

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0044221
(43) 공개일자 2021년04월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/70503 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7004309
(22) 출원일자(국제) 2019년07월11일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년02월10일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2019/050782
(87) 국제공개번호 WO 2020/012485
국제공개일자 2020년01월16일
- (30) 우선권주장
62/696,365 2018년07월11일 미국(US)
62/786,599 2018년12월31일 미국(US)

- (71) 출원인
카 메디컬 리미티드
이스라엘 예루살렘 9109701 키르야트 하다사 1 체
이비피 빌딩 피오박스 9779
- (72) 발명자
페커, 이리스
이스라엘 7520318 리손 레지온 하샤케드 스트리트
8
블로크, 이타이
이스라엘 1383000 모샤브 라모트 나프탈리 피.오.
박스 173
- (74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질 및 이의 사용 방법**(57) 요약**

PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질이 제공된다. 또한, PD1 변이체 또는 4-1BBL 변이체를 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다. 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 핵산 작제물, 이를 발현하는 숙주 세포 및 이들의 사용 방법도 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/21 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질(fusion protein)로서, 상기 PD1 아미노산 서열은:

(a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절(segment) P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 것이고; 및/또는

(b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 및/또는

상기 4-1BBL 아미노산 서열은:

(aa) 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 것이거나, 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 123과 적어도 80%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이고; 및/또는

(bb) 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복(three repeats)을 포함하고;

상기 융합 단백질은 하기:

(i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;

(ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는

(iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극(co-stimulating)함;

중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 2

PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 PD1 아미노산 서열은:

(a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 및/또는

(b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 및/또는

상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 융합 단백질은 하기:

(i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;

(ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는

(iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;

중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 3

PD1 아미노산 서열 및 4-1BB 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BB 융합 단백질로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 및/또는 상기 4-1BB 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 융합 단백질은 하기:

- (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;

중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BB 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BB 융합 단백질.

청구항 4

PD1과 4-1BB 사이에 $(GGGGG)_n$ ($n=1$ 내지 4) 링커(linker)를 포함하는 PD1-4-1BB 융합 단백질로서, 상기 융합 단백질은 하기:

- (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;

중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1-4-1BB 융합 단백질.

청구항 5

PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드(isolated polypeptide)로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 것이고; 임의로 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 6

PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 임의로 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 7

PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 8

4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 것이고; 임의로 상기 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 하기:

- (i) 4-1BB를 결합함;
- (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;

중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 9

4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 폴리펩타이드는 하기:

- (i) 4-1BB를 결합함;
- (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;

중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열이 140개 이하의 길이의 아미노산들인 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제7항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1 아미노산 서열이 적어도 126개 길이의 아미노산들인 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 12

제1항, 제5항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1 아미노산 서열이 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 또는 서열번호 115를 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 13

제1항, 제2항, 제4항 내지 제6항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1 아미노산 서열이 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 14

제1항, 제5항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1 아미노산 서열이 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 또는 서열번호 115로 구성되는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 15

제1항, 제2항, 제4항 내지 제6항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1 아미노산 서열이 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95로 구성되는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 16

제1항, 제2항, 제4항 및 제8항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 잔기 A1 내지 V6 또는 A1 내지 G14 중 어느 것도 포함하지 않는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 17

제1항, 제2항, 제4항 및 제8항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열이 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25를 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 18

제1항 내지 제4항 및 제8항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열이 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25로 구성되는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 19

제1항 내지 제3항 및 제10항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 상기 PD1과 4-1BBL 사이에 링커를 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 20

제1항, 제8항 및 제10항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복 각각 사이에 링커를 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 링커가 단일 아미노산 링커인 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 링커가 글리신인 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 링커가 항체 또는 이의 단편의 Fc 도메인(domain)인 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 24

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 링커가 (GGGS)_n(n=1 내지 4)링커인 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 25

제1항 내지 제4항 및 제10항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 생산 수율보다 적어도 1.5배 더 높고, 상기 생산 조건은 포유동물 세포에서의 발현 및 5 내지 13일 동안 32°C 내지 37°C, 5% 내지 10%의 CO₂에서의 배양을 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 26

제1항 내지 제4항 및 제10항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질의 응집체의 양은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 응집체의 양보다 적어도 20% 더 적고, 상기 응집체는 분자량이 적어도 300kDa이며, 상기 생산 조건은 포유동물 세포에서의 발현 및 5 내지 13일 동안 32℃ 내지 37℃, 5% 내지 10%의 CO₂에서의 배양을 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 27

제1항, 제19항, 제25항 및 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열이 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107, 서열번호 111, 서열번호 113, 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 28

제1항 내지 제8항 및 제10항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 80%의 동일성이 적어도 90%의 동일성을 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 29

제1항 내지 제8항 및 제10항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 80%의 동일성이 적어도 95%의 동일성을 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 30

제1항, 제10항 내지 제19항 및 제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열이 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107, 서열번호 111, 서열번호 113, 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 31

제1항, 제10항 내지 제19항 및 제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107, 서열번호 111, 서열번호 113, 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어지는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드를 암호화하는, 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide).

청구항 33

제32항의 폴리뉴클레오타이드, 및 숙주 세포에서의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소를 포함하는, 핵산 작제물(nucleic acid construct).

청구항 34

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 제32항 또는 제33항의 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 35

PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 폴리펩타이드를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 숙주 세포에서 제32항 또는 제33항의 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물을 발현시키는 단계를 포함하는, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 폴

리펩타이드를 생산하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 융합 단백질 또는 상기 폴리펩타이드를 분리하는 단계를 포함하는, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 폴리펩타이드를 생산하는 방법.

청구항 37

면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법으로서, 치료를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 분리된 폴리펩타이드, 제32항 또는 제33항의 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물, 또는 제34항의 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하는 것인, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 질환을 치료하기 위해 상기 대상체에게 치료학적 제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법.

청구항 39

면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는데 사용하기 위한, 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 분리된 폴리펩타이드, 제32항 또는 제33항의 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물 또는 제34항의 숙주 세포.

청구항 40

제39항에 기재된 용도에 사용하기 위한 조성물로서, 상기 질환을 치료하기 위한 치료학적 제제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 41

면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하기 위한 치료학적 제제를 패키징하는 패키징 재료; 및 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 분리된 폴리펩타이드, 제32항 및 제33항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물 또는 제34항의 숙주 세포를 포함하는, 제조 물품.

청구항 42

제37항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환의 세포들이 PDL1을 발현하는 것인, 방법, 용도에 사용하기 위한 조성물 또는 제조 물품.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환이 과다-증식성(hyper-proliferative) 질환을 포함하는 것인, 방법, 용도에 사용하기 위한 조성물 또는 제조 물품.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 과다-증식성 질환이 암을 포함하는 것인, 방법, 용도에 사용하기 위한 조성물 또는 제조 물품.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 암이 림프종, 백혈병 및 암종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 방법, 용도에 사용하기 위한 조성물 또는 제조 물품.

청구항 46

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환이 면역 억제 또는 투약(medication) 유도된 면역 억제 또는 감염과 관련된 질환을 포함하는 것인, 방법, 용도에 사용하기 위한 조성물 또는 제조 물품.

청구항 47

면역 세포를 활성화하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드, 제32항 및 제33항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 또는 제34항의 숙주 세포의 존재시에 면역 세포를 시험관내(in-vitro) 활성화하는 단계를 포함하는 것인, 면역 세포를 활성화하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 활성화가 PDL1 또는 외인성 PDL1을 발현하는 세포의 존재시에 이루어지는 것인, 면역 세포를 활성화하는 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 활성화가 항암제의 존재시에 이루어지는 것인, 면역 세포를 활성화하는 방법.

청구항 50

제38항, 제40항 내지 제46항 및 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환을 치료하기 위한 상기 치료학적 제제 또는 항암제가 항체를 포함하는 것인, 방법, 용도에 사용하기 위한 조성물 또는 제조 물품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2018년 7월 11일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/696,365호 및 2018년 12월 31일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/786,599호의 35 USC § 119(e) 하에 우선권의 이익을 주장하고, 이의 전문은 본원에 참조에 의해 포함된다.

[0003] 서열목록 보고

[0004] 본 출원의 제출과 동시에 제출된, 2019년 7월 7일에 생성된 268킬로바이트의 76050SequenceListing.txt라는 명칭의 ASCII 파일은 본원에 참조에 의해 포함된다.

배경 기술

[0005] 본 발명의 배경

[0006] 본 발명은 이의 몇몇 실시형태들에서 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0007] 현재 당해 분야에 이-기능성(bi-functional) 융합 단백질로서 공지되어 있는, 신호-변환-단백질(SCP: Signal-Converting-Protein)로서도 공지되어 있는 이중 신호전달 단백질(DSP: Dual Signaling Protein)은 I형 막(membrane) 단백질의 세포의 부분(세포외 아미노-말단)을 II형 막 단백질의 세포의 부분(세포외 카르복실-말단)에 연결하여 2개의 활성 측들과의 융합 단백질을 형성한다(예를 들면, 미국 특허 제7,569,663호 및 제 8,039,437호를 참조한다).

[0008] PD1은 면역글로불린 상과(super family)의 표면 공동-억제(co-inhibitory) 수용체이다. PD1은 T 세포, B 세포, 단핵구, 자연 살해 세포, 수지상 세포 및 다수의 종양-침윤 림프구(TIL: tumor-infiltrating lymphocyte) 상에서 발현된다. PD1은 2개의 리간드(ligand): PDL1(B7H1; CD274로서도 칭함) 및 PDL2(B7DC; CD273)를 갖고, 이들은 둘 다 공동-억제성이다. PDL1은 휴지(resting) 및 활성화된 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 대식세포, 혈관 내피 세포 및 채장 섬 세포 상에서 발현된다. PDL1은 또한 각종 유형의 암, 특히 NSCLC, 흑색종, 신장 세포 암종, 위암, 간세포뿐만 아니라 피부 및 각종 백혈병 암, 및 다발성 골수종 등에서 발현되는 것으로 공지되어 있다. PDL2 발현은 대식세포 및 수지상 세포 상에서만 나타나고 종양 유형 전반에 걸쳐 PDL1 보다 훨씬 덜 우세하다. PDL1의 발현은 사이토카인 IL-10 및 IL-4뿐만 아니라 I형 및 II형 IFN- γ , TNF- α , LPS, GM-CSF 및 VEGF를 포함하는 다수의 염증촉진성(proinflammatory) 분자에 의해 유도되고, IFN- γ 가 가장 강력한 유도물질(inducer)이다. 종양 미세-환경(mirco-environment)은 PDL1 발현을 상향조절하여 면역 억제를 촉

진한다. 면역 공격에 대한 반응으로, 암 세포는 T 세포 상의 PD1 수용체에 결합하는 PDL1을 과발현하여 T-세포의 활성화를 억제함으로써 T-세포 공격을 억제하고 중앙 면역 회피(immune escape)를 유도한다. PD1/PDL1 경로는 몇몇의 메커니즘들에 의해 면역 억제를 조절한다:

[0009] ● 활성화된 T 세포의 아포토시스(apoptosis)를 유도함;

[0010] ● 세포독성 T 림프구(CTL-CD8) 활성을 저지함;

[0011] ● T 세포의 증식을 억제함;

[0012] ● T 세포 아네르기(anergy) 및 탈진(exhaustion)을 촉진함;

[0013] ● 조절 T 세포의 기능을 향상시킴; 그리고

[0014] ● 손상된 T 세포 활성화 및 IL-2 생산을 저지함.

[0015] 4-1BBL은 TNF 수용체 상과의 구성원 및 강력한 활성화-유도된 T 세포 공동자극 분자인 4-1BB 수용체(CD137)의 활성화 리간드이다. 4-1BBL은 자연적으로 동종-삼량체(homo-trimer)를 형성하지만 4-1BB를 통한 신호전달은 4-1BBL의 상당한 올리고머화(oligomerization)를 요구한다. 4-1BBL은 수지상 세포(DC), B 세포 및 대식세포를 포함하는 각종 항원 제시 세포(APC: antigen presenting cell) 상에 존재한다. 4-1BB 수용체는 휴지 T 세포 또는 T 세포주에서 검출되지 않지만(< 3%), 4-1BB는 T 세포가 활성화되는 경우에 안정하게 상향조절된다. 4-1BB 활성화는 생존 유전자를 상향조절하고, 세포 분열을 강화하고, 사이토카인 생산을 유도하고, T-세포에서 활성화 유도된 세포 사멸을 방지한다.

[0016] 추가의 배경 기술로는 하기가 포함된다:

[0017] Maute et al. PNAS, 2015 Nov 24;112(47):E6506-14;

[0018] 국제 특허 출원 공개 제WO 2018053885호;

[0019] 국제 특허 출원 공개 제WO 2018032793호;

[0020] 국제 특허 출원 공개 제WO 2018006881호;

[0021] 국제 특허 출원 공개 제WO 2013144704호;

[0022] 국제 특허 출원 공개 제WO 2016022994호;

[0023] 국제 특허 출원 공개 제WO 2010027828호;

[0024] 국제 특허 출원 공개 제WO 2018085358호;

[0025] 중국 특허 출원 공개 제CN 10785781호9;

[0026] 국제 특허 출원 공개 제WO 2017194641호;

[0027] 국제 특허 출원 공개 제WO 2014180288호;

[0028] 국제 특허 출원 공개 제WO 2017059168호;

[0029] 국제 특허 출원 공개 제WO 2001/049318호;

[0030] 국제 특허 출원 공개 제WO 2016/139668호;

[0031] 국제 특허 출원 공개 제WO 2014/106839호;

[0032] 국제 특허 출원 공개 제WO 2012/042480호;

[0033] 미국 특허 출원 공개 제20150183881호;

[0034] 미국 특허 출원 공개 제US20070110746호;

[0035] 미국 특허 출원 공개 제US20070036783; 및

[0036] 미국 특허 제US9562087호.

발명의 내용

- [0037] 본 발명의 요약
- [0038] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 PD1 아미노산 서열은:
- [0039] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절(segment) P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 것이고; 및/또는
- [0040] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하고; 및/또는
- [0041] 상기 4-1BBL 아미노산 서열은:
- [0042] (aa) 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 것이거나, 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 123과 적어도 80%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0043] (bb) 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하고;
- [0044] 상기 융합 단백질은 하기:
- [0045] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- [0046] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0047] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함
- [0048] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질이 제공된다.
- [0049] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 PD1 아미노산 서열은:
- [0050] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 및/또는
- [0051] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 및/또는
- [0052] 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 융합 단백질은 하기:
- [0053] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- [0054] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0055] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0056] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질이 제공된다.
- [0057] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 및/또는 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적

어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 융합 단백질은 하기:

- [0058] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- [0059] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0060] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0061] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질이 제공된다.
- [0062] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 상기 PD1과 상기 4-1BBL 사이에 (GGGG)_n(n=1 내지 4) 링커(linker)를 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 융합 단백질은 하기:
- [0063] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- [0064] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0065] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0066] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질이 제공된다.
- [0067] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145와 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0068] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145를 포함한다.
- [0069] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145로 이루어진다.
- [0070] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 것이고; 임의로 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0071] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 임의로 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0072] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0073] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절

A1 내지 E23을 포함하지 않는 것이고; 임의로 상기 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 하기:

- [0074] (i) 4-1BB를 결합함;
- [0075] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0076] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0077] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0078] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 폴리펩타이드는 하기:
- [0079] (i) 4-1BB를 결합함;
- [0080] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0081] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0082] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0083] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 140개 이하의 길이의 아미노산들이다.
- [0084] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 적어도 126개의 길이의 아미노산들이다.
- [0085] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21을 포함한다.
- [0086] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 또는 서열번호 93을 포함한다.
- [0087] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 또는 서열번호 115를 포함한다.
- [0088] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 또는 서열번호 119를 포함한다.
- [0089] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함한다.
- [0090] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함한다.
- [0091] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73을 포함한다.
- [0092] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18을 포함한다.
- [0093] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21로 이루어진다.
- [0094] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 또는 서열번호 93으로 이루어진다.
- [0095] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 또는 서열번호 115로 이루어진다.
- [0096] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 또는 서열번호 119로 이루어진다.
- [0097] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95로 이루어진다.
- [0098] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서

열번호 91 또는 서열번호 95로 이루어진다.

- [0099] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73으로 이루어진다.
- [0100] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18로 이루어진다.
- [0101] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 24로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0102] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 잔기 A1 내지 V6 또는 A1 내지 G14 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0103] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25를 포함한다.
- [0104] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25로 이루어진다.
- [0105] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125, 서열번호 127 또는 서열번호 129를 포함한다.
- [0106] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125, 서열번호 127 또는 서열번호 129로 이루어진다.
- [0107] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123을 포함한다.
- [0108] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123으로 이루어진다.
- [0109] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 상기 PD1과 4-1BBL 사이에 링커를 포함한다.
- [0110] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 상기 단리된 폴리펩타이드는 상기 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복의 각각 사이에 링커를 포함한다.
- [0111] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 1개 내지 6개 아미노산의 길이를 갖는다.
- [0112] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 단일 아미노산 링커이다.
- [0113] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 글리신이다.
- [0114] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 항체 또는 이의 단편의 Fc 도메인이 아니다.
- [0115] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 항체 또는 이의 단편의 Fc 도메인이다.
- [0116] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 (GGGGG)_n(n=1 내지 4)(서열번호 149) 링커이다.
- [0117] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 적어도 동중-삼량체(homo-trimer)의 형태로 존재한다.
- [0118] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동중-삼량체는 SEC-MALS에 의해 측정시 분자량이 적어도 100kD이다.
- [0119] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드는 가용성이다.
- [0120] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 융합 단백질의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 생산 수율보다 적어도 1.5배 더 높고, 상기 생산 조건은 포유동물 세포에서의 발현 및 5 내지 13일 동안 32 °C 내지 37 °C, 5% 내지 10%의 CO₂에서의 배양을 포함한다.
- [0121] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 융합 단백질의 응집체의 양은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 응집체의 양보다 적어도 20% 더 적고, 상기 응집체는 분자량이 적어도 300kDa이며, 상기 생산 조건은 포유동물 세포에서의 발현 및 5 내지 13일 동안 32 °C 내지 37 °C, 5% 내지 10%의 CO₂에서의 배양을 포함한다.
- [0122] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서

14 및 서열번호 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0138] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107, 서열번호 111, 서열번호 113, 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0139] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0140] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107 및 서열번호 111로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0141] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107 및 서열번호 111로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0142] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105 및 서열번호 107로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0143] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16 및 서열번호 44 내지 서열번호 56으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0144] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14 및 서열번호 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0145] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)가 제공된다.
- [0146] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드, 및 숙주 세포에서의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물이 제공된다.
- [0147] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 서열번호 72, 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108, 서열번호 112, 서열번호 114, 서열번호 134, 서열번호 136, 서열번호 138, 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144 및 서열번호 148로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0148] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 서열번호 72, 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108 및 서열번호 112로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0149] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108 및 서열번호 112로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0150] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106 및 서열번호 108로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0151] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 서열번호 72로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0152] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 70 내지 서열번호 72로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0153] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 134, 서열번호 136, 서열번호 138, 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144 및 서열번호 148로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

- [0154] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 146을 포함한다.
- [0155] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물을 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0156] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 폴리펩타이드를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 숙주 세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물을 발현시키는 단계를 포함하는, PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 폴리펩타이드를 생산하는 방법이 제공된다.
- [0157] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 방법은 상기 융합 단백질 또는 폴리펩타이드를 단리하는 단계를 포함한다.
- [0158] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 대상체에게 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물, 또는 상기 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0159] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 방법은 상기 질환을 치료하기 위해 상기 대상체에게 치료학적 제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0160] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는데 사용하기 위한, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물 또는 숙주 세포가 제공된다.
- [0161] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 조성물은 상기 질환을 치료하기 위한 치료학적 제제를 추가로 포함한다.
- [0162] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하기 위한 치료학적 제제를 패키징(packaging)하는 패키징 재료; 및 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물 또는 숙주 세포를 포함하는, 제조 물품이 제공된다.
- [0163] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 질환의 세포는 PDL1을 발현한다.
- [0164] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 질환은 과다-증식성(hyper-proliferative) 질환을 포함한다.
- [0165] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 과다-증식성 질환은 경화증, 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 건선, 전신 경화증/피부경화증, 원발 담즙성 담관염, 원발 경화성 담관염, 간 섬유증, 방사선-유도된 폐 섬유증, 골수 섬유증 또는 후복막 섬유증의 예방을 포함한다.
- [0166] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 과다-증식성 질환은 암을 포함한다.
- [0167] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 암은 림프종, 백혈병 및 암종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0168] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 질환은 면역 억제 또는 투약(medication) 유도된 면역 억제와 관련된 질환을 포함한다.
- [0169] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 질환은 HIV, 홍역, 인플루엔자(influenza), LCCM, RSV, 사람 리노바이러스(Rhinovirus), EBV, CMV 또는 파보(Parvo) 바이러스를 포함한다.
- [0170] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 질환은 감염을 포함한다.
- [0171] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 한 양상에 따르면, 면역 세포를 활성화하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 단리된 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 또는 숙주 세포의 존재시에 면역 세포를 시험관내(in-vitro) 활성화하는 단계를 포함하는, 면역 세포를 활성화하는 방법이 제공된다.
- [0172] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 PDL1 또는 외인성 PDL1을 발현하는 세포의 존재시에 이루어진다.
- [0173] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 PDL1을 발현하는 세포는 병리학적 세포를 포함한다.
- [0174] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 병리학적 세포는 암 세포를 포함한다.

- [0175] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 항암제의 존재시에 이루어진다.
- [0176] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 질환을 치료하기 위한 상기 치료학적 제제 또는 항암제는 항체를 포함한다.
- [0177] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 항체는 리툭시매파(rituximab), 세툭시매파(cetuximab), 트라스투주매파(trastuzumab), 에드레콜로매파(edrecolomab), 알메투주매파(almetuzumab), 겐투주매파(gentuzumab), 이브리투모매파(ibrutinomab), 파니투무매파(panitumumab), 벨리무매파(Belimumab), 베바시주매파(Bevacizumab), 비바투주매파 메르탄신(Bivatuzumab mertansine), 블리나투모매파(Blinatumomab), 블론투베트매파(Blontuvetmab), 브렌투시매파 베도틴(Brentuximab vedotin), 카투막소매파(Catumaxomab), 식수투무매파(Cixutumumab), 다클리주매파(Daclizumab), 아달리무매파(Adalimumab), 베즐로톡수매파(Bezlotoxumab), 세르톨리주매파 페골(Certolizumab pegol), 시타투주매파 보가톡스(Citatzumab bogatox), 다라투무매파(Daratumumab), 디누투시매파(Dinutuximab), 엘로투주매파(Elotuzumab), 에르투막소매파(Ertumaxomab), 에타라시주매파(Etaracizumab), 겐투주매파 오조가마이신(Gentuzumab ozogamicin), 기렌투시매파(Girentuximab), 네시투무매파(Necitumumab), 오비누투주매파(Obinutuzumab), 오파투무매파(Ofatumumab), 페르투주매파(Pertuzumab), 라무시루매파(Ramucirumab), 실투시매파(Siltuximab), 토시투모매파(Tositumomab), 트라스투주매파(Trastuzumab) 및 이필리무매파(ipilimumab)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0178] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 항체는 리툭시매파 및 세툭시매파으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0179] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 질환을 치료하기 위한 상기 치료학적 제제 또는 항암제는 IMiD(예를 들면, 탈리도마이드(Thalidomide), 레날리도마이드(Lenalidomide), 포말리도마이드(Pomalidomide))를 포함한다.
- [0180] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 방법은 상기 활성화 후 상기 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 양자 전이(adoptively transferring)하는 단계를 포함한다.
- [0181] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 T 세포를 포함한다.
- [0182] 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및/또는 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야 숙련가에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 방법들 및 재료들이 본 발명의 실시형태들의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 예시적인 방법들 및/또는 재료들이 하기에 기술된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 특허 명세서가 우선할 것이다. 또한, 재료들, 방법들 및 예시들은 단지 실례이고, 반드시 한정되는 것을 의도하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0183] 도면의 여러 관점에 대한 간단한 설명

본 발명의 몇몇의 실시형태들은 단지 예시로서 첨부된 도면을 참조하여 본원에 기술된다. 이하 도면을 상세하게 구체적으로 참조하면, 도시된 세부사항은 예시에 의한 것이고 본 발명의 실시형태들의 실례적 논의 목적을 위한 것임이 강조된다. 이와 관련하여, 도면과 함께 취해진 설명은 본 발명의 실시형태들이 어떻게 실시될 수 있는지 당업자들에게 명백하다.

도면에 있어서:

도 1은 N-말단 신호 펩타이드 및 His-태그(tag)(서열번호 26)를 포함하는 본원에서 "DSP105"(서열번호 5)로서 칭하는 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 개략적 표현이다. 신호 펩타이드(흑색 밑줄그어짐, 서열번호 4), N-말단 His-태그(흑색 굵은 글씨), PD1 도메인(적색, 서열번호 2), 글리신 링커(흑색) 및 4-1BBL 도메인(청색, 서열번호 3)이 도시됨

도 2a 내지 도 2d는 DSP105(서열번호 5)의 예측된 3D 구조를 보여준다. 도 2a는 개략적 3D 모델이다. PD1은 회색 띠로 나타내고, PDL1(PD1 리간드)은 녹색 띠로 나타내며, 4-1BBL은 청색 띠로 나타내고 4-1BBL의 2개의 추가의 카피(copy)(삼량체 형성)들은 담청색으로 나타낸다. 도 2b는 개략적 전체 원자 3D 모델이다. 도 2c 및 도 2d는 개략적 3D 모델이다. X-선 해상된(X-ray resolved) 도메인은 이의 표면으로 표시되고 소수성 척도에 의해 색상표시된다(청색(가장 친수성) 내지 갈색(소수성)).

도 3은 DSP105(서열번호 5)에서 식별되는 상기 도메인 및 분절의 개략적 표시이다. Ig-유사 V-타입 도메인은

담청색으로 강조표시되고(밀줄그어진 서열은 X-선에서 해상되었음), X-선 해상된 부분은 회색으로 강조표시되고 플랭킹(flanking)/비구조화(unstructured) 영역은 적색 상자로 표시된다.

도 4는 본원에서 "DSP105_var1"(서열번호 12)로서 칭하는 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질의 예측된 3D 구조를 보여준다. 상단 패널에서, X-선 해상된 도메인은 소수성 척도에 의해 색상 - 청색(가장 친수성) 내지 갈색(소수성) 표시된 표면 표현(surface representation)으로 도시된다. PDL1(PD1 리간드)은 녹색 띠로 제시된다. 하단 패널에서, 4-1BBL은 적색 띠로 그리고 PD1은 청색 띠로 제시된다.

도 5는 본원에서 "DSP105_var2"(서열번호 14)로서 칭하는 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질의 예측된 3D 구조를 보여준다. 색상 코드는 도 4에서와 동일하다.

도 6은 본원에서 "DSP105_var3"(서열번호 16)으로서 칭하는 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질의 예측된 3D 구조를 보여준다. 색상 코드는 도 4에서와 동일하다.

도 7은 Expi293 세포에서 발현된 N-말단 His-태그된 DSP105(서열번호 1); 및 CHO-3E7에서 발현된 N-말단 His-태그된 DSP105_var17(서열번호 99)의 SDS-PAGE 분석의 이미지를 제시한다. 두 융합 단백질은 모두 니켈 겔럼에서 단일 단계 친화성 정제에 의해 정제되었고 나타낸 바와 같이 환원 및 비-환원 조건 하에 분리되었다. 이미지들에 제시된 샘플들은 하기와 같다: 라인 M - 분자량 마커; 라인 1 내지 2: N-말단 His-태그된 DSP105(서열번호 1)의 2개의 별개의 조제들, 라인 3 - N-말단 His-태그된 DSP105_var17(서열번호 99).

도 8a 내지 도 8e는 CHO-3E7 세포에서 생산된 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질의 표시된 항체를 이용한 SDS-PAGE 분석(PAGE로 표시됨) 및 웨스턴 블롯(western blot)(WB로 표시됨)의 이미지를 제시한다. 본원에서 "N-말단 His-태그된 DSP105_var17"(서열번호 99, 도 8a), "DSP105_var18"(서열번호 101, 도 8b), "DSP105_var19"(서열번호 103, 도 8c), "DSP105_var20"(서열번호 105, 도 8d) 및 "DSP105_var23"(서열번호 113, 도 8e)로서 칭하는 환원 또는 비-환원 조건 하의 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질들이 도시되어 있다. 이미지들에 제시된 샘플들은 하기와 같다: 라인 M - 분자량 마커; 라인 1 내지 3 - 환원 조건 하의 형질감염 후 각각 2일째, 4일째 및 5일째에 수집된 세포 배양 상청액; 라인 NC1 - 환원 조건 하의 음성 대조군; 라인 4 내지 6 - 비-환원 조건 하의 형질감염 후 각각 2일째, 4일째 및 5일째에 수집된 세포 배양 상청액; 라인 NC2 - 비-환원 조건 하의 음성 대조군; 및 라인 P - 양성 대조군으로서의 다중-태그(GenScript, Cat.No. M0101).

도 9a 및 도 9b는 Expi293F 세포에서 생산된 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질의 SDS-PAGE 분석의 이미지를 제시한다. 본원에서 "N-말단 His-태그된 DSP105_var17"(서열번호 99), "DSP105_var17"(서열번호 97), "DSP105_var20"(서열번호 105), "DSP105_var23"(서열번호 113), "His-태그된 DSP105_var22"(서열번호 110), "His-태그된 DSP105"(서열번호 1), "DSP105_var24"(서열번호 133), "DSP105_var25"(서열번호 135) 및 "DSP105_var31"(서열번호 147)로서 칭하는 환원(도 9a) 또는 비-환원(도 9b) 조건 하의 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질들이 도시되어 있다.

도 10a 내지 도 10c는 PDL1 또는 41BB 발현 세포에 결합하는 DSP105_var17(서열번호 99)을 입증하는 유세포측정(flow cytometric) 분석을 제시한다. 도 10a는 DLD1-PDL1 또는 HT1080-41BB 세포주 상의 표시된 수용체들의 발현을 보여준다. PDL1 또는 41BB의 표면 발현 수준은 상응하는 항체들의 각각의 세포주의 면역염색(immunostaining) 후 유세포측정 분석에 의해 측정하였다. 도 10b 및 도 10c는 DLD1-PD1에 대한 또는 HT1080-41BB 세포주에 대한 N-말단 His-태그된 DSP105_var17(서열번호 99)의 결합을 입증한다.

도 11은 HT1080-4-1BB 세포주에서의 4-1BB 수용체의 발현을 입증하는 유세포측정 분석을 제시한다.

도 12는 DSP105 분자의 결합 후 HT-1080-4-1BB 세포로부터의 IL-8 분비 수준을 나타내는 OD 값에 의해 입증되는 바와 같이, N-말단 His-태그된 DSP105_var17 단백질(서열번호 99), DSP105_var_17 단백질(서열번호 97), DSP105_var_21 단백질(서열번호 107) 및 His-태그된 PD1-4-1BBL var_22(서열번호 110)가 4-1BBL/4-1BB 신호전달을 촉진시킴을 입증하는 그래프를 제시한다.

도 13a 내지 도 13d는 본원에서 "DSP105_V31"(서열번호 147)로서 칭하는 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질의 예측된 3D 구조를 입증한다. 도 13a는 개략적 3D 띠 모델이다. PD1은 암회색 띠(우측)로 표시되고, 41BB-L은 흑색 띠(좌측)로 표시되며, 링커 분절은 PD1과 41BB-L의 구조적 요소들 사이의 백색 띠로 표시된다. 도 13b는 개략적 3D 표면 표시(surface display) 모델이다. PD1은 암회색 표면 표시(우측)로 표시되고, 41BB-L은 흑색 표면 표시(좌측)로 표시되며, 링커 분절은 PD1과 41BB-L의 구조적 요소들 사이의 백색 띠로 표시된다. 도 13c는 상기 융합 단백질 및 이의 결합 대응부(counterpart)의 개략적 3D 띠 모델이다. PD1은 암회색 띠(우측)로 표시되고, 41BB-L은 흑색 띠(좌측)로 표시되며, 링커 분절은 PD1과 41BB-L 사이의 구조적 요소들 사이의 백색 띠로

표시되고, PD1에 결합된 PD-L1은 회색 띠(우측)로 표시되고 3개의 41BB 수용체들은 41BB-L(좌측)과의 복합체(complex)로 회색 띠로 표시된다. 도 13d는 상기 융합 단백질 및 이의 결합 대응부의 개략적 3D 표면 표시 모델이다. PD1은 암회색 표면 표시(우측)로 표시되고, 41BB-L은 흑색 표면 표시(좌측)로 표시되며, 링커 분절은 PD1과 41BB-L 사이의 구조적 요소들 사이의 백색 띠로 표시되고, PD1에 결합된 PD-L1은 회색 띠(우측)로 표시되고 3개의 41BB 수용체들은 41BB-L(좌측)과의 복합체(complex)로 회색 띠로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0184] 본 발명의 상세한 실시형태들의 기술
- [0185] 본 발명은, 이들의 몇몇의 실시형태들에서 PD1-4-1BBL 변이체 융합 단백질 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.
- [0186] 본 발명의 적어도 하나의 실시형태를 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 이의 적용에 있어서 하기 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에 제시되거나 실시예에 의해 예시된 세부사항에 반드시 한정되는 것은 아님을 이해해야 한다. 본 발명은 다른 실시형태들이 가능하거나 다양한 방식으로 실행 또는 수행될 수 있다.
- [0187] 현재 당해 분야에 이-기능성(bi-functional) 융합 단백질로서 공지되어 있는, 신호-변환-단백질(SCP: Signal-Converting-Protein)로서도 공지되어 있는 이중 신호전달 단백질(DSP: Dual Signaling Protein)은 I형 막(membrane) 단백질의 세포의 부분(세포외 아미노-말단)을 II형 막 단백질의 세포의 부분(세포외 카르복실-말단)에 연결하여 2개의 활성 측들과의 융합 단백질을 형성한다.
- [0188] 본 발명자들은 구조적-기능성 도구를 사용하여, 개선된 생산 특성(예를 들면, 보다 높은 수율, 보다 낮은 백분율의 응집체)을 갖는 PD1 변이체 및/또는 4-1BBL 변이체를 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질을 생성할 수 있었고; 이는 일반적으로 (공동-자극을 통해) 면역 세포를 활성화하고 특히 면역 세포의 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환(예를 들면, 암)을 치료하는데 유리하게 사용될 수 있다.
- [0189] 이론에 얽매이지 않고, 본 발명자들은 일례로서 암의 치료에서의 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 작용 방식으로서 하기를 제안한다:
- [0190] 종양 세포의 표면 상의 그리고 종양 미세-환경(mirco-environment)에서의 상대적으로 높은 PDL1의 발현으로 인하여, 상기 PD1-4-1BBL 키메라(chimera)의 상기 PD1 모이어티(moiety)는 분자를 종양 및 전이 부위에 표적화하여 종양 미세-환경 내에서 PDL1에 대한 융합 단백질의 결합을 유도한다.
- [0191] 상기 융합 단백질을 상기 종양 세포 및/또는 종양 미세-환경에 표적하는 것은 종양 미세-환경에서의 PD1-4-1BBL 농도의 증가 및 종양 부위에서의 상기 융합 단백질의 4-1BBL 모이어티의 후속적 올리고머화(oligomerization)를 용이하게 한다. 4-1BBL의 올리고머화는 4-1BB 신호전달에 필요한 단계이므로, 이러한 4-1BBL 결합 및 올리고머화는 T 세포, B 세포, NK 세포, 특히 종양-침윤 림프구(TIL: Tumor-Infiltrating Lymphocyte) 및 기타 면역 세포의 활성화를 촉진시키는 4-1BB 공동-자극 신호를 종양 부위에 전달하여 암 세포를 죽인다.
- [0192] 4-1BBL - 4-1BB 공동-자극 신호 이외에, 종양 부위에서의 PDL1에의 상기 융합 단백질의 PD1 모이어티의 결합은 T 세포 상에 발현된 내인성 PD1과 경쟁하고; 따라서 T 세포에 대한 억제를 제거하고 추가로 종양 미세-환경에서의 TIL의 활성화에 기여한다.
- [0193] PD1-4-1BBL의 상기 활성들은 종양 미세-환경 내에서의 TIL의 활성화에 대한 상승작용(synergistic) 효과를 초래할 것으로 예상되고, 이는 각각의 모이어티 별개의 효과뿐만 아니라 이들의 2개의 상이한 모이어티들을 병용하여 사용하는 경우와 비교하여 보다 특이적이고 보다 강력한 효과일 것으로 예상된다.
- [0194] 따라서, 본 발명의 한 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 PD1 아미노산 서열은:
- [0195] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 것이고; 및/또는
- [0196] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 및/또는

- [0197] 상기 4-1BBL 아미노산 서열은:
- [0198] (aa) 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 것이거나, 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 123과 적어도 80%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0199] (bb) 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하고;
- [0200] 상기 융합 단백질은 하기:
- [0201] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- [0202] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0203] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0204] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질이 제공된다.
- [0205] 본 발명의 대안의 또는 추가의 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 PD1 아미노산 서열은:
- [0206] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 및/또는
- [0207] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 및/또는
- [0208] 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 융합 단백질은 하기:
- [0209] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- [0210] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0211] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0212] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질이 제공된다.
- [0213] 본 발명의 대안의 또는 추가의 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 및/또는 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 융합 단백질은 하기:
- [0214] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- [0215] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0216] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0217] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질이 제공된다.
- [0218] 본 발명의 대안의 또는 추가의 양상에 따르면, 상기 PD1과 상기 4-1BBL 사이에 (GGGGG)_n(n=1 내지 4) 링커를 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서, 상기 융합 단백질은 하기:
- [0219] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;

- [0220] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0221] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0222] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, PD1-4-1BBL 융합 단백질이 제공된다.
- [0223] 본 발명의 대안의 또는 추가의 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 것이고; 임의로 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0224] 본 발명의 대안의 또는 추가의 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 임의로 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0225] 본 발명의 대안의 또는 추가의 양상에 따르면, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있는 것인, PD1 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0226] 본 발명의 대안의 또는 추가의 양상에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 것이고; 임의로 상기 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하는 것이고; 상기 폴리펩타이드는 하기:
- [0227] (i) 4-1BB를 결합함;
- [0228] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0229] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0230] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0231] 본 발명의 대안의 또는 추가의 양상에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드로서, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 상기 폴리펩타이드는 하기:
- [0232] (i) 4-1BB를 결합함;
- [0233] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [0234] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함;
- [0235] 중 적어도 하나를 행할 수 있는 것인, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩타이드가 제공된다.
- [0236] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "PD1(Programmed Death 1, CD279로서도 공지되어 있음)"은 PDCD1 유전자(유전자 ID 5133)의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 동족체(homolog), 예를 들면, 기능성 단편을 말한다. 특정 실

시형태들에 따르면, 상기 용어 "PD1"은 PD1 폴리펩타이드의 기능성 동족체를 말한다. 특정 실시형태들에 따르면, PD1은 사람 PD1이다. 한 특정 실시형태에 따르면, 상기 PD1 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_005009에 제공되는 바와 같은 사람 단백질을 말한다.

- [0237] 현재까지 PD-1에 대해 2개의 리간드들, PDL1 및 PDL2(B7-DC로서도 공지되어 있음)가 확인되었다. 한 특정 실시형태에 따르면, 상기 PDL1 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001254635 및 NP_054862에 제공되는 바와 같은 사람 단백질을 말한다. 한 특정 실시형태에서, 상기 PDL2 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_079515에 제공되는 바와 같은 사람 단백질을 말한다.
- [0238] 본원에서 사용되는 바와 같은 어구 "기능성 동족체" 또는 "기능성 단편"은 PD1과 관련된 경우 전장(full length) PD1의 활성, 예를 들면 PD-L1 결합을 유지하는 폴리펩타이드의 일부를 말한다.
- [0239] 결합을 시험하기 위한 검정은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 유세포측정법, 비아코어(BiaCore), 생물층 간섭계(bio-layer interferometry) 블리츠®(Blitz®) 검정, HPLC가 포함되지만 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0240] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1은 SPR 분석에 의해 측정시 1nM 내지 100 μM, 10nM 내지 10 μM, 100nM 내지 100 μM, 200nM 내지 10 μM의 Kd로 PD-L1에 결합하고, 각각의 가능성(possibility)은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0241] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1은 SPR 분석에 의해 측정시 약 270nM의 Kd로 PDL1에 결합한다.
- [0242] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1은 SPR 분석에 의해 측정시 약 8 내지 9 μM의 Kd로 PDL1에 결합한다.
- [0243] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1은 상기 PD1의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0244] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 서열번호 27을 포함한다.
- [0245] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 서열번호 27로 이루어진다.
- [0246] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 핵산 서열은 서열번호 28을 포함한다.
- [0247] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 핵산 서열은 서열번호 28로 이루어진다.
- [0248] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 서열번호 2를 포함한다.
- [0249] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 서열번호 2로 이루어진다.
- [0250] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 핵산 서열은 서열번호 29를 포함한다.
- [0251] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 핵산 서열은 서열번호 29로 이루어진다.
- [0252] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 서열번호 30 또는 서열번호 31을 포함한다.
- [0253] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 서열번호 30 또는 서열번호 31로 이루어진다.
- [0254] 상기 용어 "PD1"은 또한 원하는 활성(즉, PD-L1 및/또는 PD-L2와의 결합)을 나타내는 기능성 동족체(천연 발생 또는 합성적으로/재조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은 예를 들면, 상기 폴리펩타이드 서열번호 2, 서열번호 27, 서열번호 30 또는 서열번호 31과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하거나 상동성(homologous)일 수 있거나; 또는 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드 서열(본원 이하에 추가로 기술되는 바와 같음)과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일할 수 있다.
- [0255] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 기능성 동족체는 상기 폴리펩타이드 서열번호 2, 서열번호 27, 서열번호 30 또는 서열번호 31과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하거나 상동성일 수 있거나; 또는 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드(본원 이하에 추가로 기술되는 바와 같음)와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다.
- [0256] 본원에서 사용되는 바와 같은 "동일성" 또는 "서열 동일성"은 전반적인 동일성, 즉 본원에 개시된 아미노산 또

는 핵산 서열의 일부가 아닌 이의 전체에 걸친 동일성을 말한다.

- [0257] 서열 동일성 또는 상동성은 Blast, ClustalW 및 MISCLE과 같은 임의의 단백질 또는 핵산 서열 정렬 알고리즘(algorithm)을 이용하여 측정할 수 있다.
- [0258] 상기 상동성은 또한 본원 이하에 추가로 기술되는 바와 같이 오솔로그(ortholog), 결실, 삽입, 또는 아미노산 치환을 포함하는 치환 변이체를 지칭할 수 있다.
- [0259] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 폴리펩타이드는 보존적(conservative) 또는 비-보존적(non-conservative) 아미노산 치환(본원에서 돌연변이로서도 칭함)을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면 문헌[Maute et al. PNAS, 2015 Nov 24;112(47):E6506-14; Ju Yeon et al. Nature Communications 2016 volume 7, Article number: 13354 (DOI: 10.1038/ncomms13354)]; 및 문헌[Zack KM et al. Structure. 2015 23(12): 2341-2348 (DOI:10.1016/j.str.2015.09.010)]에 개시되어 있고, 이의 전문은 본원에 참조에 의해 포함된다.
- [0260] 서열 동일성의 백분율이 단백질과 관련하여 사용되는 경우, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 흔히 상이한 것으로 인식되고, 여기서 아미노산 잔기는 유사한 화학적 특성(예를 들면, 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환되고, 따라서 분자의 기능적 특성을 변화시키지 않는다. 서열이 보존적 치환으로 상이한 경우, 서열 동일성 백분율은 상기 치환의 보존적 특성을 교정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이러한 보존적 치환에 의해 상이한 서열은 "서열 유사성(similarity)" 또는 "유사성"을 갖는 것으로 간주된다. 이러한 조정을 행하기 위한 수단은 당업자에게 익히 공지되어 있다. 전형적으로, 이는 완전 불일치(full mismatch)보다는 오히려 부분으로서의 보존적 치환을 점수평가(scoring)하는 것에 관여하여 서열 동일성 백분율을 증가시킨다. 따라서, 예를 들면, 동일한 아미노산에 1의 점수가 주어지고 비-보존적 치환에 0의 점수가 주어지는 경우, 보존적 치환은 0과 1 사이의 점수가 주어진다. 보존적 치환의 점수평가는 예를 들면, 헨니코프(Henikoff) S 및 헨니코프 JG의 알고리즘[Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992, 89(22): 10915-9]에 따라 계산한다.
- [0261] 특정 실시형태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는, 서열번호 31에 제시되는 PD1 아미노산 서열에 상응하는 V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106, 및 A107로부터 선택되는 아미노산 잔기에 위치한다. 특정 실시형태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는, 서열번호 31에 제시되는 PD1 아미노산 서열에 상응하는 V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, C68, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106, 및 A107로부터 선택되는 아미노산 잔기에 위치한다.
- [0262] 특정 실시형태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 변화는 서열번호 31에 제시되는 PD1 아미노산 서열에 상응하는 (1) V39H 또는 V39R; (2) L40V 또는 L40I; (3) N41I 또는 N41V; (4) Y43F 또는 Y43H; (5) R44Y 또는 R44L; (6) M45Q, M45E, M45L, 또는 M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G, 또는 S48V; (8) N49C, N49G, N49Y, 또는 N49S; (9) Q50K, Q50E, 또는 Q50H; (10) T51V, T51L, 또는 T51A; (11) D52F, D52R, D52Y, 또는 D52V; (12) K53T 또는 K53L; (13) A56S 또는 A56L; (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, 또는 Q63P; (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, 또는 G65V; (16) Q66P; (17) V72I; (18) H82Q; (19) M83L 또는 M83F; (20) R90K; (21) Y96F; (22) L97Y, L97V, 또는 L97I; (23) A100I 또는 A100V; (24) S102T 또는 S102A; (25) L103I, L103Y, 또는 L103F; (26) A104S, A104H, 또는 A104D; (27) P105A; (28) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, 또는 K106T; 및 (29) A107P, A107I, 또는 A107V로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0263] 특정 실시형태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 변화는 서열번호 31에 제시되는 PD1 아미노산 서열에 상응하는 (1) V39H 또는 V39R; (2) L40V 또는 L40I; (3) N41I 또는 N41V; (4) Y43F 또는 Y43H; (5) R44Y 또는 R44L; (6) M45Q, M45E, M45L, 또는 M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G, 또는 S48V; (8) N49C, N49G, N49Y, 또는 N49S; (9) Q50K, Q50E, 또는 Q50H; (10) T51V, T51L, 또는 T51A; (11) D52F, D52R, D52Y, 또는 D52V; (12) K53T 또는 K53L; (13) A56S 또는 A56L; (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, 또는 Q63P; (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, 또는 G65V; (16) Q66P; (17) C68S, (18) V72I; (19) H82Q; (20) M83L 또는 M83F; (21) R90K; (22) Y96F; (23) L97Y, L97V, 또는 L97I; (24) A100I 또는 A100V; (25) S102T 또는 S102A; (26) L103I, L103Y, 또는 L103F; (27) A104S, A104H, 또는 A104D; (28) P105A; (29) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, 또는 K106T; 및 (30) A107P, A107I, 또는 A107V로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0264] 특정 실시형태들에 따르면, 아미노산 돌연변이는 서열번호 2에 제시되는 PD1 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 잔기 C73(예를 들면, 서열번호 31에 제시되는 PD1 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 잔기 C68과 동등함)에 위치한다.
- [0265] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 폴리펩타이드는 서열번호 2에 제시되는 PD1 아미노산 서열의 아미노산 잔기 73(예를 들면, 서열번호 31에 제시되는 PD1 아미노산 서열의 아미노산 잔기 68과 동등함)에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함할 수 있다.
- [0266] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73을 포함한다.
- [0267] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73으로 이루어진다.
- [0268] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 74를 포함한다.
- [0269] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 74로 이루어진다.
- [0270] 본원에서 사용되는 어구 "서열번호 31에 제시되는 바와 같은 PD1 아미노산 서열에 상응하는", "서열번호 31에 상응하는", "서열번호 2에 제시되는 바와 같은 PD1 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "서열번호 2에 상응하는"은 임의의 다른 PD1 아미노산 서열에 비해 상기 상응하는 아미노산 서열 잔기를 포함함을 의도한다.
- [0271] 보존적 아미노산 및 비-보존적 아미노산 치환에 대한 추가의 기술은 본원 이하에 더 제공된다.
- [0272] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 PD1은 상기 폴리펩타이드 서열번호 18 내지 서열번호 21과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하거나 상동성일 수 있거나; 또는 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드 서열(본원 이하에 추가로 기술되는 바와 같음)과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일할 수 있고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0273] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0274] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0275] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0276] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0277] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0278] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0279] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 19와 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0280] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 20과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0281] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 21과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0282] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 85와 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0283] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 89와 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0284] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 93과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0285] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 80%의 동일성을 갖는다.

- [0313] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 89와 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0314] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 93과 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0315] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0316] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117과 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0317] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 119와 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0318] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0319] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0320] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0321] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0322] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0323] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0324] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0325] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 19와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0326] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 20과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0327] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 21과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0328] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 85와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0329] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 89와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0330] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 93과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0331] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0332] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0333] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 119와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0334] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0335] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성

을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [0336] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0337] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0338] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0339] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0340] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 19와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0341] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 20과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0342] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 21과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0343] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 85와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0344] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 89와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0345] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 93과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0346] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0347] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0348] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 119와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0349] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5를 포함하지 않는다.
- [0350] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는다.
- [0351] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0352] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2에 상응하는 아미노산 잔기 P1 내지 L5 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0353] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2에 상응하는 아미노산 잔기 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0354] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2에 상응하는 아미노산 잔기 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는다.

- [0355] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 8 또는 이의 임의의 단편을 포함하지 않는다.
- [0356] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 8을 포함하지 않는다.
- [0357] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 9 또는 이의 임의의 단편을 포함하지 않는다.
- [0358] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 9를 포함하지 않는다.
- [0359] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 8 및 서열번호 9 또는 이들의 임의의 단편을 포함하지 않는다.
- [0360] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 8 및 서열번호 9를 포함하지 않는다.
- [0361] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 또는 서열번호 115를 포함한다.
- [0362] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 117 또는 서열번호 119를 포함한다.
- [0363] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 또는 서열번호 119를 포함한다.
- [0364] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 또는 서열번호 93을 포함한다.
- [0365] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함한다.
- [0366] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함한다.
- [0367] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21을 포함한다.
- [0368] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 또는 서열번호 21을 포함한다.
- [0369] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18을 포함한다.
- [0370] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 19를 포함한다.
- [0371] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 20을 포함한다.
- [0372] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 21을 포함한다.
- [0373] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 85를 포함한다.
- [0374] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 89를 포함한다.
- [0375] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 93을 포함한다.
- [0376] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75를 포함한다.
- [0377] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 79를 포함한다.
- [0378] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 81을 포함한다.
- [0379] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 83을 포함한다.
- [0380] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 87을 포함한다.
- [0381] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 91을 포함한다.
- [0382] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 95를 포함한다.
- [0383] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115를 포함한다.
- [0384] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117을 포함한다.
- [0385] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 119를 포함한다.

- [0386] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 또는 서열번호 115로 이루어진다.
- [0387] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 117 또는 서열번호 119로 이루어진다.
- [0388] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 또는 서열번호 119로 이루어진다.
- [0389] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 또는 서열번호 93으로 이루어진다.
- [0390] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95로 이루어진다.
- [0391] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95로 이루어진다.
- [0392] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21로 이루어진다.
- [0393] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 또는 서열번호 21로 이루어진다.
- [0394] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18로 이루어진다.
- [0395] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 19로 이루어진다.
- [0396] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 20으로 이루어진다.
- [0397] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 21로 이루어진다.
- [0398] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 85로 이루어진다.
- [0399] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 89로 이루어진다.
- [0400] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 93으로 이루어진다.
- [0401] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75로 이루어진다.
- [0402] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 79로 이루어진다.
- [0403] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 81로 이루어진다.
- [0404] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 83으로 이루어진다.
- [0405] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 87로 이루어진다.
- [0406] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 91로 이루어진다.
- [0407] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 95로 이루어진다.
- [0408] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115로 이루어진다.
- [0409] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117로 이루어진다.
- [0410] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 119로 이루어진다.
- [0411] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96, 서열번호 116, 서열번호 118 및/또는 서열번호 120과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0412] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열

번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 및/또는 서열번호 96과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.

- [0461] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 및/또는 서열번호 35와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0462] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96, 서열번호 116, 서열번호 118 및/또는 서열번호 120과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0463] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 및/또는 서열번호 96과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0464] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 및/또는 서열번호 35와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0465] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96, 서열번호 116, 서열번호 118 또는 서열번호 120을 포함한다.
- [0466] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96을 포함한다.
- [0467] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 또는 서열번호 35를 포함한다.
- [0468] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32를 포함한다.
- [0469] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 33을 포함한다.
- [0470] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 34를 포함한다.
- [0471] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 35를 포함한다.
- [0472] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 76을 포함한다.
- [0473] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 80을 포함한다.
- [0474] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 82를 포함한다.
- [0475] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 84를 포함한다.
- [0476] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 86을 포함한다.
- [0477] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 88을 포함한다.
- [0478] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 90을 포함한다.
- [0479] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 92를 포함한다.
- [0480] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 94를 포함한다.
- [0481] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 96을 포함한다.
- [0482] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 116을 포함한다.
- [0483] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 118을 포함한다.
- [0484] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 120을 포함한다.

- [0485] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96, 서열번호 116, 서열번호 118 또는 서열번호 120으로 이루어진다.
- [0486] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96으로 이루어진다.
- [0487] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 및/또는 서열번호 35로 이루어진다.
- [0488] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 32로 이루어진다.
- [0489] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 33으로 이루어진다.
- [0490] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 34로 이루어진다.
- [0491] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 35로 이루어진다.
- [0492] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 76으로 이루어진다.
- [0493] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 80으로 이루어진다.
- [0494] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 82로 이루어진다.
- [0495] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 84로 이루어진다.
- [0496] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 86으로 이루어진다.
- [0497] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 88로 이루어진다.
- [0498] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 90으로 이루어진다.
- [0499] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 92로 이루어진다.
- [0500] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 94로 이루어진다.
- [0501] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 96으로 이루어진다.
- [0502] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 116으로 이루어진다.
- [0503] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 118로 이루어진다.
- [0504] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 핵산 서열은 서열번호 120으로 이루어진다.
- [0505] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 100개 내지 200개의 아미노산, 120개 내지 180개의 아미노산, 120개 내지 160개, 130개 내지 170개의 아미노산, 130개 내지 160개, 130개 내지 150개, 140개 내지 160개의 아미노산, 145개 내지 155개 아미노산을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0506] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 123개 내지 166개 길이의 아미노산들이다.
- [0507] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 156개 길이의 아미노산들이다.
- [0508] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 145개 내지 155개 길이의 아미노산들이다.
- [0509] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 150개 길이의 아미노산들이다.
- [0510] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 150개 미만의 길이의 아미노산들을 포함한다.
- [0511] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 149개 미만의 길이의 아미노산들을 포함한다.
- [0512] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 149개 미만, 148개 미만, 147개 미만, 146개 미만, 145개 미만, 144개 미만, 143개 미만, 142개 미만, 141개 미만의 길이의 아미노산들을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0513] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이다.

