

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2022-0044284
(43) 공개일자 2022년04월07일

(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 10-2022-7004624 (22) 출원일자(국제) 2020년07월08일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2022년02월10일 (86) 국제출원번호 PCT/IL2020/050762 (87) 국제공개번호 WO 2021/005599 국제공개일자 2021년01월14일 (30) 우선권주장 62/872,741 2019년07월11일 미국(US)	(71) 출원인 카 메디컬 리미티드 이스라엘 예루살렘 9109701 키르야트 하다사 1 제 이비피 빌딩 피오박스 9779 토마스 제퍼슨 유니버시티 미국 펜실베이니아 19107 필라델피아 스위트 110 체 스트리트 스트리트 925 (72) 발명자 티코신스키, 마크 엘. 미국 펜실베이니아 19066 메리온 스테이션 린덴 레 인 300 타미르, 아미 이스라엘 레호보트 7656261 나탄 알터만 스트리트 4 브레머, 에드윈 네덜란드 그로닝겐 9722이디 모차르트스트라트 26 (74) 대리인 특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 이종이량체 및 이의 사용방법**(57) 요약**

이량체화 모이어티(dimerizing moiety)를 포함하는 이종이량체가 제공되는데, 상기 이량체화 모이어티는 적어도 하나의 I형 막 단백질의 천연 리간드(natural ligand) 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열; 및 적어도 하나의 II형 막 단백질 수용체의 천연 리간드 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열;에 부착된다. 또한, 상기 이종이량체를 인코딩하는 핵산 작제물 및 시스템, 이를 발현하는 숙주 세포, 및 이의 사용방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/705 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

이량체화 모이어티(dimerizing moiety)를 포함하는 이종이량체(heterodimer)로서, 상기 이량체화 모이어티는 적어도 하나의 I형 막 단백질의 천연 리간드(natural ligand) 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열 및 적어도 하나의 II형 막 단백질 수용체의 천연 리간드 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열에 부착된 것인, 이종이량체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이량체화 모이어티는 단백질성 모이어티(proteinaceous moiety)인 것인, 이종이량체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이종이량체의 단량체는 공유결합으로 부착되지 않은 것인, 이종이량체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이량체화 모이어티는 항체 또는 이의 단편의 Fc 도메인인 것인, 이종이량체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , LAG3, BTN3A1, CD27, CD80, CD86, ENG, NLGN4X, CD84, TIGIT, CD40, IL-8, IL-10, CD164, LY6G6F, CD28, CTLA4, BTLA, LILRB1, LILRB2, TYROBP, ICOS, VEGFA, CSF1, CSF1R, VEGFB, BMP2, BMP3, GDNF, PDGFC, PDGFD, RAET1E, CD155, CD166, MICA, NRG1, HVEM, DR3, TEK, TGFB1, LY96, CD96, KIT, CD244, GFER 및 SIGLEC로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 이종이량체.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 이종이량체.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질은 PD1 및 SIRP α 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 이종이량체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질은 4-1BBL, FasL, TRAIL, TNF-알파, TNF-베타, OX40L, CD40L, CD27L, CD30L, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEGI, GITRL, EDA1/2, 림프독소 알파(Lymphotoxin alpha) 및 림프독소 베타(Lymphotoxin beta)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 이

종이량체.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질은 4-1BBL, OX40L, CD40L, LIGHT 및 GITRL로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 이중이량체.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질은 4-1BBL 및 CD40L로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 이중이량체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질 및 상기 II형 막 단백질 중 적어도 하나는 면역 조절제인 것인, 이중이량체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중이량체는 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열 및 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체를 포함하는 것인, 이중이량체.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중이량체는 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는 것인, 이중이량체.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고; 상기 이중이량체는 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제1 단량체의 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 상기 적어도 하나 및 상기 제2 단량체의 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 상기 적어도 하나는 동일한 것인, 이중이량체.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 제1 단량체의 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들

중 상기 적어도 하나 및 상기 제2 단량체의 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 상기 적어도 하나는 구별되는 것인, 이종이량체.

청구항 17

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고; 상기 이종이량체는 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는, 이종이량체.

청구항 18

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 I형 막 단백질은 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이종이량체는 상기 PD1의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 상기 4-1BBL의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 PD1의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이종이량체.

청구항 19

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이종이량체는 상기 LILRB2의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 상기 4-1BBL의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 LILRB2의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이종이량체.

청구항 20

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이종이량체는 상기 LILRB2의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 상기 CD40L의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 LILRB2의 상기 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이종이량체.

청구항 21

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 PD1 및 SIRP α 이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이종이량체는 상기 SIRP α 의 상기 아미노산 서열 및 상기 4-1BBL의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 PD1의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이종이량체.

청구항 22

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 PD1 및 SIRP α 이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이종이량체는 상기 SIRP α 의 상기 아미노산 서열 및 상

기 CD40L의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 PD1의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 23

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 LILRB2 및 SIRP α 이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 상기 SIRP α의 상기 아미노산 서열 및 상기 4-1BBL의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 LILRB2의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 24

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 LILRB2 및 SIRP α 이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 상기 SIRP α의 상기 아미노산 서열 및 상기 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 LILRB2의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 25

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 LILRB2 및 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 상기 PD1의 상기 아미노산 서열 및 상기 4-1BBL의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 LILRB2의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 26

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 LILRB2 및 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 상기 PD1의 상기 아미노산 서열 및 상기 CD40L의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 LILRB2의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 27

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 SIGLEC 및 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 상기 PD1의 상기 아미노산 서열 및 상기 4-1BBL의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 SIGLEC의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 28

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 SIGLEC 및 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 상기 PD1의 상기 아미노산 서열 및

상기 CD40L의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 SIGLEC의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 29

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 TIGIT 및 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 상기 PD1의 상기 아미노산 서열 및 상기 4-1BBL의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 TIGIT의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 30

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 TIGIT 및 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 상기 PD1의 상기 아미노산 서열 및 상기 CD40L의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 TIGIT의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 31

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 TIGIT 및 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 상기 TIGIT의 상기 아미노산 서열 및 상기 4-1BBL의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 PD-1의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 32

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 TIGIT 및 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 상기 TIGIT의 상기 아미노산 서열 및 상기 CD40L의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 PD1의 상기 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함하는, 이중이량체.

청구항 33

제5항, 제6항, 제27항 및 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 SIGLEC는 SIGLEC10인 것인, 이중이량체.

청구항 34

제2항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 단백질성 이량체화 모이어티의 N-말단에 부착되고, 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 단백질성 이량체화 모이어티의 C-말단에 부착된 것인, 이중이량체.

청구항 35

제2항 내지 제34항 중 어느 한 항의 이중이량체를 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드, 및 숙주 세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소(regulatory element)를 포함하는, 핵산 작제물 또는 시스템.

청구항 36

제2항 내지 제34항 중 어느 한 항의 이중이량체 또는 제35항의 핵산 작제물 또는 시스템을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 37

이중이량체를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 이중이량체를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템을 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 방법은 상기 이량체화 모이어티를 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열 및 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 상기 적어도 하나의 아미노산 서열에 추가하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 방법은 상기 이중이량체를 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 40

이중이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는데 사용하기 위한, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 세포.

청구항 41

면역 세포를 조절하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는데 사용하기 위한, 제11항 내지 제34항 중 어느 한 항의 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포.

청구항 42

제40항 또는 제41항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 상기 질병의 세포는 상기 I형 막 단백질의 리간드 또는 수용체를 발현하는 것인, 조성물.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질병의 세포는 상기 II형 막 단백질의 리간드 또는 수용체를 발현하는 것인, 조성물.

청구항 44

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질병은 암인 것인, 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 암은 림프종, 백혈병 및 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 46

면역 세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 상기 방법은 제11항 내지 제34항 중 어느 한 항의 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포의 존재 하에서 면역 세포를 생체 외에서 (in-vitro) 활성화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 활성화하는 단계는 상기 세포의 존재 하에서 상기 I형 막 단백질 또는 상기 II형 막 단백질의 리간드 또는 수용체, 또는 상기 I형 막 단백질 또는 상기 II형 막 단백질의 외인성 리간드 또는 수용체를 발현하는 단계인 것인, 방법.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 상기 조절은 활성화인 것인, 방법.

청구항 49

제46항 또는 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절은 억제인 것인, 방법.

청구항 50

제41항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포는 T 세포를 포함하는 것인, 방법 또는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2019년 7월 11일에 출원된 미국 특허 출원 번호 제62/872,741호의 우선권을 주장하며, 이의 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0003]

서열 목록 진술

[0004]

2020년 7월 7일에 생성된 347,293 바이트의 82913 SequenceListing.txt라는 명칭의 ASCII 파일은 본 명세서에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0005]

본 발명은, 이들의 몇몇 실시양태에서, 이중이량체 및 이의 사용방법에 관한 것이다.

[0006]

신호-변환-단백질(SCP: Signal-Convert-Protein)로도 알려져 있는 이중 신호전달 단백질(DSP: Dual Signaling Protein)은 I형 막(membrane) 단백질의 세포외 부분(세포외 아미노-말단)을 II형 막 단백질의 세포외

부분(세포의 카르복실-말단)에 연결하여, 2개의 활성 측들로 융합 단백질을 형성하는 이-기능성(bi-functional) 융합 단백질이다(예를 들면, 미국 특허 제7,569,663호 및 제8,039,437호를 참조한다). 예를 들면, PD1-4-1BBL 및 SIRP α -4-1BBL을 포함하여, 여러 이러한 DSP들이 당업계에 개시되어 있다(예를 들면, 국제 특허 출원 공개 번호 제WO2018/127919호 및 제WO2018/127917호를 참조한다). DSP들은 이들 고유의 상응하는 리간드 또는 수용체에 결합함으로써, 이들의 구성(composition)에 따라 신호 캐스케이드(signaling cascade), 성장, 생존 및 세포 활성화에 영향을 미치는 표적화 및/또는 기능적 특성을 가질 수 있다. 따라서, 예를 들면, DSP는 한 팔(arm)이 종양 위치 또는 종양 미세환경에 대한 선택적 표적화로서 역할을 하는 반면에, 다른 팔은 면역-조절제로서 역할을 하도록 고안될 수 있다. PD1-4-1BBL 및 SIRP α -4-1BBL과 같은 DSP의 독특한 구성은 종양 위치에서 적응 면역(adaptive immunity)의 표적화된 활성화를 촉진할 수 있다. 플랫폼 기술(platform technology)은 대부분의 체크포인트 표적에 적용할 수 있으므로, 유리한 위험/이익 비를 유지하면서 잠재적으로 유효성을 개선할 수 있다.

발명의 내용

- [0007] 본 발명의 몇몇 실시양태의 한 양태에 따르면, 이량체화 모이어티를 포함하는 이중이량체가 제공되며, 상기 이량체화 모이어티는 적어도 하나의 I형 막 단백질의 천연 리간드(natural ligand) 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열 및 적어도 하나의 II형 막 단백질의 천연 리간드 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열에 부착된다.
- [0008] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 단백질성 모이어티(proteinaceous moiety)이다.
- [0009] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 이중이량체의 단량체는 공유결합으로 부착되지 않는다.
- [0010] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 항체 또는 이의 단편의 Fc 도메인이다.
- [0011] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , LAG3, BTN3A1, CD27, CD80, CD86, ENG, NLGN4X, CD84, TIGIT, CD40, IL-8, IL-10, CD164, LY6G6F, CD28, CTLA4, BTLA, LILRB1, LILRB2, TYROBP, ICOS, VEGFA, CSF1, CSF1R, VEGFB, BMP2, BMP3, GDNF, PDGFC, PDGFD, RAET1E, CD155, CD166, MICA, NRG1, HVEM, DR3, TEK, TGFB1, LY96, CD96, KIT, CD244, GFER 및 SIGLEC로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0012] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , LAG3, BTN3A1, CD27, CD80, CD86, ENG, NLGN4X, CD84, TIGIT, CD40, IL-8, IL-10, CD164, LY6G6F, CD28, CTLA4, BTLA, LILRB1, LILRB2, TYROBP, ICOS, VEGFA, CSF1, CSF1R, VEGFB, BMP2, BMP3, GDNF, PDGFC, PDGFD, RAET1E, CD155, CD166, MICA, NRG1, HVEM, DR3, TEK, TGFB1, LY96, CD96, KIT, CD244, 및 GFER로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0013] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , LAG3, TIGIT, LILRB1/2, CSF1, CSF1R 및 TGFB1로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0014] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0015] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질은 PD1 및 SIRP α 로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0016] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질은 4-1BBL, FasL, TRAIL, TNF-알파, TNF-베타, OX40L, CD40L, CD27L, CD30L, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEGI, GITRL, EDA1/2, 림프독소 알파(Lymphotoxin alpha) 및 림프독소 베타(Lymphotoxin beta)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0017] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질은 4-1BBL, OX40L, CD40L, LIGHT 및 GITRL로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0018] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질은 4-1BBL 및 CD40L로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0019] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질은 4-1BBL이다.
- [0020] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질 및 상기 II형 막 단백질 중 적어도 하나는 면역 조절제이다.

- [0021] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 이중이량체는 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열 및 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체를 포함한다.
- [0022] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 이중이량체는 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고; 상기 이중이량체는 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들 및 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 제1 단량체 및 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0024] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 제1 단량체의 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 상기 제2 단량체의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나는 동일하다.
- [0025] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 제1 단량체의 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 상기 제2 단량체의 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나는 구별된다.
- [0026] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고; 상기 이중이량체는 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 적어도 하나의 II형 막 단백질들의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0027] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 I형 막 단백질은 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 PD1의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 4-1BBL의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 상기 PD1의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0028] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 LILRB2의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 4-1BBL의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0029] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 LILRB2의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나 및 CD40L의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 적어도 2개의 아미노산 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0030] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 PD1 및 SIRP α 를 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 SIRP α 의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 PD1 및 SIRP α 를 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 SIRP α 의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 LILRB2 및 SIRP α 를

포함하고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 SIRP α 의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0033] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 LILRB2 및 SIRP α 를 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 SIRP α 의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0034] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 LILRB2 및 PD1을 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0035] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 LILRB2 및 PD1을 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0036] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 SIGLEC 및 PD1을 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 SIGLEC의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0037] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 SIGLEC 및 PD1을 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 SIGLEC의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0038] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 TIGIT 및 PD1을 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 TIGIT의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0039] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 TIGIT 및 PD1을 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 TIGIT의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0040] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 TIGIT 및 PD1을 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 TIGIT의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0041] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 적어도 2개의 I형 막 단백질들의 적어도 2개의 아미노산 서열들을 포함하고, 상기 적어도 2개의 I형 막 단백질들은 TIGIT 및 PD1을 포함하고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 TIGIT의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

[0042] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 SIGLEC는 SIGLEC10이다.

[0043] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 단백질성 이량체화 모이어티의 N-말단에 부착되고 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열은 상기 단백질성 이량체화 모이어티의 C-말단에 부착된다.

[0044] 본 발명의 몇몇 실시양태들의 한 양태에 따르면, 상기 이중이량체를 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드, 및 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소(regulatory element)를 포함하는, 핵산 작제물 또는 시스템이 제공된다.

- [0045] 본 발명의 몇몇 실시양태들의 한 양태에 따르면, 상기 이중이량체 또는 상기 핵산 작제물 또는 시스템을 포함하는, 숙주 세포가 제공된다.
- [0046] 본 발명의 몇몇 실시양태들의 한 양태에 따르면, 이중이량체를 생산하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 숙주 세포에서 이중이량체를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템을 발현시키는 단계를 포함한다.
- [0047] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 방법은 상기 이량체화 모이어티를 상기 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열 및 상기 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열에 추가하는 단계를 포함한다.
- [0048] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 방법은 상기 이중이량체를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0049] 본 발명의 몇몇 실시양태들의 한 양태에 따르면, 상기 이중이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에 상기 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하고, 이로 인해 상기 대상체에서 질병을 치료한다.
- [0050] 본 발명의 몇몇 실시양태들의 한 양태에 따르면, 면역 세포를 조절하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에 상기 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주세포를 투여하는 단계를 포함하고, 이로 인해 상기 대상체에서 질병을 치료한다.
- [0051] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 방법은 상기 질병을 치료하기 위해 상기 대상체에 치료학적 제제(therapeutic agent)를 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0052] 본 발명의 몇몇 실시양태들의 한 양태에 따르면, 이중이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는데 사용하기 위한, 이중이량체, 이를 코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 세포가 제공된다.
- [0053] 본 발명의 몇몇 실시양태들의 한 양태에 따르면, 면역 세포를 조절하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는데 사용하기 위한, 이중이량체, 이를 코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0054] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 본 명세서에 기재된 조성물은 상기 질병을 치료하기 위한 치료학적 제제를 더 포함한다.
- [0055] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 질병을 치료하기 위한 치료학적 제제는 항체를 포함한다.
- [0056] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 질병의 세포(cell of the disease)는 I형 막 단백질의 리간드 또는 수용체를 발현한다.
- [0057] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 질병의 세포는 II형 막 단백질의 리간드 또는 수용체를 발현한다.
- [0058] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 질병은 암이다.
- [0059] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 암은 림프종, 백혈병 및 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0060] 본 발명의 몇몇 실시양태의 한 양태에 따르면, 면역 세포의 활성을 조절하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포의 존재 하에서 면역 세포를 생체 외에서(in vitro) 활성화하는 단계를 포함한다.
- [0061] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 활성화하는 단계는 I형 막 단백질 또는 II형 막 단백질의 리간드 또는 수용체, 또는 I형 막 단백질 또는 II형 막 단백질의 외이성 리간드 또는 수용체를 발현하는 세포의 존재 하에서 이루어진다.
- [0062] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 조절은 활성화이다.
- [0063] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 조절은 억제이다.
- [0064] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 면역 세포는 T 세포를 포함한다.
- [0065] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및/또는 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분

야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 방법들 및 재료들이 본 발명의 실시양태들의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 예시적인 방법들 및/또는 재료들이 하기에 기술된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 특허 명세서가 우선될 것이다. 또한, 재료들, 방법들 및 예시들은 단지 예시적이며, 반드시 제한되는 것을 의도하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0066]

본 발명의 몇몇의 실시양태들은 단지 예시로서 첨부된 도면을 참조하여 본원에 기술된다. 이하 도면을 상세하게 구체적으로 참조하면, 도시된 세부사항은 예시에 의한 것이고 본 발명의 실시양태들의 예시적인 논의를 목적으로 하는 것임이 강조된다. 이와 관련하여, 도면과 함께 취해진 설명은 당업자로 하여금 본 발명의 실시양태들이 어떻게 실시될 수 있는지에 대해 명백하게 한다.

