



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0128332
(43) 공개일자 2022년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/0005 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7012733

(22) 출원일자(국제) 2022년09월18일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년04월15일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/076198

(87) 국제공개번호 WO 2021/053199
국제공개일자 2021년03월25일

(30) 우선권주장
19306148.8 2019년09월20일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
잉벡티스 에스에이에스
프랑스공화국, 에프-75015 파리, 튀 뒤 독페르 루 28

(72) 발명자
루스또 마리아
프랑스 75009 파리 튀 샤프탈 15
위늘 리스
프랑스 78960 부아쟁-르-브르또뉴 알레 모리스 위 뜨릴로 2
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 LILRB2에 대항하는 단일-도메인 항체

(57) 요약

본 발명은 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 구성원 2(LILRB2)에 대항하는 단일 도메인 항체(sdAb), 이를 포함하는 약학적 조성물 및 진단 및 치료에서의 그의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/22 (2013.01)

C07K 2317/569 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

랑그라드-드무아엔 피에르

프랑스 92200 너이-쉬르-센 블라스 드 바가텔 1

꼬마르맹 줄리앙

프랑스 78110 르 베지네 블라스 뒤 마르쉐 14

명세서

청구범위

청구항 1

백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 구성원 2 (LILRB2), 바람직하게는 인간 LILRB2에 특이적으로 결합하는, 단일 도메인 항체 (sdAb).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 sdAb가 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 구성원 1 (LILRB1), 바람직하게는 인간 LILRB1을 결합시키지 않는, sdAb.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 sdAb가 서열번호: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 또는 33에서 제시된 서열을 포함하거나 이것들로 구성되거나, 또는 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 또는 33과 상이한 아미노산 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되는, 적어도 하나의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는, sdAb.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 sdAb가 3개 CDR을 포함하되, 3개 CDR이 다음인, sdAb:

(a) CDR1이 서열번호:1을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:1과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:2를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:2와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:3을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:3과 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(b) CDR1이 서열번호:4를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:4와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:5를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:5와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:6을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:6과 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(c) CDR1이 서열번호:7을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:7과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:8을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:8과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:9를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:9와 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(d) CDR1이 서열번호:10을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:10과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:11을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:11과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:12를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:12와 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(e) CDR1이 서열번호:13을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열

번호:13과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:14를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:14와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:15를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:15와 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(f) CDR1이 서열번호:16을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:16과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:17을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:17과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:18을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:18과 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(g) CDR1이 서열번호:19를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:19와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:20을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:20과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:21을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:21과 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(h) CDR1이 서열번호:22를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:22와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:23을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:23과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:24를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:24와 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(i) CDR1이 서열번호:25를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:25와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:26을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:26과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:27을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:27과 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(j) CDR1이 서열번호:28을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:28과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:29를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:29와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:30을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:30과 상이한 아미노산 서열을 갖거나;

(k) CDR1이 서열번호:31을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:31과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR2가 서열번호:32를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:32와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

CDR3이 서열번호:33을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:33과 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 sdAb가 3개 CDR을 포함하고, CDR1이 서열번호:1을 포함하거나 이것으로 구성되고, CDR2가 서열번호:2를 포함하거나 이것으로 구성되고, CDR3이 서열번호:3을 포함하거나 이것으로 구성되는, sdAb.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 서열번호: 34 내지 서열번호: 44 중 임의의 것에서 정의된 서열, 또는 이것에 적어도 80% 서열 동일성, 바람직하게는 이것에 적어도 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 더 많은 아미노-산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이것으로 구성되는, sdAb.

청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호: 34에서 정의된 서열을 포함하거나 이것으로 구성되는, sdAb.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 sdAb가 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 사이의 상호작용을 억제시키는, sdAb.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 sdAb가 LILRB2와 안지오프로이에틴 유사 2 (ANGPTL2) 사이의 상호작용을 억제시키는, sdAb.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에서 정의된, 바람직하게는 서열식별: 45-55로 이루어지는 군에서 선택된 서열에 의해 정의된 sdAb를 인코딩하는 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

청구항 11

제 10 항의 단리된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 sdAb 또는 제 8 항의 단리된 핵산을 포함하는, 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 13

제 10 항의 단리된 핵산, 또는 제 11 항의 벡터를 포함하거나, 제 12 항의 CAR을 발현시키는, 세포.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 세포가 T 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, B 세포, NK 세포, NKT 세포, 단핵구 및 수지상 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 세포가 T 세포, B 세포 또는 NK 세포인, CAR을 발현시키는 세포.

청구항 15

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 정의된 sdAb, 제 10 항의 단리된 핵산, 제 11 항의 벡터, 제 12 항의 CAR 또는 제 13 항 또는 제 14 항에 따른 CAR을 발현시키는 세포, 및 임의로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 16

바람직하게는 암이 LILRB2를 과발현시키고, 더욱 바람직하게는 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 췌장암, 췌장관

암종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 자궁내막암, 간세포성 암종, 흑색종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신경교종, 위암, 신장암, 고환암, 식도암, 자궁경부암, 마우스의 루이스 폐암(Lewis Lung cancer of mice), 백혈병, 갑상선암, 간암, 요로상피암 및 두경부암으로 이루어지는 군으로부터 선택된, 암의 치료에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 sdAb, 제 10 항의 단리된 핵산, 제 11 항의 벡터, 제 12 항의 CAR, 제 13 항 또는 제 14 항의 세포 또는 제 15 항의 약학적 조성물.

청구항 17

시험관내 또는 생체의 종양성 세포 또는 조직에서 LILRB2를 검출하기 위한, 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 sdAb의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역요법 및 면역진단의 분야에 관한 것이다. 본 발명은 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀 리 B 구성원 2 (LILRB2)에 대항하는 단일-도메인 항체 (sdAb)를 제공한다.

배경 기술

[0002] **배경**

[0003] 백혈구 면역글로불린 (Ig)-유사 수용체 (LILBR)는 세포질 꼬리가 ITIM (면역수용체 티로신계 억제 모티프)으로 구성되는 억제 수용체이다. LILRB1이 모든 면역 세포 서브세트에서 발견되는 반면에, LILRB2 발현은 항원 제시 세포 (APC) 예컨대 단핵구, 수지상 세포 및 대식세포로 제한된다.

[0004] LILRB2는 CD1d, 보체 캐스케이드로부터의 여러 분자, (C4d, C3d, C4b, C3b 및 iC3b), 안지오포이에틴-유사 2 및 5 (ANGPTL2/5) 단백질, B-아밀로이드 1-42 및 미엘린-유래된 억제제 (Nogo66, MAG) 및 전형적 (HLA-A, -B 및 -C) 또는 비-전형적 MHC 클래스 I 분자 (HLA-E, F 및 G)와 상호작용한다. 특히 면역 세포에서 발견된, LILRB2와 HLA-G 사이의 상호작용이 세포 기능을 억제시키고 면역억제 세포를 유도할 수 있음이 입증되었다. 실제로, 수지상 세포 (DC)에 존재하는 HLA-G와 LILRB2 사이의 상호작용은 이들의 성숙을 억제시키고 이들을 관용 원성으로 만든다.

[0005] 흥미롭게, LILRB2 수용체는 여러 유형의 암에서 발견되고 전이와 빈번하게 연관되는 것으로 나타났다. LILRB2는 억제 수용체이지만, 종양에 의한 발현은 종양 세포의 증식 및 운동성을 증가시키는 것으로 나타났다. 실제로, HLA-G 또는 ANGPTL2에 결합시, LILRB2 수용체는 종양 세포의 증식, 성장 및 전파를 억제하는 경로를 억제시킨다. 주목할만한 점은, LILRB2는 특히 고형 종양과 관련하여 종양-연관된 대식세포 (TAM)에 의해 발견된 다는 것이다. 이들 대식세포는 면역 세포 침윤의 억제 그리고 암 세포의 증식을 촉진하는 기능과 연관되는 M2-표현형을 나타낸다. LILRB2 수용체 발현이 건강한 개체에서 APC로 제한되므로, 종양에서의 신-발현 그리고 관용 원성 DC 및 TAM에 의한 이의 강한 상향조절은 LILRB2 수용체를 면역요법적 치료 목적으로 하는 탁월한 종양 연 관된 항원 (TAA)으로 만든다.

[0006] 그러나, 현재까지, LILRB2를 차단시킬 수 있는 효율적인 면역치료제는 없다. 차단 항-LILRB2 단클론성 항체 (mAb)의 생성은 새로운 면역요법적 치료에 길을 내줄 것이다. 그러나, mAb의 대형 크기 (~150 kDa)는 종양 침투 를 둔화시키고 여전히 치료하기 가장 어려운 암인 고형 암에 대한 적용을 제한시키기 때문에 주요 단점이 된다. 따라서 이러한 암을 대상으로 하는 새로운 및 개선된 제제에 대한 기술이 여전히 상당히 필요하다.

[0007] 낙타과 구성원은 상이한 클래스의 항체를 생산한다: (i) 2개 경쇄 및 2개 중쇄 (~150 kDa)를 함유하는 종래의 중쇄 항체, (ii) H 쇄 (HcAb; ~95 kDa)만을 포함하는 동종이량체성 중쇄 항체 및 (iii) 고유 중쇄에 기반된 추 가의 IgG 아이소타입. 이러한 중쇄-단독 항체는, 종래의 mAb와 유사하게, 이들의 항원에 대하여 높은 결합 친화 성 및 특이성을 갖는 것으로 입증되었다.

[0008] HcAb (즉 단일 도메인 항체 (sdAb) 또는 Nanobodies[®] (Nb))로부터 중쇄의 가변 도메인은 항원 결합 및 특이성 을 담당하고 이들의 결합 특성의 상실 없이 HcAb로부터 단리될 수 있다. 일반적으로 대략 15-20 kDa의 작은 크 기는 고형 종양을 표적화할 때 중요한 이점이다. 실제로, 암세포를 둘러싼 섬유질 미세환경을 보다 효율적으로 침투할 수 있어야 하며, 이러한 기질에 정착된 표적 세포 예컨대 대식세포에 도달할 수 있어야 한다. 그 다음,

sdAb는 고휘 종양 및 TAM에 표시된 LILRB2 수용체를 표적화하는 맥락에서 탁월한 후보이다.

[0009] 본 발명자는 이제 항-LILRB2 단일 도메인 항체 (sdAb) 개발함에 있어서 당업계에 상당한 기술적 기여를 하였다.

발명의 내용

[0010] **요약**

[0011] 본 발명은 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 구성원 2 (LILRB2), 바람직하게는 인간 LILRB2에 특이적으로 결합하거나 이를 특이적으로 인식하는 단일 도메인 항체 (sdAb)에 관한 것이다.

[0012] 바람직하게는, 상기 sdAb 항-LILRB2는 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 구성원 1 (LILRB1), 바람직하게는 인간 LILRB1에 결합하지 않는다.

[0013] 일 양태에서, 본 발명에 따른 sdAb는 서열번호: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 또는 33에서 제시된 서열을 포함하거나 이것들로 구성되는거나, 또는 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 또는 33과 상이한 아미노산 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되는, 적어도 하나의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.

[0014] 바람직하게는, 본 발명에 따른 sdAb는 3개 CDR을 포함하되, 다음인, sdAb:

[0015] (a) CDR1이 서열번호:1을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:1과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0016] CDR2가 서열번호:2를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:2와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0017] CDR3이 서열번호:3을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:3과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,

[0018] (b) CDR1이 서열번호:4를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:4와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0019] CDR2가 서열번호:5를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:5와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0020] CDR3이 서열번호:6을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:6과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,

[0021] (c) CDR1이 서열번호:7을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:7과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0022] CDR2가 서열번호:8을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:8과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0023] CDR3이 서열번호:9를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:9와 상이한 아미노산 서열을 갖거나,

[0024] (d) CDR1이 서열번호:10을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:10과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0025] CDR2가 서열번호:11을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:11과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0026] CDR3이 서열번호:12를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:12와 상이한 아미노산 서열을 갖거나,

[0027] (e) CDR1이 서열번호:13을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:13과 상이한 아미노산 서열을 갖고,

[0028] CDR2가 서열번호:14를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:14와 상이한 아미노산 서열을 갖고,

- [0029] CDR3이 서열번호:15를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:15와 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0030] (f) CDR1이 서열번호:16을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:16과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0031] CDR2가 서열번호:17을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:17과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0032] CDR3이 서열번호:18을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:18과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0033] (g) CDR1이 서열번호:19를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:19와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0034] CDR2가 서열번호:20을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:20과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0035] CDR3이 서열번호:21을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:21과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0036] (h) CDR1이 서열번호:22를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:22와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0037] CDR2가 서열번호:23을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:23과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0038] CDR3이 서열번호:24를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:24와 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0039] (i) CDR1이 서열번호:25를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:25와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0040] CDR2가 서열번호:26을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:26과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0041] CDR3이 서열번호:27을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:27과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0042] (j) CDR1이 서열번호:28을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:28과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0043] CDR2가 서열번호:29를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:29와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0044] CDR3이 서열번호:30을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:30과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0045] (k) CDR1이 서열번호:31을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:31과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0046] CDR2가 서열번호:32를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:32와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0047] CDR3이 서열번호:33을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열 번호:33과 상이한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0048] 특히, 항-LILRB2 sdAb는 3개 CDR을 포함하고, 여기서 CDR1은 서열번호:1을 포함하거나, 이것으로 구성되고, CDR2는 서열번호:2를 포함하거나, 이것으로 구성되고, CDR3이 서열번호:3을 포함하거나, 이것으로 구성된다.
- [0049] 특정한 양태에서, sdAb 항-LILRB2는 서열 서열번호: 34 내지 서열번호: 44 중 임의의 것에서 정의된 서열, 또는 이것에 적어도 80% 서열 동일성, 바람직하게는 이것에 적어도 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는

더 많은 아미노-산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이것으로 구성된다.

