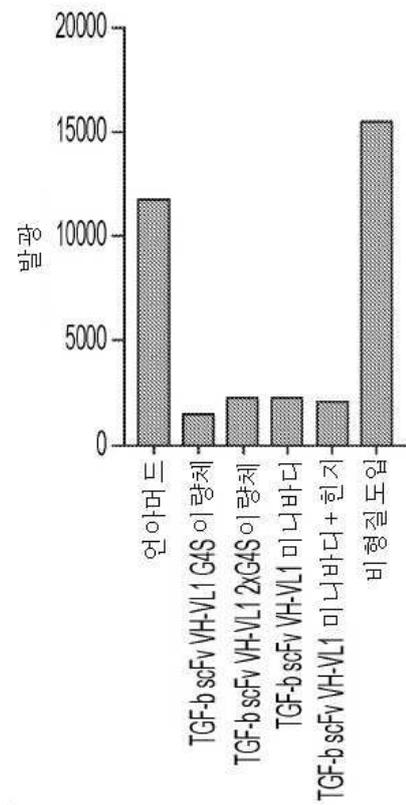
도면3



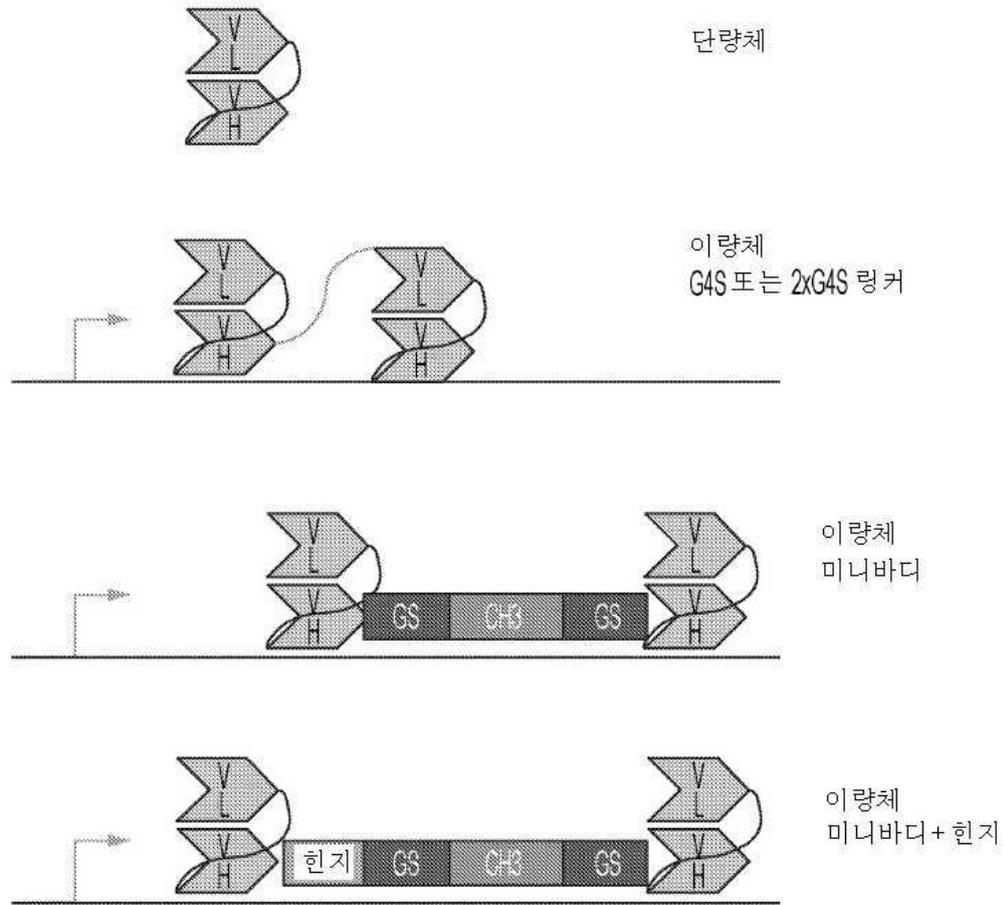
도면4



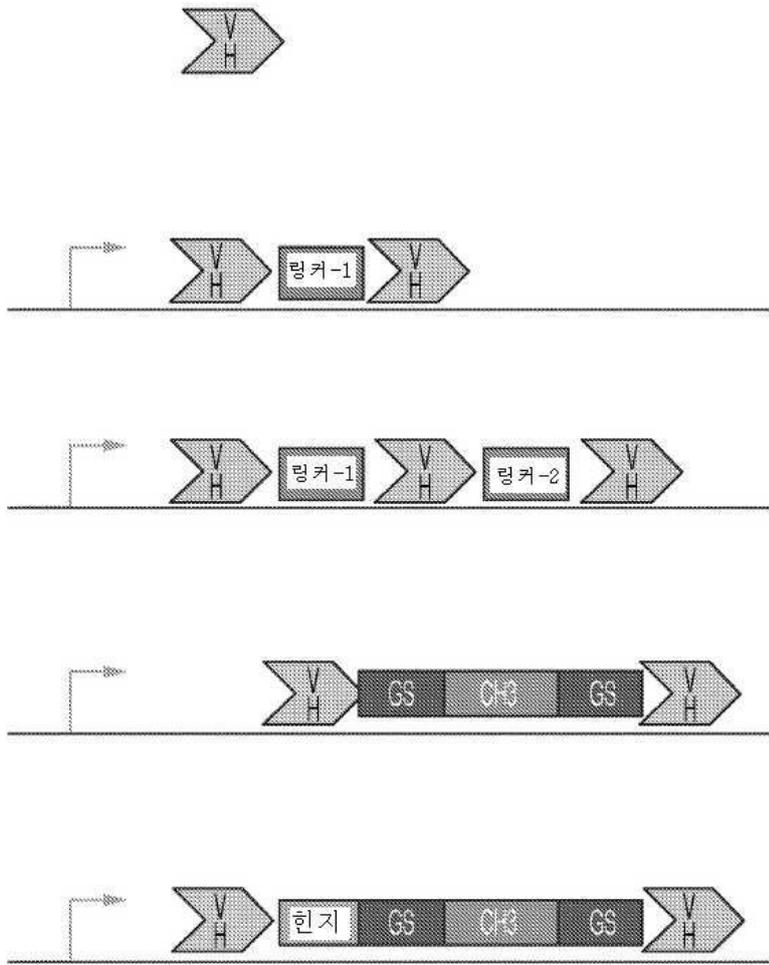
도면5a



도면5b



도면5c



도면6

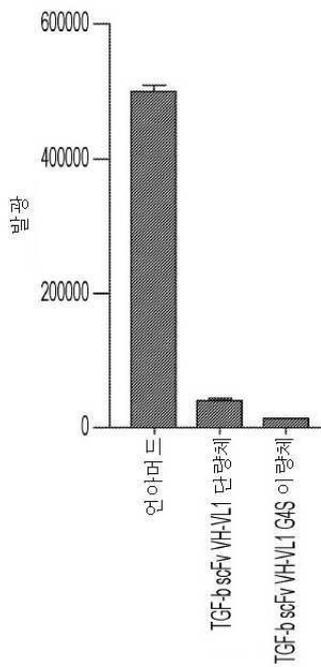


FIG. 6A

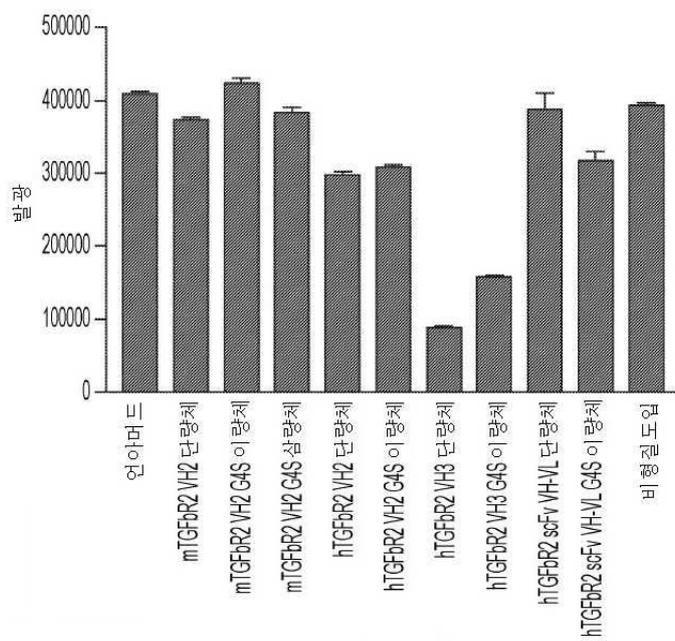
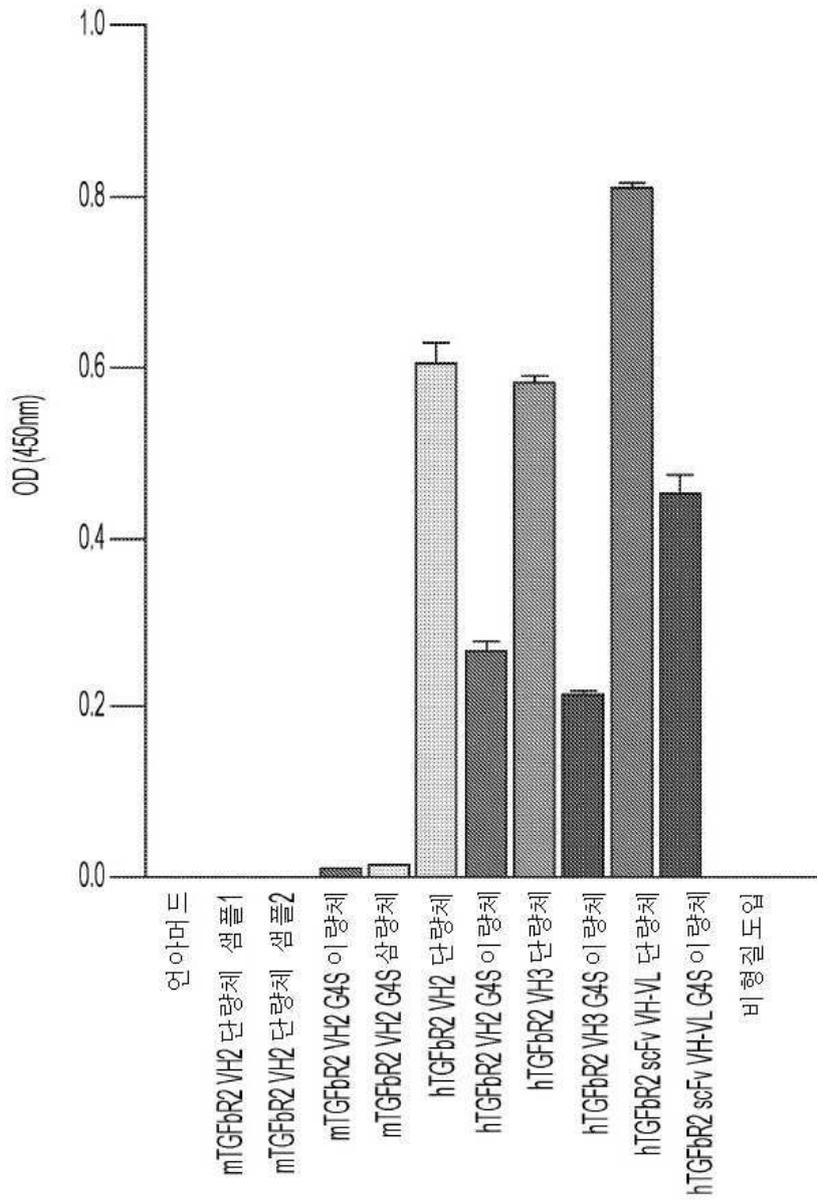
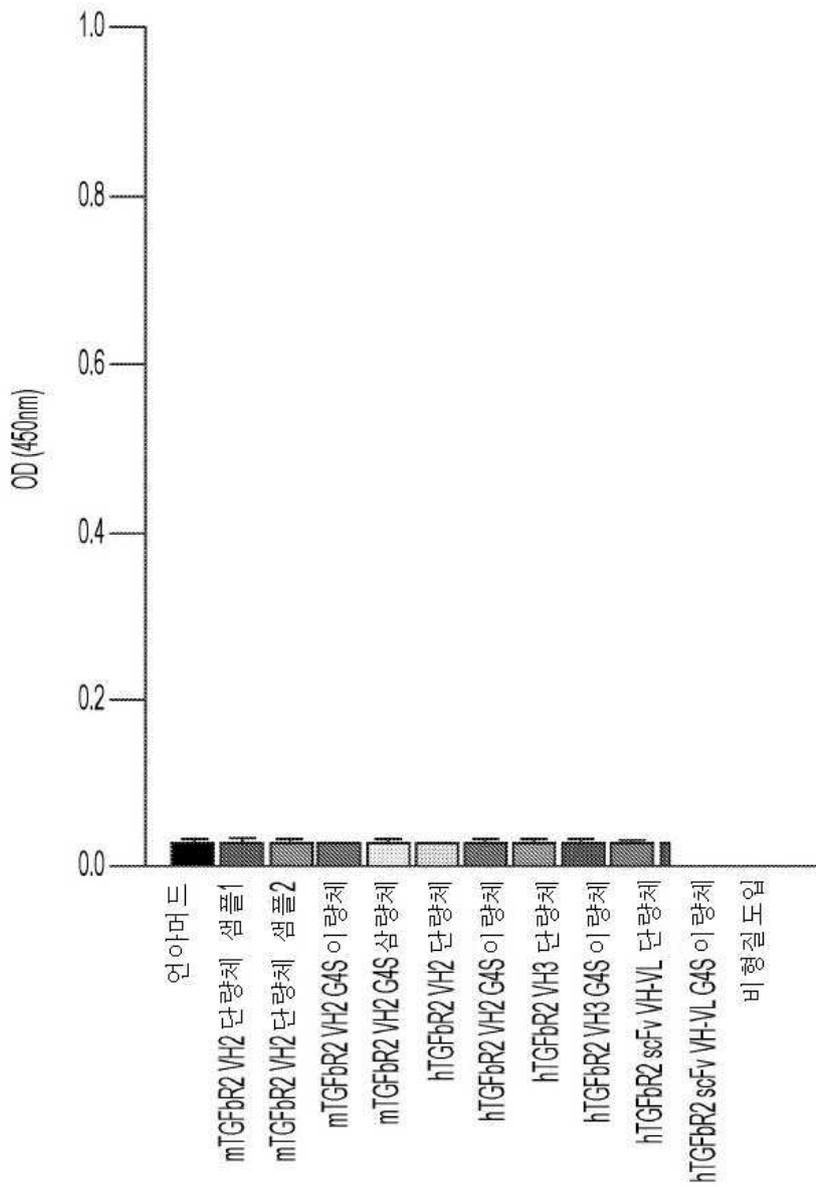


