



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2022-0160023  
(43) 공개일자 2022년12월05일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>C07K 14/705</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)<br/><i>A61P 37/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>C07K 14/70503</i> (2013.01)<br/><i>A61K 39/0008</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7035946</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년03월26일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년10월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/057949</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/191426<br/>국제공개일자 2021년09월30일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>20166161.8 2020년03월27일<br/>유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인<br/><b>바이오테스트 아게</b><br/>독일 데-63303 드라이이흐 란트스타이네르슈트라 세 5</p> <p>(72) 발명자<br/><b>키스트너, 스테펜</b><br/>독일 60599 프랑크푸르트/메인 운테르스테르 쾰레 르즈weg 50</p> <p><b>다우펜바흐, 젠스</b><br/>독일 55120 마인츠 크레우즈스트라세 41<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/><b>파도특허법인유한회사</b></p> |
|--|---|

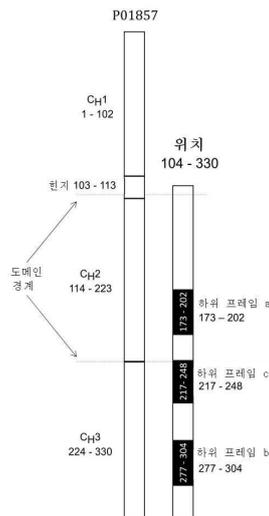
전체 청구항 수 : 총 19 항

**(54) 발명의 명칭 조절성 T 세포를 활성화하는 하나 이상의 에피토프를 포함하는 단백질**

**(57) 요약**

본 발명은 면역학 분야, 특히 면역 반응의 조절 분야, 특히 면역 반응의 억제 및/또는 관용 유도 분야에 관한 것이다. 본 발명은 인간 IgG의 Fc 부위로부터 유래한 서열에 기반한 폴리펩타이드를 포함하는 트레지토프 (조절성 T 세포 활성화 에피토프)를 제공하며, TCP는 특정한 서열 프레임 하나 이상의 위치한 인간 IgG에 이종적인 트레지토프 하나 이상을 포함한다. 본 발명은 다양한 목적을 위한, 예를 들어, 선택적으로 물질, 예를 들어 면역 반응을 조절 또는 억제하고자 하는 대상 물질에 연결되거나 또는 이러한 물질과 공동-투여되는, 단량체 또는 이량체 형태의, 또는 단독 치료제로서 사용하기 위한, 폴리펩타이드를 제공한다. 본 발명의 TCP를 암호화하는 핵산, 약학적 조성물 및 TCP의 용도 역시 제공한다.

**대표도 - 도2**



(52) CPC특허분류

**A61P 37/00** (2018.01)  
*A61K 2039/6056* (2013.01)  
*C07K 2317/52* (2013.01)  
*C07K 2319/00* (2013.01)

(72) 발명자

**운게레르, 크리스토퍼**  
독일 63225 랑겐 펠드버그스트라세 10  
**헤르메너, 피터**  
독일 35274 키츠하인 부츠핀켄weg 5

**월메이에르, 홀저**

독일 65843 슐츠바흐 소쎌헤이머 웨그 13

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프 (tregitope)를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)로서, 상기 TCP가 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,

(a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

(b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

(c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

상기 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는, TCP.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이종적인 트레지토프는 서열번호 1에 대한 서열 동일성이 적어도 85%인 아미노산 서열에서 동일한 위치에서 동일하게 생성된 것이 아닌, TCP.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

이종적인 트레지토프를 적어도 2개, 바람직하게는 적어도 3개 또는 4개 포함하며,

선택적으로, 제1 이종적인 트레지토프가 프레임 A, B 또는 C 중 하나에 위치하고, 적어도 제2 트레지토프가 프레임 A, B 또는 C 중 다른 프레임에 또는 서열번호 1의 135-330번 아미노산에 대한 서열 동일성이 적어도 85%인 아미노산 서열의 C-말단에 위치하는, TCP.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열 프레임 A가 이종적인 트레지토프를 포함하지 않을 경우, 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 대한 서열 동일성이 적어도 85%이고, 및

(b) 서열 프레임 B가 이종적인 트레지토프를 포함하지 않을 경우, 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 대한 서열 동일성이 적어도 85%이고, 및

(c) 서열 프레임 C가 이종적인 트레지토프를 포함하지 않을 경우, 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 대한 서열 동일성이 적어도 85%인, TCP.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이종적인 트레지토프 하나 이상이 프레임 A, B 또는 C 중 어느 하나에서 트레지토프와 길이가 동일하거나 또는 아미노산 1 또는 2개가 짧거나 또는 긴 길이의 서열을 치환하는, TCP.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이종적인 트레지토프 하나 이상이

서열번호 10 (Treg289),

서열번호 7 (Treg084),  
 서열번호 2 (Treg009A),  
 서열번호 9 (Treg088x),  
 서열번호 8 (Treg134),  
 서열번호 3 (Treg029B),  
 서열번호 4 (Treg088),  
 서열번호 5 (Treg167),  
 서열번호 6 (Treg289n - 천연),  
 서열번호 11 (trimmed Treg009A),  
 서열번호 12 (trimmed Treg029B - v1),  
 서열번호 13 (trimmed Treg029B - v2),  
 서열번호 14 (trimmed Treg088),  
 서열번호 15 (trimmed Treg088x - v1),  
 서열번호 16 (trimmed Treg088x - v2),  
 서열번호 17 (trimmed Treg167),  
 서열번호 18 (trimmed Treg289n),  
 서열번호 19 (trimmed Treg289),  
 서열번호 20 (trimmed Treg084), 및  
 서열번호 21 (trimmed Treg134)로 이루어진 군으로부터 선택되고,  
 바람직하게는, 트레지토프들 모두 상기 군으로부터 선택되는, TCP.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 TCP가 하기 TPC들로 이루어진 군으로부터 선택되는, TCP:

(I) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:

(a) 프레임 A에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프,

(b) 프레임 B에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프,

(c) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및

(d) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 서열에 연결된, 서열번호 9에 따른 트레지토프 (Treg088x);

(II) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:

(a) 프레임 B에 위치한 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프; 및

(b) 프레임 C에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프,

(III) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:

(a) 프레임 B에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프; 및

(b) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위

치한, 선택적으로 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된, 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프;

(IV) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:

(a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프,

(b) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및

(c) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된, 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프;

(V) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:

(a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프,

(b) 프레임 B에 위치한 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프, 및

(c) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프.

(VI) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:

(a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프,

(b) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및

(c) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된, 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프; 및

(VII) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:

(a) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및

(b) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된, 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 TCP가 선택적으로 서열번호 23-44, 46-58 및 111로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 선택적으로 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는, TCP.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 TCP가 아미노산 195-350개로 구성되고,

상기 TCP가 선택적으로 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열로 필수적으로 구성되고, TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하며,

(a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

(b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

(c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않으며,

선택적으로, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 서열에 연결될 수 있는 하나의 추가적인 트레지토프를 포함하는, TCP.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 TCP가 항체의 VH 도메인 및 CH1 도메인, 바람직하게는, 항체의 항원-결합 부분을 추가로 포함하는, TCP.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 TCP가 TCP 단량체 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상 또는 더 많은 개수로 포함하는 다량체, 바람직하게는, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 TCP 단량체를 2개 이상 포함하는 이량체를 형성하고, 선택적으로 상기 TCP 단량체가 하나 이상의 이황화 결합에 의해 공유 연결된, TCP.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 TCP가 (a) 알레르겐, (b) 과민증 유발 물질, (c) 자가면역 반응의 표적 단백질, 예를 들어, 자가항체의 표적 단백질, (d) 자가면역 반응의 표적 에피토프, 또는 (e) 치료학적 물질을 포함하는 군으로부터 선택되는 물질에 공유 또는 비-공유적으로 연결되고, 선택적으로, 상기 TCP와 상기 물질이 융합 단백질을 형성하는, TCP.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 TCP를 암호화하는 핵산으로서, 상기 핵산이 선택적으로 진핵생물 숙주 세포에서 TCP를 발현하기에 적합한 발현 벡터인, 핵산.

**청구항 14**

제13항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

**청구항 15**

하기 단계를 포함하는, 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)의 제조 방법:

- (a) 제14항에 따른 숙주 세포를 TCP를 발현하는데 적합한 조건에서 배양하는 단계;
- (b) 단계 (a)에서 발현된 TCP를 포함하는 세포 또는 배지를 회수하는 단계;
- (c) TCP를 단리하는 단계;
- (d) 선택적으로, 단계 (c)의 TCP를 약제학적으로 허용가능한 조성물로 제형화하는 단계.

**청구항 16**

제13항에 따른 핵산을 포함하는, 형질전환 동물, 바람직하게는 인간을 제외한 동물.

**청구항 17**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 TCP, 제13항에 따른 핵산 또는 제14항에 따른 숙주 세포, 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제를 포함하는, 약학적 조성물.

**청구항 18**

제15항에 있어서,

면역 반응을 조절하는데 이용하기 위한, 바람직하게는 개체에서 면역 반응을 억제하거나 또는 관용을 유도하기 위한 것이며, 선택적으로, 상기 면역 반응이 TCP와 예를 들어 공유 연결된 형태로 공동-투여되는 물질에 대한 면역 반응인, 약학적 조성물.

**청구항 19**

제17항에 있어서,

개체에서 자가면역 관련 장애, 알레르기, 바이러스 감염 또는 이식-관련 면역 반응 또는 장애를 치료 또는 예방하는데 이용하기 위한 것이거나, 바람직하게는 자가면역 장애를 치료하는데 이용하기 위한 것인, 약학적

조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 면역학 분야, 특히 면역 반응의 조절 분야, 특히 면역 반응의 억제 및/또는 관용의 유도 분야에 관한 것이다. 본 발명은 인간 IgG의 Fc 부분으로부터 유래한 서열에 기반한 폴리펩타이드를 포함하는 트레지토프 (조절성 T 세포를 활성화하는 에피토프)를 제공하며, TCP는 특이적인 서열 프레임 3종 중 하나 이상에 위치한 인간 IgG에 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 포함한다. 본 발명은 이러한 폴리펩타이드를 여러가지 목적으로, 예를 들어, 면역 반응을 조절 또는 억제하기 위한 물질에 선택적으로 연결되거나 또는 이러한 물질과 공동-투여되는, 단량체 형태 또는 이량체 형태, 또는 단독 치료제로서 사용하기 위해 제공한다. 본 발명의 TCP를 암호화하는 핵산, 약학적 조성물 및 TCP의 용도 역시 제공한다.

### 배경 기술

[0002] 조절성 T 세포를 활성화하는 에피토프 (트레지토프)는 조절성 T 세포를 활성화할 수 있는 인간 및 영장류 타입 G 면역글로불린 (IgG)의 불변부에서 처음에 발견된 펩타이드이다 (L. Cousens, et al., Hum. Immunol. 75, 1139-1146 (2014); Y. Su, R. Rossi, et al. J. Leukoc. Biol. 94, 377-383 (2013); L. Cousens, et al., J. Clin. Immunol. 33 (Suppl 1), S43-S49 (2013)). 트레지토프는 복수의 HLA 클래스 II 분자에 결합하는 컨센서스 영역을 탐색하는 인간 Ig 분자에 대한 컴퓨터 에피토프 맵핑을 통해 동정되었다 (R. Caspi, Blood 112:3003-3004 (2008)). 트레지토프의 체시는 인간 백혈구 항원 (HLA)-한정적이며, 트레지토프는 멀티플 HLA에 의해 체시된다. 트레지토프는 선택적으로 결합해, 염증 억제를 유발하는 기-존재하는 천연 조절성 T 세포를 활성화하는 것으로 기술되어 있다 (De Groot et al. Blood 112(8):3303-3311 (2008)).

[0003] 트레지토프는 HLA에 결합하여 조절성 T 세포를 활성화하는 짧은 (일반적으로 아미노산 15-20개 길이의) 선형 펩타이드 서열이다. 트레지토프 서열은 유사한 자가 단백질들에 높은 수준으로 보존되어 있다. 동정된 거의 모든 트레지토프이 단일한 9-mer 서열을 가지는데, 이는 EpiMatrix 에피토프 예측 알고리즘 (WO 2008/094538A2)에 의해 4종 이상의 다른 HLA DR 대립유전자들에 결합하는 것으로 예측될 수 있다. 이러한 동정된 트레지토프는 인간 집단에서 널리 인지될 가능성이 높다. 트레지토프에 반응하는 T 세포는 T 조절 표현형 (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>)을 나타낸다.

[0004] 최근 트레지토프의 면역억제 및 면역조절 효과가 Maddur et al. Trend in Immunology 38(11): 789-792 (2017)에서 검토되었으며, 조절성 T 세포에 대한 트레지토프의 활성화 효과가 언급되었다 (L. Cousens, et al., Hum. Immunol. 75, 1139-1146 (2014); Su et al. J. Leukoc. Biol. 94, 377-383 (2013); L. Cousens, et al., J. Clin. Immunol. 33 (Suppl 1), S43-S49 (2013)). 최근 간행물에서, 트레지토프는 알레르기 (De Groot et al., Blood 112(8): 3303-3311 (2008)), 염증성 대장염 (Van der Marel et al. World J Gastroenterol. 18(32): 4288-4299 (2012)), 1형 당뇨병 (Su et al. J. Leukoc. Biol. 94, 377-383 (2013), Cousens et al. Journal of Diabetes Research, Volume 2013, Article ID 621693 (2013)), 다발성 경화증 (Elyaman et al., Neurology Research International, Volume 2011, Article ID :256460 (2011)) 및 관용 유도 (Cousens, et al., Hum. Immunol. 75, 1139-1146 (2014))를 치료하는데 적합한 것으로 발표되었다.

[0005] WO 2008/094538 A2는 수종의 특이적인 트레지토프들과, 알레르기, 이식, 자가면역, 당뇨병, B형 간염 감염, 진신성 홍반성 루푸스, 그레이브병 및 자가면역 갑상선염에서의 이의 용도를 개시하였다. 트레지토프는 예를 들어 부적절한 면역 반응을 보이는 병태에 대한 치료 수단으로서 이용될 수 있다.

[0006] WO 2006/036834 A2는 루프 영역에 약리학적 활성 펩타이드를 함유한, 인간 IgG Fc 도메인을 가진 분자를 개시하였다.

[0007] 지금까지, 트레지토프의 유익한 특성을 이용하기 어려웠다. 트레지토프 또는 이를 함유한 단백질은 생산하기 어렵기로 악명이 높다. 따라서, 트레지토프 또는 이를 함유한 단백질을 쉽게 제조하기 위한 수단 및 방법에 대한 강력한 개발 요구가 존재한다.

[0008] 일반적으로, 트레지토프는 펩타이드 합성 또는 재조합 생산을 통해 제공될 수 있다. 그러나, 화학적 펩타이드 합성은 필요한 펩타이드의 양적 측면에서 만족스럽지 못하다. 아울러, 단독 복용한 트레지토프는, 예를 들어, 순환계에서의 짧은 펩타이드 반감기로 인해, 치료학적 투여용으로 충분히 적합한 것은 아니다. 인지하는 한, 2

중 이상의 트레지토프를 다른 단백질에 병합 또는 융합하여 발현시키고자 하는 모든 시도들은 충분한 성공을 거두지 못하였다. Cousens 등 (자자면역 및 염증성 질환에서 관용 유도를 위한 트레지토프 펩타이드의 알부민 전달, AAPS May 2014)은 여러가지 트레지토프에 인간 혈청 알부민이 연결된 융합 단백질들을 조사하였으며, 트레지토프 2개 및 4개를 함유한 단백질을 상세히 분석하였다. 말단에 트레지토프 4개가 융합된 버전이 상당한 분해 산물이 생성되고 정제하기 어려운 것으로 기술되어 있다.

[0009] 아울러, 표적-특이적인 면역학적 관용을 전달하기 위해, 트레지토프를 잠재적인 면역원성 단백질 또는 펩타이드에 통합하여, 재조합 생산이 타당할 수 있도록 하는 것이 바람직하다.

[0010] 여전히, 트레지토프 또는 트레지토프를 함유한 단백질을 재조합에 의해 생산하기 어렵다. 박테리아 발현 시스템 (*E. coli*)에 의한 트레지토프 생산이 시도되었지만, 인지하는 한 이러한 모든 시도들은, 아마도 펩타이드의 높은 소수성으로 인해 실패하였다. 진핵 생물 시스템에서의 트레지토프 발현 역시 비슷한 문제에 직면하였다. 발현을 개선하기 위해 트레지토프를 알부민 및 기타 단백질과 융합하고자 하는 접근 방법도 시도되었다. 재차, 인지하는 한, 이러한 방법들 역시 만족할만한 성과를 거두지 못하였다. 트레지토프를 화학적 합성 (예, FMOC)에 의해 생산하는 것이 가능성에도 불구하고, 트레지토프를 합리적인 비용으로 대량 생산하거나 또는 재조합 방법에 의해 트레지토프를 융합 단백질 형태로 일상적으로 발현시키는 것은 여전히 어려운 과제로 남아있다.

[0011] 이에, 당해 기술 분야에서는 트레지토프를 효율적으로 생산할 수 있는, 특히 효율적인 발현 시스템을 가능하게 할 수 있는 접근 방식이, 예를 들어 표적-특이적인 면역학적 관용을 전달하기 위해 하나 이상의 트레지토프를 표적 단백질 연결하는 방식이, 절실히 요구되고 있다. 또한, 치료학적 잠재성을 이용하기 위해 개체에 트레지토프를 투여 가능하게 할 수 있는 방법 역시 절실히 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0012] 이러한 문제들은 본원에 기술된 바와 같이, 예를 들어, 청구항의 내용에 의해 해결된다.

**과제의 해결 수단**

[0013] 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)

[0014] 제1 구현예에서, 본 발명은 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,

[0015] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0016] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0017] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0018] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 서열번호 1은 인간 IgG1의 중쇄 서열의 불변부이다 (아래에서 추가로 상세히 기술됨). 이에, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들은 인간 IgG의 CH2 도메인 및 CH3 도메인 영역을 포함하며, 특히 C144번 위치에 이황화 결합을 포함한다. 본 발명의 TCP는 따라서 전형적으로 인간 IgG의 Fc-부분으로부터 유래한 서열을 포함한다.

[0019] 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 1의 114-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,

[0020] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0021] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0022] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0023] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 선택적으로, TCP는 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 추가로 포함한다.

[0024] 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 1의 104-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 추가로 포함한다.

노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,

[0025] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0026] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0027] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0028] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 선택적으로, TCP는 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 추가로 포함한다. 선택적으로, TCP는 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 추가로 포함한다.

[0029] 본 발명을 통해 새로운 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (약칭 "TCP")가 개발되었으며, 이로써 특히 여러가지 목적 및 용도 측면에서 효율적이고 유연한 방식으로 트레지토프 ("조절성 T 세포를 활성화하는 에피토프"로도 동일하게 지칭됨)를 발현 및 투여할 수 있게 되었다.

[0030] 본 발명은, 트레지토프를 (예, 서열번호 1에 기술된) 면역글로불린 Fc-부분의 체인(들)에 병합하면, 놀랍게도 트레지토프를 잘 발현시킬 수 있다는 예상치 못한 발견 결과를 토대로 한다. 아울러, 트레지토프에 대한 백본 또는 담체 분자로서 Fc-부분을 이용함으로써 트레지토프 2 이상의 병합과 성공적인 발현이 가능해지며, 따라서 매우 효율적인 발현 및/또는 전달 도구를 제공할 수 있다.

[0031] 아울러, 본 발명자들은, 트레지토프의 특히 효율적인 발현을 가능하게 해주는, 이러한 Fc-부분의 특히 유익한 프레임들을 동정하였다. 이들 프레임은 복수의 트레지토프 변이체 및 이들의 조합을 병합할 수 있는 모듈식 설계를 제공해주며, 따라서 선택 제품을 설계하는데 엄청난 융통성을 제공해준다.

[0032] 본 발명의 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드는 또한 약제학적 맥락에서, 특히 면역학적 장애를 치료하는데에도 유용하다. 예를 들어, 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드는 단독 치료제로서, 예를 들어, 과도한 면역 반응을 치료하기 위해 투여할 수 있다. 트레지토프가 Fc-부분에 병합된다는 점은, 단리된 트레지토프와 비교해 제조하기 더 쉽게 해줄 뿐만 아니라 단일 트레지토프의 투여와 비교해 생산물의 혈장 반감기를 개선하는 역할을 할 수도 있다. 즉, 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드는 치료학적 물질 또는 예방학적 물질로서 매우 유용하다.

[0033] 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드는 또한 트레지토프를 다른 단백질에, 예를 들어, 융합 단백질 형태로 쉽게 병합 및/또는 부착 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 트레지토프를 선택 단백질에 부착하기 위한 유연한 플랫폼을 제공해주며, 따라서 트레지토프의 병합 여부를 확인하기 위한 실험의 필요성을 감소시킨다. 또한, 본 발명의 방식은 트레지토프를 면역학적 관용을 전달하고자 하는 대상 단백질 또는 펩타이드와 같은 특정 물질과 조합하여 투여하거나 또는 이와 결합시켜 투여하기 위한 새로운 도구를 제공해준다. 이는 자가면역, 알레르기, 기타 질환 관점에서, 그리고 치료제에 대한 부적절한 면역 반응을 방지하거나 또는 낮춘다는 맥락에서 특히 유용할 수 있다. 아울러, 예를 들어, 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드에 연결된 항원 결합 영역을 이용함으로써, 이러한 단백질을 특정 조직 또는 세포로 표적화 할 수 있다.

[0034] 본 발명은 다양한 용도들에 적합한 캐리어 (carrier) 형태로 트레지토프를 발현시킬 수 있다. 그러나, 본 발명의 방법을 이용해 단리된 트레지토프도 효율적으로 생산할 수 있으며, 트레지토프는 TCP에 포함된 형태로 발현된다. TCP 발현 후, TCP (또는 TCP를 포함하는 단백질)로부터 트레지토프를 절제할 수 있으며, 추가로 정제할 수 있다. 이로써 단리된 트레지토프를 효율적으로 제조 및 이용할 수 있다.

[0035] 임의 이론으로 결부시키고자 의도하는 것은 아니지만, 본 발명의 방식, 즉 담체 서열로서 면역글로불린의 Fc-부분 체인을 이용하는 방식은 트레지토프가 서로 응집되는 경향을 제거하여 효율으로 발현 가능하게 할 수 있다. 이러한 방식의 결과는, 전술한 바와 같이, 인지하는 한 복수의 트레지토프를 단백질을 융합하고자 하는 이전의 시도들이 그다지 성공하지 못하였으므로, 특히 예상치 못한 것이며, 유익하다.

[0036] 이에, 트레지토프를 병합하기 위한 백본으로서 Fc-부분 체인의 이용은 생물학적, 특히 진핵생물 발현 시스템에서 트레지토프의 효율적인 클로닝 및 발현, 특히 분비를 가능하게 한다.

[0037] 트레지토프를 병합하기 위한 담체 분자로서 면역글로불린 Fc-부분 체인을 이용함으로써, 하나의 폴리펩타이드 상에서 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있는 트레지토프, 특히 2종 이상의 트레지토프, 유익하게는 또한 3종

이상의 트레지토프를 효율적으로 클로닝하여 발현할 수 있다. 제조되는 본 발명의 TCP는 안정적이며, 정제하기 용이하다.

- [0038] 본 발명의 실시예들에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 TCP는 면역조절 활성화와 관련해 양호한 결과를 달성하였다. 이는 9종의 주요 HLA-DRB1 슈퍼타입들을 대표하는 매우 다양한 공여체들에서 작동자 CD4+ T 세포의 증폭 및 활성화에 대한 TCP의 면역 억제 능력에 의해 입증되었다.
- [0039] 다수의 추가적인 유용한 구현예들, 이점 및 용도들은 본 발명의 내용으로부터 명확해질 것이다.
- [0040] 용어 "서열 동일성"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 당업자들에게 공지되어 있다. 일반적으로, 아미노산 서열은, 정렬한 서열 2종 간의 서열 동일성이 다른 아미노산 서열의 전장에 대해 x% 이상일 경우, 다른 아미노산 서열과 "x% 이상의 동일성"을 가진다. 이러한 전체적인 정렬은, 예를 들어, EMBL 홈페이지 [http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)에 제공된 "EMBOSS" 니들 프로그램 등의 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 상동성 프로그램을 이용하여, 다음과 같이 제공된 설정 하에 수행할 수 있다: 행렬: BLOSUM 62; 갭 오픈 20; 갭 연장 0.5; 출력 형식: 쌍; 엔드 갭 패널티: 거짓 (false); 엔드 갭 오픈: 10; 엔드 갭 연장: 0.5. 아미노산 서열 세트의 서열 동일성 또는 서열 유사성 / 서열 상동성 %를 계산하는 추가적인 방법들은 당해 기술 분야에 공지되어 있다.
- [0041] 특정 영역 내에서, 본원에서 정의된 프레임은 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않으며, 이는 서열 동일성을 결정하기 위한 비교를 수행하기 전 프레임의 각각의 부분 서열들이 비교하고자 하는 서열과 비교할 서열 둘다에서 제거하는 것을, 의미한다. 본원에서, 의심되는 경우, 먼저 전장 서열에 대해 정렬을 수행한 다음 비교 서열에서 그 프레임에 해당하는 서열을 제거한다. 아울러, 명확하게 기술하기 위해, 문헌의 도처에서 정의되는 서열 동일성과 관련한 핵심 서열 이외의 임의의 N-말단 부분 서열 및 C-말단 부분 서열 역시 서열 동일성 결정에 고려되지 않는다. 즉, 상기한 첫번째 정렬을 이용해 서열 동일성 계산에 고려하지 않는 이러한 N-말단 및 C-말단 부분 서열들을 식별해, 추가로 제거할 수 있다.
- [0042] 본 발명은 서열번호 1의 135-330번 아미노산들과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 TCP를 추가로 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,
- [0043] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0044] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0045] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0046] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 TCP는 또한 서열번호 1의 114-330번 아미노산들 (인간 IgG의 완전한 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 서열)에 대해 85% 이상의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이러한 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,
- [0048] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0049] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0050] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0051] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 이러한 구현예에서, 명시된 영역에 대한 아미노산 서열 동일성은 또한 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100%일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 TCP는 또한 서열번호 1의 104-330번 아미노산들 (CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지부의 일부를 포함하는 서열)에 대해 85% 이상의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이러한 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,
- [0053] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0054] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0055] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

- [0056] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 이러한 구현예에서, 명시된 영역에 대한 아미노산 서열 동일성은 또한 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100%일 수 있다.
- [0057] 추가적인 구현예에서, 본 발명의 TCP는 또한 서열번호 1의 1-330번 아미노산들 (인간 IgG의 불변부의 아미노산 서열)에 대해 85% 이상의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이러한 TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,
- [0058] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0059] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0060] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0061] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 이러한 구현예에서, 명시된 영역에 대한 아미노산 서열 동일성은 또한 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100%일 수 있다.
- [0062] 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 더 바람직하게는 적어도 65%의 동일성을 가진 아미노산 190개 이상으로 된 인접 서열 (contiguous sequence)을 포함하는 TCP를 제공하며, 이러한 TCP는 Fc-부분 체인에 대해 이중적인, 조절성 T 세포를 활성화하는 에피토프를 2개 이상 포함하고, 이들 단백질은 선택적으로 항체의 VH 도메인 및/또는 CH1 도메인을 포함하지 않는다. 바람직하게는, TCP의 트레지토프 하나 이상, 선택적으로 2 이상이 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상에 위치하고,
- [0063] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0064] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0065] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당한다.
- [0066] 상기한 구현예에서, 프레임의 서열들은 서열 동일성 결정에 고려되며, 예를 들어 상기 정의된 TCP와 비교해 수득되는 서열 동일성은 더 낮다.
- [0067] 또한, 본 발명은 면역글로불린, 예를 들어, 이중적인 트레지토프 하나 이상, 바람직하게는 2개, 3개 또는 4개의 삽입에 의해 변형된 IgG Fc-부분 체인을 포함하는 TCP를 제공하며, 여기서 TCP는 항체의 VH 도메인 및/또는 CH1 도메인을 포함하지 않는다.
- [0068] 당해 기술 분야의 당업자라면, 전술한 모든 TCP들에 대해, 본원에 기술된 바람직한 특징들이, 비-제한적으로, 가능한 또는 바람직한 트레지토프, Fc-부분 체인, 서열 프레임, 그리고 삽입 및 위치에 대한 규정을 비롯하여, 유사하게 적용된다는 점은 자명할 것이다. TCP를 포함하는 다량체 및 융합 단백질 역시 마찬가지로 설계 및 제작할 수 있다.
- [0069] **서열번호 1**은 UNIPROT 서열 P01857에 해당한다. 이것은 인간 IgG 중쇄의 불변부를 나타내며, 다음과 같은 특징들을 가진다 (Giuntini et al., 2016. Clin Vaccine Immunol 23:698-706):
- [0070] 1) 힌지부: 위치 103-113번
- [0071] 2) CH2 도메인: 위치 114-223번
- [0072] 3) CH3 도메인: 위치 224-330번
- [0073] 4) 분자 간 Fc-부분 이량체화를 위한 시스테인 잔기: 위치 109번 및 112번
- [0074] 5) (CH2 도메인에서) 분자내 이황화 연결을 위한 시스테인 잔기: 위치 144번 및 204번
- [0075] 6) (CH3 도메인에서) 분자내 이황화 연결을 위한 시스테인 잔기: 위치 250번 및 308번
- [0076] 7) 잠재적인 당화 부위 (항체의 Kabat 번호 지정 체계에 따라 Asn 297): 위치 180번.
- [0077] 언급된 바와 같이, 본 발명은 면역글로불린 Fc-부분 체인 또는 이의 단편에 트레지토프를 도입하는 새로운 개념을 기초로 한다. 용어 "**면역글로불린 Fc-부분 체인**" 및 "**면역글로불린 Fc-부분 체인**" 또는 간단하게 "**Fc-부분 체인**"은 본 명세서 전체에서 사용되는 바와 같이 당해 기술 분야의 당업자에게 이해된다 (예를 들어, Schroeder, H.W., & Cavacini, L. (2010) Structure and function of Immunoglobulins, J Allergy Clin Immunol vol. 125(2), S41-S52 참조). 용어 "Fc-부분"은 당해 기술 분야의 당업자들에게 알려져 있다. 본 발명

에 따른 Fc-부분 체인은 면역글로불린의 Fc-단편 이량체로 된 체인 하나 또는 이의 단편을 의미한다. 예를 들어, 이러한 단편은 과과인을 이용한 절단을 통해 면역글로불린 G (IgG), 바람직하게는 인간 IgG로서 수득할 수 있다. 대응되는 아미노산 서열 및 핵산 서열들은 공지되어 있다. Fc-부분 체인에 대한 일 예는 서열번호 1의 일부로서 기술된 인간 IgG1 Fc-부분 체인이다. Fc-부분 체인은 전장 Fc-부분 체인일 수 있거나, 또는 이보다 짧을 수 있다. 바람직하게는, TCP에 이용된 폴리펩타이드는, 가능하게는 Fc-부분 체인의 힌지부 또는 힌지부의 일부를 비롯하여, 적어도 인간 IgG와 같은 IgG의 CH2 및 CH3 도메인에 해당하여야 한다.

- [0078] 본 발명의 TCP에서 면역글로불린 서열이 서열 동일성 요건을 충족한다면, 그 서열은 무라인 IgG로부터 유래할 수도 있다. 바람직하게는, 그 서열은 인간 IgG로부터 유래한다.
- [0079] 서열번호의 아미노산 135-330번에 따른 면역글로불린 Fc-부분 체인은 면역글로불린의 힌지부를 제외한 인간 면역글로불린 G (IgG)의 CH2 및 CH3 도메인 대부분을 나타낸다.
- [0080] 용어 "**CH2 도메인**", "**CH3 도메인**" 및 "**힌지부**"는 당업자들에게 공지되어 있다 (예를 들어, Schroeder, H.W., & Cavacini, L. (2010) Structure and function of Immunoglobulins, J Allergy Clin Immunol vol. 125(2), S41-S52를 참조함). 전술한 바와 같이, 해당 도메인들은 다음과 같이 서열번호 1에서 확인할 수 있다:
  - [0081] (a) 힌지부: 위치 103-113번
  - [0082] (b) CH2 도메인: 위치 114-223번
  - [0083] (c) CH3 도메인: 위치 224-330번
- [0084] 각각의 CH 영역은 분자내 이황화 결합을 통해 오히려 보존된 루프-유사 도메인을 형성한다. IgG의 CH2 도메인은 작동자 기능을 매개하고 항체 안정성을 보존하는데 중요한 역할을 담당한다. 항체에서, 이는 당 모이어티를 통해 다른 CH2 도메인과의 약한 상호작용에 참여한다. Asn297에서 N-연결된 당화는 포유류 IgG뿐 아니라 다른 항체 이소형의 상동적인 영역들에 보존되어 있다.
- [0085] 한편, 항체 또는 Fc-부분 체인 이량체에서, CH2 도메인들은 당 모이어티를 통해 서로 상호작용하고, CH3 도메인들은 서로 직접 상호작용하므로, 따라서 항체의 작동자 기능에, 특히 Fc 수용체에 결합하는데 중요하다.
- [0086] TCP 구축에 이용되는 Fc-부분 체인은 서열번호 1로부터 유래한다. 보다 구체적으로, 이는 서열번호 1의 적어도 아미노산 135-330번으로부터 유래한다. 이량체화가 요망된다면, Fc-부분 체인은 또한 서열번호 1의 아미노산 103-113번으로 명시된 바와 같은 힌지부 (핵심 힌지부, Giuntini et al., 2016 참조) 또는 이량체화를 허용하는 이의 일부를 포함할 수 있으며, 예를 들어, TCP는 서열번호 1의 아미노산 104-330번으로부터 유래할 수 있다. 이는 또한 서열번호 1의 아미노산 40-330번 또는 1-330번으로부터 유래할 수도 있다. "**유래한다**"는 하나 이상의 변형이 서열 상에 행해질 수 있다는 것을 의미한다. 한가지 변형은 서열내 하나 이상의 이중적인 트레지토프의 삽입 또는 병합이다.
- [0087] 만일 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드가 FcRn (신생아 Fc 수용체)에 결합하는 면역글로불린 Fc-부분의 결합력을 유지한다면, 이는 TCR의 반감기 및 안정성을 개선하는데 유리할 수 있다. 선택적으로, 당화 부위는 FcRn 상호작용을 위해 유지된다. 선택적으로, 본 발명의 TCP는 또한 Fc- $\gamma$ RI, Fc- $\gamma$ RII 및/또는 Fc- $\gamma$ RIII에 결합한다. 이 경우, IgG로부터 유래한 TCP는 전술한 바와 같이 당화 부위를 유지하여야 한다. Fc- $\gamma$  수용체에 대한 결합은 전문적인 항원-제시 세포에 의한 흡수를 높일 수 있으며, 그래서 본 발명의 맥락에서 유익할 수 있다.
- [0088] 단백질의 특정한 원하는 특성을 변경하거나 또는 개선하기 위해 추가의 돌연변이를 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드에 도입하는 것도 가능하다. TCP의 구체적인 목적에 따라, 해당 수용체를 통해 매개되는 구분되는 작동자 기능들을 방지하거나 또는 개선하기 위해, 예를 들어, 단백질의 해당 아미노산에 돌연변이를 도입함으로써, 신생아 Fc 수용체에 대한 또는 Fc- $\gamma$ RI, Fc- $\gamma$ RII 또는 Fc- $\gamma$ RIII에 대한 단백질의 결합을 저해하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0089] TCP는 전형적으로 용해성 단백질이므로, 유리하게는 이를 발현하는 세포에 의해 분비될 수 있다. 이를 위해, TCP는 신호 서열을 포함할 수 있다. 용어 "**신호 서열**"은 일반적으로 당업자들에게 알려져 있다. 보다 구체적으로, 이 용어는 전형적으로 N-말단 위치에서 TCP에 연결된, TCP의 세포내 수송 및/또는 분비를 촉진하는, 펩타이드에 대한 것이다. 이 신호 서열은 수송 중, 그리고 단백질의 분비하는 과정 중에 절단 분리될 수 있거나, 또는 예를 들어 별개의 효소적 처리에 의해 제거할 수 있다. 신호 서열에 대한 예는 서열번호 22를 포함한다.
- [0090] 선택적으로, TCP는 정제 태그를 포함한다. 용어 "**정제 태그**"는 또한 당업자들에게 이해된다. 보다 구체적으로,

이 용어는 TCP에, 전형적으로, N-말단 또는 C-말단 위치에서 융합되어, 합성된 TCP의 정제를 용이하게 하는, 펩타이드에 대한 것이다. 전형적인 예는 His-태그, FLAG-태그 또는 Myc-태그이다.