도면에 있어서:

도 1은 이중이량체의 가능한 배열/형태의 비제한적인 예시의 개략도(schematic representation)이다.

도 2는 본 명세서에서 "DSP305"(서열 번호: 79 및 81) 및 "DSP305_V1"(서열 번호: 79 및 83)으로 지칭되는 PD1-sc3x4-1BBL(4-1BBL의 세포외 도메인의 3개의 반복부) 이중이량체들의 개략도를 나타낸다.

도 3a-h는 PD1-sc3x4-1BBL 이중이량체 DSP305(서열 번호: 79 및 81) 및 DSP305_V1(서열 번호: 79 및 83)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 3a는 개략적인 3D 모델이고 도 3b는 DSP305(서열 번호: 79 및 81)의 전체 원자 3D 모델(full atomic 3D model)이다. PD1 서열들('노브(knob)' 및 '홀(hole)') 둘 모두에 대해)은 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도 3a의 가운데에 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도 3a의 가운데에 회색 리본으로 표시된다. 4-1BBL은 짙은 회색 리본 (왼쪽)으로 표시된다. '스페이스'/'링커' 분절은 PD1, hIgG4 및 4-1BBL의 구조 요소들(structural elements) 사이에 회색 및 흰색 리본으로 표시된다. (복합체를 안정화하는) hIgG4 Fc 도메인의 힌지(hinge) 시스템은 CPK 표현(CPK representation)으로 표시된다. 도 3c는 개략적인 3D 모델이고 도 3d는 리간드(PDL1 및 4-1BB)의 존재 하에서 DSP305(서열 번호: 79 및 81)의 전체 원자 3D 모델이다. 상이한 도메인들은 도 3a에서 표시된 것처럼 상이한 리본으로 표시된다. 또한, PD1에 결합된 PDL1은 회색 리본(오른쪽)으로 표시되고 3개의 4-1BB 도메인들은 4-1BBL(왼쪽)과 복합체를 이룬(in complex) 회색 리본으로 표시된다. 도 3e는 개략적인 3D 모델이고 도 3f는 DSP305_V1(서열 번호: 79 및 83)의 전체 원자 3D 모델이다. 상이한 도메인들은 도 3a에서 표시된 것처럼 상이한 리본으로 표시된다. 도 3g는 개략적인 3D 모델이고 도 3h는 리간드(PDL1 및 4-1BB)의 존재 하에서 DSP305_V1(서열 번호: 79 및 83)의 완전한 3D 모델이다. 상이한 도메인들은 도 3a에서 표시된 것처럼 상이한 리본으로 표시된다. 또한, PD1에 결합된 PDL1은 회색 리본(오른쪽)으로 표시되고 3개의 4-1BB 도메인들은 4-1BBL(왼쪽)과 복합체를 이룬(in complex) 회색 리본으로 표시된다.

도 4는 환원 및/또는 비환원 조건 하에서 분리된 DSP305 및 DSP305_V1의 SDS 폴리 아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석 사진이다. 도면에 제시된 샘플들은 미정제(정제되지 않음) 또는 단백질-A로 정제된 5일-상층액들이다. 상층액들은 표시된 이중이량체를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 Expi293F 세포들로부터 가져왔다. 대조군 상층액(control sup)은 형질주입되지 않은 Expi293F 세포들의 5일-상층액이다.

도 5는 본 명세서에서 "TSP111"(서열 번호: 85 및 81), "TSP111_V1"(서열 번호: 89 및 91) 및 "TSP111_V2"(서열 번호: 85 및 83)로 지칭되는 PD1-SIRP α-sc3x4-1BBL 이중이량체의 개략도를 나타낸다.

도 6a-d는 PD1-SIRP α-sc3x4-1BBL 이중이량체 TSP111 (서열 번호: 85 및 81)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 6a는 개략적인 3D 모델이고 도 6b는 TSP111(서열 번호: 85 및 81)의 전체 원자 3D 모델이다. PD1('노브' 사슬)은 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. SIRP α('홀' 사슬)는 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 회색 리본으로 표시된다. 4-1BBL은 짙은 회색 리본 (왼쪽)으로 표시된다. '스페이스'/'링커' 분절은 PD1, hIgG4 및 4-1BBL의 구조 요소들 사이에 회색 및 흰색 리본으로 표시된다. (복합체를 안정화하는) hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스템은 CPK 표현으로 표시된다. 도 6c는 개략적인 3D 모델이고 도 6d는 리간드(CD47, PDL1 및 4-1BB)의 존재 하에서 TSP111(서열 번호: 85 및 81)의 전체 원자 3D 모델이다. 상이한 도메인은 도 6a에서 표시된 것처럼 상이한 리본으로 표시된다. 또한, PD1에 결합된 PDL1은 회색 리본(오른쪽 하단)으로 표시되고 CD47(SIRP α 수용체)은 회색 리본(오른쪽 상단)으로 표시되며 3개의 4-1BB 수용체들은 4-1BBL과 복합체를 이룬 회색 리본(왼쪽)으로 표시된다.

도 7은 환원 및/또는 비환원 조건 하에서 분리된 TSP111, TSP111_V1 및 TSP111_V2의 SDS-PAGE 분석 사진이다. 도면에 제시된 샘플들은 미정제(정제되지 않음) 또는 단백질-A로 정제된-5일-상층액들이다. 상층액들은 표시된 이중이량체를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 Expi293F 세포들에서 가져왔다. 대조군 상층액(control supernatant)은 형질주입되지 않은 Expi293F 세포들의 5일-상층액이다.

도 8a-d는 세포 표면 상에 발현되는 리간드에 대한 PD1-sc3x4-1BBL 이중이량체 DSP305(서열 번호: 79 및 81)의 결합을 나타낸다. 도 8a는 DLD1-PDL1 세포주에서 PDL1 수용체의 발현을 나타내는 유세포 측정 분석-히스토그램을 나타낸다. PDL1의 표면 발현 수준은 항-PDL1 항체로 DLD1 WT 및 PDL1 과발현 세포주(DLD1-PDL1)를 면역-염색(immuno-staining)한 후 유세포 측정 분석에 의해 측정되었다. GMFI 값은 FACS 검출 및 FlowJo 소프트웨어 분석에 의해 측정된 대로 제시된다. 도 8b는 HT1080-4-1BB 세포주에서 4-1BB 수용체의 발현을 입증하는 유세포 측정 분석을 제시한다. 4-1BB의 표면 발현 수준은 항-4-1BB 항체로 HT1080 WT 및 4-1BB 과발현 세포주를 면역-염색한 후 유세포 측정 분석에 의해 측정하였다. GMFI 값이 제시된다. 도 8c는 DLD1 WT 및 PDL1 과발현 세포주에 대한 DSP305(서열 번호: 79 및 81)의 결합을 나타내는 유세포 측정 분석을 제시한다. 리간드 발현 세포주에 대한 이중이량체의 결합은 표시된 이중이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-4-1BBL 항체를 사용하여 이의 4-1BBL 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다. GMFI 값이 제시되고, 이는 GraphPad Prism 소프트웨어를 이용한 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다. 도 8d는 HT1080 WT 및 4-1BB 과발현 세포주에 대한 DSP305의 결합을 나타내는 유세포 측정 분석을 제시한다. 세포주에 대한 이중이량체의 결합은 표시된 이중이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-PD1 항체를 사용하여 PD1 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다. GMFI 값이 제시되고, 이는 GraphPad Prism 소프트웨어를 이용한 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다.

도 9a-d는 세포 표면 상에 발현되는 리간드에 대한, PD1-SIRP α-sc3x4-1BBL 이중이량체 TSP111의 결합을 나타낸다. 도 9a는 DLD1 WT 및 PDL1 과발현 세포주에 대한 TSP111의 결합을 나타내는 유세포 측정 분석을 제시한다. 리간드 발현 세포주에 대한 이중이량체의 결합은 표시된 이중이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-4-1BBL 항체를 사용하여 이의 4-1BBL 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다. GMFI 값이 제시되고, 이는 GraphPad Prism 소프트웨어를 이용한 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다. 도 9b는 HT1080 WT 및 4-1BB 과발현 세포주에 대한 TSP111의 결합을 나타내는 유세포 측정 분석을 나타낸다. 세포주에 대한 이중이량체 단백질의 결합은 표시된 이중이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-PD1 항체를 사용하여 PD1 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다. GMFI 값이 제시되고, 이는 GraphPad Prism 소프트웨어를 이용한 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다. 도 9c는 CHO-K1-CD47 과발현 세포주에서 CD47 수용체의 발현을 나타내는 유세포 측정 분석-히스토그램을 제시하고 CHO-K1 WT 모 세포주에서는 발현이 나타나지 않는다. CD47의 표면 발현 수준은 항-인간-CD47 항체로 CHO-K1 WT 및 CHO-K1-CD47 세포주를 면역-염색한 후에, 유세포 측정 분석에 의해 측정되었다. GMFI 값은 FACS 검출 및 FlowJo 소프트웨어 분석에 의해 측정된 대로 제시된다. 도 9d는 항-CD47 차단 Ab의 부재 또는 존재 하에서 CHO-K1 WT 및 CD47 과발현 세포주에 대한 TSP111의 결합을 나타내는 유세포 측정 분석이 제시된다. 리간드 발현 세포주에 대한 이중이량체의 결합은 표시된 이중이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-PD1 항체를 사용하여 PD1 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다. GMFI 값이 제시되고, 이는 GraphPad Prism 소프트웨어를 이용한 결합 곡선 그래프를 생성하는데 사용되었다.

도 10a-b는 적어도 2개의 리간드들에 대한 PD1-sc3x4-1BBL 이중이량체 DSP305 및 PD1-SIRP α-sc3x4-1BBL 이중이량체 TSP111의 동시적인 결합을 나타낸다. 이중이량체 또는 대조군 상층액(형질주입되지 않은 Expi293F 세포로부터 유래)을 함유하는 상층액을 PDL1 또는 CD47 사전-코팅된(pre-coated) 96웰 플레이트 또는 동일한 몰량(equal-molar quantity)의 두 단백질의 혼합물에서 배양했다. 배양한 후에, 비오틴화된 4-1BBL로 검출을 수행하였다. 도 10a는 PDL1-코팅된 플레이트에 대해 DSP305가 농도 의존적인 방식으로 결합하는 것을 나타내고, 도 10b는 TSP111이 CD47, PDL1 및 혼합 단백질-코팅된 플레이트에 독립적으로 결합하는 것을 나타낸다. 검출은 540nm에서의 기준(reference)으로, 450nm에서 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 TMB 기질로 수행된다.

도 11a-c는 이중이량체 DSP305, TSP111, TSP111_V1 및 TSP111_V2에 의한 41BB 매개 신호 전달의 활성화를 나타낸다. 도 11a-c는 DSP305를 함유하는 상층액 또는 대조군 상층액(형질주입되지 않은 세포로부터 유래)의 존재 하에서 PD1 코팅된 플레이트에서 배양된 HT1080 4-1BB 세포(도 11a), TSP111을 함유하는 상층액 또는 대조군 상층액(형질주입되지 않은 세포로부터 유래)의 존재 하에서 PD-1 또는 CD47 또는 단백질 둘 모두의 혼합물로 코팅된 플레이트에서 배양된 HT1080 4-1BB 세포(도 11b), 또는 TSP111, TSP111_V1, 또는 TSP111_V2를 함유하는 상

층액 또는 대조군 상층액(형질주입되지 않은 세포로부터 유래)의 존재 하에서 CD47로 코팅된 플레이트에서 배양된 HT1080 4-1BB 세포(도 11c)로부터의 IL-8 분비를 제시한다. IL-8 ELISA 키트, 및 540 nm에서 기준인 450 nm에서의 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 상층액을 IL-8 농도에 대해 분석하였다.

도 12a는 본 명세서에서 "TSP112"(서열 번호: 81 및 146)로 지칭되는 PD1-SIRP α -sc3xCD40L 이중이량체의 개략도이다.

도 12b-c는 PD1-SIRP α -sc3xCD40L 이중이량체 TSP112(서열 번호: 81 및 146)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 12b는 개략적인 3D 모델이고 도 12c는 TSP112(서열 번호: 81 및 146)의 전체 원자 3D 모델이다. PD1('노브' 사슬)은 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. SIRP α ('홀' 사슬)는 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 회색 리본으로 표시된다. CD40L은 짙은 회색 리본 (왼쪽)으로 표시된다. '스페이서'/'링커' 분절은 PD1, SIRP α , hIgG4 및 CD40L의 구조 요소들 사이에 회색 및 흰색 리본으로 표시된다. (복합체를 안정화하는) hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스테인 잔기는 CPK 표현으로 표시된다.

도 13a는 "TSP215"(서열 번호: 138 및 85)로 지칭되는 LILRB2-SIRP α -sc3x4-1BBL 이중이량체의 개략도이다.

도 13b-c는 LILRB2-SIRP α -sc3x4-1BBL 이중이량체 TSP215(서열번호: 138 및 85)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 13b는 개략적인 3D 모델이고 도 13c는 TSP115(서열 번호: 138 및 85)의 전체 원자 3D 모델이다. LILRB2('노브' 사슬)는 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. SIRP α ('홀' 사슬)는 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 회색 리본으로 표시된다. 4-1BBL은 짙은 회색 리본 (왼쪽)으로 표시된다. '스페이서'/'링커' 분절은 LILRB2, SIRP α , hIgG4 및 4-1BBL의 구조 요소들 사이에 회색 및 흰색 리본으로 표시된다. (복합체를 안정화하는) hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스테인 잔기는 CPK 표현으로 표시된다.

도 14a는 본 명세서에서 "TSP217"(서열 번호: 138 및 146)로 지칭되는 LILRB2-SIRP α -sc3xCD40L 이중이량체의 개략도이다.

도 14b-c는 PD1-SIRP α -sc3xCD40L 이중이량체 TSP217(서열 번호: 138 및 146)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 14b는 개략적인 3D 모델이고 도 14c는 TSP217(서열 번호: 138 및 146)의 전체 원자 3D 모델이다. LILRB2('노브' 사슬)는 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. SIRP α ('홀' 사슬)는 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 회색 리본으로 표시된다. CD40L은 짙은 회색 리본 (왼쪽)으로 표시된다. '스페이서'/'링커' 분절은 LILRB2, SIRP α , hIgG4 및 CD40L의 구조 요소들 사이에 회색 및 흰색 리본으로 표시된다. (복합체를 안정화하는) hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스테인 잔기는 CPK 표현으로 표시된다.

도 15a는 본 명세서에서 "TSP401"(서열 번호: 150 및 79)로 지칭되는 SIGLEC10-PD1-sc3x4-1BBL 이중이량체의 개략도이다.

도 15b-c는 SIGLEC10-PD1-sc3x4-1BBL 이중이량체 "TSP401"(서열 번호: 150 및 79)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 15b는 개략적인 3D 모델이고 도 15c는 TSP401(서열 번호: 150 및 79)의 전체 원자 3D 모델이다. SIGLEC10 서열('노브' 사슬)은 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. PD1('홀' 사슬)은 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 회색 리본으로 표시된다. 4-1BBL은 짙은 회색 리본 (왼쪽)으로 표시된다. '스페이서'/'링커' 분절은 SIGLEC10, PD1, hIgG4 및 4-1BBL의 구조 요소들 사이에 회색 및 흰색 리본으로 표시된다. (복합체를 안정화하는) hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스테인 잔기는 CPK 표현으로 표시된다.

도 16a는 본 명세서에서 "TSP501"(서열 번호: 152 및 79)로 지칭되는 TIGIT-PD1-sc3x4-1BBL 이중이량체의 개략도이다.