- [0514] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 145개 길이의 아미노산들이다.
- [0515] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 143개 길이의 아미노산들이다.
- [0516] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 140개 이하의 길이의 아미노산들이다.
- [0517] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 적어도 123개, 적어도 124개, 적어도 125개, 적어도 126개, 적어도 127개, 적어도 128개, 적어도 129개, 적어도 130개, 적어도 133개, 적어도 137개, 적어도 138개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0518] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 적어도 123개, 적어도 124개, 적어도 125개, 적어도 126개, 적어도 127개, 적어도 128개, 적어도 129개, 적어도 130개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0519] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 123개 내지 148개 길이의 아미노산들을 포함한다.
- [0520] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 적어도 126개 길이의 아미노산들이다.
- [0521] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 126개 내지 148개 길이의 아미노산들이다.
- [0522] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 123개 내지 140개 길이의 아미노산들이다.
- [0523] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 126개 내지 140개 길이의 아미노산들이다.
- [0524] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 127개 내지 140개 길이의 아미노산들이다.
- [0525] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 128개 내지 140개 길이의 아미노산들이다.
- [0526] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 130개 내지 140개 길이의 아미노산들이다.
- [0527] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 130개 내지 135개 길이의 아미노산들이다.
- [0528] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 135개 내지 140개 길이의 아미노산들을 포함한다.
- [0529] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 126개 내지 130개 길이의 아미노산들을 포함한다.
- [0530] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 127개 길이의 아미노산들이다.
- [0531] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 128개 길이의 아미노산들이다.
- [0532] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 133개 길이의 아미노산들이다.
- [0533] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 135개 길이의 아미노산들이다.
- [0534] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 136개 길이의 아미노산들이다.
- [0535] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 137개 길이의 아미노산들이다.
- [0536] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 138개 길이의 아미노산들이다.
- [0537] 특정 실시형태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 140개 길이의 아미노산들이다.
- [0538] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "4-1BBL(CD137L 및 TNFSF9로서도 공지되어 있음)"은 TNFSF9 유전자(유전자 ID8744)의 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 동족체, 예를 들면 기능성 단편을 말한다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 용어 "4-1BBL"은 4-1BBL 폴리펩타이드의 기능성 동족체를 말한다. 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL은 사람 4-1BBL이다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_003802에 제공되는 바와 같은 사람 단백질을 말한다.
- [0539] 본원에서 사용되는 바와 같은 어구 "기능성 동족체" 또는 "기능성 단편"은 4-1BBL과 관련된 경우 전장 4-1BBL의 활성, 예를 들면 (i) 4-1BB에 결합함; (ii) 4-1BB를 신호전달 경로를 활성화함; (iii) 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 활성화함, (iv) 동종삼량체를 형성함을 유지하는 폴리펩타이드의 일부를 말한다.
- [0540] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL과 관련된 경우 상기 기능성 동족체는 (i), (ii), (iii), (i)+(ii), (i)+(iii), (ii)+(iii)을 행할 수 있다.
- [0541] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL과 관련된 경우 상기 기능성 동족체는 (i)+(ii)+(iii)을 행할 수 있다.

- [0542] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL과 관련된 경우 상기 기능성 동족체는 (iv), (i)+(iv), (ii)+(iv), (iii)+(iv), (i)+(ii)+(iv), (i)+(iii)+(iv), (ii)+(iii)+(iv)을 행할 수 있다.
- [0543] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL과 관련된 경우 상기 기능성 동족체는 (i)+(ii)+(iii)+(iv)을 행할 수 있다.
- [0544] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BB 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001552에 제공되는 바와 같은 사람 단백질을 말한다.
- [0545] 결합을 시험하기 위한 검정은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 본원 상기 및 하기에 추가로 기술된다.
- [0546] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL은 SPR 분석에 의해 측정시 0.1 내지 1000nM, 0.1nM 내지 100nM, 1nM 내지 100nM, 또는 55.2nM의 Kd로 4-1BB에 결합하고, 각각의 가능성은 청구된 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0547] 삼량체화(trimerization)를 시험하기 위한 검정은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, NATIVE-PAGE, SEC-HPLC 2D 겔, 겔 여과(gel filtration), SEC-MALS, 분석적 초원심분리(AUC: Analytical ultracentrifugation), 질량 분광분석법(Mass spectrometry(MS)), 모세관 겔 전기영동(CGE: capillary gel electrophoresis(CGE))이 포함되지만 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0548] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "활성화하는" 또는 "활성화"는 세포 증식, 성숙, 사이토카인 생산, 식세포작용(phagocytosis) 및/또는 조절 및 이펙터(effector) 기능의 유도를 초래하는 면역 세포(예를 들면, T 세포, B 세포, NK 세포, 식세포(phagocytic cell))를 자극하는 프로세스를 말한다.
- [0549] 특정 실시형태들에 따르면, 활성화는 공동-자극을 포함한다.
- [0550] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "공동-자극하는" 또는 "공동-자극"은 상기 면역 세포의 활성화를 초래하는 2차 항원 독립적 자극 신호(예를 들면, 4-1BB 신호)를 전송하는 것을 말한다.
- [0551] 특정 실시형태들에 따르면, 활성화는 상기 면역 세포의 활성화를 초래하는 억제 신호(예를 들면, PDL1 신호)를 억제하는 것을 포함한다.
- [0552] 자극 또는 억제 신호의 신호전달을 측정하는 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 또한 이어지는 실시예 섹션에 개시되어 있으며, 예를 들면, 비아코어, HPLC 또는 유세포측정법을 이용한 결합 검정, 키나제(kinase) 활성 검정과 같은 효소 활성 검정, 및 예를 들면 PCR, 웨스턴 블롯, 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역조직화학(immunohistochemistry)을 이용한 신호전달 캐스케이드(cascade)와 관련된 분자의 발현이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 추가로 또는 대안으로, 신호(공동-자극 또는 억제) 전송의 결정은 면역 세포 활성화 또는 기능을 평가함으로써 달성될 수 있다. 면역 세포 활성화 또는 기능의 평가 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, CFSE 염색, MTS, 알라마르 블루(Alamar blue), BRDU 및 티미딘 이입(thymidine incorporation)과 같은 증식 검정, CFSE 염색, 크로뎀 방출, 칼신(Calcein) AM과 같은 세포 독성 검정, 세포내 사이토카인 염색, ELISPOT 및 ELISA와 같은 사이토카인 분비 검정, 유세포측정법을 이용한 CD25, CD69, CD137, CD107a, PD1 및 CD62L과 같은 활성 마커의 발현이 포함되지만 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0553] 특정 실시형태들에 따르면, 신호전달 활성 또는 활성화의 결정은 본원 하기에 추가로 기술되는 바와 같이, 시험 관내에서(in-vitro) 또는 생체외에서(ex-vivo), 예를 들면 혼합 림프구 반응(MLR: mixed lymphocyte reaction)에서 달성된다.
- [0554] 동일한 배양 조건에 대해, 상기 신호전달 활성 또는 상기 면역 세포 활성화 또는 기능은 일반적으로 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 암호화하는 숙주 세포와 접촉하지 않거나; 또는 대조군으로서도 칭하는 비히클(vehicle) 대조군과 접촉한 동일한 종의 세포에서의 신호전달, 활성화 또는 기능과 비교하여 표현된다.
- [0555] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL은 상기 4-1BBL의 세포의 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0556] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 36을 포함한다.
- [0557] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 36으로 이루어진다.
- [0558] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 37을 포함한다.
- [0559] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 37로 이루어진다.

- [0560] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3을 포함한다.
- [0561] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3으로 이루어진다.
- [0562] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 38을 포함한다.
- [0563] 특정 실시형태들에 따르면, 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 38로 이루어진다.
- [0564] 상기 용어 "4-1BBL"은 또한 원하는 활성(본원 상기에 정의된 바와 같음)을 나타내는 기능성 동족체(천연 발생 또는 합성적으로/재조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은 예를 들면, 상기 폴리펩타이드 서열번호 3, 서열번호 36과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하거나 상동성일 수 있거나; 또는 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드 서열(본원 이하에 추가로 기술되는 바와 같음)과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일할 수 있다.
- [0565] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 기능성 동족체는 상기 폴리펩타이드 서열번호 3, 서열번호 36과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하거나 상동성이거나; 또는 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드(본원 이하에 추가로 기술되는 바와 같음)와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다.
- [0566] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 폴리펩타이드는 본원 상기 및 하기 추가로 기술되는 바와 같이 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0567] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 4-1BBL은 상기 폴리펩타이드 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 및/또는 서열번호 25와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하거나 상동성이거나; 또는 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드 서열(본원 하기에 추가로 기술되는 바와 같음)과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0568] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0569] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 및/또는 서열번호 25와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0570] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23 및/또는 서열번호 24와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0571] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0572] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 23과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0573] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 24와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0574] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 25와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0575] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 V6를 포함하지 않는다.
- [0576] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 G14를 포함하지 않는다.

- [0577] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 잔기 A1 내지 V6 또는 A1 내지 G14 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0578] 본원에서 사용되는 바와 같은 어구 "서열번호 3에 상응하는"은 임의의 다른 4-1BBL 아미노산 서열에 비교하여 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 의미한다.
- [0579] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 6 또는 서열번호 7 또는 이들의 임의의 단편을 포함하지 않는다.
- [0580] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 6 또는 서열번호 7을 포함하지 않는다.
- [0581] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25를 포함한다.
- [0582] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 24를 포함한다.
- [0583] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 또는 서열번호 23을 포함한다.
- [0584] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22를 포함한다.
- [0585] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 23을 포함한다.
- [0586] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL α 아미노산 서열은 서열번호 24를 포함한다.
- [0587] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 25를 포함한다.
- [0588] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25로 이루어진다.
- [0589] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 24로 이루어진다.
- [0590] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22 또는 서열번호 23으로 이루어진다.
- [0591] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22로 이루어진다.
- [0592] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 23으로 이루어진다.
- [0593] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL α 아미노산 서열은 서열번호 24로 이루어진다.
- [0594] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 25로 이루어진다.
- [0595] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0596] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0597] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0598] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0599] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [0600] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0601] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는다.
- [0602] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 잔기 G198 내지 E205 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0603] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 166 또는 이의 임의의 단편을 포함하지 않는다.
- [0604] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 166을 포함하지 않는다.
- [0605] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 또는 서열번호 129를 포함한다.
- [0606] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 또는 서열번호 129로 이루어진다.
- [0607] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0608] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125와 적어도 85%의 동일성을 갖는다.
- [0609] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125와 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0610] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125와 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0611] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0612] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0613] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는다.
- [0614] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 상응하는 아미노산 잔기 A1 내지 E23 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0615] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 167 또는 이의 임의의 단편을 포함하지 않는다.
- [0616] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 167을 포함하지 않는다.
- [0617] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125를 포함한다.
- [0618] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125로 이루어진다.
- [0619] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123과 적어도 80%의 동일성을 갖는다.
- [0620] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123과 적어도 85%의 동일성을 갖는다.
- [0621] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123과 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0622] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0623] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0624] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0625] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123을 포함한다.
- [0626] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123으로 이루어진다.

- [0627] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 및/또는 서열번호 42와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0628] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 및/또는 서열번호 42와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0629] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 및/또는 서열번호 42와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0630] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39 및/또는 서열번호 40과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0631] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 또는 서열번호 42를 포함한다.
- [0632] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39, 서열번호 40 또는 서열번호 41을 포함한다.
- [0633] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39 또는 서열번호 40을 포함한다.
- [0634] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39를 포함한다.
- [0635] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 40을 포함한다.
- [0636] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL α 핵산 서열은 서열번호 41을 포함한다.
- [0637] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 42를 포함한다.
- [0638] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 또는 서열번호 42로 이루어진다.
- [0639] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39, 서열번호 40 또는 서열번호 41로 이루어진다.
- [0640] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39 또는 서열번호 40으로 이루어진다.
- [0641] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 39로 이루어진다.
- [0642] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 40으로 이루어진다.
- [0643] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 41로 이루어진다.
- [0644] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 42로 이루어진다.
- [0645] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 128 및/또는 서열번호 30과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0646] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 128 및/또는 서열번호 130과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0647] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 128 및/또는 서열번호 130과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0648] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 128 또는 서열번호 130을 포함한다.
- [0649] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 128 또는 서열번호 130으로 이루어진다.
- [0650] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 126과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도

89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.

- [0651] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 126과 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0652] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 126과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0653] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 126을 포함한다.
- [0654] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 126으로 이루어진다.
- [0655] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 124와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0656] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 124와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0657] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 124와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0658] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 124를 포함한다.
- [0659] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 124로 이루어진다.
- [0660] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 100개 내지 30개의 아미노산, 150개 내지 250개의 아미노산, 100개 내지 250개의 아미노산, 150개 내지 220개의 아미노산, 180개 내지 220개의 아미노산, 180개 내지 210개의 아미노산, 185개 내지 205개의 아미노산, 190개 내지 210개의 아미노산을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0661] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 190개 내지 210개 길이의 아미노산들이다.
- [0662] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 204개 길이의 아미노산들이다.
- [0663] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이다.
- [0664] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개 내지 200개 길이의 아미노산들이다.
- [0665] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개 내지 199개 길이의 아미노산들이다.
- [0666] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 170개 내지 197개 길이의 아미노산들이다.
- [0667] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 170개 내지 182개 길이의 아미노산들이다.
- [0668] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 184개 길이의 아미노산들이다.
- [0669] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개, 191개, 197개 또는 199개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0670] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 184개 길이의 아미노산들이다.
- [0671] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 183개 길이의 아미노산들이다.
- [0672] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 182개 길이의 아미노산들이다.
- [0673] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 176개 길이의 아미노산들이다.
- [0674] 특정 실시형태들에 따르면, 본원에 개시된 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 또는 상기 4-1BBL 폴리펩타이드에 포함된 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함한다.
- [0675] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 3중 반복의 각각은 하기: (i) 4-1BB에 결합함; (ii) 4-1BB를 신호전달 경로를 활성화함; (iii) 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 활성화함, (iv) 동종삼량체를 형성함 중 적어도 하나를 행할 수 있다.
- [0676] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 상기 4-1BBL 아미노산 서열의 상기 3중 반복의 각각의

사이에 링커를 포함하지 않는다.

- [0677] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 상기 4-1BBL 아미노산 서열의 상기 3중 반복의 각각의 사이에 링커를 포함한다. 당해 분야에 공지되어 있는 임의의 링커가 본 발명의 특정 실시형태들과 함께 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 링커들의 비-제한적 예는 본원 이하에 상세하게 기술된다.
- [0678] 한 특정 실시형태에 따르면, 상기 링커는 (GGGGS)_x2+GGGG(서열번호 121) 링커이다.
- [0679] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 반복된 서열은 본원에 정의된 바와 같은 상기 4-1BBL 중 임의의 것일 수 있다.
- [0680] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 3중 반복은 동일한 4-1BBL 아미노산 서열을 갖는다.
- [0681] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 3중 반복은 독특하다, 즉 상이한 4-1BBL 아미노산 서열들을 갖는다.
- [0682] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 3중 반복 중 둘은 동일한 4-1BBL 아미노산 서열을 갖는다.
- [0683] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 3중 반복 적어도 하나는 본원에 개시된 4-1BBL 아미노산 서열을 포함한다.
- [0684] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 3중 반복 적어도 하나는 본원에 개시된 4-1BBL 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0685] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22를 포함하는 아미노산 서열의 3중 반복을 포함한다.
- [0686] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22로 이루어진 아미노산 서열의 3중 반복을 포함한다.
- [0687] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0688] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0689] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0690] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0691] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0692] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131을 포함한다.
- [0693] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131로 이루어진다.
- [0694] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 132와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0695] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 132와 적어도 95%의 동일성을 갖는다.
- [0696] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열번호 132와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0697] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 132를 포함한다.
- [0698] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 132로 이루어진다.
- [0699] 상기 용어 "DSP" 및 "융합 단백질", "키메라 단백질" 또는 "키메라"는 본원에서 상호교환적으로 (interchangeably) 사용되고, 자연에서 단일 아미노산 서열에서 함께 발견되지 않는 2개 이상의 부분을 갖는 아미노산 서열을 말한다.

- [0700] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 융합 단백질은 PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열을 포함한다(본원에서 PD1-4-1BBL 융합 단백질로서 칭함).
- [0701] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1은 상기 4-1BBL에 대한 N-말단이다.
- [0702] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1은 상기 4-1BBL에 대한 C-말단이다.
- [0703] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 본원에서 정의되는 바와 같은 임의의 PD1; 및 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은,
- [0704] (aa) 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 것이거나, 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 123과 적어도 80%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0705] (bb) 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하는, 임의의 4-1BBL 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0706] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은,
- [0707] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 것이고; 및/또는
- [0708] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는, 임의의 PD1 아미노산 서열; 및 본원에서 정의되는 바와 같은 임의의 4-1BBL을 포함할 수 있고; 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0709] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은,
- [0710] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 것이고; 및/또는
- [0711] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는, 임의의 PD1 아미노산 서열; 및 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은,
- [0712] (aa) 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 것이거나, 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들로서 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 것이거나, 또는 서열번호 123과 적어도 80%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0713] (bb) 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하는, 임의의 4-1BBL 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0714] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 본원에 정의된 바와 같은 임의의 PD1; 및 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은, 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들인, 임의의 4-1BBL 아미노산 서열을 포

함할 수 있고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [0715] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은,
- [0716] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 및/또는
- [0717] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는, 임의의 PD1 아미노산 서열; 및 본원에서 정의되는 바와 같은 임의의 4-1BBL을 포함할 수 있고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0718] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은, 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150을 포함하지 않는 임의의 PD1 아미노산 서열; 및 본원에서 정의되는 바와 같은 임의의 4-1BBL을 포함할 수 있고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0719] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은
- [0720] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및 서열번호 93을 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 것이고; 및/또는
- [0721] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는, 임의의 PD1 아미노산 서열; 및 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 임의의 4-1BBL 아미노산 서열을 포함할 수 있는 것이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0722] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들로서 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 임의의 PD1 아미노산 서열; 및 예를 들면, 본원에 개시되는 바와 같은 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 임의의 4-1BBL 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0723] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2, 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93, 서열번호 27, 서열번호 30 및/또는 서열번호 31과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0724] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73, 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 및/또는 서열번호 95와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0725] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2, 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 27, 서열번호 30 및/또는 서열번호 31과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고; 상기 4-

는 서열번호 95에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [0738] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73, 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0739] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 2, 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 27, 서열번호 30 또는 서열번호 31에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0740] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은:
- [0741] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및/또는 서열번호 93과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0742] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 및/또는 서열번호 36과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0743] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 및/또는 서열번호 21과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 및/또는 서열번호 36과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0744] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은:
- [0745] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 및/또는 서열번호 93을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0746] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0747] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 또는 서열번호 93을 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0748] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73, 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0749] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73을 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [0750] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0751] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0752] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73, 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0753] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0754] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3, 서열번호 22 내지 서열번호 25 또는 서열번호 36에 제시되는 바와 같고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0755] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0756] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25를 포함하는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이다.
- [0757] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같다.
- [0758] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 24와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이다.
- [0759] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 24를 포함하는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이다.
- [0760] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 24에 제시되는 바와 같다.
- [0761] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이다.

185개 내지 202개 길이의 아미노산들이다.

- [0775] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 20에 제시되는 바와 같고, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같다.
- [0776] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 21과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0777] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 21을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25를 포함하는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이다.
- [0778] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 21에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같다.
- [0779] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은:
- [0780] (a) 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89 또는 서열번호 93과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0781] (b) 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0782] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 85, 서열번호 89 또는 서열번호 93을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고 서열번호 22를 포함한다.
- [0783] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 85, 서열번호 89 또는 서열번호 93에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고 서열번호 22를 포함한다.
- [0784] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같다.
- [0785] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95를 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고 서열번호 22를 포함한다.
- [0786] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75, 서열번호 83, 서열번호 87, 서열번호 91 또는 서열번호 95에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같다.
- [0787] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75를 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고 서열번호 22를 포함한다.
- [0788] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 75에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같다.

- [0789] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 83을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고 서열번호 22를 포함한다.
- [0790] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 783에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25에 제시되는 바와 같다.
- [0791] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73을 포함하고, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3을 포함한다.
- [0792] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 73에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 제시되는 바와 같다.
- [0793] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 본원에서 정의되는 바와 같은 임의의 4-1BBL이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0794] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은:
- [0795] (aa) 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 125와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들이거나, 또는 서열번호 123과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0796] (bb) 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0797] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들이다.
- [0798] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115를 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 125를 포함하는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들이다.
- [0799] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노

산 서열은 서열번호 125에 제시되는 바와 같다.

- [0800] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이다.
- [0801] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115를 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123을 포함하는 184개 길이의 아미노산들이다.
- [0802] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123에 제시되는 바와 같다.
- [0803] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 본원에서 정의되는 바와 같은 임의의 4-1BBL이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0804] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은:
- [0805] (aa) 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 125와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들이거나, 또는 서열번호 123과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이고; 및/또는
- [0806] (bb) 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0807] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도

도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E205를 포함하지 않는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들이다.

- [0808] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들이다.
- [0809] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117 또는 서열번호 119에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127 또는 서열번호 129에 제시되는 바와 같다.
- [0810] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117을 포함하는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127을 포함하는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들이다.
- [0811] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 117에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 127에 제시되는 바와 같다.
- [0812] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 119를 포함하는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 129를 포함하는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들이다.
- [0813] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 119에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 129에 제시되는 바와 같다.
- [0814] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 184개 길이의 아미노산들이다.
- [0815] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115를 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123을 포함하는 184개 길이의 아미노산들이다.
- [0816] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 115에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 123에 제시되는 바와 같다.
- [0817] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.
- [0818] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들 또는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3을 포함한다.
- [0819] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 제시되는 바와 같다.
- [0820] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131

과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.

- [0821] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18을 포함하는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들 또는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131을 포함한다.
- [0822] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열번호 18에 제시되는 바와 같고; 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 131에 제시되는 바와 같다.
- [0823] 본 발명의 특정 실시형태들과 함께 사용될 수 있는 PD1 아미노산 서열 및 4-1BBL 아미노산 서열의 특정 조합의 비-제한적 예는 이어지는 실시예 섹션의 표 4에 제공되고, 이는 본 명세서의 필수적인 부분으로서의 역할을 한다.
- [0824] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드 또는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 가용성이다(즉, 합성 또는 천연 발생 표면에 고정되지 않음).
- [0825] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드 또는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 합성 또는 천연 발생 표면에 고정된다.
- [0826] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 가용성이다(즉, 합성 또는 천연 발생 표면에 고정되지 않음).
- [0827] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 합성 또는 천연 발생 표면에 고정된다.
- [0828] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 적어도 동종-삼량체의 형태로 존재한다.
- [0829] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%는 적어도 동종-삼량체의 형태로 존재하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0830] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동종-삼량체는 동종-삼량체를 포함한다.
- [0831] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동종-삼량체는 동종-사량체를 포함한다.
- [0832] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동종-삼량체는 동종-오량체를 포함한다.
- [0833] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동종-삼량체는 동종-육량체를 포함한다.
- [0834] 삼량체화를 측정하는 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, NATIVE-PAGE, SEC-HPLC 2D 겔, 겔 여과, SEC-MALS, 분석적 초원심분리(AUC), 질량 분광분석법(MS), 모세관 겔 전기영동(CGE)이 포함되지만 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0835] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동종-삼량체는 SEC-MALS에 의해 측정시 분자량이 적어도 100kD, 적어도 120kD, 적어도 140kD, 적어도 160kD, 적어도 180kD이다.
- [0836] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동종-삼량체는 SEC-MALS에 의해 측정시 분자량이 적어도 100kD이다.
- [0837] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동종-삼량체는 SEC-MALS에 의해 측정시 분자량이 적어도 140kD이다.
- [0838] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 적어도 동종-삼량체는 SEC-MALS에 의해 측정시 분자량이 적어도 200kD이다.
- [0839] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL은 상기 PD1과 상기 4-1BBL 사이에 링커를 포함하지 않는다.
- [0840] 몇몇의 실시형태들에 있어서, 상기 PD1-4-1BBL은 임의의 길이일 수 있는 링커를 포함한다.
- [0841] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 상기 PD1과 상기 4-1BBL 사이에 링커를 포함한다.
- [0842] 당해 분야에 공지되어 있는 임의의 링커는 본 발명의 특정 실시형태들과 함께 사용될 수 있다.
- [0843] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 천연-발생 다중-도메인 단백질로부터 유도될 수 있거나, 또는 예를 들면, 문헌[Chichili et al., (2013), Protein Sci. 22(2): 153-167, Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev.

65(10): 1357-1369]에 기술되어 있는 바와 같은 실증적 링커이고, 상기 문헌의 전문은 본원에 참조에 의해 포함된다. 몇몇의 실시형태들에 있어서, 상기 링커는 문헌[Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369 and Crasto et al., (2000), Protein Eng. 13(5):309-312]에 기술된 것들과 같은 링커 고안 데이터베이스 및 컴퓨터 프로그램을 이용하여 고안될 수 있고, 상기 문헌의 전문은 본원에 참조에 의해 포함된다.

- [0844] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 PEG와 같은 합성 링커이다.
- [0845] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 항체(예를 들면, IgG, IgA, IgD 또는 IgE) 또는 이의 단편의 Fc 도메인 또는 힌지(hinge) 영역이다.
- [0846] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 사람 IgG4의 Fc 도메인 또는 힌지 영역이다.
- [0847] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 Fc 도메인 링커는 서열번호 160을 포함한다.
- [0848] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 사람 IgG1의 Fc 도메인 또는 힌지 영역이다.
- [0849] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 Fc 도메인 링커는 서열번호 163을 포함한다.
- [0850] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 Fc 도메인 또는 상기 힌지 영역 링커는 보존적 및 비-보존적 아미노산 치환(본원에서 돌연변이로서도 칭함)을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0851] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 항체 또는 이의 단편의 Fc 도메인 또는 힌지 영역이 아니다.
- [0852] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 기능성일 수 있다. 예를 들면, 상기 링커는 제한 없이 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 폴딩(folding) 및/또는 안정성을 개선하고/하거나, 발현을 개선하고/하거나, 약동학(pharmacokinetics)을 개선하고/하거나, 생물활성(bioactivity)을 개선하는 기능을 할 수 있다. 다른 예에서, 상기 링커는 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질을 특정 세포 유형 또는 위치에 대해 표적하는 기능을 할 수 있다.
- [0853] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 폴리펩타이드이다.
- [0854] 폴리펩타이드 링커의 비-제한적 예로는 서열 LE, GGGGS(서열번호 150), (GGGGS)_n(n=1 내지 4)(서열번호 149), GGGSGGGG(서열번호 122), (GGGGS)_{x2}(서열번호 151), (GGGGS)_{x2}+GGGG(서열번호 121), (Gly)₈, (Gly)₆, (EAAAK)_n(n=1 내지 3)(서열번호 152), A(EAAAK)_nA(n = 2 내지 5)(서열번호 153), AEAAAKEAAAKA(서열번호 154), A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)4A(서열번호 155), PAPAP(서열번호 156), K ESGSVSS EQ LAQ FRS LD(서열번호 157), EGKSSSGSGSESKST(서열번호 158), GSAGSAAGSGEF(서열번호 159) 및 X가 임의의 아미노산, 예를 들면 Ala, Lys 또는 Glu를 나타내는 (XP)_n을 갖는 링커가 포함된다.
- [0855] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 GGGGS(서열번호 150), (GGGGS)_n(n=1 내지 4)(서열번호 149), GGGSGGGG(서열번호 122), (GGGGS)_{x2}(서열번호 151), (GGGGS)_{x2}+GGGG(서열번호 121)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0856] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 (GGGGS)_n(n=1 내지 4)(서열번호 149) 링커이다.
- [0857] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 (GGGGS)_{x2}(서열번호 151) 링커이다.
- [0858] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0859] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145와 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0860] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145와 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0861] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145와 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0862] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145와 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0863] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0864] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145를 포함한다.
- [0865] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 145로 이루어진다.
- [0866] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 GGGGSGGGG(서열번호 122) 링커이다.
- [0867] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 (GGGGS)_x2+GGGG(서열번호 121) 링커이다.
- [0868] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0869] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0870] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0871] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0872] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0873] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0874] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147을 포함한다.
- [0875] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147로 이루어진다.
- [0876] 몇몇의 실시형태들에 있어서, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 1개 내지 6개 길이의 아미노산들의 링커를 포함한다.
- [0877] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 실질적으로 글리신 및/또는 세린 잔기(예를 들면, 약 30%, 또는 약 40%, 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 97% 또는 100%의 글리신 및 세린)로 구성된다.
- [0878] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 링커는 단일 아미노산 링커이다.
- [0879] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 있어서, PD1 및 4-1BBL을 연결하는 하나의 아미노산은 본원에서 PD1-G-4-1BBL 융합 단백질로서도 칭하는 글리신이다.
- [0880] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107, 서열번호 111, 서열번호 113, 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0881] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노

호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [0903] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0904] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107 및 서열번호 111로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0905] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105 및 서열번호 107로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0906] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14 및 서열번호 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0907] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0908] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 101과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0909] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 103과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0910] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 105와 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0911] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 107과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0912] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 111과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0913] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12와 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0914] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 14와 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0915] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 16과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0916] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 113과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0917] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 133과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0918] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 135와 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0919] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 137과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0920] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 139와 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0921] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 141과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0922] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 143과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0923] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147과 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0924] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107, 서열번호 111, 서열번호 113, 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0925] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0926] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107 및 서열번호 111로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0927] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105 및 서열번호 107로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0928] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14 및 서열번호 16으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0929] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107, 서열번호 111, 서열번호 113, 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0930] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143 및 서열번호 147로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0931] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 44 내지 서열번호 56, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107 및 서열번호 111로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0932] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107 및 서열번호 111로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0933] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105 및 서열번호 107로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [0960] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 97로 이루어진다.
- [0961] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 101로 이루어진다.
- [0962] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 103으로 이루어진다.
- [0963] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 105로 이루어진다.
- [0964] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 107로 이루어진다.
- [0965] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 111로 이루어진다.
- [0966] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 12로 이루어진다.
- [0967] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 14로 이루어진다.
- [0968] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 16으로 이루어진다.
- [0969] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 113으로 이루어진다.
- [0970] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 133으로 이루어진다.
- [0971] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 135로 이루어진다.
- [0972] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 137로 이루어진다.
- [0973] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 139로 이루어진다.
- [0974] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 141로 이루어진다.
- [0975] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 143으로 이루어진다.
- [0976] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 서열번호 147로 이루어진다.
- [0977] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 길이 300 내지 900개의 아미노산들, 300개 내지 800개의 아미노산들, 300개 내지 600개의 아미노산들, 300개 내지 550개의 아미노산들, 300개 내지 500개의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0978] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 300개 내지 750개 길이의 아미노산들이다.
- [0979] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 308개 내지 750개 길이의 아미노산들이다.
- [0980] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 308개 내지 400개 길이의 아미노산들이다.
- [0981] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 308개 내지 350개 길이의 아미노산들이다.
- [0982] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 308개 내지 448개, 308개 내지 362개, 308개 내지 351개, 313개 내지 351개, 313개 내지 339개, 318개 내지 351개, 318개 내지 362개, 318개 내지 340개, 318개 내지 332개 길이의 아미노산들이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0983] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 308개 내지 488개 길이의 아미노산들이다.
- [0984] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 308개 내지 351개 길이의 아미노산들이다.
- [0985] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질 아미노산 서열은 318개 내지 351개 길이의 아미노산들이다.
- [0986] 본 발명의 특정 실시형태들과 함께 사용할 수 있는 특정 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 비-제한적 예는 이어지는 실

시에 섹션의 표 4에 제공되고, 이는 본 명세서의 필수적인 부분으로서의 역할을 한다.

- [0987] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2에 제시되어 있는 바와 같은 PD1 아미노산 서열 및 서열번호 3에 제시되어 있는 바와 같은 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0988] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2에 제시되어 있는 바와 같은 PD1 아미노산 서열 및 서열번호 3에 제시되어 있는 바와 같은 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율보다 적어도 1.5배 더 높다.
- [0989] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2에 제시되어 있는 바와 같은 PD1 아미노산 서열 및 서열번호 3에 제시되어 있는 바와 같은 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율보다 적어도 2배 더 높다.
- [0990] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 생산 수율보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0991] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 생산 수율보다 적어도 1.5배 더 높다.
- [0992] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 생산 수율보다 적어도 2배 더 높다.
- [0993] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2의 생산 수율보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0994] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드의 생산 수율은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 3의 생산 수율보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0995] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 응집체의 양은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 응집체의 양보다 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 더 낮고, 상기 응집체는 예를 들면, SDS-PAGE 또는 SEC-MALS에 의해 측정될 수 있는 바와 같은 분자량이 적어도 300kDa이다.
- [0996] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 응집체의 양은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 응집체의 양보다 적어도 20% 더 낮다.
- [0997] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 응집체의 양은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 응집체의 양보다 적어도 50% 더 낮다.
- [0998] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 활성은 예를 들면, 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2에 제시되어 있는 바와 같은 PD1 아미노산 서열 및 서열번호 3에 제시되어 있는 바와 같은 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 활성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [0999] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 활성은 예를 들면, 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 활성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1000] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드의 활성은 예를 들면, 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2의 활성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1001] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된

폴리펩타이드의 활성은 예를 들면, 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 3의 활성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [1002] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 안정성은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 3에 제시되어 있는 바와 같은 PD1 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 안정성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1003] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 안정성은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 안정성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1004] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드의 안정성은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2의 안정성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1005] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드의 안정성은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 3의 안정성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1006] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 안전성은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2에 제시되어 있는 바와 같은 PD1 아미노산 서열 및 서열번호 3에 제시되어 있는 바와 같은 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 안전성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1007] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 안전성은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 5의 안전성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1008] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드의 안전성은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 2의 안전성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1009] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드의 안전성은 동일한 생산 조건 하에서 서열번호 3의 안전성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1010] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 생산 조건은 포유동물 세포에서의 발현 및 5 내지 13일 동안 32°C 내지 37°C, 5% 내지 10%의 CO₂에서의 배양을 포함한다.
- [1011] 본 발명의 특정 실시형태들과 함께 사용할 수 있는 생산 조건들의 비-제한적 예는 이어지는 실시예 섹션에 개시된다.
- [1012] 따라서, 예를 들면 상기 융합 단백질을 암호화하는 발현 벡터, N 말단에 인공적 신호 펩타이드(예를 들면, 서열번호 4) 및 His-태그 및 C 말단에 정지 코돈(codon)을 포함하는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드 또는 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 Expi293F 또는 ExpiCHO 세포와 같은 포유동물 세포에서 발현된다. 상기 형질도입된(transduced) 세포는 이어서 Expi293F 또는 ExpiCHO 세포 제조업자 지침(Thermo)에 따라 세포-특이적 배양 배지에서 32°C 내지 37°C, 5 내지 10% CO₂에서 배양하고, 적어도 5일의 배양 후 상청액(supernatant)으로부터 단백질을 수집하고 정제한다.
- [1013] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 배양은 배치(batch), 분할-배치(split-batch), 유가-배치(fed-batch) 또는 관류(perfusion) 방식으로 작동된다.
- [1014] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 배양은 유가-배치 조건 하에 작동된다.
- [1015] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 배양은 37°C에서 달성된다.
- [1016] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 배양은 32°C로의 온도 변화(temperature shift)를 갖는 37°C에서 달성된다. 이러한 온도 변화는 정지상(stationary phase)에 도달하기 전에 세포 대사를 서행시키기 위해 달성될 수 있다.

- [1017] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 PDL1에 결합할 수 있다.
- [1018] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 서열번호 2와 비교하여 본원에 개시되어 있는 바와 같은 향상된 활성을 갖는다.
- [1019] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 하기:
- [1020] (i) 4-1BB에 결합함;
- [1021] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 세포에서 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [1022] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 공동-자극함
- [1023] 중 적어도 하나를 행할 수 있다.
- [1024] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 서열번호 3과 비교하여 본원에 개시되어 있는 바와 같은 향상된 활성을 갖는다.
- [1025] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 (i), (ii), (iii), (i)+(ii), (i)+(iii), (ii)+(iii), (i)+(ii)+(iii)을 행할 수 있다.
- [1026] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 하기:
- [1027] (i) PDL1 및 4-1BB를 결합함;
- [1028] (ii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포(예를 들면, T 세포)에서 상기 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; 및/또는
- [1029] (iii) 상기 4-1BB를 발현하는 면역 세포(예를 들면, T 세포)를 활성화함
- [1030] 중 적어도 하나를 행할 수 있다.
- [1031] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 서열번호 2에 제시되는 바와 같은 PD1 아미노산 서열 및 서열번호 3에 제시되는 바와 같은 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질과 비교하여 본원에 개시되는 바와 같이 향상된 활성을 갖는다.
- [1032] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 서열번호 5와 비교하여 본원에 개시되는 바와 같이 향상된 활성을 갖는다.
- [1033] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 (i), (ii), (iii), (i)+(ii), (i)+(iii), (ii)+(iii)을 행할 수 있다.
- [1034] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 (i)+(ii)+(iii)을 행할 수 있다.
- [1035] 결합을 결정하고, 4-1BB 신호전달 경로를 활성화하고 면역 세포를 활성화하는 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 본원의 상기 및 이어지는 실시예 섹션에 추가로 기술된다.
- [1036] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 조성물(예를 들면, 상기 융합 단백질)로서, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 또는 (이를 발현하는) 숙주 세포는 면역 세포를 활성화할 수 있고, 이들은 시험관내에서, 생체외에서 및/또는 생체내에서(in-vivo) 면역 세포를 활성화하는 방법에서 사용할 수 있다.
- [1037] 따라서, 본 발명의 한 양상에 따르면, 면역 세포를 활성화하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드 및/또는 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포의 존재시에 면역 세포를 시험관내에서 또는 생체외에서 활성화하는 단계를 포함하는 것인, 면역 세포를 활성화하는 방법이 제공된다.
- [1038] 본 발명의 다른 양상에 따르면, T 세포를 활성화하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드 및/또는 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 및 PDL1을 발현하는 세포의 존재시에 T 세포를 시험관내에서 또는 생체외에서 활성화하는 단계를 포함하는 것인, T 세포를 활성화하는 방법이 제공된다.

- [1039] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포의 존재시에 이루어진다.
- [1040] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포의 존재시에 이루어진다.
- [1041] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포의 존재시에 이루어진다.
- [1042] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포; 및 상기 4-1BBL 아미노산 서열, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포의 존재시에 이루어진다.
- [1043] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 4-1BBL를 발현한다.
- [1044] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 말초 단핵구 혈액 세포(PBMC: peripheral mononuclear blood cell)를 포함한다.
- [1045] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "말초 단핵구 혈액 세포(PBMC)"는 단일 핵을 갖는 혈액 세포를 말하고, 림프구, 단핵구 및 수지상 세포(DC: dendritic cell)가 포함된다.
- [1046] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PBMC는 수지상 세포(DC), T 세포, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1047] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PBMC는 T 세포, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포를 포함한다.
- [1048] PBMC를 획득하는 방법은 대상체로부터의 전혈을 채취하고 항-응고제(예를 들면, 헤파린 또는 시트레이트)를 함유하는 용기(container)에 수집하는 것; 및 성분채집술(apheresis)과 같이 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 이어서, 특정 실시형태들에 따르면, 적어도 하나의 유형의 PBMC가 말초 혈액으로부터 정제된다. 전혈로부터 PBMC를 정제하기 위한 몇몇의 방법들 및 시약들, 예를 들면 백혈구 성분채집술(leukapheresis), 침강(sedimentation), 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation)(예를 들면, 피콜(ficoll)), 원심 세정(centrifugal elutriation), 분획화(fractionation), 예를 들면, 적혈구 세포의 화학적 용해(예를 들면, ACK에 의함), 세포 표면 마커를 이용한 특이적 세포 유형의 선별(selection)[예를 들면, 인비트로젠(Invitrogen), 스템셀 테크놀로지스(Stemcell Technologies), 셀프로(Cellpro), 어드밴스트 마그네틱스(Advanced Magnetics) 또는 밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec.)으로부터 상업적으로 입수가 가능한 예를 들면, FACS 분류기 또는 마그네틱 셀 분리(magnetic cell separation) 기술을 이용함], 및 특이적 항체로의 근절(eradication)(예를 들면, 사멸)과 같은 방법에 의한 또는 음성 선택(negative selection)(예를 들면, 마그네틱 셀 분리 기술, FACS 분류기 및/또는 포획 ELISA 라벨링(capture ELISA labeling)을 이용함)에 기초한 친화성 기반 정제에 의한 특이적 세포 유형의 고갈(depletion)이 당해 분야 숙련자들에게 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 문헌[THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D.N. Weir, editor)] 및 문헌[FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A. Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000)]에 기술되어 있다.
- [1049] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 종양 침윤 림프구를 포함한다.
- [1050] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "종양 침윤 림프구(TIL: tumor infiltrating lymphocyte)"는 혈류를 막고 종양으로 이동하지 않은 단핵구 백혈구 세포를 말한다.
- [1051] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 TIL은 T 세포, B 세포, NK 세포 및 단핵구로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1052] TIL을 획득하는 방법은 예를 들면, 생검(biopsy) 또는 부검(necropsy)에 의해 대상체로부터 종양 샘플을 획득하고 이의 단일 세포 현탁액을 조제하는 것과 같이 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 상기 단일 세포 현탁액은 임의의 적합한 방식, 예를 들면 기계적으로(예를 들면, GentleMACS(TM) 분해기(밀테니 바이오텍, 오번, 캘리포니아)를 사용하여 종양을 분해함) 또는 효소적으로(예를 들면, 콜라게나 제 또는 DNase) 획득될 수 있다. 이어서, 적어도 하나의 유형의 TIL은 상기 세포 현탁액으로부터 정제될 수 있다. 원하는 유형의 TIL을 정제하기 위한 몇몇의 방법들 및 시약들, 예를 들면 세포 표면 마커를 이용한 특이적 세포 유형의 선별[예를 들면, 인비트

로겐, 스템셀 테크놀로지스, 셀프로, 어드밴스트 마그네틱스 또는 밀테니 바이오텍으로부터 상업적으로 입수가 가능한 예를 들면, FACS 분류기 또는 마그네틱 셀 분리 기술을 이용함], 및 특이적 항체로의 근절(예를 들면, 사멸)과 같은 방법에 의한 또는 음성 선택(예를 들면, 마그네틱 셀 분리 기술, FACS 분류기 및/또는 포획 ELISA 라벨링을 이용함)에 기초한 친화성 기반 정제에 의한 특이적 세포 유형의 고갈이 당해 분야 숙련가들에게 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 문헌[THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D.N. Weir, editor)] 및 문헌[FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A. Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000)]에 기술되어 있다.

- [1053] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 식세포작용 세포를 포함한다.
- [1054] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "식세포작용 세포"는 식세포작용을 할 수 있는 세포를 말하고, 전문 및 비-전문 식세포작용 세포 둘 다를 포함한다. 식세포작용을 분석하는 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 예를 들면 사멸 검정, 유세포측정법 및/또는 현미경 평가(생세포 이미징(live cell imaging), 형광 현미경 (fluorescence microscopy), 공초점 현미경(confocal microscopy), 전자 현미경(electron microscopy))가 포함된다. 특정 실시형태들에 따르면, 식세포작용 세포는 단핵구, 수지상 세포(DC) 및 과립구(granulocyte)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1055] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 단핵구를 포함한다.
- [1056] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 용어 "단핵구"는 순환하는 단핵구 및 조직에 존재하는 대식세포(단핵구 식세포로서도 칭함) 둘 다를 말한다.
- [1057] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 단핵구는 대식세포를 포함한다. 전형적으로, 대식 세포의 세포 표면 표현형 (phenotype)으로는 CD14, CD40, CD11b, CD64, F4/80(마우스)/EMR1(사람), 라이소자임(lysozyme) M, MAC-1/MAC-3 및 CD68이 포함된다.
- [1058] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 단핵구는 순환하는 단핵구를 포함한다. 전형적으로, 순환하는 단핵구의 세포 표면 표현형으로는 CD14 및 CD16(예를 들면, CD14⁺ CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, CD14⁺CD16⁺)이 포함된다.
- [1059] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 DC를 포함한다.
- [1060] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "수지상 세포(DC)"는 림프 또는 비-림프 조직에서 발견되는 형태학적으로 유사한 세포 유형의 다양한 집단의 임의의 구성원을 말한다. DC는 전문적인 항원 제시 세포(antigen presenting cell)의 한 부류이고, HLA-제한된 T 세포를 감작하기 위한 높은 능력을 갖는다. DC로는 예를 들면, 형질세포양(plasmacytoid) 수지상 세포, 골수성 수지상 세포(미성숙 및 성숙 수지상 세포 포함), 랑게르한스(Langerhans) 세포, 지상감입 세포(interdigitating cell), 소포성(follicular) 수지상 세포가 포함된다. 수지상 세포는 기능에 의해 또는 표현형, 특히 세포 표면 표현형에 의해 인식될 수 있다. 이들 세포는 세포 표면 상의 베일(veil)-유사 돌출부를 갖는 이들의 독특한 형태, 중간 내지 높은 수준의 표면 HLA-클래스 II 발현 및 T 세포에, 특히 나이브(naive) T 세포에 항원을 제시하는 능력을 특징으로 한다(문헌[Steinman R, et al., Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:271-196.]을 참조한다). 전형적으로, DC의 세포 표면 표현형으로는 CD1a⁺, CD4⁺, CD86⁺ 또는 HLA-DR이 포함된다. 상기 용어 DC는 미성숙 및 성숙 DC 둘 다를 포함한다.
- [1061] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 과립구를 포함한다.
- [1062] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "과립구"는 이들의 세포질에서 과립의 존재를 특징으로 하는 다형핵 백혈구를 말한다.
- [1063] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 과립구는 호중구(neutrophil)를 포함한다.
- [1064] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 과립구는 비만 세포(mast cell)를 포함한다.
- [1065] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 T 세포를 포함한다.
- [1066] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "T 세포"는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 표현형 중 어느 하나를 갖는 T 세포 수용체 (TCR: T cell receptor)⁺, CD3⁺를 갖는 분화된 림프구를 말한다. 상기 T 세포는 이펙터 또는 조절 T 세포 중 어느 하나일 수 있다.
- [1067] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "이펙터 T 세포"는 예를 들면, 사이토카인을 생산함으로써 다른 면역 세포를 활성화하거나 지시하는 T 세포를 말하고, 세포독성 활성을 갖고, 예를 들면 CD4⁺, Th1/Th2, CD8⁺ 세포독

성 T 림프구이다.

- [1068] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "조절 T 세포" 또는 "Treg"는 이펙터 T 세포뿐만 아니라 선천적 (innate) 면역계 세포를 포함하는 다른 T 세포의 활성화를 음성적으로(negatively) 조절하는 T 세포를 말한다. Treg 세포는 이펙터 T 세포 반응의 지속적인 억제를 특징으로 한다. 한 특정 실시형태에 따르면, Treg는 CD4+CD25+Foxp3+ T 세포이다.
- [1069] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포이다.
- [1070] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포이다.
- [1071] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 T 세포는 기억(memory) T 세포이다. 기억 T 세포의 비-제한적 예로는 CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7- 표현형을 갖는 이펙터 기억 CD4+ T 세포, CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7+ 표현형을 갖는 중앙 기억 CD4+ T 세포, CD3+/CD8+ CD45RA-/CCR7- 표현형을 갖는 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 CD3+/CD8+ CD45RA-/CCR7+ 표현형을 갖는 중앙 기억 CD8+ T 세포가 포함된다.
- [1072] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 T 세포는 목적하는 발현 생성물을 암호화하는 핵산 서열로 형질도입된 조작된 (engineered) T 세포를 포함한다.
- [1073] 특정 실시형태들에 따르면, 목적하는 상기 발현 생성물은 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [1074] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 어구 "TCR을 암호화하는 핵산 서열로 형질도입된" 또는 "TCR을 암호화하는 핵산 서열로의 형질도입"은 MHC의 맥락에서 제시되는 원하는 항원에 대한 특이성을 갖는 T 세포로부터의 가변성 α - 및 β -쇄(chain)의 클로닝(cloning)을 말한다. TCR로의 형질도입 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면 문헌[Nicholson et al. Adv Hematol. 2012; 2012:404081; Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22(2):85-94]; 및 문헌[Lamers et al, Cancer Gene Therapy (2002) 9, 613-623.]에 개시되어 있다.
- [1075] 본원에서 사용되는 바와 같은 어구 "CAR을 암호화하는 핵산 서열로 형질도입된" 또는 "CAR을 암호화하는 핵산 서열로의 형질도입"은 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열의 클로닝을 말하고, 여기서 상기 CAR은 항원 인식 모이어티 및 T-세포 활성화 모이어티를 포함한다. 키메라 항원 수용체(CAR)는 인공적으로 작제된 하이브리드(hybrid) 단백질 또는 T-세포 신호전달 또는 T-세포 활성화 도메인에 연결된 항체(예를 들면, 단일쇄 가변성 단편(scFv: single chain variable fragment))의 항원 결합 도메인을 함유하는 폴리펩타이드이다. CAR로의 형질도입 방법은 당해 분야에 공지되어 있고 예를 들면, 문헌[Davila et al. Oncoimmunology. 2012 Dec 1;1(9):1577-1583]; 문헌[Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22(2):85-94]; 문헌[Maus et al. Blood. 2014 Apr 24;123(17):2625-35]; 문헌[Porter DL The New England journal of medicine. 2011, 365(8):725-733]; 문헌[Jackson HJ, Nat Rev Clin Oncol. 2016;13(6):370-383]; 및 문헌[Globerson-Levin et al. Mol Ther. 2014;22(5):1029-1038]에 개시되어 있다.
- [1076] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 B 세포를 포함한다.
- [1077] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "B 세포"는 B 세포 수용체(BCR)+, CD19+ 및 또는 B220+ 표현형을 갖는 림프구를 말한다. B 세포는 특이적 항원에 결합하여 체액성 반응을 유발하는 이들의 능력을 특징으로 한다.
- [1078] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 NK 세포를 포함한다.
- [1079] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "NK 세포"는 CD16+ CD56+ 및/또는 CD57+ TCR- 표현형을 갖는 분화된 림프구를 말한다. NK는 특이적 세포용해성 효소의 활성화에 의해 "자기(self)" MHC/HLA 항원을 발현하는데 실패하는 세포에 결합하여 이를 사멸시키는 이들의 능력, NK 활성화 수용체에 대한 리간드를 발현하는 종양 세포 또는 다른 이환(diseased) 세포를 사멸시키는 능력, 및 상기 면역 반응을 자극하거나 억제하는 사이토카인이라고 칭하는 단백질 분자를 방출하는 능력을 특징으로 한다.
- [1080] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 NKT 세포를 포함한다.
- [1081] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "NKT 세포"는 반-불변(semi-invariant) $\alpha\beta$ T-세포 수용체를 발현하지만 NK1.1과 같은 NK 세포와 전형적으로 관련되어 있는 각종 분자 마커도 발현하는 T 세포의 특화된 (specialized) 집단을 말한다. NKT 세포로는 NK1.1+ 및 NK1.1-, 및 CD4+, CD4-, CD8+ 및 CD8- 세포가 포함된다. NKT 세포 상의 상기 TCR은 MHC I-유사 분자 CD1d에 의해 제시된 당지질 항원을 인식한다는 점에서 고유하다. NKT 세포는 염증 또는 면역 내성(immune tolerance) 중 어느 하나를 촉진시키는 사이토카인을 생산하는 이

들의 능력으로 인하여 보호 또는 유해 효과 중 어느 하나를 가질 수 있다.