- [0050] 특히, 항-LILRB2 sdAb는 서열번호: 34에서 정의된 서열을 포함하거나 이것으로 구성된다.
- [0051] 바람직하게는, 본 발명에 따른 sdAb 항-LILRB2는 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 사이의 상호작용 및/또는 LILRB2와 안지오포이에틴 유사 2 (ANGPTL2) 사이의 상호작용을 억제시킨다.
- [0052] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 바람직하게는 서열번호: 45-55로 이루어지는 군에서 선택된 서열에 의해 정의된, 본 발명에 따른 sdAb 항-LILRB2를 인코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 단리된 핵산을 포함하는 벡터 뿐만 아니라 본 발명에 따른 sdAb 또는 단리된 핵산을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 관한 것이다.
- [0054] 특정한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 단리된 핵산 또는 벡터를 포함하거나 또는 본원에 개시된 CAR을 발현시키는 세포에 관한 것이다. 바람직하게는, 세포는 T 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, B 세포, NK 세포, NKT 세포, 단핵구 및 수지상 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 세포는 T 세포, B 세포 또는 NK 세포이다.
- [0055] 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 sdAb, 단리된 핵산, 벡터, CAR 또는 CAR을 발현시키는 세포, 및 임의로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0056] 일 양태에서, 본 발명에 따른 sdAb, 단리된 핵산, 벡터, CAR, 세포 또는 약학적 조성물은 암의 치료에 사용하기 위한 것이고, 바람직하게는 암이 LILRB2를 과발현시키고, 더욱 바람직하게는 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 췌장암, 췌장관 암종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 자궁내막암, 간세포성 암종, 흑색종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신경교종, 위암, 신장암, 고환암, 식도암, 자궁경부암, 마우스의 루이스 폐암 (Lewis Lung cancer of mice), 백혈병, 갑상선암, 간암, 요로상피암 및 두경부암으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0057] 본 발명은, 마지막으로, 시험관내 또는 생체의 종양성 세포 또는 조직에서 LILRB2를 검출하기 위한, 본 발명에 따른 sdAb 항-LILRB2의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0058] **도 1. 알파카 면역화 및 VHH 특이성 식별.** A) rhLILRB2-Fc 단백질을 이용한 알파카 면역화 프로토콜. B) 면역화된 알파카로부터의 혈청은 상이한 희석액을 이용한 ELISA에서 테스트되었다. C) VHH의 선택은 파지-디스플레이 (phage-display) 벡터 및 바이오패닝(biopanning) 기법을 사용하여 실시되었고 rhLILRB2-Fc에 대해 평가되었다. 양성 항-LILRB2 VHH는 실선으로 원형화되는 반면 음성은 점선으로 원형화된다.
- 도 2. B8, C7 및 C9 Nb는 rhLILRB2의 선형 에피토프를 인식한다.** 변성된 rhLILRB2-Fc (rhILT4-Fc), rhLILRB2 (rhILT4) 및 rhLILRB1 (rhILT2) 단백질은 웨스턴 블랏팅에 의해 막으로 옮겨졌다. A) rhLILRB2-Fc, rhLILRB2 및 rhLILRB1 단백질은 대조군 항-LILRB2 Ab (H-300 및 42D1), 대조군 항-LILRB1 (GHI/75 및 HP-F1)로 인큐베이션되었다. B) rhLILRB2-Fc, rhLILRB2 및 rhLILRB1 단백질은 B8, C7 및 C9 Nb로 인큐베이션되었다. Ab 결합은 H-300에 대한 HRP-표지된 염소-항-랫트 항체 및 42D1, GHI/75 및 HP-F1에 대한 HRP-표지된 염소-항-마우스 Ab를 사용하여 검출되었고 HRP 표지된 마우스 항-c-Myc는 Nb를 태깅한다.
- 도 3. 변성된 rhILT4 (D1-D4 도메인)에 대한 Nbs(B8, C7, C9)의 결합 및 변성된 rhILT2 (D1-D4)에 대한 Nbs(B8, C7, C9)의 부재 또는 결합.**
- 도 4. D1.1 세포주에 형질도입된 LILRB2에 대한 Nb 특이성.** LILRB2 D1.1 세포주는 42D1 대조군 항체 또는 항-LILRB2 Nb로 공-인큐베이션되었고 유세포 분석에 의해 분석되었다.
- 도 5. PBMC의 단핵구에 대한 LILRB2 수용체에 대한 Nb 특이성.** 단핵구는 PBMC로부터 단리한 다음 42D1 대조군 항체 및 Nb로 LILRB2 수용체 발현에 염색하여 관련없는 대조군 Nb와 비교하여 유세포 분석에 의해 분석되었다. 단핵구는 항-CD14 및 항-LILRB1 Ab를 갖는 다른 백혈구로부터 식별되었다.
- 도 6. LILRB2/HLA-G6 상호작용에 대한 항-LILRB2 Nb의 차단 능력.** 연구 설계 패널 (상부 우측)에서 묘사된 바와 같이, 미량정량판(microtiter plates)은 개별 Nbs와 공-인큐베이션되기 전에 rhLILRB2-Fc 단백질로 코팅되었다. 그런 다음, HLA-G6 V5 태깅된 단백질이 첨가되었고 HLA-G6-V5 단백질의 검출은 HRP 컨쥬게이션(conjugated)된 항-V5 Ab를 사용하여 수행되었다. 값은 음성 대조군 (Nb 또는 대조군 Ab의 부재 하에서 HLA-G6-V5 단백질만으로

인큐베이션된 rhLILRB2-Fc) (n=3)의 평균 흡수 강도로 정규화되었다.

도 7. LILRB2/ANGPTL2 상호작용에 대한 항-LILRB2 Nb의 차단 능력. 연구 설계 패널 (상부 우측)에서 묘사된 바와 같이, 미량정량판은 개별 Nbs와 공-인큐베이션되기 전에 rhLILRB2-Fc 단백질로 코팅되었다. 그런 다음, ANGPTL2 단백질이 첨가되었고 ANGPTL2의 검출은 항-ANGPTL2 정제된 Ab에 이어 HRP 컨주게이션된 항-토끼 Ab를 사용하여 수행되었다. 값은 음성 대조군 (Nb 또는 대조군 Ab의 부재 하에서 ANGPTL2 단백질만으로 인큐베이션된 rhLILRB2-Fc (n=1)의 평균 흡수 강도 (MFI)로 정규화되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0059]

[0060]

본원에 사용된, "백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 구성원 2" 또는 "LILRB2"는 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 (LIR) 패밀리의 구성원, 특히 2개 또는 4개 세포의 면역글로불린 도메인, 막관통 도메인, 및 2개 내지 4개 세포질 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 함유하는 LIR 수용체의 서브패밀리 B 클래스를 지칭한다. LILRB2는 항원-제시 세포에서 MHC 클래스 I 분자에 결합하고 면역 반응의 자극을 억제하고 음성 신호를 변환시키는 면역 세포에서 발현된다. 염증 반응 및 세포독성을 제어하여 면역 반응을 집중시키고 자가반응성을 제한하는데 일조하는 것으로 생각된다. LILRB2는 대안적 명칭 예컨대 LIR2, CD85 항원-유사 패밀리 구성원 D, CD85D, 면역글로불린-유사 전사물 4, ILT4, 단핵구/대식세포 면역글로불린-유사 수용체 10 또는 MIR-10으로 알려져 있다. 본 발명의 맥락에서, 이 용어는 특히 인간 LILRB2를 지칭한다. 인간 LILRB2는 예를 들어 UniProt 수탁 번호 Q8N423으로 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 LILRB2 아미노산 서열은 약 598개 아미노산이고, 유전자는 염색체 영역 19q13.4에서 클러스터에 위치한다. 인간 LILRB2는 대안적 스플라이싱에 의해 생산된 4개의 알려진 아이소폼을 갖는다. 아이소폼 1은 정규 서열로서 선택되었고 수탁 번호 Uniprot Q8N423-1로 기재되고, 아이소폼 2는 위치 437에서 아미노-산 결실에 의해 아이소폼 1과 상이하고 수탁 번호 Uniprot Q8N423-2로 기재되고, 아이소폼 3은 위치 495-510 및 511-598에서 아미노-산의 결실에 의해 아이소폼 1과 상이하고 수탁 번호 Uniprot Q8N423-3로 기재되고, 아이소폼 4는 위치 1-116에서 아미노-산의 결실에 의해 아이소폼 1과 상이하고 수탁 번호 Uniprot Q8N423-4로 기재된다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "LILRB2"는 LILRB2의 모든 아이소폼을 포괄한다.

[0061]

본원에 사용된, "중쇄 항체" (HCAb)는 경쇄가 없고 2개의 중쇄로 구성되는 면역글로불린을 지칭한다. 각 중쇄는 특이적 항원, 에피토프 또는 리간드에 대한 결합을 가능하게 하는 불변 영역 (CH) 및 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 본원에 사용된, HCAb는 각 중쇄가 VHH로 불리는 가변 도메인 및 2개의 불변 도메인 (CH2 및 CH3)을 포함하는 카멜리드(camelid)-형의 중쇄 항체를 포괄한다. 주목할만한 점은, 카멜리드 HCAb는 제1 불변 도메인 (CH1)이 결여된다는 것이다. 특이적 항원에 대한 이러한 중쇄 항체는 면역화된 카멜리드로부터 수득될 수 있다. 본원에 사용된, "카멜리드"는 단봉 낙타, 낙타, 라마 및 알파카를 포괄한다. 카멜리드 HCAb는 Hamers-Casterman 등, Nature, 1993, 363:446에 의해 기재되었다. HCAb의 다른 예는 연골 어류 (Ig-NAR) 예컨대 너스 상어 (*긴글리모스토마 시르라툼(Ginglymostoma cirratum)*) 및 워베공 상어(wobbegong shark) (*오렉톨로부스 마쿨라테스(Orectolobus maculates)*)의 면역글로불린-유사 구조이다.

[0062]

본원에 사용된, "단일-도메인 항체" (sdAb 또는 Nb)는, 항원, 에피토프 또는 리간드를 단독으로, 바꾸어 말하면, 또 다른 결합 도메인의 요구 없이 결합시킬 수 있는, 중쇄 단독 항체에서 유래된, 단일-가변 도메인을 지칭한다. 단일 도메인 항체는 VHH 또는 V-NAR에서 유래할 수 있거나, 이로 구성될 수 있다. VHH는 낙타과의 HCAb에서 발견되는 가변 도메인을 지칭한다. V-NAR은 연골 어류에서 발견되는 면역글로불린-유사 구조 (Ig-NAR)에서 발견되는 가변 도메인을 지칭한다. 대안으로서, 단일-도메인 항체는 나이브(naive) 합성 라이브러리로부터 수득될 수 있다. 단일-도메인 항체에 대한 검토를 위하여, Saerens 등, *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8:600-608, Muyltermans 등, *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Mar 15;128(1-3):178-83, 및/또는 Muyltermans 2013, *Annu Rev Biochem.* 2013;82:775-97을 참조할 수 있고, 이의 개시내용은 참고로 편입된다.

[0063]

본원에 사용된, "결합" 또는 "결합하는"은 항원을 인식하고 접촉하는 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 융합 단백질 및 (sdAb 포함) 항체를 지칭한다. "특이적으로 결합하다" 또는 "면역특이적으로 결합하다"는 항체가 특이적 항원을 인식하지만, 샘플에서 다른 분자 또는 항원을 실질적으로 인식하지도 결합하지도 않는 것을 의미한다. 일부 사례에서, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"이라는 용어는 항체, 단백질 또는 펩타이드와 제2 화학종과의 상호작용과 관련하여 사용될 수 있으며, 이는 상호작용이 특정 구조 (예를 들면, 항원성

결정자 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미한다. 본원에 사용된, 용어 "특이적 결합"은 적어도 10^{-6} 또는 10^{-7} M의 결합 친화성을 갖는 항체와 항원 사이 접촉을 의미한다. 특정 양태에서, 항체는 적어도 약 10^{-8} M, 및 바람직하게는 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M의 친화성으로 결합한다.

[0064] 본원에 사용된 용어 "LILRB2에 특이적으로 결합하는 sdAb" 및 유사 용어는, LILRB2를 특이적으로 인식하고 다른 항원 (LILR 패밀리의 다른 구성원, 예를 들어 예컨대 LILRB1을 포함하는)을 인식하지 않거나 약하게 인식하는 sdAb를 지칭한다. 바람직하게는, LILRB2에 특이적으로 결합하는 sdAb는 다른 LILR 패밀리의 구성원, 예를 들어 LILRB1을 포함하는 다른 항원 또는 이의 단편에 대한 친화도와 비교할 때 이 항원에 대해 바람직하게는 적어도 10, 100 또는 1000만큼 더 높은 친화성을 갖는다.

[0065] 항체 또는 sdAb의 친화성은 단일 항원-항체 부위에 특이적 항원과 이의 결합의 치수일 수 있고 본질적으로 항체의 항원-결합 부위와 특정한 에피토프 사이 상호작용에서 존재하는 모든 인력 및 척력의 합계이다. 특정한 항원 (예를 들면 LILRB2)에 항체 또는 sdAb의 친화성은, 항체-조합 부위의 친화성을 나타내는, 등식 $K_d = \frac{[Ag][Ab]}{[Ag Ab]}$ 에 의해 정의된, 해리의 평형 상수 K로 표현될 수 있고; 여기에서 [Ag]는 자유 항원의 농도 (M)이고, [Ab]는 자유 항체의 농도 (M)이고 [Ag Ab]는 항원-항체 복합체의 농도 (M)이다. 항원 및 항체 또는 sdAb가 강하게 함께 반응하는 경우 자유 항원 또는 자유 항체 또는 sdAb가 매우 적을 것이고, 그러므로 항체 또는 sdAb의 평형 상수 또는 친화성은 낮을 것이다.

[0066] 2개 아미노산 서열 (A)와 (B) 사이 "백분율 동일성"의 "동일성"은, 비교의 윈도우(window)를 통해서, 최적 방식으로 정렬된 2개 서열을 비교함으로써 결정된다. 서열의 상기 정렬은 잘-알려진 방법에 의해, 예를 들어, 니들만-분취(Needleman-Wunsch)의 글로벌 정렬을 위한 알고리즘을 사용하여 실행될 수 있다. 단백질 분석 소프트웨어는, 보존적 아미노산 치환을 포함하는, 다양한 치환, 결실 및 다른 변형에 할당된 유사성의 치수를 사용하여 유사한 서열을 매칭시킨다. 일단 총 정렬이 수득되면, 동일성의 백분율은 정렬된 동일한 아미노산 잔기의 전체 수를 서열 (A)와 (B) 사이 최장 서열에서 함유된 잔기의 전체 수로 나눈셈함으로써 수득될 수 있다. 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 결정된다. 두 개의 아미노산 서열을 비교하기 위해, 예를 들어 EMBL-EBI에서 제공하는 단백질의 쌍별 서열 정렬을 위한 도구 "엠보스 바늘(Emboss needle)"을 사용할 수 있으며 다음에서 사용할 수 있다:

[0067] http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_needle&context=protein, 기본 설정 사용: (i) 매트릭스: BLOSUM62, (ii) 갭 개방: 10, (iii) 갭 확장: 0.5, (iv) 출력 형식: 쌍, (v) 말단 갭 페널티: 위, (vi) 말단 갭 개방: 10, (vii) 말단 갭 확장: 0.5.

[0068] 본원에 사용된, "아미노산 변형"은 폴리펩타이드의 아미노산 서열에서 변화를 의미한다. 본원에 "아미노산 변화"로 또한 칭해질 수 있는 "아미노산 변형"은 폴리펩타이드 서열에서 아미노산 돌연변이 예컨대 치환, 삽입, 및/또는 결실을 포함한다. 본원에 "아미노산 치환" 또는 "치환"은 모체 폴리펩타이드 서열에서 특정한 위치에 있는 아미노산의 또 다른 아미노산으로 대체하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 치환은 침묵성 치환이다. "아미노산 삽입" 또는 "삽입"은 모체 폴리펩타이드 서열에서 특정한 위치에 아미노산의 부가를 의미한다. "아미노산 결실" 또는 "결실"은 모체 폴리펩타이드 서열에서 특정한 위치에서 아미노산의 제거를 의미한다. 아미노산 치환은 보존적일 수 있다. 보존적 치환은 유사한 화학적 특성 (예를 들면, 전하, 벌크 및/또는 소수성)이 있는 측쇄 ("R-기")를 갖는 또 다른 잔기에 의한 주어진 아미노산 잔기의 대체이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 보존적 치환 및 상응하는 규칙은 최신 기술에 잘-기재된다.

[0069] 본원에 사용된, "모체 폴리펩타이드" 또는 "폴리펩타이드 모체"는 변이체를 생성하기 위해 후속적으로 변형되는 미변형된 폴리펩타이드를 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 모체 폴리펩타이드는 자연-발생 HCAb로부터 VHH일 수 있다.

[0070] 본원에 사용된 "변이체 폴리펩타이드", "폴리펩타이드 변이체" 또는 "변이체"는, 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 모체 폴리펩타이드 서열의 것과 상이한 폴리펩타이드 서열을 지칭한다. 가령, 본 발명의 맥락에서, 변이체는 자연-발생 HCAb로부터 VHH의 변이체일 수 있다. 전형적으로, 변이체는 1 내지 50개 아미노산 변형, 바람직하게는 1 내지 40개 아미노산 변형을 포함한다. 특히, 변이체는 이의 모체와 비교된 경우 1 내지 30개 아미노산 변화, 예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 아미노산 변화를 가질 수 있다. 변이체는 하나 또는 몇몇 아미노산 치환, 및/또는, 하나 또는 몇몇 아미노산 삽입, 및/또는 하나 또는 몇몇 아미노산 결실을 포함할 수 있다. 일부

구현예에서, 변이체는 하나 또는 몇몇 보존적 치환을, 예를 들면 상기에 나타난 대로 포함할 수 있다. 일부 추가 구현예에서, sdAb의 변이체는 모체 sdAb의 CDR 도메인에서 하나 또는 몇몇 아미노산 변형을 포함할 수 있다. CDR3은 동일한 인식 패턴을 갖는 sdAb 패밀리를 정의하는데 흔히 사용되기 때문에, CDR3에서의 이러한 변형은 모체 sdAb와 비교하여 뚜렷한 결합 특성 (가령 증가된 결합 특성)을 갖는 새로운 sdAb 패밀리를 초래할 수 있는 반면, CDR1 또는 CDR2에서 변형은 동일한 패밀리의 (즉 동일한 CDR3 그러나 상이한 CDR1 및/또는 CDR2를 갖는) 상이한 구성원을 정의하도록 유도할 수 있다. 일부 다른 구현예에서, 모체 sdAb의 변이체는 적어도 하나의 프레임워크 도메인에서 하나 또는 몇몇 아미노산 변형을 포함할 수 있다.