도 16b-c는 TIGIT-PD1-sc3x4-1BBL 이중이량체 "TSP501"(서열 번호: 152 및 79)의 예측된 3D 구조를 나타낸다. 도 16b는 개략적인 3D 모델이고 도 16c는 TSP501(서열 번호: 152 및 79)의 전체 원자 3D 모델이다. TIGIT 서열('노브' 사슬)은 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 하단)로 표시된다. PD1('홀' 사슬)은 짙은 회색 리본 디스플레이(오른쪽 상단)로 표시된다. '노브' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 흰색 리본으로 표시된다. '홀' 서열의 hIgG4는 도면 가운데에 회색 리본으로 표시된다. 4-1BBL은 짙은 회색 리본 (왼쪽)으로 표시된다. '스페이서'/'링커' 분절은 TIGIT, PD1, hIgG4 및 4-1BBL의 구조 요소들 사이에 회색 및 흰색 리본으로 표시된다. (복합체

를 안정화하는) hIgG4 Fc 도메인의 힌지 시스테인 잔기는 CPK 표현으로 표시된다.

도 17은 환원 또는 비환원 조건 하에서 분리된 TSP215, TSP215_V1, TSP214 및 TSP214_V1의 SDS-PAGE 분석 사진이다. 도면에 제시된 샘플들은 미정제(정제되지 않음)-5일-상층액이다. 상층액은 표시된 이종이량체를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 Expi293F 세포에서 가져왔다. 대조군 상층액(control sup)은 형질주입되지 않은 Expi293F 세포들의 5일-상층액이다.

도 18a-b는 환원(R) 또는 비환원(NR) 조건 하에서 분리된 TSP112, TSP217, DSP218, TSP221, TSP222, TSP401, TSP403, TSP501 및 TSP503의 SDS-PAGE 분석 사진을 보여준다. 도면에 제시된 샘플들은 미정제(정제되지 않음, 도 18a) 또는 단백질-A로 정제된(도 18b)-5일-상층액이다. 상층액은 표시된 이종이량체를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 Expi293F 세포에서 가져왔다. 대조군 상층액(control sup)은 형질주입되지 않은 Expi293F 세포들의 5일-상층액이다.

도 19의 A-C는 TSP111의 웨스턴 블롯 분석 사진이다. 도면에 제시된 샘플들은 미정제(정제되지 않음)-5일-상층액의 샘플이다. 상층액들은 표시된 이종이량체를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 Expi293F 세포들에서 가져왔다. 대조군 상층액(control sup)은 형질주입되지 않은 Expi293F 세포들의 5일-상층액이다. 상층액을 비환원(NR) 또는 환원(R) 조건 하에서 SDS-PAGE 상에서 분리한 다음, 항-PD1(도 19의 A), 항-SIRP α(도 19의 B) 또는 항-4-1BBL(도 19의 C) 항체로 면역블롯팅(immunoblotting)을 수행했다.

도 20의 A-C는 TSP112, TSP401, TSP501 및 TSP221의 웨스턴 블롯 분석 사진이다. 도면에 제시된 샘플들은 미정제(정제되지 않음)-5일-상층액의 샘플이다. 상층액은 표시된 이종이량체를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 Expi293F 세포에서 가져왔다. 대략 50ng의 이종이량체 단백질을 함유하는 상층액 샘플들을 비환원(NR) 또는 환원(R) 조건 하에서 SDS-PAGE 상에서 분리한 다음, 항-PD1(도 20의 A), 항-SIRP α(도 20의 B) 및 항-4-1BBL(도 20의 C) 항체로 면역블롯팅을 수행했다.

도 21의 A-C는 TSP215, TSP215_V1, TSP214, TSP214_V1, TSP217 및 DSP218의 웨스턴 블롯 분석 사진이다. 도면에 제시된 샘플들은 미정제(정제되지 않음)-5일-상층액의 샘플이다. 상층액은 표시된 이종이량체를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입된 Expi293F 세포에서 가져왔다. 대조군 상층액(control sup)은 형질주입되지 않은 Expi293F 세포들의 5일-상층액이다. 대략 50ng의 이종이량체 단백질을 함유하는 상층액 샘플들을 비환원(NR) 또는 환원(R) 조건 하에서 SDS-PAGE 상에서 분리한 다음, 항-4-1BBL(도 21의 A), 항-SIRP α(도 21의 B) 및 항-LILRB2(도 21의 C) 항체로 면역블롯팅을 수행했다.

도 22a-b는 DLD1-WT 음성 대조군 세포주와 비교하여 DLD1 PDL1 과발현 세포주의 표면 상에 발현되는 리간드 PDL1에 대한 TSP401(도 22a) 및 TSP501(도 22b) 이종이량체의 PD1 팔의 결합을 나타낸다. 결합은 표시된 이종이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-4-1BBL 항체를 사용하여 4-1BBL 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다.

도 23은 HT1080 WT 및 4-1BB 과발현 세포주에 대한 TSP401 및 TSP501의 결합을 나타낸다. 세포주에 대한 이종이량체 단백질의 결합은 이종이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-PD1 항체를 사용하여 PD1 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다.

도 24는 HT1080 과발현 4-1BB 세포주에 대한 TSP214의 결합을 나타낸다. 수용체 발현 세포주에 대한 이종이량체의 결합은 이종이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-LILRB2 항체를 사용하여 LILRB2 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다. 항-4-1BB 차단 항체와 함께 세포를 배양하는 것은 세포에 대한 TSP214의 결합을 제거(abolish)하여, 특이성을 나타냈다.

도 25는 HT1080 과발현 4-1BB 세포주에 대한 TSP215의 결합을 나타낸다. 4-1BB 및 CD47 발현 세포주에 대한 이종이량체의 결합은 이종이량체와 세포를 배양한 후 항-LILRB2 항체를 사용하여 LILRB2 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다. 특이성 시험을 위해, 결합은 항-CD47 차단 항체, 항 4-1BB 차단 항체 또는 차단 항체 둘 모두의 조합의 부재 또는 존재 하에서 결정되었다.

도 26a-b는 세포 표면 상에 발현되는 CD40에 대한 PD1-SIRP α-sc3xCD40 이종이량체 TSP112의 결합을 나타낸다. 도 26a는 HT1080-CD40 과발현 세포주에 대한 CD40 수용체의 발현을 나타내는 히스토그램이며, 항-CD40 항체를 사용한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정된다. 도 26b는 HT1080 과발현 CD40 세포에 대한 TSP112의 결합을 나타낸다. CD40 발현 세포주에 대한 이종이량체의 결합은 이종이량체와 함께 세포를 배양한 후 항-PD1 항체를 사용하여 PD1 도메인의 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다.

도 27의 A-C는 세포 표면 상에 발현되는 CD155(PVR)에 대한 PD1-TIGIT-sc3x4-1BBL 이중이량체 TSP501의 결합을 나타낸다. 도 27의 A-B는 내인성 CD155이 DLD1-WT 세포에 대해 발현하고 U937 세포에 대해서는 발현하지 않는 것을 나타내는 히스토그램을 나타내고, 항 CD155 항체를 사용한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다. 도 27의 C는 TSP501이 DLD1-WT 발현 세포에 대해 결합하고 U937 세포에 대해서는 결합하지 않는 것을 나타낸다. 결합은 이중이량체와 세포를 배양한 후 항-4-1BBL 항체를 사용하여 4-1BBL 도메인을 면역-염색한 다음, 유세포 측정 분석에 의해 결정되었다.

도 28a-c는 DSP214 및 TSP215 이중이량체의 이들 각각의 대응물에 대한 동시적인 결합을 나타낸다. 도 28a-b는 HLA-G 및 41BB에 대한 DSP214(도 28a)와 TSP215(도 28b)의 결합을 나타낸다. 도 28c는 CD47 및 41BB에 대한 DSP215의 결합을 입증한다. 이중이량체 TSP214 또는 대조군 상층액(도 28a) 또는 정제된 TSP215 이중이량체(도 28b-c)를 함유하는 상층액을 HLA-G, CD47 또는 BSA 사전-코팅된 96웰 플레이트에서 배양하였다. 결합은 41BB-비오틴과 함께 배양한 후, 620 nm에서의 기준으로, 450 nm에서 플레이트 판독기를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 스트렙타비딘-HRP(streptavidin-HRP) 및 TMB 기질에 의해 검출되었다.

도 29a-b는 이중이량체 TSP401 및 TSP501에 의한 41BB-매개 신호 전달의 활성화를 나타낸다. 도 29a는 TSP401을 함유하는 상층액의 존재 하에서 PDL1 및 CD24 코팅된 플레이트에서 배양된 HT1080 4-1BB 세포로부터의 IL8 분비를 제시한다. 도 29b는 TSP501을 함유하는 상층액의 존재 하에서 PDL1 및 CD155(PVR) 코팅된 플레이트에서 배양된 HT1080 4-1BB 세포로부터의 IL-8 분비를 나타낸다.

도 30a-b는 이중이량체 TSP112, TSP217 및 DSP218에 의한 CD40-매개 신호 전달의 활성화를 나타낸다. 도 30a는 TSP112를 함유하는 상층액의 존재 하에서 PDL1 및 CD47 코팅된 플레이트에서 배양된 HT1080 CD40 세포로부터의 IL8 분비를 제시한다. 도 30b는 TSP217 또는 DSP218을 함유하는 상층액의 존재 하에서 HLA-G 및 CD47 코팅된 플레이트에서 배양된 HT1080 CD40 세포로부터의 IL8 분비를 제시한다.

도 31은 이중이량체 TSP215에 의한 41BB-매개 신호 전달의 활성화를 나타낸다. CHO-K1-CD47은 TSP215를 함유하는 상층액의 연속 희석(serial dilutions)의 존재 하에서 HT1080-41BB 세포와 함께-배양되었다.

도 32는 본 발명의 몇몇 실시양태에서 고려되는 이중이량체의 구성 및 배열의 개략도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0067] 본 발명은, 이들의 몇몇 실시양태에서, 이중이량체 및 이의 사용방법에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명의 적어도 하나의 실시양태를 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 이의 응용에 있어서 하기 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에 제시되거나 실시예에 의해 예시된 세부사항에 반드시 한정되는 것은 아님을 이해해야 한다. 본 발명은 다른 실시양태들이 가능하거나 다양한 방식으로 실시 또는 수행될 수 있다.
- [0069] 신호-변환-단백질(SCP: Signal-Convertng-Protein)로도 알려져 있는 이중 신호전달 단백질(DSP: Dual Signaling Protein)은 I형 막 단백질의 세포외 부분(세포외 아미노-말단)을 II형 막 단백질의 세포외 부분(세포외 카르복실-말단)에 연결하여 2개의 활성 측들로 융합 단백질을 형성하는, 이-기능성(bi-functional) 융합 단백질이다.
- [0070] 본 발명을 실시하도록 전환시키는 과정에서, 본 발명자들은 I형 막 단백질의 세포외 부분 및 II형 막 단백질의 세포외 부분을 포함하는 이중이량체를 생산하였다.
- [0071] 따라서, 본 발명의 한 양태에 따르면, 이량체화 모이어티를 포함하는 이중이량체가 제공되는데, 상기 이량체화 모이어티는 적어도 하나의 I형 막 단백질의 천연 리간드 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열 및 적어도 하나의 II형 막 단백질의 천연 리간드 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열에 부착된다.
- [0072] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이중이량체(heterodimer)"는 2개의 상이한 단백질들(본 명세서에서 단량체들로 지칭됨)의 인공적인 부착에 의해 형성된 비-자연 발생 이량체 단백질(non-naturally occurring dimeric protein)을 지칭한다.
- [0073] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 단량체는 공유결합으로 부착되지 않는다.
- [0074] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 단량체는 공유결합으로 부착된다.
- [0075] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 단량체는 하나의 이황화 결합에 의해 부착된다.

- [0076] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 단량체는 이황화 결합들에 의해 부착된다.
- [0077] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이량체화 모이어티(dimerizing moiety)"는 2개의 상이한 단량체들을 부착시켜 이중이량체를 형성할 수 있는 모이어티를 지칭한다. 이러한 이량체화 모이어티들은 당업계에 공지되어 있으며 화학적 및 단백질성 모이어티를 포함한다.
- [0078] 상기 이량체화 모이어티는 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열 및 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열에 부착된다.
- [0079] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 I형 막 단백질 및/또는 II형 막 단백질의 아미노산 서열에 직접 부착된다.
- [0080] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 I형 막 단백질 및/또는 II형 막 단백질의 아미노산 서열에 비-직접적으로 부착된다.
- [0081] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 I형 막 단백질 및/또는 II형 막 단백질의 아미노산 서열에 공유결합으로 부착된다.
- [0082] 특정 실시양태들에 따르면, 이량체화 모이어티는 I형 막 단백질 및/또는 II형 막 단백질의 아미노산 서열에 비-공유결합(non-covalently)으로 부착된다.
- [0083] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 I형 막 단백질 및/또는 II형 막 단백질에 대해 이종성(heterologous)이다.
- [0084] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 적어도 2개의 상이한 분자들의 조성물(composition)이다.
- [0085] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 비단백질성 모이어티, 예를 들면, 가교 결합제(cross linker), 유기 중합체, 합성 중합체, 소분자 등이다.
- [0086] 다수의 이러한 비단백질성 모이어티가 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면, Santa Cruz, Sigma-Aldrich, Proteochem 등으로부터 상업적으로 얻을 수 있다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 비단백질성 모이어티는 이중이기능성(heterobifunctional) 가교 결합제이다. 이중이기능성 가교 결합제는 2개의 상이한 반응성 말단들을 가진다. 일반적으로, 제1 단계에서, 단량체는 이중이기능성 시약의 한 반응기로 변형되고, 나머지 유리-시약은 제거된다. 제2 단계에서, 변형된 단량체를 제2 단량체와 혼합한 다음, 상기 시약의 다른 쪽 말단에 있는 변형기(modifier group)와 반응시킨다. 가장 널리 사용되는 커플링 단백질은 아민기 및 설프히드릴기를 통해 연결된다(가장 불안정한 아민 반응성 NHS-에스테르가 먼저 커플링되고 커플링되지 않은 시약을 제거한 다음, 설프히드릴기에 대한 커플링이 진행된다). 상기 설프히드릴 반응기는 일반적으로 말레이미드, 피리딜 디설파이드 및 알파-할로아세틸(alpha-haloacetyl)이다. 다른 가교결합제는 카르복실기(-COOH)와 1차 아민(-NH₂) 사이를 연결시키는 카보디이미드(carbodiimide)를 포함한다. 또 다른 접근법은 한 단량체의 라이신 잔기를 티올(thiol)로 변형하고, 말레이미드기를 첨가하여 제2 단량체를 변형시킨 다음, 단량체들 사이에 안정한 티오에스테르 결합을 형성시켜 변형하는 것이다. 단량체들 중 하나가 천연 티올들을 갖는 경우, 이 티올기들은 다른 단량체에 부착된 말레이미드와 직접 반응할 수 있다. 비스[2-(4-아지도살리실아미도)에틸] 디설파이드(Bis[2-(4-azidosalicylamido)ethyl] disulfide; BASED)와 같은, 하나의 광반응성 말단을 가진 이중이기능성 가교결합제 또한 존재한다. 광반응성기(photoreactive group)는 반응할 특정한 기가 없을 때 사용된다 - 광반응성기가 UV 광에 노출되면 비특이적으로 반응하기 때문이다. 이러한 이중이기능성 가교결합제의 비제한적 예시는 하기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 알킨-PEG4-말레이미드, 알킨-PEG5-N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 말레이미드-PEG-숙신이미드 에스테르, 아지도-PEG4-페닐옥사디아졸 메틸술폰, LC-SMCC(숙신이미드-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트)), MPBH(4-(4-N-말레이미도페닐)부티르산 히드라지드 하이드로클로라이드 + 1/2 디옥산), PDPH(3-(2-피리미디리티오)프로피온일 히드라지드), SIAB (N-숙신이미드 (4-아이오도아세틸)아미노벤조에이트), SMPH(숙신이미드-6-(b-말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트), 설프-KMUS (N-(κ-말레이미도운데카노일옥시) 설프숙신이미드 에스테르), 설프-SIAB (설프숙신이미드 (4-아이오도아세틸)아미노벤조에이트), 3-(말레이미도)프로피온산 N- 하이드록시숙신이미드 에스테르, 메톡시카보닐설프에닐 클로라이드, 프로파길-PEG-산, 아미노-PEG-t-부틸 에스테르, BocNH-PEG5-산, BMPH (N-(β-말레이미도프로피온산) 히드라지드, 트리플루오로아세트산 염), ANB-NOS, BMPs, EMCS, GMBS, LC-SPDP, MBS, SBA, SIA, 설프-SIA, SMCC, SMPB, SMPH, SPDP, 설프-LC-SPDP, 설프-MBS, 설프-SANPAH, 설프-SMCC.
- [0087] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 단백질성 모이어티이다.