- [1082] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 건강한 대상체로부터 획득된다.
- [1083] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 병리를 앓고 있는 대상체로부터 획득된다.
- [1084] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 PDL1 또는 외인성 PDL1을 발현하는 세포의 존재시에 이루어진다.
- [1085] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 외인성 PDL1을 발현하는 세포의 존재시에 이루어진다.
- [1086] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 외인성 PDL1은 가용성이다.
- [1087] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 외인성 PDL1은 고체 지지체에 고정된다.
- [1088] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 PDL1을 발현하는 세포의 존재시에 이루어진다.
- [1089] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PDL1을 발현하는 상기 세포는 병리학적(이환) 세포를 포함한다.
- [1090] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PDL1을 발현하는 상기 세포는 암 세포를 포함한다.
- [1091] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 적어도 1차 활성화 신호[예를 들면, 항원 제시 세포(APC) 상의 주요 조직적합성 복합체(MHC: Major Histocompatibility Complex)/펩타이드 복합체와 T-세포 수용체(TCR)의 라이게이션(ligation)]을 전송할 수 있는 자극제의 존재시에 이루어지고, 이는 세포 증식, 성숙, 사이토카인 생산, 식세포작용 및/또는 상기 면역 세포의 조절 또는 이펙터 기능의 유도를 초래한다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 자극제는 또한 2차 공동-자극 신호를 전송할 수 있다.
- [1092] 상기 자극제의 양 및 상기 자극제와 상기 면역 세포 사이의 비를 결정하는 방법은 당해 분야 숙련가의 능력 이내이고, 따라서 본원에 명시하지 않는다.
- [1093] 상기 자극제는 상기 면역 세포를 항원-의존적 또는 항원-독립적(즉, 폴리클로날(polyclonal)) 방식으로 활성화할 수 있다.
- [1094] 특정 실시형태들에 따르면, 자극제는 항원 비-특이적 자극제를 포함한다.
- [1095] 비-특이적 자극제는 당해 분야 숙련가에게 공지되어 있다. 따라서, 비-제한적 예로서, 상기 면역 세포가 T 세포를 포함하는 경우, 항원 비-특이적 자극제는 T 세포 표면 구조에 결합하여 상기 T 세포의 폴리클로날 자극을 유도할 수 있는 제제, 예를 들면 한정되는 것은 아니지만 항-CD28 항체와 같은 공동-자극 단백질과 병용된 항-CD3 항체일 수 있다. 다른 비-제한적 예로는 항-CD2, 항-CD137, 항-CD134, 노치(Notch)-리간드, 예를 들면, 델타-유사 1/4, 단독 또는 항-CD3과의 각종 조합으로의 Jagged1/2가 포함된다. T 세포의 폴리클로날 자극을 유도할 수 있는 다른 제제로는 미토겐(mitogen), PHA, PMA-이오노마이신(ionomycin), CEB 및 CytoStim(밀테니 바이오테크)이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 항원 비-특이적 자극제는 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함한다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 T 세포 자극제는 항-CD3 및 항-CD28 코팅된 비드(bead), 예를 들면 밀테니 바이오테크로부터 획득된 CD3CD28 MACSiBeads를 포함한다.
- [1096] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 자극제는 항원-특이적 자극제를 포함한다.
- [1097] 항원 특이적 T 세포 자극제의 비-제한적 예로는 항원-부하된(loaded) 항원 제시 세포[APC, 예를 들면 수지상 세포] 및 펩타이드 부하된 재조합 MHC가 포함된다. 따라서, 예를 들면, T 세포 자극제는 원하는 항원(예를 들면, 종양 항원)이 사전부하된 또는 원하는 항원을 암호화하는 mRNA로 형질감염된 수지상 세포일 수 있다.
- [1098] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 항원은 암 항원이다.
- [1099] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "암 항원"은 비-암성 세포와 비교하여 암성 세포에 의해 과발현되거나 단독으로 발현된 항원을 말한다. 암 항원은 공지된 암 항원 또는 암 세포를 발병시키는 새로운 특이적 항원(즉, 신생항원(neoantigen))일 수 있다.
- [1100] 공지된 암 항원에 대한 비-제한적 예로는 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-AS, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-AS, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, GAGE-I, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1/CT7, MAGE-C2, NY-ESO-1, LAGE-1, Ssx-1, Ssx-2(HOM-MEL-40), Ssx-3, Ssx-4, Ssx-5, SCP-1 및 XAGE, 멜라닌세포(melanocyte) 분화 항원, p53, ras, CEA, MUC1, PMSA, PSA, 티로시나제(tyrosinase), Melan-A, MART-1, gp100, gp75, 알파액티닌(alphaactinin)-4, Bcr-Ab1 융합 단백질, Casp-8, 베

타-카테닌(beta-catenin), cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, dek-can 융합 단백질, EF2, ETV6-AML1 융합 단백질, LDLR-푸코실트랜스퍼라제(fucosyltransferase)AS 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-2, 및 3, neo-PAP, 미오신(myosin) 클래스 I, OS-9, pml-RAR 알파 융합 단백질, PTPRK, K-ras, N-ras, 트리오스포스페이트 이소머라제(Triosephosphate isomerase), GnTV, Herv-K-mel, NA-88, SP17, 및 TRP2-Int2, (MART-I), E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 항원, EBNA, 사람 유두종 바이러스(HPV: human papillomavirus) 항원 E6 및 E7, TSP-180, MAGe-4, MAGe-5, MAGe-6, p185erbB2, p150erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 알파-태아 단백질 (fetoprotein), 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, O250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\170K, NYCO-I, RCASI, SDCCAG16, TA-90 (Mac-2 결합 단백질\사이클로필린(cyclophilin) C-관련 단백질), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, 티로시나제 관련 단백질, TRP-1 또는 TRP-2가 포함된다.

- [1101] 발현될 수 있는 다른 종양 항원은 당해 분야에 익히 공지되어 있다(예를 들면, 문헌[W000/20581; Cancer Vaccines and Immunotherapy (2000) Eds Stern, Beverley and Carroll, Cambridge University Press, Cambridge]을 참조한다). 이들 종양 항원의 서열은 공공의 데이터베이스로부터 용이하게 입수가능하지만, 문헌 [WO 1992/020356 AI, WO 1994/005304 AI, WO 1994/023031 AI, WO 1995/020974 AI, WO 1995/023874 AI & WO 1996/026214 AI]에서도 발견된다.
- [1102] 대안으로 또는 추가로, 종양 항원은 예를 들면, 생검에 의해 대상체로부터 취득된 암 세포를 이용하여 확인할 수 있다.
- [1103] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 상기 자극제는 암 세포를 포함한다.
- [1104] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 활성화는 항암제의 존재시에 이루어진다.
- [1105] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 면역 세포는 상기 활성화 후에 정제된다.
- [1106] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 취득가능한 단리된 면역 세포를 고려하였다.
- [1107] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명에 따라 사용되고/되거나 취득된 상기 면역 세포는 신선하게 단리되고, 보관, 예를 들면 향후 사용; 및 세포주(cell line)를 위해 장기간(예를 들면, 수개월, 수년) 동안 임의의 단계에서 예를 들면, 액체 질소 온도에서 냉동보존(cryopreserved)(즉 동결)될 수 있다.
- [1108] 냉동보존 방법은 당해 분야 숙련가에 의해 흔히 공지되어 있고, 예를 들면, 국제 특허 출원 공개 제 WO2007054160호 및 제WO 2001039594호 및 US 특허 출원 공개 제US20120149108호에 개시되어 있다.
- [1109] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명에 따라 취득된 상기 세포는 세포 은행 또는 보관소 또는 보관 시설에 보관 될 수 있다.
- [1110] 결과적으로, 본 교시는 또한 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들면 과다-증식성 질환; 면역 억제 및 감염과 관련된 질환에 대한 양자(adoptive) 면역 세포 치료요법들의 공급원으로서의 상기 단리된 면역 세포 및 본 발명의 방법의 사용을 제안하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [1111] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 활성화 후에 상기 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 양자 전이하는 단계를 포함한다.
- [1112] 특정 실시형태들에 따르면, 양자 세포 치료요법에서 사용하기 위한 본 발명의 방법에 따라 취득가능한 상기 면역 세포가 제공된다.
- [1113] 본 발명의 특정 실시형태들에 따라 사용되는 상기 세포는 자가(autoologous) 또는 비-자가일 수 있고; 이들은 동계(syngeneic) 또는 비-동계: 대상체에 대해 동종이계(allogeneic) 또는 이종(xenogeneic)일 수 있고; 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1114] 본 교시는 또한 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법에 있어서 본 발명의 조성물 (예를 들면, 상기 융합 단백질, 상기 PD1 d아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 상기 4-1BB 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포)의 사용을 고려한다.
- [1115] 따라서, 본 발명의 다른 양상에 따르면, 치료를 필요로 하는 대상체에게 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기

PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드 및/또는 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물, 또는 이를 암호화하는 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

- [1116] 본 발명의 다른 양상에 따르면, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환의 치료에 사용하기 위한 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드 및/또는 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물 또는 이를 암호화하는 숙주 세포가 제공된다.
- [1117] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 치료하는 또는 상기 치료는 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 이용하여 이루어진다.
- [1118] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 치료하는 또는 상기 치료는 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 이용하여 이루어진다.
- [1119] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 치료하는 또는 상기 치료는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 이용하여 이루어진다.
- [1120] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 치료하는 또는 상기 치료는 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포; 및 상기 4-1BBL 아미노산 서열, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 이용하여 이루어진다.
- [1121] 상기 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 병리(질환, 장애 또는 의학적 병태)의 발병을 억제하거나, 예방하거나 또는 저지하고/하거나 병리 또는 병리의 증상의 감소, 경감 또는 퇴보를 야기하는 것을 말한다. 당해 분야 숙련자들은 각종 방법론 및 검정을 이용하여 병리의 발병을 평가할 수 있고, 마찬가지로 각종 방법론 및 검정을 이용하여 병리의 감소, 경감 또는 퇴보를 평가할 수 있음을 이해할 것이다.
- [1122] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "대상체"로는 포유동물, 예를 들면 임의의 연령 및 임의의 성별의 사람이 포함된다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 용어 "대상체"는 병리(질환, 장애 또는 의학적 병태)를 앓고 있는 대상체를 말한다. 특정 실시형태들에 따르면, 이러한 용어는 병리를 발병할 위험이 있는 개체를 포함한다.
- [1123] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 대상체는 PDL1을 발현하는 세포와 관련된 질환으로 고통받는다.
- [1124] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 대상체의 이환 세포는 PDL1을 발현한다.
- [1125] 본원에서 사용되는 상기 어구 "면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환"은 대상체의 면역 반응 활성이 적어도 질환의 증상을 완화시키거나 증상의 개시를 지연시키는데 충분할 수 있지만 그렇게 하면 임의의 이유로 대상체의 면역 반응의 활성이 최적 미만인 것인 질환을 말한다.
- [1126] 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환의 비-제한적 예로는 과다-증식성 질환, 면역 억제와 관련된 질환, 투약(medication)(예를 들면, mTOR 억제제, 칼시뉴린(calcineurin) 억제제, 스테로이드)에 의해 야기된 면역 억제 또는 감염과 관련된 질환 및 감염이 포함된다.
- [1127] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 질환은 과다-증식성 질환을 포함한다.
- [1128] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 과다-증식성 질환은 경화증, 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 건선, 전신 경화증/피부경화증, 원발 담즙성 담관염, 원발 경화성 담관염, 간 섬유증, 방사선-유도된 폐 섬유증, 골수 섬유증 또는 후복막 섬유증의 예방을 포함한다.
- [1129] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 과다-증식성 질환은 암을 포함한다.
- [1130] 따라서, 본 발명의 다른 양상에 따르면, 본원에서 개시되는 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드 및/또는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 방법이 제공된다.
- [1131] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 암은 악성 및 전(pre)-악성 암 둘 다를 포함한다.

- [1132] 암의 전-악성 또는 양성 형태와 관련하여, 임의로 이의 조성물 및 방법은 전-악성 암의 악성 형태로의 진행을 정지시키기 위해 적용될 수 있다.
- [1133] 본 발명의 몇몇 실시형태들의 방법들에 의해 치료될 수 있는 암은 임의의 고형 또는 비-고형 암 및/또는 암 전이일 수 있다.
- [1134] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 악성 암을 포함한다.
- [1135] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 방법에 의해 치료될 수 있는 암은 임의의 고형 또는 비-고형 암 및/또는 암 전이일 수 있다. 암의 예로는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 이러한 암의 보다 구체적인 예로는 편평세포암, 폐암(소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 및 폐의 편평 암종 포함), 복막의 암, 간세포암, 위암(gastric or stomach cancer)(위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포종, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암(kidney or renal cancer), 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종 및 각종 유형의 두경부암, 및 B-세포 림프종[저등급/소포성 비-호지킨 림프종(NHL: non-Hodgkin's lymphoma); 소형 림프구성(SL: small lymphocytic) NHL; 중간 등급/소포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 버킷(Burkitt) 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL: diffused large B cell lymphoma), 고등급 림프모구성 NHL, 고등급 소형 비-분할(non-cleaved) 세포 NHL; 거대 질환(bulky disease) NHL; 외투 세포(mantle cell) 림프종, AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 거대 글로불린혈증(Waldenstrom's Macroglobulinemia) 포함]; T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병(CLL: chronic lymphocytic leukemia); 급성 림프모구성 백혈병(ALL: acute lymphoblastic leukemia); 급성 골수성 백혈병(AML: Acute myeloid leukemia), 급성 전골수세포성 백혈병(APL: Acute promyelocytic leukemia), 모발상 세포 백혈병(Hairy cell leukemia); 만성 골수모구성 백혈병(CML: chronic myeloblastic leukemia) 및 이식-후 림프구 증식성 장애(PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorder) 및 모반증(phakomatoses)과 관련된 비정상 혈관 증식, 부종(예를 들면, 뇌 종양과 관련된 것), 및 메이그 증후군(Meigs' syndrome)이 포함된다. 바람직하게, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 직장암, 비-소세포 폐암, 비-호지킨 림프종(NHL), 신세포 암, 전립선암, 간암, 췌장암, 연조직 육종, 카포시(Kaposi) 육종, 유암종 암종, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종 및 다발성 골수종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 치료를 받을 수 있는 암성 병태로는 전이성 암이 포함된다.
- [1136] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 전-악성 암을 포함한다.
- [1137] 전-악성 암(또는 전암(pre-cancer)은 당해 분야에 익히 특성확인 및 공지되어 있다(예를 들면, 문헌[Berman JJ. and Henson DE., 2003. Classifying the precancers: a metadata approach. BMC Med Inform Decis Mak. 3:8]을 참조한다). 본 발명의 방법을 통한 치료를 받을 수 있는 전-악성 암의 부류로는 후천적 소형 또는 미세한 전-악성 암, 핵 비정형성(nuclear atypia)을 갖는 후천적 거대 병변, 암으로 진행되는 유전적 과다형성 증후군(inherited hyperplastic syndrome)과 함께 발생하는 전구체 병변(precursor lesion) 및 후천적 미만성 과다형성증 및 미만성 화생(metaplasia)이 포함된다. 소형 또는 미세한 전-악성 암의 예로는 HGSIL(High grade squamous intraepithelial lesion of uterin cervix: 자궁 경부의 고등급 편평 상피내 병변), AIN(anal intraepithelial neoplasia: 항문 상피내 신생물), 성대의 이형성증, (결장의) 이상 음와(aberrant crypts), PIN(prostatic intraepithelial neoplasia: 전립선 상피내 신생물)이 포함된다. 핵 비정형성을 갖는 후천적 거대 병변의 예로는 관상 선종, AILD(angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia: 이상단백혈증을 갖는 혈관면역모세포 림프절병증), 비정형 수막종, 위 용종, 거대 플라크 유사건선(large plaque parapsoriasis), 골수 이형성증, 유두상 이행 세포 제자리 암종(papillary transitional cell carcinoma in-situ), 모세포 과다 불응성 빈혈(refractory anemia with excess blasts) 및 슈나이더 유두종(Schneiderian papilloma)이 포함된다. 암으로 진행되는 유전적 과다형성 증후군과 함께 발생하는 전구체 병변의 예로는 비정형 점 증후군(atypical mole syndrome), C 세포 선종증 및 MEA가 포함된다. 후천적 미만성 과다형성증 및 미만성 화생의 예로는 AIDS, 비정형 림프구 과다형성증, 뼈의 파제트(Paget) 질환, 이식-후 림프구 증식성 질환 및 케양성 결장염이 포함된다.
- [1138] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 급성 골수성 백혈병, 항문암, 기저 세포 암종, B-세포 비-호지킨 림프종, 담도암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수세포성 백혈병(CML), 결장직장암, 피부 T-세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 자궁내막암, 식도암, 나팔관암, 소포성 림프종, 위암, 위식도(GE) 접합부 암종, 생식 세포 종양, 배아세포종(Germinomatous)(정상피종(Seminomatous)), 생식 세포 종양, 다형성 교모세포종(GBM: Glioblastoma Multiforme), 교육종, 두경부암, 간세포 암종, 호지킨 림프종, 하인두암,

후두암, 평활근육종, 외투 세포 림프종, 흑색종, 메르켈(Merkel) 세포 암종, 다발성 골수종, 신경내분비 종양, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 구강(입)암, 구인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 말초 신경초 종양(신경섬 유육종), 말초 T-세포 림프종(PTCL: peripheral T-Cell Lymphoma), 복막암, 전립선암, 신세포 암종, 타액선암, 피부암, 소세포 폐암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 활막 육종, 고환암, 갑상선 암종, 갑상선암, 요관암, 요도 암, 자궁암, 질암 또는 외음부암이다.

- [1139] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 급성 골수성 백혈병, 방광암, 유방암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수 성 백혈병, 결장직장암, 미만성 거대 B-세포 림프종, 상피 난소암, 상피 종양, 나팔관암, 소포성 림프종, 다형 성 교모세포종, 간세포 암종, 두경부암, 백혈병, 림프종, 외투 세포 림프종, 흑색종, 중피종, 다발성 골수종, 비인두암, 비 호지킨 림프종, 비-소세포 폐 암종, 난소암, 전립선암 또는 신세포 암종이다.
- [1140] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 림프종, 백혈병 및 암종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1141] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 림프종, 백혈병, 결장암, 췌장암, 난소암, 폐암 및 편평 세포 암종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1142] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 결장 암종이다.
- [1143] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 난소 암종이다.
- [1144] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 폐 암종이다.
- [1145] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 두경부 암종이다.
- [1146] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 백혈병이다.
- [1147] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 백혈병은 급성 비림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈 병, 만성 과립구성 백혈병, 급성 전골수세포성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병, 무백혈성 백혈병(aleukemic leukemia), 백혈구증가성 백혈병(leukocytchemic leukemia), 호염구성 백혈병(basophylic leukemia), 모세포 백 혈병, 소 백혈병, 만성 골수세포성 백혈병, 피부 백혈병, 태아 백혈병, 호산구성 백혈병, (Ross') 백혈병, 모발 상 세포 백혈병, 혈모세포성 백혈병, 혈구모세포성 백혈병, 조직구성 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 림프성 백혈병, 림프모구성 백혈병, 림프구성 백혈병, 림프형성 백혈병, 림프 백혈병, 림프육종 세포 백혈병, 비만 세 포 백혈병, 거핵구성 백혈병, 소골수모구성 백혈병, 단핵구성 백혈병, 골수모구성 백혈병, 골수 백혈병, 골수성 과립구성 백혈병, 골수단핵구성 백혈병, 네겔리(Naegeli) 백혈병, 형질 세포 백혈병, 형질구성 백혈병, 전골수 구성 백혈병, 리더(Rieder) 세포 백혈병, 쉐링(Schilling) 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 아백혈성 백혈병, 및 미분화 세포 백혈병으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1148] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 백혈병은 전골수구성 백혈병, 급성 골수 백혈병 또는 만성 골수성 백혈병이다.
- [1149] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 림프종이다.
- [1150] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 림프종은 B 세포 림프종이다.
- [1151] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 림프종은 T 세포 림프종이다.
- [1152] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 림프종은 호지킨 림프종이다.
- [1153] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 림프종은 비-호지킨 림프종이다.
- [1154] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 비-호지킨 림프종은 공격성 NHL, 형질전환된 NHL, 지연형(indolent) NHL, 재발 성 NHL, 난치성 NHL, 저등급 비-호지킨 림프종, 소포성 림프종, 거대 세포 림프종, B-세포 림프종, T-세포 림프 종, 외투 세포 림프종, 버키트 림프종, NK 세포 림프종, 미만성 B-세포 림프종, 급성 림프모구성 림프종, 및 균 상 식육종/세자리(Sezary) 증후군을 포함하는 피부 T 세포 암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1155] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 다발성 골수종이다.
- [1156] 적어도 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 다발성 골수종은
- [1157] 카파-유형의 경쇄 및/또는 람다-유형의 경쇄를 생성시키는 다발성 골수종 암; 원발성 형질 세포 백혈병(PCL)을 포함하는 공격성 다발성 골수종; 다발성 골수종으로 진행할 수 있는 MGUS(monoclonal gaamopathy of undetermined significance), 발텐스트롬 거대 글로불린혈증(WM, 림프형질세포성 림프종으로서도 공지되어 있음)과 같은 양성 형질 세포 장애; 무증상 다발성 골수종(SMM: smoldering multiple myeloma), 지연형 다발성

골수종, 또한 다발성 골수종으로 진행할 수 있는 전악성 형태의 다발성 골수종; 원발성 아미로이드증으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [1158] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암은 종양 미세-환경에 종양-침윤성 림프구(TIL)를 갖는 종양 및/또는 종양 미세-환경에 상대적으로 높은 PDL1의 발현을 갖는 종양의 존재에 의해 정의된다.
- [1159] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 암의 세포는 PDL1을 발현한다.
- [1160] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 질환은 면역 억제와 관련된 질환 또는 투약(예를 들면, mTOR 억제제, 칼시뉴린 억제제, 스테로이드)에 의해 야기된 면역억제를 포함한다.
- [1161] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 질환은 HIV, 홍역, 인플루엔자, LCCM, RSV, 사람 리노바이러스, EBV, CMV 또는 파르보 바이러스를 포함한다.
- [1162] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 질환은 감염을 포함한다.
- [1163] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "감염" 또는 "감염성 질환"은 병원체에 의해 유도된 질환을 말한다. 병원체의 구체예로는 바이러스성 병원체, 세균성 병원체, 예를 들면 세포내 마이코박테리아 병원체(예를 들면, 마이코박테리움 투베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)), 세포내 세균성 병원체(예를 들면, 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes)) 또는 세포내 원생동물 병원체(예를 들면, 리슈마니아(Leishmania) 및 트리파노소마(Trypanosoma))가 포함된다.
- [1164] 본 발명의 교시에 따라 치료가능한 감염성 질환을 야기하는 바이러스성 병원체의 구체적 유형으로는 레트로바이러스, 서코바이러스(circovirus), 파코바이러스, 파포바이러스(papovavirus), 아데노바이러스(adenovirus), 헤르페스바이러스(herpesvirus), 이리도바이러스(iridovirus), 포스바이러스(poxvirus), 헤파드나바이러스(hepadnavirus), 피코르나바이러스(picornavirus), 칼리시바이러스(calicivirus), 토가바이러스(togavirus), 플라비바이러스(flavivirus), 레오바이러스(reovirus), 오르토믹소바이러스(orthomyxovirus), 파라믹소바이러스(paramyxovirus), 라브도바이러스(rhabdovirus), 분야바이러스(bunyavirus), 코로나바이러스(coronavirus), 아레나바이러스(arenavirus) 및 필로바이러스(filovirus)가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [1165] 본 발명의 교시에 따라 치료될 수 있는 바이러스성 감염의 구체예로는 사람 면역결핍 바이러스(HIV)-유도된 후천적 면역결핍 증후군(AIDS), 인플루엔자, 리노바이러스 감염, 바이러스성 뇌수막염, 엡스타인-바 바이러스(EBV: Epstein-Barr virus) 감염, 간염 A, B 또는 C 바이러스 감염, 홍역, 유두종 바이러스 감염/사마귀, 사이토메갈로바이러스(CMV: cytomegalovirus) 감염, 헤르페스 심플렉스(Herpes simplex) 바이러스 감염, 황열, 에볼라(Ebola) 바이러스 감염, 광견병 등이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [1166] 특정 실시형태들에 따르면, 본원에 개시되는 상기 조성물(예를 들면, PD1-4-1BBL 융합 단백질, PD1 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물 및/또는 이를 발현하는 숙주-세포)은 당해 분야에 익히 공지되어 있는 진통제, 화학치료제, 방사선 치료제, 세포독성 치료요법(컨디셔닝(conditioning)), 호르몬 치료요법, 항체 및 기타 치료 용법(예를 들면, 수술)을 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아닌 면역 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환(예를 들면, 암)을 치료하기 위한 다른 확립된 또는 실험적 치료학적 용법과 함께 대상체에게 투여될 수 있다.
- [1167] 특정 실시형태들에 따르면, 본원에 개시된 상기 조성물(예를 들면, PD1-4-1BBL 융합 단백질, PD1 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 작제물 및/또는 이를 발현하는 숙주 세포)은 이들에 한정되는 것은 아니지만 예를 들면, 골수 세포의 이식, 조혈모 세포(hematopoietic stem cell), PBMC, 제대혈 줄기 세포(cord blood stem cell) 및/또는 유도된 만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cell)의 이식과 같은 양자 세포 이식과 함께 대상체에게 투여될 수 있다.
- [1168] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 조성물과 함께 투여된 상기 치료학적 제제는 항암제를 포함한다.
- [1169] 따라서, 본 발명의 다른 양상에 따르면, 암의 치료 방법으로서, 치료를 필요로 하는 대상체에게 항암제; 및 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드 및/또는 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 방법이 제공된다.

[1170]

본 발명의 특정 실시형태들과 함께 사용될 수 있는 항암제로는 항암 약물 아시비신(Acivicin); 아클라루비신(Aclarubicin); 아코다졸 하이드로클로라이드(Acodazole Hydrochloride); 아크로닌(Acronine); 아드리아마이신(Adriamycin); 아도젤레신(Adozelesin); 알데스류킨(Aldesleukin); 알트레타민(Altretamine); 암보마이신(Ambomycin); 아메탄트론 아세테이트(Ametantrone Acetate); 아미노글루테티미드(Aminoglutethimide); 암사크린(Amsacrine); 아나스트로졸(Anastrozole); 안트라마이신(Anthramycin); 아스파라기나제(Asparaginase); 아스페를린(Asperlin); 아자시티딘(Azacitidine); 아제테파(Azetepa); 아조토마이신(Azotomycin); 바티마스타트(Batimastat); 벤조데파(Benzodepa); 비칼루타미드(Bicalutamide); 비스안트렌(Bisantrene) 하이드로클로라이드; 비스나피드 디메실레이트(Bisnafide Dimesylate); 비젤레신(Bizelesin); 블레오마이신 설페이트(Bleomycin Sulfate); 브레키나르 나트륨(Brequinar Sodium); 브로피리민(Bropirimine); 부설판(Busulfan); 캅티노마이신(Cactinomycin); 칼루스테론(Calusterone); 카라세미드(Caracemide); 카르베티머(Carbetimer); 카르보플라틴(Carboplatin); 카르무스틴(Carmustine); 카루비신(Carubicin) 하이드로클로라이드; 카르젤레신(Carzelesin); 세데핀골(Cedefingol); 클로람부실(Chlorambucil); 시롤레마이신(Cirolemycin); 시스플라틴(Cisplatin); 클라드리빈(Cladribine); 크리스나톨 메실레이트(Crisnatol Mesylate); 사이클로포스파미드(Cyclophosphamide); 시타라빈(Cytarabine); 다카르바진(Dacarbazine); 닥티노마이신(Dactinomycin); 다우노루비신(Daunorubicin) 하이드로클로라이드; 데시타빈(Decitabine); 텍소르마플라틴(Dexormaplatin); 데자구아닌(Dezaguanine); 데자구아닌 메실레이트(Dezaguanine Mesylate); 디아지쿠온(Diaziquone); 도세탁셀(Docetaxel); 독소루비신(Doxorubicin); 독소루비신 하이드로클로라이드; 드롤록시펜(Droxifene); 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트(Dromostanolone Propionate); 두아조마이신(Duazomycin); 에다트렉세이트(Edatrexate); 에플로니틴(Eflornithine) 하이드로클로라이드; 엘사미트루신(Elsamitrucin); 엔로플라틴(Enloplatin); 엔프로메이트(Enpromate); 에피프로피딘(Epipropidine); 에피루비신(Epirubicin) 하이드로클로라이드; 에르불로졸(Erbulozole); 에소루비신(Esorubicin) 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴(Estramustine); 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨(Estramustine Phosphate Sodium); 에타니다졸(Etanidazole); 에토포시드(Etoposide); 에토포시드(Etoposide) 포스페이트; 에토프린(Etoprine); 파드로졸(Fadrozole) 하이드로클로라이드; 파자라빈(Fazarabine); 펜레티나이드(Fenretinide); 플록스우리딘(Floxuridine); 플루다라빈(Fludarabine) 포스페이트; 플루오로우라실(Fluorouracil); 플루오로시타빈(Fluorocitabine); 포스퀴돈(Fosquidone); 포스트리에신(Fostriecin) 나트륨; 겐시타빈(Gemcitabine); 겐시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시우레아(Hydroxyurea); 이다루비신(Idarubicin) 하이드로클로라이드; 이포스파미드(Ifosfamide); 일모포신(Ilmofofosine); 인터페론 알파-2a(Interferon Alfa-2a); 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-1a; 인터페론 감마-1b; 이프로플라틴(Iproplatin); 이리노테칸(Irinotecan) 하이드로클로라이드; 란레오티드(Lanreotide) 아세테이트; 레트로졸(Letrozole); 류프롤리드(Leuprolide) 아세테이트; 리아로졸(Liarozole) 하이드로클로라이드; 로메트렉솔(Lometrexol) 나트륨; 로무스틴(Lomustine); 로속산트론(Losoxantrone) 하이드로클로라이드; 마소프로콜(Masoprocol); 메이탄신(Maytansine); 메클로로에타민(Mechlorethamine) 하이드로클로라이드; 메게스트롤(Megestrol) 아세테이트; 멜렌게스트롤(Melengestrol) 아세테이트; 멜팔란(Melphalan); 메노가릴(Menogaril); 메르캅토피린(Mercaptopurine); 메토티렉세이트(Methotrexate); 메토티렉세이트 나트륨; 메토프린(Metoprine); 메투레데파(Meturedepa); 미틴도미드(Mitindomide); 미토카르신(Mitocarcin); 미토크로민(Mitocromin); 미토길린(Mitogillin); 미토말신(Mitomalcin); 미토마이신(Mitomycin); 미토스페르(Mitosper); 미토탄(Mitotane); 미톡산트론(Mitoxantrone) 하이드로클로라이드; 마이코페놀산(Mycophenolic Acid); 노코다졸(Nocodazole); 노갈라마이신(Nogalamycin); 오르마플라틴(Ormaplatin); 옥시수란(Oxisuran); 파클리탁셀(Paclitaxel); 페가스파르가제(Pegaspargase); 펠리오마이신(Peliomycin); 펜타무스틴(Pentamustine); 페플로마이신 설페이트(Plomycin Sulfate); 페르포스파미드(Perfosfamide); 피포브로만(Pipobroman); 피포설판(Piposulfan); 피록산트론(Piroxantrone) 하이드로클로라이드; 플리카마이신(Plicamycin); 플로메스탄(Plomestane); 포르피머(Porfimer) 나트륨; 포르피로마이신(Porfiromycin); 프레드니무스틴(Prednimustine); 프로카르바진(Procarbazine) 하이드로클로라이드; 퓨로마이신(Puromycin); 퓨로마이신 하이드로클로라이드; 피라조푸린(Pyrazofurin); 리보프린(Riboprine); 로글레티미드(Rogletimide); 사핀골(Safingol); 사핀골 하이드로클로라이드; 세무스틴(Semustine); 심트라젠(Simtrazene); 스파르포세이트(Sparfosate) 나트륨; 스파르소마이신(Sparsomycin); 스피로게르마늄(Spirogermanium) 하이드로클로라이드; 스피로무스틴(Spiromustine); 스피로플라틴(Spiroplatin); 스트렙토니그린(Streptonigrin); 스트렙토조신(Streptozocin); 설로페누르(Sulofenur); 탈리소마이신(Talisomycin); 탁솔(Taxol); 테코갈란(Tecogalan) 나트륨; 테가푸르(Tegafur); 텔록산트론(Teloxantrone) 하이드로클로라이드; 테모포르핀(Temoporfirin); 테니포시드(Teniposide); 테록시론(Teroxirone); 테스트락톤(Testolactone); 티아미프린(Thiamiprine); 티오구아닌(Thioguanine); 티오테파(Thiotepa); 티아조푸이린(Tiazofuirin); 티라파자민(Tirapazamine); 토포테칸(Topotecan)

하이드로클로라이드; 토레미펜(Toremifene) 시트레이트; 트레스톨론(Trestolone) 아세테이트; 트리시리빈(Triciribine) 포스페이트; 트리메트렉세이트(Trimetrexate); 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트(Glucuronate); 트립토렐린(Triptorelin); 투블로졸(Tubulozole) 하이드로클로라이드; 우라실 머스타드(Uracil Mustard); 우레데파(Uredepa); 바프레오티드(Vapreotide); 베르테포르핀(Verteporfin); 빈블라스틴(Vinblastine) 설페이트; 빈크리스틴(Vincristine) 설페이트; 빈데신(Vindesine); 빈데신 설페이트; 비네피딘(Vinepidine) 설페이트; 빈글리시네이트(Vinglycinate) 설페이트; 빈류로신(Vinleurosine) 설페이트; 비노렐빈 타르트레이트(Vinorelbine Tartrate); 빈로시딘(Vinrosidine) 설페이트; 빈졸리딘(Vinzolidine) 설페이트; 보로졸(Vorozole); 제니플라틴(Zeniplatin); 지노스타틴(Zinostatin); 조루비신(Zorubicin) 하이드로클로라이드가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 추가의 항신생물제는 항신생물제(폴 칼라브레시(Paul Calabresi) 및 브루스 에이. 채브너(Bruce A. Chabner)) 제52장에 개시되어 있는 것들 및 굿맨(Goodman) 및 길먼(Gilman)의 문헌["The Pharmacological Basis of Therapeutics", Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc.(보건 전문 사업부)]의 도입부 1202-1263이 포함된다.

- [1171] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 항암제는 항체를 포함한다.
- [1172] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 항체는 리툽시맙(rituximab), 세툽시맙(cetuximab), 트라스투주맙(trastuzumab), 에드레콜로맙(edrecolomab), 알레투주맙(alemtuzumab), 겐투주맙(gemtuzumab), 이브리투모맙(ibrutinomab), 파니투모맙(panitumumab), 벨리무맙(Belimumab), 베바시주맙(Bevacizumab), 비바투주맙 메르탄신(Bivatuzumab mertansine), 블리나투모맙(Blinatumomab), 블론투베트맙(Blontuvetmab), 브렌투시맙 베도틴(Brentuximab vedotin), 카투막소맙(Catumaxomab), 식수투무맙(Cixutumumab), 다클리주맙(Daclizumab), 아달리무맙(Adalimumab), 베즐로톡수맙(Bezlotoxumab), 세르톨리주맙 페골(Certolizumab pegol), 시타투주맙 보가톡스(Citatumumab bogatox), 다라투무맙(Daratumumab), 디누투시맙(Dinutuximab), 엘로투주맙(Elotuzumab), 에르투막소맙(Ertumaxomab), 에타라시주맙(Etaracizumab), 겐투주맙 오조가마이신(Gemtuzumab ozogamicin), 기렌투시맙(Girentuximab), 네시투무맙(Necitumumab), 오비누투주맙(Obinutuzumab), 오파투무맙(Ofatumumab), 페르투주맙(Pertuzumab), 라무시루맙(Ramucirumab), 실툽시맙(Siltuximab), 토시투모맙(Tositumomab), 니볼루맙(Nivolumab), 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 두르발루맙(Durvalumab), 아테졸리주맙(Atezolizumab), 아벨루맙(Avelumab), 트라스투주맙(Trastuzumab) 및 이필리무맙으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1173] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 항체는 리툽시맙 및 세툽시맙으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1174] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 치료학적 제제 또는 항암제는 IMiD(예를 들면, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드)를 포함한다.
- [1175] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 IMiD는 탈리도마이드, 레날리도마이드 및 포말리도마이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1176] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 조성물과 함께 투여되는 상기 치료학적 제제는 항감염제(예를 들면, 항생제 및 항바이러스제)를 포함한다.
- [1177] 특정 실시형태들에 따르면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 조성물과 함께 투여되는 상기 치료학적 제제는 면역 억제제(예를 들면, GCSF 및 기타 골수 자극제, 스테로이드)를 포함한다.
- [1178] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 병용 치료요법은 부가적 효과를 갖는다.
- [1179] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 병용 치료요법은 상승작용 효과를 갖는다.
- [1180] 본 발명의 다른 양상에 따르면, 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하기 위한 치료학적 제제를 패키징하는 패키징 재료; 및 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드 및/또는 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 포함하는 제조 물품이 제공된다.
- [1181] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 제조 물품은 면역 세포 활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환의 치료를 위해 확인된다.
- [1182] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 질환을 치료하기 위한 상기 치료학적 제제; 및 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드 및/또는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 상기 핵산 작제물 또는 이를 발현하는

상기 숙주 세포는 별도의 용기들에 패키징된다.

- [1183] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 질환을 치료하기 위한 상기 치료학적 제제; 및 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드 및/또는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 상기 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 상기 숙주 세포는 공동-제형(co-formulation)에 패키징된다.
- [1184] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 제조 물품은 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 포함한다.
- [1185] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 제조 물품은 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 포함한다.
- [1186] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 제조 물품은 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 포함한다.
- [1187] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 제조 물품은 상기 PD1 아미노산 서열, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포; 및 상기 4-1BBL 아미노산 서열, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 포함한다.
- [1188] 따라서, 본 발명의 다른 양상에 따르면, 본원에 개시되는 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포; 및 본원에 개시되는 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포를 패키징하는 패키징 재료를 포함하는 제조 물품이 제공된다.
- [1189] 특정 실시형태들에 따르면, 본원에 개시되는 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포; 및 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포는 별도의 용기들에 패키징된다.
- [1190] 특정 실시형태들에 따르면, 본원에 개시되는 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포; 및 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 또는 이를 발현하는 숙주 세포는 공동-제형에 패키징된다.
- [1191] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드; 및/또는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 상기 단리된 폴리펩타이드는 이종(heterologous) 치료학적 모이어티에 부착되거나 또는 이를 포함한다. 상기 치료학적 모이어티는 소분자 화학적 화합물 및 폴리펩타이드를 포함하는 임의의 분자일 수 있다.
- [1192] 본 발명의 특정 실시형태들과 함께 사용될 수 있는 치료학적 모이어티의 비-제한적 예로는 세포독성 모이어티, 독성 모이어티, 사이토카인 모이어티, 면역조절 모이어티, 폴리펩타이드, 항체, 약물, 화학물질 및/또는 방사성 동위원소가 포함된다.
- [1193] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 치료학적 모이어티는 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드를 상기 치료학적 모이어티를 암호화하는 상기 핵산 서열과 번역적으로 융합함(translationally fusing)으로써 접합된다(conjugated).
- [1194] 추가로 또는 대안으로, 상기 치료학적 모이어티는 당해 분야 숙련가에게 공지되어 있는 임의의 접합 방법을 이용하여 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드에 화학적으로 접합(커플링(coupling))될 수 있다. 예를 들면, 펩타이드는 3-(2-피리딜디티오) 프로피온산 N하이드록시석신이미드 에스테르[N-석신이미드 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트로서도 칭함]("SDPD")(시그마(Sigma) Cat. No. P-3415; 예를 들면, 문헌[Cumber et al. 1985, Methods of Enzymology 112: 207-224]을 참조한다), 글루타르알데하이드 접합 절차(예를 들면, 문헌[G.T. Hermanson 1996, "Antibody Modification and Conjugation, in Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego]을 참조한다), 또는 카르보다이미드 접합 절차[예를 들면, 문헌[J. March, Advanced Organic

Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure, pp. 349-50 & 372-74 (3d ed.), 1985; B. Neises et al. 1978, Angew Chem., Int. Ed. Engl. 17:522; A. Hassner et al. 1978, Tetrahedron Lett. 4475; E.P. Boden et al. 1986, J. Org. Chem. 50:2394 및 L.J. Mathias 1979, Synthesis 561]을 참조한다]를 이용하여 목적하는 제제에 접합될 수 있다.

- [1195] 치료학적 모이어티는 당해 분야에서 널리 실시되고 있는 표준 화학적 합성 기술[예를 들면, 문헌 [hypertexttransferprotocol://worldwideweb (dot) chemistry (dot) org/portal/Chemistry)]을 참조한다]을 이용하여, 예를 들면 펩타이드 결합을 통해서(기능성 모이어티가 폴리펩타이드인 경우)와 같이 직접적 또는 간접적인 임의의 적합한 화학적 링크를 이용하여, 또는 링커 펩타이드와 같은 개재하는(intervening) 링커 요소 또는 유기 중합체와 같은 화학적 모이어티에의 공유 결합을 통해서 예를 들면, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드에 부착될 수 있다. 키메라 펩타이드는 상기 펩타이드들의 카복시(C) 또는 아미노(N) 말단에 서의 결합을 통해 또는 직쇄형, 분지형(branched) 또는 환형 측쇄, 및 내부 탄소 또는 질소 원자 등과 같은 내부의 화학적 그룹에의 결합을 통해 링크될 수 있다.
- [1196] 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 상호교환적으로 사용되는 상기 용어들 "단백질", "펩타이드" 및 "폴리펩타이드"는 천연 펩타이드(분해 생성물, 합성적으로 합성된 펩타이드 또는 재조합 펩타이드) 및 펩타이드 모방체(peptidomimetic)(전형적으로 합성적으로 합성된 펩타이드)뿐만 아니라 펩타이드 유사체인 펩토이드(peptoid) 및 세미펩토이드(semipeptoid)(예를 들면, 펩타이드를 더 안정하게 만드는 변형을 가질 수 있음)를 포함하고, 이는 예를 들면, 신체에 있는 동안 상기 펩타이드를 보다 안정하게 하거나 보다 세포에 침투할 수 있게 하는 변형을 가질 수 있다. 이러한 변형으로는 N 말단 변형, C 말단 변형, 펩타이드 결합 변형, 백본(backbone) 변형 및 잔기 변형이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 펩타이드 모방체를 제조하는 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 예를 들면, 그 전문이 본원에 제시되는 바와 같이 참조에 의해 포함되는 문헌 [Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)]에 명시되어 있다. 이와 관련하여 더 자세한 내용은 하기에 제공된다.
- [1197] 상기 펩타이드 내의 펩타이드 결합(-CO-NH-)은 예를 들면, N-메틸화된 아미드 결합(-N(CH₃)-CO-), 에스테르 결합(-C(=O)-O-), 케토메틸렌 결합(-CO-CH₂-), 설피닐메틸렌 결합(-S(=O)-CH₂-), α-아자 결합(-NH-N(R)-CO-)[여기서, R은 임의의 알킬(예를 들면, 메틸)이다], 아민 결합(-CH₂-NH-), 설피이드 결합(-CH₂-S-), 에틸렌 결합(-CH₂-CH₂-), 하이드록시에틸렌 결합(-CH(OH)-CH₂-), 티오아미드 결합(-CS-NH-), 올레핀 이중 결합(-CH=CH-), 플루오르화된 올레핀 이중 결합(-CF=CH-), 레트로(retro) 아미드 결합(-NH-CO-), 펩타이드 유도체(-N(R)-CH₂-CO-)[여기서, R은 탄소 원자 상에 본래 존재하는 "정상" 측쇄이다]에 의해 치환될 수 있다.
- [1198] 이들 변형은 펩타이드 쇄에 따라 임의의 결합에서 그리고 심지어 동시에 몇몇의(2 내지 3개의) 결합에서 발생할 수 있다.
- [1199] 천연 방향족 아미노산들, Trp, Tyr 및 Phe는 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복실산(Tic: tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid), 나프틸알라닌, Phe의 환-메틸화된 유도체, Phe 또는 O-메틸-Tyr의 할로젠화된 유도체와 같은 비-천연 방향족 아미노산들에 의해 치환될 수 있다.
- [1200] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 펩타이드들은 또한 하나 이상의 변형된 아미노산들 또는 하나 이상의 비-아미노산 단량체들(예를 들면, 지방산, 복합 탄수화물 등)을 포함할 수 있다.
- [1201] 상기 용어 "아미노산" 또는 "아미노산들"은 20개의 천연 발생 아미노산들; 예를 들면 하이드록시프롤린, 포스포세린 및 포스포트레오닌을 포함하는 흔히 생체내 번역-후 변형된 이들 아미노산들; 및 2-아미노아디프산, 하이드록시라이신, 이소데스모신, 노르-발린, 노르-류신 및 오르니틴을 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아닌 기타 흔치 않은(unusual) 아미노산들을 포함하는 것으로 이해된다. 또한, 상기 용어 "아미노산"은 D- 및 L-아미노산 둘 다를 포함한다.
- [1202] 하기 표 1 및 표 2는 천연 발생 아미노산들(표 1) 및 본 발명의 몇몇의 실시형태들과 함께 사용될 수 있는 비-전형적인 또는 변형된 아미노산들(예를 들면, 합성, 표 2)을 열거한다.

[1203] [표 1]

아미노산	3 글자 약어	1 글자 부호
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루타민	Gln	Q
글루탐산	Glu	E
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
류신	Leu	L
라이신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
티로신	Tyr	Y
발린	Val	V
상기와 같은 임의의 아미노산	Xaa	X

[1204]

[1205] [표 2]

<i>비-통상적 아미노산</i>	<i>암호</i>	<i>비-통상적 아미노산</i>	<i>암호</i>
오르니틴	Orn	하이드록시프로린	Hyp
α-아미노부티르산	Abu	아미노노르보르닐 - 카르복실레이트	Norb
D-알라닌	Dala	아미노사이클로프로판- 카르복실레이트	Cpro
D-아르기닌	Darg	N-(3- 구아니디노프로필)글리신	Narg
D-아스파라긴	Dasn	N-(카르바밀메틸)글리신	Nasn
D-아스파르트산	Dasp	N-(카르복시메틸)글리신	Nasp
D-시스테인	Dcys	N-(티오메틸)글리신	Ncys
D-글루타민	Dgln	N-(2-카르바밀에틸)글리신	Ngln
D-글루탐산	Dglu	N-(2-카르복시에틸)글리신	Nglu
D-히스티딘	Dhis	N-(이미다졸릴에틸)글리신	Nhis
D-이소류신	Dile	N-(1-메틸프로필)글리신	Nile
D-류신	Dleu	N-(2-메틸프로필)글리신	Nleu
D-라이신	Dlys	N-(4-아미노부틸)글리신	Nlys
D-메티오닌	Dmet	N-(2-메틸티오에틸)글리신	Nmet
D-오르니틴	Dorn	N-(3-아미노프로필)글리신	Norn
D-페닐알라닌	Dphe	N-벤질글리신	Nphe
D-프롤린	Dpro	N-(하이드록시메틸)글리신	Nser
D-세린	Dser	N-(1- 하이드록시에틸)글리신	Nthr
D-트레오닌	Dthr	N-(3-인돌릴에틸) 글리신	Nhtrp
D-트립토판	Dtrp	N-(<i>p</i> - 하이드록시페닐)글리신	Ntyr
D-티로신	Dtyr	N-(1-메틸에틸)글리신	Nval
D-발린	Dval	N-메틸글리신	Nmgly
D-N-메틸알라닌	Dnmala	L-N-메틸알라닌	Nmala
D-N-메틸아르기닌	Dnmarg	L-N-메틸아르기닌	Nmarg
D-N-메틸아스파라긴	Dnmasn	L-N-메틸아스파라긴	Nmasn
D-N- 메틸아스파라테이트	Dnmasp	L-N-메틸아스파르트산	Nmasp

[1206]

D-N-메틸시스테인	Dnmcys	L-N-메틸시스테인	Nmcys
D-N-메틸글루타민	Dnmglu	L-N-메틸글루타민	Nmglu
D-N-메틸글루탐산	Dnmglu	L-N-메틸글루탐산	Nmglu
D-N-메틸히스티딘	Dnmhis	L-N-메틸히스티딘	Nmhis
D-N-메틸이소류신	Dnmile	L-N-메틸이소류신	Nmile
D-N-메틸류신	Dnmleu	L-N-메틸류신	Nmleu
D-N-메틸라이신	Dnmlys	L-N-메틸라이신	Nmlys
D-N-메틸메티오닌	Dnmmet	L-N-메틸메티오닌	Nmmet
D-N-메틸오르니틴	Dnmorn	L-N-메틸오르니틴	Nmorn
D-N-메틸페닐알라닌	Dnmphe	L-N-메틸페닐알라닌	Nmphe
D-N-메틸프롤린	Dnmpro	L-N-메틸프롤린	Nmpro
D-N-메틸세린	Dnmser	L-N-메틸세린	Nmser
D-N-메틸트레오닌	Dnmthr	L-N-메틸트레오닌	Nmthr
D-N-메틸트립토판	Dnmtrp	L-N-메틸트립토판	Nmtrp
D-N-메틸티로신	Dnmtyr	L-N-메틸티로신	Nmtyr
D-N-메틸발린	Dnmval	L-N-메틸발린	Nmval
L-노르류신	Nle	L-N-메틸노르류신	Nmle
L-노르발린	Nva	L-N-메틸노르발린	Nmva
L-에틸글리신	Etg	L-N-메틸-에틸글리신	Nmetg
L-t-부틸글리신	Tbug	L-N-메틸-t-부틸글리신	Nmtbug
L-호모페닐알라닌	Hphe	L-N-메틸-호모페닐알라닌	Nmhphe
α -나프틸알라닌	Anap	N-메틸- α -나프틸알라닌	Nmanap
페니실라민	Pen	N-메틸페니실라민	Nmpen
γ -아미노부티르산	Gabu	N-메틸- γ -아미노부티레이트	Nmgabu
사이클로헥실알라닌	Chexa	N-메틸-사이클로헥실알라닌	Nmchexa
사이클로펜틸알라닌	Cpen	N-메틸-사이클로펜틸알라닌	Nmcpen
α -아미노- α -메틸부티레이트	Aabu	N-메틸- α -아미노- α -메틸부티레이트	Nmaabu
α -아미노이소부티르산	Aib	N-메틸- α -아미노이소부티레이트	Nmaib

[1207]

D- α -메틸아르기닌	Dmarg	L- α -메틸아르기닌	Marg
D- α -메틸아스파라긴	Dmasn	L- α -메틸아스파라긴	Masn
D- α -메틸아스파테이트	Dmasp	L- α -메틸아스파테이트	Masp
D- α -메틸시스테인	Dmcys	L- α -메틸시스테인	Mcys
D- α -메틸글루타민	Dmgln	L- α -메틸글루타민	Mgln
D- α -메틸 글루탐산	Dmglu	L- α -메틸글루타메이트	Mglu
D- α -메틸히스티딘	Dmhis	L- α -메틸히스티딘	Mhis
D- α -메틸이소류신	Dmile	L- α -메틸이소류신	Mile
D- α -메틸류신	Dmleu	L- α -메틸류신	Mleu
D- α -메틸라이신	Dmlys	L- α -메틸라이신	Mlys
D- α -메틸메티오닌	Dmmet	L- α -메틸메티오닌	Mmet
D- α -메틸오르니틴	Dmorn	L- α -메틸오르니틴	Morn
D- α -메틸페닐알라닌	Dmphe	L- α -메틸페닐알라닌	Mphe
D- α -메틸프롤린	Dmpro	L- α -메틸프롤린	Mpro
D- α -메틸세린	Dmser	L- α -메틸세린	Mser
D- α -메틸트레오닌	Dmthr	L- α -메틸트레오닌	Mthr
D- α -메틸트립토판	Dmtrp	L- α -메틸트립토판	Mtrp
D- α -메틸티로신	Dmtyr	L- α -메틸티로신	Mtyr
D- α -메틸발린	Dmval	L- α -메틸발린	Mval
N-사이클로부틸글리신	Ncbut	L- α -메틸노르발린	Mnva
N-사이클로헥실글리신	Nchep	L- α -메틸에틸글리신	Metg
N-사이클로헥실글리신	Nchex	L- α -메틸- γ -부틸글리신	Mtbug
N-사이클로데실글리신	Ncdec	L- α -메틸-호모페닐알라닌	Mhphe
N-사이클로데실글리신	Ncdod	α -메틸- α -나프틸알라닌	Manap
N-사이클로옥틸글리신	Ncoct	α -메틸페닐알라민	Mpen
N-사이클로프로필글리신	Ncpro	α -메틸- γ -아미노부티레이트	Mgabv
N-사이클로운데실글리신	Ncund	α -메틸-사이클로헥실알라닌	Mchexa
N-(2-아미노에틸)글리신	Naeg	α -메틸-사이클로펜틸알라닌	Mcpen
N-(2,2-디페닐에틸)글리신	Nbhm	N-(N-(2,2-디페닐에틸)카르바밀메틸-글리신	Nnbhm

[1208]

N-(3,3-디페닐프로필)글리신	Nbhe	N-(N-(3,3-디페닐프로필)카르바밀메틸-글리신	Nnbhe
1-카복시-1-(2,2-디페닐에틸아미노)사이클로프로판	Nmbc	1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산	Tic
포스포세린	pSer	포스포트레오닌	pThr
포스포티로신	pTyr	O-메틸-티로신	
2-아미노아디프산		하이드록시라이신	

[1209]

[1210] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 펩타이드들은 바람직하게는 선형 형태로 이용되지만, 환화(cyclicization)가 펩타이드 특성을 심하게 간섭하지 않는 경우에는 상기 펩타이드의 환 형태도 이용될 수 있음이 이해될 것이다.

[1211] 상기 본 발명의 펩타이드는 바람직하게는 펩타이드가 가용성 형태로 존재하는 것을 요구하는 치료제에 이용되기 때문에, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 펩타이드로는 이들의 하이드록실-함유 측쇄로 인하여 펩타이드 용해도를 증가시킬 수 있는 세린 및 트레오닌을 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아닌 하나 이상의 비-천연 또는 천연 극성 아미노산들이 포함된다.

[1212] 본 발명의 상기 펩타이드들의 상기 아미노산들은 보존적으로 또는 비-보존적으로 치환될 수 있다.

[1213] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "보존적 치환"은 상기 펩타이드의 본래 서열에 존재하는 아미노산을 유사한 입체배치적(steric) 특성을 갖는 천연 또는 비-천연 발생 아미노산 또는 펩타이드 모방체로 대체하는 것을 말한다. 대체될 상기 천연 아미노산의 측쇄가 극성 또는 소수성인 경우, 상기 보존적 치환은 천연 발생 아미노산, 비-천연 발생 아미노산으로 또는 (상기 대체되는 아미노산의 측쇄로서 동일한 입체배치적 특성을 갖는 것 이외에도) 또한 극성 또는 소수성인 펩타이드 모방체로 이루어져야만 한다.