[0071] 용어 "치료"는 환자의 건강 상태를 호전시키기 위한 임의의 행위 예컨대 질환의 또는 질환의 증상의 요법, 방지, 예방 및 지체를 지칭한다. 질환의 치유적 치료 및/또는 예방적 치료 둘 모두를 나타낸다. 치유적 치료는 질환 또는 질환의 증상 또는 직접적으로나 간접적으로 야기시키는 고통을 경감, 개선 및/또는 제거, 감소 및/또는 안정화하는 치료 또는 치유를 초래하는 치료로서 정의된다. 예방적 치료는 질환의 예방을 초래하는 치료 그리고 질환의 진행 및/또는 발생 또는 이의 출현의 위험을 감소 및/또는 지연시키는 치료 둘 모두를 포함한다. 특정 구현예에서, 그와 같은 용어는 질환, 장애, 감염 또는 이와 연관된 증상의 개선 또는 근절을 지칭한다. 다른 구현예에서, 이 용어는 암의 확산 또는 악화를 최소화하는 것을 지칭한다. 본 발명에 따른 치료는 100% 또는 완전 치료를 반드시 암시하지 않는다. 오히려, 당업자가 잠재적 이익 또는 치료적 효과를 갖는 것으로서 인식하는 다양한 정도의 치료가 있다.

[0072] 본원에 사용된, 용어 "장애" 또는 "질환"은 유전적 또는 발달적 오류, 감염, 독극물, 영양적 결핍 또는 불균형, 독성, 또는 불리한 환경적 인자의 효과에서 비롯하는 신체의 기관, 부분, 구조 또는 시스템이 잘못 기능하는 것을 지칭한다. 바람직하게는, 이들 용어는 건강 장애 또는 질환, 예를 들면 정상적인 신체적 또는 정신적 기능을 방해하는 질병을 지칭한다. 더욱 바람직하게는, 용어 장애는 동물 및/또는 인간에 영향을 미치는 면역 및/또는 염증성 질환, 예컨대 암을 지칭한다.

[0073] 본원에 사용된 용어 "암"은 비정상 세포의 급속하고 제어되지 않은 성장을 특징으로 하는 질환으로서 정의된다. 암 세포는, 예를 들어 전이에서, 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해서 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있다.

[0074] 본원에 사용된, 용어 "대상체", "숙주", "개체", 또는 "환자"는 인간 및 수의학적 대상체, 특히 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 더 바람직하게는 성인 및 어린이를 포함하는 인간을 지칭한다. 그러나, 용어 "대상체"는 또한 비-인간 동물, 특히 포유동물 예컨대 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양 및 비-인간 영장류를 기타 중에서 포함한다.

[0075] 본원에 사용된, "약학적 조성물"은 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제와 같은 임의의 다른 화학 성분과 함께 본 발명에 따른 항-LILRB2 항체 또는 sdAb의 항원 결합 도메인을 포함하는 것과 같은 활성제 중 하나 이상의 제제를 지칭한다. 약학적 또는 수의학적 조성물의 목적은 유기체에 대한 활성제의 투여를 촉진시키기 위한 것이다. 본 발명의 조성물은 임의의 종래의 투여 또는 사용 경로에 적합한 형태일 수 있다. 일 구현예에서, "약학적 조성물"은 전형적으로 활성제, 예를 들면, 화합물 또는 조성물, 및 자연-발생 또는 비-자연-발생 담체, 불활성 (예를 들어, 검출가능한 제제 또는 표지) 또는 활성, 예컨대 아주반트(ajuvant), 희석제, 결합제, 안정화제, 완충액, 염, 친유성 용매, 보존제, 아주반트 등의 조합을 포함하고 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

[0076] 본원에 지칭된 "허용가능한 비히클" 또는 "허용가능한 담체"는 약학적 또는 수의학적 조성물을 제형화하는데 유용한 것으로 당업자에 공지된 임의의 알려진 화합물 또는 화합물의 조합이다.

[0077] "치료학적 유효량"은, 대상체에 투여된 경우, 표적화된 질환 또는 장애를 치료하거나, 또는 원하는 효과를 생산하는데 필요해진 활성제의 양인 양이다. "유효량"은 제제(들), 질환 및 이의 중증도 그리고 치료되어야 하는 대상체의 연령, 체중, 및 특징에 의존하여 다양할 것이다.

[0078] 본원에 사용된, 용어 "약제"는 장애 및/또는 질환에 대한 치유적 또는 예방성 특성을 가진 임의의 서브스텐스 또는 조성물을 지칭한다.

[0079] **LILRB2에 대항하는 단일 도메인 항체**

[0080] 상기 언급된 대로, sdAb 분자는 경쇄가 자연적으로 없는 중쇄 단독 항체의 가변 영역에 상응한다. sdAb의 항원-결합 표면은 보통 평평하거나 오목한 종래의 항체의 것들보다 보통 더욱 볼록(또는 돌출형)하다.

- [0081] 본 발명에 따른 단일-도메인 항체는 항원 또는 에피토프 (예를 들면 LILRB2) 단독을, 바꾸어 말하면, 또 다른 결합 도메인의 요구 없이 결합할 수 있는 항체에서 유래된 단일 가변 도메인을 포함한다. 특히, 본 발명에 따른 단일-도메인 항체는 경쇄 또는 이의 단편이 없다. 본 발명에 따른 sdAb 분자는 낙타과, 연골 어류, 나이브 라이브리 또는 항체의 중 가변 도메인의 조각된 형태로부터 단리될 수 있는 중쇄 단독 항체 (HcAb)의 항원-결합 도메인을 포함하거나 이것들로 이루어지거나, 본질적으로 이것들로 이루어지는 폴리펩타이드이다. 바람직하게는, sdAb는 카멜리드 HcAb, 바람직하게는 알파카 HcAb에서 유래된다.
- [0082] 일부 바람직한 구현예에서, 단일-도메인 항체는 VHH, Ig-NAR로부터의 V-NAR, 조각된 V-NAR, VHH 변이체, 특히 인간화된 VHH 또는 최적화된 VHH, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0083] 일 구현예에서, LILRB2에 대한 sdAb는 최적화된 sdAb이다. 최적화된 sdAb는 자연-발생 sdAb와 비교된 경우 하나 또는 몇몇 아미노산 변형을 포함하는 단리된 HcAb에서 유래된 sdAb의 변이체를 지칭하고, 상기 변형은 가령 sdAb의 안정성을 증가시킬 수 있거나 LILRB2에 대한 sdAb 변이체의 친화성 및/또는 선택성을 증가시킬 수 있다.
- [0084] 또 다른 또는 추가 구현예에서, LILRB2에 대한 sdAb는 인간화된 sdAb이다. 인간화된 sdAb는 자연-발생 sdAb와 비교된 경우 하나 또는 몇몇 아미노산 변형을 포함하는 sdAb 변이체를 지칭하고, 상기 변형은 LILRB2에 대하여 친화성을 상당히 감소시킴 없이 인간 대상체에 대한 이의 면역원성을 감소시킬 수 있다. 본 발명에 따른 인간화된 sdAb는, 바람직하게는 인간 공통 서열에서 발견되는 것으로, 낙타과 또는 연골 어류 sdAb 서열에서 아미노산의 하나 이상을 그들의 인간 상대에 의해 대체시킴으로써 수득될 수 있고, 다만 상기 아미노산 변형은 생성된 sdAb의 항원 결합 능력에도, 이의 특성, 예컨대 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 사이 상호작용을 억제시킴의 능력에도 상당히 영향을 미치지 않는다. 그와 같은 방법은 숙련된 기술자에 의해 잘-알려져 있다. 당해 기술 분야에서는 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 VHH용 인간화된 스캐폴드(scaffold)의 몇몇 예를 제공한다. 인간화된 sdAb는 부분적으로 인간화된 sdAb 및 완전히-인간화된 sdAb를 포괄한다.
- [0085] 잠재적으로 유용한 인간화 아미노산 변형, 특히 치환은 자연 발생 VHH 서열의 프레임워크 영역의 서열을 하나 이상의 밀접하게 관련된 인간 VH 서열의 상응하는 프레임워크 서열과 비교함으로써 결정될 수 있고, 그 이후 그렇게 결정된 잠재적으로 유용한 인간화 치환 (또는 이의 조합) 중 하나 이상은 (그 자체로 알려진 방식으로) 상기 VHH 서열에 도입될 수 있고 생성된 인간화된 VHH 서열은 표적을 위한 친화성, 안정성, 용이성 및 발현 수준, 및/또는 다른 원하는 특성에 대하여 테스트될 수 있다. 이러한 방식으로, 제한된 정도의 시행착오로, 적합한 인간화 치환 (또는 적당한 이의 조합)은 숙련된 기술자에 의해 결정될 수 있다. 대안으로서, 당업자는, LILRB2에 대항하는 원하는 인간화된 sdAb를 수득하기 위해, 당해 기술 분야에 기재된 VHH의 인간화된 스캐폴드 내에서 VHH의 CDR을 그래프팅(graft)시킬 수 있다. sdAb 뿐만 아니라 인간화된 sdAb 스캐폴드의 인간화 방법은, 가령, 특허 출원 US 2010/0215664, WO2011/117423, 또는 간행물 예컨대 Conrath 등, *Journal of Molecular Biology*, 2005, 350:112-125 및 Vincke, *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 3273-3284에서 제공된다.
- [0086] 대안으로서, 당업자는, LILRB2에 대항하는 원하는 sdAb를 수득하기 위해, 당해 기술 분야 (Saerens 등., *J. Mol. Biol.* (2005) 352, 597-607)에 기재된 sdAb의 보편적 스캐폴드 내에서 CDR을 그래프팅시킬 수 있다. 본 발명의 sdAb는 가령 Saerens 등에서 나타난 대로, 보편적 프레임워크 스캐폴드를 포함하고 하기 정의된 대로 적어도 하나의 CDR, 바람직하게는 3개 CDR을 포함하는 VHH일 수 있다.
- [0087] 본 발명의 단일-도메인 항체는 이의 결합 특이성을 결정하는 적어도 하나, 바람직하게는 3개 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 바람직하게는, 단일-도메인 항체는 프레임워크 영역 (FR) 사이 분포되는 몇몇, 바람직하게는 3개 CDR을 포함한다. CDR 및 FR은 바람직하게는 자연-발생 항체 가변 도메인으로부터 단편, 변이체 또는 유도체이다. CDR은 일반적으로 5 내지 30개 아미노산의 길이를 갖고 서열 함량 및 구조 형태 둘 모두에서 높은 가변성을 보여주고, 이는 항원 결합에서 관여되고 항원 특이성을 제공한다.
- [0088] 바람직하게는, 단일 도메인 항체는 당업계 및 본원에서 각각, "프레임워크 영역 1" 또는 "FR1"; "프레임워크 영역 2" 또는 "FR2"; "프레임워크 영역 3" 또는 "FR3"; 그리고 "프레임워크 영역 4" 또는 "FR4"로 지칭되는 4개 프레임워크 영역 또는 "FR"을 포함한다. 이들 프레임워크 영역은, 당업계에서 각각 "상보성 결정 영역 1" 또는 "CDR1"; "상보성 결정 영역 2" 또는 "CDR2"; 그리고 "상보성 결정 영역 3" 또는 "CDR3"으로 지칭되는 3개 상보적 결정 영역 또는 "CDR"에 의해 중단된다. 이들 프레임워크 영역 및 상보적 결정 영역은 바람직하게는 하기 순서로 작동 가능하게 연결된다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (아미노 말단부터 카복시 말단까지).
- [0089] 주어진 sdAb의 CDR은 당업자가 이용가능한 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 그리고 비-제한 방식으로, 클로티아 또는 카뱃 방법은 CDR을 결정하는데 사용될 수 있다 (Chothia 등, *Nature* 342, 877-883;

Kabat 등, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). AbM (Oxford Molecular AbM 항체 모델링 소프트웨어)이라고 하는 클로티아와 카밧 사이 중간 방법 또는 소위 이용가능한 복합 구조의 분석 (Saerens 등, Mol Biol. 2005) 또는, 예컨대 Lefranc 등, Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77 ("IMGT" 넘버링 체계)에서 개시된 IMGT 방법에 기반된 "접촉" 방법과 같은 대안적 CDR 결정 방법 또한 사용될 수 있다.

- [0090] 종래의 인간 항체 VH와 비교하여 sdAb의 FR2 영역 및 CDR에서 몇개의 아미노산은 치환될 수 있다. 가령, FR2 영역에서 고도로 보존된 소수성 아미노산 (예컨대 Val47, Gly49, Leu50, 및/또는 Trp52)은 친수성 아미노산 (Phe42, Glu49, Arg50, Gly52)에 의해 종종 대체되어, 전반적 구조를 더욱 친수성으로 만들고 높은 안정성, 가용성 및 응집에 대한 내성에 기여한다.
- [0091] 일부 특정한 구현예에서, 본 발명의 단일-도메인 항체는 서열번호: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 또는 33에서 제시된 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 또는 33과 상이한 아미노산 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되는 CDR3을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 단일-도메인 항체는 서열번호: 3, 6 또는 9에서 제시된 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호: 3, 6 또는 9와 상이한 아미노산 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되는 CDR3을 포함한다. 바람직하게는, 그러한 아미노산 변형은 생성된 sdAb의 항원 결합 능력이나 이의 특성, 예컨대 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 사이의 상호작용 억제하기의 능력에 상당하게 영향을 미치지 않는다. 바람직하게는, 그러한 아미노산 변형은 치환 예컨대 침묵성 치환이다.
- [0092] 일부 특정한 구현예에서, 본 발명의 단일-도메인 항체는 서열번호: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29 또는 32에서 제시된 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29 또는 32와 상이한 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 단일-도메인 항체는 서열번호: 2, 5 또는 8에서 제시된 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호: 2, 5 또는 8과 상이한 아미노산 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되는 CDR2를 포함한다. 바람직하게는, 그러한 아미노산 변형은 생성된 sdAb의 항원 결합 능력이나 이의 특성, 예컨대 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 사이의 상호작용 억제하기의 능력에 상당하게 영향을 미치지 않는다. 바람직하게는, 그러한 아미노산 변형은 치환 예컨대 침묵성 치환이다.
- [0093] 일부 특정한 구현예에서, 본 발명의 단일-도메인 항체는 서열번호: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 또는 31에서 제시된 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 또는 31과 상이한 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 단일-도메인 항체는 서열번호: 1, 4 또는 7에서 제시된 서열을 포함하거나, 이것들로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호: 1, 4 또는 7과 상이한 아미노산 서열을 포함하거나, 상이하게 구성되는 CDR1을 포함한다. 바람직하게는, 그러한 아미노산 변형은 생성된 sdAb의 항원 결합 능력이나 이의 특성, 예컨대 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 사이의 상호작용 억제하기의 능력에 상당하게 영향을 미치지 않는다. 바람직하게는, 그러한 아미노산 변형은 치환 예컨대 침묵성 치환이다.
- [0094] 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 단일-도메인 항체는 하기를 포함하거나 하기로 구성된 3개의 CDR을 포함한다:
- [0095] (a) CDR1이 서열번호:1을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:1과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0096] CDR2가 서열번호:2를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:2와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0097] CDR3이 서열번호:3을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:3과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0098] (b) CDR1이 서열번호:4를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:4와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0099] CDR2가 서열번호:5를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:5와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0100] CDR3이 서열번호:6을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:6과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,