- [0088] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 2개의 상이한 친화성 상보적 태그(affinity complementary tag)에 대해 2개의 구별되는 친화성 모이어티를 갖는 친화성 쌍 폴리펩티드(affinity pairs polypeptide)의 구성원들을 포함한다. 이러한 친화성 쌍들은 당업계에 잘 알려져 있으며, 헤마글루티닌(HA), 항-HA, AviTagTM, V5, Myc, T7, FLAG, HSV, VSV-G, His, 비오틴, 아비딘, 스트렙트아비딘(streptavidin), 리자베딘(rhizavedin), 금속 친화성 태그, 렉틴 친화성 태그를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 숙련된 기술자는 어떤 태그를 선택해야 하는지 알 것이다.
- [0089] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 항체 (예를 들면, IgG, IgA, IgD 또는 IgE) 또는 이의 단편의 Fc 도메인이다.
- [0090] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 인간 IgG4의 Fc 도메인이다.
- [0091] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 인간 IgG1의 Fc 도메인이다.
- [0092] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 Fc 도메인 단량체이다.
- [0093] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 Fc 도메인 이량체이다.
- [0094] 항체의 Fc 도메인을 사용하여 이중이량체를 생산하는데 사용될 수 있는 수많은 메커니즘이 있다(예를 들면, knob-into hole(노브-인투-홀) 또는 전하 쌍(charge pairs), 이에 제한되지 않음) (예를 들면, Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010) 참고, 이의 전문은 본 명세서에 참조로 포함됨).
- [0095] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 Fc 도메인은 보존적(conservative) 또는 비보존적(non-conservative) 아미노산 치환(본 명세서에서 돌연변이로도 지칭됨)을 포함할 수 있다.
- [0096] 서열 동일성의 백분율이 단백질과 관련하여 사용되는 경우, 동일하지 않은 잔기 위치들은 보존적 아미노산 치환에 의해 흔히 상이한 것으로 인식되고, 이때, 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 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 위한 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 통상적으로, 이는 보존적 치환을 완전 불일치(full mismatch)가 아닌 부분적인 것으로 점수평가(scoring)하는 것을 포함하여, 서열 동일성 백분율을 증가시킨다. 따라서, 예를 들면, 동일한 아미노산에 1의 점수가 주어지고 비보존적 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. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992, 89(22): 10915-9]에 따라 계산된다.
- [0097] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 본원 이하에서 더 제공된다.
- [0098] Fc 도메인에서의 이러한 치환은 당업계에 공지되어 있다.
- [0099] 본 발명의 특정 실시양태와 함께 사용될 수 있는 대표적인 예시는 "노브-인투-홀"("KIH") 형태이다. 이러한 노브 및 홀 돌연변이는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들면, 미국 특허 번호 제US8216805호, Shane Atwell et al. J. Mol. Biol. (1997) 270, 26-35; Cater et al. (Protein Engineering vol.9 no.7 pp.617-621, 1996); 및 A. Margaret Merchant et.al. Nature Biotechnology(1998) 16 July에 개시되어 있으며, 이들의 전문은 참조로 본 명세서에 포함된다. 또한, Merchant et al., Nature Biotech. 16:677 (1998)에 기술된 것과 같이, "노브 및 홀" 돌연변이들은 이황화 결합(disulfide bonds)과 결합되어 형태가 왜곡되고 이중이량체화(heterodimerization)된다("knobs and hole" mutations can be combined with disulfide bonds to skew formation to heterodimerization).
- [0100] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 단량체들 중 하나는 노브 돌연변이(들)를 포함하는 Fc 도메인을 포함하고 다른 단량체는 홀 돌연변이(들)를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.
- [0101] 특정 면역글로불린 클래스 및 서브클래스로부터 특이적인 면역글로불린 Fc 도메인을 선택하고 노브 돌연변이를 위한 제1 Fc 변이체를 선택하고 홀 돌연변이를 위한 다른 하나를 선택하는 것은 당업자의 범위 내에 있다. 특정 실시양태와 함께 사용될 수 있는 치환의 비제한적 예시는 서열 번호: 109, 110 또는 111에 제시된 인간 IgG4 아미노산 서열에 상응하는 S228P, L235E, T366W, Y349C, T366S, L368A, Y407V 및/또는 E356C(EU 넘버링(Kabat, E.A., T.T. Wu, M. Reid-Miller, H.M. Perry and K.S. Gottesman. 1987. Sequences of proteins of

Immunological Interest. US. Dept. of Health and Human Services, Bethesda)에 따름), 또는 서열 번호: 12, 13 또는 14에 제시된 인간 IgG1 아미노산 서열에 상응하는 L234A, L235A, Y349C, T366W, T354C, D356C, T366S, L368A 및/또는 Y407V(EU 넘버링(Kabat, E.A., T.T. Wu, M. Reid-Miller, H.M. Perry and K.S. Gottesman, 1987. Sequences of proteins of Immunological Interest. US. Dept. of Health and Human Services, Bethesda)에 따름)를 포함한다.

- [0102] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 Fc 도메인은 서열 번호: 109-114로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0103] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 단량체는 노브 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0104] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 단량체는 홀 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0105] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 단량체는 노브 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0106] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 단량체는 홀 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0107] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 단량체는 노브 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0108] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 단량체는 홀 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0109] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티는 류신 지퍼(leucine zipper) 또는 나선-루프-나선(helix-loop-helix)을 포함한다.
- [0110] 몇몇 실시양태의 이중이량체는 적어도 하나의 I형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열 및 적어도 하나의 II형 막 단백질의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 이중이량체의 가능한 배열의 비제한적 예시는 도 1에 개략적으로 나타난다.
- [0111] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체 배열은 도 1의 1 내지 13에 나타난 배열들로부터 선택되고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0112] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체에 포함된 각각의 단량체는 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및/또는 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0113] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체에 포함된 각각의 단량체는 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0114] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 I형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0115] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체를 포함한다.
- [0116] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 I형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0117] 단량체 둘 모두가 I형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 경우, I형 막 단백질 아미노산 서열은 동일하거나, 동일한 I형 막 단백질이지만 상이한 서열이거나, 상이한 I형 막 단백질일 수 있다.
- [0118] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 I형 막 단백질의 아미노산 서열은 상기 제2 단량체의 I형 막 단백질의 아미노산 서열과 동일하다.
- [0119] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 I형 막 단백질의 아미노산 서열은 상기 제2 단량체의 I형 막 단백질의 아미노산 서열과 구별된다(즉, 상이하다).
- [0120] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 I형 막 단백질은 상기 제2 단량체의 I형 막 단백질과 구별된다

(즉, 상이하다).

- [0121] 단량체 둘 모두 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 경우, II형 막 단백질 아미노산 서열은 동일하거나, 동일한 II형 막 단백질이지만 상이한 서열이거나, 상이한 II형 막 단백질일 수 있다.
- [0122] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 II형 막 단백질의 아미노산 서열은 상기 제2 단량체의 II형 막 단백질의 아미노산 서열과 동일하다.
- [0123] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 II형 막 단백질의 아미노산 서열은 상기 제2 단량체의 II형 막 단백질의 아미노산 서열과 구별된다(즉, 상이하다).
- [0124] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 II형 막 단백질은 상기 제2 단량체의 II형 막 단백질과 구별된다(즉, 상이하다).
- [0125] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티가 단백질성 모이어티인 경우, 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열은 단백질성 이량체화 모이어티의 N-말단에 부착되고 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열은 단백질성 이량체화 모이어티의 C-말단에 부착된다.
- [0126] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티가 단백질성 모이어티인 경우, 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열은 단백질성 이량체화 모이어티의 C-말단에 부착되고 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열은 단백질성 이량체화 모이어티의 N-말단에 부착된다.
- [0127] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티가 단백질성 이량체 모이어티인 경우 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열 둘 모두는 단백질성 이량체 이량체화 모이어티의 C-말단 또는 N-말단에 부착된다.
- [0128] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티가 단백질성 이량체 모이어티인 경우, 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열 둘 모두는 단백질성 이량체 이량체화 모이어티의 C-말단에 부착된다.
- [0129] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이량체화 모이어티가 단백질성 이량체 모이어티인 경우, 상기 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 상기 II형 막 단백질의 아미노산 서열 둘 모두는 단백질성 이량체 이량체화 모이어티의 N-말단에 부착된다.
- [0130] 본 명세서에서 사용되는 어구 "I형 막 단백질의 아미노산 서열"은 I형 막 단백질의 천연 리간드 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 I형 막 단백질의 인접한 아미노산 서열을 지칭한다.
- [0131] 특정 실시양태들에 따르면, 이러한 아미노산 서열은 I형 막 단백질의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0132] 본 명세서에서 사용되는 어구 "I형 막 단백질"은 N-말단 세포외 도메인을 갖는 막관통 단백질을 지칭한다.
- [0133] 이러한 I형 막 단백질의 비제한적인 예시는 PD1, SIRP α , LAG3, BTN3A1, CD27, CD80, CD86, ENG, NLGN4X, CD84, TIGIT, CD40, IL-8, IL-10, CD164, LY6G6F, CD28, CTLA4, BTLA, LILRB1, LILRB2, TYROBP, ICOS, VEGFA, CSF1, CSF1R, VEGFB, BMP2, BMP3, GDNF, PDGFC, PDGFD, RAET1E, CD155, CD166, MICA, NRG1, HVEM, DR3, TEK, TGFB1, LY96, CD96, KIT, CD244 GFER 및 SIGLEC을 포함한다.
- [0134] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , LAG3, BTN3A1, CD27, CD80, CD86, ENG, NLGN4X, CD84, TIGIT, CD40, IL-8, IL-10, CD164, LY6G6F, CD28, CTLA4, BTLA, LILRB1, LILRB2, TYROBP, ICOS, VEGFA, CSF1, CSF1R, VEGFB, BMP2, BMP3, GDNF, PDGFC, PDGFD, RAET1E, CD155, CD166, MICA, NRG1, HVEM, DR3, TEK, TGFB1, LY96, CD96, KIT, CD244, 및 GFER로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0135] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , LAG3, TIGIT, LILRB1, LILRB2, CSF1, CSF1R 및 TGFB1로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0136] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 PD1, SIRP α , TIGIT, LILRB2 및 SIGLEC로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0137] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 면역 조절제이다.
- [0138] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역 조절제"는 면역 세포 반응(즉, 활성화 또는 기능)을 조절하는 단백질을 지

칭한다. 면역 조절제는 면역 세포 활성화 또는 기능을 양성적으로 조절하거나 면역 세포 활성화 또는 기능을 음성적으로 조절할 수 있다. 이러한 면역 조절제는 당업계에 공지되어 있으며 면역 체크 포인트 단백질, 시토카인 등을 포함한다.

- [0139] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 조절제는 면역 활성화제이다.
- [0140] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 조절제는 면역 저해제 또는 억제제이다.
- [0141] I형 막 단백질 면역 조절제의 비제한적 예시는 PD1, SIRP α , CD28, CSF1R, IL-8, IL-10, CTLA4, ICOS, CD27, CD80, CD86, SIGLEC10 및 TIGIT를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 단일 I형 막 단백질을 포함한다.
- [0142] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 적어도 하나의 I형 막 단백질을 포함한다.
- [0143] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 적어도 2개의 I형 막 단백질을 포함한다.
- [0144] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체 구성 및 배열은 도 32에 개략적으로 나타난 이중이량체들로부터 선택되고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0145] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 PD1 및 SIRP α 로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0146] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 PD1이다.
- [0147] 본 명세서에서 사용되는 용어 "PD1(Programmed Death 1, CD279로도 알려짐)"은 *PDCD1* 유전자(유전자 ID 5133)의 폴리펩티드 또는 이의 기능성 동족체(homolog), 예를 들면, 기능성 단편을 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 용어 "PD1"은 PD1 폴리펩티드의 기능성 동족체를 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1은 인간 PD1이다. 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 PD1 단백질은, 예를 들면, 하기 GenBank 번호 NP_005009에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0148] 현재까지 PD-1에 대한 2개의 리간드들, PDL1 및 PDL2(B7-DC로서도 알려짐)가 확인되었다. 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 PDL1 단백질은, 예를 들면, 하기 GenBank 번호 NP_001254635 및 NP_054862에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다. 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 PDL2 단백질은, 예를 들면, 하기 GenBank 번호 NP_079515에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0149] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 1을 포함한다.
- [0150] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 1로 이루어진다.
- [0151] 본 명세서에서 사용되는 어구 "PDCD1 유전자의 폴리펩티드의 기능성 동족체" 또는 "PDCD1 유전자의 폴리펩티드의 기능성 단편"은, PD-L1 및/또는 PD-L2에 결합하는 전장 PD1의 활성을 적어도 유지하는, 상기 폴리펩티드의 일부, 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/제조합적으로 생산됨) 및/또는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 PD1 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0152] 결합(binding)을 시험하기 위한 분석은 당업계에 잘 알려져 있고, 유세포 측정법, 비아코어(BiaCore), 생물층 간섭계(bio-layer interferometry) 블리츠®(Blitz®) 분석, HPLC를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0153] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1은 SPR 분석에 의해 측정시 1nM - 100 μ M, 10nM - 10 μ M, 100nM - 100 μ M, 200nM - 10 μ M의 Kd로 PD-L1에 결합하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0154] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1은 SPR 분석에 의해 측정시 약 270nM의 Kd로 PDL1에 결합한다.
- [0155] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1은 SPR 분석에 의해 측정시 약 8 내지 9 μ M의 Kd로 PDL1에 결합한다.
- [0156] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1은 상기 PD1의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0157] 특정 실시양태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 5, 6 또는 7을 포함한다.
- [0158] 특정 실시양태들에 따르면, PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 5, 6 또는 7로 이루어진다.
- [0159] 용어 "PD1"은 또한 원하는 활성(즉, PD-L1 및/또는 PD-L2와의 결합)을 나타내는 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/제조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은, 예를 들면, 서열번호 1, 5, 6, 또는 7과 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%, 적

어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 또는 상동성을 갖거나; 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(본원 이하에서 추가로 기술된 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%의 동일성을 갖는다.

- [0160] 본 명세서에서 사용되는, "동일성" 또는 "서열 동일성"은 전반적인 동일성(global identity), 즉, 본 명세서에 개시된 아미노산 또는 핵산 서열의 일부가 아닌 이의 전체에 걸친 동일성을 지칭한다.
- [0161] 서열 동일성 또는 상동성은 Blast, ClustalW 및 MISCLE과 같은 임의의 단백질 또는 핵산 서열 정렬 알고리즘(algorithm)을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0162] 상기 동족체는 또한 본원 이하에서 추가로 기술되는 바와 같이, 오솔로그(ortholog), 결실, 삽입, 또는 아미노산 치환을 포함하는 치환 변이체를 지칭할 수 있다.
- [0163] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 폴리펩티드는 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 당업계에 알려져 있으며 예를 들면, 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 Zack KM et al. Structure. 2015 23(12): 2341-2348 (DOI:10.1016/j.str.2015.09.010)에 개시되어 있고, 이들 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0164] 특정 실시양태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 하기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 위치한다: 서열 번호: 6에 제시된 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 A107. 특정 실시양태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 하기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 위치한다: 서열 번호: 6에 제시된 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 A107.
- [0165] 특정 실시양태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 변화는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 서열 번호: 6에 제시된 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 A107V.
- [0166] 특정 실시양태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 변화는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 서열 번호: 6에 제시된 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 A107V.
- [0167] 특정 실시양태들에 따르면, 아미노산 돌연변이는 서열 번호: 1에 제시된 PD1 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 잔기 C93에 위치한다(예를 들면, 서열 번호: 6에 제시된 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 잔기 C68과 동등함).
- [0168] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 제시된 PD1 아미노산 서열의 아미노산 잔기 93에 상응하는 위치에서 C에서 S로의 아미노산 변형을 포함할 수 있다(예를 들면, 서열 번호: 6에 제시된 PD1 아미노산 서열의 아미노산 잔기 68과 동등함)

- [0169] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 3을 포함한다.
- [0170] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 3으로 이루어진다.
- [0171] 본 명세서에서 사용되는 어구 "서열 번호: 1에 제시된 PD1 아미노산 서열에 상응하는", "서열 번호: 1에 상응하는", "서열 번호: 6에 제시된 PD1 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "서열 번호: 6에 상응하는"은 임의의 다른 PD1 아미노산 서열에 대해 상응하는 아미노산 잔기를 포함하도록 의도된다.
- [0172] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 본원 상기 및 하기에 더 제공된다.
- [0173] 본 발명의 몇몇 실시양태의 PD1은 폴리펩티드 서열 번호: 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 또는 45와 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 동일성 또는 상동성을 갖거나, 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 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 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0174] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 7에 상응하는 아미노산 분절 P1 - L5 및/또는 F146 - V150 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0175] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 7에 상응하는 아미노산 잔기 P1 - L5 및/또는 F146 - V150 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0176] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 100 - 288 아미노산, 100-200 아미노산, 120-180 아미노산, 120-160 아미노산, 130-170 아미노산, 130-160 아미노산, 130-150 아미노산, 140-160 아미노산, 145-155 아미노산, 123-166 아미노산, 138-145 아미노산, 123-148 아미노산, 126-148 아미노산, 123-140 아미노산, 126-140 아미노산, 127-140 아미노산, 130-140 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0177] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 및 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0178] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 및 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0179] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 13 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0180] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열은 서열 번호: 13 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0181] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 인코딩하는 PD1 핵산 서열은 서열 번호: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 또는 46과 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 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0182] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 인코딩하는 상기 PD1 핵산 서열은 서열 번호: 14 또는 8과 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.
- [0183] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 인코딩하는 PD1 핵산 서열은 서열 번호: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46로 이루어진 군으로부터 선택되는

핵산 서열을 포함한다.