[0091] 아울러, TCP는 당화, 인산화 또는 페길화 (PEGylations)와 번역 후 수정을 또한 포함할 수 있다. 바람직하게는, TCP는 항체의 Kabat 번호 지정 체계에 따라 Asn 297 위치에 당화 부위를 유지하며, 이는 서열번호 1에서 180번 위치에 해당한다.

[0092] 면역글로불린 Fc-부분에 기반한 TCP의 한가지 이점은 면역글로불린 Fc-부분 체인으로부터 유래한 구조에 의해 제공되는 긴 혈장 반감기이다. 그러나, TCP는 또한 반감기 연장 모이어티, 예를 들어, 알부민, 알부민 결합 도메인 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티를 포함할 수도 있다.

[0093] 트레지토프

[0094] 용어 "트레지토프" (또는 "조절성 T 세포를 활성화하는 에피토프")는 본 발명의 전체에서 사용되는 바와 같이 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있다. 트레지토프는 일반적으로 아미노산 약 10-25개, 예를 들어 아미노산 약 15-20개 길이의 작은 선형 펩타이드로서, 조절성 T 세포를 활성화할 수 있다. 이는 본래 인간의 불변부와 영장류 IgG 면역글로불린에서 동정되었다 (L. Cousens, et al., Hum. Immunol. 75, 1139-1146 (2014); Y. Su, R. Rossi, et al. J. Leukoc. Biol. 94, 377-383 (2013); L. Cousens, et al., J. Clin. Immunol. 33 (Suppl 1), S43-S49 (2013)). 이러한 짧은 선형 펩타이드는 조절성 T 세포를, 특히 항원-제시 세포, 예를 들어 수지상 세포 상에 HLA 복합체의 MHC II 포켓에 결합함으로써, 활성화할 수 있다. 항원-제시 세포와 조절성 T 세포 간의 HLA-트레지토프 복합체를 포함한 수용체-기반의 상호작용은 조절성 T 세포 타입의 활성화를 구현한다. 본 발명에 따른 T 세포 활성화 에피토프에 대한 예들은 본 명세서 전체에서 제공된다. 일반적으로, 트레지토프를 나타내는 서열은 비슷한 자가 단백질들에 고도로 보존되어 있다. 동정된 거의 모든 트레지토프들이 단일한 9-mer 핵심 서열을 나타내며, 이는 적어도 4종의 HLA DR 대립유전자에 결합하기 위한 것으로 EpiMatrix 에피토프 예측 알고리즘을 통해 예측할 수 있다. 이러한 동정된 트레지토프들은 인간 집단에서 널리 인지될 가능성이 높다. 이러한 선별은 HLA 슈퍼타입들에서 EpiMatrix 점수, HLA 결합 분석에서 예측된 히트에 대한 검증, 입증 증거에 대한 검증, 시험관내 분석 및 생체내 모델 및 상황상 고려사항을 기반으로 이루어진다.

[0095] EpiMatrix는 하나 이상의 MHC 대립유전자에 결합하는 것으로 예측된 아미노산 9-10개 길이의 펩타이드 세그먼트들에 대한 단백질 서열을 탐색하는 T 세포 에피토프 맵핑 알고리즘이다 (예를 들어, De Groot, AS, Jesdale, BM, Szu, E, Schafer, JR. An interactive web site providing MHC ligand predictions: application to HIV research. AIDS Res. and Human Retroviruses. 1997;13: 539-541; 및 Schafer JA, Jesdale BM, George JA, Kouttab NM, De Groot, AS. Prediction of well-conserved HIV-1 ligands using a Matrix-based Algorithm, EpiMatrix. Vaccine. 1998;16(19):1880-1884를 참조함). EpiMatrix는 에피토프를 예측하는데 포켓 프로파일 방법을 이용하며, 1999년에 Sturniolo 및 Hammer에 의해 최초로 언급되었다. 효율성과 단순성을 이유로, 예측은 8종의 가장 공통적인 HLA 클래스 II 대립유전자와 6종의 "슈퍼타입" HLA 클래스 I 대립유전자에 국한된다. EpiMatrix 원 점수는 상당한 대규모의 무작위 생성된 펩타이드 서열 세트로부터 파생된 점수 분포에 대해 표준화한다. EpiMatrix "Z" 척도에서 임의의 펩타이드 평가 점수 >1.64 (임의의 주어진 펩타이드 세트의 상위 대략 5%)는 예측한 MHC 분자에 결합할 가능성이 유의한 것이다. 척도에서 펩타이드 평가 점수 >2.32 (상위 1%)는 결합할 가능성이 매우 높은 것이며, 대부분의 잘 알려진 T 세포 에피토프들의 점수가 이 점수 범위에 해당한다. EpiMatrix는 예를 들어 i-cubes 웹사이트에서 iVAX Toolkit (예를 들어 the iVAX website, www. <http://i-cubed.org/tools/ivax/ivax-tool-kit/>)를 통해 공개적으로 입수가 가능하며, 추가적인 정보 역시 이용가능하다. 트레지토프의 동정은 WO 2008/094538 A2의 실시예 1, 2 및 3과 36쪽 4번째 줄부터 44쪽 30번째 줄에 예시되어 있으며, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 병합되며, 또한 WO 2008/094538 A2의 14쪽 8-23번째 줄을 참조한다.

[0096] 본 발명의 측면에서 트레지토프에 대한 주요 기능적인 특징은 다음과 같다:

[0097] (i) 트레지토프는 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포에 의해 제시된다.

[0098] (ii) 트레지토프는 이러한 항원-제시 세포의 HLA 복합체의 MHC II 포켓에 결합한다.

[0099] (iii) 트레지토프의 제시는 조절성 T 세포의 활성화를 유도한다.

[0100] (iv) 트레지토프의 제시는 유효한 T 세포 (effective T cell)를 활성화하지 않는다.

[0101] 트레지토프에 의해 달성되는 공정과 기전은 복잡하지만, 적절한 분석, 예를 들어, 하기 실시예 부분에서 기술된

바와 같이 소위 TT (파상풍 독소이드) 분석에 의해 펩타이드 성질이 트레지토프인지를 추가로 검증하는 것은 가능한 일이다. 분석은 항원으로서 파상풍 독소이드를 이용하여 PBMC에서 CD4 T 세포의 기억 반응에 대한 트레지토프-매개 억제를 토대로 이루어진다.

- [0102] 적절한 트레지토프에 대한 예들이 아래에 제공된다. 추가적인 트레지토프들은 WO2008/094538 A2의 표 2 및 WO 2016/054114 A1의 서열들에 개시되어 있으며, 이들 역시 본 발명의 맥락에서 이용할 수 있다. 적절한 트레지토프에 대한 예는 하기를 포함한다:
- [0103] 서열번호 10 (Treg289): EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW,
- [0104] 서열번호 7 (Treg084): GTDFLTITSSLPED,
- [0105] 서열번호 2 (Treg009A): GGLVQPGGSLRLSCAASGFTF,
- [0106] 서열번호 9 (Treg088x): KTLYLQMNLSRAEDTAKHYCA,
- [0107] 서열번호 8 (Treg134): LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS,
- [0108] 서열번호 3 (Treg029B): MHWVRQAPGKGLEWV,
- [0109] 서열번호 4 (Treg088): NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCA,
- [0110] 서열번호 5 (Treg167): PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ,
- [0111] 서열번호 6 (Treg289n - 천연 서열): EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW.
- [0112] 자연 생성 트레지토프의 서열에 약간의 변형이 있을 수 있다. 예를 들어, 생리학적 pH에서 전하를 띠는 아미노산을 병합함으로써 트레지토프의 소수성을 바꾸는, 특히 낮추기 위해, 단일 아미노산의 변형, 특히 치환을 포함하는 것이 유리할 수 있다. WO2008/094538의 표 2는 가능성 있는 트레지토프 변이에 대한 예들을 보여준다. 자연 생성 트레지토프에 대한 바람직한 변형 서열의 예 2종은 Treg088x와 Treg289이며, 이들 서열 내 변형은 밑줄 표시된다:
- [0113] 서열번호 9 (Treg088x): KTLYLQMNLSRAEDTAKHYCA
- [0114] 서열번호 10 (Treg289): EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW.
- [0115] 아울러, 트리밍된 서열, 즉 트레지토프를 표시하는 서열의 말단에 아미노산 하나 이상, 특히 말단으로부터 아미노산 2 또는 3개가 T 세포 결합성 에피토프의 기능은 유지하면서 생략될 수 있다. 일반적으로, 트레지토프의 아미노산 9개로 구성된 코어 모티프가 천연적인 면역학적 과정에서 펩타이드를 제시하는데 중요하다. 바람직하게는, 이러한 코어 서열이 바람직한 트레지토프의 서열에 존재한다. 하기에 트레지토프에 바람직한 트리밍된 일부 서열을 나타낸다:
- [0116] 서열번호 11 (trimmed Treg009A): VQPGGSLRLSCAASG,
- [0117] 서열번호 12 (trimmed Treg029B - v1): WVRQAPGKGL,
- [0118] 서열번호 13 (trimmed Treg029B - v2): VRQAPGKGL,
- [0119] 서열번호 14 (trimmed Treg088): YLQMNLSRAEDTAVY,
- [0120] 서열번호 15 (trimmed Treg088x - v1): KTLYLQMNLSRAEDTAKH,
- [0121] 서열번호 16 (trimmed Treg088x - v2): YLQMNLSRAEDTAKH,
- [0122] 서열번호 17 (trimmed Treg167): LQSSGLYSLSSVTVPSSSL,
- [0123] 서열번호 18 (trimmed Treg289n): YNSTYRVVSVLTVLH,
- [0124] 서열번호 19 (trimmed Treg289): YQSTYRVVSVLTVLH,
- [0125] 서열번호 20 (trimmed Treg084): FTLTISLQ, 및
- [0126] 서열번호 21 (trimmed Treg134): FYPREAKVQWKVDNALQS.
- [0127] Treg289, Treg084, Treg009A, Treg088x 및 Treg134 (트리밍되지 않은 버전과 트리밍된 버전 2종)는 본 발명에 따른 TCP 맥락에서 양호한 발현 결과를 보였다.

- [0128] 선택적으로, 본 발명의 TCP에서, TCP의 트레지토프 2중, 3중 및 모두, 서열번호 2-21의 트레지토프, 바람직하게는 서열번호 2, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 19 및 20의 트레지토프이다.
- [0129] 바람직하게는, 하나의 TCP 체인에서 이종적인 트레지토프들 모두 서로 다른 서열을 가질 수 있다. 서로 다른 트레지토프의 사용은, 서로 다른 HLA 일배체형, 다른 인지, 가공 처리 또는 제시 능력을 가진 개체의 조절성 T 세포를 표적 및 활성화하는 능력을 개선한다. 대안적으로, 하나의 TCP에서 이종적인 트레지토프들 중 일부 또는 전부 동일한 서열을 가지며, 예를 들어, 적절한 HLA 일배체형 또는 일배체형 세트 상의 제시를 표적화한다.
- [0130] 이종적인 트레지토프
- [0131] 용어 "**이종적인 트레지토프**"는 본 발명의 맥락에서 트레지토프가 각각의 면역글로불린 Fc-부분 체인 내 동일한 위치에서 동일하게 생성된 것이 아님을 의미한다. 즉, 보다 구체적으로, 용어 "**이종적인 트레지토프**"는, 트레지토프가
- [0132] (i) 면역글로불린 Fc-부분 체인에서 자연적으로 생성된 것이 아니거나, 및/또는 (ii) 면역글로불린 Fc-부분 체인 내 본래의 위치에 위치하지 않는 것을 의미한다.
- [0133] 이러한 맥락에서 용어 "자연적으로 생성된 것은 아닌"은 트레지토프 서열이 자연 생성 트레지토프와 비슷하지만 비-변형된 천연 항체, 특히 천연적인 인간 IgG 항체의 대응되는 Fc-부분에 존재하는 임의의 트레지토프와 차별적인 하나 이상의 변형을 가진 경우를 포함한다. 이러한 변형은, 예를 들어, 결손, 삽입, 역위 또는 치환일 수 있으며, 바람직하게는 치환일 수 있다.
- [0134] 서열번호 1의 맥락에서, 용어 "**이종적인**"은 본 발명의 맥락에서 트레지토프가 서열번호 1에 따른 Fc-부분 체인 내 동일한 위치에서 동일하게 생성된 것은 아닌, 구체적으로 서열번호 1의 135번 위치부터 330번 위치까지의 아미노산 서열에서 동일하게 생성된 것은 아닌 것을 의미한다. 바람직하게는, 이는 또한 서열번호 1, 예를 들어 자연 생성 서열에 대한 서열 동일성이 85% 이상인 서열 내 동일한 위치에서 동일하게 생성된 것은 아니다.
- [0135] 인간 IgG Fc-부분 체인, 보다 구체적으로는 서열번호 1의 아미노산 번호 135-330에 따른 면역글로불린 Fc-부분 체인 내, 자연 생성 트레지토프가 존재한다는 점에 주목한다. 이는 트레지토프 289 (서열번호 10)로서, 서열 프레임 A에 서열번호 1의 야생형 IgG가 위치한 것이다. 만일 다른 위치, 예를 들어 서열 프레임 B 또는 C에 위치할 경우, 이것은 이종적인 트레지토프로 간주된다. 또한, 본 명세서에서는 트레지토프 289의 서열 변이체 (트레지토프 289x)도 언급되는데, 이는 자연 생성 트레지토프와는 차이가 있으므로, 본 발명의 목적에서 이종적인 트레지토프로 간주된다. 또한, 이 트레지토프가 서열번호 1에서 트레지토프 289와 동일한 위치에 위치하는 경우에도, 동일하다. 서열번호 2-9 및 11-21의 트레지토프는 따라서 서열번호 1에서의 위치와 무관하게 이종적인 트레지토프이다.
- [0136] 본 발명의 TCP는, 이종적인 트레지토프 하나 이상 외에도, 하나 이상의 "**상동적인**" 트레지토프, 즉 서열번호 1의 Fc-부분 체인 내 자연 생성 트레지토프 또는 서열번호 1에 따른 Fc-부분 체인 내 자연 생성 트레지토프 289와 같이 85% 이상의 서열 동일성을 가진 트레지토프를 추가로 포함할 수 있다.
- [0137] 예를 들어, 만일 본 발명에서 바람직한 경우로서, 본 발명의 TCP가 프레임 B 또는 C에 이종적인 트레지토프를 하나 이상 포함한다면, 이 TCP는 프레임 A에 상동적인 트레지토프, 특히 트레지토프 289를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 이러한 TCP는 트레지토프를 2개 이상 포함하거나, 또는 프레임 B 및 C 각각에 이종적인 트레지토프가 존재하는 경우에는 트레지토프를 3개 이상 포함하는 것이다.
- [0138] 바람직하게는, 본 발명의 TCP는 이종적인 트레지토프를 2개 이상, 더 바람직하게는 3개 이상, 선택적으로 4개 이상 포함한다. 선택적으로, TCP는 트레지토프를 2-4개 포함한다.
- [0139] 트레지토프들의 병합
- [0140] 원칙적으로, 당업자는 면역글로불린의 Fc-부분 체인 또는 TCP 내에 트레지토프(들)가 적절한 것으로 간주되는 바에 따라 병합 위치를 정할 수 있다. 그러나, 바람직한 위치는 제조되는 단백질의 3차 또는 4차 구조 형성에 기여하는 TCP 부분을 제외한 영역이다. 면역글로불린의 Fc 부분의 구조와 비슷한 3차원 또는 4차원 구조 형성을 담당하는 TCP의 영역들은 예를 들어 이황화 결합을 형성하는 시스테인과 같은 아미노산이거나 또는 당화를 담당하는 아미노산일 수 있다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 트레지토프를 나타내는 서열은 3차원 구조를 안정화하는 분자간 이황화 결합이 유지되거나 및/또는 당화가 유지되는 방식으로 TCP 내에 위치한다. 특정 구현예에서, 또한, 이량체화를 허용하기 위해 힌지부 또는 이의 일부를 유지하는 것이 요망될 수도 있다. 이 경우, 트레지토프

프는 4차원 구조를 안정화하는 분자간 이황화 결합이 유지되는 방식으로 TCP 내에 위치되어야 한다.

- [0141] 특히 유용한 프레임, 즉 본 발명의 맥락에서 동정된 트레지토프를 병합하기에 적합한 영역들은 본원에 상세히 기술되어 있다.
- [0142] 구체적으로, IgG1과 같은 IgG로부터 유래한 TCP의 경우, 본 발명자들은, 서열 프레임 A, B 또는 C에 이중적인 트레지토프가 하나 이상 위치한다면, 예를 들어 TCP 발현 및 안정성에 유리하다는 것을, 발견하였으며, 여기서,
- [0143] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고,
- [0144] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0145] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212249번 위치에 해당한다
- [0146] 바람직하게는, (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 170-203번 위치에 해당하고,
- [0147] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 275-306번 위치에 해당하고, 및
- [0148] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 214-249번 위치에 해당한다.
- [0149] 선택적으로, (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 173-203번 위치에 해당하고,
- [0150] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 277-304번 위치에 해당하고, 및
- [0151] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 217-248번 위치에 해당한다.
- [0152] 각 프레임이 TCP에 트레지토프의 병합을 허용하지만, TCP의 발현은 허용가능한 방식으로 여전히 가능하다. 보다 구체적으로, Fc-부분 체인의 3차원 구조는 허용가능하지 않은 방식으로 영향을 받지 않는다. 예를 들어, 유리하게는, CH2 및 CH3 도메인을 안정화하는 분자내 이황화 결합이 유지된다. 또한, 요망되는 경우, 이량체 형성도 가능하다. 본 발명자에 의한 이들 프레임에 대한 정의는 트레지토프를 병합하기 위한 매우 유연한 플랫폼을 구현한다. 프레임 B 및 C는 특히 동정하기 어려웠다.
- [0153] 당해 기술 분야의 당업자라면, 삽입된 트레지토프 이외의 TCP 서열은 본 발명의 실질적인 이점을 근본적으로 손상시키지 않는 한, 특정한 변형을 겪을 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 서열번호 1의 대립유전자 변이체, 즉 기타 Fc-부분 체인들을 이용할 수 있다. 당업자는 Fc-부분 체인에 대한 여러가지 변이체들, 예를 들어 포유류 Fc-부분 체인 또는 인간 및 비-인간 Fc-부분 체인을 인지하고 있다. 인간 치료학적 용도의 경우, 인간 IgG, IgA 또는 IgM, 바람직하게는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, 더 바람직하게는 IgG1 및 IgG4로부터 유래한 Fc-부분 체인과 같은 인간 Fc-부분 체인이 바람직하다. 인간 IgG1 Fc-부분 체인이 가장 바람직하다.
- [0154] 본 발명의 TCP는 IgG 이외의 다른 면역글로불린, 예를 들어, IgA, IgM, IgE 또는 IgD, 바람직하게는, 이들의 CH2 및 CH3 도메인으로부터 유래할 수 있으며, TCP는 선택적으로 추가의 불변 도메인, 특히 CH4 도메인, 및/또는 이러한 면역글로불린에 전형적으로 존재하는 경우에는 연결 체인과 같은 추가의 영역을 포함할 수 있다. 이러한 TCP에서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프를 병합하기에 적절한 프레임은 해당 트레지토프의 서열과 비교적 높은 서열 유사성 %를, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 나타내는, Fc-부분 체인 내 위치들에서 동정할 수 있다. 이는 실험 단락 (예를 들어, 도 4, 5 및 6 참조)에 기술된 서열 정렬을 통해 분석할 수 있다. 이러한 맥락에서, "유사성"은 정렬된 아미노산들이 동일하거나 또는 유사한 특징을 나타내는 것을 의미하며, 예를 들어, 서열 유사성을 낮추지 않으면서, 극성 아미노산은 다른 극성 아미노산으로 교체할 수 있으며, 비극성 아미노산은 다른 비극성 아미노산으로 교체할 수 있으며, 염기성 아미노산은 다른 염기성 아미노산으로 교체할 수 있으며, 또는 산성 아미노산은 다른 산성 아미노산으로 교체할 수 있다. 일 구현예에서, 유사성은 서열 동일성이다. 이러한 TCP는 전형적으로 기원이 되는 IgA, IgM, IgE 또는 IgD의 불변 도메인 (특히, CH2 및 CH3 도메인)에 대해, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 적어도 90%의 전반적인 서열 동일성을 나타낸다. 선택적으로, 만일 TCP의 기원이 되는 IgA, IgM, IgE 또는 IgD가 상동적인 트레지토프(들)를 하나 이상 포함할 경우에는, 이러한 상동적인 트레지토프는 이중적인 트레지토프로 교체될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 이러한 TCP는 다른 위치에 하나 이상의 이중적인 트레지토프를 포함한다. IgG로부터 유래한 본 발명의 TCP에서 프레임 A, B 또는 C의 위치는 다른 Ig로부터 유래한 TCP에서 적절한 프레임을 식별하는 지침으로 작용할 수 있다. 예를 들어, 트레지토프는 대응되는 위치에 병합할 수 있다. 분자간 이황화 결합에 중요한 아미노산 위치는 전형적으로 유지된다. 또한, Fc 부위의 당화도 유지될 수 있지만, 생략될 수도 있다. IgG 이외의 다른 Ig의 경우, 수용체 결합과 같은 일부 작동자 기능에 당화는 불필요하다. 특정 구현예에서, 이량체화를 허용하기 위해, 각각의 Ig의 힌지부 또는 이의 일부를 유지하는 것이 또한 요망될 수도

있다. 이 경우, 트레지토프는 4차원 구조를 안정화하는 분자간 이황화 결합 역시 유지되는 방식으로 TCP 내에 위치되어야 한다.

[0155] 트레지토프가 병합되는 TCP는 또한 말단 절단 (truncation), 부가, 결손, 삽입, 역위 또는 치환과 같은 적절하거나 또는 유용한 것으로 간주되는 추가의 변형을 포함할 수도 있다. 이러한 변형은, 예를 들어, 요망되는 바와 같이, (예를 들어, 힌지부의 시스테인 잔기를 통한) 이황화 결합의 형성을 촉진하거나 또는 제거하는 역할을 할 수 있다. 의도한 목적에 따라 요망될 수 있는 바와 같이, Fc-수용체에 대한 결합을 개선 또는 낮추기 위해 기타 변형이 도입될 수도 있다. 바람직하게는, 변형은 TCP의 제조 (예를 들어, 재조합 발현 및/또는 분비)에 영향을 미치지 않아야 한다. 당화, 인산화, 폐길화 또는 HE실화 (HESylation)와 같은 추가적인 변형도 고려된다. 예를 들어, 폐길화는 TCP의 반감기를 추가로 연장하는데 유용할 수 있다. 당업자라면 이러한 변형을 도입하는 방법을 알 것이다.

[0156] 그러나, 당업자라면 발현 수준에 대한 서열 변형의 일부 부정적인 영향을 용인할 순 있지만, 변형이 TCP의 발현에 허용불가능한 방식으로 영향을 미치지 않도록 서열 변형을 정해야 한다. 바람직하게는, 발현 수준은, 동일한 조건에서 발현시킬 경우, 바람직하게는, 아래 실시예에 기술된 바와 같이, 서열번호 54의 폴리펩타이드, 구조체 V32의 발현 수준에 대해, 5% 미만, 10% 미만, 20% 미만, 50% 미만이어서는 안되며, 바람직하게는, 적어도 80%이어야 한다.

[0157] 본 발명의 TCP에서, 바람직하게는,

[0158] (a) 서열 프레임 A가 이종적인 트레지토프를 함유하지 않을 경우, 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가지고, 및

[0159] (b) 서열 프레임 B가 이종적인 트레지토프를 함유하지 않을 경우, 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가지고, 및

[0160] (c) 서열 프레임 C가 이종적인 트레지토프를 함유하지 않을 경우, 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진다. 물론, 이종적인 트레지토프를 함유하지 않는 프레임에서 각각의 위치에 대한 서열 동일성은 더 높을 수 있으며, 바람직하게는, 적어도 90%, 선택적으로, 적어도 99% 또는 100%일 수 있다.

[0161] 이종적인 트레지토프가 서열 프레임 "내 위치하는" 것으로 언급된다면, 이는 이 이종적인 트레지토프의 전체 서열이 해당 서열 프레임에, 예를 들어, 각각의 야생형 서열의 치환 또는 부분 치환에 의해 병합되는 것을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명의 TCP에서, 하나 이상의 이종적인 트레지토프 (또는 프레임 A, B 또는 C에 존재하는 모든 이종적인 트레지토프)는, 트레지토프와 동일한 길이를 가지거나 또는 아미노산 1 또는 2개가 더 짧거나 또는 긴 길이의, 서열번호 1의 아미노산 135-330번에 걸쳐있는 영역 내에서 서열을 치환된다. 이종적인 트레지토프가 트레지토프와 동일한 길이의 서열을 치환하는 경우, 3차 구조 및 4차 구조의 파괴가 전형적으로 최소화된다. 당업자는 적절한 것으로 간주되는 바와 같이 서열 프레임 내 추가적인 서열 변화를 도입하는 것도 고려할 수 있다. 그러나, 전형적으로, 이종적인 트레지토프(들)에 의해 치환되지 않은 서열 프레임의 부분에는 더 이상 변화를 요하지 않는다. 즉, 이는 바람직하게는 서열번호 1의 해당 위치들에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가진다.

[0162] 대안적으로 또는 바람직하게는, 본 발명의 TCP는, 프레임 A, B 및 C 중 하나 이상에 위치한 이종적인 트레지토프 외에도, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 대해 C-말단 트레지토프를 또한 포함할 수 있다. 이러한 C-말단 트레지토프는 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 대해 바로 C-말단이거나, 또는 링커, 예를 들어, 아미노산 18개 미만의 링커, 선택적으로 아미노산 12개 미만, 아미노산 5개 미만 길이의 링커를 통해 서열에 연결된다. 바람직하게는, 아미노산 3-18개 길이의 링커를 이용한다.

[0163] C-말단 이종적인 트레지토프는 TCP의 C-말단에 위치할 수 있으며, 선택적으로 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 서열에 연결될 수 있다. 대안적으로, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 대한 C-말단 이종적인 트레지토프는 TCP의 C-말단에 위치하지 않으며, 이 경우, 바람직하게는, TCP는 융합 단백질이다.

[0164] 링커는 GS 링커, 예를 들어 당해 기술 분야에서 공지된 GS 링커일 수 있다. 예를 들어, (GGSG)<sub>n</sub> (서열번호 110)과 같은 링커를 이용할 수 있으며, 여기서 "n"은 상기한 서열이 1회 이상 (예를 들어, 2, 3 또는 4) 반복되는

것을 의미한다.

[0165] 추가적인 바람직한 링커 예는 다음과 같다:

[0166] 링커 1: Ala Gly Pro Gly Pro Ser Gly (서열번호 107)

[0167] 링커 2: Pro Thr Gly Ser Gly (서열번호 108)

[0168] 링커 3: Gly Gly Ser Thr Gly (서열번호 109)

[0169] 본 발명자들은 링커 2의 사용시 특히 제조되는 TCP 이량체가 결합 에너지, 즉 단백질의 안정성 측면에서 개선됨을 확인할 수 있었다.

[0170] 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 대해 C-말단에 포함시키기에 바람직한 트레지토프는 Treg134, Treg088x 및 Treg088이다.

[0171] 아래 실시예에 나타난 바와 같이, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 대한 C-말단 이중적인 트레지토프는, 특히 링커 2 (서열번호 108)와 같은 링커를 이용하기 위한, Treg029B일 수 있다.

[0172] 또한, 하나 이상의 트레지토프가 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 N-말단에, 바람직하게는, 단백질의 N-말단 위치에 부가될 수 있는 것도, 고려한다.

[0173] 본 발명은, 제1 이중적인 트레지토프가 프레임 A, B 또는 C 중 하나에 위치하고; 적어도 제2 트레지토프가 프레임 A, B 또는 C 중 다른 프레임에 위치하거나, 또는 선택적으로 링커, 예를 들어 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결되어, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치하는, TCP를 제공한다.

[0174] 예를 들어, 만일 TCP가 이중적인 트레지토프를 2개 포함하는 경우, 이들은 프레임 A와 B, 프레임 A와 C, 또는 바람직하게는 프레임 B와 C에 위치할 수 있다. 이 경우, 프레임 A는 상동적인 트레지토프 Treg289 (서열번호 1의 176-196번 위치)를 포함하는 것이 바람직하다. 이중적인 트레지토프는 또한 프레임 A; 및 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치하거나, 또는 프레임 B; 및 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치하거나, 또는 프레임 C; 및 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치할 수 있다.

[0175] 만일 TCP가 이중적인 트레지토프를 3개 포함할 경우, 이는 프레임 A, B 및 C, 또는 프레임 A, B 및 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에, 또는 프레임 A, C 및 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에, 또는 프레임 B, C 및 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치할 수 있다. 만일 이중적인 트레지토프가 4개 존재할 경우, 이는 프레임 A, B 및 C, 및 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치할 수 있다.

[0176] 일부 바람직한 트레지토프에 대해 바람직한 위치들을 아래 표에 나타내며, 위치 번호는 서열번호 1을 참조한다. 다른 Fc-부분 체인에서의 대응되는 유용한 위치들은 당업자들에게 공지된 서열 정렬을 통해 식별할 수 있다.

[0177] **프레임 A에서 바람직한 트레지토프 위치**

**표 1**

트레지토프	서열번호 1에서의 위치
Treg289	176 - 196
Treg167	174 - 199
Treg009A	180 - 200
Treg029B	178 - 192
Treg084	186 - 200
Treg134	179 - 202
Treg088x-v1	173 - 190

[0179] 프레임 B에서 바람직한 트레지토프 위치

표 2

[0180]

트레지토프	서열번호 1에서의 위치
Treg289	280 - 300
Treg167	278 - 303
Treg009A	278 - 298
Treg029B	287 - 301
Treg084	284 - 298
Treg134	277 - 300
Treg088x-v1	287 - 304

[0181] 프레임 C에서 바람직한 트레지토프 위치

표 3

[0182]

트레지토프	서열번호 1에서의 위치
Treg289	225 - 245
Treg167	223 - 248
Treg009A	223 - 243
Treg029B	223 - 237
Treg084	224 - 238
Treg134	222 - 245
Treg088x-v1	217 - 234

[0183] 바람직한 TCP

[0184] 본 발명자들은 특정 프레임에서 특이적인 트레지토프에 특히 유용한 위치들을 동정하였다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 TCP에서,

[0185] (a) 프레임 A는 176 - 196번 위치 (즉, 서열번호 1의 각 위치에 대응되는 위치에) 서열번호 10의 트레지토프 (Treg289), 174 - 199번 위치에 서열번호 5의 트레지토프 (Treg167), 180 - 200번 위치에 서열번호 2의 트레지토프 (Treg009A), 178 - 192번 위치에 서열번호 3의 트레지토프 (Treg029B), 186 - 200번 위치에 서열번호 7의 트레지토프 (Treg084), 179 - 202번 위치에 서열번호 8의 트레지토프 (Treg134) 또는 173 - 190번 위치에 서열번호 15의 트레지토프 (trimmed Treg088x - v1)를 포함하거나; 및/또는

[0186] (b) 프레임 B는 280 - 300번 위치에 서열번호 10의 트레지토프 (Treg289), 278 - 303번 위치에 서열번호 5의 트레지토프 (Treg167), 278 - 298번 위치에 서열번호 2의 트레지토프 (Treg009A), 287 - 301번 위치에 서열번호 3의 트레지토프 (Treg029B), 284 - 298번 위치에 서열번호 7의 트레지토프 (Treg084), 277 - 300번 위치에 서열번호 8의 트레지토프 (Treg134) 또는 287 - 304번 위치에 서열번호 15의 트레지토프 (trimmed Treg088x - v1)를 포함하거나; 및/또는

[0187] (c) 프레임 C는 225 - 245번 위치에 (또는 서열번호 1의 각 위치에 대응되는 위치에) 서열번호 10의 트레지토프 (Treg289), 223 - 248번 위치에 서열번호 5의 트레지토프 (Treg167), 223 - 243번 위치에 서열번호 2의 트레지토프 (Treg009A), 223 - 237번 위치에 서열번호 3의 트레지토프 (Treg029B), 224 - 238번 위치에 서열번호 7의 트레지토프 (Treg084), 222 - 245번 위치에 서열번호 8의 트레지토프 (Treg134) 또는 217 - 234번 위치에 서열번호 15의 트레지토프 (trimmed Treg088x - v1)를 포함하거나; 및/또는

[0188] (d) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한 하나 이상의 이종적인 트레지토프는 서열번호 8 (Treg134), 서열번호 14 (trimmed Treg088) 또는 서열번호 9 (Treg088x)를 가지되, 이들 트레지토프는 선택적으로 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 서열에 GS 링커 또는 서열번호 107-110 중 어느 하나의 링커 등의 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된다.

[0189] 특이적인 트레지토프들이 적절하게 조합된 본 발명의 TCP에 대한 예로는 하기를 포함한다:

- [0190] (I) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:
- [0191] (a) 프레임 A에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프
- [0192] (b) 프레임 B에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프
- [0193] (c) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및
- [0194] (d) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커 (V32)와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 경유하여 연결된, 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프;
- [0195] (II) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:
- [0196] (a) 프레임 B에 위치한 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프; 및
- [0197] (b) 프레임 C (V20)에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프;
- [0198] (III) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:
- [0199] (a) 프레임 B에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프; 및
- [0200] (b) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커 (V34)와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 경유하여 연결된, 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프;
- [0201] (IV) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:
- [0202] (a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프; 및
- [0203] (b) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프; 및
- [0204] (c) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커 (V1)와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 경유하여 연결된, 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프;
- [0205] (V) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:
- [0206] (a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프;
- [0207] (b) 프레임 B에 위치한 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프; 및
- [0208] (c) 프레임 C (V3)에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프;
- [0209] (VI) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:
- [0210] (a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프; 및
- [0211] (b) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프; 및
- [0212] (c) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커 (V13)와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 경유하여 연결된, 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프;
- [0213] (VII) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP:
- [0214] (a) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및
- [0215] (b) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커 (V14)와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 경유하여 연결된, 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프.
- [0216] 본 발명의 맥락에서, 본 발명자들은 서열번호 23 - 44 (V1-V22) 및 46 - 58 (V24-V36)의 아미노산 서열을 포함하는 특이적인 TCP를 제공하였다. V32, V20, V34, V1, V3, V13 및 V14는 특히 높은 발현 수준을 보이며, 따라서 본 발명의 바람직한 TCP이다. V32는 대부분의 트레지토프들을 포함하는 구조체이다.