FIG. 6B

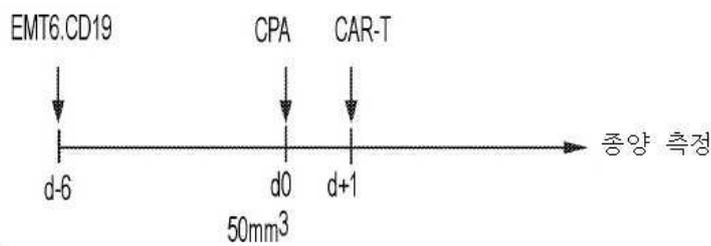
도면7a



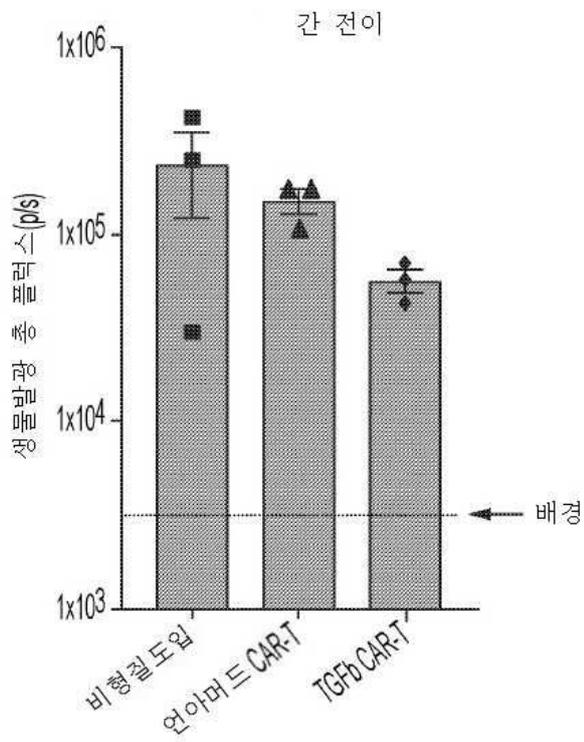
도면7b



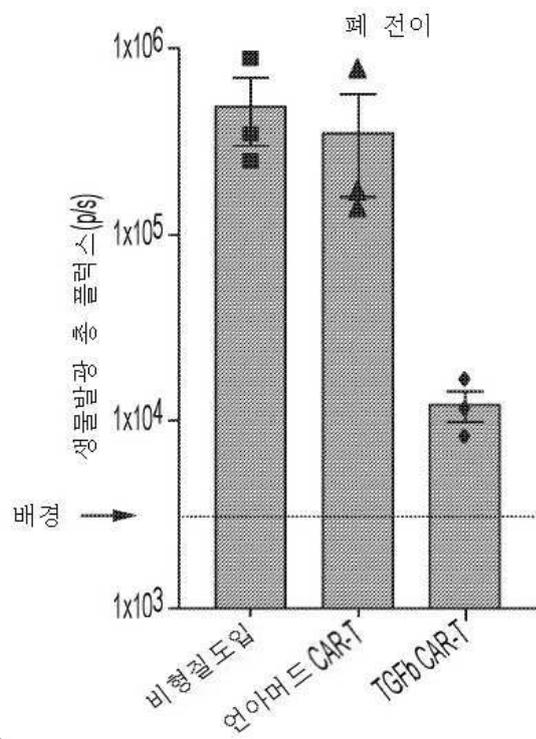
도면8a



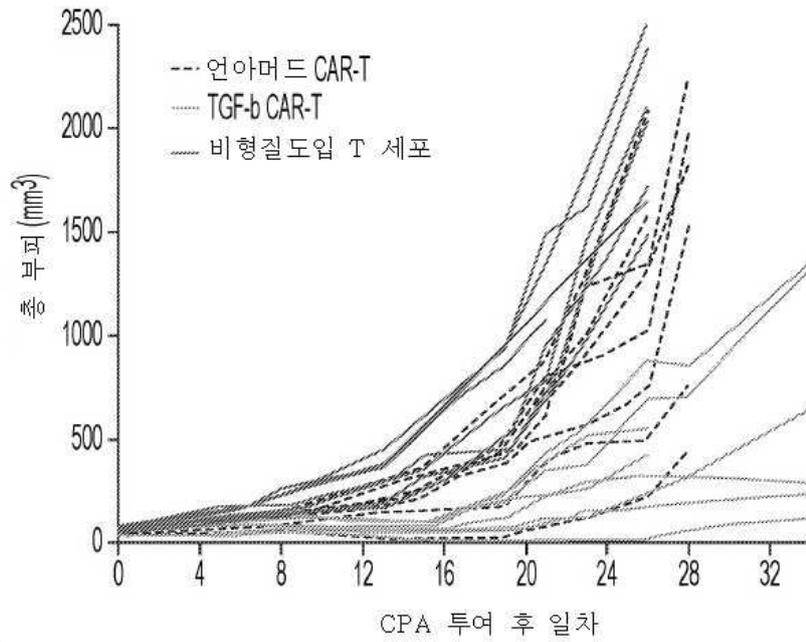
도면8b



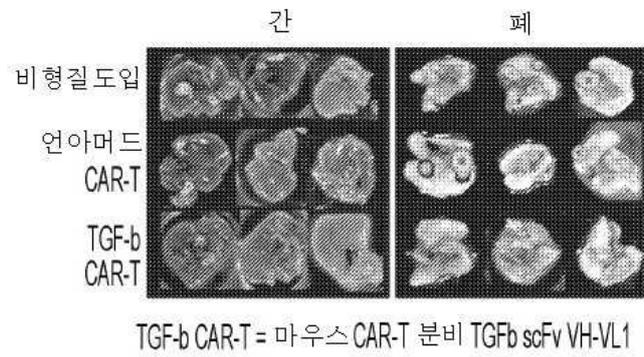
도면8c



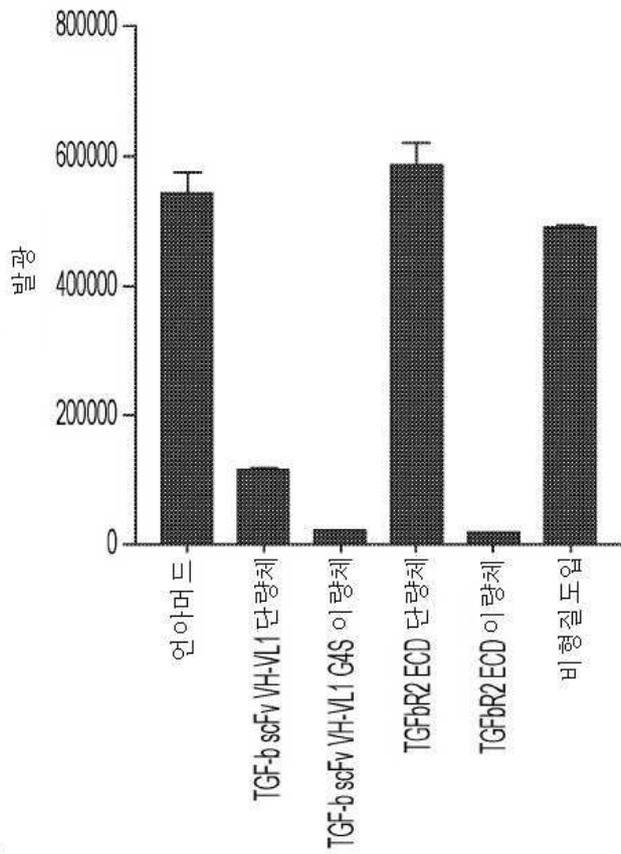
도면8d



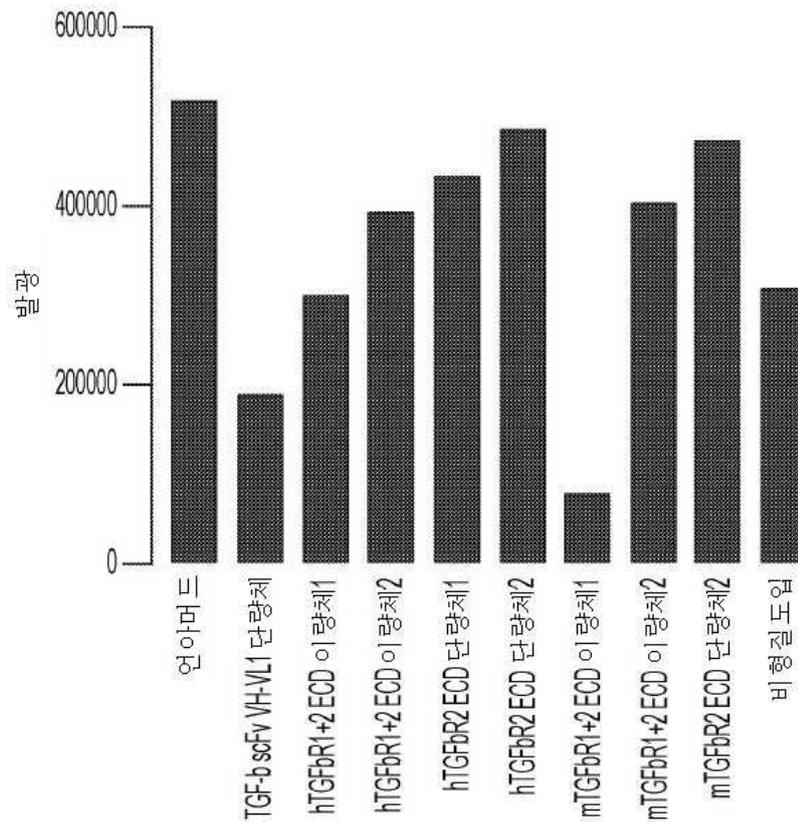
도면8e



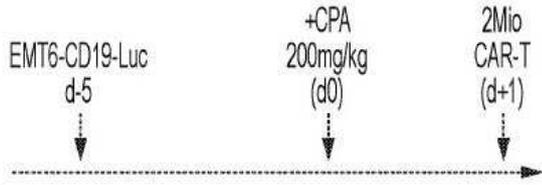
도면9a