- [0184] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 인코딩하는 PD1 핵산 서열은 서열 번호: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열로 이루어진다.
- [0185] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 인코딩하는 PD1 핵산 서열은 서열 번호: 14 또는 8을 포함한다.
- [0186] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PD1 아미노산 서열을 인코딩하는 PD1 핵산 서열은 서열 번호: 14 또는 8로 이루어진다.
- [0187] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 SIRP α 이다.
- [0188] 본 명세서에서 사용되는 용어 "SIRPa(신호 조절 단백질 알파, CD172a로도 알려짐)"은 SIRPA 유전자(유전자 ID 140885)의 폴리펩티드 또는 이의 기능성 동족체(homolog), 예를 들면, 이의 기능성 단백을 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 용어 "SIRPa"는 SIRPa 폴리펩티드의 기능성 동족체를 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, SIRPa는 인간 SIRPa이다. 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 SIRPa 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001035111, NP_001035112, NP_001317657 또는 NP_542970에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0189] 특정 실시양태들에 따르면, SIRPa 아미노산 서열은 서열 번호: 69를 포함한다.
- [0190] 특정 실시양태들에 따르면, SIRPa 아미노산 서열은 서열 번호: 69로 이루어진다.
- [0191] 본 명세서에서 사용되는 어구 "SIRPA 유전자의 폴리펩티드의 기능성 동족체" 또는 "SIRP1 유전자의 폴리펩티드의 기능성 단백질"은 CD47에 결합하는 전장 SIRP α 의 활성을 적어도 유지하는, 상기 폴리펩티드의 일부, 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨) 및 /또는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 SIRP α 폴리펩티드를 지칭한다. 결합을 시험하기 위한 분석은 당업계에 익히 알려져 있고, 본원 상기 및 하기에 추가로 기술된다.
- [0192] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD47 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001768 또는 NP_942088에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0193] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRPa는 SPR에 의해 측정시 0.1 - 100 μ M, 0.1 - 10 μ M, 1-10 μ M, 0.1-5 μ M, 또는 1-2 μ M의 Kd로 CD47에 결합하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0194] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRPa는 상기 SIRPa의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단백을 포함한다.
- [0195] 특정 실시양태들에 따르면, SIRPa 아미노산 서열은 서열 번호: 71을 포함한다.
- [0196] 특정 실시양태들에 따르면, SIRPa 아미노산 서열은 서열 번호: 71로 이루어진다.
- [0197] 용어 "SIRPa"는 또한 원하는 활성(즉, CD47와의 결합)을 나타내는 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은, 예를 들면, 서열 번호: 69 또는 71과 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 동일성 또는 상동성을 갖거나; 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(본원 이하에서 추가로 기술되는 바와 같음)과 적어도 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.
- [0198] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRPa 폴리펩타이드는 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들면 Weiskopf K et al. Science. (2013); 341(6141):88-91에 개시되어 있고, 이의 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0199] 특정 실시양태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 하기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 위치한다: 서열 번호: 71에 제시된 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는 L4, V6, A21, A27, I31, E47, K53, E54, H56, V63, L66, K68, V92 및 F96.
- [0200] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRPa 아미노산 서열은 서열 번호: 71에 제시되는 SIRPa 아미노산 서열에 상응

하는 L4, A27, E47 및 V92로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함한다.

- [0201] 특정 실시양태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 서열 번호: 71에 제시된 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는 L4V 또는 L4I, V6I 또는 V6L, A21V, A27I 또는 A27L, I31F 또는 I31T, E47V 또는 E47L, K53R, E54Q, H56P 또는 H56R, V63I, L66T 또는 L66G, K68R, V92I 및 F94L 또는 F94V.
- [0202] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열은 서열 번호: 71에 제시되는 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는 L4I, A27I, E47V 및 V92I로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이를 포함한다.
- [0203] 본 명세서에 사용된 것과 같이, 어구 "서열 번호: 71에 제시되는 SIRP α 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "서열 번호: 71에 상응하는"은 임의의 다른 SIRP α 아미노산 서열에 대해 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 의도한다.
- [0204] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열은 서열 번호: 75를 포함한다.
- [0205] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열은 서열 번호: 75로 이루어진다.
- [0206] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 본원 상기 및 하기에 더 제공된다.
- [0207] 본 발명의 몇몇 실시양태들의 SIRP 아미노산 서열은 폴리펩티드 서열 번호: 71, 73, 75 또는 77과 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 동일성 또는 상동성을 갖거나; 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 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 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0208] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열은 서열 번호: 71에 상응하는 아미노산 분절 K117 - Y343을 포함하지 않는다.
- [0209] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열은 서열 번호: 71에 상응하는 아미노산 잔기 K117 - Y343 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0210] 특정 실시양태들에 따르면, SIRP α 아미노산 서열은 100-504 아미노산, 100-500 아미노산, 150-450 아미노산, 200-400 아미노산, 250-400 아미노산, 300-400 아미노산, 320-420 아미노산, 340-350 아미노산, 300-400 아미노산, 340-450 아미노산, 100-200 아미노산, 100 - 150 아미노산, 100 - 125 아미노산, 100 - 120 아미노산, 100 - 119 아미노산, 105 - 119 아미노산, 110 - 119 아미노산, 115 - 119 아미노산, 105 - 118 아미노산, 110 - 118 아미노산, 115 - 118 아미노산, 105 - 117 아미노산, 110 - 117 아미노산, 115 - 117 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0211] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열은 서열 번호: 71, 73, 75 및 77로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0212] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열은 서열 번호: 71을 포함한다.
- [0213] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열은 서열 번호: 71로 이루어진다.
- [0214] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 72, 74, 76 또는 78과 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 실시양태를 나타낸다.
- [0215] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호 72와 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 개

별적 실시양태를 나타낸다.

- [0216] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 72를 포함한다.
- [0217] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIRP α 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 72로 이루어진다.
- [0218] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 TIGIT이다.
- [0219] 본 명세서에서 사용되는 용어 "TIGIT(Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체)"는 TIGIT 유전자(유전자 ID 201633)의 폴리펩티드 또는 이의 기능성 동족체, 예를 들면, 이의 기능성 단편을 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 용어 "TIGIT"은 TIGIT 폴리펩티드의 기능성 동족체를 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT는 인간 TIGIT이다. 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 TIGIT 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_776160 또는 XP_024309156에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0220] 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 서열 번호: 160을 포함한다.
- [0221] 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 서열 번호: 160으로 이루어진다.
- [0222] 본 명세서에서 사용되는 어구 "TIGIT 유전자의 폴리펩티드의 기능성 동족체" 또는 "TIGIT 유전자의 폴리펩티드의 기능성 단편"은 CD155 (PVR)에 결합하는 전장 TIGIT의 활성을 적어도 유지하는, 상기 폴리펩티드의 일부, 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/제조합적으로 생산됨) 및 /또는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 TIGIT 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0223] 결합을 시험하기 위한 분석은 당업계에 익히 공지되어 있고, 본원 상기 및 하기에 추가로 기술된다.
- [0224] 특정 실시양태들에 따르면, CD155 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001129240, NP_001129241, NP_001129242, NP_006496에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0225] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 TIGIT은 SPR에 의해 측정시, 0.01 - 100 μ M, 0.1 - 100 μ M, 0.1-10 μ M 또는 0.1-5 μ M의 Kd로 CD155에 결합하며, 각각의 기능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0226] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 TIGIT은 상기 TIGIT의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0227] 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 서열 번호: 164를 포함한다.
- [0228] 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 서열 번호: 164로 이루어진다.
- [0229] 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 서열 번호: 130을 포함한다.
- [0230] 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 서열 번호: 130으로 이루어진다.
- [0231] 용어 "TIGIT"은 또한 원하는 활성(즉, CD155와의 결합)을 나타내는 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/제조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은, 예를 들면, 폴리펩티드 서열 번호: 160, 164 또는 130과 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 동일성 또는 상동성을 갖거나, 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(본원 이하에서 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%의 동일성을 갖는다.
- [0232] 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT 폴리펩티드는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0233] 특정 실시양태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 하기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 위치한다: 서열 번호: 160에 제시된 TIGIT 아미노산 서열에 상응하는 I42 및 C69.
- [0234] 특정 실시양태들에 따르면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 서열 번호: 160에 제시된 TIGIT 아미노산 서열에 상응하는 I42A 및 C69S.
- [0235] 본 명세서에서 사용되는 어구 "서열 번호: 160에 제시된 TIGIT 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "서열 번호: 160에 상응하는"은 임의의 다른 TIGIT 아미노산 서열에 대해 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을

의도한다.

- [0236] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 TIGIT 아미노산 서열은 서열 번호: 132를 포함한다.
- [0237] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 TIGIT 아미노산 서열은 서열번호: 132로 이루어진다.
- [0238] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 본원 상기 및 하기에 더 제공된다.
- [0239] 특정 실시양태들에 따르면, TIGIT 아미노산 서열은 100-244 아미노산, 100-200 아미노산, 100 - 150 아미노산, 120 - 140 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0240] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 TIGIT 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호 131 또는 133과 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.
- [0241] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 TIGIT 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 133을 포함한다.
- [0242] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 TIGIT 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 133으로 이루어진다.
- [0243] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2이다.
- [0244] 본 명세서에서 사용되는 용어 "LILRB2(백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 구성원 2)"는 LILRB2 유전자(유전자 ID 10288)의 폴리펩티드 또는 이의 기능성 동족체, 예를 들면, 이의 기능성 단편을 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 용어 "LILRB2"는 LILRB2 폴리펩티드의 기능성 동족체를 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2는 인간 LILRB2이다. 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 SIRPa 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001074447, NP_001265332, NP_001265333, NP_001265334, NP_001265335에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0245] 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2 아미노산 서열은 서열 번호: 161을 포함한다.
- [0246] 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2 아미노산 서열은 서열 번호: 161로 이루어진다.
- [0247] 본 명세서에서 사용되는 어구 "LILRB2 유전자의 폴리펩티드의 기능성 동족체" 또는 "LILRB2 유전자의 폴리펩티드의 기능성 단편"은 주요 조직적합성 분자(MHC, 예를 들면, HLA-G)에 결합하는 전장 LILRB2의 활성을 적어도 유지하는, 상기 폴리펩티드의 일부, 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨) 및 /또는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 LILRB2 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0248] 결합을 시험하기 위한 분석은 당업계에 익히 공지되어 있고, 본원 상기 및 하기에 추가로 기술된다.
- [0249] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 LILRB2은 SPR 분석에 의해 측정시 0.1 nM - 100 μM, 0.1 nM - 10 μM, 1 nM - 1 μM, 1 - 100 nM, 또는 1-10 nM의 Kd로 MHC(예를 들면, HLA-G)에 결합하고, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0250] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 LILRB2은 상기 LILRB2의 세포의 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0251] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 LILRB2 아미노산 서열은 서열 번호: 165를 포함한다.
- [0252] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 LILRB2 아미노산 서열은 서열 번호: 165로 이루어진다.
- [0253] LILRB2의 세포의 도메인은 D1 - D4로 알려진 4개의 Ig-유사 도메인들을 포함한다.
- [0254] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2의 아미노산 서열은 적어도 하나의 Ig-유사 도메인을 포함한다.
- [0255] 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2의 아미노산 서열은 적어도 2개의 Ig-유사 도메인들, 적어도 3개의 Ig-유사 도메인들 또는 4개의 Ig-유사 도메인들을 포함한다.
- [0256] 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2의 아미노산 서열은 LILRB2의 도메인 D1 및 D2를 포함하거나; LILRB2의 도메인 D1, D2 및 D3, LILRB2의 도메인 D1, D2 및 D4를 포함하거나; LILRB2의 도메인 D1, D2, D3 및 D4를 포함한다.
- [0257] 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2 아미노산 서열은 서열 번호: 115 또는 117을 포함한다.

- [0258] 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2 아미노산 서열은 서열 번호: 115 또는 117로 이루어진다.
- [0259] 용어 "SIRPa"은 또한 원하는 활성(즉, MHC, 예를 들면, HLA-G에의 결합)을 나타내는 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은, 예를 들면, 폴리펩티드 서열 번호: 161, 165, 115 또는 117과 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 또는 상동성을 갖거나; 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(본원 이하에서 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%의 동일성을 갖는다.
- [0260] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 LILRB2 폴리펩티드는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0261] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 본원 상기 및 이하에서 더 제공된다.
- [0262] 특정 실시양태들에 따르면, LILRB2 아미노산 서열은 100-597 아미노산, 100-500 아미노산, 100 - 400 아미노산, 150 - 400 아미노산, 300 - 400 아미노산, 350 - 400 아미노산, 150-250 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0263] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 LILRB2 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 116 또는 118과 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.
- [0264] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 LILRB2 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 116을 포함한다.
- [0265] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 LILRB2 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 118로 이루어진다.
- [0266] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 SIGLEC이다.
- [0267] 본 명세서에서 사용되는 용어 "SIGLEC(시알산-결합 면역글로불린-유형 렉틴)"은 SIGLEC 유전자 또는 이의 기능성 동족체, 예를 들면, 이의 기능성 단편에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 용어 "SIGLEC"은 SIGLEC 폴리펩티드의 기능성 동족체를 지칭한다.
- [0268] 본 명세서에서 사용되는 용어 "SIGLEC 유전자의 폴리펩티드의 기능성 동족체" 또는 "SIGLEC 유전자의 폴리펩티드의 기능성 단편"은 시알산, 보다 구체적으로는 시알산-함유 탄수화물 (시알로글리칸)에 결합하는 전장 SIGLEC의 활성을 적어도 유지하는, 상기 폴리펩티드의 일부, 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨) 및 /또는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 SIGLEC 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0269] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC은 상기 SIGLEC의 세포의 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0270] SIGLEC의 세포의 도메인은 Ig-유사 도메인을 포함한다.
- [0271] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC의 아미노산 서열은 적어도 하나의 Ig-유사 도메인을 포함한다.
- [0272] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC은 인간 SIGLEC이다.
- [0273] SIGLEC의 비제한적인 예시는 SIGLEC-1, SIGLEC-2, SIGLEC-3, SIGLEC-4, SIGLEC-5, SIGLEC-6, SIGLEC-7, SIGLEC-8, SIGLEC-9, SIGLEC-10, SIGLEC-11, SIGLEC-12, SIGLEC-13, SIGLEC-14, SIGLEC-15, SIGLEC-16, SIGLEC-17을 포함한다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC는 SIGLEC-2, SIGLEC-3, SIGLEC-4, SIGLEC-7, SIGLEC-9, SIGLEC-10, SIGLEC-12 및 SIGLEC-15로 이루어진 군에서 선택되며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0274] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC은 SIGLEC-10이다.
- [0275] 본 명세서에서 사용되는 용어 "SIGLEC-10(시알산-결합 Ig-유사 렉틴 10)"은 SIGLEC10 유전자(유전자 ID 89790)의 폴리펩티드 또는 이의 기능성 동족체, 예를 들면, 이의 기능성 단편을 지칭한다. 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 SIGLEC10 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001164627, NP_001164628, NP_001164629, NP_001164630,

NP_001164632에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.

- [0276] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC10 아미노산 서열은 서열 번호: 162를 포함한다.
- [0277] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC10 아미노산 서열은 서열 번호: 162로 이루어진다.
- [0278] 본 명세서에서 사용되는 어구 "SIGLEC10 유전자의 폴리펩티드의 기능성 동족체" 또는 "SIGLEC10 유전자의 폴리펩티드의 기능성 단편"은 CD24 및/또는 CD52 상에 발현되는 시알산에 결합하는 전장 SIGLEC-10의 활성을 적어도 유지하는, 상기 폴리펩티드의 일부, 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨) 및/또는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 SIGLEC-10 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0279] 결합을 시험하기 위한 분석은 당업계에 익히 공지되어 있고, 본원 상기 및 하기에 추가로 기술된다.
- [0280] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC10은 SPR에 의해 측정시 1nM - 100 μ M, 0.01 - 100 μ M, 0.01 - 10 μ M, 0.1-10 μ M, 0.1-5 μ M, 또는 0.1-1 μ M의 Kd로 CD24 또는 CD52에 결합하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0281] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC-10은 상기 SIGLEC-10의 세포의 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0282] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC-10의 아미노산 서열은 적어도 하나의 Ig-유사 도메인을 포함한다.
- [0283] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC-10의 아미노산 서열은 적어도 2개의 Ig-유사 도메인들을 포함한다.
- [0284] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC-10 아미노산 서열은 서열 번호: 129를 포함한다.
- [0285] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC-10 아미노산 서열은 서열 번호: 125를 포함한다.
- [0286] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC-10 아미노산 서열은 서열 번호: 125로 이루어진다.
- [0287] 용어 "SIGLEC-10"은 또한 원하는 활성(즉, CD24 및/또는 CD52에의 결합)을 나타내는 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은, 예를 들면, 폴리펩티드 서열 번호: 162, 129 또는 125와 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 동일성 또는 상동성을 갖거나; 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 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%의 동일성을 갖는다.
- [0288] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC-10 폴리펩티드는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0289] 특정 실시양태들에 따르면, 하나의 돌연변이는 서열 번호: 162에 제시된 SIGLEC-10 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 잔기 C36에 위치한다.
- [0290] 특정 실시양태들에 따르면, 하나의 아미노산 돌연변이는 서열 번호: 162에 제시된 SIGLEC-10 아미노산 서열에 상응하는 C36S이다.
- [0291] 본 명세서에 사용되는 어구 "서열 번호: 162에 제시된 SIGLEC-10 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "서열 번호: 162에 상응하는"은 임의의 다른 SIGLEC-10 아미노산 서열에 대해 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 의도한다.
- [0292] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC-10 아미노산 서열은 서열 번호: 127을 포함한다.
- [0293] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC-10 아미노산 서열은 서열 번호: 127로 이루어진다.
- [0294] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 본원 상기 및 하기에 더 제공된다.
- [0295] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC-10 아미노산 서열은 100-639 아미노산, 100-600 아미노산, 100-550 아미노산, 100-300 아미노산, 100-200 아미노산, 100-150 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.