- [0217] 서열번호 54의 V32에 대한 대안은, 프레임 C에 서열번호 1에 따른 아미노산 R238이 결손된, 서열번호 11의 V32\_변이체이다.
- [0218] 여러가지 TCP 포맷
- [0219] 본 발명의 TCP는 여러가지 포맷으로 이용할 수 있다.
- [0220] · 단일 제제로서 TCP
- [0221] 예를 들어, 이는 단일 제제로서, 예를 들어 독립형 치료학적 물질로서 이용할 수 있으며, 여기서 TCP는 다른 물질 또는 모이어티에 연결되지 않으며, 다른, 예를 들어 치료학적 폴리펩타이드와의 융합 단백질로서 발현되지 않는다. 이러한 맥락에서, TCP는 단량체 또는 다량체로서, 예를 들어 이량체로 이용할 수 있다.
- [0222] 이에, 본 발명은 195 - 350번 아미노산들을 포함하는 TCP를 제공한다. 본 발명은 또한 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열로 필수적으로 구성되되, 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하는, TCP를 제공하며, 여기서
- [0223] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0224] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0225] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0226] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않으며, TCP는 선택적으로 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 대해 C 말단 트레지토프를 추가로 포함하며, 이는 링커, 예를 들어 아미노산 3-18개로 구성된 링커를 이용해 상기 서열에 연결될 수 있다. 이러한 TCP는 아미노산 195 - 350개, 바람직하게는, 200-330개, 예를 들어, 205-300개, 210 - 251개 또는 220-230개로 구성될 수 있다. 이러한 포맷으로 이용할 수 있는 바람직한 TCP는 본원에, 예를 들어 상기에 기술된다.
- [0227] 이러한 맥락에서, "필수적으로 구성되는"은 서열번호 1의 99-330번 위치에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 추가적인 서열의 존재, 특히 CH2 및 CH3 영역 (트레지토프가 병합된) 및 선택적으로 힌지부에 대응되는 서열의 존재를 배제하는 것은 아니다. TCP는 또한 신호 서열을 포함할 수 있다. 그러나, 바람직하게는, TCP는 항체의 VH 도메인 및/또는 CH1 도메인을 포함하지 않는다.
- [0228] 일부 추가적인 구현예들에서, TCP는 서열번호 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%의 서열 동일성을 가진 폴리펩타이드 서열로 구성되거나 또는 필수적으로 구성되되, 여기서 TCP는 선택적으로 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 C 말단 트레지토프를 추가로 포함하며, 이는 링커, 예를 들어 아미노산 3-18개로 구성된 링커를 이용해 서열에 연결될 수 있다.
- [0229] 일부 추가적인 구현예들에서, TCP는 서열번호 1의 99-330번 아미노산들에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%의 서열 동일성을 가진 폴리펩타이드 서열로 구성되거나 또는 필수적으로 구성되되, 여기서 TCP는 선택적으로 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 C 말단 트레지토프를 추가로 포함하며, 이는 링커, 예를 들어 아미노산 3-18개로 구성된 링커를 이용해 서열에 연결될 수 있다.
- [0230] 일부 추가적인 구현예들에서, TCP는 서열번호 1의 80-330번 아미노산들에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%의 서열 동일성을 가진 폴리펩타이드 서열로 구성되거나 또는 필수적으로 구성되되, 여기서 TCP는 선택적으로 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열에 C 말단 트레지토프를 추가로 포함하며, 이는 링커, 예를 들어 아미노산 3-18개로 구성된 링커를 이용해 서열에 연결될 수 있다.
- [0231] 이러한 맥락에서, "로 필수적으로 구성되는"은 TCP가 정제를 위한 친화성 태그와 같은 부가적인 구성성분을 포함할 수 있지만, 일반적으로 이러한 맥락에서 TCP는 자체 알레르겐과 같은 치료학적 또는 생리학적 효과를 가진 융합 단백질 또는 펩타이드를 포함하지 않는 것을 의미한다.
- [0232] 바람직하게는, 본 발명에 따른 TCP는 서열번호 1의 99-330번 위치 또는 트레지토프 서열, 특히 본원에 개시된 트레지토프 서열에 대한 서열 동일성이 50% 미만, 특히 75% 미만, 85% 미만, 90% 미만인 인접 아미노산 100개

초과로, 바람직하게는 50개 초과로, 더 바람직하게는 20개 초과로 이루어진 아미노산 서열을 포함하지 않는다.

- [0233] 이러한 TCP는 단량체일 수 있으며, 여기서 TCP는 전형적으로 이량체를 형성할 수 있는 부분을 포함하지 않으며, 즉 이량체화 할 수 있는 면역글로불린의 힌지부 또는 이의 일부를 포함하지 않는다. 나아가, 단량체는 또한 이량체화를 줄이기 위해 예를 들어 K292R 치환을 도입함으로써 CH3 도메인에서 변형될 수 있으며, 그 위치는 서열 번호 1을 참조한다.
- [0234] 대안적으로, 이러한 TCP는 다량체, 예를 들어, 이량체일 수 있다. TCP는 선택적으로 다량체화, 예를 들어 이량체 형성을 높이기 위해, 예를 들어 CH3 도메인에서 변형될 수 있다. 또한, TCP는 삼량체, 사량체, 오량체 또는 육량체일 수 있다. 다량체는 아래에서 추가로 특정된다. 바람직하게는, 단독 포맷으로서 TCP는 다량체, 특히 이량체를 형성한다.
- [0235] 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 TCP는 본질적으로 바람직하게는 기술된 서열 프레임 내에 및/또는 서열번호 1의 135-330번 위치에 대해 85% 이상의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 이종적인 트레지토프를 하나 이상 포함하는 Fc-부분 체인의 단량체, 이량체 또는 다량체에 해당하거나 또는 이로 구성되며, C-말단 트레지토프는 링커, 예를 들어 아미노산 3-18개로 구성된 링커를 이용해 서열에 연결될 수 있다.
- [0236] · 추가적인 항체 도메인을 포함하는 TCP
- [0237] 본 발명에 따른 TCP는, Fc-부분 체인에 대응되는 서열 및 트레지토프 서열과는 별개로, 추가의 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명은 면역글로불린 슈퍼패밀리 도메인을 추가로 포함하는, 본 발명에 따른 TCP를 제공한다.
- [0238] 예를 들어, 본 발명의 TCP는 적어도 항체의 VH 도메인과 CH1 도메인, 바람직하게는 항체 (전형적으로, IgG)의 항원-결합 부위를 포함할 수 있다. 항체의 항원 결합 부분에 대한 여러가지 구조들이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 본 발명의 TCP는 VH 도메인 및 CH1 도메인을 포함할 수 있으며, VL 및 CL 도메인을 가진 경쇄와 결합할 수 있으며, VH 도메인과 CH 도메인은 항원-결합 부분의 항원-결합부를 형성한다. 대안적으로, 항원-결합 도메인은 scFv일 수 있으며, 바람직하게는 scFv는 TCP와의 융합 단백질로서 발현된다.
- [0239] 대안적으로 또는 부가적으로, 이러한 TCP는 IgA의 CH3 도메인을, 선택적으로 IgA의 연결 영역 (joining region)을 추가로 포함할 수 있어, TCP 단량체 4개를 함유한 사량체 단백질을 제조하는 것이 가능하다. 예를 들어, 이러한 TCP는 IgM의 CH3 도메인과 CH4 도메인을 추가로 포함할 수 있으며, 그래서 TCP 단량체 10개를 함유한 다량체의 형성도 가능하다.
- [0240] · 추가의 물질이 연결된 TCP
- [0241] 본 발명에 따른 TCP는 하나 이상의 추가의 물질과 연결될 수 있다. 이러한 물질은, 예를 들어, 발현 또는 정제를 용이하게 하거나 또는 증가시키기 위해, 비-치료학적 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, TCP는 친화성 태그, 예를 들어, 알부민, 알부민-결합 도메인 또는 His-태그를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 TCP는 또한 링커, 예를 들어 GS 링커 또는 서열번호 107-110 중 임의의 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [0242] 본 발명에 따른 TCP는 부가적으로 또는 대안적으로 치료학적 또는 예방적 기능을 가진 하나 이상의 물질과 연결될 수 있다.
- [0243] 본 발명의 TCP는, 예를 들어, 물질에 공유 또는 비-공유적으로 연결될 수 있으며, 물질은 바람직하게는 부적절한 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역 관용을 부여하고자 하는 대상 물질이다. 본 발명의 맥락에서 "**면역 반응의 억제**"는, 면역 반응이 감소되거나 또는 완전히 없어지는 것을 의미한다. 이는 또한 면역 반응의 특성이 면역 반응의 부적절한 효과를 회피하거나 또는 낮추는 방식으로 바뀌는 경우를 포함한다. 나아가, 면역 반응은 또한 면역 반응의 억제에 의해 방지될 수 있다. 이러한 면역 반응의 억제 및/또는 면역 관용의 유도는 조절성 T 세포의 활성화에 의해 매개될 수 있다.
- [0244] 바람직하게는, TCP는 대상 물질과 공유적으로 연결된다. 이는 단량체 또는 다량체 (예, 이량체)로서 연결될 수 있다. TCP는 특히 다른 물질과 연결하기 쉽다. TCP는 폴리펩타이드로서 다른 단백질 또는 펩타이드에 특히 용이한 방식으로 제조할 기법에 의해 연결하여, TCP 융합 단백질을 구축할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 TCP 및 부적절한 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역 관용을 부여하고자 하는 대상 물질을 포함하는 TCP 융합 단백질에 관한 것이다.
- [0245] 융합 단백질에서, 물질은 바람직하게는 N-말단에서, 예를 들어, TCP에 존재하지 않는다면 CH1 도메인 또는 힌지

부 대신, 커플링된다 (전형적으로, 이량체화를 의도한다면, 힌지부가 존재하고, 이량체화를 의도하지 않는다면 힌지부는 생략됨). 융합 단백질은 링커, 예를 들어 GS 링커 또는 서열번호 107-110 중 임의의 링커를 통해 연결될 수 있다.

- [0246] 만일 힌지부가 TCP에 포함된다면, TCP는 또한 하나 이상의 이황화 결합을 통해 물질과 연결될 수 있다. TCP에서 라이신 잔기에 대한 화학적 커플링 역시 가능하다. 대안적으로, TCP는 이러한 물질과 비-공유적으로 연결될 수 있으며, 예를 들어 반데르 발스 상호작용, 이온성 상호작용 또는 소수성 상호작용, 극성 상호작용 (이중극자, 사중극자 또는 그 이상) 및 방향족 상호작용 (사중극자/사중극자 또는  $\pi/\pi$ )를 통해 물질과 결합할 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 결합은 생리학적 조건 하에 TCP 및 물질의 긴밀한 결합을 유지할만큼 충분히 안정적이다.
- [0247] TCP에 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 연결하는 것은, 예를 들어, 재조합 수단 및 방법에 의해, 매우 간단하다. 아울러, 펩타이드 및 폴리펩타이드는 자가 항원 또는 외래 항원과 같은 여러가지 요망되지 않은 면역 반응에 역할을 한다. 따라서, 바람직한 특정 구현예에서, 물질은 펩타이드 또는 폴리펩타이드 모이어티이다.
- [0248] "요망되지 않는 면역 반응"은, 예를 들어, 알레르기, 자가면역 또는 이식편에 대항하는 면역 반응, 예를 들어 이식편 거부 반응일 수 있다. 요망되지 않는 면역 반응은 주로 항체에 의해 또는 세포독성 T 세포와 같은 세포성 기전에 의해 매개될 수 있다. 예를 들어,  $T_H1$  또는  $T_H2$  반응일 수 있다.
- [0249] 상기한 물질은, 예를 들어, (a) 알레르겐, (b) 과민증 유도 물질, (c) 자가면역 반응, 예를 들어 자가항체의 표적 단백질, (d) 자가면역 반응의, 예를 들어 자가항체의 표적 에피토프, 또는 (e) 치료학적 물질일 수 있다.
- [0250] 용어 "**알레르겐**"은 일반적으로 당업자들에게 공지되어 있다. 알레르겐은 알레르겐에 노출된 개체에서 원치않는 또는 비정상적으로 활발한 면역 반응을 유발하는 능력을 가진, 비-자기 물질이다. 구체적으로, 알레르겐은 면역 글로불린 E (IgE) 반응을 통해 아토피 개체에서 1형 과민 반응을 자극할 수 있는 항원이다.
- [0251] 알레르겐에 대한 예로는 하기를 포함한다:
- [0252] (a) 셀러리 및 셀러리악, 옥수수 (corn 또는 maize), 계란 (전형적으로 알부민, 흰자), 콩류 (예, 콩, 완두콩, 땅콩, 대두), 우유, 해산물, 참깨, 콩 (soy), 견과류 (예, 피칸, 아몬드)와 같은 식품 알레르겐;
- [0253] (b) 곤충 독 (예, 벌독, 말벌 독, 모기 독);
- [0254] (c) 식물 꽃가루 (건초열), 예를 들어, 잔디 꽃가루 (예, 라이그라스, 티모시-그라스), 잡초 꽃가루 (예, 돼지풀, 플랜타고, 췌기풀, 아르메니아사 불가리스 (*Artemisia vulgaris*), 체노포듐 알BUM (*Chenopodium album*), 소렐), 나무 꽃가루 (예, 자작나무, 오리나무, 개암나무, 서어나무, 에스컬러스, 버드나무, 포플러, 플라타너스, 피나무속 (*Tilia*), 올레아 (*Olea*), 애쉬 주니퍼 (*Ashe juniper*), 알스토니아 스콜라리스 (*Alstonia scholaris*));
- [0255] (d) 약물 (예, 페니실린, 설폰아미드, 살리실레이트 (또한 여러가지 열매들에서 천연적으로 발견됨))
- [0256] (e) 동물성 제품 (예, Fel d 1 (고양이 알레르기), 모피 및 비듬, 바퀴벌레 (*cockroach calyx*), 양모, 집먼지 진드기 배설물.
- [0257] 일반적으로, 이러한 알레르겐의 관련 에피토프를 포함하는 단편을 이용하는 것만으로도 충분할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본 발명은 벌독의 에피토프, 단편 또는 완전한 펩타이드/단백질이 연결된 TCP, 말벌 독의 에피토프, 단편 또는 완전한 펩타이드/단백질이 연결된 TCP, 모기 독의 에피토프, 단편 또는 완전한 펩타이드/단백질이 연결된 TCP, 또는 식물 꽃가루의 에피토프, 단편 또는 완전한 펩타이드/단백질이 연결된 TCP를 제공한다.
- [0258] 면역학적 "**과민증 유발 물질**"은 면역학적 과민 반응, 즉 비-IgE 면역글로불린에 의해 매개되는 원치않는, 면역 시스템이 특정 물질을 이물질로서 인지하는, 면역학적 반응을 유발할 수 있는 비-자기 물질이다. 이러한 반응은, 알레르기와는 대조적으로, 일반적으로 긴 기간에 걸쳐 이루어진다. 과민증 유발 물질에 대한 예로는 글루텐, 살리실레이트 (이는 알레르기를 유발할 수도 있음) 등이 있다. 예를 들어,  $\alpha$ -/ $\beta$ -,  $\gamma$ - 또는  $\omega$ -글리아딘 또는 이의 원인 에피토프로부터 선택되는 단백질 또는 펩타이드와 같은 글루텐의 하나 이상의 성분이 이러한 맥락에서 고려될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한  $\alpha$ -글리아딘의 에피토프, 단편 또는 완전한 펩타이드/단백질이 연결된 TCP, 및/또는  $\beta$ -글리아딘의 에피토프, 단편 또는 완전한 펩타이드/단백질이 연결된 TCP, 및/또는  $\gamma$ -글리아딘의 에피토프, 단편 또는 완전한 펩타이드/단백질이 연결된 TCP, 및/또는  $\omega$ -글리아딘의 에피토프, 단

편 또는 완전한 펩타이드/단백질이 연결된 TCP, 및/또는 살리실레이트가 연결된 TCP를 제공한다.

- [0259] 자가 면역 반응의, 예를 들어 자가항체의 "**표적 단백질**" 또는 "**표적 에피토프**"들은 당업자들에게, 예를 들어, 자가항원 및 이와 관련한 질환 목록을 검색, 수득 및 다운로드를 허용하는, AAgAtlas 데이터베이스와 같은 데이터베이스로부터 알려져 있다. 이 데이터베이스는 <http://biokb.ncpsb.org/aagatlas>에서 자유롭게 접근가능하다. TCP와 자가-항원의 융합 단백질 또는 조합은 류마티스 질환, 하시모토 갑상선염 또는 IgG4-매개 자가면역 질환들에 적절하게 활용될 수 있다. 예를 들어, 표적 단백질은 쉐리악 질환의 경우에 조직 트랜스글루타미나제, 또는 1형 당뇨병의 경우에 인슐린 또는 인슐린 수용체 또는 섬세포 항원일 수 있다. 기타 표적 단백질은 갑상선 자극 호르몬 수용체 (TSHR) 또는 그레이브 질환에서의 기타 글라이브 질환 항원, 또는 자가면역 갑상선염에서의 갑상선 퍼옥시다제 및/또는 티로글로불린 TSHR일 수 있다. 표적 에피토프는 예를 들어 이들 표적 단백질들 중 임의의 것으로부터 유래한 에피토프, 특히 치료할 개체에 의해 MHC 상에 제시되는 상기한 단백질로부터 유래한 에피토프일 수 있다.
- [0260] 용어 "**치료학적 물질**"은 장애 또는 질환을 방지하거나 또는 치료하기 위해 이용할 수 있는 임의의 약물, 의약제 또는 기타 물질을 포함하며, 이러한 물질은 의약제로서 허가될 수 있다. 상당히 많은 수의 치료학적 물질들이 원치않는 면역 반응을 유발할 수 있다. 이러한 반응은 (전술한) 알레르기 반응이거나 또는 원치않는 반응일 수 있다. 예를 들어, 수많은 치료학적 물질들이 면역 시스템에 의해 외래의 것으로 인지된다. 이는 항-약물 항체 (ADA라고도 함)의 형성도 유발할 수 있다. 빈번하게는, 이러한 항체는 중화성이며, 즉 이는 물질이 의도한 치료학적 표적 (예, 특정 수용체)과 상호작용하지 못하도록 차단하거나 또는 치료학적 물질의 분해를 가속화함으로써 물질의 치료학적 효과를 차단한다. 이는 특히, 환자에 특정 내인성 단백질 또는 인자에 대해 유전자 결핍이 존재해 면역 시스템이 내인성 단백질 또는 인자에 대해 관용성을 유발하지 못하는 경우에, 특정 대체 요법과 관련하여 특히 적절하다. 따라서, 이러한 치료학적 물질에 대해 면역학적 관용을 부여하거나 및/또는 원치않는 면역 반응을 억제할 상당한 필요성이 존재한다. 이는 특정 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 옹고 인자, 융합 단백질 또는 단일클론 항체와 같은 치료학적 단백질 또는 펩타이드에서 특별한 문제이다. 추가적인 예는 일반적으로 원치않는 면역 반응이, 예를 들어 대체 요법의 과정 중에 치료학적 단백질 또는 펩타이드에 의해 유발되거나 또는 철회될 수 있는, 장애이다. 이러한 치료학적 물질로는 rhEPO, rhMGDF/TPO, 글루코세레브로시다제 (고세병),  $\alpha$ -글루코시다제 (포페병),  $\alpha$ -갈락토시다제 A (파브리병), IFN- $\alpha$ , IL-2, 인자 II, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI, 인자 XIII 등이 있다. 치료학적 물질에 대한 면역 반응은 원치않는 염증 또는 심지어 패혈증 쇼크를 유발할 수도 있다.
- [0261] 물론, 알레르겐, 과민증 유발 물질, 자가면역 반응의 표적 단백질, 예를 들어 자가항체의 표적 단백질 또는 치료학적 물질 전체를 TCP에 연결하여야 하는 것은 아니다. TCP가 투여될 개체의 MHC를 통해 제시되는 T 세포 에피토프들이 공지되어 있다면, 이 T 세포 에피토프 하나 이상을 TCP에 연결하는 것도 가능하다.
- [0262] 바람직하게는, 이러한 알레르겐, 과민증 유발 물질, 자가면역 반응의 표적 단백질 또는 표적 에피토프 또는 치료학적 물질과 TCP는 융합 단백질을 형성한다.
- [0263] 또한, 본 발명은 TCP 단량체 2개가 힌지부 내 이황화 결합 1 또는 2개를 통해 서로 공유 연결된 TCP 이량체를 포함하는 TCP 융합 단백질에 관한 것으로서, 융합 단백질은 각 단량체에 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역 관용을 부여하고자 하는 대상 물질을 포함할 수 있으며, 즉 이량체는 이러한 물질을 2개 포함한다.
- [0264] 특정 구현예에서, 이 물질은 면역글로불린의 전체 가변성 도메인을 포함하지 않는다. 나아가, 특정 구현예에서, 융합 단백질은 전장 면역글로불린을 생성하지 않는다.
- [0265] 그러나, 일반적으로, 연결되는 물질은 어떠한 방식으로든 제한되는 것은 아니다. 실제, 동정된 프레임에 대한 한가지 이점은 하나 이상의 이중적인 트레지토프를 항체의 Fc-부위에 전술한 바와 같이 프레임 A, B 및 C에 해당하는 위치에 삽입함으로써 거의 모든 항체의 면역원성을 쉽게 낮출 수 있는 가능성이다.
- [0266] 따라서, 특정 구현예에서, TCP는 항체 또는 Fc-융합 단백질의 일부분일 수 있다. 바람직하게는, 항체는 치료학적 항체이고, Fc-융합 단백질은 치료학적 Fc-융합 단백질이다. 이는 항체의 항원성 및/또는 중화성 항-약물 항체의 형성을 감소시킬 가능성이 있을 것이다. 즉, 이러한 항체 또는 Fc-융합 단백질의 효능 손상 및/또는 소거 가속화를 회피할 수 있다. 예를 들어, 치료학적 항체의 항원 결합 영역 또는 Fab 단편을 TCP와 융합할 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 이중적인 트레지토프를 전술한 방식에 따라 치료학적 항체의 Fc-부위에, 바람직하게는 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상에 직접 통합하는 것도 가능하다. 그러나, TCP는 이러한 항체와, 바람직하게는 중쇄의 C-말단에서 융합될 수 있다.

[0267] 치료 항체 및 치료학적 Fc 융합 단백질에 대해 적합한 예들이 당업자들에게 공지되어 있다. 이러한 치료 항체에 대한 예는 압시시맵 (Abciximab), 아브릴루맵 (Abrilumab), 아달리무맵 (Adalimumab), 아두카누맵 (Aducanumab), 아파세비쿠맵 (Afasevikumab), 아펠리모맵 (Afelimomab), 알렘투주맵 (Alemtuzumab), 아니프롤루맵 (Anifrolumab), 안루킨주맵 (Anrukinzumab), 바실리시맵 (Basiliximab), 벨리무맵 (Belimumab), 벤랄리주맵 (Benralizumab), 베르틸리무맵 (Bertilimumab), 베박시주맵 (Bevacizumab), 벨레셀루맵 (Bleselumab), 블로소주맵 (Blosozumab), 브라지쿠맵 (Brazikumab), 브렌투시맵 (Brentuximab), 브리아키누맵 (Briakinumab), 브로달루맵 (Brodalumab), 카나키누맵 (Canakinumab), 카투막소맵 (Catumaxomab), 세델리주맵 (Cedelizumab), 세르톨리주맵 (Certolizumab), 세투시맵 (Cetuximab), 클라자키주맵 (Clazakizumab), 클레놀릭시맵 (Clenoliximab), 크로테두맵 (Crotedumab), 다클리주맵 (Daclizumab), 데노수맵 (Denosumab), 두필루맵 (Dupilumab), 에쿨리주맵 (Eculizumab), 엘델루맵 (Eldelumab), 에미시주맵 (Emicizumab), 에노키주맵 (Enokizumab), 파시누맵 (Fasinumab), 페자키누맵 (Fezakinumab), 플레티쿠맵 (Fletikumab), 풀라누맵 (Fulranumab), 가빌리모맵 (Gavilimomab), 김실루맵 (Gimsilumab), 골리무맵 (Golimumab), 구셀루맵 (Guselkumab), 이브리투모맵 (Ibritumomab), 인플릭시맵 (Infliximab), 이놀리모맵 (Inolimomab), 이필리무맵 (Ipilimumab), 이톨리주맵 (Itolizumab), 익세키주맵 (Ixekizumab), 레브리키주맵 (Lebrikizumab), 레톨리주맵 (Letolizumab), 룰리주맵 페골 (Lulizumab pegol), 마브릴리무맵 (Mavrilimumab), 미리키주맵 (Mirikizumab), 무로모납-Cd3 (Muromonab-CD3), 나탈리주맵 (Natalizumab), 네몰리주맵 (Nemolizumab), 오둘리모맵 (Odelumab), 오파투무맵 (Ofatumumab), 올렌달리주맵 (Olenalizumab), 올로키주맵 (Olokizumab), 오말리주맵 (Omalizumab), 오피시누맵 (Opicinumab), 오텔릭시주맵 (Otelixizumab), 오티리맵 (Otilimab), 옥셀루맵 (Oxelumab), 오조랄리주맵 (Ozoralizumab), 팔리비주맵 (Palivizumab), 파니투무맵 (Panitumumab), 파스콜리주맵 (Pascolizumab), 펌브롤리주맵 (Pembrolizumab), 페라키주맵 (Perakizumab), 퍼투주맵 (Pertuzumab), 플라쿨루맵 (Placulumab), 프틸릭시맵 (Priliximab), 라니비주맵 (Ranibizumab), 리산키주맵 (Risankizumab), 리툽시맵 (Rituximab), 론탈리주맵 (Rontalizumab), 사릴루맵 (Sarilumab), 세쿠키누맵 (Secukinumab), 시팔리무맵 (Sifalimumab), 시플리주맵 (Siplizumab), 시루쿠맵 (Sirukumab), 탈리주맵 (Talizumab), 타네주맵 (Tanezumab), 테플리주맵 (Teplizumab), 테제펠루맵 (Tezepelumab), 티블리주맵 (Tibulizumab), 톡실리주맵 (Tocilizumab), 토시투모맵 (Tositumomab), 트랄로키누맵 (Tralokinumab), 트라스투주맵 (Trastuzumab), 우블리툽시맵 (Ublituximab), 우스테키누맵 (Ustekinumab), 베돌리주맵 (Vedolizumab) 및 자놀리무맵 (Zanolimumab)이다. 치료학적 Fc 융합 단백질에 대한 예로는 아바타셉트 (Abatacept), 알레파셉트 (Alefacept), 벨라타셉트 (Belatacept), 에타너셉트 (Etanercept) 및 인자 VIII-Fc-융합체 및 인자 IX-Fc 융합체 등이 있다.

[0268] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCP를 포함하는 조작된 항체 또는 Fc-융합 단백질에 관한 것이며, 바람직하게는, TCP는 항체 또는 Fc-융합 단백질의 Fc-부위를 치환하거나 또는 본질적으로 치환한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 포함하는 조작된 항체 또는 Fc-융합 단백질에 관한 것으로서, TCP는 서열번호 1에 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이러한 이종적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,

[0269] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0270] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0271] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0272] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 본 발명은 또한 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 포함하는 조작된 항체 또는 Fc-융합 단백질에 관한 것으로서, 이러한 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이종적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,

[0273] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0274] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0275] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0276] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 이러한 TCP는 상기에서 추가적으로 정의

되는 TCP일 수 있다. 본 발명은 또한 서열번호 1의 104-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 포함하는 조작된 항체 또는 Fc-융합 단백질에 관한 것으로서, 이러한 TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,

[0277] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0278] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0279] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0280] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 이러한 TCP는 상기에서 추가적으로 정의되는 TCP일 수 있다. 본 발명은 또한 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 적어도 85% 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 포함하는 조작된 항체 또는 Fc-융합 단백질에 관한 것으로서, TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,

[0281] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0282] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0283] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0284] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 이러한 TCP는 상기에서 추가적으로 정의되는 TCP일 수 있다.

[0285] 바람직하게는, 상기한 치료 항체의 임의의 필수적인 작동자 기능은 유지되어야 한다. 예를 들어, 당화 부위가 중요할 경우, 당화 부위는 유지하거나, 및/또는 수용체에 대한 결합성이 중요할 경우에는 이를 유지하여야 한다.

[0286] · 다량체

[0287] 본 발명은 또한 각각의 TCP 단량체가 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는, 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP) 단량체 2개 이상을 포함하는, TCP 다량체, 바람직하게는 TCP 이량체에 관한 것으로, 각각의 TCP 단량체는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,

[0288] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0289] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0290] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0291] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 바람직하게는, 이러한 TCP는 인간 Fc-부분 체인으로부터 유래한 서열을 포함한다.

[0292] 또한, 본 발명은, 각각의 TCP 단량체가 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성 또는 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는, TCP 단량체를 2개 이상 포함하는 TCP 다량체, 바람직하게는 TCP 이량체를 제공하며, 여기서 각각의 TCP 단량체는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,

[0293] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0294] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0295] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

- [0296] 서열 프레임 A, B 및 C는 예를 들어 상기에서 추가적으로 정의되는 바와 같이 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 또한, 본 발명은, 각각의 TCP 단량체가 서열번호 1의 104-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성, 또는 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는, TCP 단량체를 2개 이상 포함하는 TCP 다량체, 바람직하게는 TCP 이량체를 제공하며, 여기서 각각의 TCP 단량체는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,
- [0297] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0298] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0299] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0300] 서열 프레임 A, B 및 C는 예를 들어 상기에서 추가적으로 정의되는 바와 같이 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다.
- [0301] 다량체는 단량체, 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체일 수 있거나, 또는 TCP 단량체를 6개보다 더 많이 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 TCP 다량체는 단량체를 2-10개, 더 바람직하게는 2-6개 포함한다. TCP의 이량체 또는 다량체 형태를 수득하기 위해, 면역글로불린 Fc-부분 체인의 힌지부를 통해 형성되는 이황화 결합을 이용할 수 있다.
- [0302] 당업자라면, 이러한 TCP 다량체 내 TCP 단량체들이 완전히 동일해야 하는 것은 아님을, 알 것이다. 그러나, 본 발명에 따른 TCP 다량체에서, 단량체들은 실질적으로 유사한 구조를 가질 것이다. 바람직하게는, 다량체 내 각 단량체는 다량체에 포함된 다른 단량체에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 더 바람직하게는 90%, 95%의 서열 동일성을 가져야 한다. 단량체들이 (실질적으로) 동일할 (예, 아미노산 서열 동일성이 95% 이상, 특히 97% 이상인) 경우, 이는 접두사 "동종" (예, 동종이량체에서)으로 식별될 수 있다. 만일, 다량체 내 여러가지 단량체들이 관련된 차이가 있다면 (예, TCP 단량체들은 하나 이상의 서로 다른 트레지토프를 포함함), 이들은 접두사 "이종" (예, 이종이량체에서)으로 식별될 수 있다.
- [0303] TCP 이량체가 특히 바람직하다. 이에, 본 발명은 또한 TCP가 본원에 기술된 바와 같이 TCP 2개 이상을 포함하는 이량체를 형성하는, 본원에 기술된 바와 같은 TCP에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 TCP 단량체 2개를 포함하는 TCP 이량체를 제공한다. 예를 들어, TCP 단량체는 하나 이상의 이황화 결합, 바람직하게는 2개의 이황화 결합을 통해 공유적으로 연결될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 TCP 단량체는 각각 이량체 형성을 달성할 수 있는 면역글로불린으로부터 유래한 힌지부 또는 이의 일부를 포함한다. 보다 구체적으로, 이러한 TCP 단량체는 각각 선택적으로 서열번호 1의 103-113번 위치에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 90% 또는 100%의 서열 동일성을 가진, 이량체 형성을 달성할 수 있는, 부분을 적어도 포함하며, 바람직하게는 서열번호 1의 109번과 112번 아미노산 위치에 시스테인 잔기를 유지한다. 이량체화를 가능하게 하는 부분적인 힌지부는 서열번호 1의 104-113번 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 100%의 서열 동일성을 가진다.
- [0304] TCP는 하나 이상의 (예를 들어, 2개의) 이황화 결합을 통해 이량체화된 (TCP 단량체를 2개 포함하는) 이량체를 형성할 수 있으며, 바람직하게는, TCP는 면역글로불린의 힌지부를 통해 이량체화된 TCP 단량체 2개로 이루어진 이량체를 형성한다. 당업자들에게 공지된 바와 같이, 면역글로불린의 과파인 분해를 통해 수득가능한 Fc-단편은 전형적으로 이량체이다. 마찬가지로, Fc-부분 체인의 힌지부가 TCP에 포함된다면, 그 TCP는 각각의 힌지부를 통해 자발적으로 이량체화될 가능성이 높다. 이량체화는 비-공유적 CH3-CH3-상호작용을 통해 추가적으로 지지될 수도 있다.
- [0305] 대안적으로, 이러한 TCP 다량체에서, TCP 단량체들은 서로, 예를 들어 융합 단백질로서 또는 유연한 또는 유연하지 않은 링커를 통해 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합될 수 있다. 또한, 이량체화는 예를 들어 루신 지퍼를 통해 달성될 수 있다.
- [0306] 이러한 TCP 이량체는 일반적으로 대응되는 단량체와 비교해 안정성 및 반감기가 개선되는 경향이 있다. TCP 이량체는 동종이량체 또는 이종이량체일 수 있다. 동종이량체는 세포성 또는 단백질-프리 발현 시스템을 이용해 신뢰할 수 있는 방식으로 제조하기 더 용이할 수 있다. 한편, 이종이량체는 서로 다른 트레지토프를 여러개, 예를 들어 서로 다른 트레지토프를 최대 8개 통합할 수 있는 이점을 가질 수 있다 (각 단량체에서, 프레임 A, B, C 각각에 트레지토프 1개, 그리고 C-말단 트레지토프 1개).