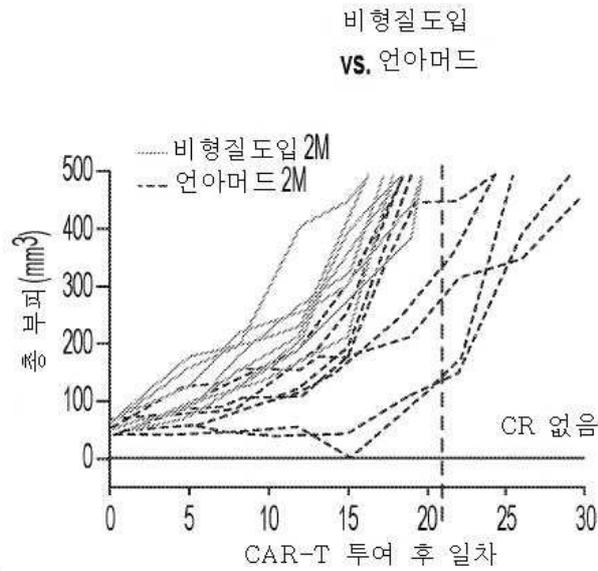
도면9b



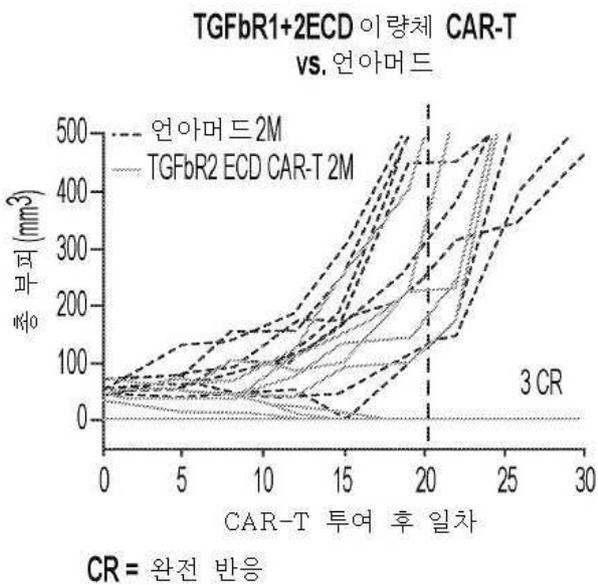
도면10a



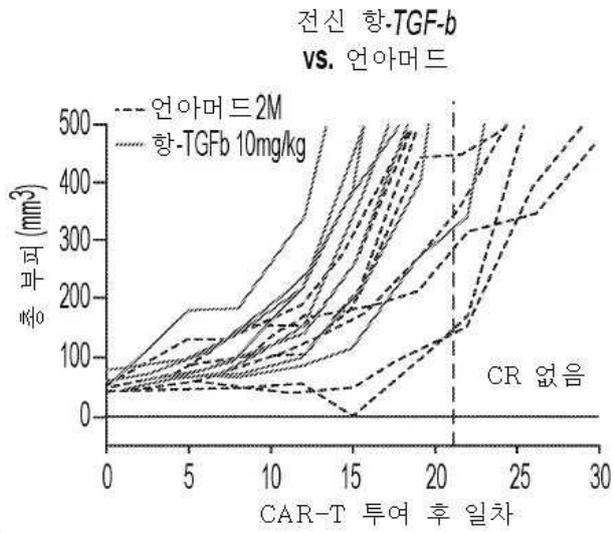
도면10b



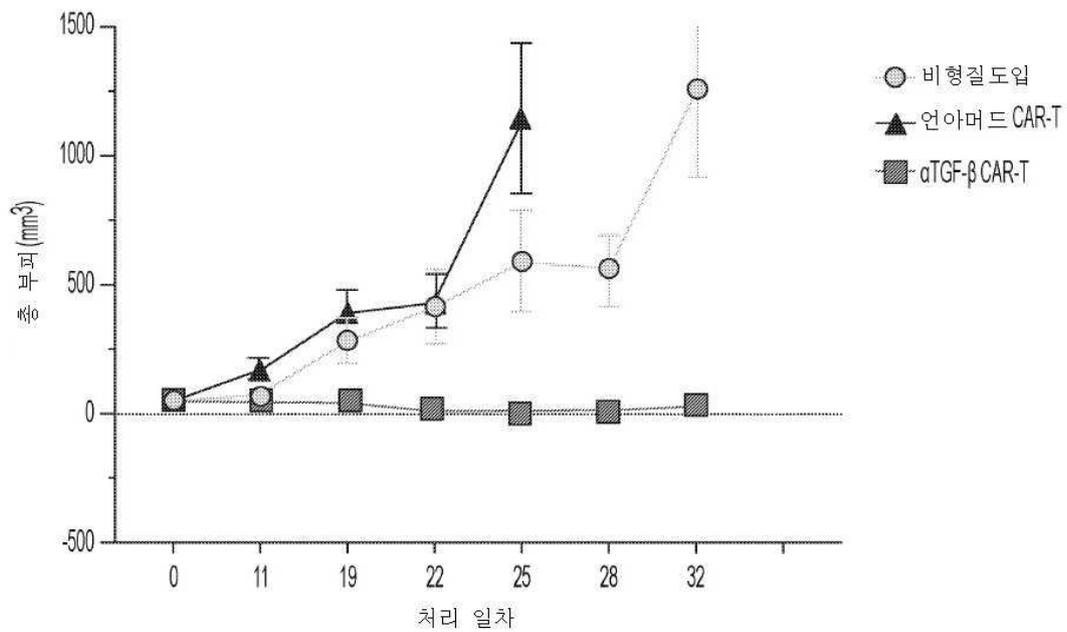
도면10c



도면10d

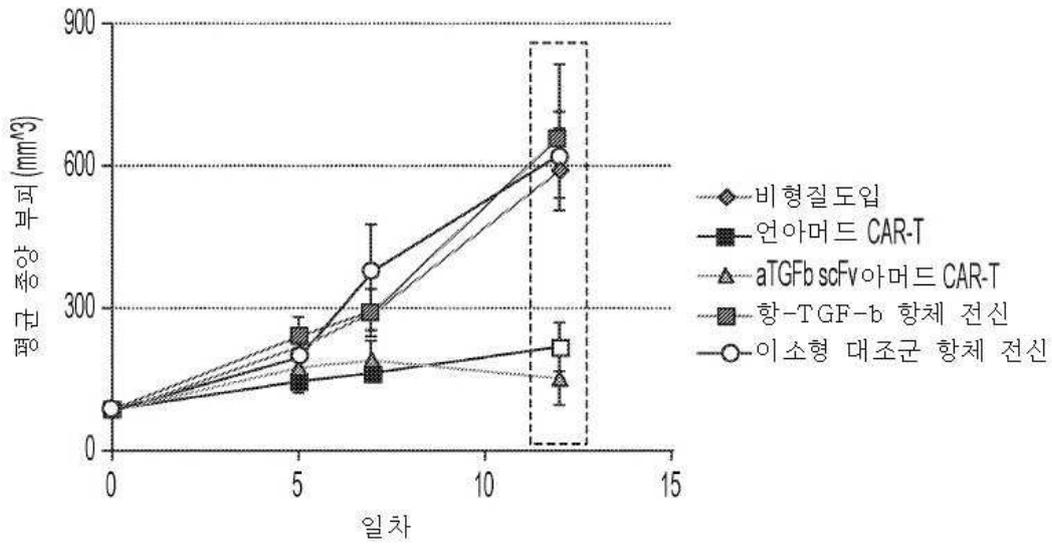


도면11

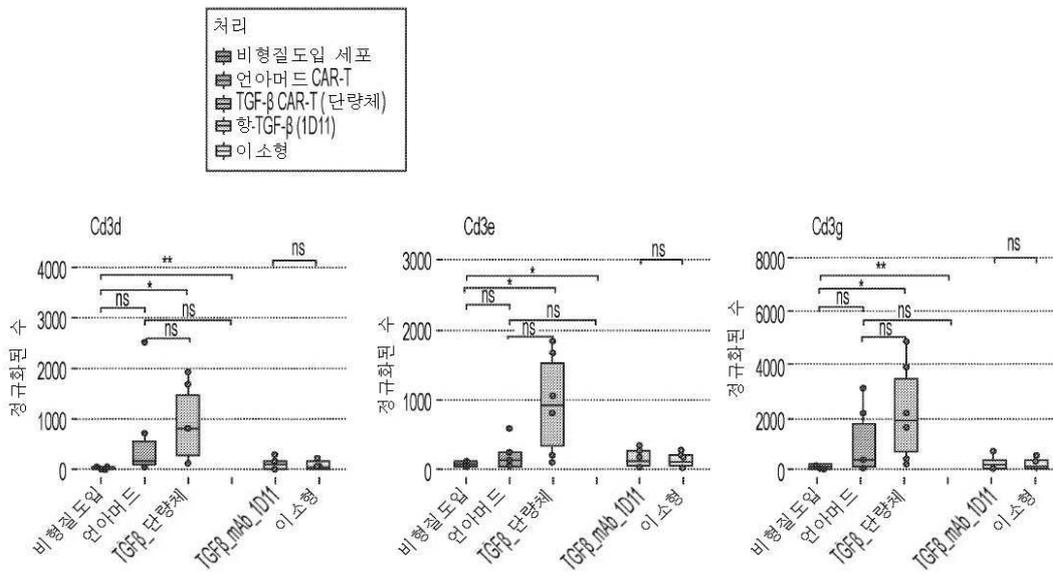


도면12

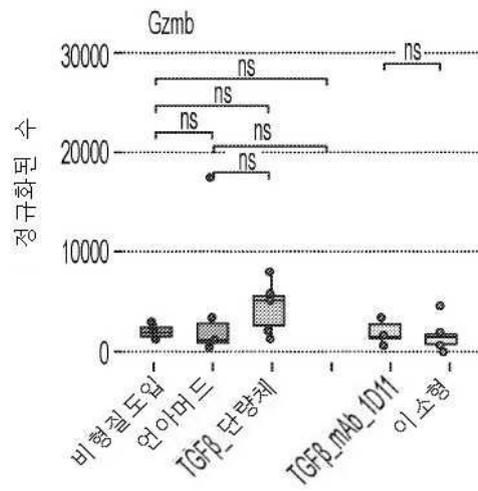
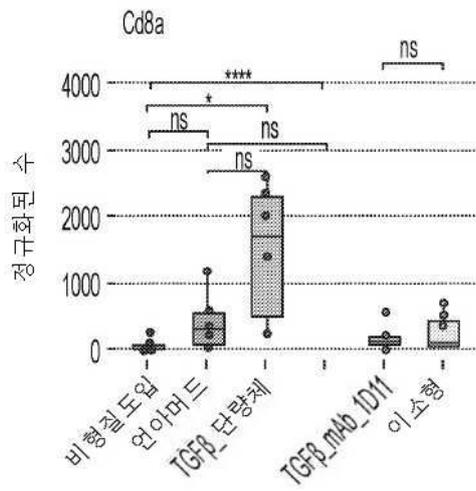
RNA 시퀀싱을 위한 EMT6-hCD19