- [0296] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 SIGLEC-10 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호 126 또는 128과 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.
- [0297] 특정 실시 양태들에 따르면, SIGLEC-10 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 128을 포함한다.
- [0298] 특정 실시양태들에 따르면, SIGLEC-10 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 128로 이루어진다.
- [0299] 본 명세서에서 사용되는 어구 "II형 막 단백질의 아미노산 서열"은 II형 막 단백질의 천연 리간드 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있는 II형 막 단백질의 인접 아미노산 서열을 지칭한다.
- [0300] 특정 실시양태들에 따르면, 이러한 아미노산 서열은 II형 막 단백질의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0301] 본 명세서에서 사용되는 어구 "II형 막 단백질"은 C-말단 세포외 도메인을 갖는 막관통 단백질을 지칭한다.
- [0302] 이러한 II형 막 단백질의 비제한적 예시는 4-1BBL, FasL, TRAIL, TNF-알파, TNF-베타, OX40L, CD40L, CD27L, CD30L, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEGI, GITRL, EDA1/2, 림프독소 알파 및 림프독소 베타를 포함한다.
- [0303] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL, OX40L, CD40L, LIGHT 및 GITRL로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0304] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질은 면역 조절제이다.
- [0305] 이러한 면역 조절제는 4-1BBL, TNF-알파, TNF-베타, OX40L, CD40L, CD27L 및 CD30L을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0306] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질은 단일 II형 막 단백질을 포함한다.
- [0307] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질은 적어도 하나의 II형 막 단백질을 포함한다.
- [0308] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질은 적어도 2개의 II형 막 단백질들을 포함한다.
- [0309] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이다.
- [0310] 본 명세서에서 사용되는 용어 "4-1BBL(CD137L 및 TNFSF9로도 알려짐)"은 TNFSF9 유전자(유전자 ID 8744)의 폴리펩티드 또는 이의 기능성 동족체, 예를 들면, 이의 기능성 단편을 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 용어 "4-1BBL"은 4-1BBL 폴리펩티드의 기능성 동족체를 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 4-1BBL은 인간 4-1BBL이다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_003802에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0311] 특정 실시양태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 47을 포함한다.
- [0312] 특정 실시양태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 47로 이루어진다.
- [0313] 본 명세서에서 사용되는 어구 "TNFSF9 유전자의 폴리펩티드의 기능성 동족체" 또는 "TNFSF9 유전자의 폴리펩티드의 기능성 단편"은 전장 4-1BBL의 활성들, 예를 들면, (i) 4-1BB 결합, (ii) 4-1BB 신호 전달 경로의 활성화, (iii) 4-1BB를 발현하는 면역 세포의 활성화, (iv) 동종삼량체(homotrimer)의 형성 중 적어도 하나를 유지하는, 폴리펩티드의 일부, 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/제조합적으로 생산됨) 및 /또는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 4-1BBL 폴리펩티드를 포함한다.
- [0314] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 기능성 4-1BBL 동족체 또는 단편은 적어도 (i)을 할 수 있다.
- [0315] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 기능성 4-1BBL 동족체 또는 단편은 (i)+(ii), (i)+(iii), (i)+(iv), (i)+(ii)+(iii), (i)+(ii)+(iv), (i)+(iii)+(iv), (ii)+(iii)+(iv) 또는 (i)+(ii)+(iii)+(iv)을 할 수 있다.
- [0316] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BB 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001552에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0317] 결합을 시험하기 위한 분석은 당업계에 익히 공지되어 있고, 본원 상기 및 하기에 추가로 기술된다.

- [0318] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL은 SPR 분석에 의해 측정시 약 0.1 - 1000 nM, 0.1 - 100 nM, 1-100 nM, 또는 55.2 nM의 Kd로 4-1BB에 결합하며, 각각의 가능성은 청구된 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0319] 삼량체화(trimerization)를 측정하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고, NATIVE-PAGE, SEC-HPLC 2D 겔, 겔 여과, SEC-MALS, 분석적 초원심분리(AUC), 질량 분광분석법(MS), 모세관 겔 전기영동(CGE)을 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다.
- [0320] 본 명세서에서 사용되는 용어 "활성화하는(activating)" 또는 "활성화(activation)"는 세포 증식, 성숙, 시토카인 생산, 식세포작용(phagocytosis) 및/또는 조절 또는 이펙터(effector) 기능의 유도를 초래하는 면역 세포(예를 들면, T 세포, B 세포, NK 세포, 식세포작용 세포(phagocytic cell))를 자극하는 과정을 지칭한다.
- [0321] 특정 실시양태들에 따르면, 활성화는 공동-자극(co-stimulating)을 포함한다.
- [0322] 본 명세서에서 사용되는 용어 "공동-자극하는" 또는 "공동-자극"은 면역 세포의 활성화를 초래하는, 2차 항원 독립적 자극 신호(예를 들면, 4-1BB 신호)를 전송하는 것을 지칭한다.
- [0323] 특정 실시양태들에 따르면, 활성화는 면역 세포의 활성화를 초래하는, 억제 신호(예를 들면, PDL1 신호)를 억제하는 것을 포함한다.
- [0324] 자극 또는 억제 신호의 신호전달을 측정하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고, 또한 하기 실시예 섹션에 개시되어 있으며, 예를 들면, 비아코어, HPLC 또는 유세포 측정법을 이용한 결합 분석, 키나아제(kinase) 활성 분석과 같은 효소 활성 분석, 및 예를 들면 PCR, 웨스턴 블롯, 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역조직화학(immunohistochemistry)을 이용한 신호전달 캐스케이드(cascade)와 관련된 분자의 발현이 포함하나, 이들에 제한되지 않는다. 추가적으로 또는 대안적으로, 신호(공동-자극 또는 억제) 전송의 결정은 면역 세포 활성 또는 기능을 평가함으로써 수행될 수 있다. 면역 세포 활성화 또는 기능의 평가 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고, CFSE 염색, MTS, 알라마르 블루(Alamar blue), BRDU 및 티미딘 이입(thymidine incorporation)과 같은 증식 분석, CFSE 염색, 크로뮴 방출, 칼신(Calcin) AM과 같은 세포 독성 분석, 세포내 시토카인 염색, ELISPOT 및 ELISA와 같은 시토카인 분비 분석, 유세포 측정법을 이용한 CD25, CD69, CD137, CD107a, PD1 및 CD62L과 같은 활성 마커의 발현을 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다.
- [0325] 특정 실시양태들에 따르면, 신호전달 활성 또는 활성화의 결정은 본원 하기에 추가로 기술되는 바와 같이, 예를 들면 혼합 림프구 반응(MLR: mixed lymphocyte reaction)에서 생체 외에서(in-vitro) 또는 생체 밖에서(ex-vivo) 수행된다.
- [0326] 동일한 배양 조건에 대해, 신호전달 활성 또는 면역 세포 활성화 또는 기능은, 일반적으로 이중양량체, 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 인코딩하는 숙주 세포와 접촉하지 않거나; 또는 대조군으로도 지칭되는 비히클(vehicle) 대조군과 접촉한 동일한 종의 세포에서의 신호전달, 활성화 또는 기능과 비교하여 표현된다.
- [0327] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL은 상기 4-1BBL의 세포의 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0328] 특정 실시양태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 49를 포함한다.
- [0329] 특정 실시양태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 49로 이루어진다.
- [0330] 용어 "4-1BBL"은 또한 원하는 활성(본원 상기에 정의된 바와 같음)을 나타내는 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/제조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은, 예를 들면, 폴리펩티드 서열 번호: 47 또는 49와 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 동일성 또는 상동성을 갖거나; 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(본원 이하에서 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%의 동일성을 갖는다.
- [0331] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 폴리펩티드는 본원 상기 및 하기에 추가로 기술되는 바와 같이 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0332] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 49에 상응하는 아미노산 분절 A1 - V6, A1

- G14 또는 A1-E23을 포함하지 않는다.

- [0333] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 49에 상응하는 아미노산 잔기 A1 - V6, A1 - G14 또는 A1-E23 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0334] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 49에 상응하는 아미노산 분절 G198 - E205를 포함하지 않는다.
- [0335] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 49에 상응하는 아미노산 잔기 G198 - E205 중 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0336] 본 명세서에서 사용되는 어구 "서열 번호: 49에 상응하는"은 임의의 다른 4-1BBL 아미노산 서열에 대해 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 의도한다.
- [0337] 특정 실시양태들에 따르면, 4-1BBL 아미노산 서열은 100-254 아미노산, 150-250 아미노산, 100-250 아미노산, 150-220 아미노산, 180-220 아미노산, 180 - 210 아미노산, 185 - 205 아미노산, 185 - 200 아미노산, 185 - 199 아미노산, 170 - 197 아미노산, 170 - 182 아미노산, 190-210 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0338] 본 발명의 몇몇 실시양태의 4-1BBL은 폴리펩티드 서열 번호: 49, 51, 53, 558, 57, 59, 61, 63 또는 65와 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 동일성 또는 상동성을 갖거나; 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 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 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0339] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 및 65로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0340] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 및 65로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0341] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 및 66과 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 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0342] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 및 66로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0343] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 및 66로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열로 이루어진다.
- [0344] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이다.
- [0345] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CD40L(CD154로도 알려짐)"은 CD40LG 유전자(유전자 ID 959)의 폴리펩티드 또는 이의 기능성 동족체, 예를 들면, 이의 기능성 단편을 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 용어 "CD40L"은 CD40L 폴리펩티드의 기능성 동족체를 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, CD40L은 인간 CD40L이다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_000065에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0346] 특정 실시양태들에 따르면, CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 163을 포함한다.
- [0347] 특정 실시양태들에 따르면, CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 163으로 이루어진다.
- [0348] 본 명세서에서 사용되는 어구 "CD40LG 유전자의 폴리펩티드의 기능성 동족체" 또는 "CD40LG 유전자의 폴리펩티드의 기능성 단편"은 전장 CD40L의 활성들, 예를 들면, (i) CD40에 결합, (ii) CD40 신호전달 경로 활성화,

(iii) 면역 세포 활성화 CD40 발현, (iv) 동종삼량체 형성 중 적어도 하나를 유지하는, 폴리펩티드의 일부, 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨) 및/또는 보존적 및 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 CD40L 폴리펩티드를 지칭한다.

- [0349] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 기능성 CD40L 동족체 또는 단편은 적어도 (i)을 할 수 있다.
- [0350] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 기능성 CD40L 동족체 또는 단편은 (i)+(ii), (i)+(iii), (i)+(iv), (i)+(ii)+(iii), (i)+(ii)+(iv), (i)+(iii)+(iv), (ii)+(iii)+(iv) 또는 (i)+(ii)+(iii)+(iv)을 할 수 있다.
- [0351] 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 CD40 단백질은 하기 GenBank 번호 NP_001241, NP_001289682, NP_001309350, NP_001309351, NP_690593에 제공되는 바와 같은, 인간 단백질을 지칭한다.
- [0352] 결합, 삼량체화, 활성화, 공동-자극 및 신호전달을 시험하기 위한 분석은 당업계에 익히 공지되어 있으며, 본원 상기 및 하기에 추가로 기술되어 있다.
- [0353] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L은 SPR 분석에 의해 측정시 약 0.1 - 1000 nM, 0.1 - 100 nM, 1-100 nM, 또는 1 - 5 nM의 Kd로 CD40에 결합하며, 각각의 가능성은 청구된 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0354] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L은 상기 CD40L의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0355] 특정 실시양태들에 따르면, CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 122를 포함한다.
- [0356] 특정 실시양태들에 따르면, CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 122로 이루어진다.
- [0357] 특정 실시양태들에 따르면, CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 123을 포함한다.
- [0358] 특정 실시양태들에 따르면, CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 123으로 이루어진다.
- [0359] 용어 "CD40L"은 또한 원하는 활성(본원 상기에 정의된 바와 같음)을 나타내는 기능성 동족체(자연 발생되거나 합성적으로/재조합적으로 생산됨)를 포함한다. 이러한 동족체들은, 예를 들면, 폴리펩티드 서열 번호: 163, 122 또는 123과 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 동일성 또는 상동성을 갖거나; 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(본원 이하에서 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%의 동일성을 갖는다.
- [0360] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 폴리펩티드는 본원 상기 및 하기에 추가로 기술되는 바와 같이 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0361] 특정 실시양태들에 따르면, 하나의 돌연변이는 서열 번호: 163에 제시된 CD40L 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 잔기 C194에 위치한다.
- [0362] 특정 실시양태들에 따르면, 하나의 돌연변이는 서열 번호: 163에 제시된 CD40L 아미노산 서열에 상응하는 C194S이다.
- [0363] 본 명세서에 사용되는 어구 "서열 번호: 163에 제시된 CD40L 아미노산 서열에 상응하는" 또는 "서열 번호: 163에 상응하는"은 임의의 다른 CD40L 아미노산 서열에 대해 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것을 의도한다.
- [0364] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 119를 포함한다.
- [0365] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 119로 이루어진다.
- [0366] 보존적 아미노산 및 비보존적 아미노산 치환에 대한 추가적인 설명은 본원 상기 및 하기에 더 제공된다.
- [0367] 특정 실시양태들에 따르면, CD40L 아미노산 서열은 100-261 아미노산, 100-220 아미노산, 100-200 아미노산, 120-160 아미노산을 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0368] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 120 또는 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%, 적

어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.

- [0369] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 120을 포함한다.
- [0370] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 120으로 이루어진다.
- [0371] 특정 실시양태들에 따르면, 본 명세서에 개시된 이중이량체에 포함된 II형 막 단백질의 아미노산 서열은 II형 막 단백질(예를 들면, 4-1BBL, CD40L) 아미노산 서열의 3개의 반복부를 포함한다.
- [0372] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 3개의 반복부 각각은 II형 막 단백질의 천연 리간드 또는 수용체에 적어도 결합할 수 있다.
- [0373] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 3개의 반복부는 동일한 II형 막 단백질(예를 들면, 4-1BBL, CD40L) 아미노산 서열을 갖는다.
- [0374] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 3개의 반복부는 구별되며, 즉 상이한 II형 막 단백질(예를 들면, 4-1BBL, CD40L) 아미노산 서열들을 갖는다.
- [0375] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 3개의 반복부 중 2개는 동일한 II형 막 단백질(예를 들면, 4-1BBL, CD40L) 아미노산 서열을 갖는다.
- [0376] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질 아미노산 서열은 상기 II형 막 단백질 아미노산 서열의 상기 3개의 반복부 각각 사이에 링커를 포함하지 않는다.
- [0377] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 II형 막 단백질 아미노산 서열은 상기 II형 막 단백질 아미노산 서열의 상기 3개의 반복부 각각 사이에 링커를 포함한다. 당업계에 공지되어 있는 임의의 링커는 본 발명의 특정 실시양태들과 함께 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 링커들의 비제한적 예시는 본원 이하에 상세하게 기술된다.
- [0378] 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 링커는 (GGGS)_x2+GGGG(서열 번호: 96) 링커이다.
- [0379] 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 링커는 GGGSGGGG(서열 번호: 97) 링커이다.
- [0380] 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 링커는 GGGGS_x3(서열 번호: 134) 링커이다.
- [0381] 따라서, 예를 들면, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체에 포함된 4-1BBL 아미노산 서열은 4-1BBL 아미노산 서열의 3개의 반복부를 포함한다.
- [0382] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 3개의 반복부 각각은 하기 중 적어도 하나를 할 수 있다: (i) 4-1BB에 결합함; (ii) 4-1BB 신호전달 경로를 활성화함; (iii) 4-1BB를 발현하는 면역 세포를 활성화함, (iv) 동종삼량체를 형성함.
- [0383] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 반복된 서열은 본 명세서에 정의된 상기 4-1BBL 중 어느 하나일 수 있다.
- [0384] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 반복부 중 적어도 하나는 본 명세서에 개시된 4-1BBL 아미노산 서열을 포함한다.
- [0385] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 반복부 중 적어도 하나는 본 명세서에 개시된 4-1BBL 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0386] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 51을 포함하는 아미노산 서열의 3개의 반복부를 포함한다.
- [0387] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 51로 이루어진 아미노산 서열의 3개의 반복부를 포함한다.
- [0388] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 67과 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.
- [0389] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 67을 포함한다.