- [1214] 천연 발생 아미노산은 전형적으로 이들의 특성에 따라 그룹화(grouped)되므로, 천연 발생 아미노산에 의한 보존적 치환은 본 발명에 따라 입체배치적으로 유사한 비-하전된 아미노산에 의한 하전된 아미노산의 대체가 보존적 치환으로서 고려된다는 사실을 염두에 두어 용이하게 결정될 수 있다.
- [1215] 비-천연 발생 아미노산에 의한 보존적 치환을 생성하기 위해, 당해 분야에 익히 공지되어 있는 아미노산 유사체들(합성 아미노산들)을 사용하는 것도 가능하다. 상기 천연 발생 아미노산의 펩타이드 모방체는 숙련된 당업자에게 공지되어 있는 문헌에 잘 기록되어 있다.
- [1216] 보존적 치환에 영향을 미칠 때, 상기 치환 아미노산은 측쇄에 본래 아미노산과 동일하거나 유사한 기능성 그룹을 갖는다.
- [1217] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 어떤 아미노산 변화가 표현형적으로 침묵하는 경향이 있는지에 관한 지침은 문헌[Bowie et al., 1990, Science 247 : 1306-1310]에서도 찾을 수 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체들은 다형성 변이체, 중간 동족체 및 대립 유전자(allele)에 추가되며 이들을 배제하지 않는다. 전형적인 보존적 치환으로는: 1) 알라닌(A), 글리신(G); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 라이신(K); 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W); 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다(예를 들면, 문헌[Creighton, Proteins (1984)]을 참조한다). 아미노산은 측쇄와 관련된 특성에 기초하여 치환될 수 있고, 예를 들면 극성 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들면 세린(S) 및 트레오닌(T); 측쇄의 전하에 기초한 아미노산, 예를 들면 아르기닌(R) 및 히스티딘(H); 그리고 소수성 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들면 발린(V) 및 류신(L)이 치환될 수 있다. 나타낸 바와 같이, 변화는 전형적으로 상기 단백질의 폴딩 또는 활성에 현저하게 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환과 같은 사소한 성질로 이루어진다.
- [1218] 본원에서 사용되는 바와 같은 어구 "비-보존적 치환"은 상이한 전기화학적 및/또는 입체배치적 특성을 갖는 다른 천연 또는 비-천연 발생 아미노산에 의한 모(parent) 서열에 존재하는 아미노산의 대체를 말한다. 따라서, 상기 치환 아미노산의 측쇄는 치환되는 본래 아미노산의 측쇄보다 현저하게 더 클 수 있고/있거나(또는 작을 수 있고/있거나) 치환되는 아미노산과 현저하게 상이한 전하적 특성을 갖는 기능성 그룹을 가질 수 있다. 이러한 유형의 비-보존적 치환의 예로는 알라닌 대신 페닐알라닌 또는 시코헥실메틸 글리신, 글리신 대신 이소류신, 또는 아스파르트산 대신 -NH-CH [(-CH₂)₅-COOH] -CO-로의 치환이 포함된다. 본 발명의 범위에 속하는 이러한 비-보존적 치환은 여전히 평균 특성을 갖는 펩타이드를 구성하는 것들이다.
- [1219] 본 발명의 상기 펩타이드들의 N 및 C 말단은 기능 그룹에 의해 보호될 수 있다. 적합한 기능성 그룹은 문헌 [Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991]에 기술되어 있고, 이의 교시는 본원에 참조에 의해 포함된다. 바람직한 보호 그룹은 예를 들면, 화합물의 친수성(hydrophilicity)을 감소시키고 친유성(lipophilicity)을 증가시킴으로써 상기 보호 그룹에 부착된 화합물을 세포로 수송하는 것을 용이하게 하는 것들이다.
- [1220] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 아미노산들 중 하나 이상은 예를 들면, 기능성 그룹의 부가에 의해 변형(개념적 관점으로 "화학적 변형")될 수 있다. 예를 들면, 상기 본래 서열에 나타나는 상기 측쇄 아미노산 잔기는 임의로 변형될 수 있지만, 하기에 기술되는 바와 같이 대안으로 상기 단백질의 다른 부분이 상기 측쇄 아미노산 잔기에 추가하여 또는 상기 측쇄 아미노산 잔기 대신에 임의로 변형될 수 있다. 상기 변형은 예를 들면, 화학적으로 변형된 아미노산을 부가함으로써 화학적 합성 프로세스가 이어지는 경우 상기 분자의 합성 동안 임의로 수행될 수 있다. 그러나, 상기 분자에 이미 존재하는 경우의 아미노산의 화학적 변형("제자리" 변형)도 가능하다. 상기 펩타이드 또는 단백질에 대한 변형은 예를 들면, 유전자 합성, 부위-지시된(site-directed)(예를 들면, PCR 기반) 또는 무작위(random) 돌연변이유발(mutagenesis)(예를 들면, EMS)에 의해, 엑소뉴클레아제(exonuclease) 결실에 의해, 화학적 변형에 의해, 또는 이중 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 융합 또는 결합 단백질에 의해 도입될 수 있다.
- [1221] 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "화학적 변형"은 펩타이드를 지칭하는 경우에 이의 아미노산 잔기들 중 적어도 하나가 프로세싱(processing) 또는 다른 번역-후 변형과 같은 자연적 프로세스에 의해 또는 당해 분야에 익히 공지되어 있는 화학적 변형 기술에 의해 변형된 펩타이드를 말한다. 변형의 비-제한적 예시 유형으로는 카르복시메틸화(carboxymethylation), 아세틸화(acetylation), 아실화(acylation), 인산화(phosphorylation), 글리코실화(glycosylation), 아미드화(amidation), ADP-리보실화(ribosylation), 지방 아실화(fatty acylation), 파르네실(farnesyl) 그룹, 이소파르네실 그룹, 탄수화물 그룹, 지방산 그룹, 접합용 링커의 부가,

관능화(functionalization), GPI 앵커(anchor) 형성, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 메틸화(methylation), 미리스틸화(myristylation), 페길화(pegylation), 프레닐화(prenylation), 인산화(phosphorylation), 유비퀴틴화(ubiquitination) 또는 임의의 유사한 프로세스 및 공지의 보호/차단 그룹이 포함된다. 에테르 결합은 임의로 세린 또는 트레오닌 하이드록실을 당의 하이드록실에 연결시키는데 사용될 수 있다. 아마이드 결합은 임의로 글루타메이트 또는 아스파테이트 카르복실 그룹을 당의 아미노 그룹에 연결시키는데 사용될 수 있다(Garg and Jeanloz, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 43, Academic Press (1985); Kunz, *Ang. Chem. Int. Ed. English* 26:294-308 (1987)). 아세탈 및 케탈 결합은 또한 아미노산과 탄수화물 사이에 임의로 형성될 수 있다. 지방산 아실 유도체는 예를 들면, 유리 아미노 그룹(예를 들면, 라이신)의 아실화에 의해 임의로 제조될 수 있다(Toth et al., *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)).

- [1222] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 변형으로는 전문이 본원에 제시되는 바와 같이 본원에 참조에 의해 포함된 PCT 출원 번호 WO 2006/050262에 기술된 바와 같이 펩타이드에의 사이클로알칸 모이어티의 부가가 포함된다. 이들 모이어티는 생체분자(biomolecule)와 함께 사용하기 위해 고안되고, 임의로 단백질에 각종 특성들을 부여하는데 사용될 수 있다.
- [1223] 또한, 임의로 펩타이드 상의 임의의 점(point)이 변형될 수 있다. 예를 들면, 단백질 상의 글리코실화 모이어티의 페길화는 전문이 본원에 제시되는 바와 같이 본원에 참조에 의해 포함된 PCT 출원 번호 WO 2006/050247에 기술된 바와 같이 임의로 수행될 수 있다. 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 그룹은 임의로 0-링크된 및/또는 N-링크된 글리코실화에 부가될 수 있다. 상기 PEG 그룹은 임의로 분지형 또는 성형일 수 있다. 임의로 임의의 유형의 수용성 중합체는 글리코실 링커를 통해 단백질의 글리코실화 부위에 부착될 수 있다.
- [1224] "페길화된 단백질"은 상기 단백질의 아미노산 잔기에 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티를 갖는, 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 이의 단편을 의미한다.
- [1225] "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 커플링제 또는 커플링 또는 활성화 모이어티를 이용한(예를 들면, 티올(thiol), 트리플레이트(triflate), 트레실레이트(tresylate), 아지리딘(aziridine), 옥시란(oxirane)을 이용하거나 또는 바람직하게는 말레이미드 모이어티를 이용한) 유도체화의 존재 또는 부재 하의 폴리알킬렌 글리콜 화합물 또는 이의 유도체를 의미한다. 말레이미도 모노메톡시 PEG와 같은 화합물은 본 발명의 예시이거나 본 발명의 활성화된 PEG 화합물이다. 폴리프로필렌 글리콜과 같은 다른 폴리알킬렌 글리콜 화합물이 본 발명에서 사용될 수 있다. 다른 적절한 폴리알킬렌 글리콜 화합물로는 하기 유형의 하전된 또는 중성의 중합체들: 텍스트란, 콜로민산(colominic acid) 또는 다른 탄수화물-기반 중합체, 아미노산들의 중합체, 및 비오틴(biotin) 유도체가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [1226] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 펩타이드는 변경된 글리코실화 패턴을 갖도록 변형된다(즉, 본래 또는 천연 글리코실화 패턴으로부터 변경됨). 본원에서 사용되는 바와 같은 "변경된(altered)"은 결실된 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 갖고/갖거나 본래 단백질에 부가된 하나 이상의 글리코실화 부위를 갖는 것을 의미한다.
- [1227] 단백질의 글리코실화는 전형적으로 N-링크되거나 또는 O-링크된다. N-링크는 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 말한다. 트리펩타이드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착하기 위한 인식 서열(recognition sequence)이다. 따라서, 폴리펩타이드에 이들 트리펩타이드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-링크된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나가 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 말하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신도 사용될 수 있다.
- [1228] 펩타이드에의 글리코실화 부위의 부가는 펩타이드의 아미노산 서열을 변경하여 상기 기술된 트리펩타이드 서열 중 하나 이상을 함유하도록 함으로써 편리하게 달성된다(N-링크된 글리코실화 부위의 경우). 상기 변경은 또한 본래 펩타이드의 서열에서 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 이에 의한 치환에 의해 이루어질 수 있다(O-링크된 글리코실화 부위의 경우). 상기 펩타이드의 아미노산 서열은 DNA 수준에서 변화를 도입함으로써 변경될 수도 있다.
- [1229] 펩타이드 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 다른 수단은 펩타이드의 아미노산 잔기에 대한 글리코시드의 화학적 또는 효소적 커플링에 의한 것이다. 사용된 커플링 방식에 따라, 당은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카르복실 그룹, (c) 시스테인의 것과 같은 유리 설프하이드릴 그룹, (d) 세린, 트레오닌 또는 하이드

록시프롤린의 것과 같은 유리 하이드록실 그룹, (e) 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것과 같은 방향족 잔기, 또는 (f) 글루탐인의 아마이드 그룹에 부착될 수 있다. 이들 방법은 예를 들면 WO 87/05330에 그리고 문헌 [Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 22 : 259-306 (1981)]에 기술되어 있다.

- [1230] 펩타이드에 존재하는 임의의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로, 효소적으로 또는 DNA 수준에서 변화를 도입함으로써 달성될 수 있다. 화학적 탈당화(deglycosylation)는 펩타이드를 트리플루오로메탄설폰산 또는 동등한 화합물에 노출시키는 것을 필요로 한다. 이러한 처리는 링크하는 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분의 또는 모든 당의 절단을 초래하여 아미노산 서열은 온전하게 유지한다.
- [1231] 화학적 탈당화는 문헌[Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987)]; 및 문헌[Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981)]에 기술되어 있다. 펩타이드 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 문헌 [Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138: 350 (1987)]에 기술된 바와 같이 각종 엔도(endo)- 및 엑소(exo)-글리코시다제의 사용에 의해 달성될 수 있다.
- [1232] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 펩타이드는 검출가능한 태그를 포함한다. 한 실시형태에 있어서, 본원에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "검출가능한 태그"는 당해 분야 공지의 기술을 이용하여 숙련된 당업자에 의해 검출될 수 있는 임의의 모이어티를 말한다. 검출가능한 태그는 펩타이드 서열일 수 있다. 임의로, 상기 검출가능한 태그는 화학적 제제에 의해 또는 단백질 가수분해(proteolysis)와 같은 효소적 수단에 의해 제거가능할 수 있다. 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 검출가능한 태그는 상기 펩타이드의 정제를 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 용어 "검출가능한 태그"로는 키틴 결합 단백질(BCP: chitin binding protein)-태그, 말토스 결합 단백질(MBP: maltose binding protein)-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST: glutathione-S-transferase)-태그, 폴리(His)-태그, FLAG 태그, 에피토프(Epitope) 태그, 예를 들면 V5-태그, c-myc-태그 및 HA-태그, 및 형광성 태그, 예를 들면 녹색 형광성 단백질(GFP), 적색 형광성 단백질(RFP), 황색 형광성 단백질(YFP), 청색 형광성 단백질(BFP) 및 시안(cyan) 형광성 단백질(CFP); 및 이들 태그의 유도체 또는 당해 분야에 공지되어 있는 임의의 태그가 포함된다. 상기 용어 "검출가능한 태그"는 또한 용어 "검출가능한 마커"도 포함한다.
- [1233] 특정 실시형태에 따르면, 상기 펩타이드는 이의 N-말단에 부착된 검출가능한 태그(예를 들면, 폴리(His)-태그)를 포함한다.
- [1234] 특정 실시형태에 따르면, 상기 펩타이드는 이의 C-말단에 부착된 검출가능한 태그(예를 들면, 폴리(His)-태그)를 포함한다.
- [1235] 특정 실시형태에 따르면, 상기 펩타이드의 상기 N-말단은 검출가능한 태그(예를 들면, 폴리(His)-태그)를 포함하지 않는다.
- [1236] 특정 실시형태에 따르면, 상기 펩타이드의 상기 C-말단은 검출가능한 태그(예를 들면, 폴리(His)-태그)를 포함하지 않는다.
- [1237] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 펩타이드는 절단가능한 모이어티에 융합된다. 따라서, 예를 들면, 회수를 용이하게 하기 위해, 발현된 암호화 서열은 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 펩타이드 및 융합된 절단가능한 모이어티를 암호화하도록 조작될 수 있다. 한 실시형태에서, 상기 펩타이드는 친화성 크로마토그래피에 의해; 예를 들면, 상기 절단가능한 모이어티에 대해 특이적인 컬럼 상의 고정화에 의해 쉽게 단리되도록 고안된다. 한 실시형태에서, 절단 부위는 상기 펩타이드와 상기 절단가능한 모이어티 사이에서 조작되고 상기 펩타이드는 이러한 부위에서 상기 융합 단백질을 특이적으로 절단하는 적절한 효소 또는 제제로의 처리에 의해 크로마토그래피 컬럼으로부터 방출될 수 있다[예를 들면, 문헌[Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988)]; 및 문헌 [Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)]을 참조한다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 펩타이드는 단리된 펩타이드이다.
- [1238] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 펩타이드는 이들에 한정되는 것은 아니지만 고체상 및 재조합 기술과 같은 펩타이드 합성 분야의 숙련자들에게 공지되어 있는 임의의 기술에 의해 합성 및 정제될 수 있다.
- [1239] 고체상 펩타이드 합성에 관해서, 다수의 기술의 요약은 문헌[J. M. Stewart and J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963] 및 문헌[J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1973]에서 찾을 수 있다. 전형적인 용액 합성에 관해서는 문헌[G. Schroder and K. Lupke, The Peptides, vol. 1, Academic Press (New York), 1965]을 참조

한다.

- [1240] 일반적으로, 이들 방법은 성장하는 펩타이드 쇠에 하나 이상의 아미노산 또는 적합하게 보호된 아미노산을 순차적으로 부가하는 것을 포함한다. 보통, 제1 아미노산의 아미노 또는 카르복실 그룹은 적합한 보호 그룹에 의해 보호된다. 이어서, 보호된 또는 유도체화된 아미노산은 아미드 링크를 형성하기에 적합한 조건 하에서 적합하게 보호된 상보적(아미노 또는 카르복실) 그룹을 갖는 서열에 다음 아미노산을 부가함으로써 불활성 고체 지지체에 부착되거나 용액으로 이용될 수 있다. 이어서, 상기 보호 그룹은 이러한 새롭게 부가된 아미노산 잔기로부터 제거되고, 이어서 다음 아미노산(적합하게 보호됨) 등이 부가된다. 원하는 모든 아미노산들이 적절한 서열로 링크된 후, 임의의 나머지 보호 그룹(및 임의의 고체 지지체)은 순차적으로 또는 동시에 제거되어 최종 펩타이드 화합물을 제공한다. 이러한 일반적 절차의 단순한 변형에 의해, 예를 들면 적절하게 보호된 디펩타이드와 보호된 트리펩타이드를(키랄 중심을 라세미화하지 않는 조건 하에서) 커플링함으로써 성장하는 쇠에 한 번에 1개 초과된 아미노산을 부가하여 탈보호 후 펜타펩타이드 등을 형성할 수 있다. 펩타이드 합성의 추가의 설명은 U.S. Pat. 제6,472,505호에 개시되어 있다.
- [1241] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 펩타이드 화합물을 제조하는 바람직한 방법은 고체상 펩타이드 합성을 포함한다.
- [1242] 대규모 펩타이드 합성은 문헌[Andersson Biopolymers 2000;55(3):227-50]에 의해 기술된다.
- [1243] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 펩타이드는 시험관내 발현 시스템을 사용하여 합성된다. 이러한 시험관내 합성 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고 상기 시스템의 구성요소는 상업적으로 입수가능하다.
- [1244] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 펩타이드는 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. "재조합" 펩타이드 또는 단백질은 재조합 DNA 기술에 의해 생성된, 즉 원하는 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 외인성 DNA 작제물에 의해 형질전환된 세포로부터 생성된 펩타이드 또는 단백질을 말한다.
- [1245] 따라서, 본 발명의 다른 양상에 따르면, 상기 기술된 폴리펩타이드 및 융합 단백질 중 어느 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [1246] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72, 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108, 서열번호 112, 서열번호 114, 서열번호 134, 서열번호 136, 서열번호 138, 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144 및 서열번호 148에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1247] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 134, 서열번호 136, 서열번호 138, 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144 및 서열번호 148에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1248] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72, 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108 또는 서열번호 112에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1249] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108 또는 서열번호 112에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1250] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106 또는 서열번호 108에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1251] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1252] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 146에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도

약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이다.

- [1253] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72, 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108, 서열번호 112, 서열번호 114, 서열번호 134, 서열번호 136, 서열번호 138, 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144 및 서열번호 148로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1254] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 134, 서열번호 136, 서열번호 138, 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144 및 서열번호 148로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1255] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72, 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108 또는 서열번호 112로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1256] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108 또는 서열번호 112로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1257] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106 또는 서열번호 108로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1258] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1259] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 146에 제시되는 바와 같은 핵산 서열을 포함한다.
- [1260] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72, 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108, 서열번호 112, 서열번호 114, 서열번호 134, 서열번호 136, 서열번호 138, 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144 및 서열번호 148로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열로 이루어지고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1261] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 134, 서열번호 136, 서열번호 138, 서열번호 140, 서열번호 142, 서열번호 144 및 서열번호 148로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열로 이루어지고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1262] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72, 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108 또는 서열번호 112로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열로 이루어지고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1263] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106, 서열번호 108 또는 서열번호 112로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열로 이루어지고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1264] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 98, 서열번호 102, 서열번호 104, 서열번호 106 또는 서열번호 108로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열로 이루어지고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1265] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57 내지 72로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열로 이루어지고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1266] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 70 내지 서열번호 72에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이다.
- [1267] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 70 내지 서열번호 72로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [1268] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 70 내지 서열번호 72로 이루어진 그룹으로부터

선택되는 핵산 서열로 이루어진다.

- [1269] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 146으로 이루어진다.
- [1270] 본 발명의 다른 양상에 따르면, 서열번호 18 내지 서열번호 21, 서열번호 85, 서열번호 89, 서열번호 93 및 서열번호 115로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150을 포함하지 않는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이거나, 또는 서열번호 18, 서열번호 117 및 서열번호 119로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 F146 내지 V150을 포함하지 않는 138개 내지 145개 길이의 아미노산들이고; 임의로 서열번호 2의 아미노산 73에 상응하는 위치에 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 상기 기술된 PD1 아미노산 서열 중 어느 하나; 또는 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이거나, 서열번호 127 및 서열번호 129로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 G198 내지 E 205를 포함하지 않는 170개 내지 197개 길이의 아미노산들이거나, 또는 서열번호 125와 적어도 80%의 동일성을 갖고 서열번호 3에 상응하는 아미노산 분절 A1 내지 E23을 포함하지 않는 170개 내지 182개 길이의 아미노산들이고; 임의로 상기 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하는 상기 기술된 4-1BBL 아미노산 서열 중 어느 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [1271] 본 발명의 다른 양상에 따르면, 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 임의로 서열번호 2의 아미노산 73의 위치에 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함하는 상기 기술된 PD1 아미노산 서열 중 어느 하나; 또는 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 임의로 상기 4-1BBL 아미노산 서열 중 어느 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [1272] 본 발명의 추가의 또는 대안의 양상에 따르면, 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖고 서열번호 2에 상응하는 아미노산 분절 P1 내지 L5 및 F146 내지 V150 중 어느 것도 포함하지 않는 123개 내지 148개 길이의 아미노산들이고; 임의로 상기 기술된 PD1 아미노산 서열 중 어느 하나; 또는 서열번호 22 내지 서열번호 25로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 185개 내지 202개 길이의 아미노산들이고; 임의로 상기 4-1BBL 아미노산 서열 중 어느 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [1273] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96, 서열번호 116, 서열번호 118 또는 서열번호 120에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1274] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1275] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96, 서열번호 116, 서열번호 118 또는 서열번호 120에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1276] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또

는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [1277] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96, 서열번호 116, 서열번호 118 또는 서열번호 120을 포함한다. 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96을 포함한다.
- [1278] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94, 서열번호 96, 서열번호 116, 서열번호 118 또는 서열번호 120으로 이루어진다.
- [1279] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96으로 이루어진다.
- [1280] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1281] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이다.
- [1282] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96을 포함한다.
- [1283] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 80, 서열번호 82, 서열번호 84, 서열번호 86, 서열번호 88, 서열번호 90, 서열번호 92, 서열번호 94 또는 서열번호 96으로 이루어진다.
- [1284] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 또는 서열번호 35에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1285] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 또는 서열번호 35에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이다.
- [1286] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 또는 서열번호 35를 포함한다.
- [1287] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 또는 서열번호 35로 이루어진다.
- [1288] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 126, 서열번호 128, 서열번호 130 또는 서열번호 132에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.
- [1289] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 또는 서열번호 42에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시형태를 나타낸다.

- [1290] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 126, 서열번호 128, 서열번호 130 또는 서열번호 132에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이다.
- [1291] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 또는 서열번호 42에 제시되는 바와 같은 핵산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성이다.
- [1292] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 126, 서열번호 128, 서열번호 130 또는 서열번호 132를 포함한다.
- [1293] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 또는 서열번호 42를 포함한다.
- [1294] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 126, 서열번호 128, 서열번호 130 또는 서열번호 132로 이루어진다.
- [1295] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41 또는 서열번호 42로 이루어진다.
- [1296] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 단리되어 RNA 서열, 상보적(complementary) 폴리뉴클레오타이드 서열(cDNA), 게놈 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 복합 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들면, 상기의 조합)의 형태로 제공되는 단일 또는 이중 가닥의(stranded) 핵산 서열을 말한다.
- [1297] 특정 실시형태들에 따르면, 본원에 개시되는 상기 폴리뉴클레오타이드 및 핵산 서열 중 어느 하나는 보존적 핵산 치환을 포함할 수 있다. 보존적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하거나, 또는 상기 핵산 서열이 본질적으로 동일하거나 관련된(예를 들면, 자연적으로 인접한(contiguous)) 서열에 대해 아미노산 서열을 암호화하지 않는 이들 핵산을 말한다. 유전자 암호의 축퇴(degeneracy) 때문에, 다수의 기능적으로 동일한 핵산들이 대부분의 단백질을 암호화한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 암호화한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서, 상기 코돈은 상기 암호화된 폴리펩타이드를 변경하지 않고 기술된 상응하는 코돈들 중 다른 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 보존적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드의 일종인 "침묵 변이(silent variation)"이다. 특정 실시형태들에 따르면, 폴리펩타이드를 암호화하는 본원에 기술된 임의의 폴리뉴클레오타이드 및 핵산 서열은 또한 핵산의 침묵 변이를 기술한다. 당업자는 소정 상황에서 핵산 내의 각각의 코돈(보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 및 보통 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 침묵 변이는 발현 생성물과 관련하여 기술된 서열에 내포되어 있다.
- [1298] 포유동물 세포에서 외인성 폴리펩타이드를 발현하기 위해서, 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 포유동물 세포 발현에 적합한 핵산 작제물로 라이게이션된다. 이러한 핵산 작제물은 구성적 또는 유도적 방식으로 상기 세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드의 전사를 지시하기 위한 프로모터(promoter) 서열을 포함한다.
- [1299] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드 및 숙주 세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물이 제공된다.
- [1300] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 조절 요소는 이중성 조절 요소이다.
- [1301] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 핵산 작제물(본원에서 "발현 벡터"로서도 칭함)은 원핵생물(prokaryote), 진핵생물(eukaryote) 또는 바람직하게는 둘 다에서의 복제 및 통합(integration)에 이러한 벡터(예를 들면, 셔틀 벡터(shuttle vector))를 적합하게 만드는 추가의 서열을 포함한다. 또한, 전형적인 클로닝 벡터는 또한 전사 및 번역 개시 서열, 전사 및 번역 종결자 및 폴리아데닐화 신호도 포함할 수 있다. 예로서, 이러한 작제물들은 전형적으로 5' LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 신호, 제2 DNA 합성의 기원(origin) 및 3'LTR 또는 이의 일부를 포함할 것이다.
- [1302] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 핵산 작제물은 전형적으로 상기 핵산 작제물이 위치하는 숙주 세포로부터의 펩타이드 분비를 위한 신호 서열을 포함한다. 바람직하게는 이러한 목적을 위한 상기 신호 서열은 포유동물 신호 서열 또는 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드 변이체의 신호 서열이다.

- [1303] 진핵생물 프로모터는 전형적으로 TATA 상자 및 상류(upstream) 프로모터 요소의 2개 유형의 인식 서열을 포함한다. 전사 개시 부위의 상류에 위치하는 25개 내지 30개의 염기 쌍(base pair)인 TATA 상자는 RNA 폴리머라제 (polymerase)가 RNA 합성을 시작하도록 지시하는데 관여하는 것으로 생각된다. 다른 상류 프로모터 요소는 전사가 개시되는 속도를 결정한다.
- [1304] 바람직하게, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 핵산 작제물에 의해 이용되는 프로모터는 형질전환된 상기 특정 세포 집단에서 활성이다. 세포 유형-특이적 및/또는 조직-특이적 프로모터의 예로는 간 특이적인 알부민[Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], 림프구 특이적 프로모터[Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]와 같은 프로모터; 특히 T-세포 수용체의 프로모터[Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] 및 면역글로불린의 프로모터[Banerji et al. (1983) Cell 33729-740]; 신경미세섬유(neurofilament) 프로모터 [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477]와 같은 뉴런(neuron)-특이적 프로모터, 췌장-특이적 프로모터[Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] 또는 유선-특이적 프로모터, 예를 들면 유청 프로모터(U.S. Pat. 제4,873,316호 및 유럽 출원 공개 제264,166호)가 포함된다.
- [1305] 인핸서(Enhancer) 요소는 링크된 상동성 또는 이중성 프로모터로부터 1,000배까지 전사를 자극할 수 있다. 인핸서는 전사 개시 부위에서 하류(downstream) E또는 상류에 위치되는 경우에 활성이다. 바이러스로부터 유도된 다수의 인핸서 요소는 광범위한 숙주 범위를 갖고 다양한 조직에서 활성이다. 예를 들면, 상기 SV40 초기 유전자 인핸서 다수의 세포 유형에 적합하다. 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 적합한 다른 인핸서/프로모터 병용은 폴리오마(polyoma) 바이러스, 사람 또는 뮤린(murine) 사이토메갈로 바이러스(CMV), 뮤린 백혈병 바이러스, 뮤린 또는 라우스(Rous) 육종 바이러스 및 HIV와 같은 다양한 레트로 바이러스 유래의 장기 반복으로부터 유도된 것들이 포함된다. 문헌[Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983]을 참조하고, 이는 본원에 참조에 의해 포함된다.
- [1306] 상기 발현 벡터의 구성에 있어서, 상기 프로모터는 이의 자연 환경에서 전사 시작 부위에서와 같이 이중성 전사 시작 부위로부터 대략 동일한 거리에 위치하는 것이 바람직하다. 그러나, 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같이, 이러한 거리의 일부 변화는 프로모터 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.
- [1307] PD1-4-1BBL, PD1 또는 4-1BBL mRNA 번역의 효율성을 증가시키기 위해 폴리아데닐화 서열도 상기 발현 벡터에 추가될 수 있다. 정확하고 효율적인 폴리아데닐화를 위해서는 2개의 별개의 서열 요소들이 요구된다: 폴리아데닐화 부위의 하류에 위치한 GU 또는 U 풍부(rich) 서열 및 11개 내지 30개의 뉴클레오타이드 상류에 위치한 6개의 뉴클레오타이드의 고도로 보존된 서열, AAUAAA. 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 적합한 종결 및 폴리아데닐화 신호로는 SV40으로부터 유도된 신호가 포함된다.
- [1308] 이미 기술된 요소들에 더하여, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 발현 벡터는 전형적으로 클로닝된 핵산의 발현 수준을 증가시키거나 재조합 DNA를 운반하는 세포의 확인을 용이하게 하도록 의도된 다른 특화된 요소들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 다수의 동물 바이러스는 허용되는 세포 유형에서 바이러스 게놈의 추가 염색체 복제를 촉진시키는 DNA 서열을 함유한다. 이들 바이러스 레플리콘(replicon)을 지닌 플라스미드(Plasmid)는 상기 플라스미드 또는 상기 숙주 세포의 게놈으로 운반되는 유전자에 의해 적절한 인자들이 제공되는 한 에피솜으로 복제된다.
- [1309] 상기 벡터는 진핵생물 레플리콘을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 진핵생물 레플리콘이 존재하는 경우, 상기 벡터는 이어서 적절한 선택가능한 마커를 사용하여 진핵생물 세포에서 증폭될 수 있다. 상기 벡터가 진핵생물 레플리콘을 포함하지 않는 경우, 에피솜 증폭이 불가능하다. 대신에, 재조합 DNA는 조작된 세포의 게놈으로 통합되고, 여기서 상기 프로모터가 원하는 핵산의 발현을 지시한다.
- [1310] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 발현 벡터는 예를 들면, 내부 리보솜 진입 부위(IRES: internal ribosome entry site) 및 프로모터-키메라 폴리펩타이드의 게놈 통합을 위한 서열과 같은 단일 mRNA로부터 몇몇의 단백질의 번역을 허용하는 추가의 폴리뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [1311] 상기 발현 벡터에 포함된 개별 요소들은 다양한 구성으로 배열될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 인핸서 요소들 및 프로모터들 등, 그리고 심지어 PD1-4-1BBL을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열(들), PD1 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 또는 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드는 역상 보체로서 존재할 수 있는 "헤드-투-테일(head-to-tail)" 구성으로, 또는 역-평행 가닥으로서 상보적 구성으로 배열될 수 있다. 이러한 다양한 구성이 상기 발현 벡터의 비-암호화 요소들과 함께 발생할 가능성이 더 높지만, 상기 발현 벡터 내의 상기 암호화 서열의 대안의 구성도 고려된다.

- [1312] 포유동물 발현 벡터의 예로는 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, PNMT81(인비트로젠(Invitrogen)으로부터 입수가능), pCI(프로메가(Promega)로부터 입수가능), pMbac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV(스트레이트젠(Stratagene)으로부터 입수가능함), pTRES(클론테크(Clontech)로부터 입수가능함) 및 이들의 유도체들이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [1313] 레트로 바이러스와 같은 진핵생물 바이러스로부터의 조절 요소를 포함하는 발현 벡터도 사용할 수 있다. SV40 벡터로는 pSVT7 및 pMT2가 포함된다. 소 유두종 바이러스로부터 유도된 벡터로는 pBV-1MTHA가 포함되고, 엡스타인 바 바이러스로부터 유도된 벡터로는 pHEB0 및 p205가 포함된다. 다른 예시적인 벡터로는 pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, 배칼로바이러스 pDSVE 및 SV-40 초기 프로모터, SV-40 후기 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 뮤린 유방 종양 바이러스 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터 또는 진핵생물 세포에서의 발현에 효과적인 것으로 밝혀진 기타 프로모터들의 지시 하에 단백질의 발현을 가능하게 하는 임의의 다른 벡터가 포함된다.
- [1314] 상기 기술된 바와 같이, 바이러스는 다수의 경우에 숙주 방어 메커니즘을 회피하도록 진화한 매우 특화된 감염원이다. 전형적으로, 바이러스는 특정 세포 유형에서 감염 및 증식한다. 바이러스 벡터의 표적화(targeting) 특이성은 사전 결정된 세포 유형을 특이적으로 표적화하고 이에 의해 상기 감염된 세포에 재조합 유전자를 도입하기 위해 이의 자연 특이성을 이용한다. 따라서, 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 의해 사용되는 벡터의 유형은 형질전환된 세포 유형에 따라 달라질 것이다. 형질전환된 세포 유형에 따라 적합한 벡터를 선택하는 능력은 당해 분야 숙련가의 능력 범위 내이고, 따라서 선택 고려사항의 일반적인 기술은 본원에 제공되지 않는다. 예를 들면, 골수 세포는 상기 사람 T 세포 백혈병 바이러스 유형 I(HTLV-I)를 이용하여 표적화될 수 있고, 신장 세포는 문헌[Liang CY et al., 2004 (Arch Virol. 149: 51-60)]에 기술된 바와 같이 배칼로바이러스 오토그라파 칼리포니카 뉴클레오폴리헤드로바이러스(AcMNPV: Autographa californica nucleopolyhedrovirus)에 존재하는 이중성 프로모터를 이용하여 표적화될 수 있다.
- [1315] 재조합 바이러스 벡터는 이들이 측면 감염(lateral infection) 및 표적화 특이성과 같은 이점을 제공하므로 PD1-4-1BBL, PD1 또는 4-1BBL의 생체내 발현에 유용하다. 측면 감염은 예를 들면 레트로 바이러스의 생명 주기(life cycle)에 내재되어 있고, 단일 감염된 세포가 해당 프로세스에 의해 이웃하는 세포에 발아하여(bud off) 감염시키는 다수의 자손 비리온(virion)을 생성하는 프로세스이다. 그 결과 넓은 영역이 신속하게 감염되고 이의 대부분은 본래 바이러스 입자에 의해 처음에는 감염되지 않았다. 이는 감염원이 딸 자손을 통해서만 확산되는 수직형 감염과 대조적이다. 옆으로 확산할 수 없는 바이러스 벡터도 생성될 수 있다. 이러한 특징은 원하는 목적이 특정 유전자를 국소화된 수의 표적화된 세포에만 도입하는 것인 경우 유용할 수 있다.
- [1316] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 발현 벡터를 세포에 도입하기 위해 각종 방법을 사용할 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)]에, 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)], 문헌[Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995)], 문헌[Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995)], 문헌[Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988)] 및 문헌[Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]]에 기술되어 있고, 예를 들면, 안정한 또는 일시적 형질감염, 리포펙션(lipofection), 전기천공(electroporation) 및 재조합 바이러스 벡터를 이용한 감염이 포함된다. 또한, 양성-음성 선택 방법에 대해서는 U.S. Pat. 제5,464,764호 및 제5,487,992호를 참조한다.
- [1317] 바이러스 감염에 의한 핵산의 도입은 바이러스의 감염성 성질로 인하여 보다 높은 형질감염 효율을 얻을 수 있으므로 리포펙션 및 전기천공과 같은 다른 방법에 비하여 몇몇의 이점을 제공한다.
- [1318] 현재 바람직한 생체내 핵산 전이 기술로는 아데노바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 I 바이러스 또는 아데노-관련 바이러스(AAV) 및 지질-기반 시스템과 같은 바이러스 또는 비-바이러스 작제물을 이용한 형질감염이 포함된다. 상기 유전자의 지질-매개된 전이에 유용한 지질은 예를 들면, DOTMA, DOPE 및 DC-Chol[Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)]이다. 유전자 치료요법에 사용하기 위한 가장 바람직한 작제물은 바이러스이고, 가장 바람직하게는 아데노바이러스, AAV, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스이다. 레트로바이러스 작제물과 같은 바이러스 작제물은 적어도 하나의 전사 프로모터/인핸서 또는 유전자좌(locus)-정의 요소(들) 또는 대안의 스플라이싱(splicing), 핵 RNA 수송(export) 또는 메신저(messenger)의 번역-후 변형과 같은 다른 수단에 의해 유전자 발현을 제어하는 다른 요소들을 포함한다. 이러한 벡터 작제물은 또한 이미

바이러스 작제물에 존재하지 않는 한 패키징 신호, 긴 말단 반복(LTR: long terminal repeat) 또는 이의 일부, 사용된 바이러스에 적절한 양성 및 음성 가닥 프라이머 결합 부위를 포함한다. 또한, 이러한 작제물은 전형적으로 이것이 위치하는 숙주 세포로부터의 상기 펩타이드의 분비를 위한 신호 서열을 포함한다. 바람직하게, 이러한 목적을 위한 상기 신호 서열은 포유동물 신호 서열 또는 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드 변이체의 신호 서열이다. 임의로, 상기 작제물은 또한 폴리아데닐화 및 하나 이상의 제한 부위 및 번역 종결 서열을 지시하는 신호를 포함할 수 있다. 예로서, 이러한 작제물은 전형적으로 5' LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 신호, 제2 가닥 DNA 합성의 기원, 및 3' LTR 또는 이의 일부를 포함할 것이다. 비-바이러스성인 다른 벡터들, 예를 들면 양이온 지질, 폴리라이신 및 덴드리머(dendrimer)가 사용될 수 있다.

- [1319] 언급된 바와 같이, 삽입된 암호화 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 포함하는 것 이외에, 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 발현 작제물은 발현된 펩타이드의 안정성, 생산, 정제, 수율 또는 독성을 향상시키기 위해 조작된 서열도 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 PD1-4-1BBL 단백질 또는 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드 및 이종성 단백질을 포함하는 융합 단백질 또는 절단가능한 융합 단백질의 발현은 조작될 수 있다. 이러한 융합 단백질은 상기 융합 단백질이 친화성 크로마토그래피에 의해; 예를 들면 이종 단백질에 대해 특이적인 컬럼 상의 고정화에 의해 쉽게 분리될 수 있도록 고안될 수 있다. 절단 부위가 PD1-4-1BBL 단백질 또는 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드와 이종성 단백질 사이에서 조작되는 경우, 상기 PD1-4-1BBL 단백질 또는 상기 폴리펩타이드는 상기 절단 부위를 붕괴시키는 적절한 효소 또는 제제를 이용한 처리에 의해 크로마토그래피 컬럼으로부터 방출될 수 있다[예를 들면, 문헌[Booth et al. (1988) Immunol. Lett. 19:65-70]; 및 문헌[Gardella et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:15854-15859]을 참조한다].
- [1320] 본 발명은 또한 본원에 기술된 상기 조성물을 포함하는 세포를 고려한다.
- [1321] 따라서, 특정 실시형태들에 따르면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질을 포함하는 숙주 세포, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및/또는 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 암호화하는 핵산 작제물이 제공된다.
- [1322] 상기 언급된 바와 같이, 다양한 원핵생물 또는 진핵생물 세포는 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드를 발현하기 위한 숙주-발현 시스템으로서 사용될 수 있다. 이들로는 상기 암호화 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지(bacteriophage) DNA, 플라스미드(plasmid) DNA 또는 코스미드(cosmid) DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아와 같은 미생물; 상기 암호화 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 상기 암호화 서열을 포함하는 Ti 플라스미드와 같은 재조합 플라스미드 발현 벡터로 형질전환된 식물 세포 시스템이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 포유동물 발현 시스템은 또한 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 폴리펩타이드를 발현하는데 사용될 수 있다.
- [1323] 박테리아 작제물의 예로는 이. 콜라이(E. coli) 발현 벡터의 pET 시리즈가 포함된다[Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89].
- [1324] 본 발명의 교시에 따라 사용할 수 있는 진핵생물 세포의 예로는 포유동물 세포, 진균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 조류 세포 또는 식물 세포가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [1325] 효모에 있어서, U.S. Pat. 출원 제5,932,447호에 개시되어 있는 바와 같이 구성적 또는 유도성 프로모터들을 포함하는 다수의 벡터들을 사용할 수 있다. 대안으로, 외래 DNA 서열의 효모 염색체로의 통합을 촉진시키는 벡터가 사용될 수 있다.
- [1326] 식물 발현 벡터가 사용되는 경우, 상기 암호화 서열의 발현은 다수의 프로모터들에 의해 구동될 수 있다. 예를 들면, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터들과 같은 바이러스 프로모터[Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514] 또는 TMV에 대한 코트(coat) 단백질 프로모터[Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311]를 사용할 수 있다. 대안으로, RUBISCO의 작은 서브유닛(subunit)과 같은 식물 프로모터[Cnoruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680 and Brogli et al., (1984) Science 224:838-843] 또는 가열 충격(heat shock) 프로모터, 예를 들면 대두 hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B[Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565]를 사용할 수 있다. 이들 작제물은 Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터, 직접 DNA 형질전환, 미세주입(microinjection), 전기천공 및 당해 분야 숙련자에게 익히 공지되어 있는 기타 기술을 이용하여 식물 세포에 도입될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463]을 참조한다.

- [1327] 당해 분야에 익히 공지되어 있는 곤충 및 포유동물 숙주 세포 시스템과 같은 다른 발현 시스템도 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 의해 사용될 수 있다.
- [1328] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 세포는 포유동물 세포이다.
- [1329] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 세포는 사람 세포이다.
- [1330] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 세포는 세포주이다.
- [1331] 다른 특정 실시형태들에 따르면, 상기 세포는 원발성 세포이다.
- [1332] 상기 세포는 혈액, 근육, 신경, 뇌, 심장, 폐, 간, 췌장, 비장, 흉선, 식도, 위, 장, 신장, 고환, 난소, 모발, 피부, 뼈, 유방, 자궁, 방광, 척수 또는 각종 체액을 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아닌 적합한 조직으로부터 유도될 수 있다. 상기 세포는 배아, 태아 및 성인 단계를 포함하는 임의의 발달 단계뿐만 아니라 발달 기원, 즉 외배엽, 중배엽 및 내배엽 기원으로부터 유도될 수 있다.
- [1333] 포유동물 세포의 비제한적 예로는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS, 예를 들면 COS-7, ATCC CRL 1651); 사람 배아 신장 세포주(현탁 배양액에서의 성장을 위해 서브클로닝된 HEK293 또는 HEK293 세포, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 1977); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 (sertoli) 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 1980); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 사람 자궁경부 암종 세포(HeLa, ATCC CCL2); NIH3T3, 저카트(Jurkat), 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 사람 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 사람 간 세포(HepG2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 1982); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 사람 간세포종 세포주(Hep G2), PER.C6, K562, 및 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)가 포함된다.
- [1334] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 포유동물 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO), HEK293, PER.C6, HT1080, NS0, Sp2/0, BHK, Namalwa, COS, HeLa 및 베로(Vero) 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [1335] 본 발명의 몇몇의 실시형태들에 따르면, 상기 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO), PER.C6 또는 293(예를 들면, Expi293F) 세포를 포함한다.
- [1336] 본 발명의 다른 양상에 따르면, PD1-4-1BBL 융합 단백질, PD1 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 또는 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 숙주 세포에서 본원에 기술된 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 핵산 작제물을 발현시키는 단계를 포함하는 것인, 방법이 제공된다.
- [1337] 특정 실시형태들에 따르면, 상기 방법은 상기 융합 단백질 또는 상기 폴리펩타이드를 단리하는 단계를 포함한다.
- [1338] 특정 실시형태들에 따르면, 제조합 폴리펩타이드의 회수는 배양에서 적절한 시간 후에 수행된다. 상기 어구 "제조합 폴리펩타이드 회수"는 상기 폴리펩타이드를 포함하는 전체 발효 배지를 수집하는 것을 말하고, 추가의 분리 또는 정제 단계를 의미할 필요는 없다. 상기에도 불구하고, 본 발명의 일부 실시형태들의 폴리펩타이드는 다양한 표준 단백질 정제 기술, 예를 들면 이들에 한정되는 것은 아니지만 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 여과, 전기영동, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 콘카나발린 A 크로마토그래피, 혼합 방식 크로마토그래피, 금속 친화성 크로마토그래피, 렉틴 친화성 크로마토그래피 크로마토포커싱(chromatofocusing) 및 차등 가용화(differential solubilization)을 이용하여 정제될 수 있다.
- [1339] 특정 실시형태들에 따르면, 합성 및 정제 후, 펩타이드의 치료학적 효능은 생체내에서 또는 시험관내에서 검정될 수 있다. 이러한 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면 세포 생존력(viability), 형질전환 마우스의 생존 및 활성화 마커의 발현이 포함된다.
- [1340] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 상기 조성물(예를 들면, 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 상기 PD1 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩타이드 또는 본원에 개시되는 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 암호화하는 핵산 작제물 및/또는 세포)은 그 자체로 유기체에게 또는 적합한 담체 또는 부형제와 혼합되는 약제학적 조성물로 투여될 수 있다.
- [1341] 따라서, 본 발명은 몇몇의 실시형태들에 있어서 본원에 개시되는 상기 조성물의 치료학적 유효량을 포함하는 약

제학적 조성물을 특징으로 한다.

- [1342] 본원에서 상기 용어 "활성 성분"은 생물학적 효과에 대한 책임이 있는 상기 조성물(예를 들면, PD1-4-1BBL 용합 단백질, PD1 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 및/또는 본원에 기술되는 세포)을 말한다.
- [1343] 본원에서 상기 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 추가로 용이하게 하기 위해 약제학적 조성물에 추가되는 불활성 물질을 말한다. 부형제의 예로는 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 각종 당 및 전분 유형, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [1344] 본원 이하에, 상호교환적으로 사용될 수 있는 어구 "생리학적으로 허용되는 담체" 및 "약제학적으로 허용되는 담체"는 유기체에 현저한 과민(irritation)을 야기하지 않고 상기 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 폐기하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 보강제(adjuvant)는 이들 어구 하에 포함된다.
- [1345] 본원에서 사용되는 바와 같은 "약제학적으로 허용되는 담체"로는 생리학적으로 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균 및 항진균제, 등장성 제제 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 바람직하게, 상기 담체는 (예를 들면, 주사 또는 주입에 의한) 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여에 적합하다. 투여 경로에 따라, 상기 활성 화합물, 즉 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 및/또는 본원에 기술된 바와 같은 세포는 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용되는 염"은 상기 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 보유하고 임의의 원하지 않는 독성학적 효과를 부여하지 않는 염을 말한다(예를 들면, 문헌[Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19]을 참조한다). 이러한 염의 예로는 산 부가염 및 염기 부가염이 포함된다. 산 부가염으로는 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산 및 아인산 등과 같은 비독성 무기산 및 지방족(aliphatic) 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환된 알칸산, 하이드록시 알칸산, 방향족산, 지방족 및 방향족 설폰산 등과 같은 비독성 유기산으로부터 유도된 것들이 포함된다. 염기 부가염으로는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 및 칼슘 등과 같은 알칼리 토 금속, 및 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 및 프로카인 등과 같은 비독성 유기 아민으로부터 유도된 것들이 포함된다.
- [1346] 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따르면 약제학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 항산화제의 예로는 (1) 수용성 항산화제, 예를 들면 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 나트륨 바이셀페이트, 나트륨 메타바이셀파이트 및 나트륨 셀파이트 등; (2) 유용성(oil-soluble) 항산화제, 예를 들면 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 및 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트화제(chelating agent), 예를 들면 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 및 인산 등이 포함된다. 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 약제학적 조성물은 또한 세제 및 가용화제(예를 들면, TWEEN 20(폴리소르베이트-20), TWEEN 80(폴리소르베이트-80) 및 보존제(예를 들면, 티메르솔, 벤질 알콜) 및 벌킹(bulking) 물질(예를 들면, 락토스, 만니톨)과 같은 첨가제를 포함할 수 있다.
- [1347] 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따르면 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 각종 완충액 함량의 완충된 염수(예를 들면, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도, 에탄올 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들면 올리브 오일 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들면 에틸 올레레이트가 포함된다.
- [1348] 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅 재료의 사용에 의해, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유동성(fluidity)을 유지할 수 있다.
- [1349] 이들 조성물은 또한 보강제, 예를 들면 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 예방은 상기 멸균 절차에 의해 그리고 각종 항균제 및 항진균제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올 및 페놀 소르브산 등의 포함에 의해 확보될 수 있다. 당, 및 염화 나트륨 등과 같은 등장성 제제를 조성물에 포함시키는 것도 또한 바람직할 수 있다. 또한, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함시킴으로써 주사가능한 약제학적 형태의 연장된 흡수를 초래할 수 있다.
- [1350] 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당해 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 본 발명의 적어도 몇

몇의 실시형태들에 따른 약제학적 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물도 조성물에 포함될 수 있다.

- [1351] 치료학적 조성물은 전형적으로 멸균되어 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 한다. 상기 조성물은 용액, 마이크로에멀전(microemulsion), 리포솜(liposome) 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정렬된 구조로서 제형화될 수 있다. 상기 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유통성은 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 다수의 경우, 등장성 제제, 예를 들면 당, 폴리알콜, 예를 들면 만니톨, 소르비톨 또는 염화 나트륨을 상기 조성물에 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 상기 조성물에 포함시킴으로써 야기될 수 있다. 멸균 주사가능한 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분들의 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 활성 화합물을 혼입한 다음 멸균 미세여과함으로써 조제될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터 필요한 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클(vehicle)에 통합함으로써 조제된다. 멸균 주사가능한 용액의 조제를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 조제 방법은 이의 사전 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조(lyophilization))이다.
- [1352] 멸균 주사가능한 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분들의 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 활성 화합물을 혼입한 다음 멸균 미세여과함으로써 조제될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터 필요한 기타 성분을 포함하는 멸균 비히클에 통합하여 조제된다. 멸균 주사가능한 용액의 조제를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 조제 방법은 활성 성분 + 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 원하는 추가 성분을 수득하는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조)이다.
- [1353] 단일 제형(dosage form)을 생성하기 위해 담체 물질과 병용될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 제형을 생성하기 위해 담체 재료와 병용될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료학적 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중에서 이러한 양은 약제학적으로 허용되는 담체와 병용하여 약 0.01% 내지 약 99%의 활성 성분, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 1% 내지 약 30%의 활성 성분의 범위일 것이다.
- [1354] 투약 용법은 최적의 원하는 반응(예를 들면, 치료학적 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들면, 단일 볼루스(bolus)가 투여될 수 있거나, 몇몇의 분할 용량들이 시간에 따라 투여될 수 있거나, 또는 상기 용량이 치료학적 상황의 긴급성에 따라 나타내어지는 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위해 투약 단위 형태(dosage unit form)로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 투약 단위 형태는 치료되는 대상체에 대한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 별개인 단위를 말하고; 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 원하는 치료학적 효과를 생성하도록 계산된 사전결정된 양의 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 투약 단위 형태에 대한 사양은 (a) 상기 활성 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정 치료학적 효과, 및 (b) 개체에서 감수성(sensitivity)의 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 구성하는 것의 당해 분야에 내재된 한계에 의해 지시되고, 이에 직접적으로 의존한다.
- [1355] 약물의 제형화 및 투여를 위한 기술은 문헌[“Remington’s Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition]에서 찾을 수 있고, 이는 본원에 참조에 의해 포함된다.
- [1356] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 약제학적 조성물은 당해 분야에 익히 공지되어 있는 프로세스에 의해, 예를 들면 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정(dragee)-제조, 레비게이팅(levigating), 유화, 캡슐화, 포획 또는 동결건조 프로세스의 수단에 의해 제조될 수 있다.
- [1357] 본 발명의 조성물은 당해 분야에 공지되어 있는 각종 방법들 중 하나 이상을 이용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여의 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 치료학적 제제의 바람직한 투여 경로로는 혈관내 전달(예를 들면, 주사 또는 주입), 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 피하, 척추, 경구, 장, 직장, 폐(예를 들면, 흡입), 비강, 국소(경피, 협측 및 설하 포함), 방광내, 유리체내, 복강내, 질내, 뇌 전달(예를 들면, 뇌실내, 뇌내 및 확산 증강된 대류(convection enhanced diffusion)), CNS 전달(예를 들면, 척수강내, 척추주위 및 척추내) 또는 비경구(피하, 근육내, 복강내, 정맥내(IV) 및 피내 포함), 경피(수동적으로 또는 이온영동

(iontophoresis) 또는 전기천공 사용), 경점막(예를 들면, 설하 투여, 비강, 질, 직장 또는 설하), 투여 또는 임플란트(implant)를 통한 투여, 또는 예를 들면 주사 또는 주입에 의한 다른 비경구 투여 경로, 또는 당해 분야에 공지되어 있는 다른 전달 경로 및/또는 투여 형태가 포함된다. 본원에서 사용되는 바와 같은 어구 "비경구 투여"는 장 및 국소 투여 이외의 보통 주사에 의한 투여 방식을 의미하고, 이로는 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 캡슐내, 안와내, 심장내, 피부내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척추내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입, 또는 생분해성(bioerodible) 삽입물의 사용이 이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니고, 각 투여 경로에 적절한 제형으로 제형화될 수 있다. 한 특정 실시형태에서, 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 단백질, 치료학적 제제 또는 약제학적 조성물은 복강내 또는 정맥내 투여될 수 있다.

[1358] 특정 실시형태들에 따르면, 본원에 개시되는 상기 조성물은 수용액으로, 비경구 주사에 의해 투여된다. 상기 제형은 또한 현탁액 또는 유제의 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로 본원에 기술되는 상기 조성물의 유효량을 포함하는 비경구 주사용 약제학적 조성물이 제공되고, 임의로 약제학적으로 허용되는 희석제, 보존제, 가용화제, 유화제, 보강제 및/또는 담체를 포함한다. 이러한 조성물은 하기: 희석제, 멸균수, 다양한 완충액 함량의 완충된 염수(예를 들면, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도; 및 세제 및 가용화제(예를 들면, TWEEN 20(폴리소르베이트-20), TWEEN 80(폴리소르베이트-80)), 항산화제(예를 들면, 수용성 항산화제, 예를 들면 아스코르브산, 나트륨 메타바이설파이트, 시스테인 하이드로클로라이드, 나트륨 바이설파이트)와 같은 첨가제; 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤과 같은 유용성 항산화제; 및 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산과 같은 금속 킬레이트화제), 및 보존제(예를 들면, 티메솔, 벤질 알콜) 및 벌킹 물질(예를 들면, 락토스, 만니톨) 중 하나 이상을 임의로 포함한다. 비-수성 용매 또는 비휘발의 예로는 에탄올, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예를 들면 올리브 오일 및 옥수수 오일, 젤라틴 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예를 들면 에틸 올레이트가 있다. 상기 제형은 냉동 건조(동결건조)되거나 진공 건조되고 사용 직전에 재용해/재현탁될 수 있다. 상기 제형은 예를 들면, 박테리아 보유 필터를 통한 여과, 멸균제를 조성물에 혼입시킴으로써, 조성물을 방사선 조사함에 의해, 또는 조성물을 가열함으로써 멸균될 수 있다.

[1359] 본원에 개시되는 각종 조성물(예를 들면, 폴리펩타이드)은 국소적으로 적용될 수 있다. 국소 투여는 대부분의 펩타이드 제형에 양호하게 작용하지 않지만, 특히 폐, 비강, 구강(설하, 협측), 질 또는 직장 점막에 적용할 경우 효과적일 수 있다.