- [0307] 이종이량체를 구축하기 위한 기법은 당업자들에게 일반적으로 알려져 있다. 이러한 이종이량체 형성은, 여러가지 TCP 단량체의 공동-발현 외에도, 특정한 TCP 변형에 의해 유도할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어, (I) 번역글로불린 Fc-부분 체인의 CH3 도메인에 대응하는 TCP 영역에 시스테인 쌍을 도입함으로써 이황화 결합 형성, (II) 여러가지 TCP 단량체들에 대해 반대로 하전된 잔기에 의한 염 형성을 촉진하는 하전된 잔기의 도입, 및 (III) 여러가지 TCP 단량체에서 더 작거나 또는 각각 더 큰 아미노산의 치환에 기반한 KiH (knobs-into-holes) 전략 등의 이종 특이성 항체 포맷의 중쇄-중쇄 쌍 형성 방법들로부터 공지되어 있다. 특히, KiH 전략이 매우 효율적이다.
- [0308] TCP 육량체 역시 형성될 수 있다. 조작된 6가 Fc 단백질들은 당해 기술 분야에 공지되어 있다 (Rowley et al. 2018. Communications Biology 1:146).
- [0309] 본원에 기술된 바와 같이, TCP 다량체는 서열번호 1의 특정 영역에 대한 서열 동일성이 85% 이상인 서열 및 트레지토프 이외의 다른 서열을 본질적으로 포함하지 않는 TCP 단백질을 포함하거나, 또는 다른 번역글로불린 도메인, 예를 들어, 항체의 항원-결합 부분 또는 기타 폴리펩타이드, 예를 들어 번역 반응을 조절하고자 하는 대상 폴리펩타이드를 추가로 포함하는, TCP 단백질을 포함할 수 있다. 물론, 혼합된 다량체들도 제조될 수 있다.
- [0310] · 단량체
- [0311] 그럼에도 불구하고, 이량체 또는 다량체 형성이 바람직하지 않은 경우도 있다. 이량체 또는 다량체 형성을 방지하는 것이, 예를 들어, 만일 TCP 서열이 본 발명의 도처에서 보다 상세히 기술된 바와 같이 다른 물질과 조합되거나 및/또는 이에 융합될 경우에, 요망될 수 있다. 예를 들어, 힌지부의 시스테인 잔기들이 TCP를 포함하는 융합 단백질에서 융합 파트너와 원치않게 상호작용할 수 있다.
- [0312] 이러한 경우, 힌지부를 통한 기타 원치않는 이황화 결합 또는 이량체 형성을 피하는 것이 권장될 수 있으며, 예를 들어, 이러한 경우에, TCP는 힌지부를 포함하지 않아야 한다. 대안적으로, 이황화화를 담당하는 시스테인 잔기는 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이 결손 또는 치환될 수 있다. 예를 들어, 해당 시스테인 잔기들 중 하나 이상이 세린 또는 다른 아미노산으로 치환되어, 제조되는 분자의 이량체 형성이 방지될 수 있다. 대안적으로, 이량체 또는 다량체의 형성은 화학적 반응, 예를 들어 환원 및 후속적인 알킬화에 의해 발현 및 정제 후 없앨 수 있다. 예를 들어, 힌지부의 시스테인 기반의 이황화 결합은 환원성 반응에 의해, 예를 들어, 환원된 글루타티온, 2-머캅토에틸아민, 다이티오프레일 또는 트리스-2-카르복시에틸포스핀 하이드로클로라이드와 같은 환원성 물질을 이용해 파괴할 수 있다. 요오도아세트아미드와 같은 시약을 이용한 후속적인 알킬화는 시스테인들 간의 이황화 결합의 재형성을 방지할 수 있다.
- [0313] 핵산, 숙주 세포 및 형질전환 동물
- [0314] 또한, 본 발명은 본원에 명시된 바와 같은 본 발명에 따른 TCP를 암호화하는 핵산, 예를 들어, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 암호화하는 핵산을 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이종적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,
- [0315] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0316] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0317] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0318] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. TCP는 인간 Fc-부분 체인으로부터 유래한 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명은 본원에 명시된 바와 같은 본 발명에 따른 TCP를 암호화하는 핵산, 예를 들어, 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 암호화하는 핵산을 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이종적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,
- [0319] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0320] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

- [0321] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하고,
- [0322] 서열 프레임 A, B 및 C는 예를 들어 상기에서 정의되는 바와 같이 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 또한, 본 발명은 본원에 명시된 바와 같은 본 발명에 따른 TCP를 암호화하는 핵산, 예를 들어, 서열번호 1의 104-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 암호화하는 핵산을 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이종적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,
- [0323] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0324] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0325] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0326] 서열 프레임 A, B 및 C는 예를 들어 상기에서 정의되는 바와 같이 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다. 또한, 본 발명은 본원에 명시된 바와 같은 본 발명에 따른 TCP를 암호화하는 핵산, 예를 들어, 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 암호화하는 핵산을 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이종적인 하나 이상의 트레지토프를 포함하고, 이종적인 트레지토프는 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,
- [0327] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0328] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0329] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0330] 서열 프레임 A, B 및 C는 예를 들어 상기에서 정의되는 바와 같이 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다.
- [0331] 핵산에 의해 암호화된 TCP는 예를 들어 융합 단백질일 수 있다. 바람직하게는, 핵산은 발현된 단백질의 분비, 즉 용이한 정제를 가능하도록 신호 펩타이드를 포함하고 있는 TCP를 암호화한다. 바람직한 구현예에서, TCP를 암호화하는 서열은 진핵생물 신호 펩타이드, 예를 들어 서열번호 22 (METDTLLLVWLLLVWPGSTG)에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 가진 N-말단 신호 펩타이드를 암호화하는 서열에 기능적으로 연결된다.
- [0332] 핵산은 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서, 바람직하게는 진핵생물 숙주 세포에서 상동적인 재조합에 적합한 벡터일 수 있다. 예를 들어, 벡터는 CRIPR/Cas 기반의 재조합에 적합할 수 있다.
- [0333] 핵산은 또한 발현 벡터일 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 TCP를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 발현 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 TCP를 발현하기에 적합할 것이다. 재차, 이러한 발현 벡터는 TCP 융합 단백질로서 등의 본 명세서 전체에 개시된 임의의 구현예에서 TCP를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.
- [0334] 이러한 발현 구조체를 구축하는데 적합한 발현 벡터는 당업자들에게 잘 알려져 있다. 각 발현 시스템 및 각 세포에 따라, 발현 구조체를 코돈-최적화하거나 및/또는 이를 적절한 벡터에 클로닝하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0335] 바람직하게는, 발현 벡터에서, 핵산은 적절한 프로모터에 기능적으로 연결된다. 이러한 프로모터들은 일반적으로 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 바람직하게는, 프로모터는 숙주 세포에서, 특히 진핵생물 숙주 세포에서 TCP의 발현을 매개하는데 적합하다. 이는 또한 형질전환 동물, 예를 들어 인간에서 발현하기에 적합할 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 조직-특이적인 프로모터일 수 있다. 예를 들어, 조류 알에서 발현시기에 적합한 프로모터를 선택할 수 있다. 또한, 프로모터는 소, 양, 염소 또는 낙타과 같은 우유-생산 동물에서 우유로 분비하는 세포에서의 발현을 매개할 수도 있다. 또한, 프로모터는 자가면역-반응을 유발하는 항원을 발현하는 인간 세포 및/또는 수지상 세포, 대식세포 및/또는 B 세포와 같은 항원-제시 세포에서 발현을 매개할 수 있는 조직-특이적인 프로모터일 수 있다.
- [0336] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCP를 암호화하는 핵산, 예를 들어 발현 벡터를 포함하는, 바람직하게는 TCP를 발현할 수 있는, 진핵생물 또는 원핵생물 숙주 세포를 제공한다.
- [0337] 바람직하게는, 세포는 진핵생물 세포이다. 세포는 포유류 세포일 수 있다. 예를 들어, 치료학적 용도를 위해, 생산된 TCP는 예를 들어 당화와 같은 번역 후 수정 측면에서 인간 단백질에 더 가까울 수 있으므로, 진핵생물, 바람직하게는 포유류 세포를 이용하는 것이 유리하다. 적절한 숙주 세포들이 공지되어 있다. 예를 들어, 세포는

상피 세포, 단핵구-유래 세포, 예를 들어, 대식세포, 수지상 세포, B 세포, 섬세포 또는 섬유모세포 세포일 수 있다. 더 바람직한 예는 HEK 293, CAP-T 세포, CAP-Go, CHO (예, CHO DG44), COS (예, COS-1 또는 COS-7), BHK-21, Jurkat, Peer, CML T1, EL4, T2, HeLa, MDCKII 및 Vero이다. 바람직한 특정 구현예에서, 세포는 HEK293 세포 또는 CAP-T 세포 또는 CAP Go 세포이다.

[0338] 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 형질전환 동물, 바람직하게는 비-인간 동물, 예를 들어, 마우스, 랫, 토끼, 기니아 피그, 원숭이, 유인원, 돼지, 개, 고양이, 낙타, 소, 양, 염소 또는 닭과 같은 조류를 추가로 제공한다. 형질전환 동물, 예를 들어 형질전환 암컷 동물이 바람직하게는 하나 이상의 세포 또는 조직에서 TCP를 발현할 수 있으며, 예를 들어, 낙타, 소, 양 또는 염소는 TCP를 자신의 모유로 분비할 수 있다. 형질전환 조류 역시 본 발명의 TCP를 포함하는 알을 낳을 수 있다. 이러한 형질전환 동물은 따라서 본 발명의 TCP를 생산하는데 이용할 수 있다. 이는 또한 연구 목적으로 이용할 수도 있다.

[0339] 제조 방법

[0340] 본 발명은 본 발명의 TCP를 암호화하는 핵산의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0341] (a) 면역글로불린 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgA, IgD, IgE, 바람직하게는, IgG1) Fc-부분 체인 또는 이의 일부분, 예를 들어, wt Fc 영역 체인을 암호화하는 핵산 서열을 제공하는 단계,

[0342] (b) 하나 이상, 예를 들어, 2, 3 또는 4개의 이중적인 트레지토프의 핵산 서열을, 단계 (a)의 핵산 서열에, 바람직하게는 본원에 정의된 바와 같이 서열번호 1에 따른 면역글로불린 Fc-부분 체인의 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상에 대응되는 위치에 도입하는 단계,

[0343] (c) 단계 (b)의 서열을 가진 핵산을 구축하는 단계.

[0344] 본 발명은 또한 TCP를 암호화하는 핵산 또는 이러한 TCP를 포함하는 단백질을 암호화하는 핵산을 제조하기 위한 면역글로불린 Fc-부분 체인의 핵산 서열의 용도를 제공한다.

[0345] TCP를 암호화하는 핵산 서열은 매뉴얼에 따라 또는 인 실리코로 설계할 수 있으며, 선택적으로, 이후 이러한 TCP 또는 단백질을 암호화하는 핵산을 재조합 또는 화학적으로 합성할 수 있다. 적절한 방법들이 공지되어 있으며, 당해 기술 분야의 당업자들이 이용가능하다.

[0346] 본 발명은 본 발명의 TCP의 제조 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 TCP는 인공 또는 조작된 단백질이며, 이는 자연적으로 생성되지 않는다. TCP는 당업자에게 적절한 것으로 간주되는 임의의 단백질 합성 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이는 재조합 기법이거나 또는 비-재조합 기법일 수 있다. 예를 들어, TCP는 세포 배양물에서 발현에 의해 또는 화학적 단백질 합성에 의해 생산할 수 있다. 그러나, 세포성 또는 비-세포성 시스템에서 재조합 발현은 잘 확립된 방법이며 비교적 저렴하므로, 이 방법이 바람직하다. 재조합 발현에서, 본 발명에 따른 TCP를 이용해 달성가능한 양호한 발현 수준이 특별한 장점이다.

[0347] TCP를 클로닝, 발현 및 정제하는데 적합한 방법들은 예를 들어 J. Sambrook and D. Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)과 같은 실험실 매뉴얼로부터 채택할 수 있다.

[0348] 또한, 본 발명은, 예를 들어, (a) TCP를 암호화하는 핵산을 포함하는 적절한 발현 벡터를 구축하는 단계, (b) 발현 벡터를 적절한 숙주 세포로 형질감염시키는 단계, (c) 숙주 세포를 TCP의 발현을 허용하는 조건에서 배양하는 단계, 및 (d) TCP를 단리하는 단계를 포함하는, 본원에 기술된 바와 같은 TCP의 제조 방법을 제공한다.

[0349] 구체적으로 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 TCP의 제조 방법을 제공한다:

[0350] (a) 본 발명의 숙주 세포를 TCP를 발현시키기에 적절한 조건에서 배양하는 단계;

[0351] (b) 단계 (a)에서 발현된 TCP를 포함하는 세포 또는 배지를 회수하는 단계;

[0352] (c) TCP를 단리하는 단계;

[0353] (d) 선택적으로, 단계 (c)의 TCP를 약제학적으로 허용가능한 조성물 형태로 제형화하는 단계.

[0354] 아울러, 선택적으로, 단계 c)의 단백질 또는 단계 d)의 조성물은 적절한 용기, 예를 들어 주사기 안에 충전할 수 있다.

- [0355] 본 발명의 TCP는, 특히 TCP가 신호 서열없이 발견되는 경우, 세포로부터 단리할 수 있다. 또한, 이는 특히 TCP가 세포의 분비를 위해 신호 서열을 이용해 발견되는 경우, 배지로부터 단리할 수도 있다.
- [0356] 단리는 본 발명의 맥락에서 다양한 순도 수준으로 정제하는 것을 의미할 수 있다. 단리는 세포 또는 배지로부터 하나 이상의 비-TCP 성분을 제거하거나 또는 감소시킨다. 예를 들어, TCP의 순도는 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5%일 수 있으며, 이때 %는 w/w이다.
- [0357] 이용가능한 단리 또는 정제 방법 및 단계들은 당업자들에게 공지되어 있으며, 적절한 것으로 간주되는 바와 같이 적용할 수 있다. 그 예로는 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 여과, 나노여과, 석출 (예, 에탄올 석출), 환외여과 및/또는 정용여과 등이 있다. 요구되는 순도에 따라, 일차 정제, 중간 정제 및 폴리싱 (polishing)과 같은 여러가지 단리 단계들을 조합할 수 있다. 아울러, 정제된 TCP는, 예를 들어 환외여과 및/또는 정용여과를 이용해, 이후 농축하여 적절한 완충제 또는 약학적 조성물로 제형화할 수 있다. 이러한 방법은 또한 예를 들어 방사선 조사 또는 무균 여과에 의한 살균 처리를 특히 치료학적 용도를 위해 포함할 수 있다.
- [0358] 예를 들어, 만일 TCP가 단백질 A 또는 단백질 G에 결합한다면, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A 또는 단백질 G를 기반으로 할 수 있다.
- [0359] 본 발명의 TCP에 포함된, 면역글로불린 Fc-부분 체인 서열을 겨냥하는 다클론 또는 단일클론 항체의 이용을 포함하는 친화성에 기반한 단리 방법이 특히 단리하는데 유용한 것으로 밝혀져 있다. 따라서, 예를 들어, 단계 (c)는 친화성 물질에 TCP를 흡착시키는 것을 포함할 수 있으며, 친화성 물질은 바람직하게는 인간 Ig의 Fc-부위에 대한 다클론 항체를 포함하며, 여기서 단계 (c)는 선택적으로 친화성 크로마토그래피를 포함한다. 단일클론 항체는 통상적으로 다클론 항체보다 더 잘 제어할 수 있다. 반면, 다클론 항체는 이의 구체적인 서열과 무관하게 여러가지 TCP를 인지하는 이점을 가진다. 따라서, 다클론 항체 또는 단일클론 항체가 본 발명의 TCP를 단리하는데 유용할 수 있다.
- [0360] 대안적으로, 만일 TCP가 친화성 태그를 포함한다면, 이는 이러한 친화성에 기반하여, 예를 들어, 금속 킬레이션 친화성 매트릭스, 예를 들어 His-태그의 경우 Ni<sup>2+</sup> 친화성 매트릭스를 통해 단리할 수 있다. TCP 상의 친화성 태그, 예를 들어, FLAG 태그를 겨냥하는 항체 역시 단리하는데 이용할 수 있다. 친화성-기반의 단리는 친화성 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 친화성 흡착을 컬럼에서 또는 배치 형태로 수행할 수 있다.
- [0361] 당해 기술 분야의 당업자라면, 전술한 모든 용도 및 방법에 대해, 가능한 또는 바람직한 트레지토프, Fc-부분 체인, 서열 프레임, 그리고 병합 및 위치 규정 등의 본원의 도처에 기술된 바람직한 TCP 및 TCP의 특징이 마찬가지로 적용됨이 자명할 것이다. 마찬가지로, TCP를 포함하는 다량체 및 융합 단백질을 설계 및 제조할 수 있다.
- [0362] TCP의 용도
- [0363] 본 발명에 따른 TCP는 하기 등의 다양한 방식으로 유용하다:
- [0364] 1) 생산된 TCP로부터 트레지토프의 효소적 절단 및 후속적인 정제에 의한, 단리된 트레지토프를 발현 및 생산하기 위해,
- [0365] 2) 예를 들어 TCP 단량체 또는 다량체, 특히 TCP 이량체로서, 단독 치료제로서 사용하기 위해,
- [0366] 3) 면역 반응을 억제하거나 및/또는 관용을 유도하고자 하는 대상 물질과의 공동-투여로 이용하기 위해, 여기서, 공동-투여는 TCP가 물질에 연결되지 않은 형태 또는 TCP가 물질에 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결된 형태로 이루어질 수 있으며, 예를 들어 TCP를 포함하는 융합 단백질에 이용하기 위해, 특히 융합 단백질에서 비-TCP 융합 파트너에 대한 면역 반응을 억제하거나 및/또는 융합 파트너에 대한 면역 관용을 유도하기 위해,
- [0367] 4) 시험관내 방법, 예를 들어 조절성 T 세포를 시험관내 활성화하기 위해, 또는
- [0368] 5) 연구에 이용하기 위해.
- [0369] 제1 용도에서, TCP는 트레지토프를 생산하는데 이용할 수 있다. 유리하게는, 본 발명에 따른 TCP는 트레지토프의 생산, 특히 재조합 생산을 용이하게 한다. 따라서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 하나 이상의 트레지토프를 포함하거나 또는 이로 구성되는 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 제조 방법을 제공한다:

- [0370] a) 본 발명에 따른 TCP를 제공하는 단계,
- [0371] b) TCP로부터 하나 이상의 트레지토프를 포함하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 추출하는 단계,
- [0372] c) 선택적으로, 단계 b)로부터 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 정제하는 단계.
- [0373] 단계 a)는 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 TCP를 제조하는 단계들을 포함할 수 있다. 단계 b)는 임의의 수단 또는 방법에 의해, 예를 들어 화학적 또는 효소적 추출에 의해 수행할 수 있다. 유리하게는, TCP에 포함된 트레지토프(들)에는 효소적 절단부가 측면에 위치하여, 트레지토프(들)를 포함하거나 또는 이로 구성되는 폴리펩타이드(들) 또는 펩타이드(들)에 대한 지정된 추출이 가능할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 맥락에서 "측면에 위치한"은 효소적 절단부가 트레지토프에 매우 인접하게, 더 바람직하게는 트레지토프의 최말단부로부터 아미노산 잔기 20개 미만, 15개 미만 또는 10개 미만의 거리에 위치하는 것을 의미한다.
- [0374] 당해 기술 분야의 당업자라면, 반드시 트레지토프로만 구성된 펩타이드를 제공해야하는 것은 아님을, 알 것이다. 추가의 아미노산을 포함하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제공하는 것으로도 완전히 충분하거나 또는 심지어 유익할 수 있다. 따라서, 예를 들어 트레지토프(들)의 측면 영역에, 예를 들어, 효소적 인지 및/또는 절단 부위가 선택되고, 보다 융통성있게 포함될 수 있다. 아울러, 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 예를 들어 부가적인 유용한 아미노산 잔기, 예를 들어 도처에 언급된 정제 태그를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 효소 인지 및/또는 절단 부위가 본 명세서 도처에서 보다 상세히 기술된 바와 같이 TCP의 서열 프레임 A, B 또는 C 중 어느 하나에 위치된다. 바람직하게는, 트레지토프에 연결되는 임의의 태그 역시 서열 프레임 A, B 또는 C 중 어느 하나에 위치된다.
- [0375] 결론적으로, 본 발명은 또한 본 발명에 따라 수득가능한 하나 이상의 트레지토프를 포함하거나 또는 이로 구성되는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0376] 하나 이상의 트레지토프를 포함하거나 또는 이로 구성되는 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 적절한 것으로 간주되는 임의의 방법에 의해 정제할 수 있다. 적절한 방법들이 공지되어 있으며, 예를 들어 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 여과, 나노여과, 석출 (예, 에탄올 석출), 한외여과, 정용 여과 등이 있다. 적절한 트레지토프 정제 방법들은 WO 2008/094538A2에도 기술되어 있다.
- [0377] 아래 실시예에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 TCP의 발현 수준은 트레지토프만 발현하는 것보다 훨씬 우수하다. 따라서, TCP로부터 트레지토프를 제조하는 본원에 기술된 방식이 유용하다.
- [0378] 단독 치료제로서 또는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 관용을 유도하고자 하는 대상 물질과 공동-투여하는데 이용하기 위한 의학적 용도들은 아래에서 보다 상세히 기술된다.
- [0379] 본 발명의 TCP는 또한 시험관내에서 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은, 항원 제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포, 대식세포 및/또는 B 세포) 및/또는 T 세포와 같은 면역 세포를 본 발명에 따른 TCP, 본 발명에 따른 핵산 또는 본 발명에 따른 숙주 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 면역 반응을 조절하기 위한, 바람직하게는 면역 반응을 억제하거나 또는 관용을 유도하기 위한, 예를 들어, 시험관내 방법을 제공하며, 여기서, 선택적으로, 이러한 면역 반응은 TCP가 공유 또는 비-공유 연결된 물질, 또는 TCP, 핵산 또는 숙주 세포와 혼합되거나 또는 실질적으로 동시에 접촉되는 물질에 대한 면역 반응이다.
- [0380] 예를 들어, 본 발명은 환자로부터 단리한 조절성 T 세포를 활성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방식으로 활성화된 조절성 T 세포는 환자에게 투여하기 위한 것일 수 있으며, 예를 들어, 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하는데 이용하기 위한 것일 수 있다. 예를 들어, 이러한 조절성 T 세포는 TCP에 제공된 트레지토프(들) 및/또는 TCP에 연결된 물질에 포함된 에피토프, 예를 들어, 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하고자 하는 대상 단백질을 인지할 수 있다. 따라서, 본 발명은 개체로부터 T 세포를 (어느 정도의 순도로) 단리하는 단계 (예를 들어, T 세포는 개체로부터 유래한 수지상 세포, 대식세포 및/또는 B 세포와 같은 항원 제시 세포를 함유한 조성물 내에, 예를 들어 PBMC의 함유물 중에 존재할 수 있음), T 세포를 본 발명의 TCP와 T 세포를 활성화하는데 적합한 조건 하에 접촉시키는 단계, 선택적으로, 활성화된 조절성 T 세포를 단리하는 단계, 및 T 세포, 바람직하게는 조절성 T 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 물질에 대해 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하는 방법을 제공한다. T 세포를 활성화하는데 적합한 조건은 전형적으로 항원 제시 세포, 바람직하게는 수지상 세포, 대식세포 및/또는 B 세포와 같은 전문적인 항원 제시 세포의 존재를 필요로 한다. 항원-제시 세포는 또한 본 발명의 숙주 세포일 수 있다. 전형적으로, 세포는 적절한 시간 동안, 예를 들어, 12-36h, 선택적으로, 16-24h 동안 공동-배양한다. T

세포를 개체에 재-투여하기 전에, T 세포의 특징적인, 예를 들어 사이토카인 생산 및/또는 면역-특이적인 마커 단백질 (예, CD25, CD127, FoxP3, CD45RA, CCR7)을, 예를 들어, FACS 또는 ELISA를 이용해 분석할 수 있다. 바람직하게는, 조절성 표현형, 예를 들어, CD25, CD127, FoxP3, CD45RA, CCR7 및/또는 IL-10을 발현하는 T 세포를 투여한다.

[0381] 본 발명의 TCP는 또한 연구 목적으로, 예를 들어 동물 모델에서, 및/또는 독성 검사 및/또는 세포 배양 기반의 실험에서 단리된 일차 세포를 자극하는데 이용할 수 있다.

[0382] 조성물 및 키트

[0383] 본원에 언급된 바와 같이, 본 발명의 TCP는 물질과 공동-투여할 수 있으며, 물질은 선택적으로 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하고자 하는 대상 물질이다. 따라서, 본 발명은 단량체 또는 다량체 (예를 들어, 이량체)일 수 있는 본 발명의 TCP를 포함하는 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 물질을 추가로 포함하며, 물질은 선택적으로 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하고자 하는 대상 물질이다.

[0384] 상기한 물질은, 예를 들어, 알레르겐, 과민증 유발 물질, 자가면역 반응의 표적 단백질, 특히 자가항체의 표적 단백질, 또는 자가면역 반응의 표적 에피토프, 특히 자가항체의 표적 에피토프, 또는 T-세포 매개되는 자가면역 반응의 표적 에피토프, 또는 치료학적 물질일 수 있다.

[0385] 본 발명은 여러가지 유형의 공동-투여에 적합한 조성물들을 제공한다.

[0386] 첫째, 본 발명은 본 발명의 TCP를 포함하며, TCP가 물질에 연결되지 않은, 조성물을 제공한다. 이에, TCP 및 물질은 주로 혼합되고, 서로 결합되는 것은 아니다. 예를 들어, 조성물은 용액, 바람직하게는 균질한 용액일 수 있다. TCP는 TCP 다량체, 예를 들어 이량체일 수 있다. 대안적으로, 이는 단량체 형태일 수 있다.

[0387] 두번째로, 본 발명은 본 발명의 TCP를 포함하며, TCP가 물질에 비-공유적으로 연결된, 조성물을 제공한다. 이러한 비-공유적 연결은, 예를 들어, 소수성 상호작용, 반데르 발스 상호작용 또는 극성 상호작용을 통한 비-특이적인 상호작용일 수 있다. 이는 또한 예를 들어, 단일 TCP가 항체의 항원-결합 부분을 포함하는 항체일 경우, 특이적인 상호작용일 수도 있으며, 이러한 항원-결합 부분은 항원에 특이적으로 결합할 수 있으며, 항원은 물질이다. 이는, 물질이 알레르겐이거나 또는 자가면역 반응의 표적, 특히 자가항체의 표적으로서 단백질인 경우에, 특히 유용할 수 있다. TCP는 TCP 다량체, 예를 들어 이량체일 수 있다. 대안적으로, 이는 단량체 형태일 수 있다.

[0388] 셋째, 본 발명은 본 발명의 TCP를 포함하며, TCP가 물질에, 예를 들어 융합 단백질의 형태로 공유 연결된, 조성물을 제공한다. TCP는 TCP 다량체, 예를 들어 이량체일 수 있다. 대안적으로, 이는 단량체 형태일 수 있다.

[0389] 네번째 구현예에서, 조성물은 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하고자 하는 대상 물질과 같은 다른 활성 물질을 포함하지 않는다. 제차, 이러한 TCP는 TCP 다량체, 예를 들어 이량체일 수 있다. 대안적으로, 이는 단량체 형태일 수 있다.

[0390] 이들 임의의 형태에서, 조성물은 아래에서 추가로 기술된 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0391] 또한, 본 발명은 본 발명의 TCP 및 물질, 선택적으로 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하고자 하는 대상 물질을 분리하여 포함하는 키트를 제공한다. 이러한 물질은 알레르겐, 과민증 유발 물질, 자가면역 반응의 표적 단백질, 특히 자가항체의 표적 단백질, 또는 자가면역 반응의 표적 에피토프, 특히 자가항체의 표적 에피토프, 또는 치료학적 물질일 수 있다. 이러한 키트는 약학적 조성물의 제형화에 적합한 부형제를 더 포함할 수 있다. 이는 의학적인 사용을 위한 지침을 동봉할 수 있다. 키트는 또한 TCP 및 약학적 조성물을 수용한 하나 이상의 용기와 지침을 포함하는 외장 패키지를 포함할 수 있으며, 선택적으로 예를 들어 본 발명의 단백질(들)을 재구성 및/또는 투여하기 위한 하나 이상의 기구를 더 포함할 수 있다.

[0392] 본 발명의 키트는 대안적으로 또는 부가적으로 TCP 및 물질을, 예를 들어 화학적 연결을 통해 연결하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 이러한 형태에서, 이는 전형적으로 TCP와 물질을 연결하기 위한 지침을 포함한다. 본 발명의 키트는 또한 TCP, 및 TCP와 키트에 제공되지 않은 물질을, 예를 들어 화학적 연결에 의한, 수단, 그리고 선택적으로 TCP와 물질을 연결하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 적절한 링커들이 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

[0393] 약학적 조성물

[0394] 본 발명은 본 발명의 TCP, 본 발명의 핵산 (구체적으로 인간 세포에서 발현시키기에 적합한 숙주 세포) 또는 본 발명의 숙주 세포를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 약학적 조성물은 본 발명의 TCP를 포함한다.

[0395] 약학적 조성물은, 선택적으로, 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 부형제 1-10종, 더 바람직하게는 1-5종을 포함한다. 용어 "부형제"는 또한 담체 및/또는 희석제를 포함한다. 적절한 부형제들은 일반적으로 당업자들에게 알려져 있다. 그 예는 염, 완충제, 보존제 및 삼투성 측면에서 활성 물질이다. 담체의 예로는 비-제한적으로 포스페이트 완충화된 염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 물, 오일/수 유제와 같은 유제, 다양한 유형의 습윤제, 멸균 용액 등이 있다. 조성물은 조성물을 등장성으로 만드는 적절한 양으로 약제학적으로 허용가능한 염을 더 포함할 수 있다. 바람직하게는, 허용가능한 부형제, 담체 또는 안정제는 사용되는 투여량 및 농도에서 무독성이다. 이는 사이트레이트, 포스페이트 및 기타 유기 산과 같은 완충제; 염-형성 반대-이온, 예를 들어 소듐 및 포타슘; 저 분자량 폴리펩타이드 (예, 아미노산 잔기 10개 이상); 단백질, 예를 들어 혈청 알부민 또는 젤라틴; 친수성 폴리머, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 히스티딘, 글루타민, 라이신, 아스파라긴, 아르기닌 또는 글리신; 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 단당류; 이당류; 기타 당류, 예를 들어 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 Tween, Pluronic 또는 폴리에틸렌 글리콜; 항산화제, 예를 들어 메티오닌, 아스코르브산 및 토코페롤 등; 및/또는 보존제, 예를 들어 옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 핵사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸을 함유할 수 있다. 아울러, 약학적 조성물은 하나 이상의 안정화제를 포함할 수 있다. 전형적인 예는 아미노산 (예, 글리신, 글루타메이트 또는 히스티딘), 당 또는 당 알코올 (예, 트레할로스, 소르비톨, 만니톨), 디터전트 (예, 폴리소르베이트 또는 폴록사머)이다. 적합한 부형제 및 제형들은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985, Mack Publishing Co.에 보다 상세히 기술되어 있다. 부형제 및/또는 담체 및/또는 희석제의 선택은 활성 물질(들), 바람직하게는 본 발명의 TCP, 및 선택적으로 본원에 기술된 바와 같이, 공동-투여될 수 있는 추가의 물질의 투여 경로 및 농도에 따라 결정될 수 있다. 약학적 조성물은 적절한 것으로 간주되는 임의 형태일 수 있으며, 구체적으로 액체이거나 또는 동결건조될 수 있다. 약학적 조성물은, 예를 들어, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 현탁제, 로렌지, 산제, 액제, 수성 용액 또는 가용화를 위한 동결건조된 조성물 등으로, 바람직하게는 수성 용액 또는 동결건조된 조성물로 제조할 수 있다.

[0396] 약학적 조성물은 비경구, 예를 들어, 정맥내, 피하, 경구, 국소, 직장, 코 투여용으로 또는 임의의 다른 투여 경로용으로 제형화할 수 있다. 정맥내 또는 피하 투여가 바람직하다. 임상 환경에서, 정맥내 투여가 바람직할 수 있다. 피하 투여가 가정에서 수행하기 더 쉬울 수 있다. 당업자는 사례 특징에 따라 투여 방식을 선택할 수 있다. 바람직한 투여 방식은 또한 예를 들어 TCP의 피하 이용가능성에 의존할 것이다.

[0397] 예를 들어, 특히, 약학적 조성물이 단독 제제로서 TCP를 포함할 경우, 임의의 부형제, 희석제 및 담체가 전형적으로 단일클론 항체 또는 다클론 항체를 포함하는 약학적 조성물과 같은 면역글로불린 제제, 특히 정맥내 또는 피하 면역글로불린 제제에 사용되며, 또한 TCP를 포함하는 약학적 제제에 적합한 것이다. 예를 들어, 약학적 제제는 TCP를 1 내지 50 g/l 농도로 포함하며, 아미노산 (예, 글리신 150 내지 500 mM), 선택적으로 디터전트 (예, 폴리소르베이트 20 mM), 및 완충제 (pH 4.3 - 6.5)를 포함한다.

[0398] 투여 용도로 제형화된 TCP의 투여량은 치료할 구체적인 장애 및 투여 경로에 따라 정해질 수 있다. 당업자는 적절한 안전하고 효과적인 투여량을 결정하는 수단 및 방법을 알 것이다.

[0399] 가이드로서, 투여량은 예를 들어 2 mg/체중 kg 내지 최대 20 g/체중 kg, 특히 200 mg/체중 kg 내지 최대 10 g/체중 kg의 범위일 수 있다.

[0400] 추가적인 가이드로서: 만일 TCP가 단독 치료제로서, 예를 들어 자가면역 장애 상황에 투여되는 경우, 투여량은 해당 장애를 치료하기 위해 사용되는 다클론성 정맥내 또는 피하 면역글로불린 (IVIG)의 투여량에 해당하는 범위일 수 있다. 만일 TCP가 면역 반응이 억제되어야 하는 대상 물질과 공동-투여되는 경우, 투여량은 그 물질의 용량에 대해 오히려 몰 과잉일 것이다. TCP가 치료학적 물질과 연결되어, 예를 들어 치료학적 단백질과 융합 단백질을 형성하는 경우, 투여량은 치료학적 물질에 대한 적절한 유효량에 의해 주로 결정될 것이다.

[0401] 치료 또는 예방할 장애에 따라, TCP는 1회 투여 또는 다회 투여로서 적용될 수 있다. 예를 들어, 투여는 매일,

매일 2회, 매주, 매주 2회 또는 매달일 수 있다. 투여는 또한 예를 들어 적절한 펌프를 통해 연속적일 수 있다. 유리하게는, TCP는 이의 Fc-부분 유래 백본 서열로 인해, 전형적으로 양호한 혈장 반감기를 가진다. 따라서, 바람직하게는, TCP를 매주, 매주 2회 또는 심지어 매달 투여하는 것으로도 충분하다. 이량체와 같은 다량체는 특히 긴 혈장 반감기를 가질 수 있어, 매주, 매주 2회 또는 매달 투여가 가능할 수 있다. 특정 TCP에 대한 정확한 혈장 반감기는 적절한 약물 동태학적 실험 등의 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의해 당업자가 결정할 수 있다. 또한, 혈장 반감기는, 신생아 Fc-수용체 (FcRn)에 대한 TCP의 결합이 유지되는지 여부에 따라 결정될 것이다. 이는 당업자가 검사할 수 있다. 마찬가지로, 혈장 반감기는 당업자가 늘리거나 또는 단축시킬 수 있다. 예를 들어, 언급된 바와 같이, TCP는 혈장 반감기를 연장하기 위해 폐길화될 수 있다.