- [0390] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열은 서열 번호: 67로 이루어진다.
- [0391] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 68과 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.
- [0392] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열 번호: 68을 포함한다.
- [0393] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 4-1BBL 핵산 서열은 서열 번호: 68로 이루어진다.
- [0394] 또 다른 예시로서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이종이량체에 포함된 CD40L 아미노산 서열은 CD40L 아미노산 서열의 3개의 반복부를 포함한다.
- [0395] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 3개의 반복부 각각은 하기 중 적어도 하나를 할 수 있다: (i) CD40에 결합함; (ii) CD40 신호전달 경로를 활성화함; (iii) CD40을 발현하는 면역 세포를 활성화함, (iv) 동종삼량체를 형성함.
- [0396] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 반복된 서열은 본 명세서에 정의된 상기 CD40L 중 어느 하나일 수 있다.
- [0397] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 반복부 중 적어도 하나는 본 명세서에 개시된 CD40L 아미노산 서열을 포함한다.
- [0398] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 반복부 중 적어도 하나는 본 명세서에 개시된 CD40L 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0399] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 119를 포함하는 아미노산 서열의 3개의 반복부를 포함한다.
- [0400] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 119로 이루어진 아미노산 서열의 3개의 반복부를 포함한다.
- [0401] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 121과 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.
- [0402] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 121을 포함한다.
- [0403] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열은 서열 번호: 121로 이루어진다.
- [0404] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호: 166과 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.
- [0405] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 핵산 서열은 서열 번호: 166을 포함한다.
- [0406] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 CD40L 핵산 서열은 서열 번호: 166으로 이루어진다.
- [0407] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 PD1이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이종이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0408] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 PD1의 아미노산 및 상기 제2 단량체의 PD1의 아미노산은 동일하다.
- [0409] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 PD1의 아미노산 및 상기 제2 단량체의 PD1의 아미노산은 구별된다(즉, 상이하다).
- [0410] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이종이량체는 서열 번호: 79 및 81; 또는 서열 번호: 79 및 83과 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.

- [0411] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 81; 또는 서열 번호: 79 및 83을 포함한다.
- [0412] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 81; 또는 서열 번호: 79 및 83으로 이루어진다.
- [0413] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2이고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 LILRB2의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0414] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 LILRB2의 아미노산 및 상기 제2 단량체의 LILRB2의 아미노산은 동일하다.
- [0415] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제1 단량체의 LILRB2의 아미노산 및 상기 제2 단량체의 LILRB2의 아미노산은 구별된다(즉, 상이하다).
- [0416] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 142 및 138; 또는 서열 번호: 144 및 140과 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.
- [0417] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 142 및 138; 또는 서열 번호: 144 및 140을 포함한다.
- [0418] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 142 및 138; 또는 서열 번호: 144 및 140으로 이루어진다.
- [0419] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2이고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 LILRB2의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0420] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 148 및 138과 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.
- [0421] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 148 및 138을 포함한다.
- [0422] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 148 및 138로 이루어진다.
- [0423] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 PD1 및 SIRP α 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 SIRP α 의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0424] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 85 및 81; 서열 번호: 89 및 91; 또는 서열 번호: 85 및 83과 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.
- [0425] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 85 및 81; 서열 번호: 89 및 91; 또는 서열 번호: 85 및 83을 포함한다.
- [0426] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 85 및 81; 서열 번호: 89 및 91; 또는 서열 번호: 85 및 83으로 이루어진다.
- [0427] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 PD1 및 SIRP α 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 SIRP α 의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.

- [0428] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 146 및 81과 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.
- [0429] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 146 및 81을 포함한다.
- [0430] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 146 및 81로 이루어진다.
- [0431] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2 및 SIRP α 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 SIRP α 의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0432] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 85 및 138; 또는 서열 번호: 85 및 140과 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.
- [0433] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 85 및 138; 또는 서열 번호: 85 및 140을 포함한다.
- [0434] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 85 및 138; 또는 서열 번호: 85 및 140으로 이루어진다.
- [0435] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2 및 SIRP α 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 SIRP α 의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0436] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 146 및 138과 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.
- [0437] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 146 및 138을 포함한다.
- [0438] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 146 및 138로 이루어진다.
- [0439] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0440] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 138과 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.
- [0441] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 138을 포함한다.
- [0442] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 138로 이루어진다.
- [0443] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 LILRB2 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 LILRB2의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0444] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 138과 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.
- [0445] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 138을 포함한다.
- [0446] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 138로 이루어진다.

- [0447] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 SIGLEC 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 SIGLEC의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0448] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 150과 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.
- [0449] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 150을 포함한다.
- [0450] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 150으로 이루어진다.
- [0451] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 SIGLEC 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 SIGLEC의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0452] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 150과 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.
- [0453] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 150을 포함한다.
- [0454] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 150으로 이루어진다.
- [0455] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 TIGIT 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 TIGIT의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0456] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 152와 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.
- [0457] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 152를 포함한다.
- [0458] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 79 및 152로 이루어진다.
- [0459] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 TIGIT 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 PD1의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 TIGIT의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0460] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 152와 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.
- [0461] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 152를 포함한다.
- [0462] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 154 및 152로 이루어진다.
- [0463] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 TIGIT 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 4-1BBL이며, 상기 이중이량체는 TIGIT의 아미노산 서열 및 4-1BBL의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0464] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 156 및 81과 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.

- [0465] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 156 및 81을 포함한다.
- [0466] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 156 및 81로 이루어진다.
- [0467] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 I형 막 단백질은 TIGIT 및 PD1로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 II형 막 단백질은 CD40L이며, 상기 이중이량체는 TIGIT의 아미노산 서열 및 CD40L의 아미노산 서열을 포함하는 제1 단량체 및 PD1의 아미노산 서열을 포함하는 제2 단량체를 포함한다.
- [0468] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 158 및 81과 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.
- [0469] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 158 및 81을 포함한다.
- [0470] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 서열 번호: 158 및 81로 이루어진다.
- [0471] 특정 실시양태들에 따르면, 본 명세서에 개시된 이중이량체는 가용성이다(즉, 합성 또는 자연 발생 표면에 고정되지 않음).
- [0472] 특정 실시양태들에 따르면, 본 명세서에 개시된 이중이량체는 합성 또는 자연 발생 표면에 고정된다.
- [0473] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체에 포함된 모이어티 각각은, 모이어티들 사이를 분리하는 링커, 예를 들면, I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 이량체화 모이어티 사이를 분리하는 링커, I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 이량체화 모이어티 사이를 분리하는 링커, II형 막 단백질 아미노산 서열의 3개의 반복부 사이를 분리하는 링커를 포함할 수 있다.
- [0474] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 이량체화 모이어티 사이에 링커를 포함하지 않는다.
- [0475] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체는 II형 막 단백질의 아미노산 서열 및 이량체화 모이어티 사이에 링커를 포함하지 않는다.
- [0476] 당업계에 공지되어 있는 임의의 링커는 본 발명의 특정 실시양태들과 함께 사용될 수 있다.
- [0477] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 자연-발생 다중-도메인 단백질로부터 유도될 수 있거나, 실험적 링커(empirical linker)일 수 있으며, 예를 들면, Chichili et al., (2013), Protein Sci. 22(2): 153-167, Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369에 기재된 바와 같고, 이들 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다. 몇몇의 실시양태들에서, 상기 링커는 Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369 및 Crasto et al., (2000), Protein Eng. 13(5):309-312에 기재된 바와 같은 링커 고안 데이터베이스 및 컴퓨터 프로그램을 이용하여 고안될 수 있으며, 이들 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0478] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 PEG와 같은 합성 링커이다.
- [0479] 특정 실시양태들에 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. 또 다른 예시에서, 상기 링커는 상기 PD1-4-1BBL 융합 단백질을 특정 세포 유형 또는 위치로 표적화하는 기능을 할 수 있다.
- [0480] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 폴리펩티드이다.
- [0481] 폴리펩티드 링커의 비제한적 예시는 서열 LE, GGGGS(서열 번호: 99), (GGGGS)_n(n=1-4)(서열 번호: 98), GGGSGGGG(서열 번호: 97), (GGGGS)_{x2}(서열 번호: 100), (GGGGS)_{x2}+GGGG(서열 번호: 96), (GGGGS)_{x3}(서열 번호: 134), (GGGGS)_{x4}(서열 번호: 135), (Gly)₈(서열 번호: 136), (Gly)₆(서열 번호: 137), (EAAAK)_n (n=1-3)(서열 번호: 101), A(EAAAK)_nA (n = 2-5) (서열 번호: 102), AEA AAKEAAAKA(서열 번호: 103), A(EAAAK)₄LEA(EAAAK)₄A (서열 번호: 104), PAPAP(서열 번호: 105), K ESGSVSS EQ LAQ FRS LD(서열 번호: 106), EGKSSGSGSESKST(서열 번호: 107), GSAGSAAGSGEF(서열 번호: 108) 및 (XP)_n(X는 지정된 임의의 아미노산, 예를 들면, Ala, Lys 또는 Glu임)를 갖는 링커를 포함한다.

- [0482] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 GGGGS(서열 번호: 99), (GGGGS)_n (n=1-4)(서열 번호: 98), GGGSGGGG(서열 번호: 97), (GGGGS)x2(서열 번호: 100), (GGGGS)x2+GGGG(서열 번호: 96), (GGGGS)x2(서열 번호: 100), (GGGGS)x3(서열 번호: 134) 및 (GGGGS)x4(서열 번호: 135)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0483] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 GGGGS(서열 번호: 99), (GGGGS)_n (n=1-4)(서열 번호: 98), GGGSGGGG(서열 번호: 97), (GGGGS)x2(서열 번호: 100), (GGGGS)x2+GGGG(서열 번호: 96)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0484] 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 링커는 (GGGGS)x2+GGGG(서열 번호: 96)이다.
- [0485] 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 링커는 (GGGGS)x2(서열 번호: 100)이다.
- [0486] 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 링커는 (GGGGS)x3(서열 번호: 134)이다.
- [0487] 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 링커는 (GGGGS)x4(서열 번호: 135)이다.
- [0488] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 1 내지 6개의 아미노산 길이이다.
- [0489] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 실질적으로 글리신 및/또는 세린 잔기로 구성된다(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).
- [0490] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 단일 아미노산 링커이다.
- [0491] 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 상기 단일 아미노산은 글리신이다.
- [0492] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 링커는 항체 또는 이의 단편의 Fc 도메인 또는 힌지 부위(hinge region)가 아니다.
- [0493] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 생산 수율은 I형 막 단백질 및 II형 막 단백질의 동일한 아미노산 서열들을 포함하는 동종이량체의 생산 수율 또는 상기 동일한 아미노산 서열들을 포함하는 분리된 단량체들의 생산 수율보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높다.
- [0494] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 응집체의 양은 I형 막 단백질 및 II형 막 단백질의 동일한 아미노산 서열들을 포함하는 동종이량체의 응집체의 양 또는 이를 포함하는 분리된 단량체들의 응집체의 양보다 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 더 작았다.
- [0495] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 안정성은 I형 막 단백질 및 II형 막 단백질의 동일한 아미노산 서열들을 포함하는 동종이량체의 안정성 또는 이를 포함하는 분리된 단량체들의 안정성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높다.
- [0496] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 활성은 I형 막 단백질 및 II형 막 단백질의 동일한 아미노산 서열들을 포함하는 동종이량체의 활성 또는 이를 포함하는 분리된 단량체들의 활성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높다.
- [0497] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 이중이량체의 안전성은 I형 막 단백질 및 II형 막 단백질의 동일한 아미노산 서열들을 포함하는 동종이량체의 안전성 또는 이를 포함하는 분리된 단량체들의 안전성보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 5배 더 높다.
- [0498] 본 발명의 몇몇 실시양태의 이중이량체는 면역 조절제인 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및/또는 II형 막 단백질의 아미노산 서열을 포함하기 때문에, 상기 이중이량체는 면역 세포를 생체 외에서, 생체 밖에서 및/또는 생체 내에서 조절하는 방법에 사용될 수 있다.
- [0499] 따라서, 본 발명의 한 양태에 따르면, 면역 세포의 활성을 조절하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주의 존재 하에서 면역 세포를 생체 외에서 활성화하는 단계를 포함한다.
- [0500] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 조절은 억제이다.
- [0501] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 조절은 활성화이다.

- [0502] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 상기 I형 막 단백질 또는 상기 II형 막 단백질(예를 들면, 4-1BB)의 리간드 또는 수용체를 발현한다.
- [0503] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 말초 단핵구 혈액 세포(peripheral mononuclear blood cell; PBMC)를 포함한다.
- [0504] 본 명세서에서 사용되는 용어 "말초 단핵 혈액 세포(PBMC)"는 단일 핵을 갖는 혈액 세포를 지칭하며, 림프구, 단핵구 및 수지상 세포(dendritic cell; DC)를 포함한다.
- [0505] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PBMC는 수지상 세포(DC), T 세포, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0506] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 PBMC는 T 세포, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포를 포함한다.
- [0507] PBMC를 얻는 방법은, 대상체로부터의 전혈을 채취하고 항-응고제(예를 들면, 헤파린 또는 시트레이트)를 함유하는 용기(container)에 수집하는 것; 및 성분채집술(apheresis)과 같이 당업계에 익히 공지되어 있다. 이어서, 특정 실시양태들에 따르면, PBMC들 중 적어도 하나의 유형은 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), 화학적 용해, 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 Magnetix) 또는 밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec.)으로부터 상업적으로 입수가능한 예를 들면, FACS 분류기 또는 마그네틱 세포 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 세포 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 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들면, THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D.N. Weir, editor) 및 FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A.Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000)에 기재되어 있다.
- [0508] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 종양 침윤 림프구를 포함한다.
- [0509] 본 명세서에서 사용되는 용어 "종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)"는 혈류를 떠나 종양으로 이동한 단핵 백혈구 세포를 지칭한다.
- [0510] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 TIL은 T 세포, B 세포, NK 세포 및 단핵구로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0511] TIL을 얻는 방법은 예를 들면, 생검(biopsy) 또는 부검(necropsy)에 의해 대상체로부터 종양 샘플을 얻고 이의 단일 세포 현탁액을 제조하는 것과 같이 당업계에 익히 공지되어 있다. 상기 단일 세포 현탁액은 임의의 적합한 방식으로 얻을 수 있으며, 예를 들면, 기계적으로(예를 들면, GentleMACS™ 분해기(Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.)를 사용하여 종양을 분해함) 또는 효소적으로(예를 들면, 콜라게나제 또는 DNase) 얻을 수 있다. 이어서, TIL들 중 적어도 하나의 유형은 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, 인비트로젠, 스템셀 테크놀로지스, 셀프로, 어드밴스트 마그네틱스 또는 밀테니 바이오테크로부터 상업적으로 입수가능한 예를 들면, FACS 분류기 또는 마그네틱 세포 분리 기술을 이용함], 및 특이적 항체로의 근절(예를 들면, 사멸)과 같은 방법에 의한 또는 음성 선택(예를 들면, 마그네틱 세포 분리 기술, FACS 분류기 및/또는 포획 ELISA 라벨링을 이용함)에 기초한 친화성 기반 정제에 의한 특이적 세포 유형의 고갈이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 방법들은 예를 들면, THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D.N. Weir, editor) 및 FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A.Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000)에 기재되어 있다.
- [0512] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 식세포작용 세포를 포함한다.
- [0513] 본원에서 사용되는 용어 "식세포작용 세포"는 식세포작용을 할 수 있는 세포를 지칭하며, 전문 및 비-전문 식세포작용 세포 둘 모두를 포함한다. 식세포작용을 분석하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고, 예를 들면 사멸 분석(killing assays), 유세포 측정법 및/또는 현미경 평가(생세포 이미징(live cell imaging), 형광 현미경(fluorescence microscopy), 공초점 현미경(confocal microscopy), 전자 현미경(electron microscopy))을 포함

한다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 식세포작용 세포는 단핵구, 수지상 세포(DC) 및 과립구(granulocyte)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0514] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 식세포작용 세포(phagocyte)는 과립구를 포함한다.
- [0515] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 식세포작용 세포는 단핵구를 포함한다.
- [0516] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 단핵구를 포함한다.
- [0517] 특정 실시양태들에 따르면, 용어 "단핵구"는 순환하는 단핵구 및 조직에 존재하는 대식세포(단핵 식세포로도 지칭됨) 둘 모두를 지칭한다.
- [0518] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 단핵구는 대식세포를 포함한다. 통상적으로, 대식 세포의 세포 표면 표현형(phenotype)은 CD14, CD40, CD11b, CD64, F4/80(마우스)/EMR1(인간), 라이소자임(lysozyme) M, MAC-1/MAC-3 및 CD68을 포함한다.
- [0519] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 단핵구는 순환하는 단핵구를 포함한다. 통상적으로, 순환하는 단핵구의 세포 표면 표현형은 CD14 및 CD16(예를 들면, CD14++ CD16-, CD14+CD16++, CD14++CD16+)을 포함한다.
- [0520] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 DC를 포함한다.
- [0521] 본 명세서에서 사용되는 용어 "수지상 세포(DC)"는 림프 또는 비-림프 조직에서 발견되는 형태학적으로 유사한 세포 유형의 다양한 집단의 임의의 구성원을 지칭한다. DC는 전문적인 항원 제시 세포(antigen presenting cell)의 한 클래스(class)이고, HLA-제한된 T 세포를 감작하는 높은 능력을 갖는다. DC는 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 세포를 포함한다. 수지상 세포는 기능에 의해 또는 표현형, 특히 세포 표면 표현형에 의해 인식될 수 있다. 이 세포들은 세포 표면 상에 베일(veil)-유사 돌출부를 갖는 이들의 독특한 형태, 중간 내지 높은 수준의 표면 HLA-클래스 II 발현, 및 T 세포, 특히 나이브(naive) T 세포에 항원을 제시하는 능력을 특징으로 한다(Steinman R, et al., Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:271-196. 참조). 통상적으로, DC의 세포 표면 표현형은 CD1a+, CD4+, CD86+ 또는 HLA-DR을 포함한다. 용어 DC는 미성숙 및 성숙 DC 둘 모두를 포함한다.
- [0522] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 과립구를 포함한다.
- [0523] 본 명세서에 사용되는 용어 "과립구"는 이의 세포질에서 과립의 존재를 특징으로 하는 다형핵 백혈구를 지칭한다.
- [0524] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 과립구는 호중구(neutrophil)를 포함한다.
- [0525] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 과립구는 비만 세포(mast cell)를 포함한다.
- [0526] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 T 세포를 포함한다.
- [0527] 본 명세서에서 사용되는 용어 "T 세포"는 CD4+ 또는 CD8+ 표현형을 갖는 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR)+, CD3+를 갖는 분화된 림프구를 지칭한다. 상기 T 세포는 이펙터 T 세포 또는 조절 T 세포일 수 있다.
- [0528] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이펙터 T 세포"는 예를 들면, 시토킨을 생산함으로써 다른 면역 세포를 활성화하거나 지시하는 T 세포, 또는 세포독성 활성을 갖는 T 세포(예를 들면 CD4+, Th1/Th2, CD8+ 세포독성 T 림프구)를 지칭한다.
- [0529] 본 명세서에서 사용되는 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 지칭한다. Treg 세포는 이펙터 T 세포 반응의 지속적인 억제를 특징으로 한다. 한 특정 실시양태에 따르면, 상기 Treg은 CD4+CD25+Foxp3+ T 세포이다.
- [0530] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포이다.
- [0531] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포이다.
- [0532] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 T 세포는 기억 T 세포이다. 기억 T 세포의 비-제한적 예시는 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 세포를 포함한다.