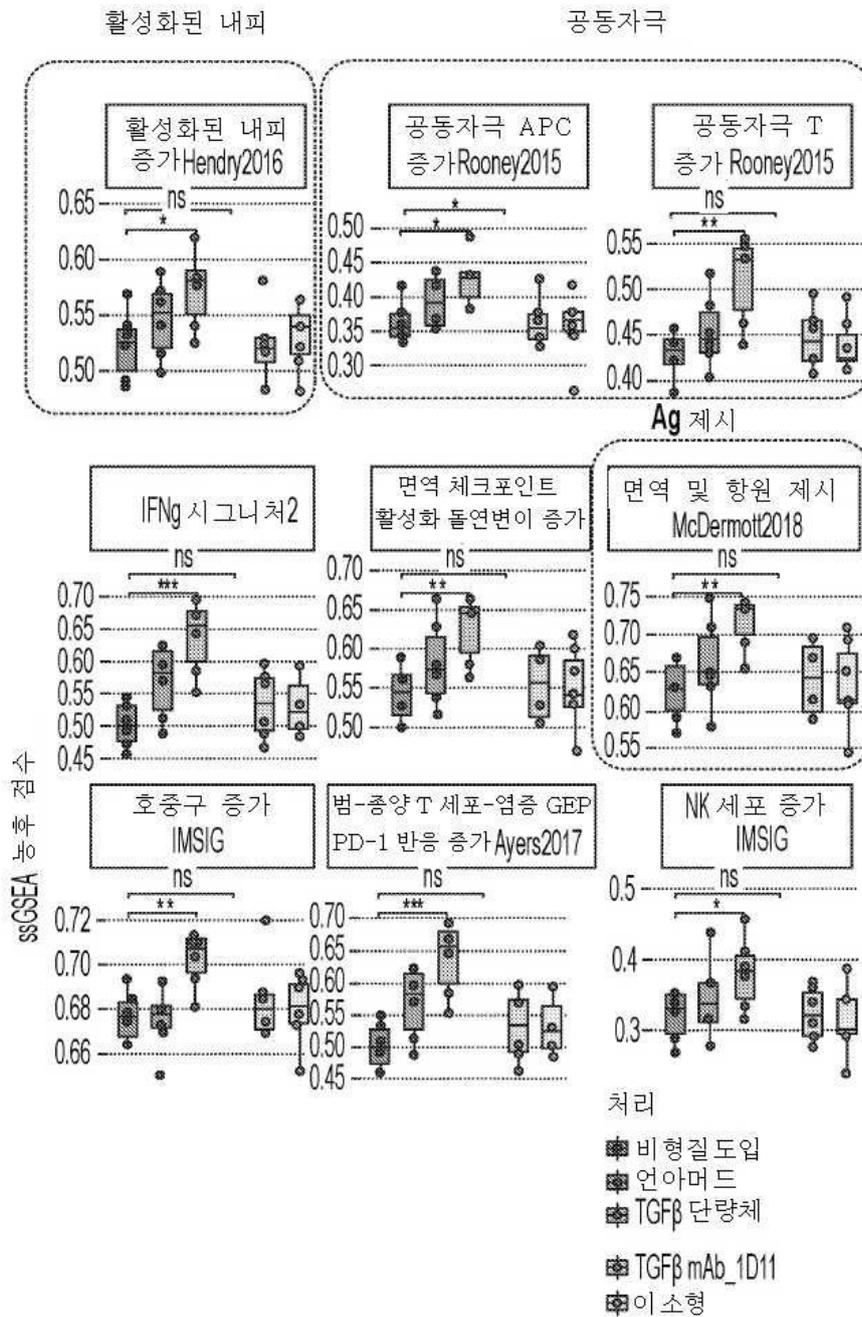
도면13a



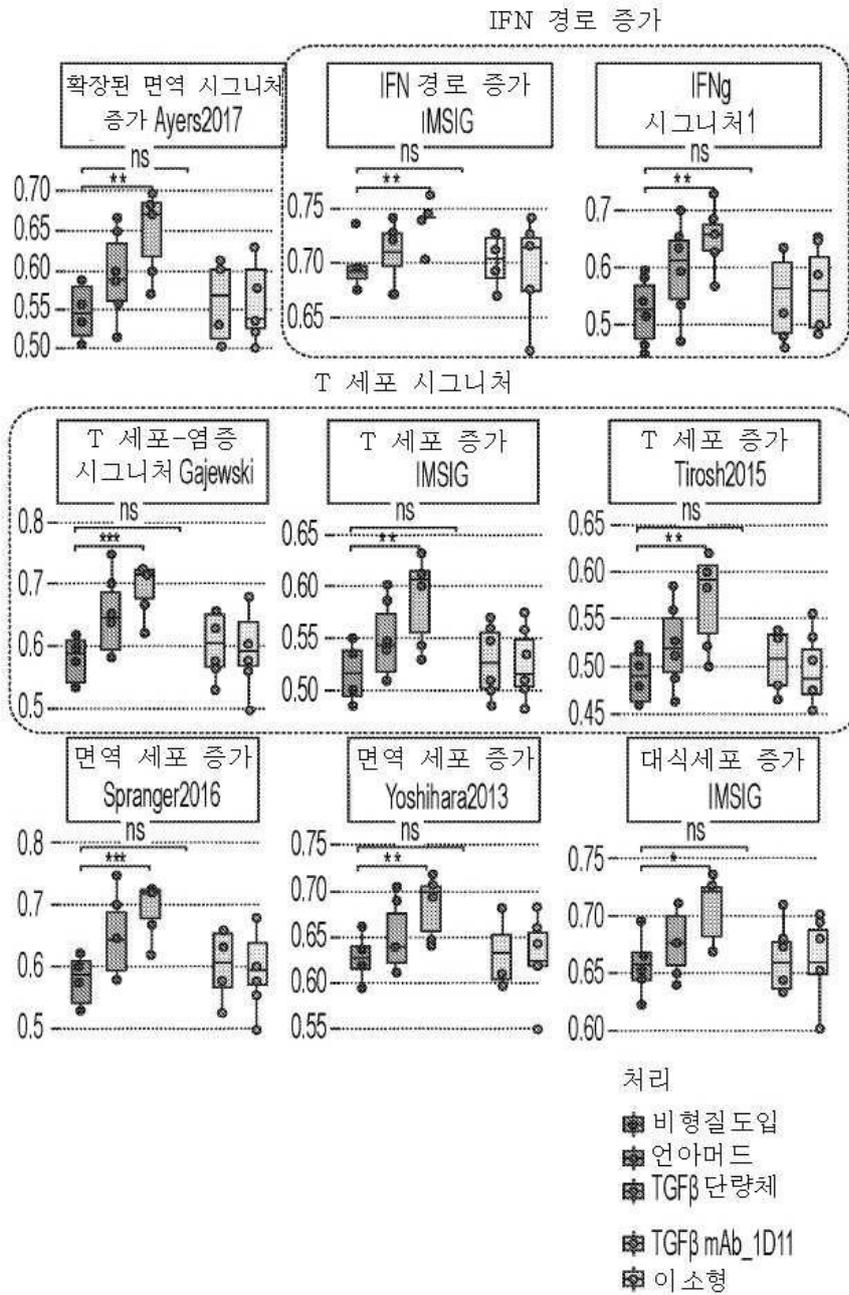
도면13b



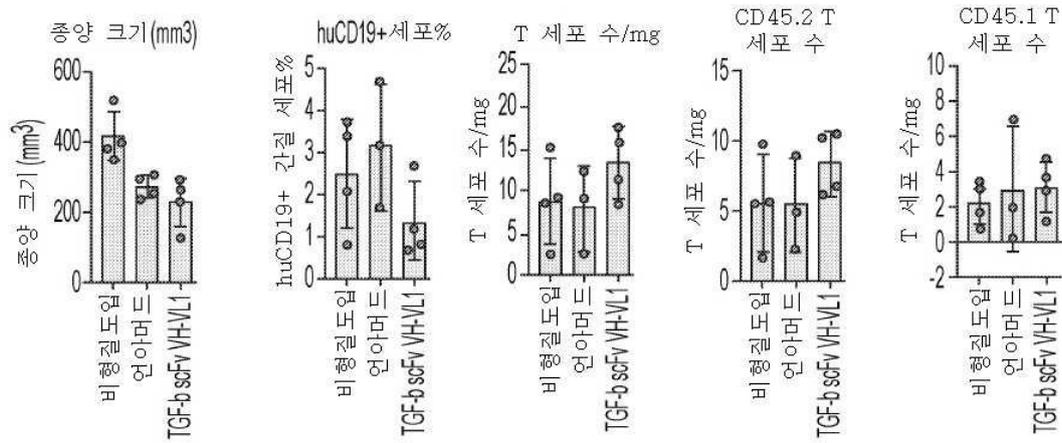
도면14a



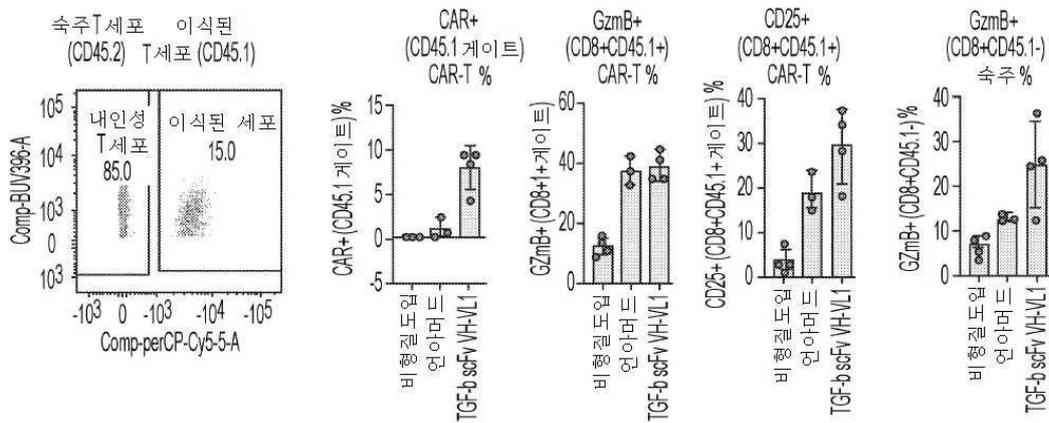
도면14b



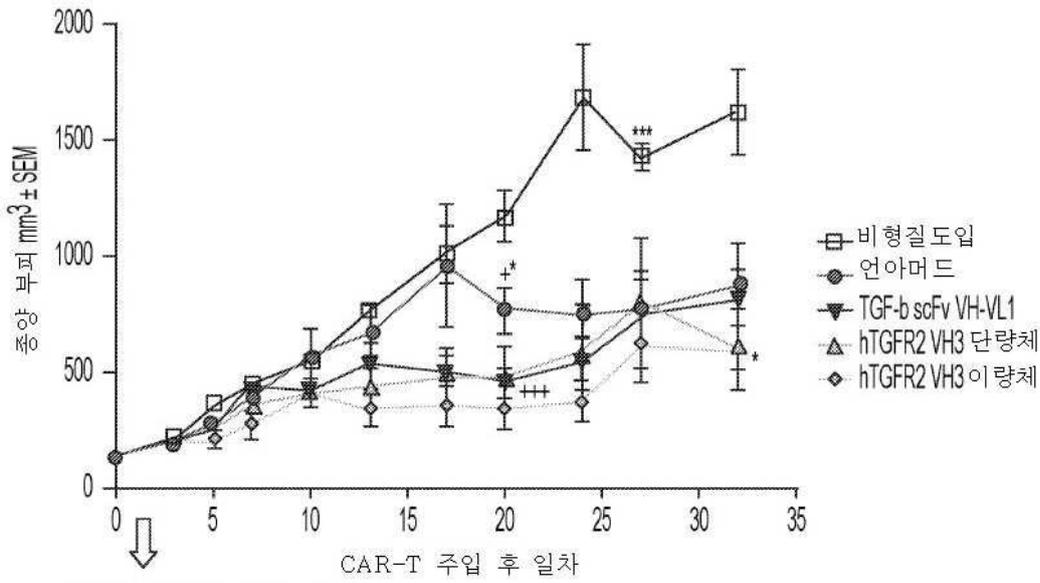
도면15a



도면15b