- [0101] (c) CDR1이 서열번호:7을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:7과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0102] CDR2가 서열번호:8을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:8과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0103] CDR3이 서열번호:9를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:9와 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0104] (d) CDR1이 서열번호:10을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:10과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0105] CDR2가 서열번호:11을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:11과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0106] CDR3이 서열번호:12를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:12와 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0107] (e) CDR1이 서열번호:13을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:13과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0108] CDR2가 서열번호:14를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:14와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0109] CDR3이 서열번호:15를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:15와 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0110] (f) CDR1이 서열번호:16을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:16과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0111] CDR2가 서열번호:17을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:17과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0112] CDR3이 서열번호:18을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:18과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0113] (g) CDR1이 서열번호:19를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:19와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0114] CDR2가 서열번호:20을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:20과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0115] CDR3이 서열번호:21을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:21과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0116] (h) CDR1이 서열번호:22를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:22와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0117] CDR2가 서열번호:23을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:23과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0118] CDR3이 서열번호:24를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:24와 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0119] (i) CDR1이 서열번호:25를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:25와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0120] CDR2가 서열번호:26을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:26과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0121] CDR3이 서열번호:27을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:27과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,

- [0122] (j) CDR1이 서열번호:28을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:28과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0123] CDR2가 서열번호:29를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:29와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0124] CDR3이 서열번호:30을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:30과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0125] (k) CDR1이 서열번호:31을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:31과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0126] CDR2가 서열번호:32를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:32와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0127] CDR3이 서열번호:33을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:33과 상이한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0128] 바람직하게는, 항-LILRB2 sdAb는 다음과 같은 3개의 CDR을 포함한다:
- [0129] (a) CDR1이 서열번호:1을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:1과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0130] CDR2가 서열번호:2를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:2와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0131] CDR3이 서열번호:3을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:3과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0132] (b) CDR1이 서열번호:4를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:4와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0133] CDR2가 서열번호:5를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:5와 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0134] CDR3이 서열번호:6을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:6과 상이한 아미노산 서열을 갖거나,
- [0135] (c) CDR1이 서열번호:7을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:7과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0136] CDR2가 서열번호:8을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:8과 상이한 아미노산 서열을 갖고,
- [0137] CDR3이 서열번호:9를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형으로 인해 서열번호:9와 상이한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0138] 바람직하게는, 그러한 아미노산 변형은 생성된 sdAb의 항원 결합 능력이나 이의 특성, 예컨대 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 사이의 상호작용 억제하기의 능력에 상당하게 영향을 미치지 않는다. 바람직하게는, 그러한 아미노산 변형은 치환 예컨대 침묵성 치환이다.
- [0139] 더더욱 바람직하게는, 항-LILRB2 sdAb는 CDR1이 서열번호:1을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형, 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개 침묵성 돌연변이, 더더욱 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개 침묵성 치환 덕분에 서열번호:1과 상이한 아미노산 서열을 갖고, CDR2가 서열번호:2를 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형, 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개 침묵성 돌연변이, 더더욱 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개 침묵성 치환 덕분에 서열번호:2와 상이한 아미노산 서열을 갖고, CDR3이 서열번호:3을 포함하거나, 이것으로 구성되거나, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변형, 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개 침묵성 돌연변이, 더더욱 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개 침묵성 치환 덕분에 서열번호:3과 상이한 아미노산 서열을 갖는 3개 CDR을 포함한다.
- [0140] 일부 구현예에서, 항-LILRB2 sdAb는 서열 서열번호: 34 내지 서열번호: 44 중 임의의 서열에서 정의된 서열 또

는 이에 대해 적어도 80%의 서열 동일성, 바람직하게는 이에 적어도 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 아미노-산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 본질적으로 이것들로 구성된다.

- [0141] 바람직하게는, 항-LILRB2 sdAb는 서열번호: 34, 서열번호: 35 및 서열번호: 36으로 이루어지는 군에서 선택된 서열 또는 이에 적어도 80%의 서열 동일성, 바람직하게는 거기에 적어도 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 아미노-산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이것들로 구성된다.
- [0142] 일 구현예에서, 항-LILRB2 sdAb는 서열번호: 34에서 정의된 서열 또는 이에 적어도 80%의 서열 동일성, 바람직하게는 이에 적어도 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 아미노-산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이것으로 구성된다. 바람직하게는, 서열번호:34에 적어도 80%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 아미노-산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이것으로 구성되는 항-LILRB2 sdAb는 여전히 LILRB2에 결합할 수 있고, 바람직하게는 서열번호: 34에 정의된 서열을 포함하거나 이것으로 구성된 항-LILRB2 sdAb와 유사한 친화성을 갖고 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G(HLA-G) 사이의 상호작용을 억제하는 능력과 같은 동일한 특성을 보존한다.
- [0143] 일부 특정한 구현예에서, 본 발명의 sdAb는 약 11 kDa 내지 약 18 kDa, 예컨대 11 kDa 내지 17 kDa, 예컨대 14 내지 16 kDa 또는 14.5 내지 15.5 kDa, 예컨대 약 15 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0144] 특정 양태에서, sdAb는 적어도 약 10^{-6} M 또는 10^{-7} M, 및 바람직하게는 적어도, 10^{-8} M, 10^{-9} M 10^{-10} M 또는 10^{-11} M의 친화성으로 LILRB2를 결합시킨다. 특히, 결합 K_d 는 0.1 nM 내지 10 μ M, 특히 1 μ M 내지 1 nM로 포함된다. 결합 친화성은 당업자가 이용가능한 임의의 방법, 특히 표면 플라즈몬 공명 (SPR)으로 측정될 수 있다.
- [0145] 바람직한 구현예에서, 항-LILRB2 sdAb는 LILRB2 이외의 LILBR 패밀리의 다른 구성원을 인식하지 않는다. 바람직하게는, 항-LILRB2 sdAb는 LILRB1을 인식하지 않는다. 대안적으로, 항-LILRB2 sdAb는 LILRB1을 약하게 인식한다. 바람직하게는, 항-LILRB2 sdAb는, 특히 인자 10, 100 또는 1000만큼 LILRB2보다 LILRB1을 덜 인식한다.
- [0146] 특정한 구현예에서, 항-LILRB2 sdAb는 LILRB2와 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 사이의 상호작용을 경쟁적으로 억제시키거나 LILRB2에 대한 인간 백혈구 항원-G (HLA-G)의 결합을 경쟁적으로 억제시킨다.
- [0147] 용어 "경쟁적으로 억제시키다"는 본 발명에 따른 sdAb가 특히 시험관내, 생체의 또는 생체내에서 LILRB2에 대한 단백질, 항체 또는 리간드의 결합, 또는 임의의 단백질, 항체 또는 리간드와 LILRB2 사이의 상호작용을 감소시키거나 억제시키거나 대체할 수 있음을 나타낸다. 경쟁 검정은 표준 기법 예컨대, 가령, 경쟁적 ELISA 또는 다른 결합 검정을 사용하여 수행될 수 있다. sdAb가 LILRB2에 단백질, 항체 또는 리간드의 결합의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%를 억제시키거나 대신하는 경우, 경쟁적인 것으로 간주된다. 바람직한 경쟁 sdAb는 LILRB2 상의 단백질, 항체 또는 리간드에 의해 인식되거나 결합되는 에피토프와 공통 아미노산 잔기를 공유하는 에피토프를 결합시킨다.
- [0148] 본원에 사용된, 용어 "HLA-G"는 적어도 7개 아이소폼을 포함하는 인간 백혈구 항원 G를 지정하며, 여기서 4개는 막-결합 (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 및 HLA-G4)되고 3개는 가용성 (HLA-G5, HLA-G6 및 HLA-G7)이다. HLA-G 인간 아이소폼은 예를 들어 HLA-G1의 경우 Uniprot 수탁 번호 P17693-1, HLA-G2의 경우 P17693-2, HLA-G3의 경우 P17693-3, HLA-G4의 경우 P17693-4, HLA-G5의 경우 P17693-5, HLA-G6의 경우 P17693-6, HLA-G7의 경우 P17693-7 하에 기재된다.
- [0149] 특정한 구현예에서, 항-LILRB2 sdAb는 LILRB2와 HLA-G6 사이의 상호작용을 경쟁적으로 억제시키거나 LILRB2에 대한 HLA-G6의 결합을 경쟁적으로 억제시킨다.
- [0150] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 sdAb는 경쟁적으로 LILRB2에 안지오포이에틴 유사 2 (ANGPTL2)의 결합을 억제시키거나 경쟁적으로 LILRB2와 ANGPTL2 사이 상호작용을 억제시킨다. 본원에 사용된, "ANGPTL2"는 친-혈관 신생 및 항세포자멸 능력으로 당업계에서 알려지는 혈관 내피 성장 인자 패밀리의 구성원이다. 이 용어는 바람직하게는 인간 ANGPTL2를 지칭한다. 인간 ANGPTL2는 예를 들어 Uniprot 수탁 번호 O15123 하에 기재된다.
- [0151] 본 발명은 또한, 적어도 하나의 분자에 컨쥬게이션된, 상기 정의된 바와 같이 하나 이상의 항-LILRB2 sdAb를 포함하는 키메라 제제 (또한 본원에 "컨쥬게이트"로 상호교환가능하게 불림)에 관한 것이다. sdAb에 컨쥬게이션된 분자는 예를 들어 의약, 예컨대 약물, 영상화 분자, 진단제, 트레이서(tracer), 태그 또는 염료에서 유용한 임의의 활성 화합물일 수 있다. 키메라 제제는, 상기 활성 화합물 이외에 또는 대신에, sdAb 또는 컨쥬게이트의 혈장 반감기를 증가시키기 위해 안정화 기 (예를 들면, 가령 Fc 또는 IgG)을 또한 함유할 수 있다. 그러한 키메

라 제제는 당업계에서 알려진 임의의 방법에 의해, 바람직하게는 화학적, 생화학적 또는 효소적 경로에 의해, 또는 유전 공학에 의해 sdAb와 분자 사이의 커플링을 사용하여 제조될 수 있다.

- [0152] 특정한 구현예에서, 본 발명의 항-LILRB2 sdAb는 표지화 수단, 예를 들면 효소 예컨대 호스래디쉬 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제, 형광성 단백질 예컨대 GFP, 형광성 표지 예컨대 플루오레세인 로다민, 표지, 화학발광성 표지 또는 생물발광성 표지 예컨대 루미날, 발색단, 예를 들어 생체내, 생체의 또는 시험관내 영상화 또는 진단에 적합한 방사성 동위원소로부터 선택된 분자 또는 단백질에 융합 또는 컨주게이션될 수 있다.
- [0153] 또 다른 특정한 구현예에서, 본 발명에 따른 sdAb는 CAR 작제물에 포함된다. 본원에 사용된, 용어 "키메라 항원 수용체" (CAR), "조작된 세포 수용체", 또는 "키메라 면역 수용체" (ICR)는 항원 결합 특이성을 면역 세포에 그라프팅시켜서, 항원 결합 도메인의 항원 결합 특성을 면역 세포의 면역원성 활성화, 예컨대 T 세포의 용해성 능력 및 자가-재생과 조합시키는 조작된 수용체를 지칭한다. 특히, CAR은 임의로 신호 펩타이드, 항원을 결합시킬 수 있는 세포의 도메인, 막관통 도메인, 임의로 힌지 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 융합된 단백질을 지칭한다. 바람직한 구현예에서, CAR은 세포의 또는 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 임의로 힌지 도메인 및 적어도 하나의 세포내 도메인으로서 본원에 개시된 대로 항-LILRB2 sdAb를 포함한다.
- [0154] **핵산, 벡터 및 숙주 세포**
- [0155] 본 발명의 추가 양태는 상기 정의된 대로 sdAb를 인코딩하는 단리된 핵산 작제물 또는 폴리펩타이드 작제물에 관한 것이다. 핵산은 단일- 또는 이중-가닥 또는 2개의 혼합물일 수 있다. 핵산은 DNA (cDNA 또는 gDNA), RNA, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 이는 예를 들어 변형된 결합, 변형된 퓨린 또는 피리미딘 염기, 또는 변형된 당을 포함하는 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이는 화학적 합성, 재조합, 및/또는 돌연변이유발을 포함하며 당업자에 알려진 임의의 방법으로 제조될 수 있다.
- [0156] 본 발명에 따른 핵산은 본 발명에 따른 sdAb 분자의 아미노산 서열로부터 유추될 수 있고 코돈 활용은 핵산이 전사될 수 있는 숙주 세포에 따라 적응될 수 있다. 이러한 단계는 당업자에게 잘 알려진 방법에 따라 실행될 수 있고 이의 일부는 참조 설명서 Sambrook 등 (Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Third Edition Cold Spring Harbor)에서 기재된다. 그러한 핵산 서열의 구체적 예는 서열번호: 61-75 중 어느 하나를 포함하는 서열, 및 이에 대한 상보적 서열을 포함한다.
- [0157] 본 발명은 또한 선택적으로 조절 서열 (예를 들면, 프로모터, 종결자, 등)의 제어 하에서 그러한 단리된 핵산을 함유하는 벡터에 관한 것이다. 벡터는 예를 들어 플라스미드, 바이러스, 코스미드, 파지미드 또는 인공 염색체일 수 있다.
- [0158] 본 발명은 추가로 숙주 세포를 형질전환, 형질감염 또는 형질도입하기 위한 본 발명에 따른 핵산 또는 벡터의 용도에 관한 것이다.
- [0159] 따라서 본 발명은 본 발명의 하나 또는 몇몇 핵산 및/또는 본 발명의 하나 또는 몇몇 벡터 및/또는 본 발명의 sdAb를 인코딩하는 하나 또는 몇몇 폴리펩타이드를 포함하는 숙주 세포를 또한 제공한다.
- [0160] 숙주 세포는, 예를 들면 예를 들어 E. coli와 같은 원핵 숙주 세포, 또는 (배양된) 포유동물, 식물, 곤충, 예를 들어 CHO-세포, BHK-세포, 인간 세포주(HeLa, COS 및 PER C6 포함), Sf9 세포 및 Sf+ 세포를 포함하는 진균 또는 효모 숙주 세포를 포함하는 본 발명의 sdAb를 발현 또는 생산할 수 있는 임의의 숙주 세포일 수 있다. 적절한 숙주 세포는 진핵 미생물 예컨대 효모 및 사상성 진균의 세포를 포괄한다. 바람직한 효모 숙주 세포는 *사카로마이세스 세레비자이*(*Saccharomyces cerevisiae*), *피치아 파스토리스*(*Pichia pastoris*), *한세놀라 폴리모르파*(*Hansenula polymorpha*), 및 *클루이베로마이세스 락티스*(*luveromyces lactis*)를 포함한다. 용어 "숙주 세포"는 복제 동안 발생하는 돌연변이 때문에 모체 숙주 세포와 동일하지 않은 모체 숙주 세포의 임의의 자손을 또한 포괄한다. 바람직하게는, 세포는 인간 배아 줄기 세포가 아니다.
- [0161] 본 발명의 추가 목적은 본 발명에 따른 sdAb의 생산 방법이고, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0162] a) 이전에-정의된 대로 숙주 세포를 배양시키는 단계 및
- [0163] b) 세포 배양물로부터 상기 정의된 대로 sdAb를 인코딩하는 상기 핵산, 벡터 또는 폴리펩타이드를 회수하는 단계.
- [0164] 단계 a)가 숙주 세포에 의해 원하는 핵산, 벡터 또는 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조건 하에서 수행되는 것은 말할 필요도 없다. 적합한 발현 조건은 적합한 배지의 사용, 적합한 음식의 공급원 및/또는 적합한 영양분의

존재, 적합한 온도, 및 선택적으로 적합한 유도 인자 또는 화합물의 존재 (예를 들면 본 발명의 뉴클레오타이드 서열이 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 경우)를 포함할 수 있고; 이들 모두는 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0165] 그러한 조건 하에서, 본 발명의 sdAb는 구성적 방식으로, 일시적 방식으로, 또는 적합하게 유도된 경우에만 발현될 수 있다.

[0166] 이어서, 본 발명의 sdAb는 그 자체로 알려진 단백질 단리 및/또는 정제 기법, 예컨대 크로마토그래피 및/또는 전기영동 기법, 차등 침전 기법, 친화성 기법 및 기타 등등을 사용하여, 숙주 세포 및/또는 상기 숙주 세포가 배양된 배양 배지로부터 단리될 수 있다. sdAb는 정제 목적을 위하여 태그 예컨대 히스티딘 또는 스트렙타비딘 태그를 또한 포함할 수 있다.