[1360] 본 발명의 조성물은 약 5 마이크론(micron) 미만의 공기역학적 직경을 갖는 에어로졸 또는 분무 건조된 입자로서 전달될 때 흡입하고 폐 상피 내벽을 가로질러 혈류로 횡단하면서 폐로 전달될 수 있다. 치료학적 제품의 폐 전달을 위해 고안된 광범위한 기계적 장치가 사용될 수 있으며, 이로는 네블라이저(nebulizer), 계량된 용량의 흡입기 및 분말 흡입기가 포함되지만 이들에 한정되는 것은 아니고, 이들 전부는 당해 분야 숙련자에게 친숙하다. 상업적으로 입수가 가능한 장치의 몇몇의 구체예로는 울트라벤트(Ultravent) 네블라이저(Mallinckrodt Inc., St. Louis, Mo.); 아콘(Acorn) II 네블라이저(Marquest Medical Products, Englewood, Colo.); 벤톨린(Ventolin) 계량된 용량의 흡입기(Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.); 및 스피너(Spinahaler) 분말 흡입기(Fisons Corp., Bedford, Mass.)가 있다. 넥타(Nektar), 알케르메스(Alkermes) 및 맨카인드(Mannkind)는 전부 흡입가능한 인슐린 분말 조제를 승인받았거나 상기 기술이 본원에 기술된 제형에 적용될 수 있는 임상 시험 중이다.

[1361] 점막에 투여하기 위한 제형은 전형적으로 분무 건조된 약물 입자일 것이고, 이는 정제, 껌, 캡슐, 현탁액 또는 유제에 포함될 수 있다. 표준 약제학적 부형제는 임의의 제조사로부터 입수가 가능하다. 경구 제형은 츄잉 껌, 껌 스트립, 정제 또는 로젠지(lozenge) 형태일 수 있다.

[1362] 경피제형이 또한 조제될 수 있다. 이들은 전형적으로 연고, 로션, 스프레이 또는 패치(patch)일 것이고, 이들 전부는 표준 기술을 이용하여 조제될 수 있다. 경피 제형은 침투 향상제의 포함을 필요로 할 것이다. 본 발명의 상기 약제학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투약 수준은 환자에게 독성이지 않으면서 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료학적 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위해 다양할 수 있다. 선택된 투약 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 사용된 상기 특정 조성물과 병용하여 사용된 치료, 다른 약물, 화합물 및/또는 재료의 지속기간, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 병태, 일반적 건강 및 이전 병력을 포함하는 다양한 약동학적 인자들, 및 의학

분야에 익히 공지되어 있는 유사 인자들에 따라 달라질 것이다.

- [1363] 특정 실시형태들에 따르면, 본원에 개시되는 조성물은 치료학적 유효량으로 대상체에게 투여된다. 본원에서 사용되는 상기 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 치료되는 장애의 하나 이상의 증상을 치료하거나, 억제하거나 또는 완화시키거나, 또는 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 제공하기에 충분한 용량을 의미한다. 정확한 용량은 대상체-의존적 변수(예를 들면, 연령, 면역계 건강 등), 질환 및 수행되는 치료와 같은 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다. 본원에 개시된 폴리펩타이드 조성물, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 핵산 작제물 및 본원에 기술된 상기 세포의 경우, 추가 연구가 수행됨에 따라, 다양한 환자에서의 다양한 병태를 치료하기 위한 적절한 용량 수준에 관한 정보가 나타날 것이며, 치료학적 맥락, 수용자의 연령 및 일반적인 건강 상태를 고려하여 통상의 숙련된 작업자는 적절한 용량을 확인할 수 있을 것이다. 상기 선택된 용량은 원하는 치료학적 효과에, 투여 경로에 그리고 원하는 치료의 지속기간에 의존한다. 폴리펩타이드 조성물의 경우, 일반적으로 1일 0.0001 내지 100mg/kg 체중의 용량 수준이 포유동물에게 투여되고, 보다 통상적으로 0.001 내지 20mg/kg 체중이다. 예를 들면, 용량은 0.3mg/kg 체중, 1mg/kg 체중, 3mg/kg 체중, 5mg/kg 체중 또는 10mg/kg 체중 또는 1 내지 10mg/kg의 범위 내일 수 있다. 예시적인 치료 용법은 주당 5회, 주당 4회, 주당 3회, 주당 2회, 주당 1회, 2주에 1회, 3주에 1회, 4주에 1회, 월 1회, 3개월마다 1회 또는 3 내지 6개월마다 1회를 수반한다. 일반적으로, 정맥내 주사 또는 주입의 경우, 용량은 더 낮을 수 있다. 투약 용법은 최적의 원하는 반응(예를 들면, 치료학적 반응)을 제공하기 위해 조정된다. 예를 들면, 단일 볼루스가 투여될 수 있고, 몇몇의 분할된 용량들이 시간에 따라 투여될 수 있거나, 상기 용량이 치료학적 상황의 긴급성에 따라 비례적으로 감소되거나 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위해 투약 단위 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 투약 단위 형태는 치료되는 대상체에 대한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 별개인 단위를 말하고; 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 원하는 치료학적 효과를 생성하도록 계산된 사전결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 투약 단위 형태에 대한 사양은 (a) 상기 활성 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정 치료학적 효과, 및 (b) 개체에서 감수성의 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 구성하는 것의 당해 분야에 내재된 한계에 의해 지시되고, 이에 직접적으로 의존한다.
- [1364] 임의로, 상기 폴리펩타이드 제형은 임의의 적합한 타이밍(timing) 용법에 따라, 0.0001 내지 100mg/kg 환자의 체중/일 사이, 바람직하게는 0.001 내지 20.0mg/kg/일의 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 치료학적 조성물은 예를 들면, 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 매주 3회, 매주 2회 또는 매주 1회, 2주 또는 3주, 4주, 5주, 6주, 7주 또는 8주에 1회 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 단기간 또는 장기간(예를 들면, 1주, 1개월, 1년, 5년)에 걸쳐 투여될 수 있다.
- [1365] 대안으로, 본원에 개시된 상기 조성물은 서방성(sustained release) 제형으로서 투여될 수 있으며, 이 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 용량 및 빈도는 환자의 치료학적 제제의 반감기에 따라 다르다. 일반적으로, 사람 항체는 최장의 반감기를 나타내고, 이어서 사람화된(humanized) 항체, 키메라 항체 및 비사람(nonhuman) 항체가 이어진다. 융합 단백질의 반감기는 매우 다양할 수 있다. 용량 및 투여 빈도는 상기 치료가 예방학적인지 치료학적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방학적 적용에 있어서, 상대적으로 낮은 용량은 장기간에 걸쳐 상대적으로 드문 간격으로 투여된다. 일부 환자들은 이들의 남은 생애 동안 계속해서 치료를 받는다. 치료학적 적용에 있어서, 상기 질환의 진행이 감소되거나 종결될 때까지, 그리고 바람직하게는 상기 환자가 질환의 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보일 때까지 상대적으로 짧은 간격으로 상대적으로 높은 용량이 때때로 필요하다. 그 후, 상기 환자는 예방학적 용법을 투여받을 수 있다.
- [1366] 소정 실시형태들에 있어서, 상기 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 세포 조성물은 치료되는 부위에 직접적으로 예를 들면, 주사에 의해 국부적으로 투여된다. 전형적으로, 상기 주사는 상기 조성물의 증가된 국부 농도를 야기하고, 이는 전신 투여에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 크다. 상기 폴리펩타이드 조성물은 치료될 부위로부터 상기 폴리펩타이드의 수동적 확산을 감소시킴으로써 상기 폴리펩타이드 조성물의 증가된 국부 농도를 생성하는 것을 돕기 위해 상기 기술된 바와 같은 매트릭스(matrix)와 병용될 수 있다.
- [1367] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 분야에 공지되어 있는 의학적 장치를 이용하여 투여될 수 있다. 예를 들면, 한 임의의 실시형태에서, 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 약제학적 조성물은 미국 특허 제 5,399,163호; 제5,383,851호; 제5,312,335호; 제5,064,413호; 제4,941,880호; 제4,790,824호; 또는 제 4,596,556호에 개시된 장치와 같은 바늘 피하 주사 장치를 이용하여 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 익히 공지되어 있는 임플란트 및 모듈(module)의 예로는 제어된 속도로 의약을 분배하기 위한 이식가능한 미세-주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,487,603호; 피부를 통해 의약을 투여하기 위한 치료학적 장치를 개시하는 미국

특허 제4,486,194호; 정확한 주입 속도로 의약을 전달하기 위한 의약 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제 4,447,233호; 연속적 약물 전달을 위한 가변 유동 이식가능한 주입 장치를 개시하는 미국 특허 제4,447,224호; 다중-챔버(multi-chamber) 구획(compartment)을 갖는 삼투압 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제 4,439,196호; 및 삼투압 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제 4,475,196호가 포함된다. 이들 특허는 본원에 참조에 의해 포함된다. 다수의 다른 이러한 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 당해 분야 숙련자들에게 공지되어 있다.

[1368] 상기 활성 화합물은 임플란트, 경피 패치 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어된 방출 제형과 같은 신속한 방출로부터 상기 화합물을 보호할 담체와 함께 조제될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리 무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 중합체를 사용할 수 있다. 이러한 제형의 조제를 위한 다수의 방법이 특허를 받았거나 일반적으로 당해 분야 숙련자들에게 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[1369] 제어 방출 중합체 장치는 중합체 장치(막대, 실린더, 필름, 디스크) 또는 주사(미세입자)의 이식 후 전신적 장기 방출을 위해 만들어질 수 있다. 상기 매트릭스는 마이크로스피어(microsphere)와 같은 미세 입자의 형태로 존재할 수 있으며, 여기서 켈타이드는 고체 중합체 매트릭스 또는 미세캡슐 내에 분산되어 있고, 여기서 코어는 중합체 셸(shell)과 다른 재료로 이루어지고, 상기 켈타이드는 상기 코어에 분산되거나 현탁되며, 이는 본질적으로 액체 또는 고체일 수 있다. 본원에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 미세 입자, 마이크로스피어 및 미세 캡슐은 상호교환적으로 사용된다. 대안으로, 상기 중합체는 나노미터 내지 4 센티미터 범위의 얇은 슬래브(slab) 또는 필름, 분쇄 또는 기타 표준 기술에 의해 생성된 분말, 또는 심지어 하이드로겔(hydrogel)과 같은 겔로서 구조될 수 있다.

[1370] 본원에 개시된 활성제의 전달을 위해 비-생분해성 또는 생분해성 매트릭스가 사용될 수 있지만, 생분해성 매트릭스가 바람직하다. 이들은 천연 또는 합성 중합체일 수 있지만, 보다 양호한 분해 및 방출 프로파일의 특성화 인으로 인하여 합성 중합체가 바람직하다. 중합체는 방출이 요구되는 기간에 기초하여 선택된다. 몇몇의 경우에는 선형 방출이 가장 유용할 수 있지만, 다른 경우에는 펄스(pulse) 방출 또는 "벌크(bulk) 방출"이 더 효과적인 결과를 제공할 수 있다. 상기 중합체는 하이드로겔(전혀적으로 최대 약 90중량%의 물을 흡수함)의 형태로 존재할 수 있고, 임의로 다가 이온 또는 중합체와 가교(crosslinked)될 수 있다.

[1371] 매트릭스는 용매 증발, 분무 건조, 용매 추출 및 당업자에게 공지되어 있는 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 생분해성 마이크로스피어는 예를 들면, 문헌[Mathiowitz and Langer, J. Controlled Release, 5:13-22 (1987); Mathiowitz, et al., Reactive Polymers, 6:275-283 (1987); 및 Mathiowitz, et al., J. Appl Polymer Sci, 35:755-774 (1988)]에 의해 기술된 바와 같이 약물 전달용 마이크로스피어를 만들기 위해 개발된 임의의 방법을 사용하여 조제될 수 있다.

[1372] 상기 장치는 이식 또는 주사 부위를 치료하기 위해 국소 방출용으로 제형화될 수 있고, 이는 전형적으로 전신 치료 또는 전신 전달을 위한 용량보다 훨씬 더 적은 용량을 전달할 것이다. 이들은 이식되거나 피하, 근육, 지방에 주사되거나 삼킬 수 있다.

[1373] 소정 실시형태들에 있어서, 본 발명의 적어도 몇몇의 실시형태들에 따른 치료학적 화합물이 BBB(원하는 경우)를 통과하는 것을 보장하기 위해, 이들은 예를 들면, 리포솜으로 제형화될 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 관해서, 예를 들면, 미국 특허 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송되는 하나 이상의 모이어터를 포함할 수 있고, 따라서 표적화된 약물 전달을 향상시킨다(예를 들면, 문헌[V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685]을 참조한다). 예시의 표적화 모이어터로는 플레이트 또는 비오틴(예를 들면, 미국 특허 제5,416,016호 내지 문헌[Low et al.]을 참조한다); 만노사이드(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 항체(P. G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 계면활성제 단백질 A 수용체(Briscoe et al. (1995) Am. J Physiol. 1233:134); p120(문헌[Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090]; 또한 문헌[K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273]을 참조한다)이 포함된다.

[1374] 본 발명의 몇몇의 실시형태들의 조성물은 필요에 따라 팩(pack) 또는 디스펜서(dispenser) 장치, 예를 들면 상기 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투약 형태를 함유할 수 있는 FDA 승인 키트(kit)로 제시될 수 있다. 상기 팩은 예를 들면, 블리스터 팩(blister pack)과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는

디스펜서 장치에는 투여를 위한 지침이 수반될 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서는 약제의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에서 규정한 형태로 용기와 관련된 고지(notice)에 의해 수용될 수도 있고, 이 고지는 해당 조성물의 형태 또는 사람 또는 수의학적 투여에 대한 기관의 승인을 반영한다. 예를 들면, 이러한 고지는 처방 약물에 대해 미국 식품의약국에서 승인한 라벨링(labeling) 또는 승인된 제품 삽입물일 수 있다. 상용성(compatible) 약제학적 담체로 제형화된 본 발명의 조제를 포함하는 조성물도 조제될 수 있고, 적절한 용기에 배치되고, 상기에 추가로 상세히 설명된 바와 같이 명시된 병태의 치료에 대해 라벨링될 수 있다.

- [1375] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 $\pm 10\%$ 를 말한다.
- [1376] 상기 용어 "포함한다", "포함하는", "포함된다", "포함되는", "갖는" 및 이들의 활용형은 "포함하지만 이들에 한정되는 것은 아님"을 의미한다.
- [1377] 상기 용어 "으로 이루어진"은 "포함하지만 이들에 한정되는 것은 아님"을 의미한다.
- [1378] 상기 용어 "본질적으로 이루어지는"은 추가의 성분들, 단계들 및/또는 부분들이 청구된 조성물, 방법 또는 구조의 기본 및 신규 특성들을 실질적으로 변경하지 않는 경우에만 상기 조성물, 방법 또는 구조가 추가의 성분들, 단계들 및/또는 부분들을 포함할 수 있음을 의미한다.
- [1379] 본원에서 사용되는 바와 같은 단수 형태 "한", "하나" 및 "상기"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수의 참조물을 포함한다. 예를 들면, 용어 "한 화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 이들의 혼합물을 포함하는 복수의 화합물들을 포함할 수 있다.
- [1380] 본 출원 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 실시형태들은 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식으로의 설명은 단지 편의성과 간결성을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 불가변적 제한으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위에 대한 설명은 가능한 모든 하위 범위뿐만 아니라 해당 범위 내의 개별 수적 값을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들면, 1 내지 6과 같은 범위에 대한 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위 범위뿐만 아니라, 해당 범위 내의 개별 수, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5 및 6도 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.
- [1381] 본원에서 수적 범위가 표시될 때마다, 표시된 범위 내에서 인용된 숫자(분수 또는 정수)를 포함하는 것을 의미한다. 어구 첫번째 표시된 수와 두번째 표시된 수 "사이의 범위의/사이의 범위이다" 및 첫번째 표시된 수 "로부터" 두번째 표시된 수 "까지의 범위의/까지의 범위이다"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 이는 첫번째 및 두번째 표시된 수 및 이들 사이의 모든 분수 및 정수를 포함하는 것을 의미한다.
- [1382] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "방법"은, 공지의 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 화학, 약리학, 생물학, 생화학 및 의학 분야의 전문가에게 공지되어 있거나 이들에 의해 용이하게 개발된 이들 방식, 수단, 기술 및 절차를 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아닌, 주어진 과제를 달성하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차를 말한다.
- [1383] 특정 서열 목록을 참조할 때, 이러한 참조는 예를 들면, 서열분석(sequencing) 오류, 클로닝 오류 또는 염기 치환, 염기 결실 또는 염기 부가를 초래하는 기타 변경으로 인한 사소한 서열 변이를 포함하는 것과 같이 이의 상보적 서열에 실질적으로 대응하는 서열도 포함하는 것으로 이해되어야 하고, 단 이러한 변이의 빈도는 50개의 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안으로 100개의 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안으로 200개의 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안으로 500개의 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안으로 1000개의 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안으로 5,000개의 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안으로 10,000개의 뉴클레오타이드 중 1개 미만이다.
- [1384] **실시예**
- [1385] 이제 상기 설명과 함께 본 발명의 몇몇의 실시형태들을 비제한적 방식으로 예시하는 하기 실시예를 참조한다.
- [1386] 일반적으로, 본원에서 사용된 명명법 및 본 발명에서 이용되는 실험실 절차는 분자, 생화학, 미생물 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술은 문헌에 자세히 설명되어 있다. 예를 들면, 문헌["Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989)]; 문헌["Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)]; 문헌[Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)]; 문헌[Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988)]; 문헌[Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York]; 문헌[Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold

Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)]; 미국 특허 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 제시되는 바와 같은 방법론; 문헌["Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)]; 문헌["Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition]; 문헌["Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)]; 문헌[Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)]을 참조하고, 입수가 가능한 번역검정은 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 기술되어 있으며, 예를 들면 미국 특허 제3,791,932호; 제3,839,153호; 제3,850,752호; 제3,850,578호; 제3,853,987호; 제3,867,517호; 제3,879,262호; 제3,901,654호; 제3,935,074호; 제3,984,533호; 제3,996,345호; 제4,034,074호; 제4,098,876호; 제4,879,219호; 제5,011,771호 및 제5,281,521호; 문헌["Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984)]; 문헌["Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)]; 문헌["Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984)]; 문헌["Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986)]; 문헌["Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986)]; 문헌["A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press]; 문헌["PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990)]; 문헌[Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)]을 참조하고; 이들 전부는 전문이 본원에 제시되는 바와 같이 참조에 의해 포함된다. 다른 일반적인 참조문헌도 이 문서 전체에 걸쳐 제공된다. 이의 절차는 당해 분야에 익히 공지되어 있는 것으로 생각되고, 독자의 편의를 위해 제공된다. 이에 포함된 모든 정보는 본원에 참조에 의해 포함된다.

[1387] **실시예 1**

[1388] **PD1-4-1BBL 변이체의 선택**

[1389] 하기 매개변수들을 최적화하기 위해 본원에서 "DSP105"로 칭하는 N-말단 신호 펩타이드 및 his-태그를 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질(서열번호 26, 도 1)의 구조적 분석을 수행하였다:

- [1390] ● 폴딩 - 표적과의 결합을 가능하게 하는 적절한 폴딩, 잠재적인 디설파이드 스크램블링(scrambling) 최소화;
- [1391] ● 무결성(Integrity) - 노출된 단백질 가수분해 부위 없음;
- [1392] ● 다량체화(Multimerization) - 2개의 도메인의 잠재적인 다량체화를 탐색함. 구체적으로, C-말단 도메인 형성의 삼량체화를 최적화함.
- [1393] ● 포유동물 발현 시스템에서의 고발현; 및
- [1394] ● 낮은 면역원성.

[1395] 구체적으로, PD1 도메인(UniProt ID Q15116 세포외 도메인의 아미노산 21 내지 170에 상응함, 서열번호 2)의 경우:

[1396] 1. PD1 종합적 모델은 PDB 구조에 기초하여 생성되었다: 3RRQ, 5GGR, 5GGS, 5IUS, 5JXE, 4ZQK, 5B8C, 5WT9 및 1개의 NMR 구조 2M2D. 상기 언급된 PDB 구조에서 누락된 PD1의 C-말단 부분(GLU150으로부터 시작, 즉 EVPTAHPSPSPRPAQGFQTLV, 서열번호 6)은 (펩타이드 모델링 알고리즘에 따라) 그 자체로 폴딩될 것으로 예측되는 Pro-풍부 분절을 포함한다.

[1397] 2. 상기 융합 단백질은 PROSPER 서버를 이용하여 단백질 가수분해 부위에 대해 분석하였다.

[1398] 4-1BBL(UniProt ID P41273 EM 도메인의 아미노산 50 내지 254에 상응함, 서열번호 3)의 경우:

[1399] 1. 4-1BBL 세포외(EC) 도메인 모델은 PDB 구조: 2X29에 기초하여 생성되었다. 4-1BBL의 N-말단 부분이 이러한 PDB 구조에서 누락되고 X-선에서 해상되지 않았기 때문에, 이러한 분절(ACPWAVSGARASPGSAASPRREGPELSPD, 서열번호 7)은 소수성 잔기를 용매에 노출시키는 것으로 보이고, 이의 구조를 예측하려는 시도는 구조화되지 않은 영역을 나타냈다. 이는 상기 융합 DSP105의 안정성을 저하시킬 수 있고, 또한 4-1BBL을 통한 삼량체화를 위한 적절한 배향(orientation)을 방해할 수도 있다.

[1400] 2. 상기 융합 단백질은 PROSPER 서버를 이용하여 단백질 가수분해 부위에 대해 분석하였다.

- [1401] 3. 상기 4-1BBL 해상된 도메인 내에서 용매를 향하여 바깥쪽을 직면하고 있는 루프가 검출되었고, 이는 프로세스를 경험하는 영역일 수 있음을 의미한다.
- [1402] 하기 도 2a 내지 도 3 및 표 3은 생성된 3D 모델, 확인된 도메인 및 분절, 및 DSP105 용합 단백질의 분석에서 검출된 예측된 단백질 가수분해 부위를 입증한다.
- [1403] 종합하면, 구조적 분석은 하기를 나타냈다:
- [1404] 1. PD1의 N-말단에서 5개 잔기의 분절(PGWFL, 서열번호 8)은 주로 본래 소수성이고 이들은 PDL1을 인식하는데 필요하지 않으며 이들은 구조화된 도메인의 외부에 걸쳐 있으므로 이들을 제거하는 것이 권고된다.
- [1405] 2. 상기 포인트 1에 설명된 바와 같은 유사한 명백한 동작(즉, 이들은 주로 본래 소수성이고 이들은 PDL1을 인식하는데 필요하지 않으며 이들은 구조화된 도메인의 외부에 걸쳐 있음)으로 인하여 PD1의 C-말단에서 5개 잔기의 분절(FQTLV, 서열번호 9)을 제거하는 것도 권고된다.
- [1406] 3. PD1의 C-말단 상에 그리고 4-1BBL의 N-말단 상에 4개의 예측된 절단 부위가 발견된다(구조화되지 않은 분절에만 집중).
- [1407] 4. 상기 4-1BBL 도메인의 N-말단 분절(ACPWAVSGARASPG, 서열번호 10/ACPWAV, 서열번호 11)을 제거하는 것은 DSP105의 유연성 및 소수성을 저하시킬 것으로 예측된다.
- [1408] 5. 이러한 제거된 N-말단 분절에는 부정확한 디설파이드 결합으로 인하여 적절한 폴딩/재배열을 방지할 수 있는 유리 Cys 잔기가 존재한다.
- [1409] [표 3]

DSP105 PD1-4-1BBL 용합 단백질(서열번호 1)에서의 예측된 단백질 가수 분해 부위

Merops ID	프로테아제 명칭	위치	P4-P4' 부위	N-단편 (kDa)	C- 단편 (kDa)	절단 점수
M10.003	매트릭스 메탈로펩티다제 -2	144	RPAG QFQT	19.03	24.84	0.99
M10.004	매트릭스 메탈로펩티다제 -9	144	RPAG QFQT	19.03	24.84	0.96
C01.036	카텝신 K	147	GQFQ TLVG	19.44	24.44	1.1
C02.001	칼파인-1	151	TLVG ACPW	19.92	23.95	0.94
S01.269	글루타밀 펩티다제 I	174	RLRE GPEL	22.43	21.44	1.04

- [1410]
- [1411] 상기 구조 분석에 기초하여, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 73, 서열번호 75, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83, 서열번호 85, 서열번호 87, 서열번호 89, 서열번호 91, 서열번호 93, 서열번호 95, 서열번호 115, 서열번호 117 또는 서열번호 119의 아미노산 서열을 갖는 몇몇의 PD1 변이체가 고안되었고, 이는 4-1BBL 또는 이의 임의의 변이체에 융합될 수 있다.
- [1412] 또한, 상기 구조 분석에 기초하여, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 123, 서열번호 125, 서열번호 127 또는 서열번호 129의 아미노산 서열을 갖는 몇몇의 4-1BBL 변이체가 고안되었고, 이는 PD1 또는 이의 임의의 변이체에 융합될 수 있다.
- [1413] 또한, 4-1BBL 모이어티의 활성을 유도하기 위한 상기 용합 단백질의 삼량체화의 필요성을 회피하기 위해, 4-1BBL 아미노산 서열의 3중 반복을 포함하는 4-1BBL 변이체가 고안되었고, 이는 PD1 또는 이의 임의의 변이체에 융합될 수 있다. 이러한 4-1BBL 변이체의 예시의 서열은 서열번호 131의 아미노산 서열을 갖는 반복들 사이의 (GGGG)x2+GGGG(서열번호 121) 링커를 갖는 서열번호 23의 3중 반복을 포함한다.
- [1414] 이러한 3중 반복 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 DSP105에 대한 일례로서, DSP1-5_V31(서열번호 147)의 모델은 상동성 모델링에 이어 측쇄 및 루프 개선(refinement)을 이용하여 생성되었다. 동족체 X-선 구조를 기반으로 각 부분에 대한 상동성 모델링을 수행하였다. PD1의 경우 - PDB ID: 3RRQ, 5GGR, 5GGS, 5JXE 및 4ZQK를 주형(template)으로서 사용하였다. hIgG4의 경우 - PDB ID: 4C54, 4C55, 5W5M 및 5W5N을 주형으로서 사용하였다. 41BB-L의 경우 - PDB ID: 6CPR, 6A3V 및 6CU0을 주형으로서 사용하였다. 링커 분절은 주로 구조적 위반을 제거하기 위해 그리고 가능한 '스페이스(spacer)'에 대한 타당한 추정을 가능하게 하기 위해 CHARMM

의 루프 모델링을 이용하여 모델링하였다. 이러한 모델 분석은 리간드에 대한 가능한 결합 및 상이한 도메인들 사이의 간섭이 없음을 예측하였다(도 13a 내지 도 13d).

[1415] 또한, (GGGS)x2(서열번호 149) 링커를 포함하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 삼량체화 후 별개의 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 PD1 모이어티들 사이의 보다 긴 거리를 허용하도록 고안되었다.

[1416] 이어서, 몇몇의 PD1-4-1BBL 변이체가 고안되었다. 이들의 선택에 대한 근거를 포함하는 이들의 서열 및 이들의 3D 모델은 본원 하기의 표 4 및 도 4 내지 도 6에 나타낸다.

[1417] [표 4]

고안된 PD1-4-1BBL 변이체의 설명

변이체	서열	설명	주석
DSP105	PGWFLDSPDRPWNPPTFSFALLVVTIEGDNATFTCSFSN TSEFVLNWRMSPNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRF RVYQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGALSAPKA QIKESLRAELRVYTERRAEVPTAHPSPRPAGQFOILV ACFWAVSGARASPGSAASPRLNREGPELSPDDPAGLLD RQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG SYKEDTKELVAKAGVYVFFOLELRVVAAGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV GLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 5)	PD1 서열번호 2 (150 아미노산), 클리신 링커, 4 IBBL 서열번호 3 (205 아미노산)	
DSP105_{var1}	DSPDRPWNPPTFSFALLVVTIEGDNATFTCSFSN LNWRMSPNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFVYQLP NGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGALSAPKAQIKESL RAELRVYTERRAEVPTAHPSPRPAGQSAASPRLNREG PELSPDDPAGLLDROGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFOL ELRRVVAAGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTV LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 12)	PD1 서열번호 18 (140 아미노산), 클리신 링커, 4 IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)	4-IBBL의 구조화된 도메인에 상응하는 긴 비구조화 및 소수성 분자로 인해 4- IBBL의 처음 14-N-말단 AA를 제거하는 것 외에도, PD1의 양쪽 말단에서 작은 소수성 플렉싱 부경(원 구조화되는 것으로 예상됨) 제거

[1418]

<p>DSP105_ var2</p>	<p>DSPDRWNPPFTFSPALLVVTTEGDNNAITFCFSNTSESFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTVQLP NGRDFHMSVVRARRND\$GTLYLCCGAI\$LA\$PKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAQOGARASPGSAAS PRLREGPELSPDDPAGLLDLKQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDIKELVYAKAGV YVYFFQLELRVYVAGEGSGVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTYDLPPASSEARN\$AFQGRLLHL\$AQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGAIVLGLFRVTPPEIPAGLPSPR SE (서열번호 14)</p>	<p>PDI 서열번호 18 (140 아미노산), 클라신 링커, 4 IBBL 서열번호 23 (197 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 5AA + PDI의 C- 말단으로부터 5AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 8AA의 결실 (Gly 링커 유지)</p>	<p>구조화되지 않은 것으로 예측되고 4- IBBL의 구조화된 도메인에 선행하는 코어 소수성 분절인 4-IBBL의 처음 8 N- 말단 AA를 제거하는 것 외에도, PDI의 양쪽 말단에서 작은 소수성 플렉싱 분절 (델 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>
<p>DSP105_ var3</p>	<p>DSPDRWNPPFTFSPALLVVTTEGDNNAITFCFSNTSESFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTVQLP NGRDFHMSVVRARRND\$GTLYLCCGAI\$LA\$PKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAQGLREGPELSPD DPAGLLDLKQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDIKELVYAKAGVYVYFFQLELRVY AGEGSGVSLALHLQPLRSAAGAAALTYDLPPASSE ARN\$AFQGRLLHL\$AQRLGVHLHTEARARHAWQ LITQGAIVLGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 16)</p>	<p>PDI 서열번호 18 (140 아미노산), 클라신 링커, 4 IBBL 서열번호 24 (185 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 5AA + PDI의 C- 말단으로부터 5AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 20AA의 결실 (Gly 링커 유지)</p>	<p>4-IBBL의 구조화된 도메인에 선행하는 긴 비구조화 및 소수성 분절로 인해 4- IBBL의 처음 20 N-말단 AA를 제거하는 것 외에도, PDI의 양쪽 말단에서 작은 소수성 플렉싱 분절 (델 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>
<p>DSP105_ var4</p>	<p>DSPDRWNPPFTFSPALLVVTTEGDNNAITFCFSNTSESFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTVQLP NGRDFHMSVVRARRND\$GTLYLCCGAI\$LA\$PKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAQOGSGARASPGSA ASPRELREGPELSPDDPAGLLDLKQGMFAQLVAQNVLII DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDIKELVYAKAG VYVYFFQLELRVYVAGEGSGVSLALHLQPLRSAAGA AALALTYDLPPASSEARN\$AFQGRLLHL\$AQRLGV VHLHTEARARHAWQLITQGAIVLGLFRVTPPEIPAGLPSP RSE (서열번호 44)</p>	<p>PDI 서열번호 18 (140 아미노산), 클라신 링커, 4 IBBL 서열번호 25 (199 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 5AA + PDI의 C- 말단으로부터 5AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 6 아미노산의 결실</p>	<p>PDI의 양쪽 말단으로부터 작은 소수성 플렉싱 분절 (델 구조화되는 것으로 예상됨) 제거 및 4-IBBL의 코어 소수성 분절 제거</p>

[1419]

<p>DSP105₋ var5</p>	<p>DSPDRPWNPPTFSPALLVVTTEGDNATFTCSFSNTSESFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTVQLP NGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCCGAIISLAPKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPSPGSGARASPGSAASPRLRE GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSLW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDIKELVAKAGVYVYFFQ LELRRVYAGEGSGVSLALHLQPLRSAAAGAAALALTY DLPPASSEARNSAFGQGRLLHLISAGQRLLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVGLGFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 45)</p>	<p>PD1 서열번호 21 (133 aa), 글리신 링커, 4-1BBL 서열번호 25 (199 아미노산)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 5AA + PD1의 C- 말단으로부터 12AA + 4 1BBL의 N-말단으로부터 6 아미노산의 결린</p>	<p>4-1BBL의 코어 소수성 분절을 제거하는 것 외에도, PD1의 N-말단으로부터 작은 소수성 분절 및 (결정화된 자체물에 기초하여) PD1의 C-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(별 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>
<p>DSP105₋ var6</p>	<p>DSPDRPWNPPTFSPALLVVTTEGDNATFTCSFSNTSESFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTVQLP NGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCCGAIISLAPKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPSPGSGAAAPRLREGPELSPDD PAGLLDLROGMFAQLVAQNVLIDGPLSLWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDIKELVAKAGVYVYFFQLELRRVVA GEGSGVSLALHLQPLRSAAAGAAALALTYDLPPASSE RNSAFHQGRLLHLISAGQRLLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVGLGFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 46)</p>	<p>PD1 서열번호 21 (133 aa), 글리신 링커, 4-1BBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 5AA + PD1의 C- 말단으로부터 12AA + 4 1BBL의 N-말단으로부터 14 아미노산의 결린</p>	<p>4-1BBL의 플렉싱(별 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절을 제거하는 것 외에도, PD1의 N-말단으로부터 작은 소수성 분절 및 (결정화된 자체물에 기초하여) PD1의 C-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(별 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>
<p>DSP105₋ var7</p>	<p>DSPDRPWNPPTFSPALLVVTTEGDNATFTCSFSNTSESFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTVQLP NGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCCGAIISLAPKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPSPGSGARASPGSAASPRLREGP ELSPDDPAGLLDLROGMFAQLVAQNVLIDGPI SWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDIKELVAKAGVYVYFFQLE LRRVYAGEGSGVSLALHLQPLRSAAAGAAALALTYDL PPASSEARNSAFGQGRLLHLISAGQRLLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVGLGFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 47)</p>	<p>PD1 서열번호 21 (133 aa), 글리신 링커, 4-1BBL 서열번호 23 (197 아미노산)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 5AA + PD1의 C- 말단으로부터 12AA + 4 1BBL의 N-말단으로부터 8 아미노산의 결린</p>	<p>구조화되지 않은 것으로 예측되고 4- 1BBL의 구조화된 도메인에 선행하는 코어 소수성 분절인 4-1BBL의 처음 8 N- 말단 AA를 제거하는 것 외에도, PD1의 N-말단으로부터 작은 소수성 분절 및 (결정화된 자체물에 기초하여) PD1의 C- 말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(별 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>

[1420]

<p>DSP105_ var8</p>	<p>DSPDRWNPPTFSPALLVVTTEGDNATFTCSNTSESFV LNWYRMSPSNQDKLAAPEDRSQPGQDCRFRTQLP NGRDHMSVVRARRNDSTYLCGALSAPKAQIKESL RAELRVTERRAEFTVTAHPSGREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVYAKAGYVYVFFQLELRVYAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAAGAAALTYDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 48)</p>	<p>PDI 서열번호 21 (133 aa), 글리신 링커, 4-1IBBL 서열번호 24 (185 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 5AA + PDI의 C- 말단으로부터 12AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 20AA의 결실 (GH 링커 유지)</p>	<p>4-1IBBL의 구조화된 도메인에 선행하는 긴 비구조화 및 소수성 분절로 인해 4- IBBL의 처음 20 N-말단 AA를 제거하는 것 외에도, PDI의 N-말단으로부터 작은 소수성 분절 및 (결정화된 자체물에 기조하여) PDI의 C-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(결 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>
<p>DSP105_ var9</p>	<p>PWNPPFTSPALLVVTTEGDNATFTCSNTSESFV LNWYRMSPSNQDKLAAPEDRSQPGQDCRFRTQLP NGRDHMSVVRARRNDSTYLCGALSAPKAQIKESL RAELRVTERRAEFTVTAHPSGREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVYAKAGYVYVFFQLELRVYAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAAGAAALTYDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 49)</p>	<p>PDI 서열번호 19 (128 aa), 글리신 링커, 4-1IBBL 서열번호 25 (199 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 10AA + PDI의 C- 말단으로부터 12AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 6 아미노산의 결실</p>	<p>4-1IBBL의 코어 소수성 분절을 제거하는 것 외에도, (결정화된 자체물에 기조하여) PDI의 양쪽 말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(결 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>
<p>DSP105_ var10</p>	<p>PWNPPFTSPALLVVTTEGDNATFTCSNTSESFV LNWYRMSPSNQDKLAAPEDRSQPGQDCRFRTQLP NGRDHMSVVRARRNDSTYLCGALSAPKAQIKESL RAELRVTERRAEFTVTAHPSGREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVYAKAGYVYVFFQLELRVYAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAAGAAALTYDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 50)</p>	<p>PDI 서열번호 19 (128 aa), 글리신 링커, 4-1IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 10AA + PDI의 C- 말단으로부터 12AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 14 아미노산의 결실</p>	<p>4-1IBBL의 플렉싱(결 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절을 제거하는 것 외에도, (결정화된 자체물에 기조하여) PDI의 양쪽 말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(결 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>

[1421]

<p>DSP105_ var11</p>	<p>PWNPFTEFPALLVVTIEGDNAITFCFSNTSESFLNWKY RMSPSNQTDKLAAPPEDRSQPCQDCRFRTVQLPNGRD FHMSVVRARRNDSGTLYLCGAISSLAPKAQIKESLRAEILR VTERRAEVPTAHPSFGARASPGSAASPRLRGEPFLSPD DPAGLLDRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLA GVSLLTGLSYKEDTKELVYAKAGVYVYFFQLELRVY AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVLPPASSE ARNSAFGFGQRLHLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTOGATVGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 51)</p>	<p>PD1 서열번호 19 (128 aa), 글리신 링커, 4-1BBL 서열번호 23 (197 아미노산)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 10AA + PD1의 C- 말단으로부터 12AA + 4- 1BBL의 N-말단으로부터 8 아미노산의 결실</p>	<p>구조화되지 않은 것으로 예측되고 4- 1BBL의 구조화된 도메인에 실행하는 코어 소수성 분절인 4-1BBL의 처음 8 N- 말단 AA를 제거하는 것 외에도, (결정화된 적재물에 기초하여) PD1의 양쪽 말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(열 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>
<p>DSP105_ var12</p>	<p>PWNPFTEFPALLVVTIEGDNAITFCFSNTSESFLNWKY RMSPSNQTDKLAAPPEDRSQPCQDCRFRTVQLPNGRD FHMSVVRARRNDSGTLYLCGAISSLAPKAQIKESLRAEILR VTERRAEVPTAHPSFGARASPGSAASPRLRGEPFLSPD DPAGLLDRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLA GVSLLTGLSYKEDTKELVYAKAGVYVYFFQLELRVY AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVLPPASSE ARNSAFGFGQRLHLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTOGATVGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 52)</p>	<p>PD1 서열번호 19 (128 aa), 글리신 링커, 4-1BBL 서열번호 24 (185 아미노산)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 10AA + PD1의 C- 말단으로부터 12AA + 4- 1BBL의 N-말단으로부터 20AA의 결실 (Gly 링커 유지)</p>	<p>4-1BBL의 구조화된 도메인에 실행하는 긴 비구조화 및 소수성 분절로 인해 4- 1BBL의 처음 20 N-말단 AA를 제거하는 것 외에도, (결정화된 적재물에 기초하여) PD1의 양쪽 말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(열 구조화되는 것으로 예상됨) 제거</p>
<p>DSP105_ var13</p>	<p>PWNPFTEFPALLVVTIEGDNAITFCFSNTSESFLNWKY RMSPSNQTDKLAAPPEDRSQPCQDCRFRTVQLPNGRD FHMSVVRARRNDSGTLYLCGAISSLAPKAQIKESLRAEILR VTERRAEVPTAHPSFGARASPGSAASPRLRGEPFLSPD DPAGLLDRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLA GVSLLTGLSYKEDTKELVYAKAGVYVYFFQLELRVY AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVLPPASSE ARNSAFGFGQRLHLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTOGATVGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 53)</p>	<p>PD1 서열번호 20 (135 아미노산), 글리신 링커, 4- 1BBL, 서열번호 25 (199 아미노산)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 10AA + PD1의 C- 말단으로부터 5AA + 4- 1BBL의 N-말단으로부터 6 아미노산의 결실</p>	<p>4-1BBL의 코어 소수성 분절을 제거하는 것 외에도, PD1의 N-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(열 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 적재물에 기초하여) PD1의 C-말단으로부터 보다 작은 소수성 분절 제거</p>

[1422]

<p>DSP105 var14</p>	<p>PWNPFPSALLVVTTEGDNATFTCSFNTSESEFLNWKY RMSPSNQDKLAAFPEDRSQPGQDCRFVYVTLQPNGRD FHMSVYVARRNDSGTLYLCCGSAISLAPKAQKESLRAELR VTERRAEVPTAHPSPPRPAQGSAAASPRREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVYAKAGVYVYFQLELRRVY AGEGSGYSLALHLOPLRSAAAGAAALATVDLPPASSE ARNSAFHQGRLLHLHSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTOGATVGLFRVYTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 54)</p>	<p>PDI 서열번호 20 (135 아미노산), 글리신 17개, 4- IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 10AA + PDI의 C- 말단으로부터 5AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 14 아미노산의 결실</p>	<p>4-IBBL의 플렉싱(델 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절을 제거하는 것 외에도, PDI의 N-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(델 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 자체물)에 기초하여) PDI의 C-말단으로부터 보다 작은 소수성 분절 제거</p>
<p>DSP105 var15</p>	<p>PWNPFPSALLVVTTEGDNATFTCSFNTSESEFLNWKY RMSPSNQDKLAAFPEDRSQPGQDCRFVYVTLQPNGRD FHMSVYVARRNDSGTLYLCCGSAISLAPKAQKESLRAELR VTERRAEVPTAHPSPPRPAQGSAAASPRREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVYAKAGVYVYFQLELRRVY AGEGSGYSLALHLOPLRSAAAGAAALATVDLPPASSE ARNSAFHQGRLLHLHSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTOGATVGLFRVYTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 54)</p>	<p>PDI 서열번호 20 (135 아미노산), 글리신 17개, 4- IBBL 서열번호 23 (197 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 10AA + PDI의 C- 말단으로부터 5AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 8AA의 결실</p>	<p>구조화되지 않은 것으로 예측되고 4- IBBL의 구조화된 도메인에 신형하는 코어 소수성 분절인 4-IBBL의 처음 8 N- 말단 AA를 제거하는 것 외에도, PDI의 N-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(델 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 자체물)에 기초하여) PDI의 C- 말단으로부터 보다 작은 소수성 분절 제거</p>
<p>DSP105 var16</p>	<p>PWNPFPSALLVVTTEGDNATFTCSFNTSESEFLNWKY RMSPSNQDKLAAFPEDRSQPGQDCRFVYVTLQPNGRD FHMSVYVARRNDSGTLYLCCGSAISLAPKAQKESLRAELR VTERRAEVPTAHPSPPRPAQGSAAASPRREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVYAKAGVYVYFQLELRRVY AGEGSGYSLALHLOPLRSAAAGAAALATVDLPPASSE ARNSAFHQGRLLHLHSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTOGATVGLFRVYTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 55)</p>	<p>PDI 서열번호 20 (135 아미노산), 글리신 17개, 4- IBBL 서열번호 24 (185 아미노산)</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 10AA + PDI의 C- 말단으로부터 5AA + 4- IBBL의 N-말단으로부터 20AA의 결실 (Gly 17개 유지)</p>	<p>4-IBBL의 구조화된 도메인에 신형하는 긴 비구조화 및 소수성 분절로 인해 4- IBBL의 처음 20 N-말단 AA를 제거하는 것 외에도, PDI의 N-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(델 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 자체물)에 기초하여) PDI의 C-말단으로부터 보다 작은 소수성 분절 제거</p>

[1423]

<p>DSP105_ var17</p>	<p>DSPDRPWNPPTFSPALLVVTTEGDNATFTCSFNTSEFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGDSRFRVTOLP NGRDHMSVVRARRNDSGTILCGAISLAPKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPSPRPAGQGSAAASPRLREG PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQL ELRRVAGEGSGVSLALHLQPLRSAAGAAALATVD LPPASSEARNSAFQGRLLHLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGAIVLGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 97)</p>	<p>PDI 서열번호 75 (140 아미노산), 글리신 리커, 4- IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PDI의 N- 말단으로부터의 5AA + PDI의 C- 말단으로부터의 5AA의 결합 + 서열번호 2에 상응하는 C73의 S로의 돌연변이 + 4-IBBL 14AA 로부터의 N-말단 분절의 결실</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 작은 소수성 분절 및 (결정화된 작제물에 기초하여) PDI의 C-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(원 구조화되는 것으로 예상됨) 제거; 원치 않는 S-S 가교를 방지하기 위한 PDI에서의 C에서 S로의 돌연변이; 및 4-IBBL의 플렉싱(원 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절 제거</p>
<p>DSP105_ var18</p>	<p>WNPTFSPALLVVTTEGDNATFTCSFNTSEFVNWYR MSPSNQTDKLAAPEDRSQPGDSRFRVTQLPNGRDF HMSVVRARRNDSGTILCGAISLAPKAQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDL ROGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGI SYKEDIKELVAKAGVYVFFQELRFRVVAAGEGGSV SLALHLQPLRSAAGAAALATVDLPPASSEARNSAFQF QGRLLHLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAIVL GLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 101)</p>	<p>PDI 서열번호 87 (127 아미노산), 글리신 리커, 4- IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PDI의 N- 말단으로부터의 11AA + PDI의 C- 말단으로부터의 12AA의 결합 + 서열번호 2에 상응하는 C73의 S로의 돌연변이 + 4-IBBL 14AA 로부터의 N-말단 분절의 결실</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 보다 큰 플렉싱 분절(원 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 작제물에 기초하여) PDI의 C- 말단으로부터 보다 큰 소수성 분절 제거; 원치 않는 S-S 가교를 방지하기 위한 PDI에서의 C에서 S로의 돌연변이; 및 4-IBBL의 플렉싱(원 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절 제거</p>

[1424]

<p>DSP105_ var19</p>	<p>WNPPFSPALLVVEGDNAIFTCFSFNISEFVLNWWYR MSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDF HMSVYRARRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHSPSPRPAAGGSAASPRLEGGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPELWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDTKELVYAKAGVYVYFFQLELRRVVA GEGSGVSLALHLQPLRSAAAGAAALALTYDLPASSEA RNSAFGQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGAIVLGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 103)</p>	<p>PD1 서열번호 91 (134 아미노산), 클리신 링커, 4- IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PD1의 N- 말단으로부터의 11AA + PD1의 C- 말단으로부터의 5AA의 결실 + 서열번호 2에 상응하는 C73의 S로의 돌연변이 ++4IBBL 14AA로부터의 N-말단 부정의 결실</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터보다 큰 플렉싱 분절(일 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 착제물에 기초하여)PD1의 C- 말단으로부터 작은 소수성 분절 제거; 원치 않는 S-S 가교를 방지하기 위한 PD1에서의 C에서 S로의 돌연변이; 및 4IBBL의 플렉싱(일 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절 제거</p>
<p>DSP105_ var20</p>	<p>DSPDRPNPPTFSPALLVVEGDNAIFTCFSFNISEFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDSRFRVTQLP NGRDFHMSVYRARRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHSPSPRPAAGGSAASPRLEGGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPELWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDTKELVYAKAGVYVYFFQLELRRVVA GEGSGVSLALHLQPLRSAAAGAAALALTYDLPASSEA RNSAFGQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGAIVLGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 105)</p>	<p>PD1 서열번호 83 (133 아미노산), 클리신 링커, 4- IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PD1의 N- 말단으로부터의 5AA + PD1의 C- 말단으로부터의 12AA의 결실 + 서열번호 2에 상응하는 C73의 S로의 돌연변이 ++4IBBL 14AA로부터의 N-말단 부정의 결실</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 작은 플렉싱 분절(일 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 착제물에 기초하여)PD1의 C- 말단으로부터 보다 큰 소수성 분절 제거; 원치 않는 S-S 가교를 방지하기 위한 PD1에서의 C에서 S로의 돌연변이; 및 4IBBL의 플렉싱(일 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절 제거</p>

[1425]

<p>DSPI05_ var21</p>	<p>DSPDRPWNPITFSPALLVVTIEGDNAITFCFSNTSESFV LNWYRMSNSQTDKLAAPEDRSQPQDCRRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESL RAELKVTERRAEVPTAHPSPSPRPAAGSASPRLREGPEL SPDDPAGLLDRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVYVFTQLERL RYVAGEGGSVSLALHLQPLRSAGAAALALITVDLPP ASSEARNSAFGQRLHLHLSAQORLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 107)</p>	<p>PDI 서열번호 95 (138 아미노산), 클린신 링커, 4- IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PDI의 N- 말단으로부터의 5AA+ PDI의 C- 말단으로부터의 7AA의 결합 + 서열번호 2에 상응하는 C73의 S로의 돌연변이 ++4-IBBL 14AA로부터의 N-말단 부위의 결실</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 보다 큰 돌연변이 분절(결합 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 적재물에 기초하여) PDI의 C- 말단으로부터 작은 소수성 분절 제거, 원치 않는 S-S 가교를 방지하기 위한 PDI에서의 C에서 S로의 돌연변이, 및 4-IBBL의 돌연변이(결합 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절 제거</p>
<p>DSPI05_ var22</p>	<p>PGWFILSDRPNWNPITFSPALLVVTIEGDNAITFCFSN TSESFVLNWYRMSNSQTDKLAAPEDRSQPQDCRRFRVTQLP RYTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKA QIKESLRAELKVTERRAEVPTAHPSPSPRPAAGSASPRLREGPEL ACPWAVSGARASPGSAAASPRLEGPDLVGG RQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDDPGLDGL SYKEDTKELVAKAGVYVYVFTQLERLRYVAGEGGSV SLALHLQPLRSAGAAALALITVDLPPASSEARNSAFG QGRLLHLSAQORLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV GLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 111)</p>	<p>PDI 서열번호 73 (136 아미노산), 클린신 링커, 4- IBBL SEQ ID 서열번호 3 (205 아미노산)</p>	<p>서열번호 2에 상응하는 C73의 S로의 돌연변이</p>	<p>원치 않는 S-S 가교를 방지하기 위한 PDI에서의 C에서 S로의 돌연변이</p>
<p>DSPI05_ var23</p>	<p>DSPDRPWNPITFSPALLVVTIEGDNAITFCFSNTSESFV LNWYRMSNSQTDKLAAPEDRSQPQDCRRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESL RAELKVTERRAEVPTAHPSPSPRPAAGSASPRLREGPEL SPDDPAGLLDRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVYVFTQLERL RYVAGEGGSVSLALHLQPLRSAGAAALALITVDLPP ASSEARNSAFGQRLHLHLSAQORLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호 113)</p>	<p>PDI 서열번호 93 (138 아미노산), 클린신 링커, 4- IBBL 서열번호 22 (191 아미노산)</p>	<p>PDI의 N- 말단으로부터의 5AA+ PDI의 C- 말단으로부터의 7AA의 결합 4-IBBL 14AA의 N-말단 부위의 결실</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 보다 큰 돌연변이 분절(결합 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 적재물에 기초하여) PDI의 C- 말단으로부터 작은 소수성 분절 제거 및 4-IBBL의 돌연변이(결합 구조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절 제거</p>

[1426]

<p>DSP105 var24</p>	<p>DSPDRPWNPPITFSFALLVVTEGDNAITFCFSNTSESFV LNWYRMSPSNQDKLAAPEDRSQPGDCRFRTQLP NGRDFHMSVVARBRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESI RAELRVTERRAEVPTAHPSPSRGRGPELSPDDPAGLI LDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDIKELVVAKAGVYVYFFQLELRVYVAGEG SGSVLALHLQLRSLAAGAAALALTVDLPPASSEARNNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVILGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호133)</p>	<p>PDI 서열번호 115 (136 아미노산), 클라신 펩커, 4- IBBL 서열번호 123 (184 아미노산)</p>	<p>PDI의 N- 말단으로부터의 5AA + PDI의 C- 말단으로부터의 9AA의 결실. 4-IBBL의 N-말단 분절로부터의 21AA의 결실</p>	<p>(PDI C-말단측 및 4IBBL N-말단측 둘 다로부터) 상대적으로 긴 링커를 단축하여 4-IBBL의 음으로 하전된 N- 말단을 보완하기 위해 최대 양전하 잔기를 유지함</p>
<p>DSP105 var25</p>	<p>DSPDRPWNPPITFSFALLVVTEGDNAITFCFSNTSESFV LNWYRMSPSNQDKLAAPEDRSQPGDCRFRTQLP NGRDFHMSVVARBRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESI RAELRVTERRAEVPTAHPSPSRGRGPELSPDDPAGLI LRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDIKELVVAKAGVYVYFFQLELRVYVAGEGSGS VSLALHLQLRSLAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFG FOGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (서열번호135)</p>	<p>PDI 서열번호 115 (136 아미노산), 클라신 펩커, 4- IBBL 서열번호 125 (182 아미노산)</p>	<p>PDI의 N- 말단으로부터의 5AA + PDI의 C- 말단으로부터의 9AA의 결실. 4-IBBL의 N-말단 분절로부터의 23AA의 결실</p>	<p>(PDI C-말단측 및 4IBBL N-말단측 둘 다로부터) 상대적으로 긴 링커를 보다 갈게 단축하여 4-IBBL의 음으로 하전된 N-말단을 보완하기 위해 최대 양전하 잔기를 유지함</p>

[1427]

<p>DSP105_ var26</p>	<p>PGWFLDSPDRPWNPFTFSFALLVVEGDNAIFTCFSFN TSEFVLNWRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPQDCRF RVTLQFNGRDFHMSVVRARRNDSTGLCGAISLAPKA QKESLRAELRVTERAEVPTAHPSPRPAGOGSASP RLREGFELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVY YVFFQLELRVVVAGEGSVLSALHLQPLRSAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGQRLHLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGAIVLGLFRVTPPEIPA (서열번호 137)</p>	<p>PDI 서열번호 117 (145) 아미노산), 글리신, 알라닌, 4- IBBL 서열번호 127 (183) 아미노산)</p>	<p>PDI의 C- 말단으로부터의 5AA의 결핍, 4-IBBL의 N-말단 분절로부터의 14AA 및 4- IBBL의 C- 말단으로부터의 8AA의 결핍</p>	<p>PDI의 N-말단의 비결핍(상기 N-말단은 상기 PDI나 상호작용 측에 존재하고, 따라서 이러한 영역에서의 결핍은 단백질 상호작용에 영향을 미칠 가능성이 있다). (결정화된 과제물에 기초하여) PDI의 C-말단으로부터 소수성 분절 제거 및 4-IBBL의 불평형(필 수 조화되는 것으로 예상됨) 및 소수성 분절 제거 및 4-IBBL seq의 C- 말단측(링커를 갖는 이러한 분절의 가능한 상호작용) 제거</p>
<p>DSP105_ var27</p>	<p>PGWFLDSPDRPWNPFTFSFALLVVEGDNAIFTCFSFN TSEFVLNWRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPQDCRF RVTLQFNGRDFHMSVVRARRNDSTGLCGAISLAPKA QKESLRAELRVTERAEVPTAHPSPRPAGREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPISWYSDPG LAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELR VYVAGEGSVLSALHLQPLRSAGAAAALALTVDLPPA SSEARNSAFGQRLHLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGAIVLGLFRVTPPEIPA (서열번호 139)</p>	<p>PDI 서열번호 119 (143) 아미노산), 글리신, 알라닌, 4- IBBL 서열번호 129 (176) 아미노산)</p>	<p>PDI의 C-말단으로부터 7AA의 결핍, 4-IBBL의 N-말단 분절로부터의 21AA 및 4-IBBL의 C- 말단으로부터의 8AA의 결핍</p>	<p>(PDI C-말단측 및 4-IBBL N-말단측 중 다로부터) 상대적으로 긴 링커 및 4-IBBL seq의 C-말단측 (링커를 갖는 이러한 분절의 가능한 상호작용) 단축</p>