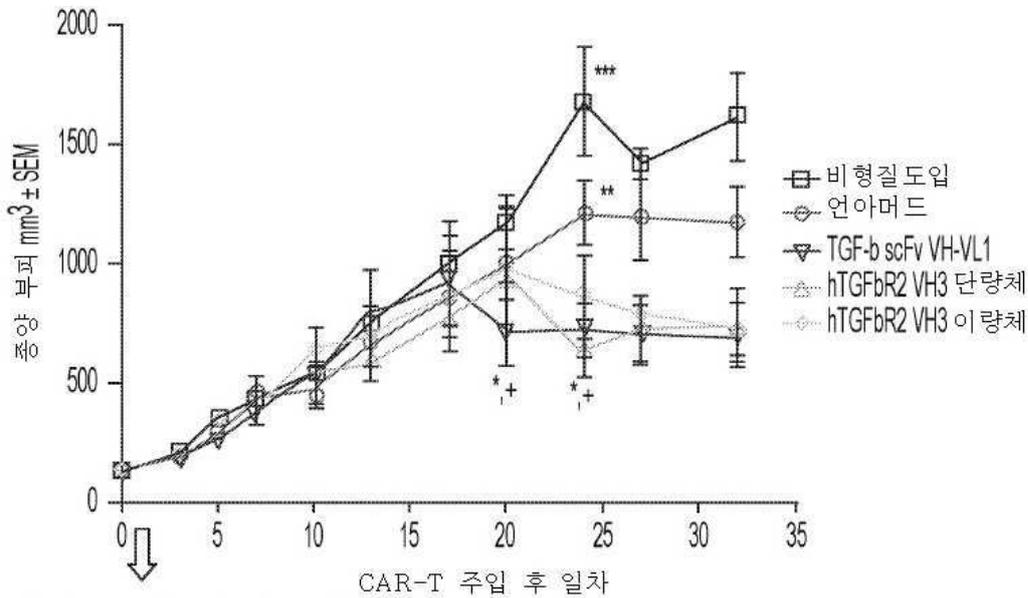
도면16a



CAR-T 세포는 IV로 주사됨
 모든 CAR-T는 26%로 정규화됨; n=6)

- *: 종양 부피로 인해 안락사
- + : 과사성 증양으로 인해 안락사

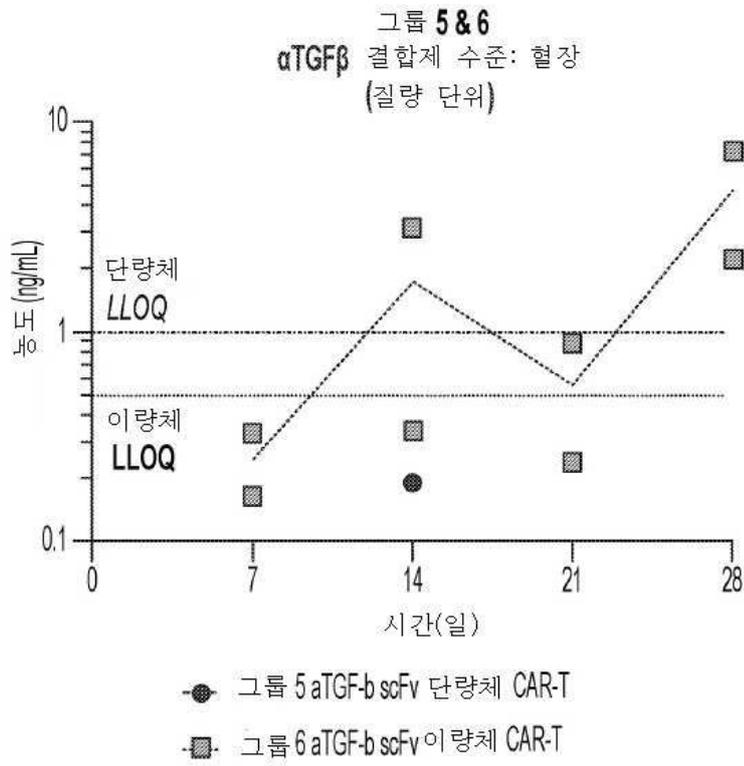
도면16b



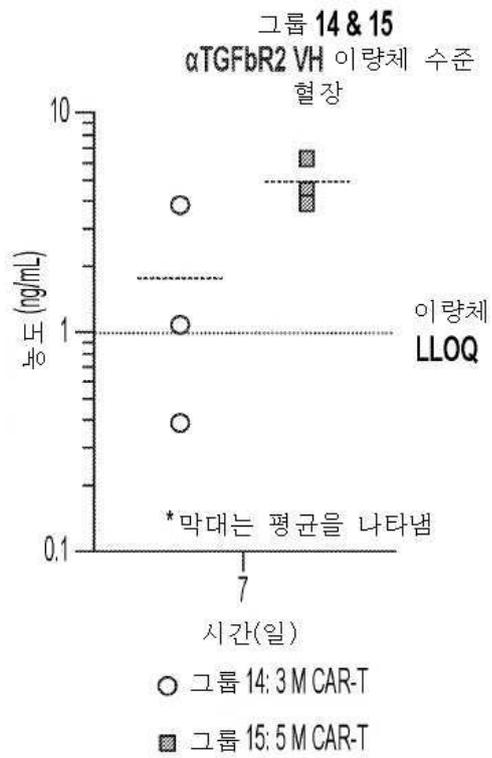
CAR-T 세포는 IV로 주사됨
 모든 CAR-T는 26%로 정규화됨; n=6)