[0167] 본 발명은 본원에 정의된 대로 LILRB2에 대한 sdAb를 수득하는 방법을 또한 제공한다. 본 발명에 따른 sdAb의 수득 및/또는 선택 방법은 단백질 선택 기술 예컨대, 비제한적으로, 세포 디스플레이, 과지 디스플레이, 리보솜 디스플레이, mRNA 디스플레이, DNA 디스플레이 또는 플라스미드 디스플레이에 기반될 수 있다. 이들 기법은 해당 기술 분야에 잘 기재되어 있다. 가령, 박테리오파지에 표시된 VHH의 라이브러리를 생성하기 위해, 숙련된 기술자는 Muydermans 등, *Molecular Biotechnology*, 2001, 74, 277-302, 특히 Recombinant VHH라는 제목의 섹션을 참조할 수 있고, 이의 개시내용은 참고로서 여기에 포함된다. 박테리오파지 상에 표시된 V-NAR의 라이브러리를 생성하기 위해, 숙련된 기술자는 Doolley 등 *Mol Immunol*, 2003, 40:25-30을 참조할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 기능적 sdAb, 특히 LILRB2를 인식할 수 있거나, 또는 LILRB2와 HLA-G 사이의 상호작용을 경쟁적으로 억제시키고/시키거나 LILRB2와 ANGPTL2 사이의 상호작용을 경쟁적으로 억제시키는 sdAb를 선택할 수 있게 하는 하나 또는 몇몇 단계를 포괄할 수 있다.

[0168] 특정한 구현예에서, 본 발명에 따른 sdAb를 포함하는 CAR은 세포에 의해 발현된다. 세포는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 진핵 세포, 예컨대 포유류 세포이다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 sdAb를 포함하는 CAR을 발현시키는 세포는 면역 세포이다. 세포는 대식세포, T 세포, B 세포, NK 세포, NKT, 단핵구 및 수지상 세포로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 세포는 인간 배아 줄기 세포가 아니다.

[0169] **약학적 조성물**

[0170] 본 발명은 또한 상기 정의된 대로 적어도 하나의 sdAb, CAR 또는 세포 및 임의로 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0171] 본 발명의 약학적 조성물은 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams & Wilkins; Twenty first Edition, 2005)에 기재된 것과 같은 표준 방법에 따라 제형화될 수 있다. 사용될 수 있는 약학적으로 허용가능한 부형제는, 특히, Handbook of Pharmaceuticals Excipients, American Pharmaceutical Association (Pharmaceutical Press; 6th revised edition, 2009)에서 기재된다.

[0172] 일 양태에서, 본 발명의 조성물은 유리하게는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체는 (a) 충전제 또는 희석제 예컨대 예를 들어, 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 미세결정질 셀룰로스 및 규산; (b) 결합제, 예컨대, 카복시메틸셀룰로스, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스; (c) 보습제, 예를 들어 글리세롤; (d) 붕해제, 예를 들어, 아가-아가(agar-agar), 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 복합 규산염, 나트륨 크로스카멜로스 및 탄산나트륨; (e) 용액 지연제, 예를 들어 파라핀; (f) 흡수 촉진제, 예컨대 4차 암모늄 화합물; (g) 습윤제, 예컨대 글리세롤 모노스테아레이트; (h) 흡착제 예컨대 카올린 및 벤토나이트; (i) 윤활제 예컨대 탈크, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고품질 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 술페이트, (j) 향산화제, (k) 완충제 예컨대 시트르산나트륨 또는 인산나트륨, (l) 보존제, (m) 방향제 및 향수 등과 같은 각각의 투여 방식에 따라 전통적으로 사용되는 담체로부터 선택될 수 있다.

[0173] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 sdAb, CAR, 세포 또는 폴리펩타이드를 상기 기재된 대로 적어도 하나의 관례적 부형제 (또는 담체)와 적절한 정도의 순도로 혼합시킴으로써 수득될 수 있다. 특히, 본 발명의 sdAb, CAR, 세포 또는 폴리펩타이드는 조성물의 활성 성분(active ingredient)이다.

[0174] 활성 성분과 조합되는 부형제(들)는 (i) 상기 활성 성분의 안정성을 포함하는 물리-화학적 특성, (ii) 상기 활성 성분에 대하여 원하는 약동학적 프로파일, (iii) 생약 형태 및 (iv) 투여 루트에 따라 다양할 수 있음은 말할 것도 없다.

[0175] 약학적 조성물은 전형적으로 본 발명의 sdAb, CAR, 또는 세포의 효과적인 용량을 포함한다. 본원에 기재된 "치

료적으로 효과적인 용량"은 주어진 조건 및 투여 일정에 대하여 치료적으로 효과를 주는 용량을 지칭한다. 활성 서브스텐스의 "치료적으로 효과적인 용량"은 질환 또는 장애를 반드시 치유하지 않지만 이러한 질환 또는 장애에 치료를 제공하여 이의 출현이 지연, 방해 또는 예방되거나, 이의 증상이 악화되거나, 이의 기간이 수정되거나 덜 심각하거나, 환자의 회복이 빨라지도록 할 것이다.

- [0176] 본 발명의 약학적 조성물은 임의의 종래의 경로, 예를 들면 정제, 캡슐의 형태로 장 경로 (즉 경구), 예를 들면 주사가 가능한 용액 또는 현탁액의 형태로 비경구, 근육내, 경피, 정맥내 경로 그리고 예를 들면 겔, 연고, 겔, 로션, 패치, 좌약 및 기타 등등의 형태로 국소 경로에 의한 투여에 적합하도록 제형화될 수 있다.
- [0177] 일부 특정한 구현예에서, 약학적 조성물은 대상체에 투여되기 직전에 적합한 비히클에서 용해될 수 있는 동결건조물 또는 동결-건조된 분말일 수 있다.
- [0178] 본 발명은 또한 상기 정의된 대로 sdAb 또는 sdAb-진단 또는 의료 영상화 제제 컨주게이트 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 조성물에 관한 것이다.
- [0179] **본 발명에 따른 용도**
- [0180] 본 발명에 따른 sdAb, CAR, 세포, 조성물 및 작제물 (즉 단리된 핵산, 폴리펩타이드 및/또는 벡터)은 생물학 연구, 생화학 산업 또는 의약을 포함하는 다양한 분야에서 사용될 수 있다.
- [0181] 특히 본 발명의 sdAb, CAR, 세포, 조성물 및 작제물은 특히 종양의 크기를 감소시키거나 이들 대상체에서 종양의 성장 또는 재-성장을 예방하거나 면역억제성 미세환경의 유도를 예방하기 위해 암을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체에서 적용된다.
- [0182] 일 구현예에서, 치료하기 위한 대상체는 비-인간 동물, 특히 포유동물 예컨대 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양 및 비-인간 영장류이다. 대안적으로, 치료하기 위한 대상체는 인간, 특히 어린이, 청소년 또는 성인을 포함하는 임의의 연령의 인간일 수 있다.
- [0183] 특히, 대상체는 LILRB2 발현, 특히 LILRB2 과-발현을 수반하는 질환에 영향을 받는다. 일 구현예에서, 대상체는 암, 염증성 장애, 예를 들어 박테리아, 바이러스 또는 진균에 의해 유발되는 것과 같은 감염성 질환, 또는 자가-면역 질환을 앓고 있다.
- [0184] 바람직하게는, 대상체는 암으로, 더더욱 바람직하게는 LILRB2 양성 암으로 앓고 있다. 예를 들어, 암과 같은 질환의 치료에 적합한 대상체는 이러한 대상체가 LILRB2 양성 세포, 특히 LILRB2 양성 암 세포, 바람직하게는 LILRB2를 과발현시키는 세포를 보유하는지 여부를 검사함으로써 식별될 수 있다. 질환 및 암의 예는 하기에 보다 구체적으로 기재된다.
- [0185] 본 발명의 추가 목적은 LILRB2 수용체를 포함하는 장애 또는 질환의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 sdAb, CAR, 세포, 폴리펩타이드 작제물 또는 약학적 조성물이며, 바람직하게는 암과 같은, 및/또는 의약 또는 백신으로 사용하기 위한 것이다. 따라서, 이를 필요로 하는 대상체에서 종양의 성장 또는 전이의 확산의 억제 방법 및/또는 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법이 본원에 기재된다. 종양은 고형 종양 또는 액체 종양, 바람직하게는 고형 종양일 수 있다. 일부 구현예에서, 종양 또는 암은 LILRB2를 발현시키거나 과발현시킨다.
- [0186] 특정 구현예에서, 이들 방법은 본 발명의 sdAb, CAR, 세포, 조성물 및 작제물의 치료적으로 유효량을 대상체 또는 환자에 투여하는 단계를 포함하거나, 대안적으로 이것들로 본질적으로 구성되거나, 더욱 추가로 이것들로 구성된다. 추가 양태에서, 환자는 이전에 진단에 의해 치료를 위해 선택되었으며, 가급적이면 종양이 LILRB2를 발현시키거나 과발현시키는지 여부를 평가하기 위해 선택되었다.
- [0187] 인간 LILRB2는 특히 암과 같은 질환 또는 장애의 치료에 적절한 표적이므로, 항-LILRB2 sdAb는 약물, 약제 또는 백신으로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 sdAb, CAR, 세포 또는 폴리펩타이드 작제물은 의약 또는 백신으로서 대상체의 질환, 장애, 또는 병태의 치료에서 약제 또는 백신의 제조에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 약제 또는 백신은 암을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0188] 일 구현예에서, 본 발명의 sdAb, CAR, 세포, 조성물 및 작제물은 LILRB2에 대한 HLAG 및/또는 ANGPTL2의 결합 억제에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 병리, 질환 및/또는 장애의 치료에서 사용을 위한 것이다. 따라서, 본 발명은 LILRB2에 대한 HLAG 및/또는 ANGPTL2의 결합 억제에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 병리, 질환 및/또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다.

- [0189] 본 발명은 또한 LILRB2 수용체와 관련된 장애 또는 질환을 앓고 있는 대상체의 치료 방법에 관한 것으로, 여기서 상기 방법은 본 발명에 따른 sdAb, CAR, 세포, 작제물 또는 약학적 조성물의 치료적으로 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0190] 특정한 구현예에서, 질환 또는 장애는 암, 바람직하게는 고형 종양, 더더욱 바람직하게는 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 췌장암, 췌장관 암종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 자궁내막암, 간세포성 암종, 흑색종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신경교종, 위암, 신장암, 고환암, 식도암, 자궁경부암, 마우스의 루이스 폐암(Lewis Lung cancer of mice), 백혈병, 갑상선암, 간암, 요로상피암 및 두경부암으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0191] 따라서, 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 대상체에서 종양의 성장의 억제 방법 및/또는 전이의 성장 및/또는 확산의 억제 방법에 관한 것이다. 종양은 고형 종양, 또는 액체 종양일 수 있다. 일부 구현예에서, 종양 또는 암은 LILRB2를 발현시키거나 과발현시킨다.
- [0192] 본원에 기재된 sdAb, CAR, 세포 또는 약학적 조성물은 예를 들어, 소형 분자, 방사선 요법, 화학요법, 수술, 특히 항암제를 포함하는 다른 치료제와 동시에 또는 후속적으로 투여될 수 있다. "항암"제는, 예를 들어, 암 세포 사멸, 암 세포내 세포자멸사 유도, 암 세포의 성장 속도 감소, 전이의 발생률 및 수 감소, 종양 크기 감소, 종양 성장 억제, 종양 또는 암 세포로의 혈액 공급 감소, 암 세포 또는 종양에 대한 면역 반응 촉진, 암의 진행 예방 또는 억제, 또는 암에 걸린 대상체의 수명 증가를 통해 대상체의 암에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다. 더욱 일반적으로, 이들 다른 조성물은 세포의 증식을 사멸 또는 억제시키는데 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다.
- [0193] 의학 분야에서 당업자에게 알려진 종래의 방법은, 치료되어야 하는 질환의 유형 또는 질환의 부위에 따라, 대상체에게 본원에 개시된 sdAb, 조성물, 작제물 또는 CAR을 투여하는데 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 종래의 경로, 예를 들면, 비경구 투여 (예를 들면 정맥내, 피하, 진피내, 또는 근육내 경로), 또는 경구, 비강 또는 폐 경로로 투여될 수 있다.
- [0194] **진단 및 예후에서의 용도**
- [0195] 단일-도메인 항체는 LILRB2의 정체를 위한 리간드로서 사용될 수 있다. 이들은 LILRB2 수용체의 결정화를 촉진시키기 위해 결정화 샤페론으로도 사용될 수 있다.
- [0196] 본 발명의 sdAb 및 폴리펩타이드는 세포 면역-염색에서, *생체내* 또는 *시험관내* 영상화에서 그리고 진단 목적으로 또한 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 LILRB2를 발현시키는 세포, 바람직하게는 LILRB2를 과발현시키는 세포, 예컨대 암 세포의 진단, 영상화 또는 치료하기 위한 사용을 위해 상기 기재된 대로 sdAb, 컨쥬게이트, 또는 조성물에 관한 것이다.
- [0197] 이들은 LILRB2 수용체를 표적하는 잠재적 약물의 식별, 스크리닝 또는 특성규명을 위한 시험관내 검증에서 생물학적 시약으로서, 예를 들면 테스트 화합물 또는 경쟁적 결합제로도 사용될 수 있다.
- [0198] 본원에 개시된 항-LILRB2 sdAb는, 예를 들면, 주어진 치료 요법의 효능을 결정하기 위해, *시험관내* 또는 *생체외* 뿐만 아니라 *생체내* 임상적 테스트 절차의 일부로서 조직 또는 세포에서 발현 LILRB2 수준을 모니터링하는데 진단적으로 사용될 수 있다.
- [0199] 본 개시내용의 검출 방법은, *시험관내* 또는 *생체외* 뿐만 아니라 *생체내*, 예를 들어 기관 또는 조직의 생검 후에 생물학적 샘플에서 발현 LILRB2의 수준을 검출하여 세포가 양성인지 테스트하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 sdAb에 의한 LILRB2의 검출을 위한 *시험관내* 또는 *생체외* 기법은 효소 결합된 면역흡착 검정 (ELISA), RIA, EIA 및 다른 "샌드위치 검정(sandwich assays)", 웨스턴 블랏(Western blots), 유세포 분석, 면역침전, 방사면역검정, 및 면역형광 (예를 들면, IHC)을 포함한다. 또한, LILRB2 폴리펩타이드의 검출을 위한 *생체내* 기법은 대상체에 표지화된 항-LILRB2 sdAb를 도입하는 단계를 포함한다. 본 발명의 sdAb에 의한 LILRB2의 검출을 위한 *생체내* 기법에서, sdAb는 대상체에서의 존재 및 위치가 표준 영상화 기법에 의해 검출될 수 있는 방사능 마커로 표지화될 수 있다.
- [0200] 본 발명은 대상체가 증가된 LILRB2 발현 또는 활성과 연관된 의학적 질환 또는 병태 (예를 들면, LILRB2를 과발현시키는 전암성 또는 양성 세포의 검출)가 발병할 위험이 있는지를 결정하기 위한 진단적, 예후적 또는 예측적 검정을 또한 제공한다. 그러한 검정은 LILRB2 발현 또는 과발현을 특징으로 하거나 이와 연관된 의학적 질환 또는 병태의 개시에 앞서 그것에 대하여 개체를 예방적으로 치료하기 위해 예후적 또는 예측적 목적으로 사용될

수 있다.

[0201] 본 발명은 진단적 예측적 또는 예측적 검정 방법을 또한 제공하고, 여기서 본 발명에 따른 sdAb는 항-LILRB2 sdAb를 사용한 치료에 적합한 대상체를 선택하는 데 사용되며, 예를 들면 여기서 LILRB2는 환자의 선택을 위한 바이오마커이며, LILRB2는 세포, 예컨대 종양성 세포에서 과발현되는 경우이다.