[1428]

<p>DSP105- var28</p>	<p>DSPDRPNPPIFPALLVVTIEGDNATFTCSFSFN LNWYRMSNSQDKLAAPFEDRSQGDQCRFRVTLQP NGRDFHMSVVRARRND8GTYLCGAISLAPKAQKESL RAELKVTERRAEVPTAHPSPRPAGQCPWA⁵SGA RASFGSAASPRLREGPELSPDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGLSYKEDTREL VYAKAGVYVVFQLELRRVYVAGEGSGVSLALHLQPL RSAAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGQGRLLHLSA GORLGVHLHTEARARHAWQLTQGTATVGLFRVTEIP AGLPSRSE (서열번호 141)</p>	<p>PDI 서열번호 18 (140 아미노산), 글리신 링커, 4- IBBL 서열번호 3 (205 아미노산)</p>	<p>PDI의 N- 말단으로부터의 SAA+ PDI의 C-말단으로부터 SAA의 결실</p>	<p>PDI의 N-말단으로부터 작은 불완전 분절된 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화된 단백질에 기초하여) PDI의 C- 말단으로부터 작은 소수성 분절 제거. 4-IBBL의 상량제와 후 PDI 도메인들 사이의 장거리를 허용하기 위해 PDI과 4-IBBL 사이에 상대적으로 긴 링커를 남김</p>
<p>DSP105- var29</p>	<p>PGWLDSPDRPNPPIFPALLVVTIEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWYRMSNSQDKLAAPFEDRSQGDQCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRND8GTYLCGAISLAPKA QIKESLRAELKVTERRAEVPTAHPSPRPAGQCPWA⁵SGA SCARASGSAASPRLREGPELSPDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGLSYKEDT KELVYAKAGVYVVFQLELRRVYVAGEGSGVSLALHL QPLRSAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGQGRLLH LSAGORLGVHLHTEARARHAWQLTQGTATVGLFRVTEIP PEIPAGLPSRSE (서열번호 143)</p>	<p>PDI 서열번호 2 (130 아미노산), 글리신 링커, 4- IBBL 서열번호 25 (109 아미노산)</p>	<p>4-IBBL의 N-말단 분절로부터의 SAA의 결실</p>	<p>4-IBBL의 상량제와 후 PDI 도메인들 사이의 장거리를 허용하기 위해 PDI과 4-IBBL 사이에 긴 링커 결합을 할 수 있는 정의된 구조가 없는 긴 고우 서열 4-IBBL로부터 코어 소수성 분절 제거.</p>
<p>DSP105- var30</p>	<p>PGWLDSPDRPNPPIFPALLVVTIEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWYRMSNSQDKLAAPFEDRSQGDQCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRND8GTYLCGAISLAPKA QIKESLRAELKVTERRAEVPTAHPSPRPAGQCPWA⁵SGA GGSGGGGSAASPRLREGPELSPDPAGLLDLRQGMFA PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDP LAGVSLTGLSYKEDTRELVYAKAGVYVVFQLELRR VYVAGEGSGVSLALHLQPLRSAGAAALATVDLPPA SSEARNSAFGQGRLLHLSAGORLGVHLHTEARARHA WOLTOGTATVGLFRVTEIPAGLPSRSE (서열번호 145)</p>	<p>PDI 서열번호 2 (130 아미노산), (GGGS)^{x2} (서열번호 149) 링커 4-IBBL 서열번호 3 (205 아미노산)</p>	<p>(GGGS)^{x2}에 의해 링크된 WT PDI 및 4- IBBL</p>	<p>4-IBBL의 상량제와 후 PDI 도메인들 사이의 장거리를 허용하기 위해 PDI과 4-IBBL 사이의 링커 결합</p>

[1429]

<p>DSPDPWNPPTFSPALLVVEGDNATFTCSFNSSESV LNWYRMSNQTDKLAADPTDRSQDQCRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSTGYLCCGASLAPKAQIKESL RAELRVYERRAEVPTAHPSPRPAGQCGGGGGGGS AASPRLREGPELSPDPAGLLDROGMEAOQVAQNVL LIDGPISWYSDPGLAGVSI.TGGLSYKEDIKELVAKA GVVYVFQLELRVVAEGSGSLSLAIHIQPLRSAAQ AAALALITVDLPPASSEARNSAFGQRLHLSAQORL GVHLHTEARHAWQLTQCGATVILGFRVTPPEIPAGLP SPRSGGGGGGGGGGSAASPRLEGPPELSPDPDPA GLDLRQGMFAQVAQNVLLIDGPIWYSDPGLAGVSI LTGGLSYKEDIKELVAKAGVYVVFQLELRVVAAGE GSGVSLALHQLPLRSAAQAALALITVDLPPASSEARN SAFGQRLHLSAQORLGVHLHTEARHAWQLTQ GATVILGFRVTPPEIPAGLPSPRSGGGGGGGGGG SAASPRLEGPPELSPDPAGLLDROGMEAOQVAQNV LIDGPIWYSDPGLAGVSI.TGGLSYKEDIKELVAK AGVYVVFQLELRVVAEGSGSLSLAIHIQPLRSAA GAAALALITVDLPPASSEARNSAFGQRLHLSAQOR GVHLHTEARHAWQLTQCGATVILGFRVTPPEIPAGL PSPRSE (서열번호 147)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 작은 용량인 본질(원 구조화되는 것으로 예상됨) 및 (결정화본 자체를에 기초하여) PD1의 C- 말단으로부터 작은 소수성 부질 제거. 4-IBBL의 3개 도메인을 포함하여 상량체화의 필요성을 회피함(원 구조화되고 소수성인 것으로 예상되는 N-말단의 14 AA 부질)</p>
<p>DSPDPWNPPTFSPALLVVEGDNATFTCSFNSSESV LNWYRMSNQTDKLAADPTDRSQDQCRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSTGYLCCGASLAPKAQIKESL RAELRVYERRAEVPTAHPSPRPAGQCGGGGGGGS AASPRLREGPELSPDPAGLLDROGMEAOQVAQNVL LIDGPISWYSDPGLAGVSI.TGGLSYKEDIKELVAKA GVVYVFQLELRVVAEGSGSLSLAIHIQPLRSAAQ AAALALITVDLPPASSEARNSAFGQRLHLSAQORL GVHLHTEARHAWQLTQCGATVILGFRVTPPEIPAGLP SPRSGGGGGGGGGGSAASPRLEGPPELSPDPDPA GLDLRQGMFAQVAQNVLLIDGPIWYSDPGLAGVSI LTGGLSYKEDIKELVAKAGVYVVFQLELRVVAAGE GSGVSLALHQLPLRSAAQAALALITVDLPPASSEARN SAFGQRLHLSAQORLGVHLHTEARHAWQLTQ GATVILGFRVTPPEIPAGLPSPRSGGGGGGGGGG SAASPRLEGPPELSPDPAGLLDROGMEAOQVAQNV LIDGPIWYSDPGLAGVSI.TGGLSYKEDIKELVAK AGVYVVFQLELRVVAEGSGSLSLAIHIQPLRSAA GAAALALITVDLPPASSEARNSAFGQRLHLSAQOR GVHLHTEARHAWQLTQCGATVILGFRVTPPEIPAGL PSPRSE (서열번호 147)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 5AA + PD1의 C- 말단으로부터 5AA의 결실 N-말단 본질에서 14AA 결실을 갖는 3개의 4-1- BBL을 함유하는 단일체</p>
<p>PD1 서열번호 18 (140 아미노산), 링커로서 GGGGGGGG (서열번호 122), s3x4IBBL [서열번호 131 (601 aa), 3 회 서열번호 72) GGGGGGGGGG GGG 링커 (서열번호 121)에 의해 분리됨]</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 5AA + PD1의 C- 말단으로부터 5AA의 결실 (Gly 링커 유지)</p>
<p>DSPDPWNPPTFSPALLVVEGDNATFTCSFNSSESV LNWYRMSNQTDKLAADPTDRSQDQCRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSTGYLCCGASLAPKAQIKESL RAELRVYERRAEVPTAHPSPRPAGQCGGGGGGGS AASPRLREGPELSPDPAGLLDROGMEAOQVAQNVL LIDGPISWYSDPGLAGVSI.TGGLSYKEDIKELVAKA GVVYVFQLELRVVAEGSGSLSLAIHIQPLRSAAQ AAALALITVDLPPASSEARNSAFGQRLHLSAQORL GVHLHTEARHAWQLTQCGATVILGFRVTPPEIPAGLP SPRSGGGGGGGGGGSAASPRLEGPPELSPDPDPA GLDLRQGMFAQVAQNVLLIDGPIWYSDPGLAGVSI LTGGLSYKEDIKELVAKAGVYVVFQLELRVVAAGE GSGVSLALHQLPLRSAAQAALALITVDLPPASSEARN SAFGQRLHLSAQORLGVHLHTEARHAWQLTQ GATVILGFRVTPPEIPAGLPSPRSGGGGGGGGGG SAASPRLEGPPELSPDPAGLLDROGMEAOQVAQNV LIDGPIWYSDPGLAGVSI.TGGLSYKEDIKELVAK AGVYVVFQLELRVVAEGSGSLSLAIHIQPLRSAA GAAALALITVDLPPASSEARNSAFGQRLHLSAQOR GVHLHTEARHAWQLTQCGATVILGFRVTPPEIPAGL PSPRSE (서열번호 147)</p>	<p>PD1의 N-말단으로부터 5AA + PD1의 C- 말단으로부터 5AA의 결실 (Gly 링커 유지)</p>

[1430]

[1431] 실시예 2

[1432] PD1-4-1BBL 변이체의 제조

[1433] 비교 기능 분석 및 생산 평가를 위해, 몇몇의 PD1-4-1BBL 융합 단백질이 생성되었다, 즉: 본원에서 "DSP105"(서열번호 5)로서 칭하는 PD1-4-1BBL 융합 단백질 및 본원에서 각각 "DSP105_V1", "DSP105_V2", "DSP105_V3", "DSP105_V17", "DSP105_V18", "DSP105_V19", "DSP105_V20", "DSP105_V21", "DSP105_V22", "DSP_V23", "DSP105_V24", "DSP105_V25", "DSP105_V26", "DSP105_V27", "DSP105_V28", "DSP105_V29", "DSP105_V30" 및 "DSP105_V31"(서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 103, 서열번호 105, 서열번호 107, 서열번호 111, 서열번호 113, 서열번호 133, 서열번호 135, 서열번호 137, 서열번호 139, 서열번호 141, 서열번호 143, 서열번호 145 및 서열번호 147)로서 칭하는 9개의 DSP105 변이체.

[1434] 생산은 DSP105 및 이의 변이체에 대한 암호화 서열로 클로닝된 pcDNA3.4 또는 pTT5 발현 벡터에 의해 형질감염된 ExpiCHO, Expi293F 또는 CHO-3E7 세포에서 수행되었다. 상기 서열은 N 또는 C 말단에 6개의 His-태그 그리고 C 말단에 정지 코돈을 갖거나 갖지 않는 인공 신호 펩타이드(MEAPAQLLFLLLWLPTDTG, 서열번호 4), 코작(Kozak) 서열의 부가와 함께 EcoRI 및 HindIII 제한 효소를 이용하여 상기 벡터에 클로닝되었다. 상기 단백질은 세포 배양의 상청액으로부터 수집되었다.

[1435] 상기 상청액은 HisTrapTM FF Crude 컬럼에 의한 1-단계 정제에 의해 정제되었다.

[1436] 상기 태그된 융합 단백질의 생산은 His 태그 또는 상기 분자의 도메인들(즉, PD1 또는 4-1BBL 각각의 세포의 도메인) 중 하나에 대한 특이적 항체를 사용하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었고, 예를 들면, 도 8a 내지 도 8e를 참조한다.

[1437] 예를 들면, 환원 조건 하에 SDS-PAGE 겔 상에서 분리된 변이체 His-태그된-DSP105_V17, DSP105-V18, DSP105_V19, DSP105_V20 및 DSP105_V23의 웨스턴 블롯 분석에 이은 항-PD1 항체 또는 항 His-태그 항체를 이용한 면역블롯팅(immunoblotting)은 상기 변이체가 CHO-3E7 세포에서 발현되었음을 입증하였다.

[1438] 임의로, 상기 생산된 융합 단백질은 정제된 삼량체의 분획을 수집하기 위해 크기 배제 크로마토그래피에 의해

추가로 정제된다. 이를 위해, 상기 단백질을 이동상(mobile phase)으로서 PBS를 갖는 슈퍼덱스(Superdex) 컬럼에 1ml/min의 유속으로 부하한다. 단백질 삼량체에 상응하는 주요 피크가 수집된다.

- [1439] 수율은 BCA 또는 브래드포드(Bradford) 단백질 농도 측정을 사용하거나, 또는 280nm에서 나노드롭(Nanodrop)에 의한 광학 밀도 측정에 의해 단백질 소멸 계수(protein extinction coefficient)로 나누어 평가한다. 단백질 안정성은 보관 및 가속화된(accelerated) 조건 하에 평가된다.
- [1440] **실시예 3**
- [1441] **상기 PD1-4-1BBL 변이체의 올리고머 상태의 측정**
- [1442] **재료** - 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같은 Expi293 세포에서 생산된 N-말단 his-태그된 DSP105(서열번호 1)[본원에서 "DSP105(HEK-NH)"로서도 칭함], ExpiCHO 세포에서 생산된 N-말단 his-태그된 DSP105(서열번호 1)[본원에서 "DSP105(CHO-NH)"로서도 칭함], ExpiCHO 세포에서 생산된 N-말단 his-태그된 DSP105 변이체 DSP105_V1(서열번호 13), DSP105_V2(서열번호 15) 및 DSP105_V3(서열번호 17)[본원에서 "DSP105(CHO-NH)-V1", "DSP105(CHO-NH)-V2" 및 "DSP105(CHO-NH)-V3"로서도 칭함], CHO-3E7 또는 ExpiCHO 세포에서 생산된 N-말단 His-태그된 DSP105 변이체 DSP105_V17(서열번호 99) 및 DSP105_V22(서열번호 109) 및 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같은 CHO-3E7 또는 ExpiCHO 세포에서 생산된 DSP105 변이체 DSP107_V17(서열번호 97), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147).
- [1443] 스펙트라(Spectra) BR 단백질 분자량 마커(Thermo Fisher Scientific, cat# 26634), 4 내지 20% 폴리아크릴아미드 겔(BioRad, cat# 556-8094), 이-스테인 페드(e-Stain ped)(GenScript, cat #L02011), 라엠멜리(Laemmeli) 부하 완충액(BioRad, cat# 161-0747). 슈퍼덱스(Superdex) 200 증가 컬럼(GE Healthcare), SEC-MALS 시스템: AKTA 익스플로러(Explorer)(GE) + MiniDawn TREOS + OPTILAB T-reX(WYATT).
- [1444] **방법** -
- [1445] **SDS-PAGE 분석** - 각각의 샘플로부터의 2 μ g의 단백질 또는 35 μ l의 상청액을 β -메르캅토에탄올의 존재 또는 부재(각각 환원 및 비-환원 조건) 하에 부하 완충액과 혼합하였고, 95°C에서 5분 동안 가열하였고, 4 내지 20% 농도구배(gradient) 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 SDS-PAGE 상에서 분리하였다. 상기 겔 상에서의 단백질 이동은 제조업자의 지침에 따라 이-스테인 페드로 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색하고 이-스테인 기기(GenScript)를 사용하여 세척함으로써 가시화된다.
- [1446] **SEC-MALS 분석** - 단백질을 슈퍼덱스 200 증가 컬럼(GE Healthcare)에 부하하고 이동상으로서 10mM KPO4 pH 8.0 + 150mM NaCl을 사용하여 0.8ml/min의 유속으로 실행한다. 검출은 AKTA 익스플로러(GE) + MiniDawn TREOS + OPTILAB T-reX(WYATT)를 사용하여 UV, MALS 및 RI에 의해 수행된다.
- [1447] **결과** -
- [1448] 도 7에서 입증된 바와 같이, 높은 비율의 고분자량 형태(HMW, 응집체)가 N-말단 His-태그된 DSP105(서열번호 1)에서 비환원 조건 하에서 관찰되었지만 환원 조건에서는 관찰되지 않았다. 반면에, N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99)에서는 경미한 수준의 응집체만이 검출되었고, 이는 DSP105_V17에서 부정확한 디설파이드 결합 형성으로 인한 DSP105의 응집이 방지되었음을 나타낸다. 도 8a 내지 도 8e에서 입증되는 바와 같이, 다른 PD1-4-1BBL 변이체[즉, DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105) 및 DSP105_V23(서열번호 113)]에서 낮은 수준의 응집체가 관찰되었다.
- [1449] 도 9a 내지 도 9b에 나타낸 바와 같이, 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에서 분리된 경우 N-말단 his-태그된 DSP105(WT; 서열번호 1), His N-말단 His-태그된 DSP105 변이체 DSP105_V17(서열번호 99), DSP105_V17(서열번호 97), DSP105_V20(서열번호 105), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), 및 DSP105_V31(서열번호 147), PD1-4-1BBL의 변이체들은 환원 조건 하에서와 동일한 분자량에서 검출되었다. 보다 높은 분자량의 추가의 밴드(band)는 his-태그된 DSP105(WT; 서열번호 1, 도 9a 내지 도 9b에서 "DSP105WT"로 지정됨)에서 검출되었고, 이는 환원 조건에 비해 비-환원 조건 하에서 더 강했다. 이는 S-S 가교(bridge)에 의해 매개되는 다량체의 형성을 시사할 수 있다. 흥미롭게도, 비환원 DSP105WT에 나타난 이러한 주요 "고 분자량" 밴드는 CYS73> Ser 치환을 함유하는 DSP105_V22(서열번호 111)에

서 보이지 않았으며, 이는 이러한 고분자 밴드가 아마도 CYS73에 의해 매개된다는 것을 강조한다.

[1450] **실시예 4**

[1451] **상기 PD1-4-1BBL 변이체는 도메인 둘 다를 포함한다**

[1452] **재료** - 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산된, DSP105(HEK-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)-V1(서열번호 13), DSP105(CHO-NH)-V2(서열번호 15), DSP105(CHO-NH)-V3(서열번호 17), N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP_V17(서열번호 97), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147).

[1453] 웨스턴 블롯 분석의 경우: 스펙트라 BR 단백질 마커(Thermo Fisher Scientific, cat# 26634), 라ئم멜리 부하 완충액(BioRad, cat# 161-0747), 4 내지 20% 폴리아크릴아미드 겔(BioRad, cat# 556-8094), 항 4-1BBL(BioVision, 5369-100), 항 PD1(Cell Signaling, cat# 86163), 항-His(GenScript, Cat.No. A00186), 2차 염소 항 토끼 IgG (H + L)-HRP 접합체(R&D, cat# 170-6515), ECL Plus 웨스턴 블롯팅 기질(Pierce, cat# 32132).

[1454] 샌드위치(sandwich) ELISA의 경우: 항 4-1BBL 항체(매칭된 쌍(matched pair)으로부터의 포획 항체; Abnova #H00008744-AP41), 항 PD1-비오틴화 항체, 스트렙타비딘(Streptavidin) 단백질, HRP(#21126, Thermo Scientific), TMB 기질(1-Step™ Ultra TMB-ELISA 기질 용액, Thermo Scientific #34028).

[1455] **방법** -

[1456] **웨스턴 블롯 분석** - 단백질(레인(lane)당 50 내지 500ng)을 환원 또는 비환원 조건(각각 β-머캅토에탄올을 함유하는 부하 완충액에서 그리고 95℃에서 5분 동안 끓임, 또는 동일한 완충액에서 β-머캅토에탄올의 부재 하에 가열하지 않음)으로 처리하였고, 4 내지 20% 농도구배 SDS-PAGE 겔에서 분리하였다. 이어서, 단백질을 PVDF 막으로 이동시켰고, 1차 항체, 항 4-1BBL, 항-PD1 또는 항-His와 함께 밤새 배양하였고, 이어서 HRP-접합된 2차 항체와 함께 1시간 배양하였다. ECL 전개 후 신호가 검출되었다.

[1457] **샌드위치 ELISA** - 플레이트는 항 4-1BBL 포획 항체(PBS에서 2.5ug/ml)로 코팅되고 차단 용액(PBS, 1% BSA, 0.005% Tween)으로 차단된다. 차단 용액에 일련 희석된 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질은 코팅된 플레이트에서 2시간 동안 도포 및 배양되고, 이어서 항-PD1 비오틴화 항체를 검출하면서 배양하고, 제조업자의 지침에 따라 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질로 후속 검출한다. 플레이트는 620nm에서를 기준으로 450nm에서 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 분석된다.

[1458] **실시예 5**

[1459] **상기 PD1-4-1BBL 변이체는 PDL1 및 4-1BB에 결합한다**

[1460] **PDL1에 대한 PD1-4-1BBL 단백질의 상기 PD1 도메인의 결합 분석**

[1461] 사람 PDL1에 대한 PD1-4-1BBL의 상기 PD1 도메인의 결합은 PDL1을 과발현하는 DLD1-PDL1 세포주를 사용하여 측정되었다. DLD1-WT 세포는 음성 대조군으로서 작용하였다. 세포를 상이한 농도의 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질과 함께 배양하고, 이어서 2차 항 4-1BBL 항체로 면역-염색하였다. 결합은 유세포 측정법에 의해 분석하였다.

[1462] **재료** - 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산된, DSP105(HEK-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)-V1(서열번호 13), DSP105(CHO-NH)-V2(서열번호 15), DSP105(CHO-NH)-V3(서열번호 17), N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP105_V17(서열번호 97), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147).

[1463] DLD1-WT 및 DLD1-PDL1 세포주(Hendriks et al 2016), 트루 스테인(True stain) FCX(Biolegend, cat#422302), 항 4-1BBL(Biolegend, cat#311506), 이소타입 IgG1, k(Biolegend, cat#400122), 항 PDL1(Biolegend,

cat#329708), 이소타입 IgG2b(Biolegend, cat#400322).

- [1464] **방법** - 세포를 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 상이한 농도(0.05 내지 50 $\mu\text{g/ml}$)를 이용하여 병상에서 30분 동안 배양하였고, 이어서 4-1BBL에 대한 항체로 면역-염색하고 유세포 측정법으로 분석하였다.
- [1465] **4-1BB에 대한 PD1-4-1BBL 단백질의 상기 4-1BBL 모이어티의 결합 분석**
- [1466] 사람 4-1BB에 대한 PD1-4-1BBL의 상기 4-1BBL 도메인의 결합은 4-1BB를 과발현하는 HT1080-4-1BB 세포주를 사용하여 측정되었다. HT1080 WT 세포는 음성 대조군으로서 작용하였다. 세포를 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 상이한 희석액과 함께 배양하고, 이어서 2차 항 PD1 항체로 면역-염색하였다. 결합은 유세포 측정법에 의해 분석하였다.
- [1467] **재료** - 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산된, DSP105(HEK-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)-V1(서열번호 13), DSP105(CHO-NH)-V2(서열번호 15), DSP105(CHO-NH)-V3(서열번호 17), N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP105_V17(서열번호 97), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147).
- [1468] HT1080 WT 및 HT1080-4-1BB 세포(Wyngol et al, 2009), Fixable Viability Dye(BD Biosciences, cat#562247), 트루 스테인 FCX(Biolegend, cat#422302), 항 PD1(Biolegend cat#329908), 항 41BB(Biolegend cat#309801) 이소타입 IgG1, K(Biolegend, cat# 400122).
- [1469] **방법** - 세포를 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질의 상이한 희석액(1:8 내지 1:1024)을 이용하여 병상에서 30분 동안 배양하였고, 이어서 PD1에 대한 항체로 면역-염색하고 유세포 측정법으로 분석하였다.
- [1470] **결과** - 도 10a에 나타난 바와 같이, DLD1-PD1 및 HT1080-4-1BB 세포는 관련 수용체 PD1 및 41BB를 각각 발현한다. 결합 검정은 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 97)이 DLD1-PDL1 세포에 그리고 HT1080-41BB 세포에 용량 의존적 방식으로 결합함을 보여주었다(도 10b). (비-형질감염된 세포로부터의) 상청액 대조군의 상이한 희석액은 HT1080-41BB 세포에 결합하지 않았다(도 10b). 이어서, GMFI 값은 GraphPad Prism 소프트웨어를 이용한 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다(도 10c). 종합하면, 융합 단백질인 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 97)의 양측은 세포의 표면 상에서 과발현된 이들의 관련 대응물에 결합한다.
- [1471] **사람, 마우스 및 사이노몰거스(cynomolgus) 원숭이 PDL1 및 4-1BB 대응부에 대한 PD1-4-1BBL의 결합**
- [1472] PDL1 및 4-1BB 대응부에 대한 PD1-4-1BBL 단백질의 결합은 표면 플라즈몬 공명(SPR: Surface Plasmon Resonance) 검정에 의해 측정한다.
- [1473] **재료** - 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산된, DSP105(HEK-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)-V1(서열번호 13), DSP105(CHO-NH)-V2(서열번호 15), DSP105(CHO-NH)-V3(서열번호 17), N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP105_V17(서열번호 97), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147).
- [1474] 시리즈 S 센서 칩 CM5(GE, cat. # BR100530), Ab 포획 키트, 사람 hCD47(음성 대조군), 사람 PDL1, 마우스 PDL1, 사이노몰거스 PDL1, 사람 4-1BB, 마우스 4-1BB, 사이노몰거스 4-1BB.
- [1475] **방법** - 비아코어(Biacore) T100 바이오센서(biosensor)(GE Healthcare)를 이용하여 SPR 검정을 수행한다. 상기 포획 키트로부터의 항체는 제조업자에 의해 권고되는 바와 같은 표준 아민 커플링 프로토콜을 사용하여 상기 칩(Fc1-4)의 모든 4개의 유동-채널에 커플링된다. 상기 칩에 대한 PD1-4-1BBL 대응부 단백질(PDL1 및 4-1BB) 결합은 HBS-EP + 실험 완충액(10mM HEPES pH7.3, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween20)에서 수행된다: 사람 CD47(음성 대조군)은 참조 채널 Fc1에 부하되고, 한편 Fc2-4는 사람, 마우스 및 사이노몰거스 PDL1 단백질이 부하된다. 상기 칩의 자동화된 재생 후, 상기 칩은 채널 Fc1 상에 사람 CD47로 그리고 채널 Fc2-4 상에 사람, 마우스 및 사이노몰거스 4-1BB 단백질로 재-부하된다. 대응부 결합 후, 상기 PD1-4-1BBL 분석물은 4개의 모든 채널을 통과한다. 이러한 프로세스는 50 $\mu\text{l/min}$ 의 유속으로 다양한 농도의 PD1-4-1BBL 분석물을 이용하여 반복적

으로 반복된다. 3M의 MgCl₂ 용액은 각 주기의 종료시에 주입되어(20 μl/min으로 45초) 주입되어 상기 포획된 분자를 제거하여 활성 표면을 재생성한다. 결합 매개변수는 BiaEvaluation 소프트웨어 v. 3.0.2(GE Healthcare)에서 키네틱 1:1 결합 모델을 이용하여 평가하였다.

[1476] **실시예 6**

[1477] **양면 결합(DUAL SIDE BINDING) - 효능 검정**

[1478] 상기 분자의 대응물에 대한 상기 분자의 양면의 결합, 즉 PDL1에 대한 PD1의 결합 및 4-1BB에 대한 4-1BBL의 결합은 샌드위치 ELISA 기반 효능 검정에 의해 시험된다. 이러한 검정은 또한 상기 상이한 생산 배치(batch)들의 기능적 특성을 비교하는데 사용된다.

[1479] **재료** - 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산된, DSP105(HEK-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)-V1(서열번호 13), DSP105(CHO-NH)-V2(서열번호 15), DSP105(CHO-NH)-V3(서열번호 17), N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP105_V17(서열번호 97), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147). 사람 재조합 PDL1(ACRO Biosystem, A001-214), 사람 재조합 단백질 4-1BB-비오틴(cat#41B-H82E3, ACRO Biosystem), 스트렙트아비딘 단백질-HRP(cat#21126, ThermoScientific), 1-Step™ 울트라 TMB-ELISA 기질 용액(cat#34028, ThermoScientific).

[1480] **방법** - PDL1은 플라스틱 플레이트의 표면에 결합되고, PD1-4-1BBL이 부가되어 상기 고정화된 PDL1에 결합되도록 한다. 세척 후, 비오틴닐화된 4-1BB를 부가하고 상기 분자의 4-1BBL 암(arm)에 결합되도록 한다. 이어서, 상기 플레이트를 세척하고 스트렙트아비딘 HRP를 부가한다. 검출은 450nm에서의 기준으로 540nm에서 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 TMB 기판으로 수행된다.

[1481] **실시예 7**

[1482] **상기 PD1-4-1BBL 변이체에 의한 4-1BB의 활성화**

[1483] 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질에 의한 4-1BB 수용체의 활성화 효과는 HT1080 세포 또는 상기 4-1BB 수용체를 과발현하는 다른 세포주를 사용하여 측정되었다. 구체적으로, 상기 HT1080-4-1BB 세포주는 4-1BB를 과발현하고 4-1BBL의 결합시 IL8을 분비하는 것으로 공지되어 있다(Wyzgol et al., 2009, The Journal of Immunology). 4-1BBL이 이들 세포 표면 상의 4-1BB 수용체에 결합하면, 신호전달 경로가 활성화되어 IL8의 분비를 초래한다. 이를 위해, PDL1 발현 세포를 갖거나 또는 갖지 않는 상이한 농도의 상기 생산된 PD1-4-1BBL의 존재 하에 상기 세포를 배양하였고, 상기 배양 배지로의 IL8 분비를 ELISA에 의해 측정하였다.

[1484] **재료** - 상기 본원 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산된, DSP105(HEK-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)-V1(서열번호 13), DSP105(CHO-NH)-V2(서열번호 15), DSP105(CHO-NH)-V3(서열번호 17), N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP105_V17(서열번호 99), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147).

[1485] HT1080-4-1BB 세포, IL-8 ELISA 키트(R&D, cat#D8000C), DMEM(Biological industries, cat# 01-055-1A), FBS(Rhenium, cat# 10270106), 항 4-1BB(Biolegend, cat#359810), 이소타입 IgG1, k(Biolegend, cat#400122).

[1486] **방법** - HT1080-4-1BB 세포(웰당 10000개)를 상이한 농도의 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질을 갖는 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 상청액의 IL8 농도는 제조업자의 프로토콜에 따라 IL8 ELISA 키트에 의해 측정되었다. 플레이트는 540nm에서의 기준으로 450nm에서 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 분석되었다.

[1487] **결과** - 도 11에 나타낸 바와 같이, HT1080-4-1BB 세포는 관련 수용체 4-1BB를 발현한다. 시험된 모든 DSP105 변이체 단백질 (N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP105_V17(서열번호 99), 및 DSP105_V23(서열번호 13)은 FBS 함유 배지에서 용량 의존적 방식으로, 상기

HT1080-4-1BB 세포로부터의 IL8 분비에 의한 측정시 상기 4-1BB 신호전달을 유발할 수 있었다(도 12).

- [1488] **실시예 8**
- [1489] **PDL1 결합 차단에 대한 상기 PD1-4-1BBL 변이체의 영향**
- [1490] PD1-4-1BBL의 상기 PD1 부분은 T 세포에서 발현된 내인성 PD1과 종양 세포 상에서 발현된 PDL1의 상호작용을 차단하도록 고안된다. 이를 위해, 이러한 상호작용 차단제로서의 상기 생산된 PD1-4-1BBL 변이체의 유효성을 평가한다.
- [1491] **재료** - 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산된, DSP105 (HEK-NH) (서열번호 1), DSP105 (CHO-NH) (서열번호 1), DSP105 (CHO-NH)-V1 (서열번호 13), DSP105 (CHO-NH)-V2 (서열번호 15), DSP105 (CHO-NH)-V3 (SEQ IDN O: 17), N-terminal His-tagged DSP105_V17 (서열번호 99), His-tagged DSP105_V22 (서열번호 109), DSP105_V17 (서열번호 99), DSP105_V18 (서열번호 101), DSP105_V19 (서열번호 103), DSP105_V20 (서열번호 105) DSP105_V21 (서열번호 107), DSP_V22 (서열번호 111), DSP105_V23 (서열번호 113), DSP105_V24 (서열번호 133), DSP105_V25 (서열번호 135), DSP105_V26 (서열번호 137), DSP105_V27 (서열번호 139), DSP105_V28 (서열번호 141), DSP105_V29 (서열번호 143), DSP105_V30 (서열번호 145) and DSP105_V31 (서열번호 147).
- [1492] PD-1: PDL1 억제제 스크리닝 ELISA 검정 쌍(Acro Biosystems, cat. #EP101), 하기를 포함함: 제조함 사람 PDL1, 항 hPD1 중화 항체, 비오틴화된 hPD1.
- [1493] **방법** - ELISA 플레이트는 제조함 사람 PDL1로 밤새 코팅된다. 플레이트를 세척하고 상기 생산된 PD1-4-1BBL 용합 단백질 또는 양성 대조군 항 PD1 항체의 상이한 농도로 1시간 동안 배양한다. 비오틴화된 PD1을 부가한 후 추가로 1시간 배양한다. 상기 배양 후, 상기 플레이트를 세척하고 표준 ELISA 프로토콜에 따라 스트렙티아비딘-HRP 및 TMB 기질로 블롯팅한다.
- [1494] 플레이트는 620nm에서의 기준으로 450nm에서 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 분석한다.
- [1495] **실시예 9**
- [1496] **상기 PD1-4-1BBL 변이체에 의한 PBMC 또는 T 세포의 활성화**
- [1497] T 세포의 활성화는 2개의 신호를 필요로 한다: 항원 제시 세포(APC) 상의 중 조직적합성 복합체(MHC)/펩타이드 복합체와 상기 T-세포 수용체(TCR)의 라이게이션 및 항원 제시 세포(APC) 상에 상응하는 리간드를 갖는 T 세포에 대한 공동자극 수용체의 가교. 4-1BB는 4-1BBL에 대한 라이게이션시 CD8+ 및 CD4+ T 세포 둘 다의 확장, 생존, 분화 및 사이토카인 발현을 촉진하는 T 세포 공동-자극 수용체이다.
- [1498] T 세포의 활성화를 측정하기 위한 다수의 방법들이 당해 분야에 공지되어 있고, 하기가 포함되지만 이들에 한정되는 것은 아니다:
- [1499] - T 세포의 표면에서의 활성화 마커의 발현(예를 들면: CD25, CD69, CD62L, CD137, CD107a, PD1 등). 활성화 마커의 발현은 특이적 항체와 유세포측정 분석(FACS)을 이용하여 상기 세포를 염색함으로써 시험한다.
- [1500] - 염증성 사이토카인(예를 들면: IL2, IL6, IL8, INF 감마 등)의 분비. 염증성 사이토카인의 분비는 ELISA에 의해 시험된다.
- [1501] - CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester: 카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르) 또는 기타 세포 증식 염료로 T 세포를 사전-염색하고 FACS에 의해 측정되는 CFSE 희석에 의한 세포의 편차를 측정하여 측정되는, 증식. 증식은 또한 Incucyte 기기를 사용하여 시간에 걸쳐 사진을 찍고 특정 소프트웨어로 상기 사진을 분석하여 측정된다.
- [1502] - 칼신-AM 시약을 이용하여 암 세포를 사전-라벨링하고 발광 플레이트 판독기를 이용하여 상기 배양 배지로의 칼신의 방출을 측정함으로써 측정되는, 표적 세포, 예를 들면 암 세포의 사멸. 사멸은 또한 라벨링된 표적 세포 및 카스파제 민감성 형광 기질을 사용하여 Incucyte 기기에 의해 측정된다.
- [1503] 이를 위해, 사람 T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell) 활성화의 향상에 대한 상기 생산된 PD1-4-1BBL 용합 단백질의 영향을 평가한다.
- [1504] **재료** - 본원 상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산된, DSP105(HEK-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)-V1(서열번호 13), DSP105(CHO-NH)-V2(서열번호 15), DSP105(CHO-NH)-V3(서열번호 17),

N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP105_V17(서열번호 97), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147). 피콜-파크(Ficoll-Paque)(GE Healthcare, cat# 17-1440-03), Leaf 정제된 항-사람 CD3(BioLegend, cat# BLG-317315), 재조합 사람 IL-2(Biolegend, cat# 589106), 항 CD27, 항 CD25, CD69, CD107a, CD137, PD1 항체, EasySep Direct 사람 T 세포 단리 키트 (Stemcell, cat# 19661), αCD3/CD28 다이내비드(dynabead)(Thermo, cat# Dy-11131D), IFNγ ELISA 키트 (Peprotech, cat# 900-TM27), CFSE.

[1505] 방법 - 사람 PBMC는 피콜-파크 방법(Grienvic et al. 2016 Biopreserv Biobank. 14 (5) : 410-415)을 사용하여 건강한 공여자의 말초 혈액에서 단리되고, T 세포는 음성 선택 자기 비드에 의해 추가로 단리된다. 단리 후, 항-CD3(30ng/ml) 또는 IL-2(1000U/ml) 또는 항-CD3 + IL-2, 또는 αCD3/CD28 다이내비드(세포당 1:10 비드)의 최적 이하의 농도의 존재시에 상이한 농도의 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질을 부가하여 세포를 배양한다. 세포는 PDL1 발현 세포의 존재 또는 부재 하에 또는 PDL1 코팅된 플레이트에서 1 내지 7일 동안 배양한다. IFNγ와 같은 전염증성 사이토카인의 상기 배양 배지로의 분비는 ELISA로 측정된다. 증식은 제조업자의 프로토콜에 따라 IncuCyte® S3 생-세포 분석 시스템(Incucyte)에 의해 또는 CFSE를 사용하여 측정된다. 세포는 유세포 측정법에 의해 활성화 마커 CD25, CD69, CD107a, CD137(4-1BB), PD1, 상이한 시점에서의 표면 발현에 대해 추가로 시험된다. 사멸은 제조업자 프로토콜에 따라 칼세인 AM 방출에 의해 또는 Incucyte 기기에 의해 평가된다.

[1506] 실시예 10

[1507] 상기 PD1-4-1BBL 변이체의 생체내 항-종양 효과

[1508] 암 치료에서 PD1-4-1BBL의 효능을 시험하기 위해 3개의 상이한 생체내 마우스 모델들이 사용된다:

[1509] 1. 사람 줄기 세포로 또는 사람 PBMC로 또는 고정화된 사람 PBMC로 그리고 사람 종양 세포로 접종된 NSG 마우스. 이러한 모델에서, PD1-4-1BBL은 사람 PDL1(종양 및 면역 세포에서 발현됨)과 그리고 사람 T 세포 상의 4-1BB와 상호작용한다.

[1510] 2. C57BL/6 - MC38 마우스 결장 암종 또는 다른 암 세포주 또는 사람 PDL1을 과발현하는 암 세포주로 접종된 사람-4-1BB 녹-인(knock-in) 마우스. 이러한 모델에서, 상기 마우스 4-1BB 세포의 도메인은 사람 4-1BB의 도메인에 의해 대체되므로 PD1-4-1BBL은 마우스 T 세포에서 발현된 사람 4-1BB와 상호작용할 수 있다. PD1-4-1BBL은 마우스와 그리고 종양 세포 상에 발현된 사람 PDL1과 상호작용한다.

[1511] 3. 마우스 PDL1을 발현하는 동계(Syngeneic) 마우스 종양 모델. 이들 모델에서, PD1-4-1BBL은 종양 세포 상의 마우스 PDL1과 상호작용한다.

[1512] 방법 - 3개 모델 모두에서, 마우스에게 정맥내로(IV), 복강내로(IP), 피하로(SC) 또는 정위적으로(orthotopically) 종양 세포를 접종한다. 일단 종양이 촉진되면(약 80mm³), 마우스는 상기 생산된 PD1-4-1BBL 융합 단백질, 예를 들면, DSP105(HEK-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)(서열번호 1), DSP105(CHO-NH)-V1(서열번호 13), DSP105(CHO-NH)-V2(서열번호 15), DSP105(CHO-NH)-V3(서열번호 17), N-말단 His-태그된 DSP105_V17(서열번호 99), His-태그된 DSP105_V22(서열번호 109), DSP105_V17(서열번호 99), DSP105_V18(서열번호 101), DSP105_V19(서열번호 103), DSP105_V20(서열번호 105), DSP105_V21(서열번호 107), DSP_V22(서열번호 111), DSP105_V23(서열번호 113), DSP105_V24(서열번호 133), DSP105_V25(서열번호 135), DSP105_V26(서열번호 137), DSP105_V27(서열번호 139), DSP105_V28(서열번호 141), DSP105_V29(서열번호 143), DSP105_V30(서열번호 145) 및 DSP105_V31(서열번호 147)의 상이한 용량 및 상이한 용법으로 IV, IP, SC 또는 정위적으로 치료된다.

[1513] 체중과 임상학적 징후에 대해 마우스를 추적한다. 종양은 캘리퍼(caliper)로 일주일에 수회 측정하고; 종양 체적은 다음 방정식에 따라 계산된다: $V = \text{길이} \times \text{너비}^2 / 2$. 마우스 체중은 일상적으로 측정된다. 종양 성장 및 생존은 전체 실험을 통해 모니터링된다.

[1514] 상기 종양에서 면역 세포의 침윤 및 서브-타입핑(sub-typing)은 특이적 항체 염색 및 유세포측정 분석을 사용하여 종양 절제 또는 림프절 배출, 소화 및 면역 표현형 검사에 의해 시험한다. 추가로 또는 대안으로, 특이적 항체를 사용한 면역조직화학 염색을 위해 종양 절제, 파라핀 포매 및 절편화(sectioning)에 의해 면역 세포의

침윤 또는 종양의 괴사 등급을 결정한다.

- [1515] 희생시, 마우스 장기를 수거하고 H&E 및 IHC 염색을 위해 파라핀 블록에 포매한다.
- [1516] 하기 시험들: PK 분석, 혈장내 사이토카인 측정, 순환중인 혈액 세포 하위-집단의 FACS 프로파일링, 혈액학 시험, 혈청 화학 시험, 항-약물-항체(ADA) 분석 및 중화 항체 분석(NAB)을 위해, 일반적 절차에 따라 상이한 시점에 마우스로부터 혈액 샘플을 채취한다.
- [1517] 본 발명이 이의 특정 실시형태들과 관련하여 설명되었지만, 다수의 대안, 변형 및 변경이 당해 분야 숙련자에게 명백할 것임이 분명하다. 따라서, 첨부된 청구범위의 정신 및 넓은 범위 내인 모든 이러한 대안, 변형 및 변경을 포함하도록 의도된다.
- [1518] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참조에 의해 본원에 포함되도록 명시된 바와 동일한 정도로 본 명세서에 이들의 전문이 참조에 의해 본원에 포함된다. 또한, 본 출원의 임의의 참조의 인용 또는 확인은 이러한 참조가 본 발명에 대한 선행 기술로서 입수가능하다는 것을 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 섹션 제목이 사용되는 한, 이들은 반드시 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [1519] 또한, 본 출원의 임의의 우선권 문서(들)는 이의 전문이 참조에 의해 본원에 포함된다.

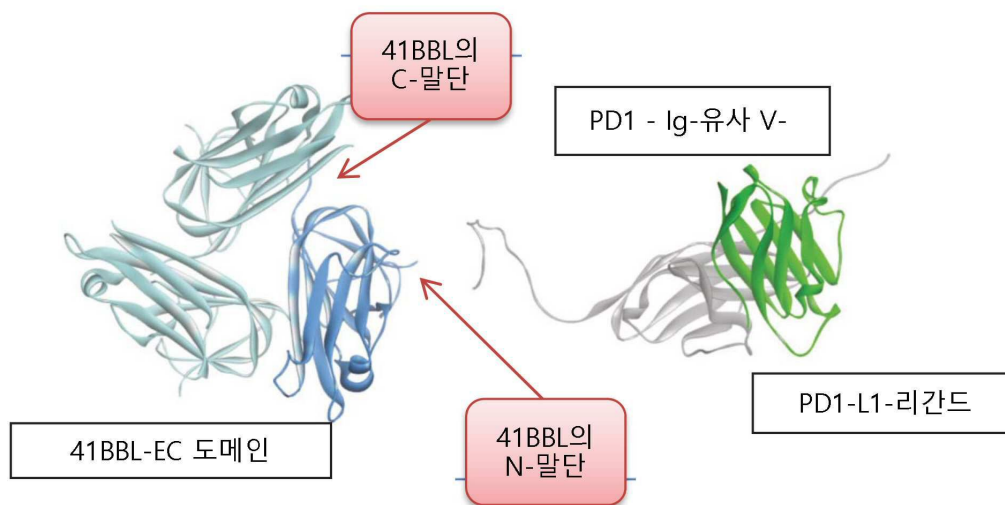
도면

도면1

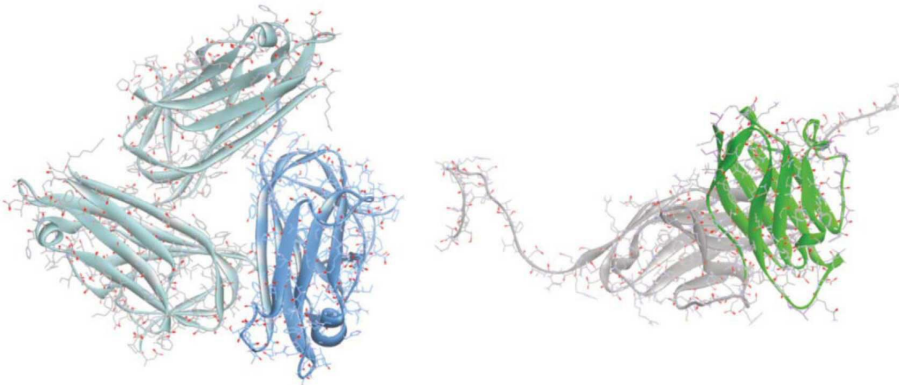
```

MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGHHHHHPGWFLDSPDRPWNPPPTFS
PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWRMSPSNQTDKLAAP
PEDRSQPGQDCRFVRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI
SLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV
GACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF
AQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA
KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA
LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH
AWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSE
    
```

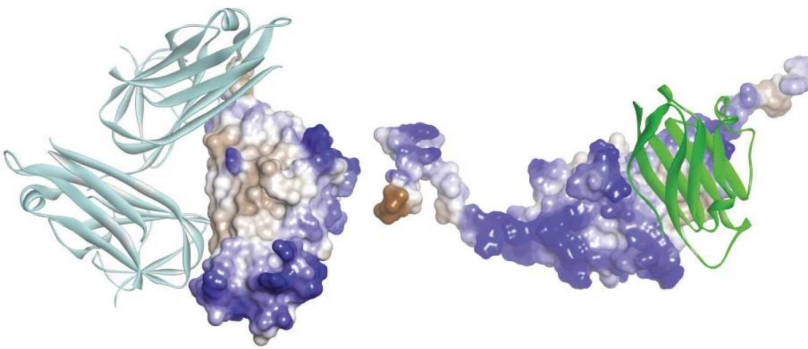
도면2a



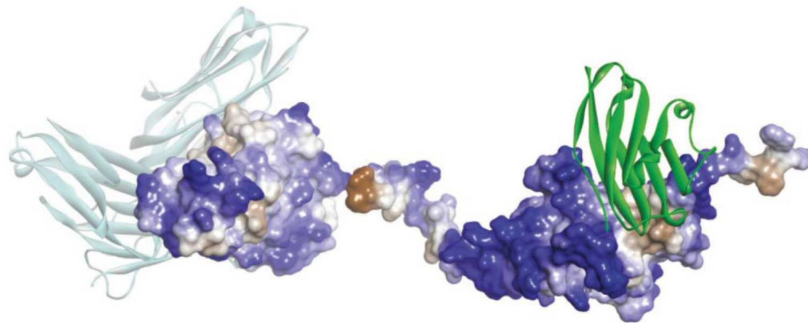
도면2b



도면2c



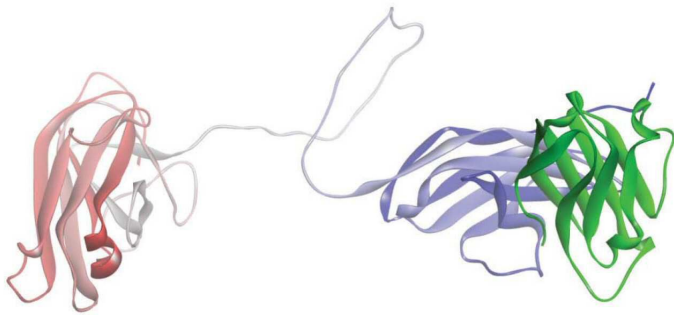
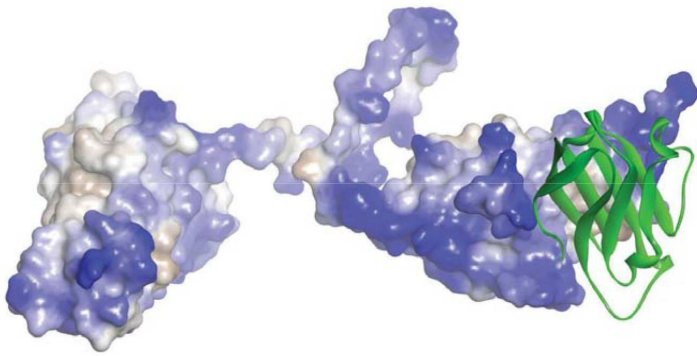
도면2d



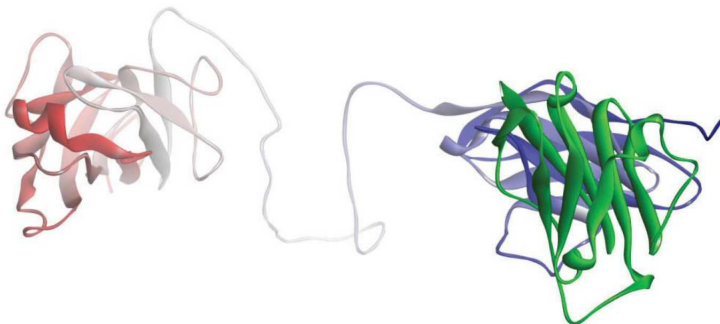
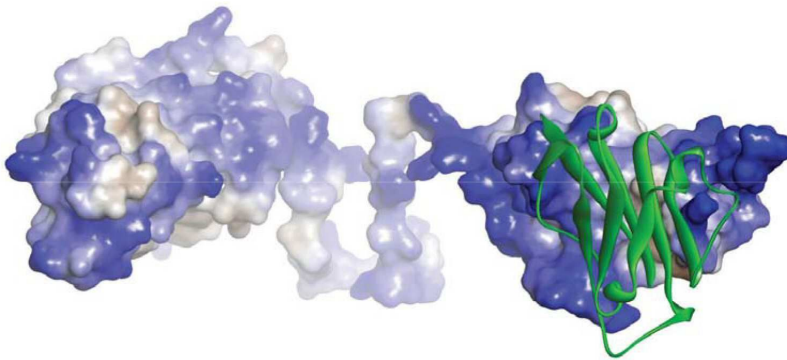
도면3

PGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED
 RSQPGQDCRFVRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYLCGAI SLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE
 VPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGAACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA
 QLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGS
 GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR
 HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