- *: 종양 부피로 인해 안락사
- + : 과사성 증양으로 인해 안락사

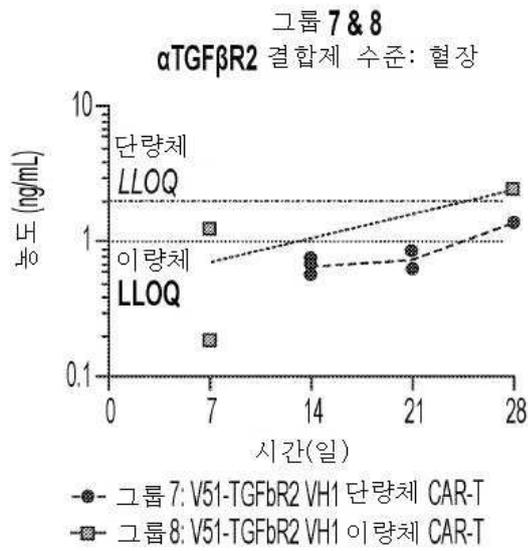
도면17a



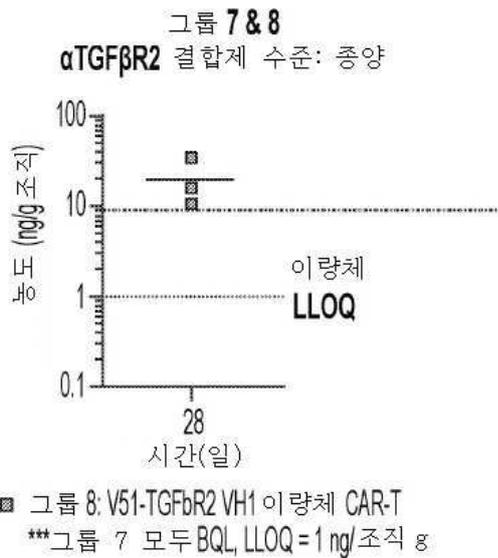
도면17b



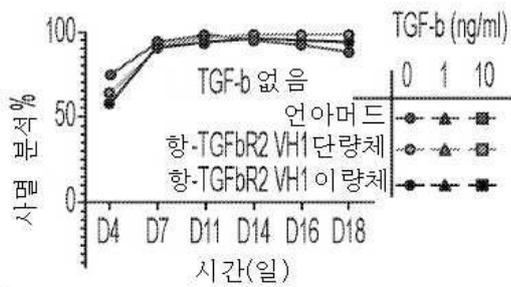
도면17c



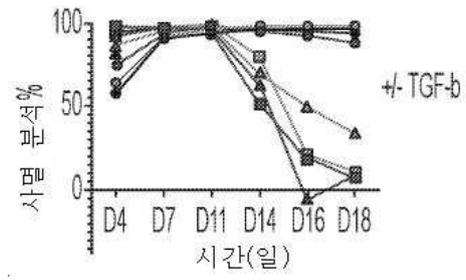
도면17d



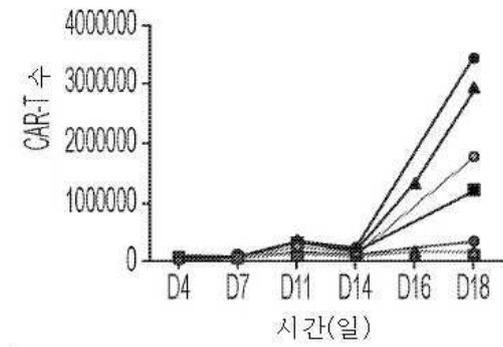
도면18a



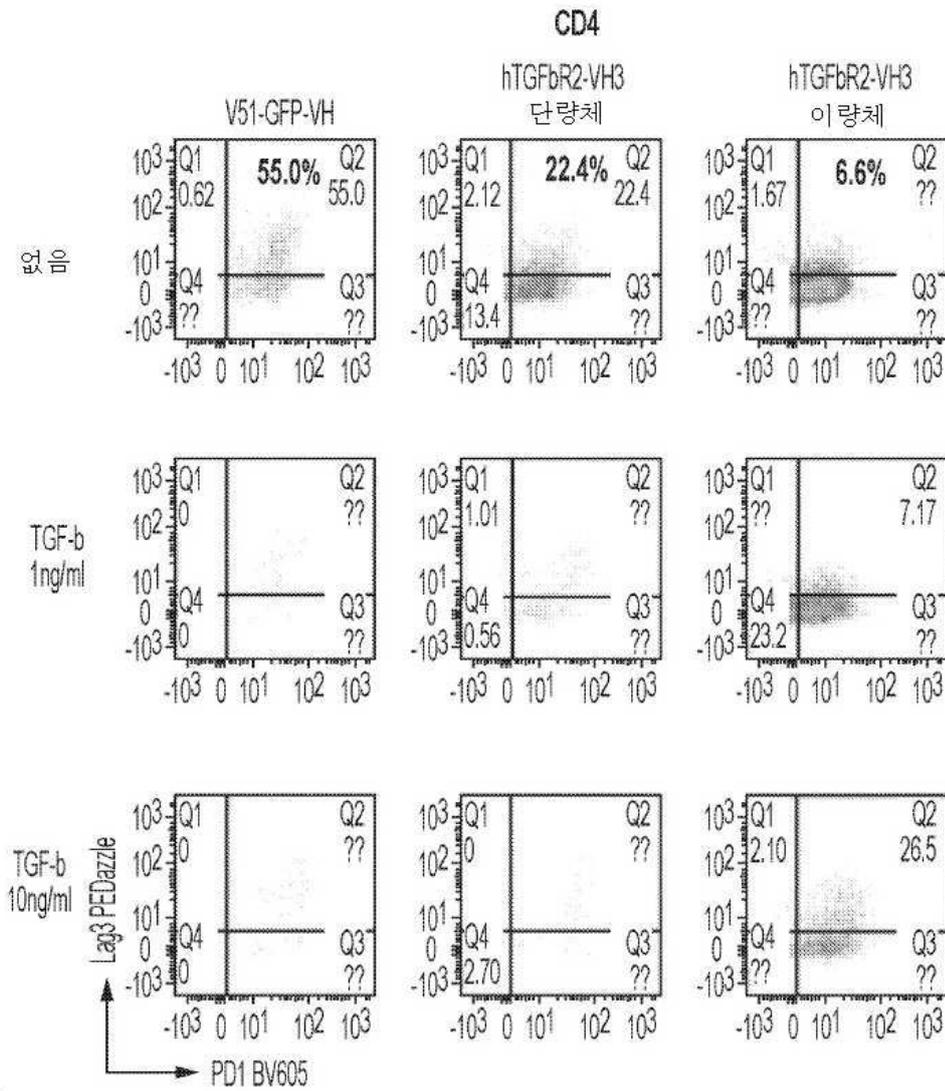
도면18b



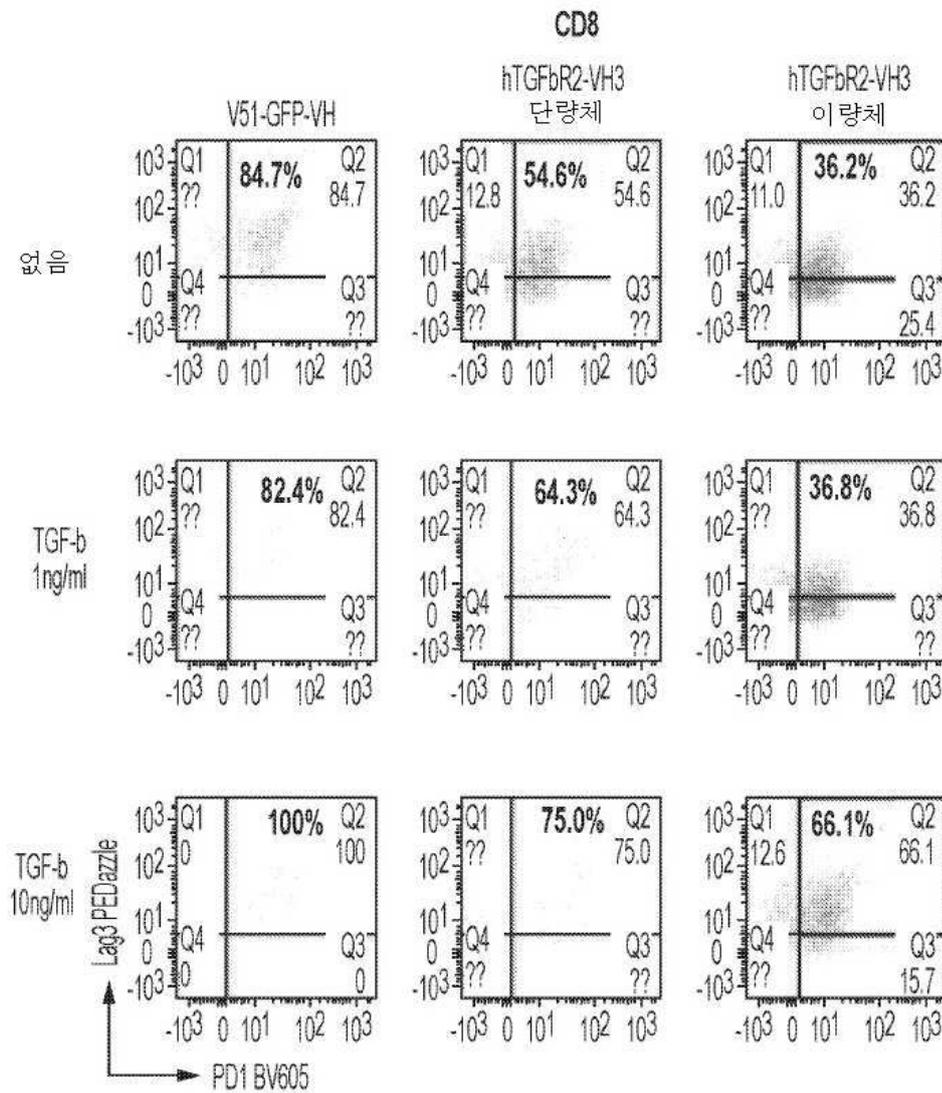
도면18c



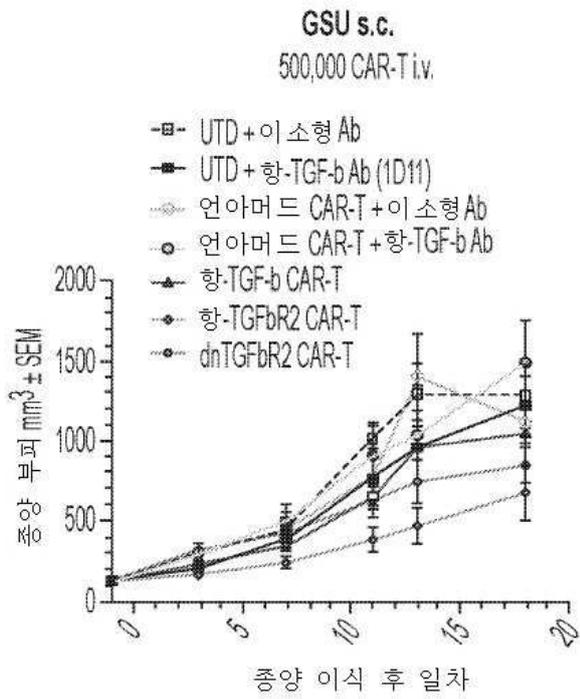
도면 19a



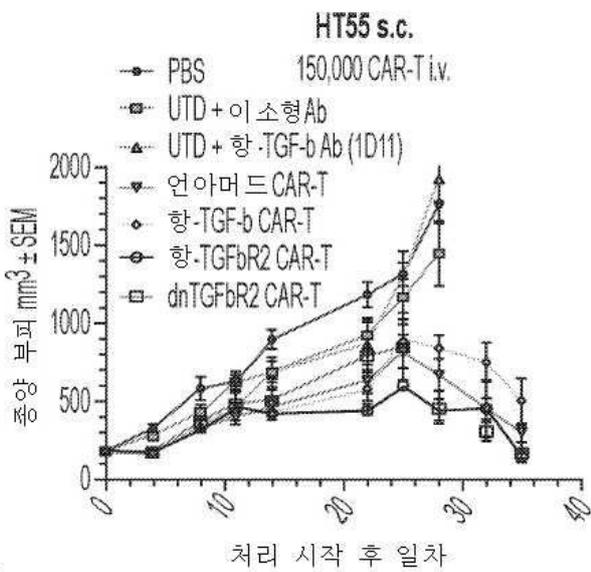
도면19b



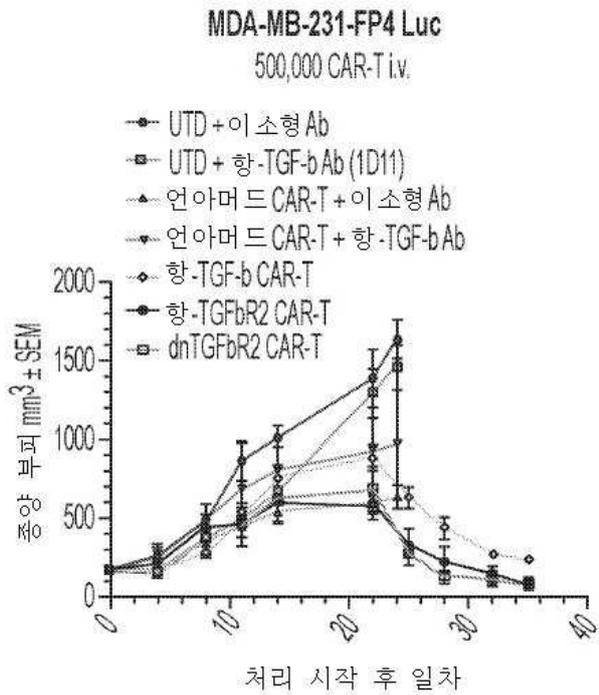
도면20a



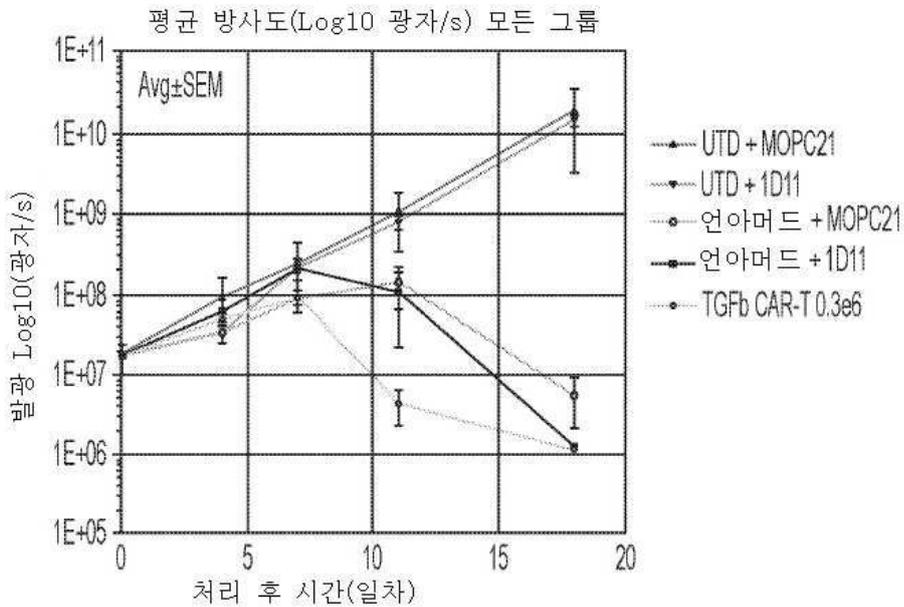
도면20b



도면20c

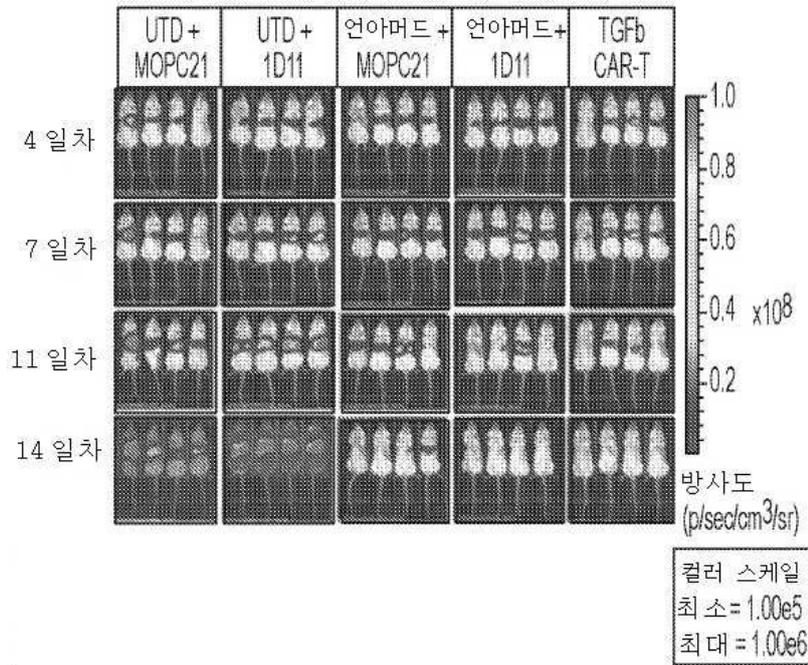


도면21a

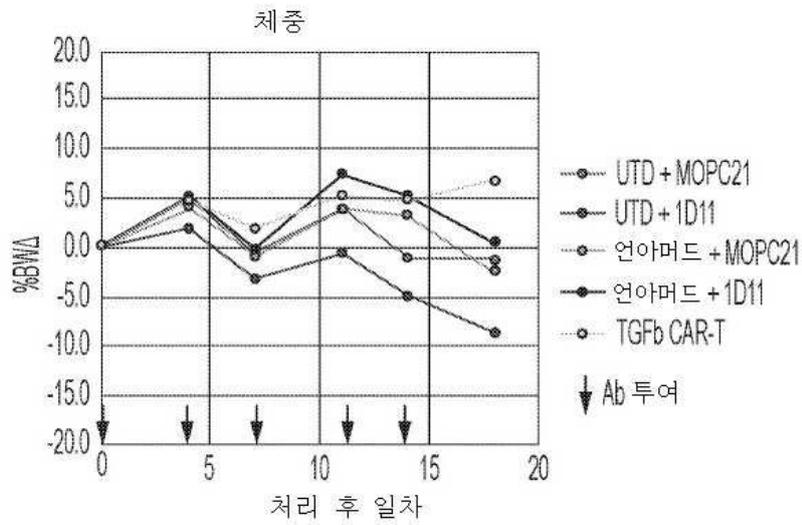


1D11 = aTGF- β (i.p.; 10mg/kg; 주 2 회)
MOPC21 = 이소형 대조군
TGF- β CAR-T 는 항-TGF- β scFv 단량체를 분비함

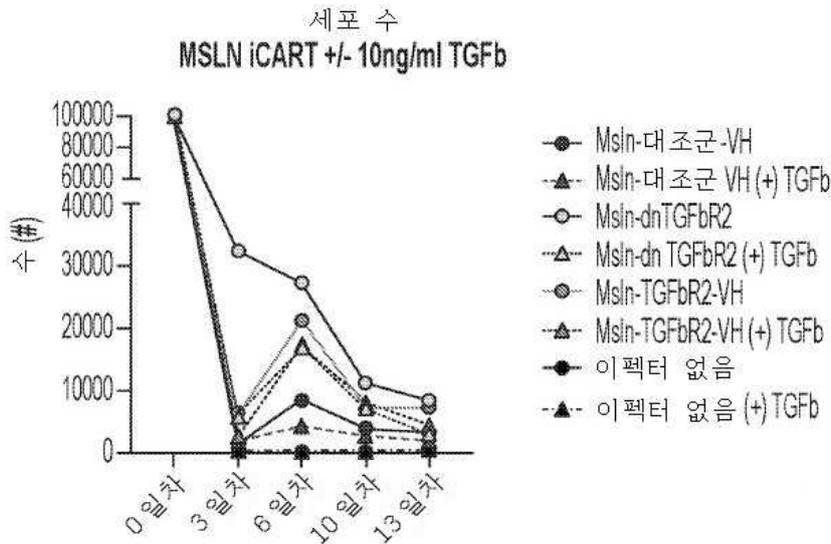
도면21b



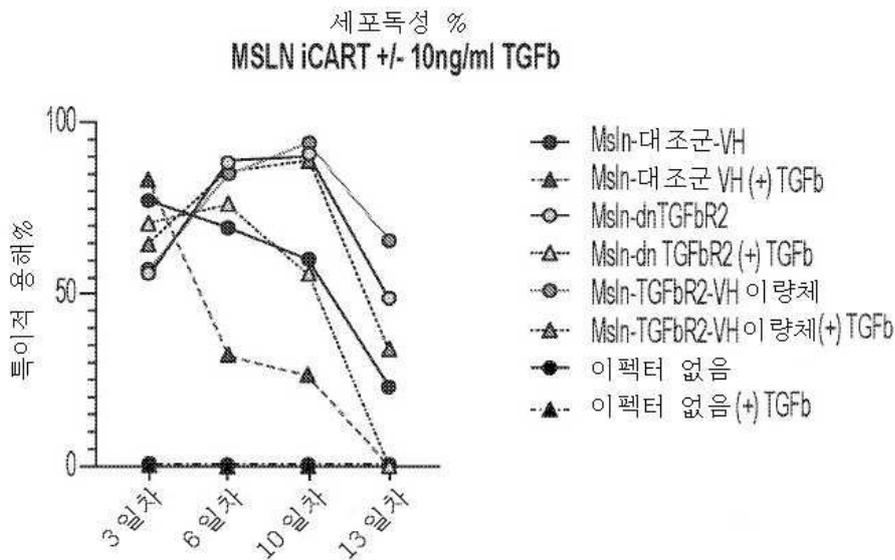
도면21c



도면22a



도면22b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

<120> CELL THERAPY COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING TGF-B SIGNALING

<130> MIL-013W01

<140> PCT/IB2022/000063

<141> 2022-02-15

<150> 63/306,836

<151> 2022-02-04
 <150> 63/149,628
 <151> 2021-02-15
 <160> 65
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn

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

 35 40 45
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe

 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr

 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser

 130 135 140
 Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

145 150 155 160
 Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175
 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg
 180 185 190
 Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

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

<210> 2
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30
 Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 4

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Phe Tyr Tyr Gly Glu Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe

65 70 75 80

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

 85 90 95

Cys Pro Arg Gly Pro Thr Met Ile Arg Gly Val Ile Asp Ser Trp Gly

 100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

 165 170 175

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

180 185 190

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 5

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 5

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

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

Ala Lys Ala Arg His Ile Lys Val Arg Ser Arg Asp Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Trp Ile Glu Lys Thr Gly Asn Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ala Gly Arg His Ile Lys Val Arg Ser Arg Asp Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 8

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 9

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu
 20 25 30

Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 115 120 125

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 130 135 140

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu Gln
 145 150 155 160

Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val Ser
 165 170 175

Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 180 185 190

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 195 200 205

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 210 215 220

Lys Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly
 225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 10

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 10

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

Phe Gly Thr Glu Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

 165 170 175

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

 180 185 190

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

225 230 235

<210> 14

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Lys Gly Leu Glu Phe Val Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr
 290 295 300
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 305 310 315 320
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 325 330 335
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly
 340 345 350
 Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 355 360 365
 <210> 15
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 15
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu
 20 25 30
 Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp

Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 355 360 365
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 370 375
 <210> 16
 <211> 762
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 16
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu
 20 25 30
 Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 115 120 125
 Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 130 135 140
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu Gln

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

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

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

 Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 355 360 365
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly
 370 375 380
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 385 390 395 400

Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala
 405 410 415

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly
 420 425 430

Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 435 440 445

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 450 455 460

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Arg Pro Thr Gly Val
 465 470 475 480

Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 485 490 495

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 500 505 510

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 515 520 525

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu Gln Met Trp Trp
 530 535 540

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val Ser Arg Ile Asp