- [0402] TCP를 포함하는 약학적 조성물은 본원에 기술된 임의의 치료학적 용도로 적용가능하다.
- [0403] 바람직하게는, 약학적 조성물은 안정한 조성물이며, 즉 TCP는 2-8℃에서, 바람직하게는 실온 (18℃ - 25℃)에서 보관할 경우, 적어도 3개월 동안, 바람직하게는 적어도 6개월 동안 환자에게 투여하기에 적합하게 유지된다.
- [0404] TCP 또는 약학적 조성물은 적정 용기, 예를 들어, 플라스크, 바틀, 백 또는 주사기 안에 수용될 수 있다. 의약제로 이용할 경우, TCP를 포함하는 약학적 조성물은 바람직하게는 약제학적으로 허용가능한 용기 안에 존재한다.
- [0405] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 TCP를, 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 관용을 부여하고자 하는 대상 물질과 같은 추가적인 물질의 함유 또는 부재 하에 포함하는, 본원에 기술된 모든 형태의 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 TCP 및 원치않는 면역 반응을 유발할 수 있는 물질을 포함하는 조합된 조성물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0406] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 TCP (이는 다량체, 예를 들어 이량체 또는 단량체일 수 있음)와, 별도로, 원치않는 면역 반응을 억제하고자 하는 대상 물질을 포함하는 약학적 키트에 관한 것이다. 키트는 또한 키트의 의학적 사용에 대한 지침을, 예를 들어 본 명세서 도처에 기술된 투여량 및 투여 경로에 대한 지침과 더불어 포함할 수 있다.
- [0407] 이러한 키트는 이들 조성물의 공동-투여로 사용하기 위한 것일 수 있으며, 여기서 공동-투여는 키트를 이용해 치료할 개체에 동일한 부위에 또는 비슷한 부위에 또는 비슷한 구역에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 공동-투여는 2가지 성분을, 예를 들어 서로 다른 정맥으로 정맥내 투여하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 공동-투여는 동일한 부위에서 이루어진다.
- [0408] 공동-투여는 또한 동시에, 또는 실질적으로 동시에, 예를 들어 하루 동안에, 바람직하게는 1시간 이하의 기간 내에, 예를 들어, 10분 이내, 5분 이내 또는 1분 이내에 이루어질 수 있다. 공동-투여는 유리하게는 키트의 성분들, 즉 TCP 및 물질이 T 세포에 실질적으로 동시에 제시되는 효과를 달성하며, 그래서 물질의 에피토프에 반응성인 T 세포는 TCP로부터 유발된 트레지토프에 의해 활성화된 조절성 T 세포에 의해 영향을 받게 되며, 따라서 물질에 대한 면역 반응이 억제되거나 및/또는 물질에 대한 면역성이 부여된다.
- [0409] 의학적 적응증
- [0410] 본 발명에 따른 TCP는 의약제로서 유용하다. TCP는 트레지토프의 존재로 인해, 다중적인 방식으로 의약제에 유익하게 이용할 수 있는 면역조절 특성 및 면역억제 특성을 가진다.
- [0411] 구체적으로, 본 발명은 개체에서 면역 반응을 조절하는데 사용하기 위한 본 발명의 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 필요한 개체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 개시한다. 면역 반응의 조절은 면역 반응의 억제 또는 관용 유도 (즉, 관용 부여)일 수 있다.
- [0412] 또한, 본 발명은 면역 반응을 억제하거나 또는 관용을 유발하는데 사용하기 위한 본 발명의 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 필요한 개체에서 면역 반응을 억제하거나 또는 관용을 유도하는 방법을 개시한다.
- [0413] 또한, 본 발명은 자가면역 관련 장애, 알레르기, 바이러스 감염 또는 이식-관련 면역 반응 또는 장애를 예방 또는 치료, 바람직하게는 치료하는데 사용하기 위한 본 발명의 약학적 조성물을 제공한다. 마찬가지로, 본 발명은 자가면역 관련 장애, 알레르기, 바이러스 감염 또는 이식-관련 면역 반응 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에 있어, 본 발명에 따른 TCP의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 관련 장애, 알레르기, 바이러스 감염 또는 이식-관련 면역 반응 또는

장애를 필요한 개체에서 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

- [0414] "치료"는 본 발명의 맥락에서 한가지 이상의 질환 증상이 완화되는, 바람직하게는 질환의 2가지 이상, 가장 바람직하게는 모든 증상들이 완화되거나, 또는 증상이 더이상 발생하지 않는 것을 의미한다. 치료는 요망되는 경우 반복될 수 있다. "예방"은 질환의 발병 위험 또는 발생의 저하를 포함한다.
- [0415] 본원에서, 용어 "개체"는 인간 또는 비-인간 포유류, 바람직하게는 인간 개체에 관한 것이다. 개체는 환자, 예를 들어 본원에 언급된 질환 또는 장애 하나 이상을 앓고 있는 환자일 수 있다. 용어 비-인간 포유류는 특별한 방식으로 제한되지 않으며, 예를 들어, 개, 고양이, 말, 양, 염소, 소, 낙타, 기니아 피그, 돼지, 토끼, 마우스 또는 랫 등이 있다. 치료학적 용도의 경우, Fc-부분 체인 및/또는 TCP에 이용되는 트레지토프는 바람직하게는 치료할 종으로부터 유래한다.
- [0416] "자가면역 관련 장애"는 신경학적 자가면역 장애, 피부학적 자가면역 장애, 류마티스 장애, 대사 장애, 갑상선 질환, 이식-관련 면역 반응 및 장애, 및 기타 자가면역 장애를 망라한다.
- [0417] 신경학적 자가면역 장애에 대한 예는 만성 염증성 탈수초 다발신경병증 (CIDP)과 같은 탈수초 질환, 다병소성 운동 신경병증 (MMN), 궤랑 바레-증후군, 다발성 경화증 (MS), 시신경 척수염, 급성 파종성 뇌척수염, 중증 근 무력증, 람베르트-이튼 증후군, 항-NMDAR 뇌염, 강직-인간 증후군, 신경퇴행성 중추 신경계 질환, IgM-관련 다발신경병증, 근염, 자가면역 다발성 근염, 포함체 근육염, 면역 신경근긴장증, 만성 국소 뇌염, 및 연쇄구균 감염 관련 소아 자가면역 신경정신 질환 (PANDAS) 등이 있다.
- [0418] 피부 자가면역 장애에 대한 예로는 수포성 피부 장애, 예를 들어 천포창 (예, 심상성 천포창 및 낙엽상 천포창), 자가면역 피부근염, 괴저성 농피증, 독성 표피 괴사증 (TEN), 스티븐 존슨-증후군 (SJS), 아토피성 피부염, 자가면역 두드러기 및 경화성 집액부종 등이 있다.
- [0419] 류마티스 장애에 대한 예는 류마티스 관절염 (RA), 소아 류마티스 관절염, 건선, 및 전신 홍반성 낭창 (SLE)이다.
- [0420] 대사 자가면역 장애로는 예를 들어 1형 당뇨병 등이 있다.
- [0421] 갑상선 질환 타입의 자가면역 관련 장애에 대한 예는 그레이브병 및 자가면역 갑상선염이다.
- [0422] 기타 자가면역 장애로는 예를 들어, 일차성 및 이차성 혈관염, 예를 들어, 가와사키 증후군, 현미경적 다발혈관염, 베게너 육아종증, 척-스트라우스-증후군, IgA-관련 혈관염, 결절성 다발동맥염, 울혈반모양 혈관병증, 항인지질 항체 증후군 (APS), 부종양성 증후군 및 면역 혈소판감소증 (ITP)이 있다. 자가면역혈우병 (예, 자가면역 용혈성 빈혈), 자가면역 간염, 자가면역 천식 및 신경피부염, 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP) 및 만성 통증의 치료 또는 예방도 고려할 수 있다.
- [0423] 자가면역 장애의 치료와 관련하여, TCP가 물질, 전형적으로 자가면역 반응의 표적인 것으로 알려진 단백질과 공동-투여하는 (예를 들어, 융합 단백질 형태와 같이 공유 연결되는) 것이 유리할 수 있다. 그러나, 본원에 기술된 바와 같이, 필수적인 것은 아니다.
- [0424] 마찬가지로, 알레르기 또는 식품 과민증과 같은 과민증을 본 발명의 이러한 측면에 따라 치료할 수 있다. 예를 들어, 이러한 구현예에서, TCP를, 공지된 경우, 알레르겐 또는 알레르겐의 일부 또는 과민증을 유발하는 물질 또는 화합물과 공동-투여하는 (예를 들어, 융합 단백질 형태와 같이 공유적으로 연결되는) 것이 유익할 수 있다. 그러나, 본원에 기술된 바와 같이, 반드시 그런 것은 아니다.
- [0425] 본 발명의 약학적 조성물에 의해 표적화할 수 있는 바이러스 감염에 대한 예는 B형 간염 및 C형 간염이다. 예를 들어, 만성 B형 간염의 급성 악화는 B형 간염 바이러스의 코어 및 e 항원 (HBcAg/HBeAg)에 대한 세포독성 T 세포 반응의 증가에 의해 수반될 수 있으며, HBcAg에 특이적인 조절성 T 세포는 HBcAg 펩타이드-특이적인 세포독성 T 세포 증가에 의해 수반되는, 악화시 감소하며, 예를 들어 WO 2008/094538 A2를 참조한다. 따라서, 본 발명의 치료에 의해 매개되는 조절성 T 세포의 활성화 증가는 이러한 악화 또는 이의 증상을 낮추는데 도움이 될 수 있다. 이러한 구현예에서, TCP를, 공지된 경우, 반응 증가를 나타내는 항원 또는 이의 일부와 공동-투여하는 (예를 들어, 융합 단백질 형태와 같이 공유적으로 연결되는) 것이 유익할 수 있다. 그러나, 본원에 기술된 바와 같이, 반드시 그런 것은 아니다.
- [0426] "이식-관련 면역 반응 및 장애"는, 예를 들어, 이식 거부 반응, 숙주 편대 이식 질환, 및 이식편대숙주 질환이다. 만일 이러한 면역 반응의 적어도 일부에 원인이 되는 표적 단백질 또는 T 세포 에피토프가 공지되어

있다면, 본 발명의 TCP와 함께, 예를 들어 용합 단백질 형태와 같이 공유 연결된 형태로 표적 단백질 또는 T 세포 에피토프와 공동-투여하는 것도 가능하다. 그러나, 반드시 그런 것은 아니다.

[0427] 투여 시점에, 면역 반응이 개체에 존재할 수 있거나 (예, 환자에 존재하는 자가면역 또는 알레르기 장애, 또는 치료학적 물질, 예를 들어 대체 치료학적 단백질에 대한 면역 반응), 또는 개체를 치료하지 않는다면 향후 면역 반응이 발생할 가능성이 높을 수 있다 (예를 들어, 향후 투여될 물질에 대한 반응으로서 면역 반응, 예를 들어 대체 치료학적 단백질과 같은 치료학적 물질). 만일 면역 반응을 유발하는 대상 물질이 알려져 있다면, TCP를 면역 반응을 유발하는 대상 물질과 함께 공동-투여할 수 있다. 예를 들어, TCP는 자가면역 반응, 예를 들어 항체의 표적 단백질 또는 표적 에피토프 또는 알레르겐과 함께 공동-투여할 수 있다.

[0428] TCP는, 트레지토프의 함유로 인해, TCP를 예를 들어 단독 치료학적 물질로서, 특히, 물질을 다른 활성 물질과 함께 공동-투여하지 않고 이용함으로써 이미 유익하게 이용될 수 있는, 면역조절 특성 및 면역억제 특성을 가진다. 따라서, 본 발명의 단백질은 면역억제제 또는 면역조절제로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 이는 자가면역 관련 장애, 알레르기, 바이러스 감염 또는 이식-관련 면역 반응 또는 장애 등의 본원에 기술된 장애를 예방 또는 치료하기 위해 적절하게 적용할 수 있다.

[0429] 따라서, TCP는 본원에 정의된 바와 같이 단독 치료제로서 투여하는데 이용하기 위한 것일 수 있다. 그러나, 용어 "단독" 치료제가 TCP를 특정 장애를 치료하는데 유용한 다른 약물과 공동-투여하는 것을, 배제하는 것은 아니다. 단독 적용의 경우, TCP 또는 TCP 조성물은 알레르겐과 같이 원치않는 면역 반응을 조절하고자 하는 용합 단백질 또는 펩타이드 등의 물질을 포함하지 않는다. 바람직하게는, 이러한 단독 적용의 경우, TCP는 이량체 또는 다량체로 투여된다.

[0430] 단독 치료제 형태로서 본 발명의 TCP는 바람직하게는 혈장-유래 정맥내 면역글로불린 G (IVIG) 또는 피하 혈장-유래 면역글로불린 G를 이용하여 치료하는 것이 유익한 것으로 알려진 적응증에 이용하기 위한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 TCP는 단독 치료제로서, 특히 본원에 정의된 바와 같은 TCP 이량체 또는 다량체로 구성되거나 또는 이로 필수적으로 구성되는 단백질은, 알레르기, 면역 혈소판 감소증과 같은 자가면역 질환, 가와사키 질환 및 췌장 비레 증후군, I형 당뇨병, 간염, 신경 질환, 예를 들어 다병소성 운동 신경병증, 강직 인간 증후군, 다발성 경화증, 및 중증 근무력증, 근염, 만성 염증성 탈수초 다발신경병증, 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP), 전신성 홍반성 루푸스, 그레이브병, 자가면역 갑상선염, 숙주 편대 이식 질환, 이식편대숙주 질환 및 만성 통증을 치료하는데 유익하게 적용할 수 있다. 이러한 구현예에서, 치료제에 의해 조절하고자 하는 면역 반응의 표적이 공지되어야 하는 것은 아니다.

[0431] 대안적으로, TCP는 개체에서 면역 반응을 조절하는데 이용하기 위해, 면역 반응을 억제하기 위해 또는 관용을 유도하기 위해 다른 물질과 공동-투여된다. 이 경우, 이러한 면역 반응은 전형적으로 TCP와 함께 공동-투여되는 물질에 대한 면역 반응이다. 본원에 기술된 바와 같이, 일 구현예에서, 물질 및 TCP는 서로 연결되지 않는다. 대안적으로, 약학적 조성물은 TCP와 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결된, 바람직하게는 TCP에 공유 연결된, 예를 들어 용합 단백질 형태의 물질에 대해 원치않는 면역 반응을 억제 또는 저해하는데 이용하기 위한 것일 수 있다. 만일 대상 물질이 대상 물질에 공유적 또는 비-공유적으로 연결된다면, TCP는 심지어 연결없이 단순히 공동-투여하는 경우와 비교해 관용 유발 특성을 부여하는데 더 적합하다.

[0432] 구현예 목록

[0433] 제1 구현예 (구현예 1)에서, 본 발명은 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 (TCP)를 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하고,

[0434] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및

[0435] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및

[0436] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,

[0437] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다.

[0438] 제2 구현예에서, 제1 구현예의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들과의 서열 동일성은 적어도 90%이다. 제3 구현예에서, 제1 구현예의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들과의 서열 동일성은 적어도 95%이다. 제4 구현예에서, 제1 구현예의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들과의 서열 동

일성은 적어도 99%이다. 제5 구현예에서, 제1 구현예의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들과의 서열 동일성은 100%이다.

- [0439] 제6 구현예에서, 본 발명은, 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 1-5 중 어느 하나에 따른 TCP일 수 있는, TCP를 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하며,
- [0440] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0441] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0442] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0443] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다.
- [0444] 제7 구현예에서, 구현예 6의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대한 서열 동일성은 적어도 90%이다. 제8 구현예에서, 구현예 6의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대한 서열 동일성은 적어도 95%이다. 제9 구현예에서, 구현예 6의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대한 서열 동일성은 적어도 99%이다. 제10 구현예에서, 구현예 6의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 114-330번의 아미노산들에 대한 서열 동일성은 100%이다.
- [0445] 제11 구현예에서, 본 발명은, 서열번호 1의 104-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 1-10 중 어느 하나에 따른 TCP일 수 있는, TCP를 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하며,
- [0446] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0447] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0448] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0449] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다.
- [0450] 제12 구현예에서, 구현예 11의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 104-330번의 아미노산들에 대한 서열 동일성은 적어도 90%이다. 제 13 구현예에서, 구현예 11의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 104-330번의 아미노산들에 대한 서열 동일성은 적어도 95%이다. 제 14 구현예에서, 구현예 11의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 104-330번의 아미노산들에 대한 서열 동일성은 적어도 99%이다. 제 15 구현예에서, 구현예 11의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 104-330번의 아미노산들에 대한 서열 동일성은 100%이다.
- [0451] 제16 구현예에서, 본 발명은, 서열번호 1의 1-330번의 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는, 구현예 1-15 중 어느 하나에 따른 TCP일 수 있는, TCP를 제공하며, 여기서 TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하며,
- [0452] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0453] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0454] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0455] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다.
- [0456] 제17 구현예에서, 구현예 16의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 대한 서열 동일성은 적어도 90%이다. 제18 구현예에서, 구현예 16의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 대한 서열 동일성은 적어도 95%이다. 제 19 구현예에서, 구현예 16의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 대한 서열 동일성은 적어도 99%이다. 제 20 구현예에서, 구현예 16의 TCP에 있어서, 서열번호 1의 1-330번 아미노산들에 대해 대한 서열 동일성은 100%이다.
- [0457] 제21 구현예에서, 본 발명은, 서열번호 1의 135-330번의 아미노산들에 대해 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%의 서열 동일성을 가진 아미노산 190개 이상으로 된 인접 서열을 포함하는, 구현예 1-20 중 어느 하나에 따

른 TCP일 수 있는, TCP를 제공하며, 상기한 TCP는 Fc-부분 체인에 대해 이중적인, 조절성 T 세포 활성화 에피토프를 2개 이상 포함하며, 이러한 단백질은 선택적으로 항체의 V<sub>H</sub> 도메인 및/또는 C<sub>H</sub>1 도메인을 포함하지 않는다. 제22 구현예에서, 구현예 21에 따른 TCP의 2개 이상의 트레지토프가 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내에 위치하며,

- [0458] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0459] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0460] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당한다
- [0461] 구현예 21 및 22에서, 프레임의 서열은 서열 동일성 결정에 고려되며, 따라서 서열 동일성이 예를 들어 구현예 1과 비교해 감소한다.
- [0462] 제23 구현예에서, 구현예 1-22 중 어느 하나에 따른 TCP는 이중적인 트레지토프를 2개 이상, 바람직하게는 3개 이상, 선택적으로 4개 포함한다. 제24 구현예에서, 구현예 1-23 중 어느 하나에 따른 TCP는 트레지토프 2-4개를 포함한다.
- [0463] 제25 구현예에서, 구현예 1-24 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 제1 이중적인 트레지토프는 프레임 A, B 또는 C 중 하나에 위치하고, 적어도 제2 트레지토프는 프레임 A, B 또는 C 중 다른 프레임 또는 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치하며, 선택적으로 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 서열에 연결된다.
- [0464] 제26 구현예에서, 구현예 1-25 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 A에 위치한다. 제27 구현예에서, 구현예 1-26 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 B에 위치한다. 제28 구현예에서, 구현예 1-27 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 C에 위치한다. 제29 구현예에서, 구현예 1-28 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 A 및 B에 위치한다. 제30 구현예에서, 구현예 1-29 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 A 및 C 각각에 위치한다. 제31 구현예에서, 구현예 1-30 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 B 및 C 각각에 위치한다. 제32 구현예에서, 구현예 1-31 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열 프레임 B 또는 C에 위치한다.
- [0465] 제33 구현예에서, 구현예 1-32 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서,
- [0466] (a) 서열 프레임 A가 이중적인 트레지토프를 함유하지 않을 경우, 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가지며,
- [0467] (b) 서열 프레임 B가 이중적인 트레지토프를 함유하지 않을 경우, 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가지며, 및
- [0468] (c) 서열 프레임 C가 이중적인 트레지토프를 함유하지 않을 경우, 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진다.
- [0469] 제34 구현예에서, 구현예 1-33 중 어느 하나에 따른 TCP는 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 하나 이상의 이중적인 트레지토프를 포함한다. 제35 구현예에서, 구현예 34의 TCP에 있어서, 이중적인 트레지토프는 상기 아미노산 서열의 C-말단에 바로 위치한다. 제36 구현예에서, 구현예 34의 TCP에 있어서, 이중적인 트레지토프는 아미노산 3-18개의 링커를 통해 서열에 연결된다. 제37 구현예에서, 구현예 36의 TCP에 있어서, 링커는 GS 링커 또는 서열번호 107, 108, 109 또는 110 중 어느 하나의 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. 제38 구현예에서, 구현예 34-37 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 이중적인 트레지토프 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단은 Treg134, Treg088x 및 Treg088로 이루어진 군으로부터 선택된다. 제39 구현예에서, 구현예 34 및 36-37 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단 이중적인 트레지토프는 Treg029B이고, 링커는 서열번호 108을 가진다.
- [0470] 제40 구현예에서, 구현예 34-39 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, TCP의 C-말단에 이중적인 트레지토프가 존재하며, 선택적으로, 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 서열에 연결된다. 대안적으로, 제41 구현예에서, 구

현에 34-39 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단 이중적인 트레지토프는 TCP의 C-말단에 위치하지 않으며, 바람직하게는, TCP는 융합 단백질이다.

- [0471] 제42 구현예에서, 전술한 구현예들 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 트레지토프와 동일한 길이어거나 또는 아미노산 1 또는 2개가 짧거나 긴 서열번호 1의 135-330번 아미노산 서열을 치환하며, 바람직하게는, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 상기 트레지토프와 동일한 길이를 가진 서열번호 1의 135-330번 아미노산 서열을 치환한다.
- [0472] 제43 구현예에서, 전술한 구현예들 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 하기를 포함하는 군으로부터 선택된다:
- [0473] 서열번호 10 (Treg289): EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW,
- [0474] 서열번호 7 (Treg084): GTDFILTISSLQPED,
- [0475] 서열번호 2 (Treg009A): GGLVQPGGSLRLSCAASGFTF,
- [0476] 서열번호 9 (Treg088x): KTLYLQMNLSRAEDTAKHYCA,
- [0477] 서열번호 8 (Treg134): LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS,
- [0478] 서열번호 3 (Treg029B): MHWVRQAPGKGLEWV,
- [0479] 서열번호 4 (Treg088): NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCA,
- [0480] 서열번호 5 (Treg167): PAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQ,
- [0481] 서열번호 6 (Treg289n - native): EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW,
- [0482] 서열번호 11 (trimmed Treg009A): VQPGGSLRLSCAASG,
- [0483] 서열번호 12 (trimmed Treg029B - v1): WVRQAPGKGL,
- [0484] 서열번호 13 (trimmed Treg029B - v2): VRQAPGKGL,
- [0485] 서열번호 14 (trimmed Treg088): YLQMNLSRAEDTAVY,
- [0486] 서열번호 15 (trimmed Treg088x - v1): KTLYLQMNLSRAEDTAKH,
- [0487] 서열번호 16 (trimmed Treg088x - v2): YLQMNLSRAEDTAKH,
- [0488] 서열번호 17 (trimmed Treg167): LQSSGLYSLSVVTVPSSSL,
- [0489] 서열번호 18 (trimmed Treg289n): YNSTYRVVSVLTVLH,
- [0490] 서열번호 19 (trimmed Treg289): YQSTYRVVSVLTVLH,
- [0491] 서열번호 20 (trimmed Treg084): FTLTISSLQ, 및
- [0492] 서열번호 21 (trimmed Treg134): FYPREAKVQWKVDNALQS,
- [0493] 선택적으로, 트레지토프들 모두 상기 군으로부터 선택된다.
- [0494] 제44 구현예에서, 전술한 구현예들 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 트레지토프는 서열번호 10, 7, 2, 9 및 8로 이루어진 군으로부터 선택된다. 제45 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 10을 가진다. 제46 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 7을 가진다. 제47 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 2를 가진다. 제48 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 9를 가진다. 제49 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 8을 가진다.
- [0495] 제50 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 3을 가진다. 제51 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레

지토프는 서열번호 4를 가진다. 제52 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 5를 가진다. 제53 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 6을 가진다. 제54 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 11을 가진다. 제55 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 12를 가진다. 제56 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 13을 가진다. 제57 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 14를 가진다. 제58 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 15를 가진다. 제59 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 16을 가진다. 제60 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 17을 가진다. 제61 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 18을 가진다. 제62 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 19를 가진다. 제63 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 20을 가진다. 제64 구현예에서, 구현예 1-44 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 21을 가진다.

- [0496] 제65 구현예에서, 구현예 1-65 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나의 TCP 단량체 내 트레지토프들 모두 서로 다른 서열을 가진다. 제66 구현예에서, 구현예 1-65 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 하나의 TCP 단량체 내 모든 트레지토프가 동일한 서열을 가진다.
- [0497] 제67 구현예에서, 본 발명은 서열 프레임 A가 서열번호 1의 170-203번 위치에 해당하고, 바람직하게는, 서열번호 1의 173-203번 위치에 해당하는, 구현예 1-66 중 어느 하나에 따른 TCP를 제공한다. 제68 구현예에서, 본 발명은 서열 프레임 B가 서열번호 1의 275-306번 위치에 해당하고, 바람직하게는, 서열번호 1의 277-304번 위치에 해당하는, 구현예 1-67 중 어느 하나에 따른 TCP를 제공한다. 제69 구현예에서, 본 발명은 서열 프레임 C가 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하고, 바람직하게는, 서열번호 1의 217-248번 위치에 해당하는, 구현예 1-68 중 어느 하나에 따른 TCP를 제공한다.
- [0498] 제70 구현예에서, 구현예 1-69 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서,
- [0499] (a) 프레임 A는 176 - 196번 위치 (즉, 서열번호 1의 각 위치에 대응되는 위치)에 서열번호 10의 트레지토프 (Treg289), 174 - 199번 위치에 서열번호 5의 트레지토프 (Treg167), 180 - 200번 위치에 서열번호 2의 트레지토프 (Treg009A), 178 - 192번 위치에 서열번호 3의 트레지토프 (Treg029B), 186 - 200번 위치에 서열번호 7의 트레지토프 (Treg084), 179 - 202번 위치에 서열번호 8의 트레지토프 (Treg134) 또는 173 - 190번 위치에 서열번호 15의 트레지토프 (trimmed Treg088x - v1)를 포함하거나; 및/또는
- [0500] (b) 프레임 B는 280 - 300번 위치에 서열번호 10의 트레지토프 (Treg289), 278 - 303번 위치에 서열번호 5의 트레지토프 (Treg167), 278 - 298번 위치에 서열번호 2의 트레지토프 (Treg009A), 287 - 301번 위치에 서열번호 3의 트레지토프 (Treg029B), 284 - 298번 위치에 서열번호 7의 트레지토프 (Treg084), 277 - 300번 위치에 서열번호 8의 트레지토프 (Treg134) 또는 287 - 304번 위치에 서열번호 15의 트레지토프 (trimmed Treg088x - v1)를 포함하거나; 및/또는
- [0501] (c) 프레임 C는 225 - 245번 위치에 (또는 서열번호 1의 각 위치에 대응되는 위치에) 서열번호 10의 트레지토프 (Treg289), 223 - 248번 위치에 서열번호 5의 트레지토프 (Treg167), 223 - 243번 위치에 서열번호 2의 트레지토프 (Treg009A), 223 - 237번 위치에 서열번호 3의 트레지토프 (Treg029B), 224 - 238번 위치에 서열번호 7의 트레지토프 (Treg084), 222 - 245번 위치에 서열번호 8의 트레지토프 (Treg134) 또는 217 - 234번 위치에 서열번호 15의 트레지토프 (trimmed Treg088x - v1)를 포함하거나; 및/또는
- [0502] (d) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한 하나 이상의 이중적인 트레지토프는 서열번호 8 (Treg134), 서열번호 14 (trimmed Treg088) 또는 서열번호 9 (Treg088x)를 가지되, 이들 트레지토프는 선택적으로 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 서열에 GS 링커 또는 서열번호 107-110 중 어느 하나의 링커 등의 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된다.
- [0503] 제71 구현예에서, 구현예 1-70 중 어느 하나에 따른 TCP는

- [0504] (I) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP이다:
- [0505] (a) 프레임 A에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프,
- [0506] (b) 프레임 B에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프,
- [0507] (c) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및
- [0508] (d) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커 (V32)와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 경유하여 연결된, 서열번호 9에 따른 트레지토프 (Treg088x)로서, 트레지토프는 TCP의 C-말단에 위치할 수 있음.
- [0509] 제72 구현예에서, 구현예 1-70 중 어느 하나에 따른 TCP는
- [0510] (II) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP이다:
- [0511] (a) 프레임 B에 위치한 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프; 및
- [0512] (b) 프레임 C (V20)에 위치한 서열번호 2 (Treg009A)에 따른 트레지토프.
- [0513] 제73 구현예에서, 구현예 1-70 중 어느 하나에 따른 TCP는
- [0514] (III) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP이다:
- [0515] (a) 프레임 B에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프; 및
- [0516] (b) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된, 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프로서, 트레지토프는 TCP의 C-말단에 위치할 수 있음.
- [0517] 제74 구현예에서, 구현예 1-70 중 어느 하나에 따른 TCP는
- [0518] (IV) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP이다:
- [0519] (a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프,
- [0520] (b) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및
- [0521] (c) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된, 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프로서, 트레지토프는 TCP의 C-말단에 위치할 수 있음.
- [0522] 제75 구현예에서, 구현예 1-70 중 어느 하나에 따른 TCP는
- [0523] (V) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP이다:
- [0524] (a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프,
- [0525] (b) 프레임 B에 위치한 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프, 및
- [0526] (c) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084).
- [0527] 제76 구현예에서, 구현예 1-70 중 어느 하나에 따른 TCP는
- [0528] (VI) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP를 포함한다:
- [0529] (a) 프레임 A에 위치한 서열번호 10 (Treg289)에 따른 트레지토프,
- [0530] (b) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및
- [0531] (c) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된, 서열번호 9 (Treg088x)에 따른 트레지토프로서, 트레지토프는 TCP의 C-말단에 위치할 수 있음.
- [0532] 제77 구현예에서, 구현예 1-70 중 어느 하나에 따른 TCP는
- [0533] (VII) 하기 트레지토프를 포함하는 TCP를 포함한다:

- [0534] (a) 프레임 C에 위치한 서열번호 7 (Treg084)에 따른 트레지토프, 및
- [0535] (b) 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 C-말단에 위치한, 선택적으로 GS 링커와 같은 아미노산 3-18개 길이의 링커를 통해 연결된, 서열번호 8 (Treg134)에 따른 트레지토프로서, 트레지토프는 TCP의 C-말단에 위치할 수 있음.
- [0536] 제78 구현예에서, 구현예 1-70 중 어느 하나에 따른 TCP는 서열번호 23-44, 46-58 및 111로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0537] 제79 구현예에서, 본 발명은 TCP가 이량체 형성을 달성할 수 있는 부분을 적어도 포함하며, 선택적으로 면역글로불린의 전체 힌지부를 포함하는, 구현예 1-78 중 어느 하나에 따른 TCP를 제공한다.
- [0538] 제80 구현예에서, 본 발명은 TCP가 아미노산 195 - 350을 포함하는, 구현예 1-79 중 어느 하나에 따른 TCP를 제공한다.
- [0539] 제81 구현예에서, 구현예 80에 따른 TCP는 서열번호 1의 135-330번 아미노산들에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열로 필수적으로 구성되며, TCP는 서열번호 1에 대해 이중적인 하나 이상의 트레지토프를 서열 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상의 프레임 내 위치에 포함하며,
- [0540] (a) 서열 프레임 A는 서열번호 1의 168-203번 위치에 해당하고, 및
- [0541] (b) 서열 프레임 B는 서열번호 1의 272-307번 위치에 해당하고, 및
- [0542] (c) 서열 프레임 C는 서열번호 1의 212-249번 위치에 해당하며,
- [0543] 서열 프레임 A, B 및 C는 서열 동일성을 결정하는데 고려되지 않는다.
- [0544] 제82 구현예에서, 본 발명은 TCP가 항체의 V<sub>H</sub> 도메인 및/또는 C<sub>H1</sub> 도메인을 포함하지 않는, 구현예 1-81 중 어느 하나에 따른 TCP를 제공한다.
- [0545] 제83 구현예에서, 본 발명은 TCP가 면역글로불린 슈퍼패밀리 도메인을 추가로 포함하고, 바람직하게는, TCP가 적어도 항체의 V<sub>H</sub> 도메인 및 CH1 도메인을, 바람직하게는 항체의 항원-결합 부분을 추가로 포함하는, 구현예 1-79 중 어느 하나에 따른 TCP를 제공한다.
- [0546] 제84 구현예에서, 구현예 1-80 및 81-83 중 어느 하나에 따른 TCP는 IgA의 CH3 도메인, 및 선택적으로 IgA의 연결 영역을 추가로 포함한다.
- [0547] 제85 구현예에서, 구현예 1-80 및 82-83 중 어느 하나에 따른 TCP는 IgM의 CH3 및 CH4 도메인을 추가로 포함한다.
- [0548] 제86 구현예에서, 구현예 1-85 중 어느 하나에 따른 TCP는 알부민 또는 알부민-결합 도메인을 포함하는 군으로부터 선택되는 친화성 태그를 더 포함한다. 제87 구현예에서, 구현예 1-86 중 어느 하나에 따른 TCP는 링커, 예를 들어 GS 링커 또는 서열번호 107-110 중 임의의 링커를 추가로 포함한다. 제88 구현예에서, 구현예 1-87 중 어느 하나에 따른 TCP는 신호 펩타이드, 예를 들어 서열번호 22의 신호 펩타이드를 추가로 포함한다.
- [0549] 제89 구현예에서, 구현예 1-88 중 어느 하나에 따른 TCP는 TCP 단량체를 적어도 2, 3, 4, 5, 6 또는 더 많이 포함하는 다량체를 형성한다. 제90 구현예에서, 구현예 89의 TCP는 구현예 1-88 중 어느 하나에 따른 TCP 단량체를 2개 이상 포함하는 이량체를 형성한다. 제91 구현예에서, 구현예 90에 따른 TCP에 있어서, TCP 단량체는 하나 이상의 이황화 결합을 통해 공유 결합되며, 선택적으로 TCP 단량체는 적어도 부분적인 면역글로불린 힌지부를 통해 공유 연결된다. 제92 구현예에서, 구현예 91에 따른 TCP에 있어서, 부분적인 힌지부는 서열번호 1의 104-113번 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진다. 제93 구현예에서, 구현예 91 또는 92에 따른 TCP에 있어서, 힌지부는 서열번호 1의 99-113번 아미노산들에 대해 적어도 85%, 바람직하게는, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%의 서열 동일성을 가진다.
- [0550] 제94 구현예에서, 구현예 89-93 중 어느 하나에 따른 TCP는 구현예 80-82 중 어느 하나에 따른 TCP 단량체로 구성된다.
- [0551] 제95 구현예에서, 구현예 89-93 중 어느 하나에 따른 TCP는 구현예 83-85 중 어느 하나에 따른 TCP 단량체를 하나 이상, 바람직하게는 2개 포함한다.
- [0552] 제96 구현예에서, 구현예 1-80, 82-93 및 95 중 어느 하나에 따른 TCP는 물질에 공유 또는 비-공유적으로 연결

되고, 물질은 바람직하게는 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하고자 하는 대상 물질이다. 제97 구현예에서, 구현예 96에 따른 TCP에 있어서, TCP는 물질에 공유 연결된다. 제98 구현예에서, 구현예 96에 따른 TCP에 있어서, TCP는 물질에 비-공유적으로 연결된다.

- [0553] 제99 구현예에서, 구현예 96-98 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 물질은 알레르겐이다. 제100 구현예에서, 구현예 96-98 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 물질은 과민증 유발 물질이다. 제101 구현예에서, 구현예 96-98 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 물질은 자가면역 반응의, 예를 들어, 자가항체의 표적 단백질이다. 제 102 구현예에서, 구현예 96-99 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 물질은 자가면역 반응의 표적 에피토프, 예를 들어, 자가항체의 표적 에피토프이다. 이는 또한 자가면역 반응의 표적 에피토프인 T 세포 에피토프일 수 있다. 제103 구현예에서, 구현예 96-99 중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, 물질은 치료학적 물질이다. 제104 구현예에서, 구현예 96-103중 어느 하나에 따른 TCP에 있어서, TCP 및 물질은 융합 단백질을 형성한다.
- [0554] 제105 구현예에서, 본 발명은 구현예 1-104 중 어느 하나에 따른 TCP를 암호화하는 핵산을 제공한다. 제106 구현예에서, 구현예 105에 따른 핵산은 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포 및/또는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 상동적인 재조합용 벡터에서 TCP를 발현시키는데 적합한 발현 벡터이며, 숙주 세포는 바람직하게는 진핵생물 숙주 세포이다.
- [0555] 제107 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 TCP를 암호화하는 핵산, 바람직하게는 구현예 105-106 중 어느 하나에 따른 핵산의 제조 방법을 제공한다:
- [0556] (a) 면역글로불린 Fc-부분 체인을 암호화하는 핵산 서열을 제공하는 단계,
- [0557] (b) 하나 이상의 이중적인 트레지토프의 핵산을, 단계 (a)의 핵산 서열에, 본원에 정의된 바와 같이 서열번호 1에 따른 면역글로불린 Fc-부분 체인의 프레임 A, B 또는 C 중 하나 이상에 대응되는 위치에 도입하는 단계,
- [0558] (c) 단계 (b)의 서열을 가진 핵산을 구축하는 단계.
- [0559] 제108 구현예에서, 본 발명은 구현예 105-106 중 어느 하나에 따른 핵산을 포함하는 진핵생물 또는 원핵생물, 바람직하게는, 진핵생물 숙주 세포를 제공하며, 선택적으로, 숙주 세포는 TCP를 발현하는데 적합하다.
- [0560] 제109 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 TCP 제조 방법을 제공한다:
- [0561] (a) 구현예 108에 따른 숙주 세포를 TCP를 발현하는데 적합한 조건에서 배양하는 단계;
- [0562] (b) 단계 (a)에서 발현된 TCP를 포함하는 세포 또는 배지를 회수하는 단계;
- [0563] (c) TCP를 단리하는 단계;
- [0564] (d) 선택적으로, 단계 (c)의 TCP를 약제학적으로 허용가능한 조성물로 제형화하는 단계.
- [0565] 제110 구현예에서, 구현예 109에 따른 방법에 있어서, 단계 (c)는 TCP를 친화성 물질에 흡착시키는 것을 포함하며, 친화성 물질은 바람직하게는 인간 Ig의 Fc-부분에 대한 다클론 항체를 포함하며, 단계 (c)는 선택적으로 친화성 크로마토그래피를 포함한다.
- [0566] 제111 구현예에서, 본 발명은 구현예 105-106 중 어느 하나에 따른 핵산을 포함하는 형질전환 동물, 바람직하게는 비-인간 동물, 예를 들어 마우스를 제공한다.
- [0567] 제112 구현예에서, 본 발명은 조성물이 물질을 더 포함하며, 물질이 선택적으로 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하고자 하는 대상 물질인, 구현예 1-104 중 어느 하나에 따른, 바람직하게는 구현예 80-82 또는 94에 따른 TCP를 포함하는 조성물을 제공한다. 제113 구현예에서, 구현예 112에 따른 조성물에 있어서, 물질은 알레르겐이다. 제114 구현예에서, 구현예 112에 따른 조성물에 있어서, 물질은 과민증 유발 물질이다. 제115 구현예에서, 구현예 112에 따른 조성물에 있어서, 물질은 자가면역 반응의 표적 단백질, 예를 들어, 자가항체의 표적 단백질이다. 제116 구현예에서, 구현예 112에 따른 조성물에 있어서, 물질은 자가면역 반응의 표적 에피토프, 예를 들어, 자가항체의 표적 에피토프이다. 물질은 T 세포 기반의 자가면역 반응의 표적 에피토프일 수 있다. 제117 구현예에서, 구현예 112에 따른 조성물에 있어서, 물질은 치료학적 물질이다.
- [0568] 제118 구현예에서, 본 발명은 구현예 1-104 중 어느 하나에 따른, 바람직하게는 구현예 80-82 또는 94에 따른 TCP, 및 물질, 선택적으로, 원치않는 면역 반응을 억제하거나 및/또는 면역학적 관용을 부여하고자 하는 대상 물질을 분리하여 포함하는 키트를 제공한다. 제119 구현예에서, 구현예 118에 따른 키트에 있어서, 물질은 알레르겐이다. 제120 구현예에서, 구현예 118에 따른 키트에 있어서, 물질은 과민증 유발 물질이다. 제121 구현예에

서, 구현예 118의 TCP에 있어서, 물질은 자가면역 반응의 표적 단백질, 예를 들어, 자가항체의 표적 단백질이다. 제122 구현예에서, 구현예 118의 TCP에 있어서, 물질은 자가면역 반응의 표적 에피토프, 예를 들어, 자가항체의 표적 에피토프이다. 이는 또한 자가면역 반응의 표적 에피토프인 T 세포 에피토프일 수 있다. 제123 구현예에서, 구현예 118의 TCP에 있어서, 물질은 치료학적 물질이다.