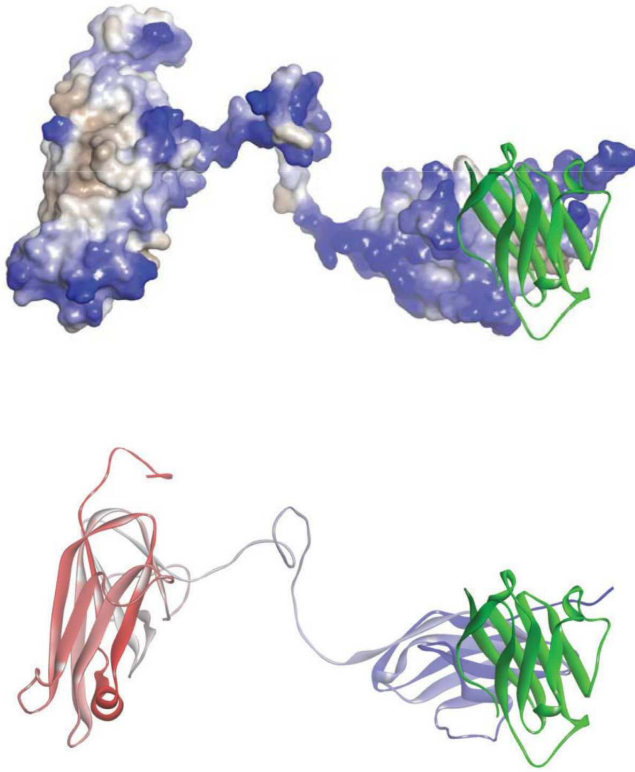
도면4



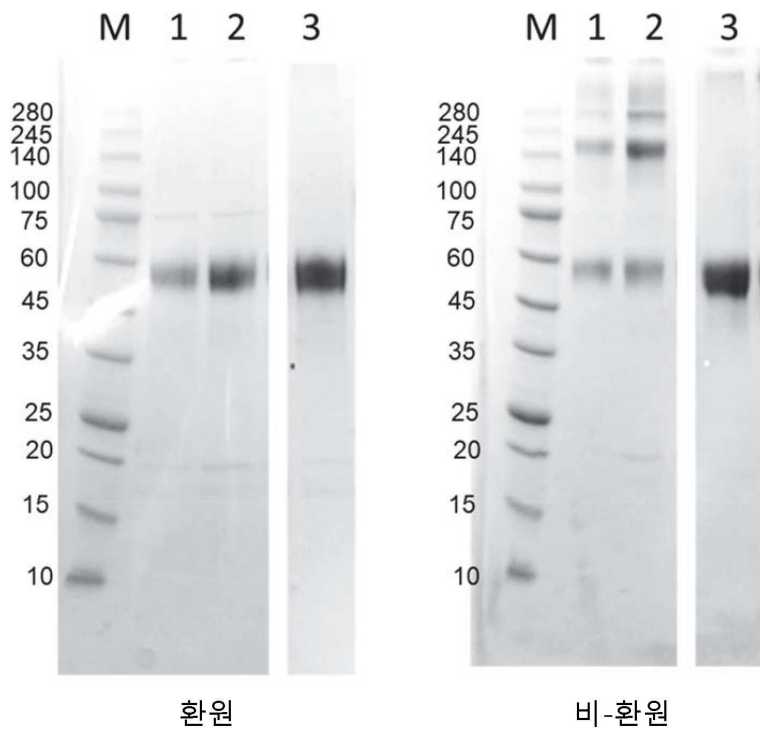
도면5



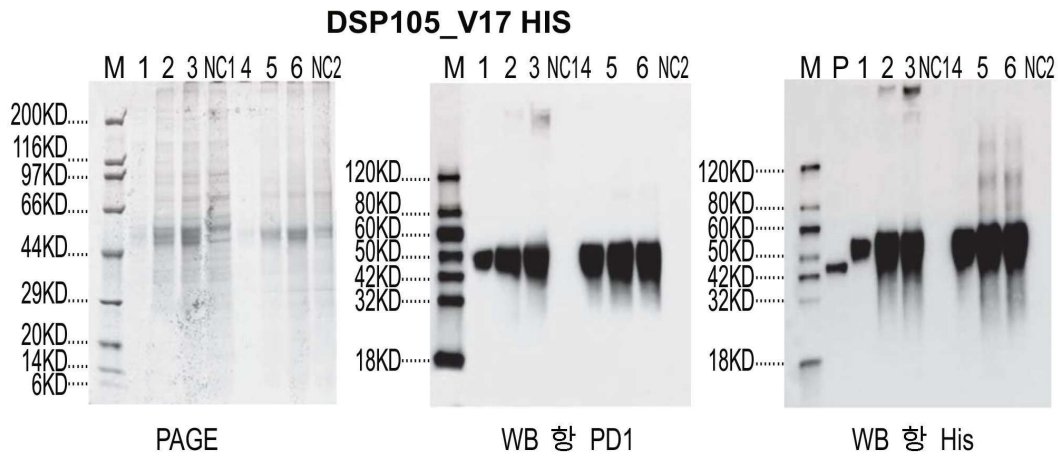
도면6



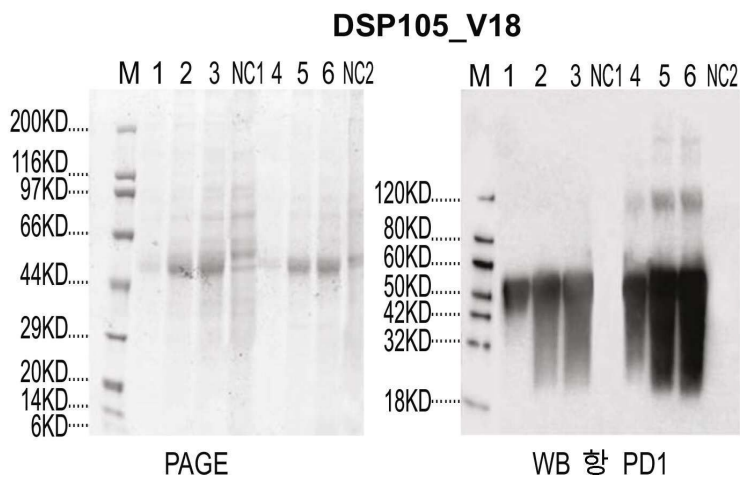
도면7



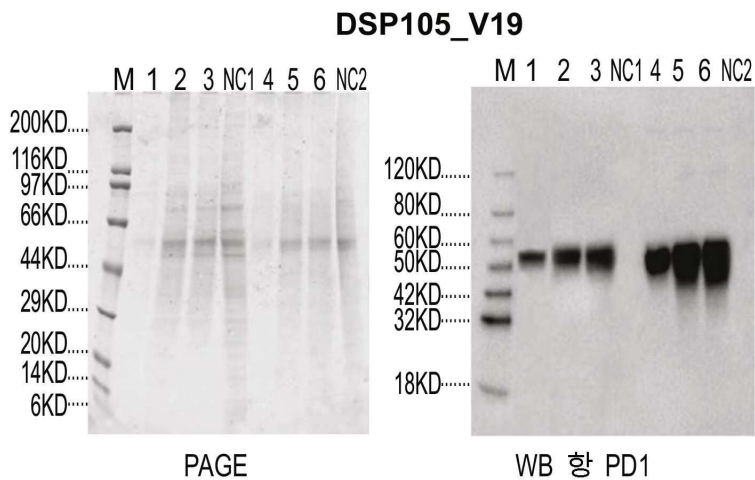
도면8a



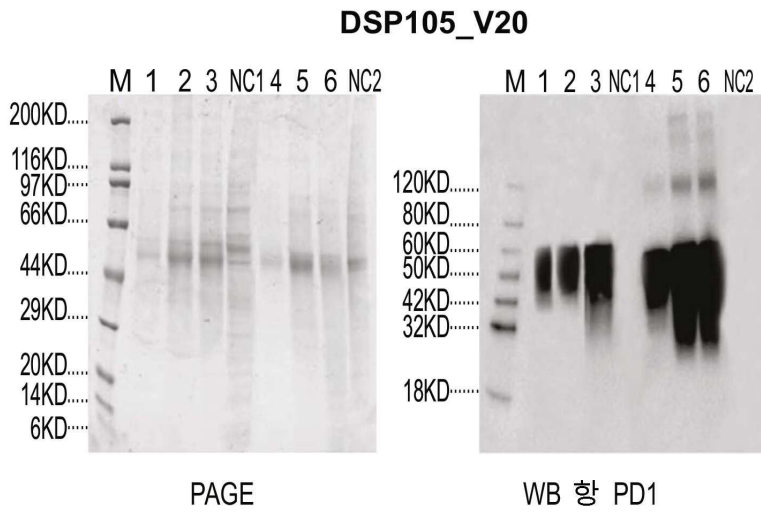
도면8b



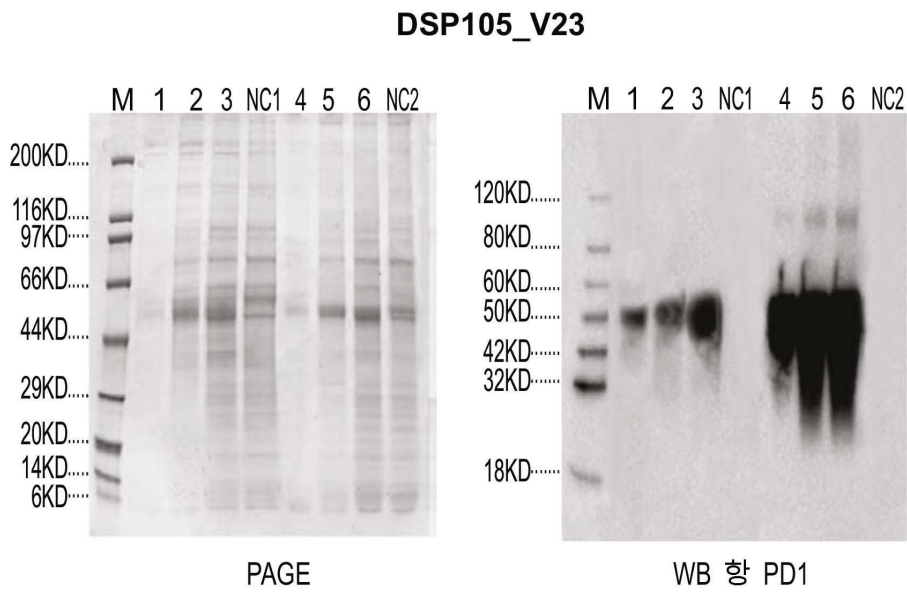
도면8c



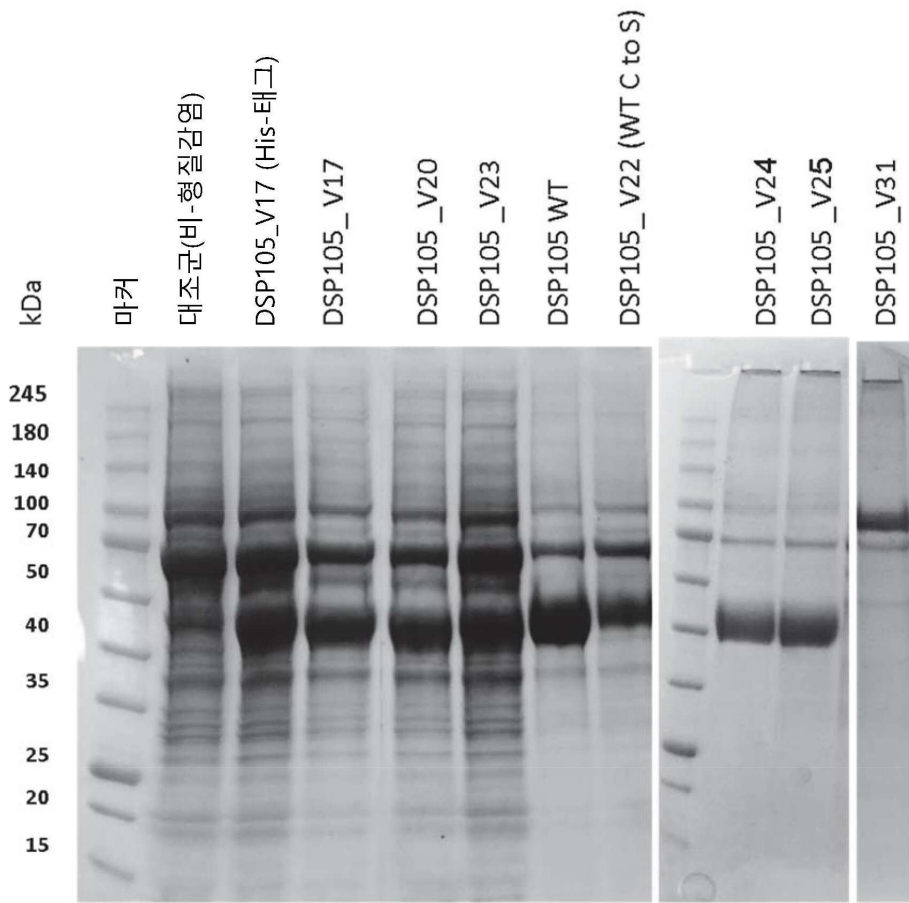
도면8d



도면8e

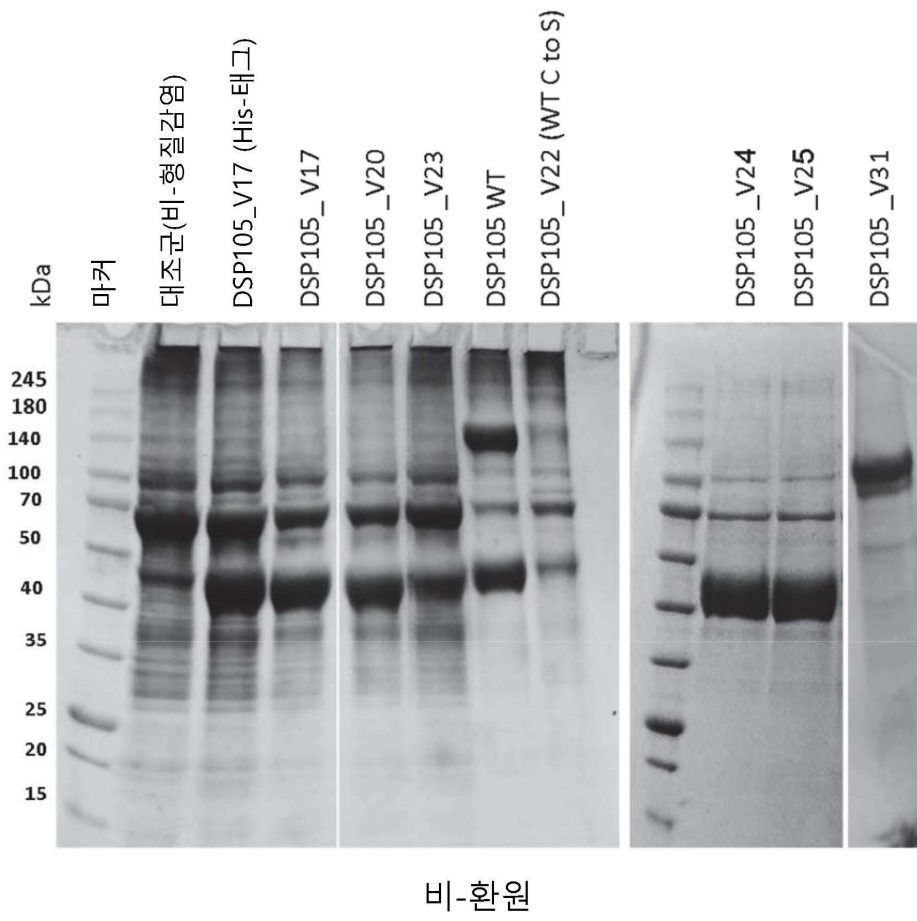


도면9a

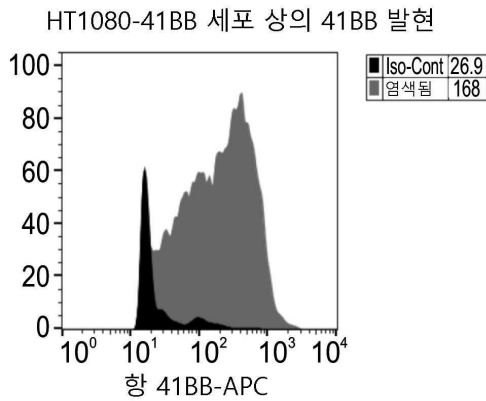
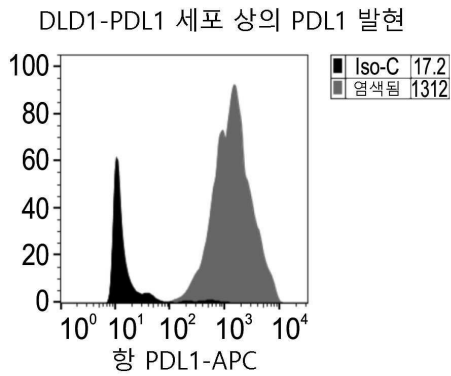


면역

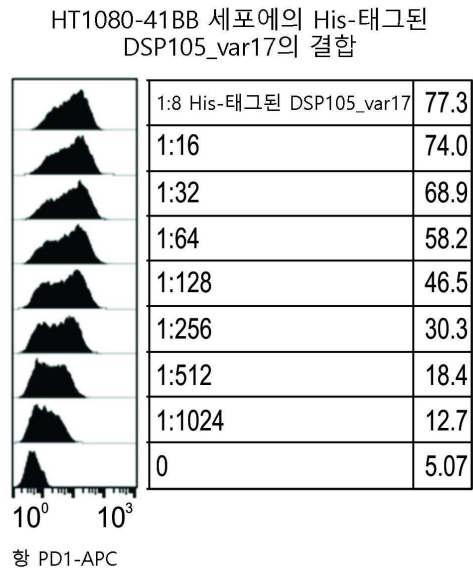
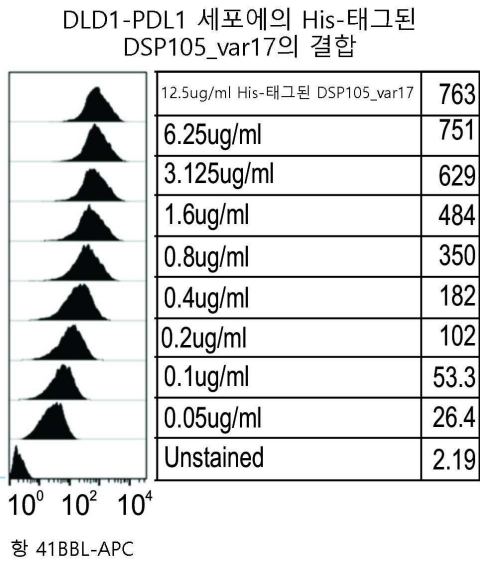
도면9b



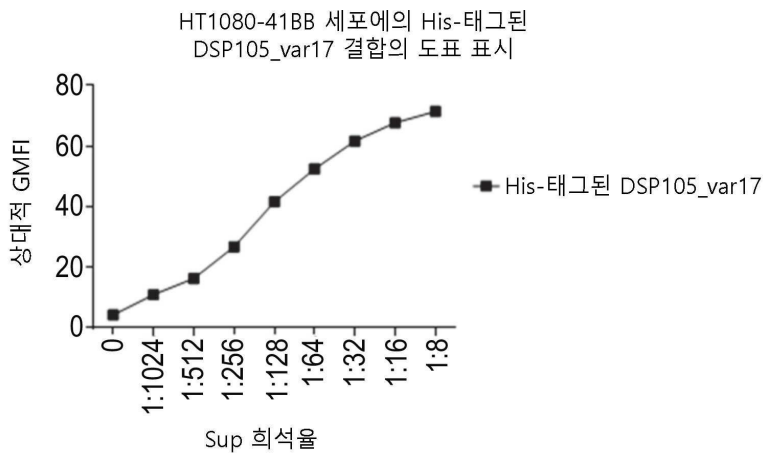
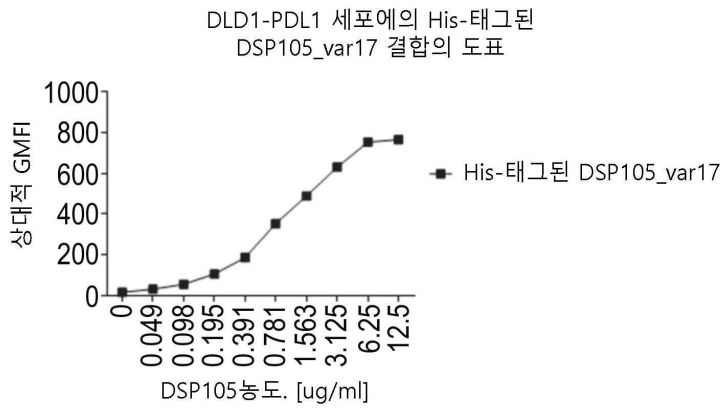
도면10a



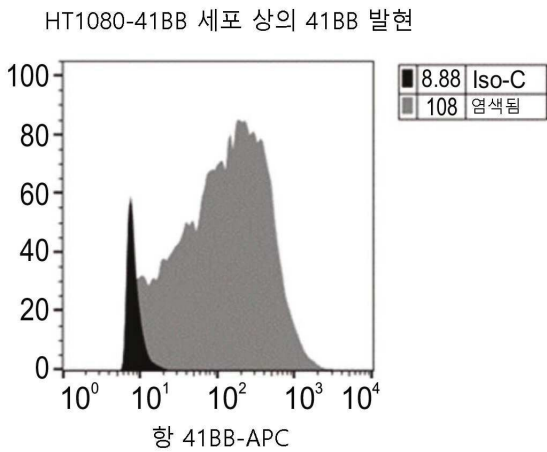
도면10b



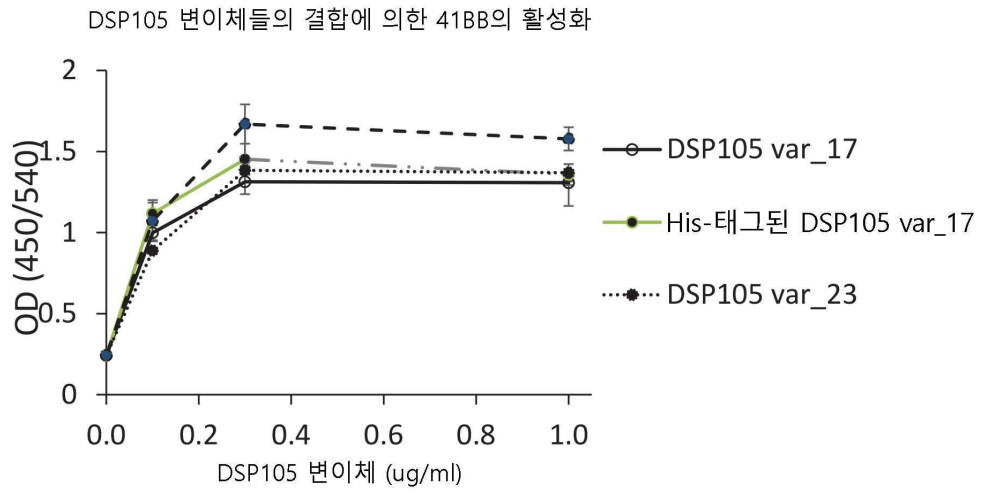
도면10c



도면11



도면12



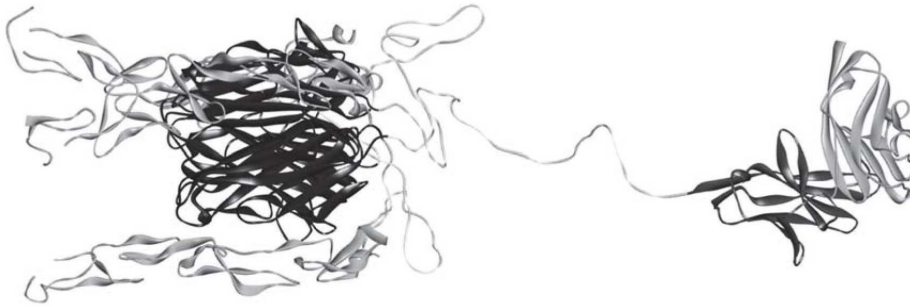
도면13a



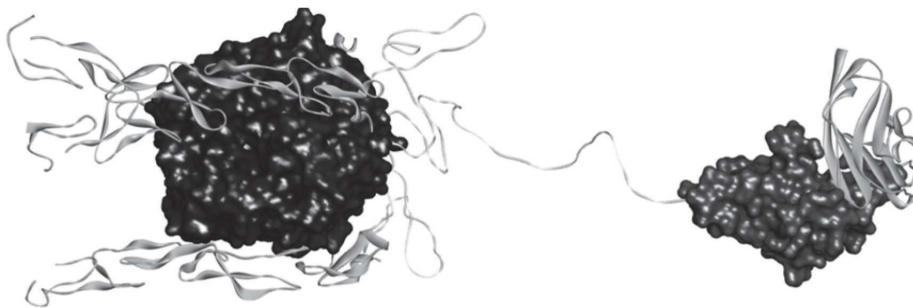
도면13b



도면13c



도면13d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> KAHR Medical Ltd.

PECKER, Iris

BLOCH, Itai

<120> PD1-4-1BBL VARIANT FUSION PROTEIN AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 77792

<150> 62/696,365

<151> 2018-07-11

<150> 62/786,599

<151> 2018-12-31

<160> 169

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 362

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ORIGINAL PD1-41BBL with signal peptide and His Tag

<400> 1

His His His His His His Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg
 1 5 10 15

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 20 25 30

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
 35 40 45

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
 50 55 60

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg
 65 70 75 80

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 85 90 95

Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 100 105 110

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 115 120 125

Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 130 135 140

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

Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro
 165 170 175

Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
 180 185 190

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
 195 200 205

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
 210 215 220

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
 225 230 235 240

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
 245 250 255

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
 260 265 270

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
 290 295 300

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
 305 310 315 320

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
 325 330 335

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
 340 345 350

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 355 360

<210> 2

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ORIGINAL PD1 DOMAIN

<400> 2

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

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

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val

145 150

<210> 3

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ORIGINAL 41BBL DOMAIN

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala

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

180 185 190
 Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 195 200 205

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> SIGNAL PEPTIDE
 <400> 4

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly
 20

<210> 5
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> ORIGINAL PD1-41BBL without His Tag
 <400> 5

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

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60
 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95
 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110
 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140
 Gln Phe Gln Thr Leu Val Gly Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro
 165 170 175
 Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
 180 185 190
 Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
 195 200 205
 Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
 210 215 220
 Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
 225 230 235 240
 Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
 245 250 255
 Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
 260 265 270
 Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
 275 280 285
 Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg

290 295 300
 Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr

305 310 315 320
 Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
 325 330 335

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
 340 345 350

Pro Arg Ser Glu

355

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> C-terminal segment of PD1

<400> 6

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

1 5 10 15
 Phe Gln Thr Leu Val

20

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> N-terminal segment of the 4-1BBL

<400> 7

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

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

20

25

30

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence
 <220><223> segment of five residues at the N-terminal of PD1
 <400> 8
 Pro Gly Trp Phe Leu
 1 5
 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> segment of five residues at the C-terminal of PD1
 <400> 9
 Phe Gln Thr Leu Val
 1 5
 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> N-terminal segment of the 4-1BBL domain
 <400> 10
 Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly

 1 5 10
 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> N-terminal segment of the 4-1BBL domain
 <400> 11
 Ala Cys Pro Trp Ala Val
 1 5
 <210> 12
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> K105_var1 without His Tag

<400> 12

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

Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala
 245 250 255
 Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn
 260 265 270
 Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
 275 280 285
 Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp
 290 295 300
 Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
 305 310 315 320
 Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 325 330
 <210> 13
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> K105_var1 with His Tag

 <400> 13
 His His His His His His Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro
 1 5 10 15
 Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr
 20 25 30
 Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro
 50 55 60

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

Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
 115 120 125

Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala
 130 135 140

Gly Gln Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu
 145 150 155 160

Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe
 165 170 175

Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser
 180 185 190

Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu
 195 200 205

Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val
 210 215 220

Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser
 245 250 255

Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala
 260 265 270

Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu
 275 280 285

His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
 290 295 300

Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly
 305 310 315 320

Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
 325 330 335

Ser Glu

<210> 14

<211> 338

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> K105_var2 without His Tag

<400> 14

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr

 115 120 125

Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Gly Ala Arg Ala

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu

 195 200 205

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

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
 165 170 175
 Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
 180 185 190
 Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
 195 200 205
 Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
 210 215 220
 Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
 225 230 235 240
 Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
 245 250 255
 Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
 260 265 270
 Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
 275 280 285
 His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
 290 295 300
 Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 325

<210> 17

<211> 332

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> K105_var3 with His Tag

<400> 17

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

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

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

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

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

 260 265 270
 Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln

275 280 285
 Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp
 290 295 300
 Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
 305 310 315 320
 Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

325 330
 <210> 18
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 140 aa PD1 segment
 <400> 18
 Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45

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

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130 135 140

<210> 19

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 128 aa PD1 segment

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys

35 40 45

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 20

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 135 aa PD1 segment

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys

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

 Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 85 90 95
 Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 100 105 110
 Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130 135
 <210> 21
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220><223> 133 aa PD1 segment
 <400> 21
 Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60

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

100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125

Ala His Pro Ser Pro

130

<210> 22

<211> 191

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 191 aa 41BBL segment

<400> 22

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

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

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

Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro
 180 185 190

Ser Pro Arg Ser Glu
 195

<210> 24
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 185 aa 41BBL segment
 <400> 24

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

Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu
 20 25 30

Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly
 35 40 45

Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu
 50 55 60

Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu
 65 70 75 80

Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu
 85 90 95

His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu
 100 105 110

Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe
 115 120 125

Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly
 130 135 140

Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr
 145 150 155 160

Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro
 165 170 175

Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

180 185

<210> 25

<211> 199

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 199 aa 41BBL segment

<400> 25

Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile

35 40 45

Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His

145 150 155 160

Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly

165 170 175

Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly

180 185 190

Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

195

<210> 26

<211> 381

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ORIGINAL PD1-41BBL with signal peptide and His Tag

<400> 26

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser His His His His His His Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

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

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

370 375 380
 <210> 27
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> aa sequence of full length PD1
 <400> 27
 Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

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

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

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

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

 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 28

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence of full length PD1

<400

> 28

```

atgcagatcc cacagggccc ctggccagtc gtctgggccc tgctacaact gggctggcgg      60
ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc ccccccacctt ctccccagcc      120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg      180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc      240
gccttccccg aggaccgag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg      300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggcc ggcgcaatga cagcggcacc      360
tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca      420

gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag ccctcacc      480
aggccagccg gccagttcca aacctggtg gttggtgtcg tgggcggcct gctgggcagc      540
ctggtgctgc tagtctgggt cctggccgtc atctgctccc gggccgcacg agggacaata      600
ggagccaggc gcaccggcca gccctgaag gaggaccct cagccgtgcc tgtgttctct      660
gtggactatg gggagctgga tttccagtgg cgagagaaga ccccggagcc ccccgtgcc      720
tgtgtccctg agcagacgga gtatgccacc attgtctttc cttagcgaat gggcacctca      780
tccccgccc gcaggggctc agctgacggc cctcggagtg cccagccact gaggcctgag      840

gatggacact gctcttgccc cctctga      867
    
```

<210> 29

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 2

<400> 29

```

ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc ccccccacctt ctccccagcc      60
    
```

ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 120
 gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 180
 gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 240
 cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 300

tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 360
 gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgccacag cccaccccag ccctcacc 420
 aggccagccg gccagttcca aaccctggtg 450

<210> 30

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 amino acid sequence

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln

165

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 amino acid sequence

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35

40

45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100

105

110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg

115 120

<210> 32

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 18

<400> 32

gactcccctg acagaccttg gaaccctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120
 aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgctgc ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat ccctcacctt ctccaagacc tgccggccag 420

<210> 33

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 19

<400> 33

ctttggaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
 accttcacct gttccttcag caaacctcc gagtccctcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgctggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgcccaccg ctcatcctc acct 384

<210> 34

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 20

<400> 34

ctttggaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
 accttcacct gttccttcag caaacctcc gagtccctcg tgctgaactg gtacagaatg 120
 tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgctggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360

gtgccaccg ctcacccctc accttctcca agacctgccg gccag 405

<210> 35

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 21

<400> 35

gactccctg acagacctg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcaact 399

<210> 36

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> aa sequence of full length 41BBL

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala

180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala

195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His

210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val

225 230 235 240

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

245 250

<210> 37

<211> 765

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence of full length 41BBL

<400> 37

atggaatacg ccctcgacgc ttaactggac cccgaagccc cgtggcctcc cgcgccccgc 60

gctcgcgcct gccgcgtact gccttgggcc ctggtcgcgg ggctgctgct gctgctgctg 120

ctcgtgccc cctgcgccgt ctctctcgcc tccccctggg ccgtgtccgg ggctcgcgcc 180

tgcgccggct ccgcggccag cccgagactc cgcgagggtc ccgagcttcc gcccgacgat 240

cccgccggcc tcttggacct gcggcagggc atgtttgcbc agctggtggc ccaaaatgtt 300
 ctgctgatcg atgggccctt gagctggtac agtgaccacg gcctggcagg cgtgtccctg 360
 acggggggcc tgagctacaa agaggacacg aaggagctgg tggtagccaa ggctggagtc 420
 tactatgtct tctttcaact agagctgcbg cgcgtggtgg ccggcgaggg ctgagctcc 480
 gtttcaactt cgtgacact gcagccactg cgtctgctg ctggggccgc cgcctggct 540

ttgaccgtgg acctgccacc cgcctcctcc gaggtcggga actcggcctt cggtttccag 600
 ggccgcttgc tgcacctgag tggcgccag cgcctgggcb tccatcttca cactgaggcc 660
 agggcacgcc atgcttggca gcttaccacg ggcgccacag tcttgggact cttccgggtg 720
 acccccgaaa tcccagccgg actcccttca ccgaggtcgg aataa 765

<210> 38

<211> 615

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 3

<400> 38

gcctgcccct gggccgtgct cggggctcgc gcctcggccg gctccgcggc cagcccgaga 60
 ctccgcgagg gtcccagact ttcccccac gatcccggcg gcctcttga cctgcggcag 120

ggcatgtttg cgcagctggt ggcccaaaat gttctgctga tcgatgggcc cctgagctgg 180
 tacagtgacc caggcctggc aggcgtgtcc ctgacggggg gcctgagcta caaagaggac 240
 acgaaggagc tggtaggtggc caaggctgga gtctactatg tcttctttca actagagctg 300
 cggcgcgtgg tggccggcga gggctcaggc tccgtttcac ttgcctgca cctgcagcca 360
 ctgcctctg ctgctggggc cggccctctg gctttgaccg tggacctgcc accgcctcc 420
 tccgaggctc ggaactcggc cttcggtttc cagggccgct tgctgacact gactgcccgc 480
 cagcgcctgg gcgtccatct tcaactgag gccagggcac gccatgctg gcagcttacc 540

cagggcgcca cagtcttggg actcttccgg gtgacccccg aaatcccagc cggactccct 600
 tcaccgaggt cggaa 615

<210> 39

<211> 573

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 22

<400> 39

tctgccgctt ctcccagact gagagaagga cctgagctga gccctgatga tctgtctgga 60
 ctgctggatc tgcggcaggg catgtttgct cagttgggtg cccagaacgt gctgctgac 120
 gatggccctc tgtcctggta ctctgatcca ggattggctg gcgtgtccct gactggcggc 180

ctgtcttaca aagaggacac caaagaactg gtggtggcca aggccggcgt gtactacgtg 240
 ttctttcage tgaactgcg gagagtgggtg gctggcgaag gatctggatc tgtgtctctg 300
 gccctgcatc tgcagcctct gagaagtgtc gcaggcgtg ctgcactggc tetgacagtt 360
 gatctgcctc ctgcctcctc cgaggccaga aactccgctt ttggcttcca aggcagactg 420
 ctgcacctgt ccgctggaca gagactggga gtccatctgc acacagaggc cagagctaga 480
 cacgcttggc agttgacaca gggcgttaca gtgctgggcc tgtttagagt gaccctgag 540
 attccagccg gcctgccatc tcttagatct gag 573

<210> 40

<211> 591

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 23

<400> 40

gctagagctt ctctggctc tgccgttct cccagactga gagaaggacc tgagctgagc 60
 cctgatgac ctgctggact gctggatctg cggcagggca tgtttgctca gttgggtggc 120
 cagaactgct tgetgatcga tggcctctg tcttggtact ctgatccagg attggtctggc 180
 gtgtccctga ctggcggcct gtcttacaaa gaggacacca aagaactggt ggtggccaag 240
 gccggcgtgt actacgtgtt ctttcagctg gaactgcgga gagtgggtgc tggcgaagga 300

tctggatctg tgtctctggc cctgcatctg cagcctctga gaagtgtgc aggcgtctgt 360
 gcactggctc tgacagttga tctgctcct gcctcctccg aggccagaaa ctccgcttt 420
 ggcttccaag gcagactgct gcacctgtcc gctggacaga gactgggagt ccatctgcac 480
 acagaggcca gagctagaca cgcttggcag ttgacacagg gcgtacagt getgggcctg 540
 tttagagtga ccctgagat tccagccggc ctgccatctc ctagatctga g 591

<210> 41

<211> 555

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 24

<400> 41

ctgagagaag gacctgagct gagccctgat gatcctgctg gactgctgga tctgcggcag 60
 ggcatgtttg ctcagttggg ggcccagaac gtgctgetga tcatggccc tetgtcctgg 120
 tactctgac caggattggc tggcgtgtcc ctgactggcg gcctgtctta caaagaggac 180
 accaaagaac tgggtggcgc caaggccggc gtgtactacg tgttctttca gctggaactg 240
 cggagagtgg tgctggcga aggatctgga tctgtgtctc tggccctgca tetgcagcct 300
 ctgagaagtg ctgcaggcgc tgctgcaactg gctctgacag ttgatctgcc tctgcctcc 360
 tccgaggcca gaaactccg ctttggcttc caaggcagac tgctgcacct gtccgctgga 420

 cagagactgg gactccatct gcacacagag gccagagcta gacacgctg gcagttgaca 480
 cagggcgcta cagtgtggg cctgtttaga gtgaccctg agattccagc cggcctgcca 540
 tctctagat ctgag 555

<210> 42

<211> 597

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 25

<400> 42

tctggcgcta gagcttctcc tggctctgcc gcttctcca gactgagaga aggacctgag 60
 ctgagccctg atgatctgc tggactgctg gatctgcggc agggcatgtt tgctcagttg 120

 gtggcccaga acgtgctgct gatcgatggc cctctgtcct ggtactctga tccaggattg 180
 gctggcgtgt cctgactgg cggcctgtct taaaaagagg acaccaaaga actggtggtg 240
 gccaaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggctggc 300
 gaaggatctg gatctgtgtc tctggccctg catctgcagc ctctgagaag tgctgcaggc 360
 gctgtgcac tggtctgac agttgatctg cctcctgect cctccgagge cagaaactcc 420
 gcctttggct tccaaggcag actgetgcac ctgtccgctg gacagagact gggagtccat 480
 ctgcacacag aggccagagc tagacacgct tggcagttga cacagggcgc tacagtgctg 540

 ggctgttta gactgacccc tgagattcca gccggcctgc catctctag atctgag 597

<210> 43

<400> 43

000

<210> 44

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> var 4

<400> 44

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

210 215 220
 Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala

225 230 235 240
 Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu

 245 250 255
 Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro

 260 265 270
 Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg

 275 280 285
 Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr

 290 295 300
 Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val

305 310 315 320
 Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser

 325 330 335
 Pro Arg Ser Glu

340

<210> 45

<211> 333

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> var 5

<400> 45

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

1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser

 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser

 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro

50 55 60

305 310 315 320
 Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

 325 330
 <210> 46
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> var 6
 <400> 46
 Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45

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

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

Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr
 180 185 190

Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys
 195 200 205

Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val
 210 215 220

Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro
 225 230 235 240

Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu
 245 250 255

Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly
 260 265 270

Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His
 275 280 285

Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr
 290 295 300

Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro
 305 310 315 320

Ser Pro Arg Ser Glu
 325

<210> 47

<211> 331

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> var 7

<400> 47

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

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

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45

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

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

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

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

 Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln

165 170 175
 Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
 180 185 190

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

195 200 205
 Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
 210 215 220

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
 245 250 255

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser

260 265 270
 Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
 275 280 285

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
 290 295 300

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 305 310 315

<210> 49

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> var 9

<400> 49

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 1 5 10 15

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
 20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
 35 40 45

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg

50	55	60	
Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val			
65	70	75	80
Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile			
	85	90	95
Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu			
	100	105	110
Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro			
	115	120	125
Gly Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu			
	130	135	140
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp			
145	150	155	160
Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu			
	165	170	175
Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val			
	180	185	190
Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val			
	195	200	205
Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg			
	210	215	220
Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His			
225	230	235	240
Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr			
	245	250	255
Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly			
	260	265	270
Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val			
	275	280	285
His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln			
	290	295	300

165 170 175

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu

260 265 270

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

275 280 285

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe

290 295 300

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

305 310 315 320

<210> 51

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> var 11

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys

35 40 45

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg
 50 55 60
 Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 85 90 95
 Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 100 105 110
 Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125
 Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu
 130 135 140
 Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
 165 170 175
 Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
 180 185 190
 Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
 195 200 205
 Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
 210 215 220
 Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
 225 230 235 240
 Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
 245 250 255
 Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
 260 265 270
 Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
 275 280 285
 His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala

290 295 300
 Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 325
 <210> 52
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> var 12
 <400> 52
 Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 1 5 10 15
 Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
 20 25 30
 Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
 35 40 45
 Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg
 50 55 60
 Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 85 90 95
 Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 100 105 110
 Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125
 Gly Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
 130 135 140
 Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala

50 55 60
 Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 65 70 75 80

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

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

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

 Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
 275 280 285
 Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
 290 295 300

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
 305 310 315 320

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 325 330 335

<210> 54

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> var 14

<400> 54

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 1 5 10 15

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
 20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
 35 40 45

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg

50 55 60

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 65 70 75 80

Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 85 90 95

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 100 105 110

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

115 120 125

Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg
 130 135 140

Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu
 145 150 155 160

Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile
 165 170 175

Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His

275 280 285

Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly

290 295 300

Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly

305 310 315 320

Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

325

<210> 55

<211> 333

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> var 15

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys

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

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

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

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

Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala

290 295 300

Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr

305 310 315 320

Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

325 330

<210> 56

<211> 321

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> var 16

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys

35 40 45

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

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

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

 Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
 275 280 285
 Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
 290 295 300
 Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
 305 310 315 320
 Glu

<210> 57

<211> 1020

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 44, var 4

<400> 57

gatagcccg atgcccgtg gaaccgccc acctttagcc cggcgtgct ggtggtgacc 60
 gaaggcgata acgcgacctt tacctgcagc tttagcaaca ccagcгааag ctttgtgctg 120
 aactggtatc gcatgagccc gagcaaccag accgataaac tggcggcgtt tccgгаат 180

cgcagccagc cgggccagga ttgccgcttt cgcgtgacct agctgccgaa cggcccgcat 240
 tttcatatga gcgtggtgcg cgcgcgccgc aacgatagcg gcacctatct gtgcggcgcg 300
 attagcctgg cggcgaagc gcagattaaa gaaagcctgc gcgcggaact gcgcgtgacc 360
 gaacgccgcg cggaagtgcc gaccgcgcat ccgagcccga gcccgcgccc ggcgggccag 420

ggcagcggcg cgcgcgcgag cccgggcagc gcggcgagcc cgcgcctgcg cgaaggcccg 480
 gaactgagcc cggatgatcc ggcgggctg ctggatctgc gccagggcat gtttgcgag 540
 ctggtggcgc agaactgct gctgattgat ggcccctga gctggtatag cgatccgggc 600
 ctggcgggcg tgagcctgac ggcgggctg agctataaag aagatacaa agaactggtg 660
 gtggcgaag cggcgtgta ttatgtgitt tttcagctgg aactgcgccc cgtggtggcg 720
 ggcaaggca gcggcagcgt gaccctggcg ctgcatctgc agccgctgcg cagcgcggcg 780
 ggcgcgccgg cgtggcgct gaccgtggat ctgccgccgg cgagcagcga agcgcgcaac 840

agcgcgtttg gctttcaggg ccgctgctg catctgagcg cgggccagcg cctgggcctg 900
 catctgcata ccgaagcgcg cgcgcgcat gcgtggcagc tgaccaggg cgcgaccctg 960
 ctgggctgt ttcgctgac cccgaaatt ccggcgggccc tgccgagccc gcgcagcga 1020

<210> 58
 <211> 999
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> NA seq of SEQ ID NO: 45, var 5
 <400> 58

gactctccag acagacctg gaacctcca accttcttc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtctg 120
 aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240
 ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcacctg gatctggcgc tagagcatct 420
 cctggctctg ctgcctctcc tagactgaga gagggacctg agctgtctcc tgatgatcct 480
 gctggcctgc tggatctgag acagggcatg tttgctcagc tggcggcca gaactgctg 540
 ctgattgatg gccctctgct ctggctactct gatcctggat tggctggcgt gtcctgact 600

ggcggcctgt cttacaaaga ggacacaaa gaactggtgg tggccaagc cggcgtgtac 660

tacgtgttct ttcagctgga actgctggaga gtggtggccg gcgaaggatc tggatctgtg 720
 tctctggcac tgcattcgca gcccttgaga tctgctgcag gcgctgctgc tctggctctg 780
 acagttgatc tgcctctgc ctctccgag gccagaaact ccgcttttg cttccaaggc 840
 agactgctgc atctgtctgc cggccagaga ctgggagtcc atctgcatc agaggctaga 900
 gccaggcacg cctggcagtt gacacaaggt gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc 960
 ccagagattc cagccggcct gccttctcca agatccgag 999

<210> 59

<211> 975

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 46, var 6

<400> 59

gactctccag acagacctg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120
 aactgttaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240
 ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcacctg gatctgctgc ttcccctaga 420
 ctgagagagg gccctgagct gtcccctgat gatcctgctg gattgctgga cctgcggcag 480
 ggcatgtttg ctcagttggt ggcccagaac gtgctgctga tcgatggccc tctgtctctg 540
 tactctgac caggattggc tggcgtgtcc ctgactggcg gcctgtctta caaaggaggc 600
 accaaagaac tggtggtcgc caaggccggc gtgtactacg tgttctttca gctggaactg 660
 cggagagtgg tgctggcga aggatctgga tctgtgtctc tggccctgca tctgcagcct 720
 ctgagaagtg ctgcaggcgc tgctgcaactg gctctgacag ttgatctgcc tectgcctcc 780

tccgaggcca gaaactccgc ctttggcttc caaggcagac tgctgcatct gtctgccgga 840
 cagagactgg gagtgcacct ccatacagag gccagagcta gacacgcttg gcagttgaca 900
 cagggcgcta cagtgtctggg cctgtttaga gtgaccctg agatcccagc tggcctgcca 960
 tctcctagat ctgag 975

<210> 60

<211> 992

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 47, var 7

<400> 60

```

actctccaga cagaccttgg aaccttccaa cttctctcc cgctctgctg gtggttaccg      60
agggcgacaa tgccaccttc acctgttctc tcagcaacac ctccgagtcc ttcgtgctga      120

actggtacag aatgtccctt agcaaccaga cgcacaagct ggccgccttt cctgaggaca      180
gatctcagcc aggccaggac tgccggttca gagttacca gctgcctaac ggccgggact      240
tccacatgtc tgttgtgctg gccagacgga acgactctgg cacatatctg tgcggcgcca      300
tctctctggc tccaaggctc cagatcaaag agtctctgcg ggccgagctg agagtacag      360
aaagacgagc tgaggtgccc accgctcatc cctcacctgg agccagagct tctcctggat      420
ctgctgcttc ccctagactg agagagggcc ctgagctgtc ccctgatgat cctgctggat      480
tgctggacct gcggcagggc atgtttgctc agttggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg      540

atggccctct gtcttgttac tctgatccag gattggctgg cgtgtccctg actggcggcc      600
tgtcttacia agaggacacc aaagaactgg tggtcgcaaa ggccggcgtg tactactgtg      660
tctttcagct ggaactgcgg agagtggctg ctggcgaagg atctggatct gtgtctctgg      720
ccctgcactc gcagcctctg agaagtgtct caggcgtctc tgcactggct ctgacagttg      780
atctgcctcc tgctctctcc gaggccagaa actccgcctt tggtctccaa ggcagactgc      840
tgcactgtgc tgccggacag agactgggag tgcacctcca tacagaggcc agagctagac      900
acgcttggca gttgacacag ggcgctacag tgctgggcct gtttagagtg acccctgaga      960

tcccagctgg cctgccatct cctagatctg ag                                     992

```

<210> 61

<211> 956

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 48, var 8

<400> 61

```

actctccaga cagaccttgg aaccttccaa cttctctcc cgctctgctg gtggttaccg      60
agggcgacaa tgccaccttc acctgttctc tcagcaacac ctccgagtcc ttcgtgctga      120
actggtacag aatgtccctt agcaaccaga cgcacaagct ggccgccttt cctgaggaca      180
gatctcagcc aggccaggac tgccggttca gagttacca gctgcctaac ggccgggact      240
tccacatgtc tgttgtgctg gccagacgga acgactctgg cacatatctg tgcggcgcca      300

```

tctctctggc tccaaggct cagatcaaag agtctctgcg ggccgagctg agagtgacag 360
 aaagacgagc tgaggtgccc accgctcatc cctcacctgg actgagagag ggcctgagc 420
 tgtcccctga tgatcctgct ggattgctgg acctgcggca gggcatgttt gctcagttgg 480
 tggcccagaa cgigtctgtg atcgatggcc ctctgtcctg gtactctgat ccaggattgg 540
 ctggcgtgtc cctgactggc ggcctgtctt acaaagagga caccaaagaa ctggtggtcg 600
 ccaagccggc cgtgtaactac gtgttctttc agctggaact gcgagagtg gtggctggcg 660
 aaggatctgg atctgtgtct ctggccctgc atctgcagcc tctgagaagt gctgcaggcg 720

ctgctgcact ggctctgaca gttgatctgc ctctgcctc ctccgaggcc agaaactccg 780
 cctttggctt ccaaggcaga ctgctgcatc tgtctgccgg acagagactg ggagtgcacc 840
 tccatacaga ggccagagct agacacgctt ggcaattgac acagggcgct acagtctgg 900
 gcctgtttag agtgaccctt gagatcccag ctggcctgcc atctcctaga tctgag 956

<210> 62

<211> 984

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 49, var 9

<400> 62

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
 accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtcttcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggtctcc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgccaccg ctcatcctc acctggatct ggcgctagag catctcctgg ctctgctgcc 420
 tctcctagac tgagagaggg acctgagctg tctcctgatg atctgctgg cctgctggat 480
 ctgagacagg gcatgtttgc tcagctggig gcccaaacg tgctgctgat tgatggcctt 540

ctgtcctggt actctgatcc tggattggct ggcgtgtccc tgactggcgg cctgtcttac 600
 aaagaggaca ccaaagaact ggtggtggcc aaggccggcg tgtactacgt gttctttcag 660
 ctggaactgc ggagagtggg ggccggcgaa ggatctggat ctgtgtctct ggcactgcat 720
 ctgcagcccc tgagatctgc tgcaggcct gctgctctgg ctctgacagt tgatctgctt 780
 cctgcctcct ccgaggccag aaactccgcc ttggcttcc aaggcagact gctgcatctg 840
 tctgccggcc agagactggg agtccatctg catacagagg ctgagccag gcacgcctgg 900

cagttgacac aaggtgctac agtgctgggc ctgttcagag tgaccccaga gattccagcc 960

ggcctgcctt ctccaagatc cgag 984

<210> 63

<211> 960

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 50, var 10

<400> 63

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60

accttcacct gttccttcag caacacctcc gaggccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctg aggacagatc tcagccaggc 180

caggactgcc gggtcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240

gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300

aaggctcaga tcaaagatc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360

gtgccaccg ctcatcctc acctggatct gctgcttccc ctagactgag agagggcctt 420

gagctgtccc ctgatgatcc tgctggattg ctggacctgc ggcagggcat gtttctcag 480

ttggtggccc agaactgct gctgatcgt ggcctctgt cctggtactc tgatecagga 540

ttggctggcg tgccttgac tggcggcctg tcttacaag aggacaccaa agaactggtg 600

gtcgccaagg ccggcgtgta ctactgttc tttcagctgg aactcggag agtggtggct 660

ggcgaaggat ctggatctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagtgtgca 720

ggcgtgctg cactggctct gacagttgat ctgctcctg cctcctcga ggccagaaac 780

tccgctttg gcttccaagg cagactgctg catctgtctg ccggacagag actgggagtg 840

cacctcata cagaggccag agctagacac gcttggcagt tgacacaggg cgctacagtg 900

ctgggcctgt ttagagtgac cctgagatc ccagctggcc tgccatctcc tagatctgag 960

<210> 64

<211> 978

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 51, var 11

<400> 64

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60

accttcacct gttccttcag caacacctcc gaggccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagetggcc gccttttctg aggacagatc tcagccaggc 180

caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240

gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300

aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360

gtgccaccg ctcatcctc acctggagcc agagcttctc ctggatctgc tgcttcccct 420

agactgagag agggccctga gctgtcccct gatgatcctg ctggattgct ggacctgcgg 480

cagggcatgt ttgctcagtt ggtggcccag aacgtgctgc tgatcgatgg cctctgtcc 540

tggtactctg atccaggatt ggctggcgtg tcctgactg gcggcctgic ttacaaagag 600

gacaccaaag aactggtggt cgccaaggcc ggctgtact acgtgttctt tcagctggaa 660

ctgcggagag tgggtgctgg cgaaggatct ggatctgtgt ctctggccct gcactctcag 720

cctctgagaa gtgtctcagg cgctgctgca ctggctctga cagttgatct gcctcctgcc 780

tcctccgagg ccagaaactc cgctttggc ttccaaggca gactgctgca tctgtctgcc 840

ggacagagac tgggagtga cctccataca gaggccagag ctagacacgc ttggcagttg 900

acacagggcg ctacagtct gggcctgttt agagtgacc ctgagatccc agctggcctg 960

ccatctccta gatctgag 978

<210> 65

<211> 942

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 52, var 12

<400> 65

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60

accttcacct gttccttcag caacacctcc gaggccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagetggcc gccttttctg aggacagatc tcagccaggc 180

caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240

gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300

aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360

gtgccaccg ctcatcctc acctggactg agagagggcc ctgagctgic cctgatgat 420

cctgtggat tgetggacct gcggcagggc atgtttgctc agttggtggc ccagaacctg 480

ctgctgatcg atggccctct gtccctgtac tctgatccag gattggctgg cgtgtccctg 540

actggcggcc tgcittacaa agaggacacc aaagaactgg tggtcgcaa ggccggcgtg 600
 tactactgt tctttcagct ggaactgcgg agagtgggctg ctggcgaagg atctggatct 660
 gtgtctctgg ccttgcactt gcagcctctg agaagtgtctg caggcgtctg tgcactggct 720

ctgacagtgg atctgcctcc tgcctcctcc gaggccagaa actccgcctt tggcttccaa 780
 ggcagactgc tgcactgttc tggcggacag agactgggag tgcacctcca tacagaggcc 840
 agagctagac acgcttggca gttgacacag ggcgctacag tgctgggctt gtttagagtg 900
 acccctgaga tcccagctgg cctgccatct cctagatctg ag 942

<210> 66

<211> 1005

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 53, var 13

<400> 66

ccttggaaac ctccaacctt ctctcccgtt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
 accttcacct gttccttcag caaacctcc gagtccctcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaaccggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg ggcctatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagatc tctgcccggc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 tgccccaccg ctcatcctc accttctcca agacctgctg gccagggatc tggcgttaga 420
 gcatctcctg gctctgtctc ctctcctaga ctgagagagg gacctgagct gtctcctgat 480
 gatcctgctg gcctgctgga tctgagacag ggcatgtttg ctgagctggt ggcccagaac 540

gtgctgctga ttgatggccc tctgtcctgg tactctgata ctggattggc tggcgtgtcc 600
 ctgactggcg gcctgtctta caaagaggac accaaagaac tgggtgggag caagccggc 660
 gtgtactacg tgttctttca gctggaactg cggagagtgg tggccggcga aggatctgga 720
 tctgtgtctc tggcactgca tctgcagccc ctgagatctg ctgcaggcgc tgctgctctg 780
 gctctgacag ttgatctgcc tctgcctcc tccgaggcca gaaactccgc ctttggcttc 840
 caaggcagac tgctgcactt gtctgccggc cagagactgg gagtccatct gcatacagag 900
 gctagagcca ggcacgcctg gcagttgaca caaggtgcta cagtgtctggg cctgttcaga 960

gtgaccccag agattccagc cggcctgcct tctccaagat ccgag 1005

<210> 67

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 54, var 14

<400> 67

```

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc      60
accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg      120
tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctcg aggacagatc tcagccaggc      180
caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt      240
gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg ggcctatctc tctggctccc      300

aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag      360
gtgcccaccg ctcatccctc accttctcca agacctgctg gccagggatc tgctgcttcc      420
cctagactga gagagggccc tgagctgtcc cctgatgatc ctgctggatt gctggacctg      480
cggcagggca tgtttgctca gttggtggcc cagaacctgc tgctgatcga tggccctctg      540
tcttggtact ctgatccagg attggtctgc gtgtccctga ctggcggcct gtcttacaaa      600
gaggacacca aagaactggt ggtcgccaag gccggcgtgt actacgtgtt ctttcagctg      660
gaactcgga gagtgggtggc tggcgaagga tctggatctg tgtctctggc cctgcatctg      720

cagcctctga gaagtgctgc aggcgctgct gactggctc tgacagtga tctgcctcct      780
gcctcctccg aggccagaaa ctccgccttt ggcttccaag gcagactgct gcattctgtct      840
gccggacaga gactgggagt gcacctccat acagaggcca gagctagaca cgcttggcag      900
ttgacacagg gcgctacagt gctgggcctg tttagagtga cccctgagat cccagctggc      960
ctgccatctc ctgatctga g