 545 550 555 560

Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 565 570 575

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 580 585 590

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Arg
 595 600 605

Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 610 615 620

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 625 630 635 640

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

645 650 655
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Glu
 660 665 670

Gln Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 675 680 685

Ser Arg Ile Asp Ser Pro Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 690 695 700

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 705 710 715 720

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 725 730 735

Ala Lys Arg Arg Pro Thr Gly Val Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Tyr Trp
 740 745 750

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 755 760

<210> 17

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 17

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr

Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 325 330 335

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Thr Leu Gly Leu
 340 345 350

Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 355 360 365

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 370 375 380

Ser Ala Leu Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
 385 390 395 400

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu
 405 410 415

Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 420 425 430

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp
 435 440 445

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 450 455 460

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala
 465 470 475 480

Asp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 485 490 495

<210> 18

<211> 500

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 18

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

1 5 10 15

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

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser
 130 135 140

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

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

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser
 260 265 270

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn Val
 275 280 285

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 290 295 300

Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Lys
 305 310 315 320

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr Met
 325 330 335

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 340 345 350

Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 355 360 365

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 370 375 380

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro
 385 390 395 400

Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 405 410 415

Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 420 425 430

Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
 435 440 445

Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 450 455 460

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 465 470 475 480

Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg
 485 490 495

Leu Glu Ile Lys

500

<210> 19

<211> 378

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 19

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn

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

 35 40 45
Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe

 50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

 115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser

 130 135 140
Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

145 150 155 160
Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

 165 170 175
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg

180 185 190
 Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

195 200 205
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr

210 215 220
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 245 250 255
 His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly

260 265 270
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

275 280 285
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 290 295 300

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 305 310 315 320
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

325 330 335
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

340 345 350
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 355 360 365

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370 375

<210> 20

<211> 631

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 20

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser
 130 135 140

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg
 180 185 190

Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 245 250 255

His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 260 265 270

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 275 280 285

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 290 295 300

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 305 310 315 320

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 325 330 335

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 340 345 350

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 355 360 365

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 370 375 380

Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 385 390 395 400

Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 405 410 415

Ser Asn Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 420 425 430

Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln
 435 440 445

Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr
 450 455 460

Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 465 470 475 480

Tyr Cys Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp

485 490 495
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr Val Leu Thr
 515 520 525