[0569] 제124 구현예에서, 본 발명은 구현예 1-104 중 어느 하나에 따른 TCP, 구현예 105-106 중 어느 하나에 따른 핵산 또는 구현예 108에 따른 숙주 세포, 및 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 약학적 조성물은 TCP를 포함한다.

[0570] 제125 구현예에서, 구현예 124에 따른 약학적 조성물은 구현예 112-117 중 어느 하나에 따른 조성물 또는 구현예 118-123 중 어느 하나에 따른 키트를 포함한다.

[0571] 제126 구현예에서, 본 발명은 개체에서 면역 반응을 조절하는데 이용하기 위한 구현예 124-125 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물을 제공한다. 제127 구현예에서, 구현예 126에 따라 이용하기 위한 약학적 조성물은 면역 반응을 억제하거나 또는 관용을 유도하기 위한 것이며, 선택적으로 면역 반응은 TCP와 공동-투여되는, 예를 들어 공유-연결된 형태의 물질에 대한 면역 반응이다. 제128 구현예에서, 구현예 126 또는 127에 따라 이용하기 위한 약학적 조성물은 다른 물질에 대한 원치않는 면역 반응을 억제 또는 저해하는데 이용하기 위한 것이며, TCP는 이 물질과 공동-투여된다. 제129 구현예에서, 구현예 126에 따라 이용하기 위한 약학적 조성물은 TCP와 공유 연결된 물질에 대해 원치않는 면역 반응을 억제 또는 저해하는데 이용하기 위한 것이다.

[0572] 제130 구현예에서, 본 발명은 자가면역 관련 장애, 알레르기, 바이러스 감염 또는 이식-관련 면역 반응 또는 장애 예방 또는 치료하는데 이용하기 위한, 바람직하게는, 자가면역 장애를 치료하는데 이용하기 위한 구현예 124-129 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물을 제공한다. 제131 구현예에서, 구현예 130에 따른 약학적 조성물은 자가면역 관련 장애를 예방하는데 이용하기 위한 것이다. 제132 구현예에서, 구현예 130에 따른 약학적 조성물은 자가면역 관련 장애를 치료하는데 이용하기 위한 것이다. 제133 구현예에서, 구현예 130에 따른 약학적 조성물은 알레르기를 예방하는데 이용하기 위한 것이다. 제134 구현예에서, 구현예 130에 따른 약학적 조성물은 알레르기를 치료하는데 이용하기 위한 것이다. 제135 구현예에서, 구현예 130에 따른 약학적 조성물은 바이러스 감염을 치료하는데 이용하기 위한 것이다. 제136 구현예에서, 구현예 130에 따른 약학적 조성물은 이식-관련 면역 반응 또는 장애를 예방하는데 이용하기 위한 것이다. 제137 구현예에서, 구현예 130에 따른 약학적 조성물은 이식-관련 면역 반응 또는 장애를 치료하는데 이용하기 위한 것이다. 제138 구현예에서, 본 발명은 치료학적 단백질에 대한 자가면역 반응을 예방하는데 이용하기 위한 구현예 124-129 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물을 제공한다.

[0573] 제139 구현예에서, 본 발명은 면역 세포를 구현예 1-104 중 어느 하나에 따른 TCP, 구현예 105-106 중 어느 하나에 따른 핵산 또는 구현예 108에 따른 숙주 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 면역 반응을 조절, 바람직하게는 면역 반응을 억제 또는 관용을 유도하기 위한 예를 들어 시험관내 방법을 제공하며, 선택적으로, 면역 반응은 TCP와 공유 또는 비-공유 연결된 물질에 대한 면역 반응이다.

[0574] 제140 구현예에서, 구현예 1-130 중 어느 하나에 따른 이중적인 트레지토프는 서열번호 1과 85% 이상의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열 내 동일 위치에서 동일하게 생성되지 않으며, 예를 들어, 서열번호 1과 85% 이상의 서열 동일성을 가진 자연 생성 아미노산 서열 내 동일 위치에서 동일하게 생성되지 않는다.

**도면의 간단한 설명**

[0575] **도 1:** 트레지토프 서열의 오리진을 보여주는, Kuby, Immunology, Seventh Edition, W. H. Freeman & Co., New York, 2013에 따른 Ig 도메인 구조.

**도 2:** 인간 IgG 중쇄 (P01857; 서열번호 1)의 불변부의 서열 구조 및 담체 분자 서열로서 서열번호 1의 104-330번 위치의 바람직한 Fc-부분 하위-서열 (서열번호 60). 다중 서열 정렬을 통해 동정한 트레지토프 치환 프레임은 강조 표시된다.

**도 3:** 분자내 이황화 결합, 도메인 경계 및 국소 잔기 넘버링의 치환 프레임이 표시된 Fc-부분 하위-서열 (서열번호 60).

**도 4:** 전체 담체 분자 서열 (P01857, 서열번호 1의 150-220번 위치가 표시됨, 서열번호 104)에 대한 트레지토프 서열 Treg289, Treg167, Treg009A, Treg029B, Treg084 및 Treg134 (서열번호 10, 5, 2, 3, 7 및 8)의 ClustalX 정렬 발췌. P01857 104-330번 위치에 대해 trimmed Treg088x-v1을 추가로 정렬하여, 추가하였다. 전

체 담체 분자 서열에 대한 전체 정렬은 잔기 30개로 이루어진 프레임 A를 정의한다.

**도 5:** 담체 분자의 부분 서열 (P01857, 서열번호 1의 241-310번 위치가 표시됨, 서열번호 105)에 대한 트레지토프 서열 Treg289, Treg167, Treg009A, Treg029B, Treg084 및 Treg134 (서열번호 10, 5, 2, 3, 7 및 8)의 ClustalX 정렬 발췌. P01857에 대해 trimmed Treg088x-v1 (서열번호 15)을 추가로 정렬하여, 추가하였다. 담체 분자의 부분 서열에 대한 전체 정렬은 잔기 28개로 이루어진 프레임 B를 정의한다.

**도 6:** 담체 분자의 부분 서열 (P01857, 서열번호 1의 205-250번 위치가 표시됨, 서열번호 106)에 대한 트레지토프 서열 Treg289, Treg167, Treg009A, Treg029B, Treg084 및 Treg134 (서열번호 10, 5, 2, 3, 7 및 8)의 ClustalX 정렬 발췌. 측면 시스테인은 정렬 표적에 포함되지 않는다. 아울러, P01857에 대해 trimmed Treg088x-v1 (서열번호 15)을 추가로 정렬하여, 추가하였다. 담체 분자의 부분 서열에 대한 전체 정렬은 잔기 32개로 이루어진 프레임 C를 정의한다.

**도 7:** 프레임 A (좌측 막대, 검정), 프레임 B (중간 막대, 회색) 또는 프레임 C (우측 막대, 옅은 색)에 대한 단일-치환된 Fc 동중이량체의 결합 에너지 예측. 분자간 이황화 결합으로 인한 공유 기여는 무시한다.

**도 8:** 3중-치환된 Fc 동중 이량체의 결합 에너지 예측. 1: tgp0084fa, tgp0167fb, tgp009Afc; 2: tgp0134fa, tgp029Bfb, tgp0167fc; 3: tgp029Bfa, tgp0289fb, tgp0134fc; 4: tgp0167fa, tgp009Afb, tgp0084fc; 5: tgp0289fa, tgp0134fb, tgp0084fc; 6: tgp0084fa, tgp0167fb, tgp009Afc; 7: P01857 104-330번 위치, 비-치환된 담체 (tgp: 트레지토프, fa: 프레임 A, fb: 프레임 B, fc: 프레임 C. 분자간 이황화 결합으로 인한 공유 기여는 무시한다. 단일 트레지토프는 tgp0084 등으로 명명한다.

**도 9:** 선택 이종이량체들의 결합 에너지.

- 1: P01857#104-330 (당화된), 비-치환된 담체
- 2: P01857#104-330 + tgp0289fa-tgp0134fb-tgp0084fc 및  
P01857#104-330 + tgp029B-tgp0289fb-tgp0134fc
- 3: P01857#104-330 + tgp0289fa-tgp0134fb-tgp0084fc 및  
P01857#104-330 + tgp009Afa-tgp029Bfb-tgp0167fc
- 4: P01857#104-330 + tgp0084fa-tgp0134fb-tgp029Bfc 및  
P01857#104-330 + tgp0167fa-tgp0289fb-tgp009Afc
- 5: P01857#104-330 + tgp0289fa-tgp0134fb-tgp0084fc 및  
P01857#104-330 + tgp029Bfa-tgp0167fb-tgp009Afc
- 6: P01857#104-330 + tgp029Bfa-tgp0289fb-tgp0134fc 및  
P01857#104-330 + tgp0289fa-tgp0134fb-tgp0084fc
- 7: P01857#104-330 + tgp0134fa-tgp0289fb-tgp0084fc 및  
P01857#104-330 + tgp0167fa-tgp009Afb-tgp029Bfc
- 8: P01857#104-330 + tgp009Afa-tgp0084fb-tgp0289fc 및  
P01857#104-330 + tgp0134fa-tgp029Bfb-tgp0167fc
- 9: P01857#104-330 + tgp0134fa-tgp0167fb-tgp009Afc 및  
P01857#104-330 + tgp029Bfa-tgp0084fb-tgp0289fc
- 10: P01857#104-330 + tgp029Bfa-tgp009Afb-tgp0167fc 및  
P01857#104-330 + tgp0084fa-tgp0134fb-tgp0289fc
- 11: P01857#104-330 + tgp0084fa-tgp0167fb-tgp0134fc 및  
P01857#104-330 + tgp009Afa-tgp029Bfb-tgp0289fc

**도 10:** 본 발명의 단백질의 의미에서 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 분자로서 Fc 이량체. 이중이량체 복합체 [E(A:B)](아래쪽 그래프) 및 단량체 [E(A), E(B)](위쪽 그래프)의 총 에너지와 결합 에너지 간의 상관관계.

**도 11:** 구조체 V32 및 3종의 다이렉트 트레지토프 (Dir-Treg)에 대한 발현 분석. 구조체 V32 또는 Dir-Treg-01-FLAG 또는 Dir-Treg-02-FLAG 또는 Dir-Treg-03-FLAG (서열번호 101-103)에 대한 서열 정보를 운반하는 플라스미드 DNA를 동일한 조건에서 CAP-T 세포에 핵으로 형질전환하고, 4일간 단백질 발현을 수행하였으며, 각각의 Dir-Treg는 C-말단에 트레지토프 서열과 그 다음으로 FLAG-Tag가 연속적으로 클로닝된 것이다. 세포 상층액을 원심분리를 통해 회수하였다. 구조체 V32는 1:10으로 희석하고, Dir-Treg-0x-FLAG 상층액은 1:2로 희석하였으며, 샘플을 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 카르복시-말단 FLAG-BAP 융합 단백질 (Sigma-Aldrich, P7457-.1MG)을 대조군으로 연속 희석에 사용하였다. Precision Plus Protein All Blue Standard (Bio-Rad, 161-0373)를 크기 확인을 위해 이용하였다. SDS-PAGE를 실시한 후, 단백질을 겔에서 PVDF 막으로 블롯팅한 다음 항-FLAG 및 항-Fc 항체를 이용해 형광 검출을 수행하였다. 구조체 V32의 발현은 Dir-Treg-0x-FLAG 변이체들과 비교해 단백질을 현저하게 높은 수준으로 생산하였다.

**도 12:** FcTregV1, V3, V13, V14, V20, V23, V32 및 V34 및 대응되는 비-변형된 Fc-부분 (서열번호 60)에 대한 웨스턴 블롯 분석. CAP-T 세포에 각 구조체를 암호화하는 플라스미드를 일시적으로 형질전환하고, 4일 세포 배양 상층액을 로딩하여, 환원된 SDS-PAGE에서 분리하였다. 웨스턴 블롯 분석을 AffiniPure 마우스 항-인간 IgG, Fc $\gamma$  단편 특이적인 일차 항체 및 IRDye 800CW 당나귀 항-마우스 이차 항체를 사용해 수행하였다. 트레지토프를 포함하는 폴리펩타이드 모두 잘 발현 및 분비되었다. Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards를 이용해 확인한 단백질 크기를 나타낸다.

**서열목록**

- 서열번호 1: 인간 wt IgG 불변부
- 서열번호 2: Treg009A
- 서열번호 3: Treg029B
- 서열번호 4: Treg088
- 서열번호 5: Treg167
- 서열번호 6: Treg289n - 천연
- 서열번호 7: Treg084
- 서열번호 8: Treg134
- 서열번호 9: Treg088x
- 서열번호 10: Treg289
- 서열번호 11: trimmed Treg009A
- 서열번호 12: trimmed Treg029B - v1
- 서열번호 13: trimmed Treg029B - v2
- 서열번호 14: trimmed Treg088
- 서열번호 15: trimmed Treg088x - v1
- 서열번호 16: trimmed Treg088x - v2
- 서열번호 17: trimmed Treg167
- 서열번호 18: trimmed Treg289n
- 서열번호 19: trimmed Treg289
- 서열번호 20: trimmed Treg084

- 서열번호 21: trimmed Treg134
- 서열번호 22: 신호 펩타이드
- 서열번호 23-44 및 46-58: FcTregV1-V22 및 V24-V36
- 서열번호 59: 신호 펩타이드를 암호화하는 na
- 서열번호 60: Fc-부분 하위-서열
- 서열번호 61-96: FcTregV1-V22 및 V24-V36을 암호화하는 na
- 서열번호 97: Dir-Treg01-FLAG
- 서열번호 98: Dir-Treg02-FLAG
- 서열번호 99: Dir-Treg03-FLAG
- 서열번호 100: FLAG 서열
- 서열번호 101: Dir-Treg01-FLAG DNA
- 서열번호 102: Dir-Treg02-FLAG DNA
- 서열번호 103: Dir-Treg03-FLAG DNA
- 서열번호 104: 도 4에 나타난 서열번호 1의 부분 서열
- 서열번호 105: 도 5에 나타난 서열번호 1의 부분 서열
- 서열번호 106: 도 6에 나타난 서열번호 1의 부분 서열
- 서열번호 107: 링커 1
- 서열번호 108: 링커 2
- 서열번호 109: 링커 3
- 서열번호 110: GS 링커의 서열 또는 부분 서열
- 서열번호 111: FcTregV32\_변이체

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**실시예**

- [0576] **실시예**
- [0577] 트레지토프에 대한 담체 플랫폼을 동정하기 위한 분자 모델링 연구

[0578] 트레지토프는 조절성 T 세포를 활성화할 수 있는, 인간 및 영장류 타입 G 면역글로불린 (IgG)의 불변부에서 천연적으로 발견되는 펩타이드이다. 그러나, 이러한 펩타이드는 재조합 방식으로 생산하기 매우 어렵다. 이의 천연 기원에 따라, 인간 IgG의 Fc-부위를 여러가지 트레지토프 세트 (서열번호 2, 3, 5, 6, 7, 8)의 클로닝용 프레임워크 후보로 선택하였다. 이들 서열은 본래 **도 1**에 나타난 바와 같이 면역글로불린의 여러가지 도메인으로부터 유래하였다. 본 실험의 목표는 트레지토프 클로닝 및 발현에 적합한 서열 프레임을 동정하는 것이었다. 본 연구에 사용된 정확한 기본 서열은 UNIPROT 서열 P01857 (서열번호 1)의 104-330번 위치 (**도 2**)이며, 이는 힌지부의 일부분에서 시작해 인간 IgG1의 중쇄 불변부의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 상세 서열은 **도 3**에 나타난다.

[0579] 담체 분자 서열 내 잠재적인 치환 프레임을 CLUSTALX 다중 서열 정렬을 통해 동정하였다. 트레지토프의 에피토프 특징을 유지하기 위해, 트레지토프 서열에 갭 삽입 없이 정렬하였다. 이는 최고 가능한 갭 패널티 값 (=100)을 적용해 달성하였다. **도 4, 5** 및 **6**은 트레지토프 서열과 담체 분자 서열 간의 정렬을 도시한다. 전체 담체 분자 서열을 기준으로, 프레임 A (**도 4**)에 대해 정렬한다. 분자간 이황화 결합을 교란하지 않기 위해, 전체 서열을 시스테인 잔기를 망라하지 않는 구획으로 나누었다. 이들 구획을 트레지토프와 추가로 정렬하였다. 이로써 **도 5** (프레임 B) 및 **도 6** (프레임 C)에 나타난 정렬이 수득되었다. 이들 다른 2개의 구획들에서 상동성은 전체 서열에서보다 현저하게 낮다는 점에 유의하여야 한다.

- [0580] Fc-부위는, 이의 생물학적 활성 형태에서, CH2 도메인과 CH3 도메인을 포함하며 힌지부에서 분자간 이황화 결합에 의해 서로 연결된, 동종이량체이다 (도 1). 유사한 서열들에 대한 상동성에 기반한 모델은 YASARA 소프트웨어 제품군을 이용한 상동성 모델링으로 지칭되는 계산 방법에 의해 구축되었다. 에너지 측면에서 가장 우호적인 구조를 결과 모델 구조로 선택하였다. 소프트웨어에 의해 예측된 이량체 형성 실패 및 수렴 불량은 실제 접힘 문제에 대한 표시로 간주하였으며, 불안정성의 예측으로 해석하였다. 계산된 구조 모델에 기반하여, 프레임 A는 완전히 도메인 CH2에 포함되고, 프레임 B는 거의 도메인 CH3의 중앙에 위치함을 알 수 있다. 프레임 C는 도메인 CH2와 중첩되며, CH2와 CH3의 도메인 경계부를 포함한다. 결과적으로, 프레임 A는 트레지토프 치환에 가장 덜 중요한 영역인 것으로 추정되며, 프레임 B 및 C는 단량체의 구조, 이량체의 구조 및 이량체 결합 에너지에 대해 보다 현저한 영향을 미칠 수 있다.
- [0581] 치환 프레임의 폴드 (fold)는 항상  $\beta$ -가닥 및 한쪽 또는 양쪽 말단에서 루프 또는 짧은 나선을 포함하는 것으로 예측되었다. 각 경우에,  $\beta$ -가닥은 동일 도메인 내 다른 가닥들과 쌍을 형성해, 담체의 다른 2차 구조 요소들과 긴밀한 커플링을 확립한다. 그러나, 어느 프레임도 다른 Fc 분자 체인과의 분자간 상호작용에 직접 관여하지 않는다. 정확하게 접힌 담체는 기존 담체 구조 (P01857)와 유사한 결합 에너지를 나타내어야 한다. 힌지부에서 분자간 이황화 결합 형성은, 안정한 이량체 구조가 형성되었을 때에만 예측할 수 있다. CH 도메인들 간의 상호작용이 이러한 이량체 형성에 지배적인 기여 인자인 것으로 입증된 바 있다. 따라서, 모델의 CH3 - CH3 상호작용 에너지가 예측 구조를 1차 검증하는데 유용한 척도이다. 어닐링 및 최소화 예측에 물 분자는 적용하지 않았다. 대신, 결정 구조를 가능한 근접하게 재현하도록 매개변수화된 특수 힘 영역 (special force field), 즉 YASARA NOVA 힘 영역이 이량체화 에너지를 평가하는데 있어 계산 시도 및 정밀도 간의 합리적인 타협인 것으로 판명된 바 있다.
- [0582] 실제, Fc-부분 변이체 (원자 약 7500개)에서, 상동성 모델링 공정에 따라 어닐링 및 급속 하강 최소화 시뮬레이션 사이클을 36회 수행한 바, 구조, 총 에너지, 단량체 에너지 및 결합 에너지에서 수렴을 달성하기에 유용한 전략인 것으로 판명되었다. 그럼에도 불구하고, 고전적인 힘-영역 기반의 모델은 이의 정밀도가 제한적이며, 비슷한 구조들 간의 비교 및 그로부터 정성적인 경향 추론으로만 해석되어야 한다. 결과의 신뢰성을 높이기 위해 신뢰할 수 있는 실험 데이터를 참조하였다.
- [0583] 아래 구조 변이체들을 분석하였다:
- [0584] a) 트레지토프 하나를 포함하는 Fc 동형이량체 (각 프레임 당 트레지토프 1개/Fc 분자)
- [0585] b) 트레지토프 3개를 포함하는 Fc 동형이량체 (트레지토프 3개/Fc 분자, 각 프레임 당 트레지토프 1개)
- [0586] c) 트레지토프 6개를 포함하는 Fc 이형이량체 (트레지토프 3개/Fc 분자, 각 프레임 당 트레지토프 1개, 각 단량체 내 서로 다른 트레지토프)
- [0587] d) C-말단에 트레지토프 부착
- [0588] e) a), b) 및 d)의 조합
- [0589] 도 7은 TCP의 이량체 결합 에너지 (사례 a)를 나타낸 것이다. 이들 및 다른 모든 결과들은 힌지부의 이황화 결합 2개로부터 기원한 공유 기여는 무시하였음에 유념한다. 이들의 기여는 모든 트레지토프 삽입 변이체들에서 동일한 것으로 추정된다. 예상된 바와 같이, 기본 서열을 트레지토프로 임의 치환한 결과, 결합 에너지가 감소하였다. 변형된, 각각 당화 생략이 이러한 차이에 유의하게 기여할 가능성이 높다. 모델링한 변이체들 모두 오리지널 Fc 단편과 동일한 당화 패턴을 가지지 않음에 유념하여야 한다. 담체 모델 구조는 이의 선두 주형, PDB 결정 구조 3SGK로부터 유래한 당화 패턴을 유지한다. 이 구조는 서열번호 60의 Asn77에서 당화된다 (도 3 참조). 이는 서열번호 1의 Asn180 위치이다 (도 4 참조). 당화는 최대 tgp084, tgp0134 및 tgp088x에서 예측할 수 있으며, 또한 바로 이 위치에 Asn이 존재하는 것으로 명확해졌다. 프레임 A에 모든 다른 트레지토프를 삽입하면 이 당화 부위가 없어졌다. 데이터에서 당화가 이량체 결합 에너지에 어느 정도로 영향을 미치는지는 명확하지 않았다. 한편, 오리지널 Fc 서열과 N180Q 치환 차이만 있는 tgp0289 (도 4 참조)가 Fc 이량체와 가장 비슷하였지만, 결합 에너지 차이가 135 kJ/mol로 의외였다. 이는 주로 2면각 및 정전기 에너지 차이에서 비롯한 것이다. 특히, 정전기 에너지 차이는 적용된 힘 영역에서 명시적으로 고려되지 않는 용매화 현상에 대한 힌트이다. 그래서 결합 에너지 차이가 힘 영역에 의해 과대 평가될 수 있다. tgp0084 및 tgp0134를 제외하고는, 프레임 C에도 적용되었다. 다이어그램은 또한 이량체 결합 에너지에 직접 영향을 미치는, 프레임 B의 중요한 역할을 검증해주었다. 유리하게는 Tgp009A를 프레임 A에 도입하여야 한다.

- [0590] 도 8는 사례 b), 즉 동종이량체로서 3중 치환된 Fc-부분 변이체의 결과를 도시한다. 먼저, 도 7의 데이터와 비교해, 트레지토프의 3중 치환시 결합 에너지에 일부 상승적인 효과가 존재하는 것으로 보인다. 오차 막대는 최적화 과정 중에 결합 에너지에 대한 표준 편차 (변동)를 표시한다.
- [0591] 사례 c) 치환의 예는 도 9에 도시한다. 이는 더이상 동종이량체가 아니며, 임의의 고유한 대칭성이 없는 이종이량체이다. 변이체 2를 제외하고는, 모든 이종이량체 변이체들은 비-치환된 Fc 이량체보다 훨씬 덜 안정적이다. 그러나, 도 8의 동종이량체와 비교해, 도 9는 변이체 11만 동종이량체보다 현저하게 덜 안정적임을 보여준다. 원칙적으로, 실험적으로 트레지토프를 6개 함유한 이종이량체를 구축할 수 있다. 변이체 7, 8 및 9는 또한 당화 된 단량체를 하나 이상 가질 수 있다.
- [0592] 도 10은 이종이량체의 에너지 상황을 개괄적으로 나타낸 것이다. 대부분의 변이체는 결합 에너지가 -250 kJ/mol 내지 -320 kJ/mol이며, 전체 복합체 에너지는 -8740 kJ/mol 내지 -11000 kJ/mol이다. 이러한 경우의 예외는, 도 9에서 정의되는 바와 같이, 결합 에너지가 매우 약한 변이체 11 (-154 kJ/mol 결합 에너지; -8214 kJ/mol 전체 복합체 에너지), 매우 안정적인 변이체 2 (-424 kJ/mol 결합 에너지; -11481 kJ/mol 전체 복합체 에너지) 및 비-치환된 담체 변이체 1 (-515 kJ/mol 결합 에너지; -10123 kJ/mol 전체 복합체 에너지)이다. 변이체 2는, 트레지토프에 의해 유발된 안정성 문제가 우발적으로 없어진다는 점에서 독특한 것으로 보인다. 특정한 일관성 지표는 총 에너지와 결합 에너지 간에 발견되는 약한 상관관계이다. 아울러, 원자의 개수가 변이체들 간에 큰 차이가 없으므로 (7200 - 7600개), 에너지 수직 확산은 힘 영역 정밀도 및 엔트로피 기여 둘다에 대한 크기 순서를 제시해준다.
- [0593] Fc-부위의 C-말단에 트레지토프 직접 부착을 예비 분석한 결과, 각 이량체의 불안정화가 확인되었다 (데이터 도시 안함). 그 이유는, C-말단 아르기닌의 카르복시기가 표면에 접근할 수 없고 이량체 구조의 안에 은폐되어 있다는 점과 관련 있을 수 있다. C-말단의 위치를 바꾸는 임의의 변형은 CH3 도메인의 변형 (deformation)을 유발할 수 있으며, 이량체 결합 에너지를 낮출 수 있다. 3가지 링커 버전 (서열번호 107-109)을 프레임 B 치환 없이 3중의 트레지토프 구조체를 이용해 분석하였다. 링커 1종, 즉 링커 3 (서열번호 109)를 정상적인 C-말단 라이신 잔기가 누락된 말단 절제된 Fc 분자에 이용하였다. 링커 2 (PTGSG; 서열번호 108)는 결합 에너지의 개선을 제공하였으며, 이는 C-말단 부착으로서 tgp029B (예를 들어, 변이체 3; 담체 서열 + tgp009Afa (프레임 A에 Treg009A), no fb (프레임 B에 트레지토프 없음), tgp0084fc (프레임 C에 Treg084, 및 tgp029B (Treg029B) C-말단 부착 - 동종이량체)가, tgp0289 (변이체 1; 담체 서열 + tgp009Afa, no fb, tgp0084fc, 및 tgp0289 C-말단 부착 - 동종이량체)보다 더 현저하다.
- [0594] 여러가지 TCP들의 발현
- [0595] TCP들에 대한 여러가지 발현 구조체 (본원에서 FcTreg로도 언급함) 36종, 즉 구조체 FcTregV1 - FcTregV22 및 FcTregV24 - FcTregV36을 제조하였다. FcTregV23 역시 제조하였다 (서열번호 45). 각 TCP 변이체의 아미노산 서열 (서열번호 23-44 및 46-58)과 핵산 서열 (서열번호 61-82 및 84-96)은 본 발명의 서열목록에 제공한다. 구조체들 모두 분비시키기 위해 Fc 신호 펩타이드, 예를 들어, Fc-Signal\_AA (서열번호 22): METDTLLLVVLLLVWPGSTG를 이용하였다.
- [0596] 이 신호 서열은 이 Fc-Signal\_DNA (서열번호 59): ATGGAACCCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAGGCAGCACCGGC에 의해 암호화된다.
- [0597] 신호 서열은 단백질의 N-말단에 해당하는 DNA의 5' 말단에 부가하였다. 신호 펩타이드는 단백질의 수송 및 분비 중에 절단 제거된다.
- [0598] 발현 및 이량체 형성을 분석하기 위해, 구조체의 일시적인 발현에 HEK293F 세포 및 CAP-T 세포를 이용하였다. CAP-T 세포는 일차 인간 양수 세포에 기반한 불멸화 세포주이며, 4 mM L-Glu이 첨가된 PEM 배지 (Life Technologies)에서 현탁 배양하였다. CAP Go 세포와 비교해, CAP-T 세포는 유인원 바이러스 40의 거대 T 항원을 추가적으로 발현한다. HEK 293-f 세포주는 오리지널 HEK 293 세포주로부터 유래한 것이며, 무혈청 배지에서 현탁 배양에 적응된 것이다. 상업적으로 입수가 가능한 Nucleofector™ system을 이용한 전기천공에 의해 일시적인 형질감염을 수행하였다.
- [0599] 배양물의 기하급수적인 성장 단계 동안, CAP-T 세포를 Cedex XS (Roche Applied Science, Innovatis)에 의해 계수하고, 생존 세포 밀도 및 생존성을 결정하였다. 각각의 뉴클레오펙션 반응에서, 원심분리 (150 x g, 5분간)에 의해 CAP-T 세포  $1 \cdot 10^7$  개를 회수하였다. 세포를 완전 뉴클레오펙터 용액 SE (Lonza, Switzerland) 100  $\mu$ l에 재현탁하고, 각각의 Fc-Treg 구조체 (트레지토프 담체 분자를 암호화하는 플라스미드)와 혼합하였다. DNA/

세포 현탁물을 큐벳으로 옮기고, Nucleofector II에서 X001 프로그램에 따라 뉴클레오펙션을 수행하였다. 펄스 후, 미리 데운 완전 PEM 배지 (4 mM L-알라닌-L-글루타민 첨가) 500  $\mu$ l를 큐벳에 첨가하여 세포를 회수하고, 125 mL 진탕 플라스크의 완전 PEM 배지 11.5 mL로 조심스럽게 옮겼다. 큐벳을 신선한 배지 500  $\mu$ l로 1회 행귀, 남아있는 세포를 회수하였다. 최종 배양 부피는 12.5 ml이었다. HEK293-F 세포  $7 \cdot 10^6$  개 및 플라스미드 7  $\mu$ g를 이용해 마찬가지로 전기천공을 수행하였다. 형질감염 후, 세포를 4일간 배양하였다. 세포 펠릿 및 상층액을 웨스턴 블롯으로 검사하였다. 대조군은 Fc 단백질의 형질감염이었다. 검사한 구조체들 모두 펠릿에서 발현이 확인되었지만, 분비 차이가 관찰되었다. HEK293F 및 CAP-T 세포에서 관찰된 발현 간에 양호한 상관관계가 존재하였다.

- [0600] 분자 V1, V3, V13 및 V14는 HEK293F에서 분비 및 발현에서 양호한 결과가 달성되었다. V7, V9 및 V12는 매우 약간이었지만 분비 및 발현이 관찰되었다. 이러한 측면에서 성능이 가장 우수한 TCP는 V1, V3, V13 및 V14이었다 (V13 및 V14는 CAP-T 세포에서만 검사함). CAP-T 세포에서 V15 - V36의 상층액을 추가로 검사한 결과, V20, V23, V32 및 V34에서 특히 양호한 결과가 관찰되었다.
- [0601] 따라서, 본 발명의 바람직한 TCP는 다음과 같은 구조를 가지며, 언급되지 않은 프레임은 이중적인 트레지토프를 포함하지 않는다:
- [0602] (a) 프레임 A에 Treg289, 프레임 C에 Treg084, C-말단 Treg134, 예를 들어, V1
- [0603] (b) 프레임 A에 Treg289, 프레임 C에 Treg084, 프레임 B에 Treg134, 예를 들어, V3
- [0604] (c) 프레임 A에 Treg289, 프레임 C에 Treg084, C-말단 Treg88, 예를 들어, V13
- [0605] (d) 프레임 C에 Treg084, C-말단 Treg134, 예를 들어, V14
- [0606] (e) 프레임 C에 Treg009A, 프레임 B에 Treg088x, 예를 들어, V20
- [0607] (f) 프레임 A에 Treg084, 예를 들어, V23
- [0608] (g) 프레임 A에 Treg009A, 프레임 C에 Treg084, 프레임 B에 Treg009A, C-말단 Treg088x, 예를 들어, V32
- [0609] (h) 프레임 B에 Treg289, C-말단 Treg088x, 예를 들어, V34.

**표 4**

명칭	프레임 A	프레임 C	프레임 B	C-말단	발현	이량체 형성
구조체 V1	Treg289	Treg084		Treg134	++	++
구조체 V3	Treg289	Treg084	Treg134		+	+/-
구조체 V13	Treg289	Treg084		Treg088x	++	+++
구조체 V14		Treg084		Treg134	++	+
구조체 V20		Treg009A	Treg088x		++	+++
구조체 V23	Treg084				++	++
구조체 V32	Treg009A	Treg084	Treg009A	Treg088x	++	++
구조체 V34			Treg289	Treg088x	++	++

[0611] FcTregsV1, V3, V13, V14, V20, V23, V32 및 V34, 및 대응되는 비-변형된 Fc-부분 (서열번호 60)에 대한 예시적인 웨스턴 블롯을 도 12에 나타낸다. 전술한 바와 같이, 일시적으로 형질감염한 CAP-T 세포의 세포 배양 상층액을, 각 상층액 20  $\mu$ l를 10  $\mu$ l NuPage LDS 샘플 완충제 (4x, Thermo Fisher), 4  $\mu$ l NuPage 샘플 환원제 (10x, Thermo Fisher) 및 6  $\mu$ l Aqua Dest. (B. Braun, Germany)와 혼합하여, 준비하였다. 샘플을 70°C에서 10분간 변성시키고, 준비한 샘플 10  $\mu$ l를 NuPAGE 농도구배 4-12% 비스트리스 겔에 로딩하였다. Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad)를 크기 마커로 이용하였다. 환원된 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)을 200V에서 MOPS 완충제 (40 mL NuPAGE MOPS SDS 전개 완충제 + 760 mL Aqua dest. + 500  $\mu$ l NuPAGE 항산화제)를 이용해 수행하였다. 후속적인 웨스턴 블롯은 니트로셀룰로스 막에서 60분간 30 V에서 이동 완충제 (50 mL NuPAGE 이동 완충제 (20x, Thermo Fisher) + 1 mL NuPAGE 항산화제 + 100 mL 메탄올 + 849 mL Aqua Dest.)를 사용해 수행하였다. 검출시 비-특이적인 항체 결합을 차단하기 위해, 막을 먼저 오디세이 차단 완충제 (PBS)로 4°C에서 밤새 차단 처리하였다. 그 후, AffiniPure 마우스 항-인간 IgG, Fc  $\gamma$  단편 특이적인 항체 (Jackson ImmunoResearch, 209-005-098)를 일차 항체로 사용하였으며, 완만하게 교반

하면서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였으며, 차단 완충제 + 0.05 % Tween 20 30 mL를 혼합하여 준비한 용액에 1:100으로 희석하였다. 2차 항체 IRDye 800CW 당나귀 항-마우스 (1:15000 희석, Li-Cor)를 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1차 항체 및 2차 항체의 인큐베이션 단계 사이 및 이후에, 막을 PBS-T (500 mL PBS + 0.1% 10% Tween 20 용액) 약 25 mL로 각각 4번 행구었다. 막을 5분간 PBS로 2번 행군 후, 광 차단 하에 밤새 건조하였다. 막을 항체-표지된 단백질 밴드를 검출하기 위해 Odyssey CLx Imager (Li-Cor)에서 스캐닝하였다.

[0612] 도 12에 나타낸 바와 같이 환원된 SDS-PAGE를 토대로 한 웨스턴 블롯 결과, FcTregV1, V3, V13, V14, V20, V23, V32 및 V34의 특히 양호한 발현 및 분비가 명확하게 드러났다. TCP들 SDS-PAGE시 환원 조건으로 인해 크기 범위 약 26 - 36 kDa의 단량체로서 대부분 볼 수 있었다. 이 크기 범위에 속하는 각각의 FcTreg 변이체들에서 복수의 밴드는, 단백질이 클론 발현이 아닌 일시적인 형질감염 플로부터 생산된 것이므로, 번역 후 수정 (예, 당화)을 거친 여러가지 중일 수 있다. 약 55 - 70 kDa의 밴드로서 남아있는 이량체화된 TCP 분자들 중 일부도 관찰되었다.

[0613] 이들 결과는, 본 발명의 방식에 따라 면역글로불린 Fc-부위에 병합함으로써 트레지토프를 효율적으로 발현 및 생산할 수 있음을, 보여준다.