[0202] **키트**

[0203] 본원에 기재된 임의의 sdAb, 조성물, CAR, 세포, 벡터, 폴리펩타이드 또는 핵산 작제물은 본 발명에 의해 제공되는 키트에 포함될 수 있다.

[0204] 특정 구현예에서 키트는 예를 들어, 적당한 용기 수단, 세포, 완충액, 세포 배지, 벡터, 프라이머, 제한 효소, 염, 및 등등을 포함한다. 키트는 멸균된 약학적으로 허용가능한 완충제 및/또는 기타 희석제를 함유하기 위한 수단을 또한 포함할 수 있다.

[0205] 일부 구현예에서, 개체로부터 샘플을 채취하고/하거나 샘플을 검정하는 수단은 키트에 제공될 수 있다.

[0206] 일부 구현예에서, 키트는 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 추가 제제를 추가로 포함하고, 추가 제제는 sdAb, 조성물, CAR, 세포, 벡터, 폴리펩타이드 또는 핵산 작제물, 또는 본 발명의 키트의 다른 성분(component)과 조합될 수 있거나 키트에서 별도로 제공될 수 있다.

[0207] 본 발명의 일부 사례에서, 키트는 또한 예를 들어, 제2 암 요법, 예컨대 화학요법 및/또는 기타 면역요법을 포함한다. 키트(들)는 특정한 암, 예컨대 LILRB2를 발현시키거나 과발현시키는 암으로 맞춤화될 수 있다.

[0208] 용기는 단위 용량, 벌크 패키지 (예를 들면, 다중-용량 패키지) 또는 하위-단위 용량일 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명은 단일-용량 투여 단위를 위한 상기 정의된 바와 같은 키트에 관한 것이다. 본 발명의 키트는 건조된/동결건조된 이관능성 분자를 포함하는 제1 수령체 그리고 수성 제형을 포함하는 제2 수령체를 또한 함유할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 단일-챔버 및 사전-충전된 다중-챔버 주사기 (예를 들면, 액체 주사기 및 동결건조주사기)가 함유하는 키트가 제공된다. 본 발명의 키트는 적합한 패키징되어 있다. 적합한 패키징은 바이알, 병, 단지, 가요성 패키징 (예를 들면, 밀봉된 마일라(Mylar) 또는 플라스틱 백), 및 기타 등등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0209] 본원에 기재된 sdAb, 조성물, CAR, 세포, 벡터, 폴리펩타이드 또는 핵산 작제물의 용도에 관련된 사용설명서는 일반적으로 투약량, 투약 일정, 의도된 치료를 위한 투여의 경로, 또는 그러한 성분을 재구성 또는 희석하기 위한 수단에 관한 정보를 포함한다. 본 발명의 키트에서 공급된 사용설명서는 표지 또는 패키지 삽입물 (예를 들면, 진단지 또는 사용 설명서의 형태로 키트에 포함된 종이 시트)에 전형적으로 쓰여진 사용설명서이다. 일부 구현예에서, 키트는 본원에 기재된 임의의 방법에 따른 사용을 위한 사용설명서를 포함할 수 있다. 포함된 사용설명서는 특히 본원에 기재된 질환 예컨대 암의 치료의 맥락에서 본원에 기재된 sdAb, 조성물, CAR, 세포, 벡터, 폴리펩타이드 또는 핵산 작제물의 투여에 대한 설명을 포함할 수 있다. 키트는 개체가 LILRB2와 연관된 질환, 예를 들면, 본원에 기재된 것들을 갖는지에 대한 여부를 식별하는 것에 기반하여 치료에 적합한 개체를 선택하는 설명을 추가로 포함할 수 있다.

[0210] 본 발명의 다른 양태 및 이점은 하기 실시예를 고려할 때 명백해질 것이고, 이는 본질적으로 단지 예시일 뿐이고 본 출원의 범위를 제한하지 않는다.

[0211] **실시예**

[0212] **LILRB2-Fc-특이적 VHH의 식별.**

[0213] 알파카는 완전 프로인드 아쥘반트(Freund adjuvant)에서 LILRB2-Fc 단백질로 먼저 면역화하였고 후속적으로 불완전 프로인드 아쥘반트에서 LILRB2-Fc 단백질로 2회 부스팅하였다. 종래의 항체 서브클래스 (즉, IgG1), 및 VHH는 알파카 혈청으로부터 분획화하였다. 혈청은 연속해서 희석하였고 ELISA로 LILRB2-Fc 단백질에 대해 테스트하였다. 그 다음, B 림프구는 알파카로부터 정제하였고 3,5.10⁷ 클론을 함유하는 라이브러리를 획득하였다. LILRB2-Fc에 대한 디스플레이를 사용하는 바이오스페닝을 수행하였고 선택된 VHH에 대한 프리-플라스믹(pre-plasmic) (PE)-ELISA를 실행하였다. 400개 콜로니를 테스트하였고 LILRB2에 대한 130개 양성 클론을 식별하였으며, 이는 실선으로 원형화하였고 음성 클론은 점선으로 원형화하였다. (도 1). 모든 양성 클론을 서열분석하였고 12개 고유한 VHH 서열을 생성하고, 정제하였다.

[0214] Nb B8, C7 및 C9는 rhLILRB2의 선형 에피토프를 인식한다.

[0215] 본 발명자는 생성된 Nb가 LILRB1 수용체에 대한 임의의 교차-반응성 없이 LILRB2 수용체에 대해 특이적인지를 먼저 조사하였다. 이를 위해, 웨스턴 블랏팅을 환원 조건에서 수행하였다. 정제된 이량체성 rhLILRB2-Fc, 단량체성 rhLILRB2 및 단량체성 rhLILRB1 단백질을 사용하여 상이한 Nb의 항원 특이성을 비교하였다. Nb 특이성은 대조군 항체 H-300 (LILRB1, -2, -4, -5, -6에 특이적), 42D1 (LILRB2에 특이적), GHI/75 (LILRB1에 특이적) 및 HP-F1 (LILRB1에 특이적)에 대해 평가하였다. H-300 다클론성 항체 (LILRB1, -2, -4, -5 및 -6 단백질에 특이적)로 표지화된 막은 각각 rhLILRB2-Fc 및 rhLILRB2의 크기에 상응하는 대략 105kDa 및 77kDa에서 밴드를 보였다 (도 2). 42D1 단클론성 항체 (LILRB2-Fc 수용체에 특이적)로 인큐베이션된 막은 rhLILRB2-Fc의 크기에 상응하는 105kDa에서 고유 밴드를 디스플레이하고 77kDa에서는 밴드가 없었으며, 이는 42D1 mAb가 rhLILRB2를 인식하지 못함을 논증하였다. GHI/75 및 HP-F1 단클론성 항체로 인큐베이션된 막은 rhLILRB1의 크기에 상응하는 84kDa에서 밴드를 보였다. 15개 Nb 중에서, B8, C7 및 C9만이 rhLILRB2-Fc의 분자량에 상응하는 대략 105kDa에 밴드 (도 3) 그리고 또한 rhLILRB2의 D1 및 D2 도메인의 분자량에 상응하는 대략 77kDa에 밴드를 디스플레이하였다. 또한, B8 및 C7 Nb와의 인큐베이션은 대략 84kDa에 임의의 밴드를 드러내지 않았다. 이것은 B8 및 C7 Nb가 rhLILRB1에 결합하지 않음을 암시한다. 그러나, C9 Nb는 대략 84kDa에서 약한 밴드를 디스플레이하여, C9 특이성이 rhLILRB2 수용체에 완전히 제한되지 않음을 시사하였다. 종합하면, 이러한 데이터는 Nb가, Nb를 유도하는 데 사용된 면역원인 변성된 이량체성 LILRB2-Fc (D1-D2-Fc) 단백질, 뿐만 아니라 변성된 단량체성 LILRB2 (D1-D2-D3-D4 도메인) 단백질을 인식할 수 있음을 논증하였다. 웨스턴 블랏 실험의 경우, c-Myc \ll .9E10 \gg 순수한 (E-Bioscience, Ref 14-6784-82) 항체가 사용되었다.

[0216] LILRB2 형질도입된 D1.1 세포주에서 LILRB2 수용체에 대한 Nb 특이성.

[0217] 그 다음, 본 발명자는 수득된 Nb가 형태적 LILRB2 수용체에 결합할 수 있는지를 결정하고자 하였다. 본 발명자는 형태적 LILRB2 수용체에 대한 15개 Nb의 결합 특이성을 평가하였다. 이를 위해, 본 발명자는 Invectys에 의해 생성된 LILRB2-D1.1 형질도입된 세포주에 대한 Nb 특이성을 사정하였다. 이 목적을 위하여, LILRB2-D1.1 세포주를 Nb로 인큐베이션하였고 42D1 대조군 Ab와 비교하였다. 도 4에서 도시된 바와 같이, LILRB2-D1.1 세포의 62.6%는 42D1 대조군 Ab로 표지화하였다. 흥미롭게, LILRB2-D1.1 세포주의 93.2%, 76.4% 및 75.2%는 각각 B8, C9 및 C7 Nb에 의해 표지화된 (도 7) 반면, LILRB2-D1.1 세포주의 40% 미만은 다른 Nb 예컨대 A2에 의해 표지화되었다 (데이터 도시되지 않음). 본 발명자는 B8, C7 및 C9에 의해 인식된 에피토프가 42D1 대조군 항체 및 다른 Nb의 에피토프보다 더욱 접근가능함을 가정하였다. 유세포 분석을 위하여, Myc 태그 - Phycoerythrin (Abcam, Ref : ab72468)에 대한 마우스 단클론성 항체 [9E10]를 사용하였다.

[0218] 단핵구에 의해 발현된 LILRB2 수용체에 대한 Nb 특이성

[0219] 단핵구는 이의 표면에서 단량체성 또는 이량체성 LILRB2 수용체를 강하게 발현시키고 대식세포 LILRB2 발현을 연구하기 위한 관련 모델이다. 따라서, 본 발명자는 건강한 공여체 PBMC로부터 정제된 단핵구에 대한 항-LILRB2 Nb의 특이성을 사정하였다. 단핵구는 항-CD14, 항-LILRB1 Ab 및 항-LILRB2 Nb로 표지화함으로써 표현형화 (phenotyped)하였다. 단핵구의 38%는 42D1 대조군 Ab에 대하여 양성이고 5%는 무관한 Nb (예를 들면 ILT4가 아닌 항원에 대해 알파카에서 상승된 Nb)에 대하여 양성이었다. 항-LILRB2 Nb로, 단핵구의 50% 초과를 표지화하였다: A2 Nb의 경우 68.3%, B8 Nb의 경우 50.8%, C7 Nb의 경우 62%, C9 Nb의 경우 58.1%, D8 Nb의 경우 53.5%, G3 Nb의 경우 57% 및 G10 Nb의 경우 46.7% (도 5). 그러나, 단핵구는 D12, F5 및 H12 Nb에 대하여 음성이었다 (데이터 도시되지 않음). 통틀어, 본 발명자는 B8, C7 및 C9 Nb가 LILRB2 수용체 내에서 선형 에피토프에 대하여 단량체성 또는 이량체성에 대해 강하게 특이적임을 결정하였다. 시험관내 LILRB2-D1.1 생성된 세포주를 위한 또는 생체의 단핵구를 위한 LILRB2 에피토프의 접근가능성은 Nb보다 대조군 Ab 42D1에서 더욱 어려울 수 있다. 42D1 단클론성 Ab에 대하여 이러한 약한 결합은 항-LILRB2 Nb, 특히 B8, C7 및 C9 Nb에 영향을 미치지 않는 입체 장애와 관련된 가능성이 있다.

[0220] Nb 항-LILRB2는 LILRB2/HLA-G 상호작용을 억제시킨다.

[0221] LILRB2 수용체는 HLA-G 및 ANGPTL2와 상호작용하여 각각 면역 세포 반응을 억제시키고 종양 발달을 유도시킨다. 그런 다음, 본 발명자는 항-LILRB2가 면역 세포 기능을 회복하고 종양 성장을 예방하기 위해 이러한 상호작용을 차단할 수 있는지 여부를 조사하였다. LILRB2/HLA-G 상호작용의 억제를 연구하기 위해, 본 발명자는 Nb의 차단 능력을 평가하기 위하여 먼저 ELISA 검정을 설계하였다. 이 목적을 위하여, rhLILRB2-Fc 단백질은 Nb의 존재 여부에 관계없이 HLA-G6 단백질로 공-인큐베이션하기 전에 미량정량관 상에 코팅하였다. rh-LILRB2-Fc 수용체는 가용성 HLA-G6 아이소폼에 대하여 강한 친화성을 갖는다는 것이 논증되었다. 도 6에서 도시된 바와 같이, 아이

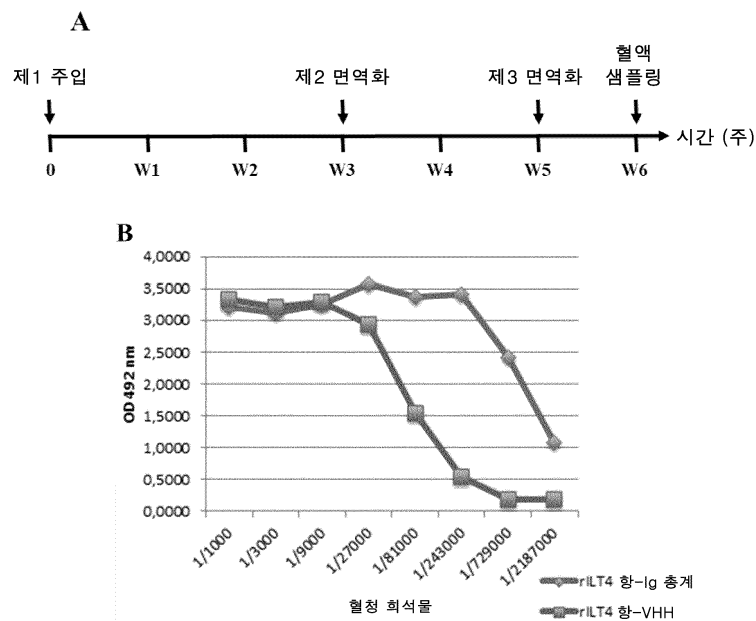
소타입 대조군 단클론성 항체는 HLA-G6/LILRB2 상호작용 (24%의 차단) 뿐만 아니라 차단된 것으로 보고되지 않았던 H-300 다클론성 항체 (26%의 차단)를 방해한다. 그러나, 항-LILRB2 단클론성 차단 항체 27D6은 HLA-G6과 LILRB2 수용체 사이의 상호작용 (100%의 차단)을 강하게 폐지하였다. 항-LILRB2 Nb와 관련하여, 본 발명자는 7개 Nb (A2, C7, C9, D8, E7, F5 및 G10)가 상호작용을 약하게 억제시키고 (<30%), 3개 Nb가 부분적 억제를 나타냄을 결정하였다: D12 (44.8%), G3 (39.4%) 및 H12 (50%)인 반면, B8 Nb는 HLA-G6/LILRB2 상호작용 (100%의 차단)을 완전히 억제시킨다.