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
 530 535 540

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
 545 550 555 560

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser
 565 570 575

Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 580 585 590

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 595 600 605

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln
 610 615 620

Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 625 630

<210> 21

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 290 295 300

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 305 310 315 320

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 325 330 335

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 340 345 350

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360

<210> 22
 <211> 614
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 22

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser
 130 135 140

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg
 180 185 190

Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 260 265 270

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 275 280 285

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 290 295 300

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 305 310 315 320

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 325 330 335

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 340 345 350

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

Thr Arg Leu Glu Ile Lys

610

<210> 23

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 23

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

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

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

130 135 140
 Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 145 150 155 160
 Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 165 170 175

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 180 185 190

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Leu Gln Val Gln Glu Ser Gly
 245 250 255

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
 260 265 270

Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser Tyr Phe Ser Trp Gly Trp Ile Arg
 275 280 285

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Tyr Tyr Gly
 290 295 300

Glu Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ile Ser
 305 310 315 320

Ile Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr
 325 330 335

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Pro Arg Gly Pro Thr Met Ile
 340 345 350

Arg Gly Val Ile Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 355 360 365

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 370 375 380

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 385 390 395 400

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr
 405 410 415

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

420 425 430
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

450 455 460
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

465 470 475 480
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

485 490
 <210> 24

<211> 496
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 24
 Gln Leu Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser

20 25 30
 Tyr Phe Ser Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Phe Tyr Tyr Gly Glu Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe

65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95
 Cys Pro Arg Gly Pro Thr Met Ile Arg Gly Val Ile Asp Ser Trp Gly

100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Val Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

420 425 430

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

435 440 445

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

<210> 25

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Phe Tyr Tyr Gly Glu Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

305 310 315 320
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

 370 375

<210> 26

<211> 627

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 26

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Phe Tyr Tyr Gly Glu Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe

65 70 75 80

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

 85 90 95

Cys Pro Arg Gly Pro Thr Met Ile Arg Gly Val Ile Asp Ser Trp Gly

 100 105 110

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 370 375 380

Gln Leu Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 385 390 395 400

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser
 405 410 415

Tyr Phe Ser Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 420 425 430

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

Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe
 450 455 460

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 465 470 475 480

Cys Pro Arg Gly Pro Thr Met Ile Arg Gly Val Ile Asp Ser Trp Gly
 485 490 495

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 500 505 510

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 515 520 525

Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 530 535 540

Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 545 550 555 560

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 565 570 575

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 580 585 590

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 595 600 605

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

165 170 175
 Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

180 185 190
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

195 200 205
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

210 215 220
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

225 230 235 240
 Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro

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

260 265 270
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

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

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

305 310 315 320
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

325 330 335
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

340 345 350
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

355

<210> 28

<211> 610

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 28

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

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

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

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

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro
 245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 305 310 315 320

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln
 355 360 365

Leu Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 370 375 380

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser Tyr
 385 390 395 400

Phe Ser Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 405 410 415

Ile Gly Ser Phe Tyr Tyr Gly Glu Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 420 425 430

Lys Ser Arg Ala Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser
 435 440 445

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 450 455 460

Pro Arg Gly Pro Thr Met Ile Arg Gly Val Ile Asp Ser Trp Gly Gln
 465 470 475 480

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

485 490 495
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 500 505 510

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
 515 520 525

Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 530 535 540

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly
 545 550 555 560

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 565 570 575

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 580 585 590

Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 595 600 605

Ile Lys
 610

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 29

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Gln Glu
 20 25 30

Ser Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Lys Ser Gly Thr Arg Ile Lys Gln Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Glu Pro Ile Gly His Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Gln Ala Pro Gly Glu Lys Trp Ala Arg Arg Trp Asp Leu Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 31

<211

> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 31

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 162

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 32

Ile Pro Pro His Val Pro Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys
 1 5 10 15

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

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

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

<210> 33

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 33

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val
 1 5 10 15
 Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val
 20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp
 35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr
 50 55 60

Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr
 65 70 75 80

Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Gly Gly Gly Gly
 85 90 95

Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile
 100 105 110

Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe
 115 120 125

Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser
 130 135 140

Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val
 145 150 155 160

Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys
 165 170 175

His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala
 180 185 190

Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe
 195 200 205

Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe
 210 215 220

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 225 230

<210> 34

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 34

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

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

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

<210> 35

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 35

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Glu
1 5 10 15

Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val
 20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp
 35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ala Val Thr Thr
 50 55 60

Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr
65 70 75 80

Thr Gly Pro Phe Ser Glu Lys Gln Ser Ala Gly Leu Gly Pro Val Glu
 85 90 95

Leu Gly Gly Gly Gly Ser Ile Pro Pro His Val Pro Lys Ser Val Asn
 100 105 110

Ser Asp Val Met Ala Ser Asp Asn Gly Gly Ala Val Lys Leu Pro Gln
 115 120 125

Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Leu Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys
 130 135 140

Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ala Ile Cys Glu Lys Pro His
145 150 155 160

Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Lys Asn Ile Thr Leu
 165 170 175

Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Thr Tyr His Gly Phe Thr Leu
 180 185 190

Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Val Met Lys Glu Lys Lys Arg Ala
 195 200 205

Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ala Cys Asn Met Glu Glu Cys Asn Asp
 210 215 220

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

225

230

235

<210> 36

<211> 160

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 36

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Gly Gly Gly Gly Ser Ala Val

65 70 75 80

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

 85 90 95

Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ala Ile Cys

 100 105 110

Glu Lys Pro His Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Lys

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

<210> 37

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 37

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

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Ile Pro Pro His Val Pro Lys Ser Asp Val Glu Met

 20 25 30

Glu Ala Gln Lys Asp Ala Ser Ile His Leu Ser Cys Asn Arg Thr Ile

 35 40 45

His Pro Leu Lys His Phe Asn Ser Asp Val Met Ala Ser Asp Asn Gly

 50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr

 85 90 95

Ala Ile Cys Glu Lys Pro His Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Met Lys Glu Lys Lys Arg Ala Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ala Cys

145 150 155 160

Asn Met Glu Glu Cys Asn Asp Tyr Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Thr

 165 170 175

Thr Ser Ser Pro Asp Leu

 180

<210> 38

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 38

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

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

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

 180 185 190
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 195 200 205

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Pro
 210 215 220

Pro His Val Pro Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Ala
 225 230 235 240

Ser Ile His Leu Ser Cys Asn Arg Thr Ile His Pro Leu Lys His Phe
 245 250 255

Asn Ser Asp Val Met Ala Ser Asp Asn Gly Gly Ala Val Lys Leu Pro
 260 265 270

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Leu Ser Thr Cys Asp Asn Gln
 275 280 285

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ala Ile Cys Glu Lys Pro
 290 295 300

His Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Lys Asn Ile Thr
 305 310 315 320

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Thr Tyr His Gly Phe Thr
 325 330 335

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Val Met Lys Glu Lys Lys Arg
 340 345 350

Ala Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ala Cys Asn Met Glu Glu Cys Asn
 355 360 365

Asp Tyr Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Thr Thr Ser Ser Pro Asp Leu
 370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 385 390 395

<210> 39
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 39

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

245 250 255
 Asn Ser Asp Val Met Ala Ser Asp Asn Gly Gly Ala Val Lys Leu Pro
 260 265 270

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

275 280 285
 Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ala Ile Cys Glu Lys Pro
 290 295 300

His Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Lys Asn Ile Thr
 305 310 315 320

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Thr Tyr His Gly Phe Thr
 325 330 335

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Val Met Lys Glu Lys Lys Arg

340 345 350
 Ala Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ala Cys Asn Met Glu Glu Cys Asn
 355 360 365

Asp Tyr Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Thr Thr Ser Ser Pro Asp Leu
 370 375 380

<210> 40

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val
 1 5 10 15

Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val
 20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp
 35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr
 50 55 60

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

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 43

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

50 55 60

Trp Val

65

<210> 44

<211> 41

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown: CD28 signal domain sequence"

<400> 44

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

35 40

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <400> 45
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 46
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <400> 46
 Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
 20 25 30
 Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

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

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

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

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

 245 250 255

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 260 265 270

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 275 280 285

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 290 295 300

Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu
 305 310 315 320

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 325 330 335

Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His
 340 345 350

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 355

<210> 48

<211> 353

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 48

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

325 330 335
 Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 340 345 350

Arg

<210> 49

<211> 526

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 49

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala

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

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

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

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

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

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

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

 385 390 395 400

Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val
 405 410 415

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 420 425 430

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 435 440 445

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 450 455 460

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 465 470 475 480

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 485 490 495

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 500 505 510

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 515 520 525

<210> 50
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 50

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

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

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

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

 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
 305 310 315 320
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
 325 330 335
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
 340 345 350
 Ala Leu Pro Pro Arg
 355
 <210> 52
 <211> 363
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221

> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 52

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

20 25 30

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

35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro

65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln

85 90 95

Phe Ser Leu Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp

115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala

130 135 140

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
 210 215 220
 Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
 225 230 235 240
 Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
 245 250 255
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 260 265 270
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 275 280 285
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 290 295 300
 Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 305 310 315 320
 Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 325 330 335
 His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
 340 345 350
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 355 360
 <210> 53
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223>
 /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 53
 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
 130 135 140
 Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
 145 150 155 160
 Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
 165 170 175
 Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
 195 200 205
 Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 210 215 220
 Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 225 230 235 240
 Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 245 250 255
 Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 260 265 270
 Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro

100 105 110
 Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
 130 135 140

His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
 145 150 155 160

Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
 165 170 175

Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
 180 185 190

Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
 195 200 205

Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
 210 215 220

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 225 230 235 240

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 245 250 255

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 260 265 270

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu
 275 280 285

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 290 295 300

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser
 305 310 315 320

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 325 330 335

Pro Arg

<210> 55
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <400> 55
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

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

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

 145 150 155 160
 Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
 165 170 175
 Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
 180 185 190

Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
 195 200 205
 Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
 210 215 220
 Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 225 230 235 240
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 245 250 255
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 260 265 270
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu
 275 280 285
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 290 295 300
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser
 305 310 315 320
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 325 330 335
 Pro Arg

<210> 56

<211> 338

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 56

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
 130 135 140

His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
 145 150 155 160

Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
 165 170 175

Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
 180 185 190

Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
 195 200 205

Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
 210 215 220

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 225 230 235 240

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 245 250 255

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 260 265 270

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

115 120 125
 Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys

130 135 140
 His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
 145 150 155 160

Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
 165 170 175

Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
 180 185 190

Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr

195 200 205
 Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr

210 215 220
 Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln

225 230 235 240
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu

245 250 255
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly

260 265 270
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu

275 280 285
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly

290 295 300
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser

305 310 315 320
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro

325 330 335
 Pro Arg

<210> 58

<211> 22

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 61

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

1 5 10 15

<210> 62

<211> 481

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala

35 40 45

Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr

65 70 75 80

Asn Gly Lys Phe Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala

100 105 110

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

115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu

145 150 155 160

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

 165 170 175

Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp

 180 185 190

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

 195 200 205

Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser

 210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly

 245 250 255

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ile Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro

 260 265 270

Tyr Leu Asp Asn Glu Arg Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu

 275 280 285

Lys His Leu Cys His Thr Gln Ser Ser Pro Lys Leu Phe Trp Ala Leu

 290 295 300

Val Val Val Ala Gly Val Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Leu Val Thr Val

305 310 315 320

Ala Leu Cys Val Ile Trp Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln

 325 330 335

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

 340 345 350

Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Pro

 355 360 365

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

 370 375 380

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

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 340 345 350

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 355 360 365

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 370 375 380

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 385 390 395 400

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

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
 420 425 430

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
 435 440 445

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
 450 455 460

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
 465 470 475 480

Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 64

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<220><221> SITE

<222> (1)..(50)

<223> /note="This sequence may encompass 1-10 'Gly Gly Gly Gly Ser'
 repeating units"

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ser

50

<210> 65

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

35 40