[0614] 따라서, 분자 V1, V3, V13, V14, V20, V23, V32 및 V34를 선택해, 재조합 단백질을 안정적으로 발현하는 CAP Go 기본 세포주를 구축하였다. CAP Go 세포의 형질감염은 CAP-T 세포에 대해 전술한 바와 같이 수행하였으며, 단 용액 SE 대신 용액 V를 사용하고, Nucleofector II에서 형질감염 프로그램 X001을 운영하였다. 아울러, 블라스티시딘을 이용한 선별을 뉴클레오펙션 후 72시간 경과시 개시하였다.

[0615] 단백질 A/G 또는 Thermo Scientific의 FcXL 컬럼을 통한 일반적인 친화성 정제 프로토콜에 의해 세포 배양 상층 물로부터 재조합 TCP 변이체를 정제하고자 하는 수차례의 시도들은 실패하였다. TCP는 수지에 적절하게 결합하지 않았으며, 그래서 통과 분획에서 검출되었다. 웨스턴 블롯 검출에서 재조합 단백질 변이체에 결합하는 것으로 확인된 다클론 마우스 항-인간 IgG, Fc- $\gamma$  단편 특이 항체를 적용함으로써, 특이적인 친화성 정제 전략을 개발하였다. 이 항체 (AffiniPure 다클론 마우스 항-인간 IgG, Fc- $\gamma$  단편 특이 항체 (Jackson ImmunoResearch, Cat 209-005-098))를 친화성 크로마토그래피에서 포획 항체로 이용하였다.

[0616] 상업적으로 입수가능한 AffiniPure 다클론 마우스 항-인간 IgG, Fc- $\gamma$  단편 특이 항체 (Jackson ImmunoResearch, Cat 209-005-098)를, 하기 단계에 따라, NHS-활성화된 세파로스 4 패스트 플로우 수지 (GE Healthcare, Cat. 17-0906)에 공유적으로 접합하였다:

[0617] (a) 항-인간 IgG, Fc- $\gamma$  단편 특이 항체 완충제를 커플링 완충제 (0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8.3)로 교체한다.

[0618] (b) NHS-활성화된 세파로스 4 패스트 플로우 매트릭스를 1x 매트릭스 부피의 1 mM HCl로 6회, 그리고 1x 매트릭스 부피의 커플링 완충제로 1회 행구었다.

[0619] (c) 12.5 mL 항-인간 IgG, Fc- $\gamma$  단편 특이 항체 (~1 mg/mL)를 준비한 NHS-활성화된 세파로스 4 패스트 플로우 수지 25 mL에 첨가하였다. 교반기를 사용해 밤새 2-8°C에서 접합을 수행하였다.

[0620] (d) 매트릭스의 미-반응 기들은 0.1 M Tris-HCl, pH ~8.5로 ~4시간 동안 인큐베이션하여 차단하였다.

[0621] (e) 수지를 0.1 M Tris-HCl 완충제, pH 8-9, 및 0.1 M 아세테이트 완충제, 0.5 M NaCl, pH 4-5를 사용해 세척하였다. 세척 공정은 다음과 같다: 3 x 1 매트릭스 부피의 Tris 완충제 -> 3 x 1 매트릭스 부피의 아세테이트 완충제. 이러한 사이클은 3-6회 반복하였다. 마지막으로, 수지를 20% 에탄올 중에 보관하였다.

[0622] (f) 수지는 XK 16/40 또는 Tricorn 10/300 컬럼에 충전하였다.

[0623] 분자 발현 조제물의 세포 배양 상층액으로부터 재조합 단백질 변이체를 정제하기 위해, 세포 배양 상층액을 먼저 pH 7.4로 조정하였다. 상층액을 준비한 친화성 컬럼에 유속 2 - 6 ml/min 및 압력 0.15 - 0.2 MPa으로 로딩하였다. 이후, 컬럼을 DPBS (둘베코의 포스페이트-완충화된 염수)로 행구었다. 재조합 단백질 변이체는 100 mM 글리신-HCl, pH 2.7로 용출시켰다. 유속 및 압력은 로딩 단계에서와 동일하였다. 최종 분획 부피의 약 10%를 사용해 1 M Tris-HCl pH 8.8로 중화하였다. 재조합 단백질 변이체를 PBS (포스페이트-완충화된 염수)로 완충제 교체하고, Pierce 단백질 농축기 (Thermo, Cat: 88535)를 사용해 농축 (~30x)하였다. 선택적으로, Amicon 한외여과 필터 (Merck, Cat: ufc901024)를 추가로 농축하기 위해 사용하였다.

[0624] 방관자 억제 분석

[0625] 건강한 공여자의 PBMC (말초혈 단핵 세포)를 과상표 독소이드를 이용한 증식성 반응을 유발하는 대응되는 항원으로 생체의 자극하는 것에 기반한 방관자 억제 분석 (TT 분석)을 이용해, 작동자 CD4 세포의 증식/활성화에 대한 이들의 저해 능력에 대해 분자 구조체를 평가하였다. 공여자 선택시, 인간 집단을 가능한 광범위하게 포괄하여 (주요 HLA-DR B1 슈퍼타입 망라), 인간 집단에서 대립유전자 변동성의 95% 이상을 망라하도록, 고려하였다. 인큐베이션한 세포에 대한 분석은 세포내 및 세포 표면 마커를 이용한 면역 염색으로 수행하였으며, 유세포 측정으로 분석하였다. 분자 구조체의 저해 효과는 작동자 CD4 T 세포의 증식 및 활성화 소실로서 관찰가능하였다. 특히 효과적인 분자 구조체는 통계학적 분석으로 동정하였다.

[0626] 분석은 0일에 96웰 플레이트에  $3 \times 10^5$  세포/웰로 접종하여 수행하였으며, 각 데이터 포인트는 2세트로 수행하였다. 자극원 첨가, 트레지토프, 면역염색용 항체 및 유세포 측정 셋업 등의 모든 후속적인 조작들은 플레이트에서 세포를 제거하지 않고 수행하였다. PBMC의 자극은 1일에 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  과상표 독소이드 (TT)를 이용해 TCP 구조체 0, 10, 20, 40 또는 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 존재 하에 수행하였다. TCP 구조체 단독 또는 TT 단독만 첨가한 대조군뿐 아니라 이들 중 어떤 것도 첨가하지 않은 대조군도 웰에 포함시켰다. 판독은 7일차에 작동자 (증식, CD25), 기억 (CCR7, CD45RA) 및 조절성 (FoxP3, CD25) T 세포 마커에 따라 수행하였다.

[0627] TCP 변이체 V20 (트레지토프 009A 및 088x 포함)을 건강한 공여자의 PBMC에서 TT 억제 분석으로 검사하였다 (상기 참조). 네이티브 Fc를 대조군으로 이용하였다. 억제 반응은 공여자 및 측정된 자극 매개변수에 따라 달랐다. V20은 마이크로-몰 내지 낮은 마이크로-몰 농도에서, CD69 (양쪽 공여체) 또는 HLA-DR (한쪽 공여체)을 평가하였을 때, TT 작동자 반응을 75% 이상 (백그라운드는 공제함) 억제하였다. TT에 의한 자극에 대한 반응으로서 측정된 매개변수에 대한 억제 감수성 순서는 CD69 > HLA-DR > 증식 > CD25이었다. 공여자 중 한명 (EV0156)에서는, V20이 본 실험에서 검사한 자극 매개변수 4가지 모두 억제하였으며; CD69 및 HLA-DR에 대해 강하였으며, 증식 및 CD25에 대해서는 훨씬 약하였다. 2번째 공여체 (EV0159)의 경우, V20은 CD69에 대해 강한 효과를, HLA-DR에 대해 보다 약한 효과를 나타내었으며, 증식 또는 CD25에 대해서는 인지가능한 효과가 없었다.

[0628] 트레지토프 펩타이드가 직접 융합된 본 발명의 재조합 단백질의 발현 비교

[0629] 본 실험의 목표는 본 발명에 따른 TCP의 발현을, N-말단에 류라인 IgG1 신호 펩타이드가 그리고 C-말단에 검출 또는 잠재적인 정제를 위한 FLAG-Tag가 융합된 트레지토프 (직접 트레지토프, Dir-Treg-FLAG) 3종의 발현을 비교하는 것이었다 (아래 표 및 표시된 서열번호 참조).

표 5

[0630]

서열번호	구조체	트레지토프 1	트레지토프 2	트레지토프 3	트레지토프 4	FLAG 서열
97 & 101	Dir-Treg-01-FLAG	289Q	084	134	-	DYKDDDDK (서열번호 100)
98 & 102	Dir-Treg-02-FLAG	009a	088x	084	-	DYKDDDDK(서열번호 100)
99 & 103	Dir-Treg-03-FLAG	088x	289Q	009a	-	DYKDDDDK (서열번호 100)
92	Fc_Treg_V32	009a	084	009a	088x	-

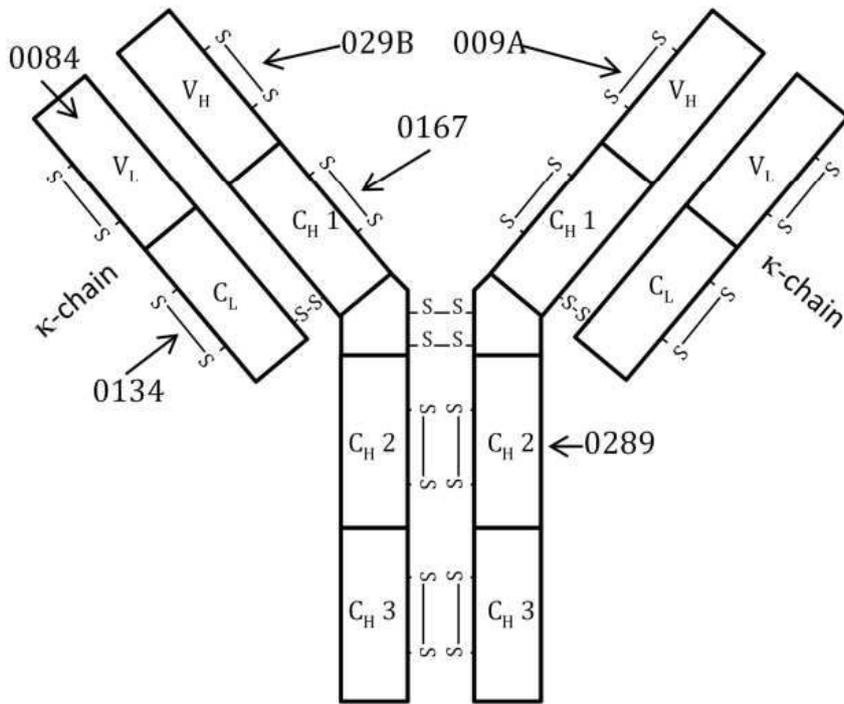
[0631] CAP-T 세포는 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038) 및 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  블라스티시딘이 첨가된 PEM 배지 (Thermo Fisher Scientific, R21001; 완전 PEM 배지)에서 배양하였다. 세포를 해동하기 위해, 냉동 바이얼을 필요한 양만큼 37°C 수조로 옮겼다. 해동한 후, 각 바이얼을 냉각시킨 완전 PEM 배지 10 mL로 옮겼다. 세포 현탁물을 150 xg에서 5분간 원심분리하였다. 이 세척 단계 후 DMSO를 제거하였다. 펠릿을 따뜻한 완전 PEM 배지 15 mL에 재현탁하여, 125 mL 진탕 플라스크로 옮겼다. 세포를 가슴 배양기에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 함유 분위기에 배양하였다. 플라스크를 교반 플랫폼 위에 놓고, 50 mm 궤도로 185 rpm으로 회전시켰다.

[0632] 세포의 서브배양을 3-4일마다 수행하였다. 배양한 세포 현탁물을 필요한 양만큼 새로운 플라스크에 옮기고 완전 PEM 배지를 첨가하여, 신선한 배양물을 0.5x10<sup>6</sup> 세포/ml로 설정하였다. 옮긴 세포 현탁물이 총 부피의 20%를 초과할 경우에는, 현탁물을 150 xg에서 5분간 원심분리하고, 펠릿을 신선한 완전 PEM 배지에 재현탁하였다. 진탕 플라스크 당 세포 현탁물의 부피는 총 플라스크 부피의 20%이었다. 해동 후, 형질감염 실험을 수행하기 전, 서브배양을 최소 3회 수행하였다.

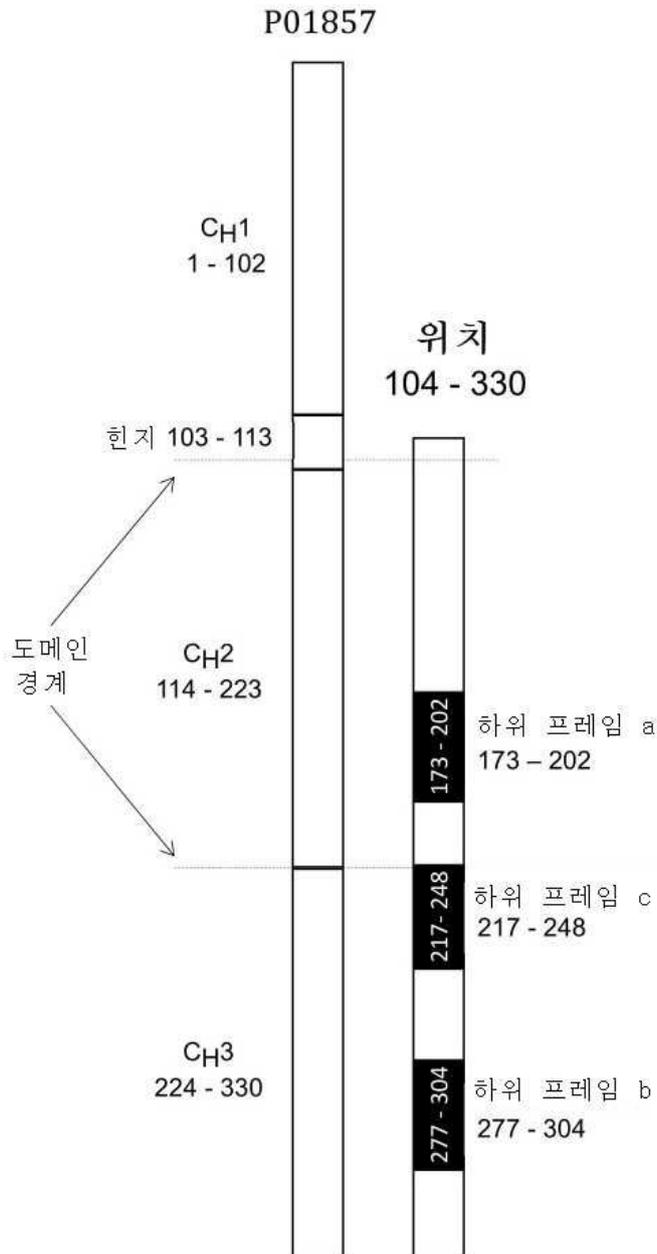
- [0633] CAP-T 세포를 4D-Nucleofector를 사용해 형질감염하였다. 각 형질감염에서, CAP-T 세포  $10 \times 10^6$  개를 15 ml 코니칼 시험관에서 150 xg로 5분간 원심분리하였다. 세포는 펠릿 부피 및 플라스미드 용액의 부피를 고려해 첨가한 SE 완충제 95  $\mu$ l에 재현탁하였다. 그 후, 각 플라스미드 5  $\mu$ g을 세포 현탁물에 첨가한 다음 부드럽게 혼합하였다. 용액을 100  $\mu$ l Nucleocuvettes로 옮겼다. 사용한 형질감염 프로그램은 ED-100이었다. 형질감염 후, 세포를 Nucleocuvette 하나에서 완전 PEM 배지 12.5 mL이 든 125 mL 진탕 플라스크로 옮겼다. 세포는 전술한 바와 같이 4일간 배양하였다. 4일차에 150 xg로 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다.
- [0634] 본 발명의 단백질의 상층액을 1:10으로 희석하고, Dir-Treg-FLAG의 상층액은 환원 샘플 완충제로 1:2로 희석하였다. 카르복시-말단 FLAG-BAP 융합 단백질 (Sigma-Aldrich, P7457-1MG)을 대조군으로서 연속 희석에 이용하였다 (겔에 로딩하는 최종 양: 640 ng, 320 ng, 160 ng, 80 ng, 40 ng, 20 ng). NuPAGE LDS 샘플 완충제 (4x, Thermo Fisher Scientific, NP0007) 2.5부를 NuPAGE 샘플 환원제 (10x, Thermo Fisher Scientific, NP0004) 1부와 조합하여 환원 샘플 완충제를 만들었다. 각 샘플 20  $\mu$ l를 환원 샘플 완충제 20  $\mu$ l과 1.5 mL 바이얼에서 혼합하고, 써모세이커 (Eppendorf)에서 10분간 70°C에서 가열하였다. NuPAGE 4-12% 비스-트리스 단백질 겔 (Thermo Fisher Scientific)을 XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific)에 장착하였으며, 안쪽 챔버 및 바깥 챔버에 1x NuPAGE MES SDS 전개 완충제 (Thermo Fisher Scientific, NP000202)를 채워 넣었다. NuPAGE 향산화제 (Thermo Fisher Scientific) 500  $\mu$ l를 안쪽 챔버에 첨가하였다. 준비한 각 샘플 10  $\mu$ l 및 1x LDS 샘플 완충제에 1/10으로 희석한 Precision Plus Protein All Blue Standard (Bio-Rad, 161-0373) 4  $\mu$ l를 겔에 로딩하였다. 겔을 정압 200 V 하에 50-60분간 영동하여, 샘플을 분리하였다.
- [0635] 분리된 단백질을 면역형광 검출에 의해 조사하기 위해, 약습 단백질 이동에 XCell II Blot module (Thermo Fisher Scientific)을 이용함으로써 Amersham Hybond Low Fluorescence 0.2  $\mu$ m 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF) 막 (GE Healthcare Life Sciences)으로 이동시켰다. PVDF 막을 SDS 겔에 바로 적용하고, 시스템을 제조사의 지침에 따라 NuPAGE 이동 완충제 (20X, Thermo Fisher Scientific)로 채웠다. 단백질 블롯팅을 1시간 동안 30 V에서 수행하였다. 단백질 이동 후, 막을 오디세이 차단 완충제 (Licor)에서 밤새 4°C에서 차단하고, 그 후 2  $\mu$ g/mL 단일클론 항-FLAG M2 항체 (Sigma Aldrich, F1804-200UG) 및 0.05% Tween 20이 함유된 오디세이 차단 완충제에 희석한 17  $\mu$ g/mL AffiniPure 마우스 항-인간 IgG와 함께 동시에 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, PVDF 막을 0.1% PBST에서 5분간 4회 행구었다. 단백질을 검출하기 위해, 막을 2조각으로 자르고, FLAG-검출용 막 절편은 0.067  $\mu$ g/ml IRDye 800CW 당나귀 항-마우스 (Licor)와 1시간 동안 인큐베이션하였다. 본 발명의 단백질이 함유된 다른 막 절편은 IRDye 680RD 당나귀 항-마우스 (Licor)와 인큐베이션하였다. 마지막으로, PVDF 막을 0.1% PBST에서 5분간 4회, PBS에서 5분간 2회, 그리고 물로 행구었다. 막은 Licor Odyssey Imager로 가시화하였다. Phoretix 1D 소프트웨어를 사용해 밴드 밀도를 정량하였으며, 본 발명의 단백질과 Dir-Treg-FLAG의 발현을 비교하였다.
- [0636] 후자 대조군 단백질의 농도-의존적인 면역형광 신호가 관찰되었으며, 이는 항-FLAG 항체 검출의 품질을 입증해 준다 (도 11). Dir-Treg-01-FLAG는 거의 발현되지 않았다. Dir-Treg-03-FLAG는 최소량으로 발현되었고, Dir-Treg-02-FLAG는 순차적인 트레지토프 펩타이드들의 최상의 발현을 입증해주었다. 그러나, 본 발명의 단백질 (구조체 V32)의 발현은 Dir-Treg-02-FLAG와 비교해 9배 높았으며, Dir-Treg-03-FLAG와 비교해 20배 높았다.
- [0637] 본 실험은, 본 발명에 따른 TCP가 FLAG-tag가 융합된 3종의 순차적인 트레지토프 펩타이드 3가지 버전과 비교해 더 우호적으로 발현됨을 명확하게 입증해준다.

도면

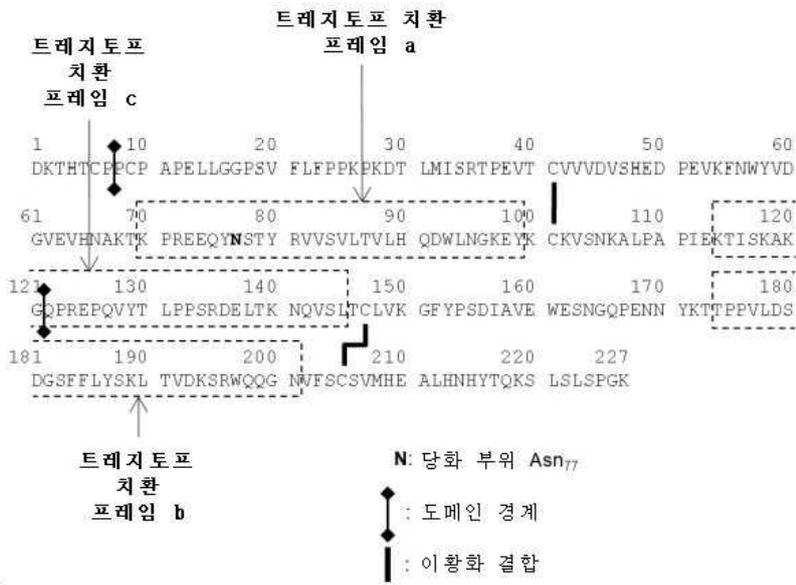
도면1



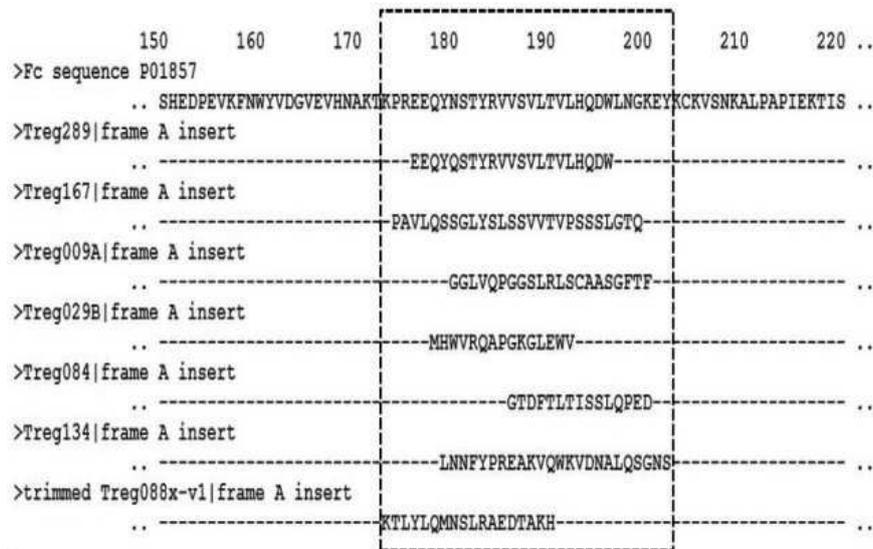
도면2



도면3



도면4



도면5

```

..      250      260      270      280      290      300      310 ..
>Fc sequence P01857
.. LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNWFSCSV ..
>Treg167|frame B insert
.. -----PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ----- ..
>Treg289|frame B insert
.. -----EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW----- ..
>Treg009A|frame B insert
.. -----GGLVQPGGSLRLSCAASGFTF----- ..
>Treg029B|frame B insert
.. -----MHWVRQAPGKGLEWV----- ..
>Treg084|frame B insert
.. -----GTDFTLTISSLQPED----- ..
>Treg134|frame B insert
.. -----LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS----- ..
>trimmed Treg088x-v1|frame B insert
.. -----KTLYLQMNLSRAEDTAKH----- ..

```

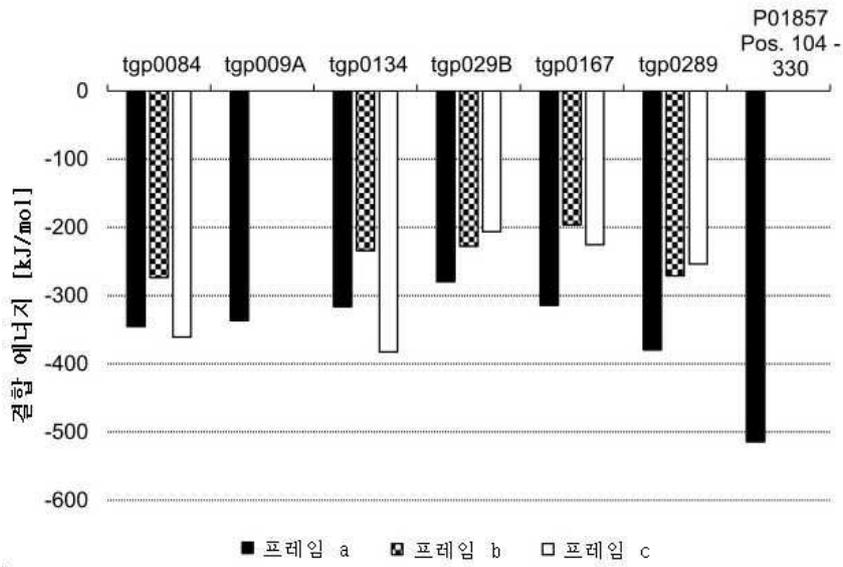
도면6

```

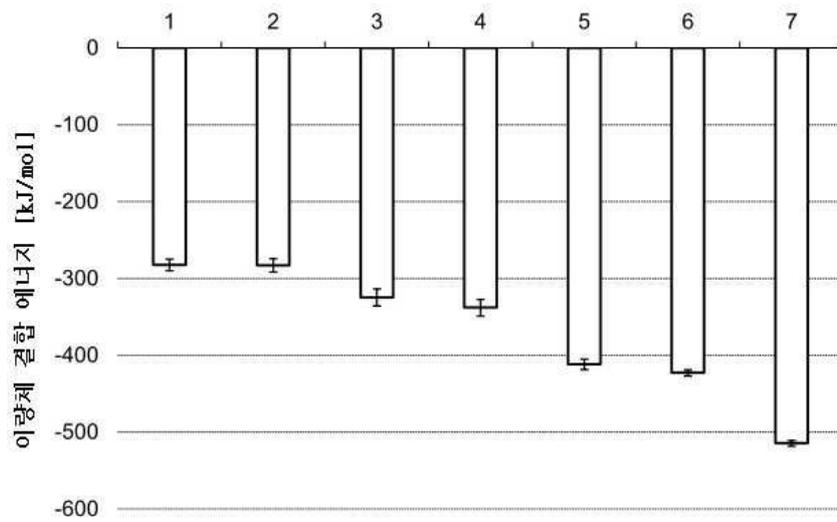
..      210      220      230      240      250
>Fc sequence P01857
.. CRVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTLC ..
>Treg167|frame C insert
.. -----PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ----- ..
>Treg289|frame C insert
.. -----EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW----- ..
>Treg084|frame C insert
.. -----GTDFTLTISSLQPED----- ..
>Treg009A|frame C insert
.. -----GGLVQPGGSLRLSCAASGFTF----- ..
>Treg029B|frame C insert
.. -----MHWVRQAPGKGLEWV----- ..
>Treg134|frame C insert
.. -----LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS----- ..
>trimmed Treg088x-v1|frame C insert
.. -----KTLYLQMNLSRAEDTAKH----- ..

```

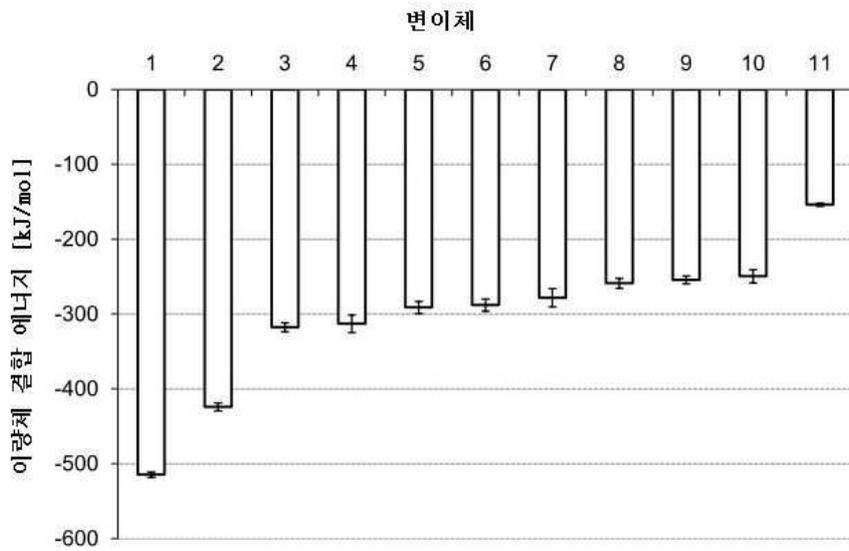
도면7



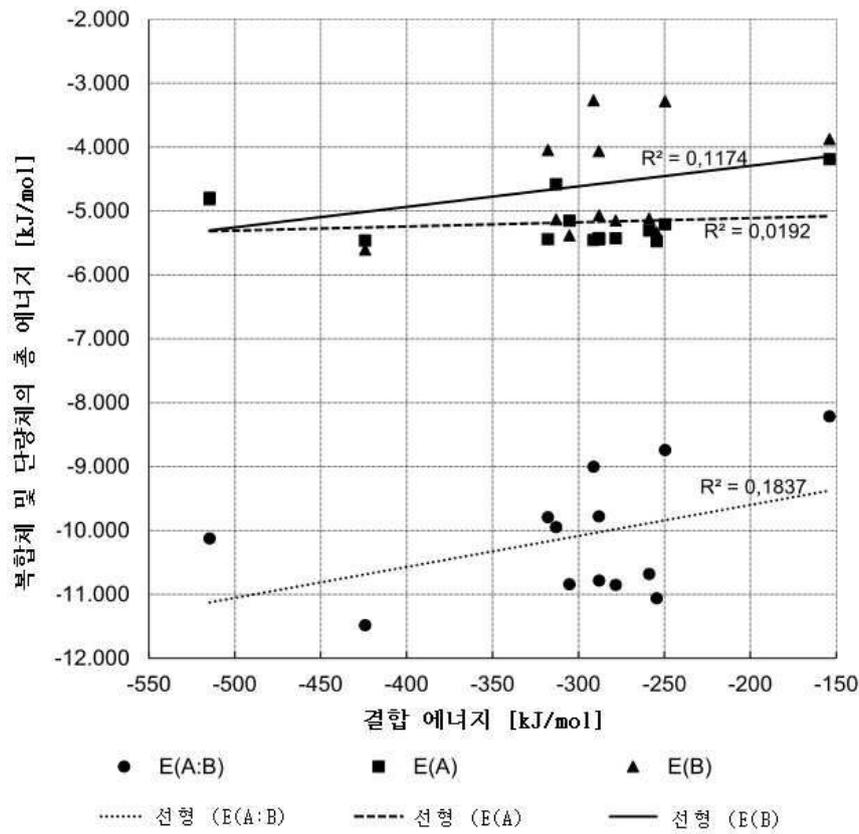
도면8



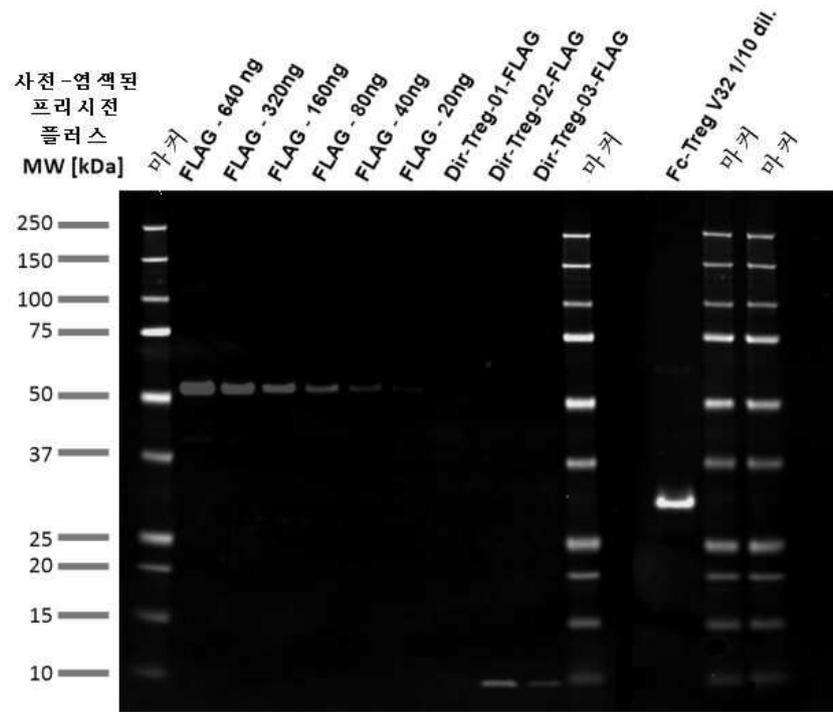
도면9



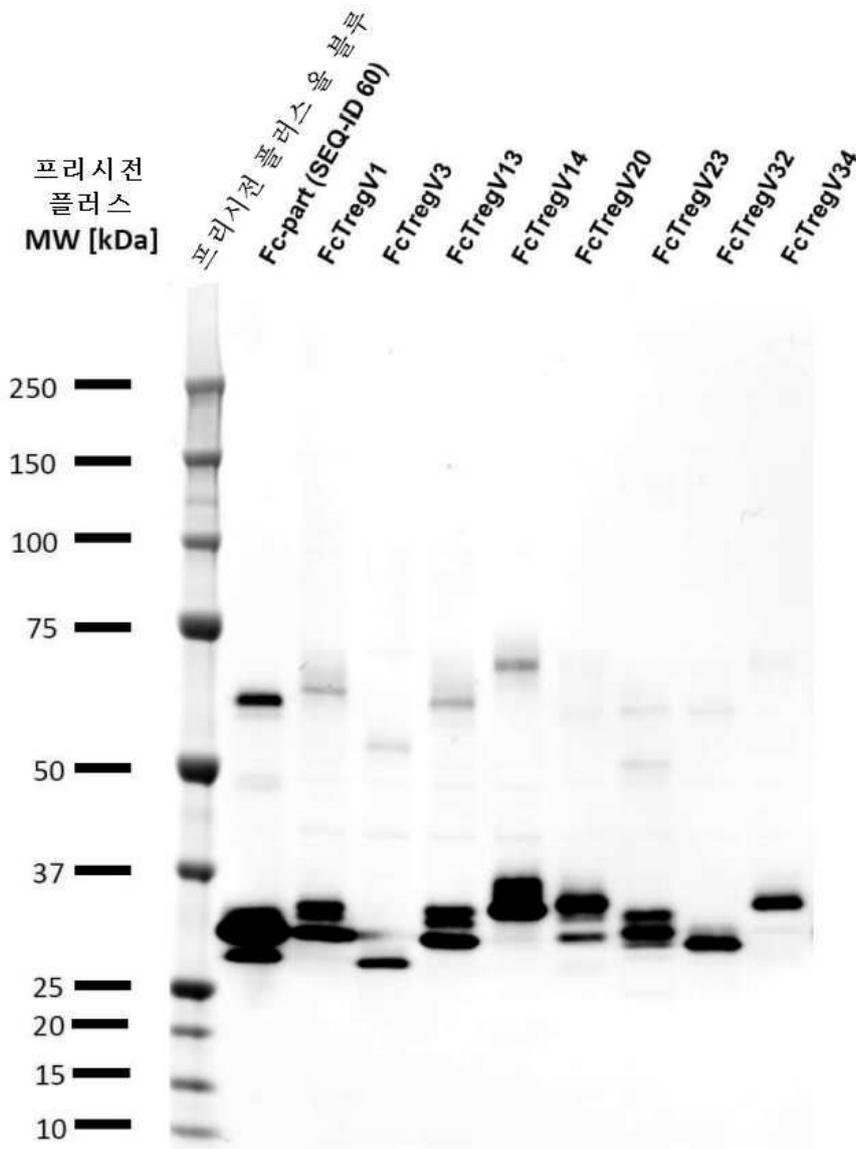
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Biotest AG