[0222] B8 Nb는 LILRB2/ANGPTL2 상호작용을 부분적으로 억제시킨다

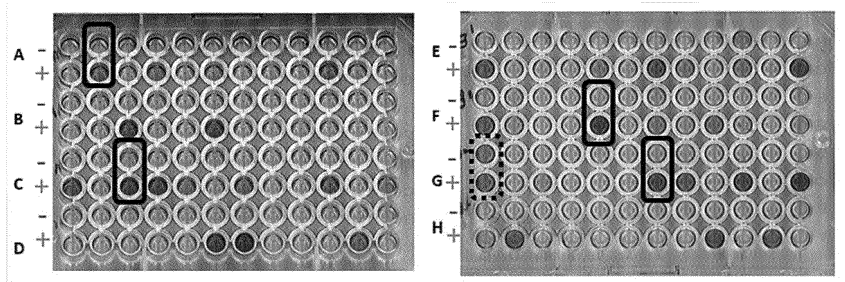
[0223] LILRB2/ANGPTL2 상호작용이 종양 발달을 촉진시킴이 논증되었다. 실제로, 암 세포에 의해 발현된 LILRB2 수용체와 자가분비 발현인 ANGPTL2 단백질 사이의 상호작용은 종양 증식, 종양 세포자멸사의 억제 및 종양 세포의 분화를 초래한다. 항-LILRB2 Nb가 이러한 상호작용을 차단할 수 있는지를 결정하기 위해, 본 발명자는 ELISA를 설정하여 rhLILRB2-Fc와 ANGPTL2 단백질 사이의 상호작용을 평가하였다. 이전에 기재된 바와 같이, rhLILRB2-Fc 단백질은 항-LILRB2 항체 또는 Nb의 존재 여부에 관계없이 rhANGPTL2로 공-인큐베이션되기 전에 미량정량관 상에 코팅되었다. 일부 Nb는 LILRB2/ANGPTL2 상호작용을 부분적으로 차단하였다 (<24% 결합의 억제) (데이터 도시되지 않음). B8 Nb는 Nb가 없는 대조군과 비교하여 이러한 상호작용을 강하게 차단한 (51.4% 결합의 억제) 반면, A2, H12 및 G10은 약한 차단 (각각 24%, 20% 및 8%)을 보였다 (도 7).