```

<210> 68

<211> 999

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 55, var 15

<400> 68

```

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc      60

accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg      120
tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctcg aggacagatc tcagccaggc      180
caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt      240

```

gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgccaccg ctcatccctc accttctcca agacctgctg gccagggagc cagagcttct 420
 cctggatctg ctgcttcccc tagactgaga gagggccctg agctgtcccc tgatgatcct 480

gctggattgc tggacctgcg gcagggcatg tttgctcagt tggaggcca gaactgtctg 540
 ctgatcgatg gccctctgtc ctggtactct gatccaggat tggetggcgt gtcctgact 600
 ggcgccctgt cttacaaaga ggacacaaa gaactggtgg tcgccaaggc cggcgtgtac 660
 tacgtgttct ttcagctgga actgcggaga gtggtggctg gcgaaggatc tggatctgtg 720
 tctctggccc tgcactgca gcctctgaga agtgtctcag gcgctgtctc actggctctg 780
 acagttgatc tgccctctgc ctctccgag gccagaaact ccgcctttgg cttccaaggc 840
 agactgtctg atctgtctgc cggacagaga ctgggagtgc acctccatac agaggccaga 900

gctagacacg ctggcagtt gacacagggc gctacagtgc tgggcctgtt tagagtgacc 960
 cctgagatcc cagctggcct gccatctcct agatctgag 999

<210> 69

<211> 963

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 56, var 16

<400> 69

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
 accttacct gttcctttag caacacctcc gactccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
 tcccctagca accagaccga caagetggcc gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactgcc gggtcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240

gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgccaccg ctcatccctc accttctcca agacctgctg gccagggact gagagagggc 420
 cctgagctgt cccctgatga tctgtctgga ttgctggacc tgcggcaggg catgtttgct 480
 cagttggtgg cccagaactg gctgtctgac gatggcctc tgtcctggta ctctgatcca 540
 ggattggctg gcgtgtccct gactggcggc ctgtcttaca aagaggacac caaagaactg 600
 gtggtcgcca aggccggcgt gtactactgt ttctttcagc tggaaactgcg gagagtgtg 660

gctggcgaag gatctggatc tgtgtctctg gccctgcatc tgcagcctct gagaagtgct 720

gcaggcgctg ctgcactggc tctgacagtt gatctgctc ctgcctcctc cgaggccaga 780
 aactccgctt ttggcttcca aggcagactg ctgcatctgt ctgccggaca gagactggga 840
 gtgcacctcc atacagaggc cagagctaga cacgcttggc agttgacaca gggcgttaca 900
 gtgctgggcc tgittagagt gaccctgag atcccagctg gcctgccatc tctagatct 960
 gag 963

<210> 70

<211> 996

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 12

<400> 70

gactctccag acagacctt gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120
 aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240
 ttccacatgt ctgttgctgc ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctcccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat ccctcacctt ctccaagacc tgctggccag 420

ggatctgccg cttctcttag actgagagag ggccttgagc tgtctctga tgatctgct 480
 ggactgctgg acctgagaca gggcatgttt gccagctgg tggcccagaa tgtgctgctg 540
 attgacggcc ctctgtcctg gtactctgat ccaggattgg ctggcgtgtc cctgactggc 600
 ggctgtctt acaaagagga caccaaagaa ctggtggtcg ccaaggccgg cgtgtactac 660
 gtgttctttc agctggaact gcggagagtg gtggctggcg aaggatctgg atctgtgtct 720
 ctggccctgc atctgcagcc tctgagaagt gctgcaggcg ctgctgact ggctctgaca 780
 gttgatctgc ctctgcctc ctccgaggcc agaaactccg cctttggctt ccaagcaga 840

ctgctgcatc tgctgccgg acagagactg ggagtgcacc tccatacaga ggccagagct 900
 agacacgctt ggcagttgac acagggcgt acagtgtgg gcctgtttag agtgaccct 960
 gagattccag ccggcctgcc atctccaaga tctgag 996

<210> 71

<211> 1014

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 14

<400> 71

```

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc      60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg      120
aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac      180

agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttacce agctgcctaa cggccgggac      240
ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc      300
atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca      360
gaaagacgag ctgagggtcc caccgtcat ccctcacctt ctccaagacc tgctggacag      420
ggcgccagag ctctcctgg atctgctgct tcccttagac tgagagaggg cctgagctg      480
tcccctgatg atctgctgg attgctggac ctgcggcagg gcatgtttgc tcagtgggtg      540
gcccagaacg tgctgctgat cgatggcctt ctgtcctggt actctgatcc aggattggct      600

ggcgtgtccc tgactggcgg cctgtcttac aaagaggaca ccaaagaact ggtggtcgcc      660
aaggccggcg tgtactacgt gttctttcag ctggaactgc ggagagtggg ggctggcgaa      720
ggatctggat ctgtgtctct ggccctgcat ctgcagctc tgagaagtgc tgcaggcgct      780
gctgcaactg ctctgacagt tgatctgect cctgcctcct ccgaggccag aaactccgcc      840
tttgcttcc aaggcagact gctgcatctg tctgccggac agagactggg agtgcacctc      900
catacagagg ccagagctag acacgcttgg cagttgacac agggcgctac agtgctgggc      960
ctgtttagag tgaccctga gatccagct ggctgceat ctctagatc tgag      1014

```

<210> 72

<211> 978

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> NA seq of SEQ ID NO: 16

<400> 72

```

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc      60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg      120
aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac      180
agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttacce agctgcctaa cggccgggac      240
ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc      300
atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca      360

```

gaaagacgag ctgaggatgcc caccgctcat ccctcacctt ctccaagacc tgctggccag 420
 ggactgagag agggacctga actgtctcct gatgatcctg ccggcctgct ggatctgaga 480
 cagggcatgt ttgccagct ggtggcccag aatgtgctgc tgattgacgg ccctctgtcc 540
 tggactctg atccaggatt ggctggcgtg tcctgactg gcggcctgtc ttacaaagag 600
 gacaccaaag aactgggtgt cgccaaggcc ggcgtgtact acgtgttctt tcagctgaa 660
 ctgcgagag tggtagctgg cgaaggatct ggatctgtgt ctctggccct gcactgcag 720
 cctctgagaa gtgctgcagg cgctgctgca ctggctctga cagttgatct gcctcctgcc 780

tcctccgagg ccagaaactc cgctttggc ttccaaggca gactgctgca tctgtctgcc 840
 ggacagagac tgggagtca cctccataca gaggccagag ctagacacgc ttggcagttg 900
 acacagggcg ctacagtct gggcctgttt agagtgacc ctgagatccc tgctggactg 960
 ccctctcaa gatctgag 978

<210> 73

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 73 PD1 ECD Full with CYS73>SER SUBSTITUTION

<400> 73

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

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

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

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

115 120 125
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
 145 150

<210> 74
 <211> 450
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> na sequence encoding SEQ ID NO:73
 <400> 74

cccggctggt ttctggactc tccagacaga ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgt 60
 ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120
 gagtccttcg tgcgaaactg gtacagaatg tccctagca accagaccga caagctggcc 180
 gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactctc ggttcagagt taccagctg 240
 cctaaccggc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300

tatctgtgcg ggcacatctc tctggctccc aaggctcaga tcaaagagtc tctgegggcc 360
 gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgccaccg ctcacccctc accttctcca 420
 agacctgctg gccagtttca gacactcgtg 450

<210> 75
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> PD1 -5-5 from var17 (DSP105 var 1 with CYS73>SER SUBSTITUTION)
 <400> 75

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

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

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45

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

50 55 60
 Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80

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

<210> 76

<211

> 420

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 75 420 bp

<400> 76

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gaggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120
 aactggtaca gaatgtccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcttgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagtgacct agctgcctaa cggcagagac 240
 ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcgcgccc 300
 atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacctt ctccaagacc tgctggccag 420

<210> 77

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-5 with His Tag with CYS73>SER SUBSTITUTION

<400> 77

His His His His His His Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr
 20 25 30
 Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro
 50 55 60
 Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln
 65 70 75 80
 Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg
 85 90 95
 Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys

100 105 110
 Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
 115 120 125
 Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala
 130 135 140

Gly Gln
 145

<210> 78

<211> 438

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO:77 438 bp

<400> 78

caccaccacc atcaccacga ctctccagac agaccttggg accctccaac ctctctccc 60

gctctgctgg tggttaccga gggcgacaat gccaccttca cctgttcctt cagcaacacc 120

tccgagtctt tctgtctgaa ctggtacaga atgtccccta gcaaccagac cgacaagctg 180

gccgccttcc ctgaggacag atctcagcca ggccaggact ctcggttcag agtgaccagc 240

ctgcctaacg gcagagactt ccacatgtcc gtcgtgcggg ccagaagaaa cgactctggc 300

acctatctgt gcggcgccat ctctctggct cccaaggctc agatcaaaga gtctctgcgg 360

gccgagctga gactgacaga aagacgagct gaggtgccca ccgctcatcc ctcaccttct 420

ccaagacctg ctggccag

438

<210> 79

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -10-5 (with CYS73>SER SUBSTITUTION)

<400> 79

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln

 130 135

<210> 80

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO:79 405 bp

<400> 80

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctgtgg ttaccgagg cgacaatgcc

60

accttcacct gttccttcag caacacctcc gaggccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
 tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc 180

 caggactctc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgcccaccg ctcatecctc accttctcca agacctgctg gccag 405

<210> 81

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -10-12 (with CYS73>SER SUBSTITUTION)

<400> 81

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 1 5 10 15

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
 20 25 30

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
 35 40 45

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg
 50 55 60

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 65 70 75 80

Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 85 90 95

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 100 105 110

Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125

<210> 82

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO:81 384 bp

<400> 82

```

ccttggaaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc      60
accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg      120
tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttcttg aggacagatc tcagccaggc      180
caggactctc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt      240
gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc      300
aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag      360
gtgccaccg ctcatcctc acct                                          384
    
```

<210> 83

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-12 (New, from V20) (with CYS73>SER SUBSTITUTION)

<400> 83

```

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

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

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
           115          120          125
    
```

Ala His Pro Ser Pro

130

<210> 84

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO:83 399 bp

<400> 84

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgetctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagttaccc agctgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgctcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcgcgccc 300

atctctctgg ctcccaagc tcatgatcaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat ccctcacct 399

<210> 85

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-12

<400> 85

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

1 5 10 15

Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe

20 25 30

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
 Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg
 100 105 110

Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125

<210> 86

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 85 381 bp

<400> 86

tggaaccctc caaccttctc tcccgctctg ctggttggtta ccgagggcga caatgccacc 60
 ttcacctggt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggtg cagaatgtcc 120
 cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcctgagg acagatctca gccaggccag 180
 gactgtcggg tcagagtgac ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
 cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccatctctct ggctccaag 300
 gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
 cccaccgctc atcctcacc t 381

<210> 87

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-12 (New, from V18) (with CYS73>SER SUBSTITUTION)

<400> 87

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

Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe
 50 55 60

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

85 90 95
 Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg
 100 105 110
 Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser
 115 120 125
 Pro Arg Pro Ala Gly Gln

130

<210> 90

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 89 402 bp

<400

> 90

tggaaccctc caaccttctc tcccgctctg ctggtgggta ccgagggcga caatgccacc 60
 ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120
 cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcctgagg acagatctca gccagccag 180
 gactgtcggg tcagagtgac ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
 cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccatctctct ggctccaag 300
 gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
 cccaccgctc atcctcacc ttctccaaga cctgctggcc ag 402

<210> 91

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-5 (New, from V19) (with CYS73>SER SUBSTITUTION)

<400> 91

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

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

Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser
 115 120 125
 Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130

<210> 92

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 91 402 bp

<400> 92

tggaaccctc caaccttctc tcccgctctg ctggtggtta ccgagggcga caatgccacc 60
 ttcacctggt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120
 cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcctgagg acagatctca gccaggccag 180

gactctcggt tcagagtac ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
 cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtcggcgc ccatctctct ggctccaag 300
 gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
 cccaccgctc atccctcacc ttctccaaga cctgctggcc ag 402

<210> 93

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-7

<400> 93

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

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

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45

Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60

Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95

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

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125

Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala
 130 135

<210> 94

<211> 414

<212>

> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 93 414 bp

<400> 94

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120
 aactgttaca gaatgtccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagtgaccc agctgcctaa cggcagagac 240
 ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcacctt ctccaagacc tgct 414

<210> 95

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-7 (New, from V21) (with CYS73>SER SUBSTITUTION)

<400> 95

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr

115 120 125

Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala

130 135

<210> 96

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 95 414 bp
 <400> 96
 gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt caccigtgcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120

 aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180
 agatctcage caggccagga ctctcggttc agagtgacce agctgcctaa cggcagagac 240
 ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctccaagc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcacctt ctccaagacc tgct 414
 <210> 97
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> DSP105 var17 (var1 with substitution of CYS73 in the PD1 domain

to SER) without His tag

<400> 97
 Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60

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

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 97 996 bp

<400> 98

```

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc      60
gagggcgaca atgccacctt caccigtctc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg      120
aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac      180
agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagtgacce agctgcctaa cggcagagac      240

ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc      300
atctctctgg ctccaagc tcatgcaaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca      360
gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat ccctcacctt ctccaagacc tgctggccag      420
ggatctgccg ctctcctag actgagagag ggccctgagc tgtctcctga tgatcctgct      480
ggactctggt acctgagaca gggcatgttt gctcagctgg tggcccagaa cgtgctgctg      540
attgatggcc ctctgtcctg gtactctgat cctggattgg ctggcgtgic cctgactggc      600
ggcctgtctt acaaagagga caccaaagaa ctggtggtcg ccaaggccgg cgtgtactac      660

gtgttctttc agctggaact gcggagagtg gtggctggcg aaggatctgg atctgtgtct      720
ctggccctgc atctgcagcc tctgagaagt gctgcaggcg ctgctgact ggctctgaca      780
gttgatctgc ctctgcctc ctccgaggcc agaaactccg cctttggctt ccaagcaga      840
ctgctgcatc tgctgccgg acagagactg ggagtgcacc tccatacaga ggccagagct      900
agacacgctt ggcagttgac acagggcgct acagtgtgg gcctgttag agtgacacct      960
gagatcccag cggcctgcc atctccaaga tctgaa      996
  
```

<210> 99

<211> 338

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var17 (var1 with substitution of CYS73 in the PD1 domain to SER) with His tag

<400> 99

```

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

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

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

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

 Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser
 245 250 255
 Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala
 260 265 270
 Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu
 275 280 285

His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
 290 295 300

Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
 325 330 335
 Ser Glu

<210> 100

<211> 1014

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 99 1014 bp

<400> 100

caccaccacc atcaccacga ctctccagac agaccttga accctccaac ctctctccc 60
 gctctgctgg tggttaccga gggcgacaat gccaccttca cctgttcctt cagcaacacc 120

 tccgagtect tegtctgaa ctggtacaga atgtccccta gcaaccagac cgacaagctg 180
 gccgcctttc ctgaggacag atctcagcca ggccaggact ctcggttcag agtgaccag 240
 ctgcctaacg gcagagactt ccacatgtcc gtcgtgcggg ccagaagaaa cgactctggc 300
 acctatctgt gcggcgccat ctctctggct cccaaggctc agatcaaaga gtctctgcgg 360
 gccgagctga gaggacaga aagacagct gaggtgccca ccgctcatcc ctcaccttct 420
 ccaagacctg ctggccaggg atctgccgct tctcctagac tgagagaggg cctgagctg 480
 tctcctgatg atcctgctgg actgctggac ctgagacagg gcatgtttgc tcagctggtg 540

 gcccagaacg tgctgctgat tgatggcct ctgtcctggt actctgatcc tggattggt 600
 ggcgtgtccc tgactggcgg cctgtcttac aaagaggaca ccaaagaact ggtggcgc 660
 aaggccggcg tgiactactg gttctttcag ctggaactgc ggagagtgtt ggctggcgaa 720
 ggatctggat ctgtgtctct ggccttgcac ctgcagctc tgagaagtgc tgcaggcct 780
 gctgcactgg ctctgacagt tgatctgect cctgcctcct ccgagccag aaactcggc 840
 tttggcttcc aaggcagact gctgcatctg tctgccggac agagactggg agtgcacctc 900
 catacagagg ccagagctag acacgcttgg cagttgacac agggcgctac agtgctgggc 960

 ctgtttagag tgacacctga gatccagcc ggcctgcat ctccaagatc tga 1014

<210> 101

<211> 319

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var18

<400> 101

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

1 5 10 15

Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe

 20 25 30

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu

 35 40 45

Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
 210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu

245 250 255

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser

260 265 270

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg

275 280 285

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg

290 295 300

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

305 310 315

<210> 102

<211> 957

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 101 957 bp

<400> 102

tggaaccctc caaccttctc tcccgtctg ctggtggtta ccgagggcga caatgccacc 60

ttcacctggt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggtc cagaatgtcc 120

cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcctgagg acagatctca gccaggccag 180

gactctcggg tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240

cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccatctctct ggctccaag 300

gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360

cccaccgtc atccctcacc tggatctgcc gcttctccta gactgagaga gggccctgag 420

ctgtctcctg atgatectgc tggactgctg gacctgagac agggcatggt tgctcagctg 480

gtggcccaga acgtgctgct gattgatggc cctctgtcct ggtactctga tcttgattg 540

gctggcgtgt cctgactgg cggcctgtct taaaaagagg acaccaaaga actgggtggtc 600

gccaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggctggc 660

gaaggatctg gatctgtgtc tctggccctg catctgcagc ctctgagaag tgctgcaggc 720
 gctgtctgcac tggctctgac agttgatctg cctcctgcct cctccgaggc cagaaactcc 780
 gcctttggct tccaaggcag actgctgcat ctgtctgccg gacagagact gggagtgcac 840
 ctccatacag aggccagagc tagacacgct tggcagttga cacagggcgc tacagtgtg 900
 ggctgttta gagtgacacc tgagatcca gccggcctgc catctccaag atctgaa 957

<210> 103

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var19

<400> 103

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

1 5 10 15

Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe

 20 25 30

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu

 35 40 45

Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp

165 170 175
 Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
 180 185 190

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
 195 200 205

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
 210 215 220

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
 225 230 235 240

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
 245 250 255

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
 260 265 270

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
 275 280 285

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
 290 295 300

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
 305 310 315 320

Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 325

<210> 104

<211> 978

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 103 977 bp

<400> 104

tggaaccctc caaccttctc tcccgctctg ctggttggtta ccgagggcga caatgccacc 60
 ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggtg cagaatgtcc 120
 cctagcaacc agaccgaaa gctggccgcc tttctgagg acagatctca gccaggccag 180
 gactctcggt tcagagtgac ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240

cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccatctctct ggctccaag 300
 gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
 cccaccgctc atccctcacc ttctccaaga cctgctggcc agggatctgc cgcttctct 420
 agactgagag agggccctga gctgtctct gatgatctg ctggactgct ggacctgaga 480
 cagggcatgt ttgctcagct ggtggcccag aacgtgctgc tgattgatgg ccctctgtcc 540
 tggctactctg atcctggatt ggctggcgtg tcctgactg gcggcctgic ttacaaagag 600
 gacaccaaag aactggtggt cgccaaggcc ggcgtgtact acgtgttctt tcagctggaa 660
 ctgcggagag tgggtggctgg cgaaggatct ggatctgtgt ctctggccct gcactctgcag 720
 cctctgagaa gtgctgcagg cgctgctgca ctggctctga cagttgatct gcctcctgcc 780
 tcctccgagg ccagaaactc cgctttggc ttccaaggca gactgctgca tctgtctgcc 840
 ggacagagac tgggagtga cctccataca gaggccagag ctagacacgc ttggcagttg 900
 acacagggcg ctacagtct gggcctgttt agagtacac ctgagatccc agccggcctg 960
 ccatctccaa gatctgaa 978

<210> 105

<211> 325

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var20

<400> 105

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

1	5	10	15
Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser			
	20	25	30
Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser			
	35	40	45
Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro			
	50	55	60
Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp			
65	70	75	80
Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr			
	85	90	95

Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly
 130 135 140
 Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln
 145 150 155 160
 Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly
 165 170 175
 Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr
 180 185 190
 Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys
 195 200 205
 Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val
 210 215 220
 Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro
 225 230 235 240
 Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu
 245 250 255
 Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly
 260 265 270
 Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His
 275 280 285
 Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr
 290 295 300
 Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro
 305 310 315 320
 Ser Pro Arg Ser Glu
 325

<210

> 106

<211> 975

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 105 1062 bp

<400> 106

```

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgetctgct ggtggttacc      60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg      120
aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac      180
agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagtgacct agctgcctaa cggcagagac      240
ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc      300

atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca      360
gaaagacgag ctgagggtcc caccgctcat ccctcacctg gatctgccgc ttctcctaga      420
ctgagagagg gccctgagct gtctcctgat gatcctgctg gactgctgga cctgagacag      480
ggcatgtttg ctcagctggt ggcccagaac gtgctgctga ttgatggccc tctgtcctgg      540
tactctgata ctggattggc tggcgtgtcc ctgactggcg gcctgtctta caaagaggac      600
accaagaac tggtggtcgc caagccggc gtgtactacg tgttctttca gctggaactg      660
cggagagtgg tggctggcga aggatctgga tetgtgtctc tggccctgca tetgcagcct      720

ctgagaagtg ctgcaggcgc tgctgcactg gctctgacag ttgatctgcc tctgcctcc      780
tccgaggcca gaaactccgc ctttggcttc caaggcagac tgctgcatct gctgcccga      840
cagagactgg gagtgcacct ccatacagag gccagagcta gacacgcttg gcagttgaca      900
cagggcgcta cagtgtctgg cctgtttaga gtgacacctg agatcccagc cggcctgcca      960
tctccaagat ctgaa
    
```

<210> 107

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var21

<400> 107

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

```

1           5           10           15
Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
                20           25           30
    
```

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Ser Ala Ala Ser Pro
 130 135 140
 Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
 145 150 155 160
 Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
 165 170 175
 Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
 180 185 190
 Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
 195 200 205
 Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
 210 215 220
 Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
 225 230 235 240
 Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
 245 250 255
 Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
 260 265 270
 Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var22 362 aa with His tag

<400> 109

His His His His His His Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg
 1 5 10 15

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 20 25 30

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
 35 40 45

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
 50 55 60

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg
 65 70 75 80

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 85 90 95

Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 100 105 110

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 115 120 125

Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 130 135 140

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

Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro
 165 170 175

Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
 180 185 190

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
 195 200 205

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala

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

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
 260 265 270
 Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
 290 295 300

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
 305 310 315 320

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
 325 330 335
 Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
 340 345 350
 Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 355 360

<210> 110

<211> 1086

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 109 1086 bp

<400> 110

caccatcatc accaccatcc tggctggttt ctggacagcc cgcacagacc ttggaacacct 60

cctacattca gccccgctct gctggtggtt accgagggcg ataatgccac cttcacctgt 120

agcttcagca acaccagcga gagcttcgtg ctgaactggt acagaatgag ccccagcaac 180

cagaccgaca agctggccgc ctttctgag gatagatctc agcccggcca ggactctcgg 240

ttcagagtta cacagctgcc caacggccgg gacttccaca tgtctgtcgt cggggccaga 300

agaaacgaca gcggcacata tctgtgcggc gccatttctc tggcccctaa ggctcagatc 360

aaagagagcc ttagagccga gctgagagt acagaaagac gggccgaagt gccacagct 420

cacccttcac ctctccaag acctgccgc cagtttcaga cactcgtggg agcttgcct 480

tgggccgttt ctggcctag agcctctcct ggatctgccg ctctcccag actgagagag 540

ggacctgagc tgagccctga tgatctgct ggactgetgg atctgagaca gggcatgttt 600

gccagctgg tggcccagaa tgtgctgctg attgatggcc ctctgtcctg gtacagcgat 660

cctggacttg ctggcgttag cctgactggc ggcctgagct acaaagagga caccaaagaa 720

ctggtgggtg ccaaggccgg cgtgtactac gtgttcttc agctggaact gcggagagtg 780

gtggccggcg aaggatctgg atctgtgtct ctggctctgc atctgcagcc tctgagatct 840

gctgctggtg ctgctgctct ggccctgaca gttgatctgc ctctgcctc tagcgaggcc 900

agaaactccg cctttggctt ccaaggcaga ctgctgcacc tgagcgtgg acagagactg 960

ggagtccatc tgcacacaga agccagagct agacacgct ggcagctgac acaaggcgt 1020

acagtctgg gctgttcag agtgaccct gagattccag ccggcctgcc atctctaga 1080

tctgag 1086

<210> 111

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var22 362 aa

<400> 111

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110
 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

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

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

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

 Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
 340 345 350

Pro Arg Ser Glu

355

<210> 112

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 111 1086 bp

<400> 112

```

cctggctggt ttctggacag ccccgacaga ccttgaacc ctctacatt cagccccgt      60
ctgctggtgg ttaccgaggg cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc    120
gagagcttcg tgctgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc    180

gcctttcctg aggatagatc tcagcccggc caggactctc ggttcagagt tacacagctg    240
cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggcca gaagaaacga cagcggcaca    300
tatctgtgcg gcgccatttc tctggccctt aaggctcaga tcaaagagag cctgagagcc    360
gagctgagag tgacagaaag acgggccgaa gtgccacag ctcacccttc accttctcca    420
agacctgccg gccagtttca gacactcgtg ggagcttgtc cttgggccgt ttctggcgt     480
agagcctctc ctggatctgc cgcttctccc agactgagag agggacctga gctgagccct    540
gatgatcctg ctggactgct ggatctgaga cagggcattg ttgccagct ggtggcccag    600

aatgtgctgc tgattgatgg ccctctgtcc tggtagacag atcctggact tgctggcgtt    660
agcctgactg gcggcctgag ctacaaagag gacaccaaag aactggtggt ggccaaggcc    720
ggcgtgtact acgtgttctt tcagctggaa ctgcggagag tggtagccgg cgaaggatct    780
ggatctgtgt ctctggctct gcatctgcag cctctgagat ctgctgctgg tgctgctgct    840
ctggccctga cagttgatct gcctctgcc tctagcgagg ccagaaactc cgcctttggc    900
ttccaaggca gactgctgca cctgagcgtg ggacagagac tgggagtcca tctgcacaca    960
gaagccagag ctagacacgc ctggcagctg acacaaggcg ctacagtgct gggcctgttc   1020

agagtgacct ctgagattcc agccggcctg ccatctccta gatctgag                    1068

```

<210> 113

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var23 amino acid sequence

<400> 113

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

245 250 255
 Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
 260 265 270
 Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
 275 280 285
 Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu

290 295 300
 Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
 305 310 315 320
 Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 325 330

<210> 114

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 var23 nucleic acid sequence

<400> 114

gactctccag acagacctg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120

 aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagtgacct agctgcctaa cggcagagac 240
 ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgagggtcc caccgtcat cctcacctt ctccaagacc tgctggatct 420
 gccgttctc ctgactgag agagggcct gagctgtctc ctgatgatcc tgctggactg 480
 ctggacctga gacagggcat gtttgctcag ctggtggccc agaactgct gctgattgat 540

 ggccctctgt cctggtactc tgatctgga ttggctggcg tgtccctgac tggcggcctg 600
 tcttacaag aggacaccaa agaactggtg gtcgccaagg ccggcgtgta ctactgttc 660
 tttcagctgg aactgcggag agtgggtggct ggcgaaggat ctggatctgt gtctctggcc 720
 ctgcatctgc agcctctgag aagtctgca ggcgctgctg cactggctct gacagttgat 780
 ctgcctctg cctcctccga ggccagaaac tccgcctttg gcttccaagg cagactgctg 840
 catctgtctg ccggacagag actgggagtg cacctccata cagaggccag agctagacac 900

gcttggcagt tgacacaggg cgctacagtg ctgggcctgt ttagagtgac acctgagatc 960

ccagccggcc tgccatctcc aagatctgaa 990

<210> 115

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 variant amino acid sequence

<400> 115

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr

115 120 125

Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg

130 135

<210> 116

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 variant nucleic acid sequence

<400> 116

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120

 aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggcgcctt tectgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240
 ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat ccctcacctt ctccaaga 408

<210> 117

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 variant amino acid sequence

<400> 117

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

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

Gln

145

<210> 118

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 variant nucleic acid sequence

<400> 118

```

cccggctggt ttctggactc tccagacaga ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgt      60
ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc      120
gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccttagca accagaccga caagctggcc      180
gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc ggttcagagt tacccagctg      240

cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca      300
tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc aaggtcaga tcaaagagtc tctgcgggcc      360
gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtccccaccg ctcatccctc accttctcca      420
agacctgctg gccag                                           435
    
```

<210> 119

<211> 143

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 variant amino acid sequence

<400> 119

```

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1           5           10           15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
           20           25           30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
           35           40           45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
           50           55           60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65           70           75           80
    
```


<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 123

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-1BBL variant amino acid sequence

<400> 123

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

1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His

85 90 95

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

100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly

115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val

130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln

145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala

165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

180

<210> 124

<211> 552

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-1BBL variant nucleic acid sequence

<400> 124

agagagggcc ctgagctgtc tctgatgat cctgctggac tgctggacct gagacagggc 60
 atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgattg atggccctct gtctctgtac 120
 tctgatcctg gattggctgg cgtgtccctg actggcggcc tgtcttaca agaggacacc 180

aaagaactgg tggtcgcca ggccggcgtg tactacgtgt tcttcagct ggaactgagg 240
 agagtggagg ctggcgaagg atctggatct gtgtctctgg cctgcatct gcagcctctg 300
 agaagtgctg caggcgtctg tgcactggct ctgacagttg atctgctcc tgctcctcc 360
 gaggccagaa actccgctt tggcttccaa ggcagactgc tgcactgtc tgccggacag 420
 agactgggag tgcacctca tacagaggcc agagctagac acgcttgca gttgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gtttagagt acacctgaga tcccagccgg cctgccatct 540
 ccaagatctg aa 552

<210> 125

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-1BBL variant amino acid sequence

<400> 125

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

1 5 10 15

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp

20 25 30

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu

35 40 45

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

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

Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 180

<210> 126

<211> 546

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-1BBL variant nucleic acid sequence

<400> 126

ggccctgagc tgtctcctga tgatcctgct ggactgctgg acctgagaca gggcatgttt 60
 gctcagctgg tggcccagaa cgtgctgctg attgatggcc ctctgtcctg gtactctgat 120
 cctggattgg ctggcgtgct cctgactggc ggctgtctt acaaagagga caccaaagaa 180
 ctggtggctg ccaaggccgg cgtgtactac gtgttctttc agctggaact gctgagagtg 240
 gtggctggcg aaggatctgg atctgtgtct ctggccctgc atctgcagcc tctgagaagt 300

 gctgcaggcg ctgctgcaact ggctctgaca gttgatctgc ctctgcctc ctccagggcc 360
 agaaactccg cctttggctt ccaaggcaga ctgctgcatc tgtctgccgg acagagactg 420
 ggagtgcacc tccatacaga ggccagagct agacacgctt ggcagttgac acagggcct 480

acagtgctgg gcctgttttag agtgacacct gagatcccag cggcctgcc atctccaaga 540
 tctgaa 546
 <210> 127
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 4-1BBL variant amino acid sequence
 <400> 127

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

<210> 128

<211> 551

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-IBBL variant nucleic acid sequence

<400> 128

gatctgccgc ttctcctaga ctgagagagg gcctgagct gtctcctgat gatcctgctg 60
 gactgctgga cctgagacag ggcatgtttg ctgagctggt ggcccagaac gtgctgctga 120
 ttgatggccc tctgtcctgg tactctgata ctggattggc tggcgtgtcc ctgactggcg 180
 gcctgtctta caagaggac accaaagaac tggtggtcgc caaggccggc gtgtactacg 240
 tgttctttca gctggaactg cggagagtgg tggctggcga aggatctgga tctgtgtctc 300
 tggccctgca tctgcagcct ctgagaagtg ctgcaggcgc tgctgactg gctctgacag 360

ttgatctgcc tctgcctcc tccgaggcca gaaactccgc ctttgcttc caaggcagac 420
 tgctgcatct gtctgccgga cagagactgg gactgcacct ccatacagag gccagagcta 480
 gacacgcttg gcagttgaca cagggcgcta cagtgtggg cctgtttaga gtgacacctg 540
 agatcccage c 551

<210> 129

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-IBBL variant amino acid sequence

<400> 129

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

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
 20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
 35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
 50 55 60

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

<213> Artificial sequence

<220><223> sc3x4-1BBL -14-0 amino acids sequence

<400> 131

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly

 85 90 95

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

 100 105 110

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu

 115 120 125

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser

 130 135 140

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg

145 150 155 160

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

 210 215 220

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

Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu
 485 490 495

Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu
 500 505 510

His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu
 515 520 525

Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe
 530 535 540

Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly
 545 550 555 560

Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr
 565 570 575

Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro
 580 585 590

Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 595 600

<210> 132

<211> 1803

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sc3x4-1BBL -14-0 nucleic acid sequence

<400> 132

tctgccgcca gcctaggct gcgcgagga cccgagctga gccagacga tcccgcggc 60

ctgctggacc tgaggcagg aatgttcga cagctggtg cccagaact gctgctgac 120

gacggccctc tgtcctgta ctctgateca ggctggccg gcgtgtcct gacaggaggc 180

ctgtcttata aggagatag caaggagctg gtggtggca aggcaggcgt gtactacgtg 240

ttcttcagc tggagctgag gagagtgtg gcaggagagg gcagcggctc cgtgtctctg 300

gcctgcacc tccagcctc gcggagcgc gccggcggc ccgcctggc cctgaccgtg 360

gatctgcctc cagccagctc cgaggccagg aatagcctc tcggctttca gggccgctg 420

ctgcacctgt ccgcccggca gcggtggga gtgcacctgc acacagaggc cagagcccgg 480

cagcatggc agctgacaca gggagcaacc gtgctgggcc tgttccgct gaccctgag 540

atcccagccg gcctgccaag cccccggtcc gagggcggcg gcggctctgg cggaggaggc 600
 agcggaggcg gcggctctgc cgccagcccc aggctgcgcg agggaccgca gctgtcccca 660
 gacgatcctg ccggcctgct ggacctgcgc cagggaatgt ttgccagct ggtggctcaa 720
 aacgtgctgt taatcgacgg ccctctgagc tggtaactctg atcctggcct ggccggcgtg 780
 agcctgaccg gcggcctgtc ctacaaagag gatactaaag agctggtggt cgccaaagcc 840
 ggcggtgact acgtgttctt ccaactggag ctgaggaggg tcgtcgccgg cgaaggcagc 900

ggctccgtgt ctctggccct gcacctccag ccgctgagga gcgccgccgg cgccgccgcc 960
 ctggccctga cggaggacct gccacctgcc tctagcgagg caagaatc tgccttcggc 1020
 ttccagggca ggctgctgca cctgagcgcc ggccagcgcc tgggctcca cctgcatacc 1080
 gaagccagag cccggcatgc ctggcagctg acccagggcg ccaccgtgct gggcctgttc 1140
 agagtgaccg cagagatccc gcggcgctg cctagcccaa ggtccgaagg cggcgcgggc 1200
 tccggcggcg gaggtctctg aggagggggc tctgcccca gcccaaggct gcgagggga 1260
 cccgagctgt cgctgacga tccagccggc ctgctggacc tgcgtcaggg catgttcgcc 1320

cagctggtgg ctcagaactg gctgttaatc gacggcccac tgtcttgta ttctgatccc 1380
 ggctggccg gcgtgtctct gacaggaggc ctgagctaca aagaggatac aaaagagctg 1440
 gtggtcgcta aagctggcgt gtactacgtg ttcttccaac tggagctgcg cagggtcgtc 1500
 gccggcgagg gcagcggtc cgtgtctctg gcctgcacc tccagccatt acggagcgcc 1560
 gccggcgccc ccgccctggc cctgactgtg gacctgccac cagcctctc tgaggcacgg 1620
 aacagcgct tcggcttcca aggcagactg ctgcacctgt ctgccggcca gaggtgggc 1680
 gtccacctgc acaccgaagc cagagcccgg cagcctggc agctgactca gggcgctacc 1740

gtgctgggcc tgttccgct aacccagag atccctgccg gcctgccag ccctcggtcc 1800
 gag 1803

<210> 133

<211> 321

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant amino acid sequence

<400> 133

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

1 5 10 15

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

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
 275 280 285

Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
 290 295 300

Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
 305 310 315 320
 Glu

<210> 134

<211> 963

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant nucleic acid sequence

<400> 134

gactctccag acagacctg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120

aactgttaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggcgcctt tectgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagttacc agtgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgtcgg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctcccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacctt ctccaagagg aagagagggc 420

cctgagctgt ctctgatga tctgctgga ctgctggacc tgagacaggg catgtttgct 480

cagctggtgg cccagaactg gctgctgatt gatggcctc tgtcctggta ctctgatcct 540

ggattggctg gcgtgtccct gactggcggc ctgtcttaca aagaggacac caaagaactg 600

gtggtcgcca aggccggcgt gtactacgtg ttctttcagc tggaaactgcg gagagtgggtg 660

gctggcgaag gatctggatc tgtgtctctg gcctgcatc tgcagcctct gagaagtgct 720

gcaggcgctg ctgcaactggc tctgacagt gatctgctc ctgctctc ctagggccaga 780

aactccgctt ttggcttcca aggcagactg ctgcatctgt ctgccggaca gagactggga 840

gtgcacctcc atacagaggc cagagctaga cacgcttggc agttgacaca gggcgctaca 900

gtgctgggcc tgtttagagt gacacctgag atcccagccg gctgccatc tccaagatct 960

gaa 963

<210> 135

<211> 319

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant amino acid sequence

<400> 135

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
 210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu

245 250 255

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser

260 265 270

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg

275 280 285

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg

290 295 300

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

305 310 315

<210> 136

<211> 957

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant nucleic acid sequence

<400> 136

gactctccag acagacctg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacctt ctccaagagg aggcctgag 420

ctgtctcctg atgatectgc tggactgctg gacctgagac agggcatggt tgctcagctg 480

gtggcccaga acgtgctgct gattgatggc cctctgtcct ggtactctga tctggattg 540

gctggcgtgt cctgactgg cggcctgtct tacaagagg acaccaaaga actggtggtc 600

gccaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggctggc 660

gaaggatctg gatctgtgtc tctggccctg catctgcagc ctctgagaag tgctgcaggc 720
 gctgtctgcac tggctctgac agttgatctg cctcctgcct cctccgaggc cagaaactcc 780
 gcctttggct tccaaggcag actgctgcat ctgtctgccg gacagagact gggagtgcac 840
 ctccatacag aggccagagc tagacacgct tggcagttga cacagggcgc tacagtgtctg 900
 ggccctgttta gactgacacc tgagatccca gccggcctgc catctccaag atctgaa 957

<210> 137

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant amino acid sequence

<400> 137

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

165 170 175
 Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp

180 185 190
 Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser

195 200 205
 Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr

210 215 220
 Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly

225 230 235 240
 Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala

245 250 255
 Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser

260 265 270
 Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His

275 280 285
 Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg

290 295 300
 Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu

305 310 315 320
 Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala

325

<210> 138

<211> 987

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant nucleic acid sequence

<400> 138

cccggctggt ttctggactc tccagacaga ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgt 60
 ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120
 gagtcccttg tgetgaactg gtacagaatg tccctagca accagaccga caagctggcc 180
 gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc ggcttcagagt taccagctg 240

cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300
 tatctgtgcg gcgcatctc tctggctccc aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360
 gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgcccaccg ctcatccctc accttctcca 420
 agacctgctg gccagggatc tgccgcttct cctagactga gagagggccc tgagctgtct 480
 cctgatgata ctgctggact gctggacctg agacagggca tgtttgctca gctggtggcc 540
 cagaacctgc tgetgattga tggccctctg tcttggtact ctgatcctgg attggtggc 600
 gtgtccctga ctggcggcct gtcttaciaa gaggacacca aagaactggt ggtcgccaag 660

gccggcgtgt actacgtgtt ctttcagctg gaactgcgga gagtgggtggc tggcgaagga 720
 tctggatctg tgictctggc cctgcatctg cagcctctga gaagtgtgc aggcgtgct 780
 gcactggctc tgacagtga tctgctcct gcctcctccg aggccagaaa ctccgccttt 840
 ggcttccaag gcagactgct gcactgtct gccggacaga gactgggagt gcacctccat 900
 acagaggcca gagctagaca cgcttggcag ttgacacagg gcgctacagt gctgggcctg 960
 tttagagtga cacctgagat cccagcc 987

<210> 139

<211> 320

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant amino acid sequence

<400> 139

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

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

115 120 125
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly

130 135 140
 Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp

145 150 155 160
 Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu

165 170 175
 Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val

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

195 200 205
 Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg

210 215 220
 Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His

225 230 235 240
 Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr

245 250 255
 Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly

260 265 270
 Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val

275 280 285
 His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln

290 295 300
 Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala

305 310 315 320

<210> 140

<211> 960

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant nucleic acid sequence

<400> 140

cccggctggt ttctggactc tccagacaga ccttggaaacc ctccaacctt ctctcccgt 60
 ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120
 gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccttagca accagaccga caagctggcc 180
 gcctttctg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc ggttcagagt taccagctg 240
 cctaaccggc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300

tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360
 gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtccccaccg ctcatccctc accttctcca 420
 agacctgctg gaagagaggg ccctgagctg tctcctgatg atcctgctgg actgctggac 480
 ctgagacagg gcatgtttgc tcagctggtg gcccagaacg tgctgctgat tgatggcct 540
 ctgtcctggt acictgatcc tggattggct ggcgtgtccc tgactggcgg cctgtcttac 600
 aaagaggaca ccaaagaact ggtggtcgcc aaggccggcg tgtactacgt gttctttcag 660
 ctggaactgc ggagagtggg ggctggcgaa ggatctggat ctgtgtctct ggccctgcat 720

ctgcagcctc tgagaagtgc tgcaggcgct gctgcaactgg ctctgacagt tgatctgcct 780
 cctgcctcct ccgaggccag aaactccgcc tttggcttcc aaggcagact gctgcatctg 840
 tctgccggac agagactggg agtgcacctc catacagagg ccagagctag acacgcttgg 900
 cagttgacac agggcgctac agtgctgggc ctgtttagag tgacacctga gatcccagcc 960

<210> 141

<211> 346

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant amino acid sequence

<400> 141

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

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

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45

Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant amino acid sequence

<400> 143

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

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

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

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

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
 225 230 235 240

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 245 250 255

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
 260 265 270

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
 275 280 285

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
 290 295 300

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
 305 310 315 320

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
 325 330 335

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 340 345 350

<210> 144

<211> 1092

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant nucleic acid sequence

<400> 144

cctggctggt ttctggacag ccccgacaga ccttgaacc ctctacatt cagccccgct 60
 ctgctggtgg ttaccgagg cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc 120
 gagagcttcg tgetgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc 180
 gcctttctg aggatagatc tcagcccggc caggactgtc ggttcagagt tacacagctg 240
 cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggcca gaagaacga cagcggcaca 300
 tatctgtgcg gcgccatttc tctggcccct aaggctcaga tcaaagagag cctgagagcc 360
 gagctgagag tgacagaaag acgggccgaa gtcccacag ctacccttc accttctcca 420

 agacctgcc gccagtttca gacctcgtg ggagcttgtc cttgggccgt ttctgdcgct 480
 agagcctctc ctggatctgg cgctagagcc tctcctggat ctgcccttc tcccagactg 540

agagaggac ctgagctgag ccctgatgat cctgctggac tgctggatct gagacagggc 600
 atgtttgcc agctggtggc ccagaatgtg ctgctgattg atggcctct gtctgtgtac 660
 agcgatcctg gacttgctgg cgttagcctg actggcggcc tgagctacaa agaggacacc 720
 aaagaactgg tggtaggcaaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 780
 agagtggtag ccggcgaagg atctggatct gtgtctctgg ctctgcatct gcagcctctg 840

agatctgctg ctggtgctgc tgctctggcc ctgacagttg atctgcctcc tgcctctagc 900
 gaggccagaa actccgcctt tggcttcaa ggcagactgc tgcacctgag cgctggacag 960
 agactgggag tccatctgca cacagaagcc agagctagac acgcctggca gctgacacaa 1020
 ggcgctacag tgctgggect gttcagagt acccctgaga ttccagccgg cctgcatct 1080
 cctagatctg ag 1092

<210> 145

<211> 365

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant amino acid sequence

<400> 145

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

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

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

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

<210> 146

<211> 1095

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant nucleic acid sequence

<400> 146

cctggctggt ttctggacag ccccgacaga ccttgaacc ctctacatt cagccccgct 60

ctgctggtgg ttaccgaggg cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc 120

gagagcttcg tgctgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc 180

gcctttctctg aggatagatc tcagcccggc caggactgtc ggttcagagt tacacagctg 240

cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggcca gaagaaacga cagcggcaca 300

tatctgtgcg gcgccatttc tctggcccct aaggctcaga tcaaagagag cctgagagcc 360

gagctgagag tgacagaaag acgggccgaa gtgccacag ctccacctc accttctcca 420

agacctgccg gccagtttca gacactcgtg ggaggaggag gatccggagg aggaggatcc 480

gcctgtcctt gggctgtgtc tggcgtaga gcatctctg gctctgctgc ctctcctaga 540

ctgagagagg gacctgagct gtctctgat gatcctgctg gcctgctgga tctgagacag 600

ggcatgtttg ctacagtggt ggcccagaac gtgctgctga ttgatggccc tctgtcctgg 660

tactctgac ctggattggc tggcgtgtcc ctgactggcg gcctgtctta caaagaggac 720

accaaagaac tgggtgtggc caagccggc gtgtactacg tgttctttca gctggaactg 780

cggagagtgg tggccggcga aggatctgga tctgtgtctc tggcactgca tctgcagccc 840

ctgagatctg ctgcaggcgc tgctgctctg gctctgacag ttgatctgcc tctgcctcc 900

tccgaggcca gaaactccgc ctttggcttc caaggcagac tgctgcatct gctgcccggc 960

cagagactgg gactccatct gcatacagag gctagagcca ggcacgcctg gcagttgaca 1020

caagtgcta cagtgtctggg cctgttcaga gtgaccccag agattccagc cggcctgcct 1080

tctccaagat ccgag 1095

<210> 147

<211> 750

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant amino acid sequence

<400> 147

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

1 5 10 15

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

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

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

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

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
 260 265 270

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
 275 280 285

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
 290 295 300

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
 305 310 315 320

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
 325 330 335

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 340 345 350

Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser
 355 360 365

Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala
 370 375 380

Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp
 385 390 395 400

Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser
 405 410 415

Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr
 420 425 430

Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly
 435 440 445

Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala
 450 455 460

Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser
 465 470 475 480

Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
 485 490 495

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

<210> 148

<211> 2250

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105 variant nucleic acid sequence

<400> 148

```

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc      60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg      120

aactgttaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac      180
agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac      240
ttccacatgt ctgttgtgcg gggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc      300
atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca      360
gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat ccctcacctt ctccaagacc tgctggccag      420
ggcggcgggc gctcgggagg aggaggatct gccgccagcc ctaggctgcg cgagggaccc      480
gagctgagcc cagacgatcc cgccggcctg ctggacctga ggcagggaat gttcgcacag      540

ctggtggccc agaactgct gctgatcgac ggcctctgt cctggtactc tgatccaggc      600
ctggccggcg gtccctgac aggaggcctg tcttataagg aggatacca ggagctggtg      660
gtggcaaagg caggcgtgta ctactgttcc ttccagctgg agctgaggag agtgggtggca      720
ggagagggca gcggtccgt gtctctggcc ctgcacctcc agcctctgcg gagcgccgcc      780
ggcgcgcccg ccctggccct gaccgtggat ctgcctccag ccagctccga ggccaggaat      840
agcgccttcg gctttcaggc cgcctgctg cacctgtccg ccggccagcg gctgggagtg      900
cacctgcaca cagaggccag agcccggcac gcatggcagc tgacacaggg agcaaccgtg      960

ctgggctgtg tccgcgtgac ccctgagatc ccagccggcc tgccaagccc ccggtccgag     1020
ggcggcgggc gctctggcgg aggaggcagc ggaggcggcg gctctgccgc cagccccagg     1080
ctgcgcgagg gacccgagct gtccccagac gatcctgccg gcctgctgga cctgcgccag     1140
ggaatgtttg ccagctggt ggctcaaac gtgctgttaa tcgacggccc tctgagctgg     1200
tactctgate ctggcctggc gggcgtgagc ctgaccggcg gcctgtccta caaagaggat     1260
actaaagagc tggtggtcgc caaagccggc gtgtactacg tgttttcca actggagctg     1320
aggagggtcg tcgccggcga aggcagcggc tccgtgtctc tggccctgca cctccagccg     1380

ctgaggagcg ccgccggcgc cgccgccctg gcctgacgg tggacctgcc acctgcctct     1440
agcagggcaa gaaattctgc cttcggcttc cagggcaggc tgctgcacct gagcgccggc     1500

```

cagcgcctgg gcgtccacct gcataccgaa gccagagccc ggcatgcctg gcagctgacc 1560
 cagggcgcca ccgtgctggg cctgttcaga gtgaccccag agatccccgc cggcctgcct 1620
 agcccaaggt ccgaaggcgg cggcggctcc ggcggcggag gctctggagg agggggctct 1680
 gccgccagcc caaggctcgc cgagggaccc gagctgtcgc ctgacgatcc agccggcctg 1740
 ctggacctgc gtcaggcat gttcgcccag ctggtggctc agaactgtct gttaatcgac 1800

ggccccactgt ctigtattc tgatcccgc ctggccggcg tgtctctgac aggaggcctg 1860
 agctacaaag aggatacaa agagctggtg gtcgctaaag ctggcgtgta ctacgtgttc 1920
 ttccaactgg agctgcgcag ggtcgtcgc ggcgagggca gcggctccgt gtctctggcc 1980
 ctgcacctcc agcattacg gagcggccc ggcggcccg ccctggccct gactgtggac 2040
 ctgccaccag cctcctctga ggcacggaac agcgccttcg gcttccaagg cagactgctg 2100
 cacctgtctg ccggccagag gctgggcgtc cacctgcaca ccgaagccag agccccggcac 2160
 gctggcagc tgactcaggc cgctaccgtg ctgggcctgt tccgcgtaac cccagagatc 2220

cctgccggcc tgcccagccc tcggtccgag 2250

<210> 149

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> may repeat 1-4 times

<400> 149

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 150

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 151

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 151

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 152

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> may repeat 1-3 times

<400> 152

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<220>

><221> REPEAT

<222> (2)..(6)

<223> EAAAK

<220><221> REPEAT

<222> (2)..(6)

<223> repeat 2-5 times

<400> 153

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5

<210> 154

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 154

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

1 5 10

<210> 155

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 155

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

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala

 20 25 30

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

 35 40 45

<210> 156

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 156

Pro Ala Pro Ala Pro

1 5

<210> 157

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 157

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

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 158

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 158

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

1 5 10

<210> 159

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker amino acid sequence

<400> 159

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe

1 5 10

<210> 160

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4 Fc linker

<400> 160

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

<213> Artificial sequence

<220><223> hIgG4 Fc linker

<400> 163

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

 210 215 220

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
 20 25 30
 Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
 35 40 45
 Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
 50 55 60
 Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
 65 70 75 80
 Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 85 90 95
 Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
 100 105 110
 Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
 115 120 125
 Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
 130 135 140
 Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
 145 150 155 160
 Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
 165 170 175
 Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Asp
 180 185 190
 Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu
 195 200 205
 Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn
 210 215 220
 Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn
 225 230 235 240
 Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly
 245 250 255
 Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe

260 265 270
 His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu

275 280 285
 Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu

290 295 300
 Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala

305 310 315 320
 His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln

325 330

<210> 169

<211> 996

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DSP105_V32 (4-1BBL-PD1 FUSION) nucleic acid sequence

<400> 169

tctgccgctt ctcccagact gagagaagga cctgagctga gccctgatga tctgctgga 60

ctgctggate tgcggcaggg catgtttgct cagttggtgg cccagaacgt gctgctgac 120

gatggcctc tgtcctggta ctctgatcca ggattggctg gcgtgtccct gactggcggc 180

ctgtcttaca aagaggacac caaagaactg gtggtggcca aggccggcgt gtactacgtg 240

ttctttcagc tggaactcgc gagagtgggtg gctggcgaag gatctggatc tgtgtctctg 300

gccctgcatc tgcagcctct gagaagtgtc gcaggcctg ctgactggc tctgacagtt 360

gatctgcctc ctgcctcctc cgaggccaga aactccgctt ttggcttcca aggcagactg 420

ctgcacctgt ccgctggaca gagactggga gtccatctgc acacagaggc cagagctaga 480

cacgcttggc agttgacaca gggcgctaca gtgctgggcc tgtttagagt gaccctgag 540

attccagccg gectgccatc tcttagatct gagggcgact cccctgacag accttgaac 600

cctccaacct tcctccccgc tctgctggtg gttaccgagg gcgacaatgc caccttcacc 660

tgttccttca gcaacacctc cgagtccttc gtgctgaact ggtacagaat gtcccctagc 720

aaccagaccg acaagctggc cgcttttctt gaggacagat ctcagccagg ccaggactgc 780

cggttcagag ttaccagct gcctaacggc cgggacttcc acatgtctgt tgtgcgggcc 840

agacggaacg actctggcac atatctgtgc ggcgccatct ctctggctcc caaggtcag 900

atcaaagagt ctctgcgggc cgagctgaga gtgacagaaa gacgagctga ggtgccacc 960

gtcatccct caccttctcc aagacctgcc ggccag

996