<120> Recombinant protein comprising at least one regulatory T cell activating epitope

<130> EPA-142 069

<160> 111

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> C\_REGION

<222> 1..102

<223> CH1

<220>

<221> DOMAIN

<222> 103..113

<223> hinge

<220>

<221> C\_REGION

<222> 114..223

<223> CH2

<220>

<221> REGION

<222> 173..202

<223> Frame A

<220>

<221> REGION

<222> 217..248

<223> Frame C

<

220>

<221> C\_REGION

<222> 224..330

<223> CH3

<220>

<221> REGION

<222> 277..304

<223> Frame B

<400> 1

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser



Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg009A

<400> 2

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 1 5 10 15

Ser Gly Phe Thr Phe  
 20

<210> 3

<211> 15

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg029B

<400> 3

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg088

<400> 4

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

1                    5                    10                    15

Val Tyr Tyr Cys Ala

20

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg167

<400> 5

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

1                    5                    10                    15

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln

20

25

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg289n - native

<400> 6

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

1                    5                    10                    15

Leu His Gln Asp Trp

20

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg084

<400> 7

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

1                    5                    10                    15

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg134

<400> 8

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

1                    5                    10                    15

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

20

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg088x

<400> 9

Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

1                    5                    10                    15

Lys His Tyr Cys Ala

20

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Treg289

<400> 10

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

1                    5                    10                    15

Leu His Gln Asp Trp

20

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg009A

<400> 11

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

1                    5                    10                    15

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg029B - v1

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

1                    5                    10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg029B - v2

<400> 13

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

1                    5

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg088

<400> 14

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

1                    5                    10                    15

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg088x - v1

<400> 15

Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

1                    5                    10                    15

Lys His

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg088x - v2

<400> 16

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

1                    5                    10                    15

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg167

<400> 17

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

1                    5                    10                    15

Ser Ser Ser Leu

20

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg289n

<400> 18

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

1                    5                    10                    15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg289

<400> 19

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

1                    5                    10                    15

<210> 20

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg084

<400> 20

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

1                    5

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> trimmed Treg134

<400> 21

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

1                    5                    10                    15

Gln Ser

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc signal peptide

<400> 22

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

1                    5                    10                    15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 23

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V1

<400> 23

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                      55                      60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
                                  85                      90                      95  
  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
                                  100                      105                      110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
                                  115                      120                      125  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                                  130                      135                      140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145                      150                      155                      160  
  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
                                  165                      170                      175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
                                  180                      185                      190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                                  195                      200                      205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                                  210                      215                      220  
  
 Pro Gly Lys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp  
 225                      230                      235                      240  
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
                                  245                      250  
  
 <210> 24  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FcTreg-V2  
 <400> 24

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

245

<210> 25

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V3

<400> 25

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100                    105                    110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

165                    170                    175

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

180                    185                    190

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys  
 225

<210> 26

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V4

<400> 26

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Gly Leu Val  
 65 70 75 80

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 85 90 95

Phe Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 115 120 125

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

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

145                    150                    155                    160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

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

                         180                    185                    190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

                         195                    200                    205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

                         210                    215                    220  
 Pro Gly Lys Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

225                    230                    235                    240  
 Trp Val

<210> 27

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V5

<400> 27

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Met His Trp Val Arg Gln

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp

225 230 235 240

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

245 250

<210> 28

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V6

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Pro Gly Lys

225

<210> 29

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V7

<400> 29

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 225

<210> 30

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V8

<400> 30

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

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

                  180                    185                    190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
 245 250

<210> 31

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V9

<400> 31

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

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

115 120 125  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145                      150                      155                      160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
                                  165                      170                      175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
                                  180                      185                      190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                                  195                      200                      205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                                  210                      215                      220  
 Pro Gly Lys  
 225  
 <210> 32  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FcTreg-V10  
 <400> 32  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                                  20                      25                      30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                                  35                      40                      45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                                  50                      55                      60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
  
 65                      70                      75                      80  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
                                  85                      90                      95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

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

130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

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

180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220  
 Pro Gly Lys

225

<210> 33

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V11

<400> 33

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

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

20 25 30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60



20 25 30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
  
 35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Gly Leu Val  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 85 90 95  
 Phe Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr  
 115 120 125  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp  
  
 225 230 235 240  
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
 245 250  
 <210> 35  
 <211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V13

<400> 35

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

1                    5                                    10                                    15

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

                  20                                    25                                    30

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

                  35                                    40                                    45

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

                  50                                    55                                    60

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

65                                    70                                    75                                    80

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

                  85                                    90                                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

                  100                                    105                                    110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

                  115                                    120                                    125

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

                  130                                    135                                    140

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

145                                    150                                    155                                    160

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

                  165                                    170                                    175

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

                  180                                    185                                    190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

                  195                                    200                                    205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

225 230 235 240

Asp Thr Ala Lys His

245

<210> 36

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V14

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

115 120 125

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

130 135 140

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

145                      150                      155                      160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
                                  165                      170                      175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
                                  180                      185                      190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                                  195                      200                      205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                                  210                      215                      220  
  
 Pro Gly Lys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp  
 225                      230                      235                      240  
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
                                  245                      250  
  
 <210> 37  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FcTreg-V15  
 <400> 37  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
  
                                  20                      25                      30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                                  35                      40                      45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                                  50                      55                      60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

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

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

210 215 220  
 Pro Gly Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 225 230 235 240  
 Asp Thr Ala Lys His  
 245

<210> 38

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V16

<400> 38

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20

25

30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Val Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 85 90 95  
 Asp Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr  
 115 120 125  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Leu His Gln Asp Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 245

<210> 39

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V17

<400> 39

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Gly Leu Val

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Phe Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100                    105                    110

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

115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

165                    170                    175

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

180                    185                    190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195                    200                    205

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

210                    215                    220

Pro Gly Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 225                      230                      235                      240  
 Glu Asp

<210> 40

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V18

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

                    20                      25                      30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                     35                      40                      45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                     50                      55                      60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

                    85                      90                      95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
                     100                      105                      110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr  
                     115                      120                      125

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Val Ser  
                     130                      135                      140

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

145                      150                      155                      160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Gly Gly



Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 115 120 125  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe  
 130 135 140  
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Asp Glu Leu Thr Lys  
 145 150 155 160  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 165 170 175  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 180 185 190  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 195 200 205  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 210 215 220  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 245 250 255  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
 260  
 <210> 42  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FcTreg-V20  
 <400> 42  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
  
 65 70 75 80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 115 120 125  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Gln Val Ser  
  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
 180 185 190  
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Lys His Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys  
 225  
 <210> 43  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FcTreg-V21  
 <400> 43

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

245

<210> 44

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V22

<400> 44

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100                    105                    110

Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

165                    170                    175

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

180                    185                    190

Leu His Gln Asp Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 245  
 <210> 45  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FcTreg-V23  
 <400> 45  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Val Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 85 90 95  
 Asp Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

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

210 215 220  
 Pro Gly Lys

225

<210> 46

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V24

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 47

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V25

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Gly Leu Val  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 85 90 95  
 Phe Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr  
 115 120 125  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 180 185 190  
 Pro Glu Asp Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys  
 225  
 <210> 48  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FcTreg-V26  
 <400> 48

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Val Leu Asp Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

                  180                    185                    190

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

195                    200                    205

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

210                    215                    220

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

225                    230                    235                    240

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

245

<210> 49

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V27

<400> 49

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

1                    5                    10                    15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

                  20                    25                    30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

                  35                    40                    45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

                  50                    55                    60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65                    70                    75                    80  
 Arg Val Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

                  85                    90                    95  
 Asp Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

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

                  115                    120                    125  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Gln Val Ser

                  130                    135                    140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145                    150                    155                    160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

                  165                    170                    175  
 Val Leu Asp Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

                  180                    185                    190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser

225 230 235 240

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

245

<210> 50

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V28

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

245

<210> 51

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V29

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Lys His Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

225 230 235 240

Glu Asp

<210> 52

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V30

<400> 52

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

His Asn Ala Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

                  100                    105                    110

Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

                  115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Val Leu Asp Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

                  180                    185                    190

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

195                    200                    205

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

                  210                    215                    220

Pro Gly Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

225                    230                    235                    240

Asp Thr Ala Lys His

245

<210> 53

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V31

<400> 53

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

1                    5                    10                    15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

                  20                    25                    30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

                  35                    40                    45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

                  50                    55                    60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65                    70                    75                    80  
 Arg Val Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

                  85                    90                    95  
 Asp Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

                  100                    105                    110  
 Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

                  115                    120                    125  
 Ala Lys His Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

                  130                    135                    140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145                    150                    155                    160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Gly Gly

                  165                    170                    175  
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

                  180                    185                    190

Phe Thr Phe Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

225 230 235 240

Glu Asp

<210> 54

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V32

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Gly Leu Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Phe Thr Phe Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

195 200 205

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

210 215 220

Ser Pro Gly Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

225 230 235 240

Glu Asp Thr Ala Lys His

245

<210> 55

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V33

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60



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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

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

                  180                    185                    190

Leu His Gln Asp Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195                    200                    205

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

                  210                    215                    220

Pro Gly Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

225                    230                    235                    240

Asp Thr Ala Lys His

245

<210> 57

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V35

<400> 57

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

1                    5                    10                    15  
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

                  20                    25                    30  
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

                  35                    40                    45  
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50                    55                    60  
His Asn Ala Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

65                    70                    75                    80  
Ala Glu Asp Thr Ala Lys His Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

                  85                    90                    95  
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

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

                  115                    120                    125  
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Gln Val Ser

                  130                    135                    140  
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145                    150                    155                    160  
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Gly Gly

                  165                    170                    175  
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

180                    185                    190

Phe Thr Phe Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

245

<210> 58

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTreg-V36

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Gly Phe Thr Phe

245

<210> 59

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fc signal peptide

<400> 59

atggaaacccg acacactgct gctgtgggtg ctgcttttgt ggggtccagg cagcaccggc 60

<210> 60

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Residues 104-330 of UNIPROT sequence P01857

<400> 60

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

1                    5                    10                    15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                          20                    25                    30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                          35                    40                    45  
  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                          50                    55                    60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
                          85                    90                    95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
                          100                    105                    110  
  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
                          115                    120                    125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                          130                    135                    140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145                    150                    155                    160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
                          165                    170                    175  
  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
                          180                    185                    190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                          195                    200                    205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                          210                    215                    220  
 Pro Gly Lys  
 225  
 <210> 61  
 <211> 753  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV1

<400> 61

gacaagacce acacctgtcc tccctgccct gccctgagc tgctgggagg acccagcgtg 60  
 ttctgttcc cacccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc tgaagtgacc 120  
 tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacca gacacctac 240  
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaagc cctgcctgcc ccaatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360  
 ggaccgact tcacctgac catcagcagc ctgcagcccg aggacgacga gctgaccaag 420

aaccaggtgt ccctgacctg cctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggacagc 540  
 gacgctcat tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600  
 aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 660  
 ctgagcctga gccccggcaa gctgaacaac ttctaccac gcgaggcaa ggtgcagtgg 720  
 aaggtggaca atgccctgca gagcggcaac agc 753

<210> 62

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV2

<400> 62

gacaagacce acacctgtcc tccctgccct gctcctgaac tgctgggagg acccagcgtg 60  
 ttctgttcc cacccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc tgaagtgacc 120  
 tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 240  
 agcctgagca gcgtggtcac cgtgcccagc agcagcctgg gcaccagaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaagc cctgcctgcc ccaatcgaga aaaccatcag caaggccatg 360  
 cactgggtcc gacaggcccc tggcaaggga ctggaatggg tccgagatga gctgaccaag 420

aaccaggtgt ccctgacctg cctggtaag ggattctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggacagc 540  
 gacggctcat tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600  
 aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtcc 660  
 ctgagcctga gcccagcaaa ggggtggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgtct 720  
 tgcgcccga gcggtttcac ctcc 744

<210> 63

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV3

<400> 63

gacaagacc acacctgtcc tcctgccct gccctgagc tgctgggagg acccagcgtg 60  
 ttctgttcc cacccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc tgaagtgacc 120  
 tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacca gagcacctac 240  
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaagc cctgcctgcc ccaatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360  
 ggcaccgact tcacctgac catcagcagc ctgcagcccg aggacgacga gctgaccaag 420

aaccaggtgt ccctgacctg cctggtaag ggattctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacc tgaacaactt ctaccacgc 540  
 gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaat gcctgcaga gcggcaacag ccagcagggc 600  
 aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtcc 660  
 ctgagcctga gcccagcaaa g 681

<210> 64

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV4

<400> 64

gacaagacc acacctgtcc tccatgccct gcacctgagc tgctgggcgg acccagcgtg 60

ttcctgttcc cacccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc tgaagtgacc 120

tgctgggtgg tggacgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacgg cggcctgggtg 240

cagcctggcg gcagcctgag actgtcttgc gccgccagcg gcttcacctt cgagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc ccaatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggcaccgact tcacctgac catcagcagc ctgcagcccg aggacgacga gctgaccaag 420

aaccaggtgt cctgacctg cctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 480

tgaggagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcagcag gcctgcaca accactacac ccagaagtec 660

ctgagcctga gccccgcaa gatgactgg gtccgacagg cccctggcaa gggcctggaa 720

tgggtg 726

<210> 65

<211> 753

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV5

<400> 65

gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 60

ttcctettcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgctgggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agatgcactg ggtgcgccag 240

gcccccgca agggcctgga gtgggtgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagcccc 360

gccgtgtcgc agagcagcgg cctgtacagc ctgagcagcg tggtgaccgt gccagcagc 420

agcctgggca cccagacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgaggagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540

gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctcctg gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa actgaacaac ttctaccccc gcgaggccaa ggtgcagtgg 720  
aaggtggaca acgccctgca gagcggcaac agc 753  
<210> 66  
<211> 681  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> FcTregV6  
<400> 66  
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 60  
  
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120  
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180  
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac 240  
cgtgtgggca ccgacttcac cctgaccatc agcagcctgc agcccagga cgagtacaag 300  
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccggc 360  
ggcctggtgc agcccggcgg cagcctgcgc ctgagctgcg ccgccagcgg cttcaccttc 420  
aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480  
  
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcccgccgt gctgcagagc 540  
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg accgtgccca gcagcagcct gggcacccag 600  
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660  
ctctccctgt ctccgggtaa a 681  
<210> 67  
<211> 681  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> FcTregV7  
<400> 67  
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 60  
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120  
  
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180  
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacca gacacctac 240

cgctggtga gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300  
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360  
 ggggaggagc agtaccagag cacctaccgc gtggtgagcg tgctgaccgt gctgcaccag 420  
 gactgggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccga ggagcagtac 540

cagagcacct accgcgtggt gagcgtgctg accgtgctgc accaggactg gcagcagggg 600  
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660  
 ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 68

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV8

<400> 68

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 60  
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 240  
 agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc agcagcctgg gcacccagaa ggagtacaag 300  
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccccc 360  
 gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc ctgagcagcg ttgtgaccgt gcccagcagc 420  
 agcctgggca cccagacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540  
 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660  
 ctctccctgt ctccgggtaa acccgcctg ctgcagagca gcggcctgta cagcctgagc 720  
 agcgtggtga ccgtgcccag cagcagcctg ggcacccag 759

<210> 69

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV9

<400> 69

gacaaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 60  
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180  
  
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacca gacacctac 240  
 cgcgtggtga gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300  
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360  
 ggcaccgact tcacctgac catcagcagc ctgcagcccg aggacgatga gctgaccaag 420  
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540  
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600  
  
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660  
 ctctcctgt ctccgggtaa a 681

<210> 70

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV10

<400> 70

gacaaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 60  
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180  
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 240  
  
 agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc agcagcctgg gcaccagaa ggagtacaag 300  
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaactgaac 360  
 aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag tgaaggtgg acaacgcct gcagagcggc 420  
 aacagcgtca gcctgacctg cctggtcaaa ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540  
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 71

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV11

<400> 71

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 60

ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcggtgggg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 240

agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc agcagcctgg gcacccagaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

ggggaggagc agtaccagag cacctaccgc gtggtgagcg tgctgaccgt gctgcaccag 420

gactgggtca gectgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540

gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 72

<211> 753

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV12

<400> 72

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 60

ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcggtgggg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcccggagg agcagtacgg cggcctggtg 240

cagccccgcg gcagcctgcg cctgagctgc gccgccagcg gcttcacctt cgagtacaag 300  
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

ggggaggagc agtaccagag cacctaccgc gtggtgagcg tgctgaccgt getgcaccag 420  
 gactgggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540  
 gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600  
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660  
 ctctccctgt ctccgggtaa actgaacaac ttctaccccc gcgaggccaa ggtgcagtgg 720  
 aaggtggaca acgcccctga gagcggcaac agc 753

<210> 73

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV13

<400> 73

gacaaaaacte acacatgcc accgtgceca gcacctgaac tcttgggagg accgtcagtc 60  
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180  
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtacca gagcacctac 240  
 cgcgtggtga gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300  
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

ggcaccgact tcacctgac catcagcagc ctgcagcccg aggacgatga gctgaccaag 420  
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540  
 gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600  
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660  
 ctctccctgt ctccgggtaa aaagacctg tacctgcaga tgaacagcct gagggccgag 720  
 gacaccgcca agcac 753

<210> 74

<211> 753

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV14

<400> 74

```

gacaaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcttgggagg accgtcagtc      60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtataa cagcacctac      240
cgcgtggtga gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      360

ggcacccgact tcacctgac catcagcagc ctgcagcccg aggacgatga gctgaccaag      420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag      480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gttggactcc      540
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      660
ctctccctgt ctccgggtaa actgaacaac ttctaccccc gcgaggccaa ggtgcagtgg      720
aaggtggaca acgcccctga gagcggcaac agc                                     753
    
```

<210> 75

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV15

<400> 75

```

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttccgtt      60
ttcctgttcc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc      120
tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac      180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacca gagcacctac      240
agagtgggtg ccgtgctgac agtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag      300
tgcaaggtgt ccaacaagcc cctgectgct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag      360

ggcgaagaac agtatcagtc cacctaccgg gtcgtcagcg ttctgaccgt tctgcatcag      420
    
```

gattgggtgt ccctgacctg cctggtaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540  
 gacggctcat tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 600  
 aatgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gccccggcaa gaaaacctg tacctgcaga tgaactcct gagagccgag 720  
 gacaccgcca agcac 735

<210> 76

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV16

<400> 76

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcgcgcg accttccgtt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
 tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtactggac 180  
 ggcgtggaag tgcaacaagc caagaccaag cctagagagg aacagtacaa cagcacctac 240  
 agagtgggca ccgacttac cctgaccatc agttctctgc agcccagga cgagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaagc cctgctctgt cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggcgaagaac agtaccagag cacataccgc gtggtgtctg tgctgacagt gctgcatcag 420  
 gattgggtgt ccctgacctg cctggtaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctga ggaacaatac 540  
 cagtccacat atagagtggg gtccgtcttc accgtctctg accaagattg gcagcagggc 600  
 aatgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gccccggcaa agaagaacaa tatcaatcca cctaccgggt cgtcagcgtg 720  
 ctcaccgtgc ttcatcaaga ctgg 744

<210> 77

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV17

<400> 77

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttccttt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
 tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacgg cggactggtt 240  
 caacctggcg gctctctgag actgtcttgt gccgccagcg gcttcacctt cgagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgct cctatcgaga aaaccatctc taaggctggc 360  
  
 ggactcgtgc agccaggtgg aagtcttaga ctgagctgtg ccgcctctgg ctttaccttc 420  
 aatcaggtgt ccctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540  
 gacggctcat tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 600  
 aatgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gccctggcaa gggcaccgat ttaccctga ccatttctag cctgcagcct 720  
 gaggac 726

<210> 78

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV18

<400> 78

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttccttt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
 tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtaca cagcacctac 240  
 agagtgggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgct cctatcgaga aaaccatcag caagccaag 360  
  
 ggccaagaac agtaccagag cacataccgg gtcgtcagcg ttctgacagt gctccatcaa 420  
 gactgggtgt ccctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccggcggact ggttcagcct 540  
 ggtggatctc tgagactgtc ttgtgccgc agcggttca cctttagatg gcagcagggc 600  
 aacgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660

ctgtctctga gccctggaaa aggcggactt gtgcaaccag gtggaagcct gagactgagc 720  
 tgtgccgctt cggcctttac cttc 744

<210> 79

<211> 786

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV19

<400> 79

atggaaacg acacactgct gctgtgggtg ctgcttttgt gggtgccagg cagcaccggc 60  
 gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 120  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 180  
 tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 240  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacaa cagcacctac 300  
 agagtgggtg ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 360

tgcaaggtgt ccaacaagc cctgectgct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 420  
 ggcaccgact teacctgac cattagtagc ctgcagcctg aggacgacga gctgacaaa 480  
 aatcaggtgt ccctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 540  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 600  
 ggcacagatt tcacactgac aatcagctca ctgcagcccg aagatagatg gcagcagggc 660  
 aatgtgttca gctgctctgt gatgcagag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 720  
 ctgtctctga gccccggcaa gggaacagac ttaccetta caatctcatc cctccagcca 780

gaggac 786

<210> 80

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV20

<400> 80

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacaa cagcacctac 240  
 agagtgggtg cctgctgtgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgtct cctatcgaga aaaccatctc taaggctggc 360  
 ggccctggttc agcctggtgg atctctgaga ctgtcttggc cggccagcgg cttcaccttc 420  
 aatcaggtgt cctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540  
 gacggcagca agacactgta cctgcagatg aactccctga gagccgagga taccgccaag 600  
 cacgtgttca gctgttctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gccccggcaa g 681

<210> 81

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV21

<400> 81

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttccgtt 60  
 ttctctgttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
 tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacgg cggactggtt 240  
 caacctggcg gctctctgag actgtcttgt gccgccagcg gcttcacctt cgagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgtct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagccaa gagaacccca ggtttacaca ctgcctcaa gcagggacga gctgaccaag 420  
 aatcaggtgt cctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540  
 gacggcagca agacactgta cctgcagatg aactccctga gagccgagga taccgccaag 600  
 cacgtgttca gctgttctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gccttgaaa aggtggactt gtgcagccag gtggaagcct gagactgagc 720  
 tgtgccgctt ccggctttac cttc 744

<210> 82

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV22

<400> 82

```

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt    60
ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc    120
tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacagggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac    180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacca gagcacctac    240
agagtgggtg cctgtctgac agtgtctgac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag    300
tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgtct cctatcgaga aaacctgta cctgcagatg    360

aacagcctga gagccgagga cacagctaag caccctcaa gcagagatga gctgaccaag    420
aaccaggtgt cctgacctg cctggtcaag ggctttctacc cttccgatat cgccgtggaa    480
tgggagagca atggccagcc agagaacaac tacaagacca cacctcctga agaacagtat    540
cagtccacct accgggtcgt cagcgtttctg accgttctgc atcaggattg gcagcagggc    600
aacgtgttca gctgtttctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct    660
ctgtctctga gccttgcaa agggcgactt gttcaacctg gcggctctct gagactgtct    720
tgtgccgcca gcggcttcac cttc                                     744
    
```

<210> 83

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV23

<400> 83

```

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt    60
ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc    120
tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacagggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac    180
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtaca cagcacctac    240
agagtgggca ccgacttcac cctgaccatc agttctctgc agcccagga cgagtacaag    300
tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgtct cctatcgaga aaacctcag caaggccaag    360
    
```

ggccagccaa gagaaccca ggtttacaca ctgcctccaa gcaggacga gctgaccaag 420  
aatcaggtgt cctgacctg cctggtaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540  
gacggctcat tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 600  
aatgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
ctgtctctga gccccgcaa g 681

<210> 84

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV24

<400> 84

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcgccgg accttccgtt 60  
ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtactggac 180  
ggcgtggaag tgcaacaagc caagaccaag cctagagagg aacagtacca gagcacctac 240  
agagtgggtg cctgctgac agtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
tgcaaggtgt ccaacaagc cctgcctgct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360  
ggcaccgact tcacctgac cattagtagc ctgcagcctg aggacgacga gctgacccaa 420

aatcaggtgt cctgacctg cctggtaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctga agaacagtat 540  
cagtccacct accgggtcgt cagcgttctg accgttctgc atcaggattg gcagcagggc 600  
aacgtgttca gctgttctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
ctgtctctga gccccgcaa g 681

<210> 85

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV25

<400> 85

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60

ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tcggtggtgg tggatgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacgg cggactggtt 240

caacctggcg gctctctgag actgtcttgt gccgccagcg gcttcacctt cgagtacaag 300

tgcaagggtg ccaacaaggc cctgectgct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggcgaagaac agtaccagag cacctacaga gtggtgtccg tgctgacagt gctgcaccag 420

gattgggtgt cctgacatg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480

tgaggagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540

ggcacagatt tcacctgac catctctage ctgcagcctg aggatagatg gcagcagggc 600

aatgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660

ctgtctctga gccccgcaa g 681

<210> 86

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV26

<400> 86

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60

ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tcggtggtgg tggatgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacca gagcacctac 240

agagtgggtg ccgtgctgac agtgtctgac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300

tgcaagggtg ccaacaaggc cctgectgct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggccagccaa gagaacccca ggtttacaca ctgcctcaa gcaggacga gctgaccaag 420

aatcaggtgt cctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480

tgaggagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540

ggcacagatt tcacctgac catctctage ctgcagcctg aggatagatg gcagcagggc 600

aatgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660

ctgtctctga gccccgcaa agaagaacag taccagcca cctaccgggt cgtcagcgtt 720

ctgaccgttc tgcatacagga ttgg 744

<210> 87

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV27

<400> 87

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60

ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tgctgtgtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtataa cagcacctac 240

agagtgggca ccgacttcac cctgaccatc agttctctgc agcccagga cgagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaagcc cctgctctgt cctatcgaga aaaccatctc taaggctggc 360

ggactgggtgc agcctgggtg atctctgaga ctgtcttttg cgcagcagg cttcaccttc 420

aatcaggtgt cctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540

ggcacagatt tcacactgac gatctccagc ctgcagcctg aagatagatg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtct 660

ctgtctctga gccctggaaa aggcggactt gttcaacctg gcggaagcct gagactgagc 720

tgtgctgctt ccggctttac cttc 744

<210> 88

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV28

<400> 88

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60

ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tgctgtgtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtataa cagcacctac 240

agagtgggtg cctgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgct cctatcgaga aaacctgta cctgcagatg 360  
 aacagcctga gagccgagga cacagctaag cacctccaa gcagagatga gctgaccaag 420  
 aaccaggtgt ccctgacctg cctggtaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc agagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540

gacggctcat tcttctgta cagcaagctg acagtggaca agagcagatg gcagcagggc 600  
 aacgtgttca gctgttctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gccccggcaa agaagaacag taccagagca cataccgggt cgtcagcgtc 720  
 ctgacagtcc tgcaccaaga ctgg 744

<210> 89

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV29

<400> 89

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gtccagagc tgctcggcgg accttccgtt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tgctgtgtgg tggatgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag aactgtacc tgcagatgaa cagcctgaga 240  
 gccgaggata ccgccaaca cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgct cctatcgaga aaacctcag caaggccaag 360  
 ggcaagaac agtaccagag cacctacaga gtggtgtccg tgctgaccgt cctgcatcag 420  
 gattgggtgt ccctgacatg cctggtaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc agagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540

gacggctcta aaacctgta tctccagatg aattccctgc gcgccgagga cacagctaaa 600  
 catgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gcctggcaa gggcaccgat ttcacctga ccatttctag cctgcagcct 720  
 gaggac 726

<210> 90

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV30

<400> 90

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
  
 tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag aactgtacc tgcagatgaa cagcctgaga 240  
 gccgaggata ccgccaacac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgct cctatcgaga aaacctgta tctccagatg 360  
 aattccctgc gcgccgagga cacagctaag caccctccat ctgagatga gctgaccaag 420  
 aaccaggtgt ccctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc agagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540  
  
 ggcacagatt teacctgac catctctagc ctgcagcctg aggatagatg gcagcagggc 600  
 aatgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gccccggcaa gaaaactctc tatctgcaaa tgaactctct ccgagctgaa 720  
 gatacggcca agcac 735

<210> 91

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV31

<400> 91

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
  
 tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacaa cagcaectac 240  
 agagtgggca ccgacttcac cctgaccatc agttctctgc agccccgagga cgagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgct cctatcgaga aaacctgta cctgcagatg 360  
 aacagcctga gagccgagga cacagctaag caccctcaa gcagagatga gctgaccaag 420  
 aaccaggtgt ccctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480

tgggagagca atggccagcc agagaacaac tacaagacca caggtggact ggtgcagcct 540

ggcggatctc tgagactgtc ttgtgccgcc agcggcttca cctttagatg gcagcagggc 600

aacgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660

ctgtctctga gcctggcaa gggcacagat ttcacactga cgatctccag cctgcaacct 720

gaggac 726

<210> 92

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV32

<400> 92

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttccgtt 60

ttctctttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacgg cggactggtt 240

caacctggcg gctctctgag actgtcttgt gccgccagcg gcttcacctt cgagtacaag 300

tgcaaggtgt ccaacaagc cctgcctgct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360

ggcaccgact tcacctgac cattagtagc ctgcagcctg aggacaggga cgagctgaca 420

aagaatcagg tgcacctgac ctgcctggtc aagggttct acccttccga tatcgcctg 480

gaatgggaga gcaatggcca gcctgagaac aactacaaga ccacaggtgg actggtgcag 540

ccaggtgga gctgagact tagctgtgcc gcctctggct ttaccttcag atggcagcag 600

ggcaactgt tcagctgtc tgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 660

tctctgtctc tgagccccgg caagaaaacc ctgtacctgc agatgaactc cctgagagcc 720

gaggacaccg ccaagcac 738

<210> 93

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV33

<400> 93

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tgctgggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtataa cagcacctac 240  
 agagtgggca cgcattcac cctgaccatc agttctctgc agcccaggga cgagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360  
 ggcacagatt tcacgtcac catctctagc ctgcagcctg aagatgacga gctgaccaag 420  
 aaccaggtgt cctgacatg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctgt gctggacagc 540

gacggcagca agacactgta cctgcagatg aactccctga gagccgagga taccgccaag 600  
 cacgtgttca gctgttctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
 ctgtctctga gccccgcaa gaaaaccctg tatctccaga tgaatagcct gcgcgccgag 720  
 gacacagcca aacac 735

<210> 94  
 <211> 735  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FcTregV34  
 <400> 94

gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60  
 ttctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120

tgctgggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
 ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtataa cagcacctac 240  
 agagtgggtgt ccgtgctgac cgtgctgac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgct cctatcgaga aaaccatcag caaggccaag 360  
 ggccagccaa gagaacccca ggtttacaca ctgcctcaa gcaggacga gctgaccaag 420  
 aatcaggtgt cctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
 tgggagagca atggccagcc tgagaacaac tacaagacca cacctcctga agaacagtac 540

cagtccacct accgggtcgt cagcgttctg acagttctgc atcaagactg gcagcagggc 600  
 aacgtgttca gctgttctgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtct 660

ctgtctctga gccccggcaa gaaaaccctg tacctgcaga tgaactcct gagagccgag 720  
gacaccgcca agcac 735  
<210> 95  
<211> 744  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> FcTregV35  
<400> 95  
gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60  
ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
  
tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180  
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag aactgtacc tgcagatgaa cagcctgaga 240  
gccgaggata ccgccaaca cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
tgcaagggtg ccaacaaggc cctgcctgct cctatcgaga aaaccatctc taaggctggc 360  
ggcctggttc agcctggigg atctctgaga ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc 420  
aatcaggtgt cctgacctg cctggtcaag ggcttctacc cttccgatat cgccgtggaa 480  
tgggagagca atggccagcc agagaacaac tacaagacca ccggcggact tgtgcagcca 540  
  
ggtggaagtc ttagactgag ctgtgccgcc tctggcttta ccttagatg gcagcagggc 600  
aacgtgttca gctgctctgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtct 660  
ctgtctctga gccctggcaa agaggaacag taccagagca cctacagagt ggtgtccgtg 720  
ctgaccgtcc tgcacagga ttgg 744  
<210> 96  
<211> 735  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> FcTregV36  
<400> 96  
gataagacac acacatgtcc tccatgtcct gctccagagc tgctcggcgg accttcggtt 60  
ttcctgtttc cacctaagcc taaggacacc ctgatgatca gcagaacccc tgaagtgacc 120  
  
tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 180

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag aactgtacc tgcagatgaa cagcctgaga 240  
 gccgaggata ccgccaaca cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 300  
 tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgct cctatcgagg gcaccgattt caccctgacc 360  
 atctctagcc tgcagcctga ggaccctcct agcagagatg agctgaccaa gaaccaggtg 420  
 tcctgacct gcctgggtcaa gggcttctac ccttccgata tcgccgtgga atgggagagc 480  
 aatggccagc cagagaacaa ctacaagacc acacctctg tgctggacag cgacggctca 540

ttcttctgt acagcaagct gaccgtggac aagagcagat ggacgaggg caatgtgttc 600  
 agctgctctg tgatgcacga ggcctgcac aacctacta cccagaagtc tctgtctctg 660  
 agccctggca aaggcggact tgttcaacct ggcggctctc tgagactgtc ttgtgccgcc 720  
 agcggcttca ccttc 735

<210> 97

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SIGNAL

<222> 1..20

<223> Murine IgG signal peptide

<220>

<223> Dir-Treg01-FLAG

<400> 97

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 Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

20 25 30

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

35 40 45

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

50 55 60

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

65 70 75 80

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

85

<210> 98

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SIGNAL

<222> 1..20

<223> signal

<220>

<223> Dir-Treg02-FLAG

<400> 98

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met

                  35                    40                    45

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Lys His Gly Thr Asp Phe Thr

                  50                    55                    60

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

65                    70                    75                    80

Asp Lys

<210> 99

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SIGNAL

<222> 1..20

<223> Murine IgG signal peptide

<220>

<223> Dir-Treg03-FLAG

<400> 99

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

1                    5                    10                    15

Gly Ser Thr Gly Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

                  85

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLAG-TAG

<400> 100

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1                    5

<210> 101

<211> 264

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> Dir-Treg01-FLAG DNA

<400> 101

atggaaaccg acacctgct gctgtgggtg ctgctgctgt ggggtccagg atctaccggc 60

gaggaacagt accagagcac ctaccgggtg gtgtccgtgc tgacagtgct gcaccaggac 120

tggggcaccg acttcacct gaccatcagc agcctgcagc ccgaggacct gaacaacttc 180

tacccccg agccaaggt gcagtggaag gtggacaatg ccctgcagag cggcaacagc 240  
gactacaagg acgacgacga caag 264  
<210> 102  
<211> 246  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Dir-Treg02-FLAG DNA  
<  
400> 102  
atggaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg atctacaggc 60  
ggaggactgg tgcagcctgg cggctctctg agactgtctt gtgccgccag cggttcacc 120  
ttcaagacc tgiacctgca gatgaacagc ctgcgggccg aggacacagc caagcacggc 180  
accgatttca ccctgacat cagcagcctg cagcctgagg acgactaaa ggacgacgac 240  
gacaag 246  
<210> 103  
<211> 264  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Dir-Treg03-FLAG DNA  
<400> 103  
atggaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg cagcacaggc 60  
aagaccctgt acctgcagat gaacagcctg cgggccgagg acacagccaa gcacaggaa 120  
cagtaccaga gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggattggggc 180  
ggactgggtgc agcctggcgg aagcctgaga ctgtctgtg cgcagcagg cttcaccttc 240  
gactacaagg acgacgacga caag 264  
<210> 104  
<211> 71  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 104  
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

50 55 60

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

65 70

<210> 105

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Phe Ser Cys Ser Val

65 70

<210> 106

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35

40

45

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 1

<400> 107

Ala Gly Pro Gly Pro Ser Gly

1

5

<210> 108

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 2

<400> 108

Pro Thr Gly Ser Gly

1

5

<210> 109

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 3

<400> 109

Gly Gly Ser Thr Gly

1

5

<210> 110

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence or partial sequence of GS linker (GGSG)<sub>n</sub>

<400> 110

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 111

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FcTregV32\_variant

<400> 111

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Gly Leu Val

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Phe Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

                  100                    105                    110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

165

170

175

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

180

185

190

Phe Thr Phe Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195

200

205

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

210

215

220

Pro Gly Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

225

230

235

240

Asp Thr Ala Lys His

245