도면

도면1

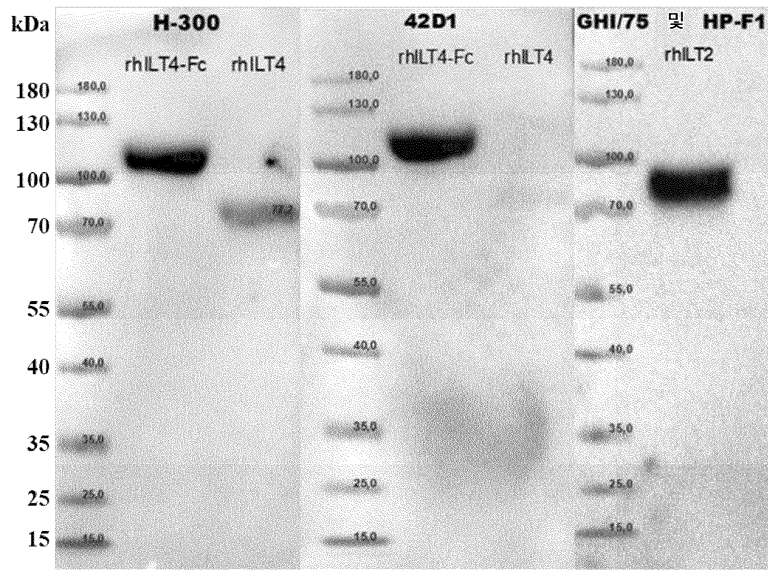


C (-) IgG1 (+) ILT4 1µg/ml

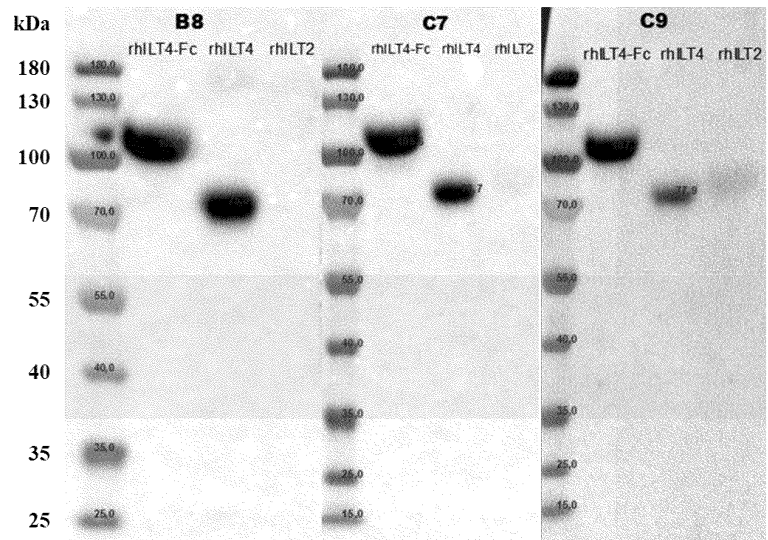


도면2

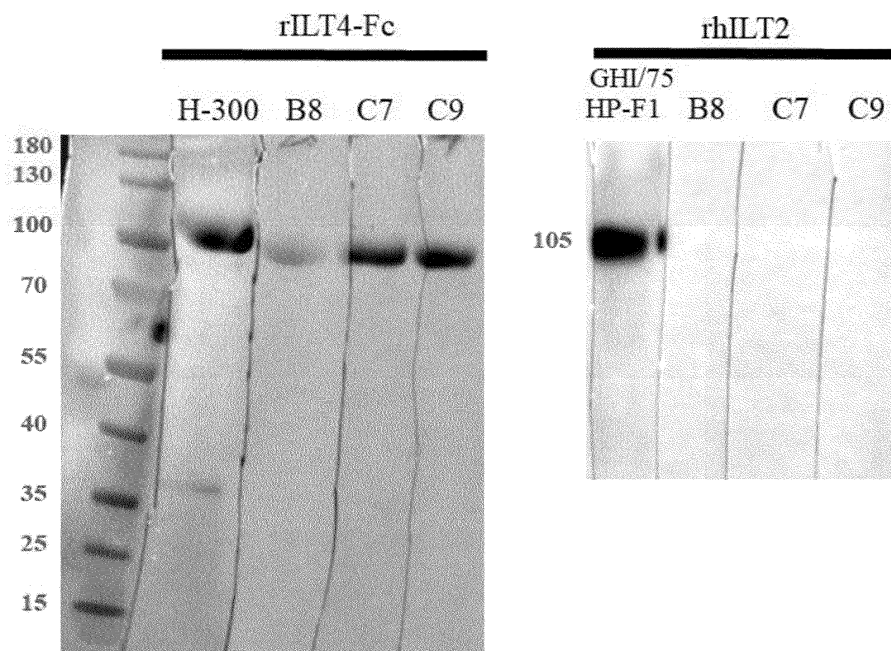
A



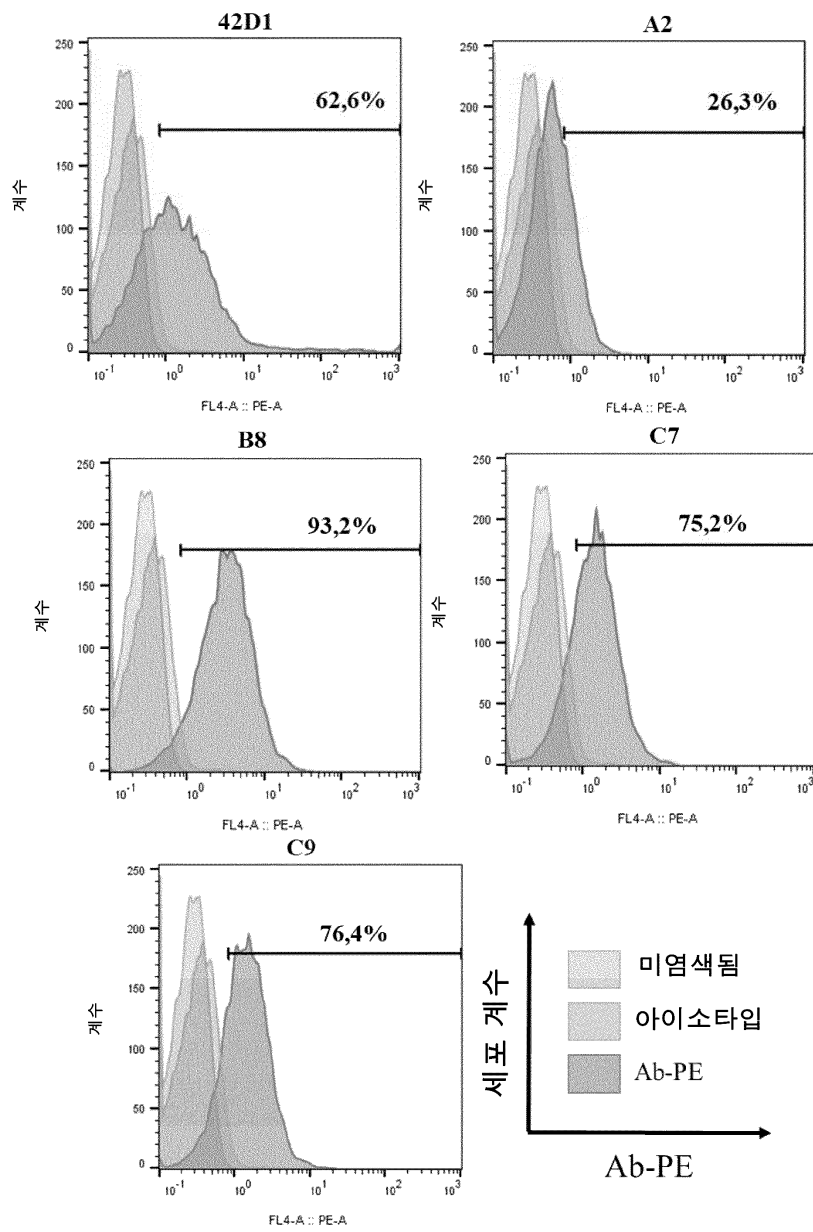
B



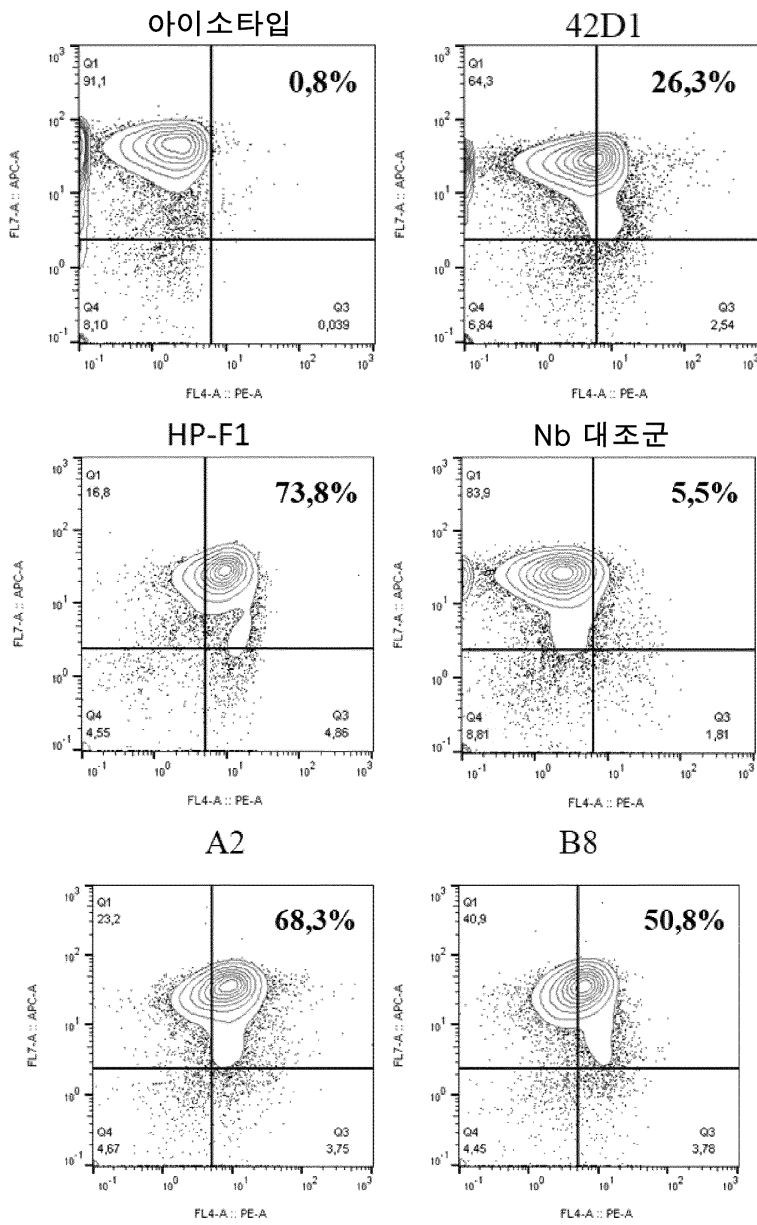
도면3



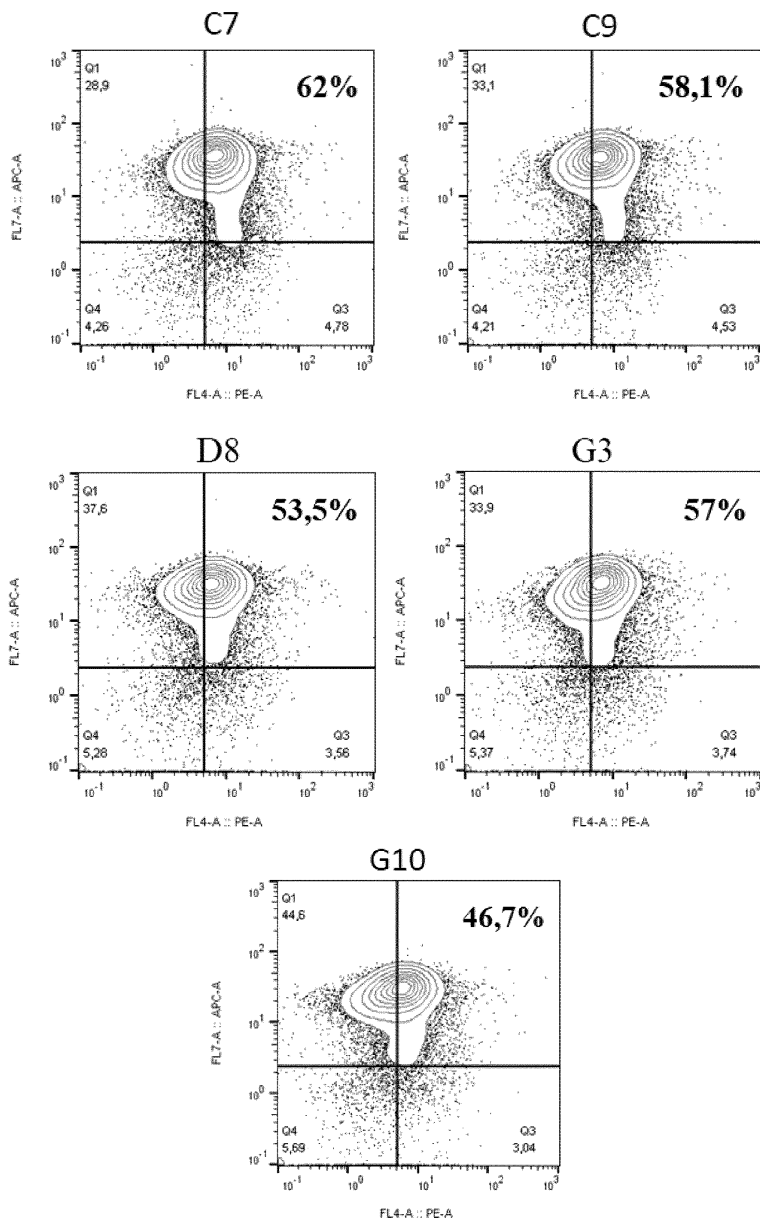
도면4



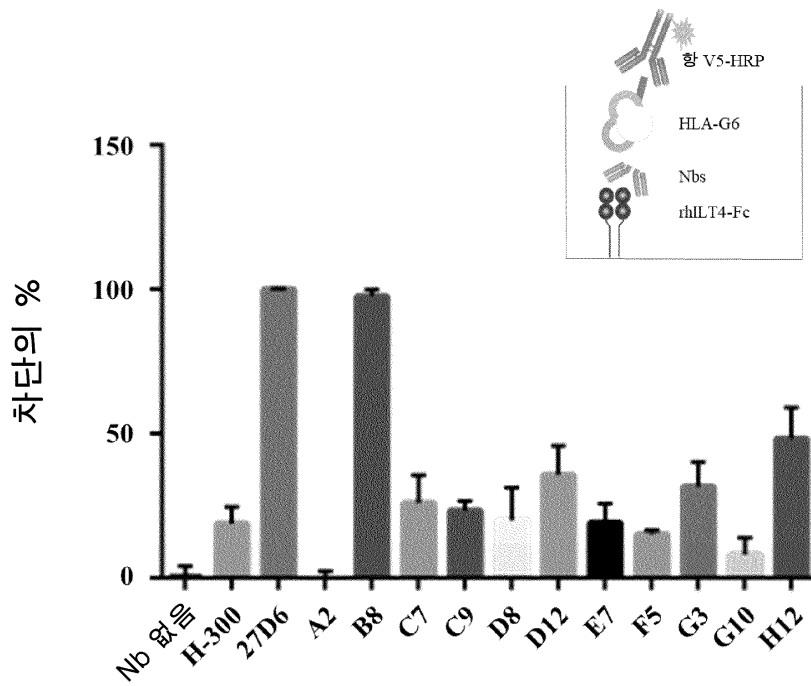
도면5a



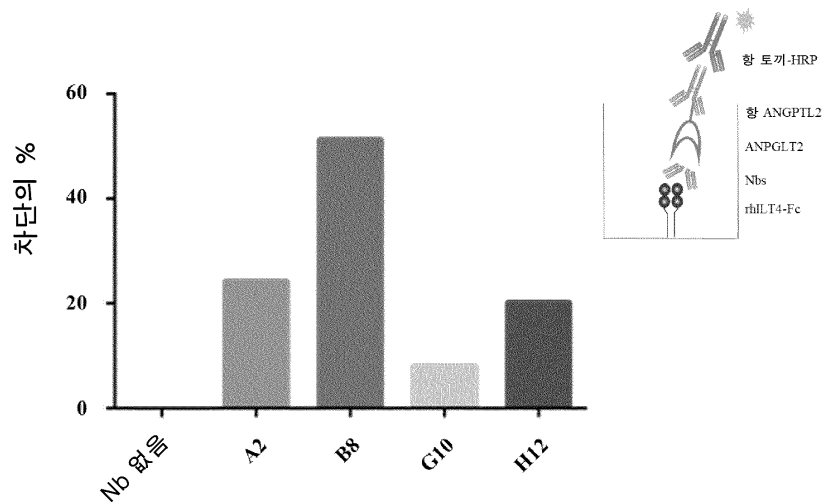
도면5b



도면6



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Inventys

<120> Single-domain antibodies directed against LILRB2

<130> B3095PC00

<160> 55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> ILT4-B8 CDR1
 <400> 1
 Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala
 1 5

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> ILT4-B8 CDR2
 <400> 2
 Ile Gly Asn Ser Gly Asp Ser Thr
 1 5

<210> 3
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> ILT4-B8 CDR3
 <400> 3
 Ala Ala Arg Lys Gly Phe Ala Ser Ser Cys His Gly Leu Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Tyr Asp Ser Asp Tyr Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr
 20 25

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> ILT4-C7 CDR1
 <400> 4
 Gly Phe Ala Leu Glu His Tyr Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-C7 CDR2

<400> 5

Ile Ser Asn Ser Gly His Thr Thr

1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-C7 CDR3

<400> 6

Ala Ala Thr Pro Arg Gly Trp Gly Leu Thr Ser Asn Gln Tyr Glu Tyr

1 5 10 15

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-C9 CDR1

<400> 7

Gly Arg Thr Leu Asn Gly Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-C9 CDR2

<400> 8

Ile Arg Ala Ile Asp Gly Ser Thr

1 5

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-C9 CDR3

<400> 9

Ala Ala Arg Leu Arg Val Ser Asn Gly Asn Ala Trp Ser Ser Ser Ser

1 5 10 15

Tyr Leu His

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-A2 CDR1

<400> 10

Gly Phe Asn Val Asn Ala Tyr His

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-A2 CDR2

<400> 11

Ile Ser Ser Asp His Ser Thr

1 5

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-A2 CDR3

<400> 12

Ala Ala Thr Ala Asn Gln Leu Trp Gln Val Trp Met Gly Ile Thr Ser

1 5 10 15

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-D8 CDR1

<

<400> 13

Gly Leu Thr Ser Arg Pro Tyr Tyr

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-D8 CDR2

<400> 14

Ile Ser Ser Arg Glu Gly Ser Thr

1 5

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-D8 CDR3

<400> 15

Ala Gly Arg Tyr Ser Thr Cys Ser Gly Met Ala Arg Asp Tyr Asn Tyr

1 5 10 15

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-D12 CDR1

<400> 16

Gly Phe Thr Leu Asp His Tyr Ala

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-D12 CDR2

<400> 17

Ile Asn Val Asn Arg Gly Thr Ser

1 5

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-D12 CDR3

<400> 18

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

1 5 10 15

Gln Asn Tyr Gly Met Asp Tyr

20

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-E7 CDR1

<400> 19

Gly Ser Thr Ser Arg His Tyr Tyr

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-E7 CDR2

<400> 20

Ile Thr Ser Arg Glu Gly Ser Thr

1 5

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-E7 CDR3

<400> 21

Ala Ala Arg Tyr Ser Ser Cys Ser Gly Met Pro Ser Asp Tyr Asn Tyr

1 5 10 15

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-F5 CDR1

<400> 22

Gly Phe Asn Val Asn Ala Tyr His

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-F5 CDR2

<400> 23

Ile Ser Ser Asp Arg Glu Thr

1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-F5 CDR3

<400> 24

Ala Ala Thr Ala Asn Gln Leu Trp Arg Leu Trp Met Gly Ile Ser Ser

1 5 10 15

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-G3 CDR1

<400> 25

Gly Phe Thr Ser Arg His Tyr Tyr

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-G3 CDR2

<400> 26

Ile Ser Ser Arg Glu Gly Ser Thr

1 5

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-G3 CDR3

<400> 27

Ala Gly Arg Tyr Ser Ser Cys Ser Gly Met Pro Arg Asp Tyr Asn Tyr

1 5 10 15

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-G10 CDR1

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Phe Ala Tyr Thr

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> ILT4-G10 CDR2

<400> 29

Ile Asp Trp Thr Gly Ser Ser Ser

1 5
<210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> ILT4-G10 CDR3
<400> 30
Ala Thr Leu Cys Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Arg Pro Ile Ile Ala

1 5 10 15
Asp Gly Gly Val
 20
<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> ILT4-H12 CDR1
<400> 31
Gly Phe Thr Leu Asp Ser Tyr Ala

1 5
<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> ILT4-H12 CDR2
<400> 32
Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr

1 5
<210> 33
<211> 21
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> ILT4-H12 CDR3
<400> 33

Ala Ala Leu Arg Glu Gly Ser Tyr Tyr Pro Asp Asp Asp Ala Cys Arg
 1 5 10 15

Asp Gly Met Asp Tyr
 20

<210> 34

<211> 134

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> >ILT4-B8

<400> 34

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

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

Ala Ile Ser Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ser Cys Ile Gly Asn Ser Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Glu Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Arg Lys Gly Phe Ala Ser Ser Cys His Gly Leu Gly Ala Ala
 100 105 110

Tyr Asp Ser Asp Tyr Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Gln Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 35

<211> 125

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> >ILT4-C7

<400> 35

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

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

His Tyr Ser Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 35 40 45

Gly Val Ser Cys Ile Ser Asn Ser Gly His Thr Thr Lys Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Ala Thr Pro Arg Gly Trp Gly Leu Thr Ser Asn Gln Tyr
 100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 36

<211> 126

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> >ILT4-C9

<400> 36

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Arg Leu Arg Val Ser Asn Gly Asn Ala Trp Ser Ser Ser Ser

100 105 110

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

115 120 125

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> ILT4-A2

<400> 37

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Asn Ala Tyr

20 25 30

His Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ser Phe Ile Ser Ser Asp His Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Gln Leu Trp Gln Val Trp Met Gly Ile Thr Ser Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 38

<211> 123

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> >ILT4-D8

<400> 38

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Arg Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Ser Met Phe Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Gly Arg Tyr Ser Thr Cys Ser Gly Met Ala Arg Asp Tyr Asn Tyr

 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 39

<211> 130

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> >ILT4-D12

<400> 39

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp His Tyr

 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Lys Arg Glu Gly Val

 35 40 45

Ser Cys Ile Asn Val Asn Arg Gly Thr Ser Ala Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ser Ser

130

<210> 40

<211> 123

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> > ILT4-E7

<400> 40

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Ser Arg His Tyr

20 25 30

Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ser Cys Ile Thr Ser Arg Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Met Phe Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Arg Tyr Ser Ser Cys Ser Gly Met Pro Ser Asp Tyr Asn Tyr

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

Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ser Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Leu
 35 40 45

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

Gln Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Met Phe Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Gly Arg Tyr Ser Ser Cys Ser Gly Met Pro Arg Asp Tyr Asn Tyr
 100 105 110

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

<210> 43

<211> 127

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> >ILT4-G10

<400> 43

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Thr Leu Cys Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Arg Pro Ile Ile Ala
 100 105 110

Asp Gly Gly Val Trp Ser Gln Val Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 44

<211> 128

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> >ILT4-H12

<400> 44

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

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

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

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ser Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Leu Arg Glu Gly Ser Tyr Tyr Pro Asp Asp Asp Ala Cys Arg
 100 105 110

Asp Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 45

<211> 402

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> >ILT4-B8

<400> 45

gaggtgcagc tggttagtc ggggggaggt ttggtgcagc ctgggggctc tctgagactc 60

tctgtgtag cctctggatt cactttgat tattatgcca taagctggtt ccgccgggcc 120

ccaggaagg agcgtgaggg tgtctcatgt attgtaata gtggtgatag cacaaactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtttat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggaa acagccgttt attactgcgc agcgcgaaaa 300

gggttcgcta gttcctgca cggcctcggg gctgcatacg atagtgacta tgaatcgttg 360

tatgactact ggggccaggg gaccaggctc accgtctcct ca 402

<210> 46

<211> 370

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> >ILT4-C7

<400> 46

tcaggtgcag ctctggagt cggggggagg ctggtgcag cctggggggt ctctgagact 60

ctctgtgca gcctctggat tcgctttgga acattattcc ataggctggt tccgccaggc 120

cccaggaag gagcgtgagg ggtctcatg tattagtaat agtgggcata ccacaaagta 180

tcagactcc gtgaagggcc gattcacctc ctccagagac aacgccaaga acacggtgta 240

tctgcaaatg aacagcctga agcctgagga cacagccgtt tattactgtg cagcgacacc 300

aaggggttgg ggcctaactg cgaatcagta tgaatactgg ggccagggga cccaggtcac 360

cgtctcatca 370

<210> 47

<211> 378

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> >ILT4-C9

<400> 47

gaggtgcagc tggttagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tctgtgcag cctctggacg caccetcaat ggttatacca ctggctggtt ccgccaggct 120

ccaggaagg agcgcgagtt ttagccact attcgcgca ttgatggtag cacatcctat 180

gcagactccg tgatgggccg attcaccatc tccagagaca acgcaaaaa tacgtctat 240

cttgaatga acagactgaa acctgaggac tcggccctgt attattgtgc ggccggctc 300

agagtgagca atggtaacgc atggcatca tctagctatc tccactgggg ccgggggacc 360

caggtcaccg tctcctca 378

<210> 48

<211> 361

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> ILT4-A2

<400> 48

tcagttgagc ctctggagt ctgggggagg ctggtgcag cctgggggt ctctgagact 60

ctctgtgca gcctctggat tcaactgaa tgcttatcac ataggctggt tccgccaggc 120

cccaggaaag gacgctgagg gggctctcatt cattagtagt gatcatagca caaactatgc 180

agactccgtg aaggacgat tcacatctc cagagacagc ggtacggtgt atctgcaaat 240

gaacagactg aaacctgagg acacagccac ttactattgt gcagcaaccg ccaatcaact 300

gtggcaagta tggatgggca ttactctctg gggccagggg acccaggtca cegtctctc 360

g 361

<210> 49

<211> 370

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> >ILT4-D8

<400> 49

tcagttgagc ctctggagt cggggggagg ctggtgcag cctgggggt ctctgagact 60

ctctgtgca gcctctggat tgacttcgcg cccttattac ataggttggt ttcgccagtc 120

cccagggaag gacgctgagg gactctcatg tattagtagt agggaagta gcacaaacta 180

cgcagactcc gtgaaggatc gattcacat ctccagagat aacgctcaga gtatgtttta 240

tctgcaaatg aacagcctga aatctgagga cacagccgtt tattactgtg caggacgtta 300

ttcgacatgt tcaggaatgg cccgcgatta taactactgg ggtcagggga cccaggtcac 360

cgtctcctca 370

<210> 50

<211> 390

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> > ILT4-D12

<400> 50

gaggtgcagc tggttagatc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttggat cattatgcca taggctggtt cgccaggcc 120
 ccaggcgaaa agcgtgaagg cgtctcatgt attaatgtta atcgttggtac ctccgcctat 180

gcagactccg tgaaggcccg ttccaccatc tcgagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
 ctgcaaatgg acaacctgag acctgaggac acagccgttt attactgtgc agccctactc 300
 gagggggcct caggcgatgt gtgtgatgac gtcaatcaaa actacggcat ggactactgg 360
 ggcaaaggga ccctggtcac cgtctcctca 390

<210> 51

<211> 369

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> > ILT4-E7

<400> 51

gaggtgcagc tggttgatc ggggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatc gacttcgcgc cattattaca taggctggtt cgccaggcc 120

ccaggaaagg agcgtgaagg tgtctcatgt attactagta gggaaggtag cacaaactac 180
 gcagactccg tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca acgctcagaa tatgttttat 240
 ttgcaaatga acagcctgaa atctgaggac acagccgttt attactgtgc agcacgttat 300
 tcgagtgtt caggaatgcc ctacagattat aactactggg gtcgggggac ccaggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 52

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> > ILT4-F5

<400> 52

gaggtgcagc tggttagatc ggggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caacgtgaat gcttatcaca taggctggtt cgccaggcc 120
 ccaggagagg agcgtgaagg ggtctcattc attagtagtg atcgtgagac aaactatgca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacagcg ccaagaacac ggtgtatctg 240

caaatgaaca gactgaaacc tgaggacaca gccgtttatt actgtgcagc aaccgccaat 300
 caactgtggc gactatggat gggcattagt tcttggggcc aggggaccca ggtcacctgc 360
 tctca 366

<210> 53

<211> 369

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> > ILT4-G3

<400> 53

gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt cacttcgcgc cattattaca taggttggtt tcgccagtcc 120
 ccaggaagg agcgtgaggg gctctcatgt attagtagta ggggaagtag cacaaactac 180
 gcagactccg tacaggaccg attcaccatc tccagagaca acactcagaa tatgttttat 240
 ttgcaaatga acagcctgaa atctgaggac acagccgttt attactgtgc aggacgttat 300
 tcgagttgtt caggaatgcc ccgggattat aactactggg gtcgggggac ccaggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 54

<211> 381

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> >ILT4-G10

<400> 54

caggtgcagc tcgtggagtc cgggggaggc ttggtgcacc ctggggggtc tctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt cacttttttt gcgtatacca tgggctggtt ccgccaggct 120
 ccaggaagg agcgtgaggt tctctcaggt attgactgga ccgggagtag ctcaaactat 180
 gcagactccg tgaggggccc attcaccatc tccagacaca acgccaagaa tacgctgtat 240
 ctacaaatga acagcctgaa acctgacgac acggccgtgt attactgtgc gacactttgt 300
 tctctactgt tacgggtcgc gcggccaatt attgctgatg ggggagtttg gagccaggtg 360

accaggtca ccgtctcctc a 381

<210> 55

<211> 384

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> >ILT4-H12

<400> 55

gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttggat tcatatgccg taggctggtt cgccaggcc 120

ccagggaagg agcgtgaggg agtctcatgt attagtagta gtggtggtag cacacactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgggtgat 240

ctgcaaatga gcagcctgaa acctgaggac acagccagtt attactgtgc agcacttcgc 300

gaaggttctt aciatcccga cgatgacgcg tgcgtgacg gcatggacta ctggggcaaa 360

gggaccagg tcaccgtctc ctca 384