- [0533] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 T 세포는 목적하는 발현 생성물을 인코딩하는 핵산 서열로 형질도입된 조작된(engineered) T 세포를 포함한다.
- [0534] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 목적하는 발현 생성물은 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [0535] 본 명세서에서 사용되는 어구 "TCR을 인코딩하는 핵산 서열로 형질도입된" 또는 "TCR을 인코딩하는 핵산 서열로 형질도입하는"은 MHC의 맥락에서 제시되는 원하는 항원에 대한 특이성을 갖는 T 세포로부터의 가변성 α - 및 β -사슬(chain)의 클로닝(cloning)을 지칭한다. TCR로 형질도입하는 방법은 당해 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면 Nicholson et al. Adv Hematol. 2012; 2012:404081; Wang and Rivière Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22(2):85-94; 및 Lamers et al, Cancer Gene Therapy (2002) 9, 613-623에 개시되어 있다.
- [0536] 본 명세서에서 사용되는 어구 "CAR을 인코딩하는 핵산 서열로 형질도입된" 또는 "CAR을 인코딩하는 핵산 서열로 형질도입하는"은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열의 클로닝을 지칭하며, 이때, 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, 단일 사슬 가변성 단편(single chain variable fragment; scFv))의 항원 결합 도메인을 함유하는 폴리펩티드이다. CAR로 형질도입하는 방법은 당업계에 공지되어 있고 예를 들면, Davila et al. Oncoimmunology. 2012 Dec 1;1(9):1577-1583; Wang and Rivière Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22(2):85-94; Maus et al. Blood. 2014 Apr 24;123(17):2625-35; Porter DL The New England journal of medicine. 2011, 365(8):725-733; Jackson HJ, Nat Rev Clin Oncol. 2016;13(6):370-383; 및 Globerson-Levin et al. Mol Ther. 2014;22(5):1029-1038에 개시되어 있다.
- [0537] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 B 세포를 포함한다.
- [0538] 본 명세서에서 사용되는 용어 "B 세포"는 B 세포 수용체(BCR)+, CD19+ 및/또는 B220+ 표현형을 갖는 림프구를 지칭한다. B 세포는 특이적 항원에 결합하여 체액성 반응을 유발하는 이의 능력을 특징으로 한다.
- [0539] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 NK 세포를 포함한다.
- [0540] 본 명세서에서 사용되는 용어 "NK 세포"는 CD16+ CD56+ 및/또는 CD57+ TCR- 표현형을 갖는 분화된 림프구를 지칭한다. NK는 특이적 세포용해성 효소의 활성화에 의해 "자기(self)" MHC/HLA 항원을 발현하는데 실패한 세포에 결합하여 이를 사멸시키는 이들의 능력, NK 활성화 수용체에 대한 리간드를 발현하는 종양 세포 또는 다른 이환된(diseased) 세포를 사멸시키는 능력, 및 면역 반응을 자극하거나 억제하는 시토카인으로 불리는 단백질 분자를 방출하는 능력을 특징으로 한다.
- [0541] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 NKT 세포를 포함한다.
- [0542] 본 명세서에서 사용되는 용어 "NKT 세포"는 반-불변(semi-invariant) $\alpha\beta$ T-세포 수용체를 발현하고, NK1.1과 같은 NK 세포와 통상적으로 관련되어 있는 다양한 분자 마커 또한 발현하는 T 세포의 특화된(specialized) 집단을 지칭한다. NKT 세포는 NK1.1+ 및 NK1.1-, 및 CD4+, CD4-, CD8+ 및 CD8- 세포를 포함한다. NKT 세포 상의 TCR은 MHC I-유사 분자 CD1d에 의해 제시된 당지질 항원을 인식한다는 점에서 고유하다. NKT 세포는 염증 또는 면역 내성(immune tolerance)을 촉진하는 시토카인을 생산하는 이들의 능력으로 인해 보호 또는 유해 효과를 가질 수 있다.
- [0543] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 건강한 대상체로부터 얻어진다.
- [0544] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 병리(예를 들면, 암)를 앓고 있는 대상체로부터 얻어진다.
- [0545] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 조절은 상기 I형 막 단백질 또는 상기 II형 막 단백질의 리간드 또는 수용체 또는 상기 I형 막 단백질 또는 상기 II형 막 단백질의 외인성 리간드 또는 수용체(예를 들면, PD-L1)를 발현하는 세포의 존재 하에서 이루어진다.
- [0546] 특정 실시양태들 따르면, 상기 외인성 리간드 또는 수용체는 가용성이다.
- [0547] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 외인성 리간드 또는 수용체는 고형 지지체(solid support)에 고정된다.

- [0548] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 리간드 또는 수용체를 발현하는 세포는 병리학적(이환된) 세포, 예를 들면, 암 세포를 포함한다.
- [0549] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 조절은 적어도 1차 활성화 신호[예를 들면, 항원 제시 세포(APC) 상의 주요 조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex; MHC)/펩티드 복합체와 T-세포 수용체(TCR)의 결합(ligation)]을 적어도 전송할 수 있는 자극제의 존재 하에서 이루어지며, 이는 세포 증식, 성숙, 시토카인 생산, 식세포작용 및/또는 면역 세포의 조절 또는 이펙터 기능의 유도를 초래한다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 자극제는 또한 2차 공동-자극 신호를 전송할 수 있다.
- [0550] 상기 자극제의 양 및 상기 자극제와 상기 면역 세포 사이의 비를 결정하는 방법은 당업계의 숙련자의 능력 범위 내이며, 따라서 본 명세서에 명시하지 않는다.
- [0551] 상기 자극제는 상기 면역 세포를 항원-의존적 또는 항원-독립적(즉, 다중클로날(polyclonal)) 방식으로 활성화할 수 있다.
- [0552] 특정 실시양태들에 따르면, 자극제는 항원 비-특이적 자극제를 포함한다.
- [0553] 비-특이적 자극제는 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다. 따라서, 비-제한적 예시로서, 상기 면역 세포가 T 세포를 포함하는 경우, 항원 비-특이적 자극제는 T 세포 표면 구조에 결합하여 상기 T 세포의 다중클로날 자극을 유도할 수 있는 제제일 수 있으며, 예를 들면, 항-CD28 항체와 같은 공동-자극 단백질과 병용되는 항-CD3 항체가 있고, 이에 제한되지 않는다. 다른 비-제한적 예시는 단독으로 또는 항-CD3과 다양하게 조합되는, 항-CD2, 항-CD137, 항-CD134, 노치(Notch)-리간드, 예를 들면, 델타-유사 1/4, Jagged1/2를 포함한다. T 세포의 다중클로날 자극을 유도할 수 있는 다른 제제는 미토겐(mitogen), PHA, PMA-이오노마이신(ionomycin), CEB 및 CytoStim(Miltenyi Biotech)을 포함하지만, 이들에 제한되는 않는다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 항원 비-특이적 자극제는 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함한다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 T 세포 자극제는 항-CD3 및 항-CD28 코팅된 비드(bead), 예를 들면 Miltenyi Biotec으로부터 얻은 CD3CD28 MACSiBeads를 포함한다.
- [0554] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 자극제는 항원-특이적 자극제를 포함한다.
- [0555] 항원 특이적 T 세포 자극제의 비-제한적 예시는 항원-로딩된(loaded) 항원 제시 세포(APC, 예를 들면 수지상 세포) 및 펩티드 로딩된 재조합 MHC를 포함한다. 따라서, 예를 들면, T 세포 자극제는 원하는 항원(예를 들면, 종양 항원)이 사전로딩된(preloaded) 수지상 세포 또는 원하는 항원을 코딩하는 mRNA로 형질주입된 수지상 세포일 수 있다.
- [0556] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 항원은 암 항원이다.
- [0557] 본 명세서에서 사용되는 용어 "암 항원"은 비-암성 세포와 비교하여 암성 세포에 의해 과발현되거나 단독으로 발현된 항원을 지칭한다. 암 항원은 공지된 암 항원이거나 암 세포에서 발달하는 새로운 특이적 항원(즉, 신생 항원(neoantigen))일 수 있다.
- [0558] 공지된 암 항원에 대한 비제한적 예시는 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-1, 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, MUCI, PMSA, PSA, 티로시나제(tyrosinase), Melan-A, MART-I, gp100, gp75, 알파액티닌(alphaactinin)-4, Bcr-Abl 융합 단백질, Casp-8, 베타-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, 인간 유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV) 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-2를 포함한다.

- [0559] 발현될 수 있는 다른 종양 항원은 당업계에서 익히 공지되어 있다(예를 들면, W000/20581; Cancer Vaccines and Immunotherapy (2000) Eds Stern, Beverley and Carroll, Cambridge University Press, Cambridge 참조). 이 종양 항원들의 서열들은 공공의 데이터베이스로부터 쉽게 입수가능하고, WO 1992/020356 AI, WO 1994/005304 AI, WO 1994/023031 AI, WO 1995/020974 AI, WO 1995/023874 AI & WO 1996/026214 AI에서도 발견된다.
- [0560] 대안적으로 또는 추가로, 종양 항원은 예를 들면, 생검에 의해 대상체로부터 얻은 암 세포를 이용하여 확인될 수 있다.
- [0561] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 상기 자극제는 암 세포를 포함한다.
- [0562] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 조절은 항암제의 존재 하에서 이루어진다.
- [0563] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 면역 세포는 상기 조절 후에 정제된다.
- [0564] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 얻을 수 있는 분리된 면역 세포를 고려한다.
- [0565] 특정 실시양태들에 따르면, 본 발명에 따라 사용되고/되거나 얻어진 면역 세포는 신선하게 분리되고, 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.
- [0566] 동결보존 방법은 당업자에게 일반적으로 알려져 있으며, 예를 들면, 국제 특허 출원 공개 번호 제W02007054160호 및 제W0 2001039594호 및 미국 특허 출원 공개 번호 제US20120149108호에 개시되어 있다.
- [0567] 특정 실시양태들에 따르면, 본 발명에 따라 얻어진 세포는 세포 은행(cell bank) 또는 보관소(depository) 또는 보관 시설(storage facility)에 보관될 수 있다.
- [0568] 결과적으로, 본 교시는 또한 면역 세포를 조절하는 것, 예를 들면, 면역 세포를 활성화하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병, 예를 들면, 제한 없이, 과다-증식성 질병; 면역 억제 및 감염과 관련된 질병에 대한 입양(adoptive) 면역 세포 치료요법들에 대한 공급원으로서 본 발명의 분리된 면역 세포 및 방법의 용도를 추가로 제안한다.
- [0569] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 활성화 후에 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에 입양 전달(adoptively transferring)하는 단계를 포함한다.
- [0570] 특정 실시양태들에 따르면, 입양 세포 치료요법에서 사용하기 위한 본 발명의 방법에 따라 얻어질 수 있는 면역 세포가 제공된다.
- [0571] 본 발명의 특정 실시양태들에 따라 사용되는 세포들은 자가(autoologous) 또는 비-자가일 수 있고; 이들은 대상체에 대해 동계(syngeneic) 또는 비-동계: 동종이계(allogeneic) 또는 이종(xenogeneic)일 수 있고; 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적 실시양태를 나타낸다.
- [0572] 본 교시는 또한 이종이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는 방법에서 본 발명의 조성물(예를 들면, 이종이량체, 이를 코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템 또는 이를 발현하는 숙주 세포)의 용도를 고려한다.
- [0573] 따라서, 본 발명의 한 양태에 따르면, 상기 이종이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 이종이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하고, 이로인해 대상체에서 질병을 치료한다.
- [0574] 본 발명의 추가적 또는 대안적 양태에 따르면, 이종이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는데 사용하기 위한 이종이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 세포가 제공된다.
- [0575] 본 발명의 추가적 또는 대안적 양태에 따르면, 면역 세포를 조절하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 이종이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하고, 이로인해 대상체에서 질병을 치료한다.

- [0576] 본 발명의 추가적 또는 대안적 양태에 따르면, 면역 세포를 조절하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병을 치료하는데 사용하기 위한 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0577] 용어 “치료하는” 또는 “치료”는 병리 (질병, 질환, 또는 의학적 상태)의 발생(development)을 억제, 방지 또는 저지(arresting)하고/하거나 병리 또는 병리 증상의 감소, 경감(remission), 또는 퇴행을 유발하는 것을 지칭한다. 당업자는 병리의 발생을 평가하기 위해 다양한 방법론 및 분석방법들을 사용할 수 있고, 마찬가지로 병리의 감소, 경감, 또는 퇴행을 평가하기 위해 다양한 방법론 및 분석들을 사용할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0578] 본 명세서에서 사용되는 용어 “대상체”는 포유동물, 예를 들면 임의의 연령 및 성별의 인간을 포함한다. 특정 실시양태들에 따르면, 용어 “대상체”는 병리 (질병, 질환, 또는 의학적 상태)를 앓고 있는 대상체를 지칭한다. 특정 실시양태들에 따르면, 상기 용어는 병리가 발생할 위험이 있는 개체를 포함한다.
- [0579] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 대상체는 I형 막 단백질 또는 II형 막 단백질의 수용체 또는 리간드를 발현하는 세포와 관련된 질병을 앓고 있다.
- [0580] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 대상체는 II형 막 단백질(예를 들면, 4-1BB, CD40)의 수용체 또는 리간드를 발현하는 세포와 관련된 질병을 앓고 있다.
- [0581] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 대상체의 이환된 세포 (diseased cell)는 I형 막 단백질 또는 II형 막 단백질의 수용체 또는 리간드를 발현한다.
- [0582] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 대상체의 이환된 세포는 I형 막 단백질의 수용체 또는 리간드(예를 들면, PDL1, 시알산, CD155)를 발현한다.
- [0583] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 대상체의 이환된 세포는 II형 막 단백질의 수용체 또는 리간드를 발현한다.
- [0584] 본 발명의 특정 실시양태들에 따라 치료될 수 있는 질병의 비제한적인 예시는 혈관 신생을 유도하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병 (예를 들면, I형 막 단백질이 VEGFA이고, II형 단백질이 TWEAK 또는 APRIL인 경우), 혈관 신생을 억제하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병 (예를 들면, I형 막 단백질이 ENG이고, II형 단백질이 FasL, TRAIL or VEGI인 경우), 골 형성을 유도하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병 (I형 막 단백질은 BMP2이고, II형 막 단백질은 TWEAK 또는 APRIL인 경우), 골 형성을 억제하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병 (I형 막 단백질은 BMP3이고, II형 막 단백질은 RANKL, FasL, TRAIL, VEGI인 경우), 간 재생으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병 (I형 막 단백질이 GFER이고, II형 막 단백질이 TWEAK 또는 APRIL인 경우), 면역 세포를 조절하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병 (I형 막 단백질 및 II형 단백질 중 적어도 하나가 면역 조절제인 경우)를 포함한다.
- [0585] 본 명세서에서 사용되는 어구 “면역 세포를 조절하는 것으로부터 이익을 얻는 질병”은 대상체의 면역 반응 활성이 질병의 증상을 적어도 완화하거나 증상의 개시(onset)를 지연하기에 충분하나, 그렇게 하면 어떠한 이유로든 대상체의 면역 반응 활성이 최적보다 낮은, 질병을 지칭한다.
- [0586] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 면역 세포를 활성화하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있다.
- [0587] 면역 세포의 활성화하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병의 비제한적인 예시는 과증식성 질병 (hyper-proliferative disease), 면역 억제와 관련된 질병, 약물 (예를 들면, mTOR 억제제, 칼시뉴린 억제제, 스테로이드)에 의해 유발되는 면역 억제, 및 감염을 포함한다.
- [0588] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 과증식성 질병을 포함한다.
- [0589] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 과증식성 질병은 경화증 (sclerosis), 섬유증 (fibrosis), 특발성 폐 섬유증 (Idiopathic pulmonary fibrosis), 건선 (psoriasis), 전신 경화증/경피증 (systemic sclerosis/scleroderma), 원발성 담즙성 담관염 (primary biliary cholangitis), 원발성 경화성 담관염 (primary sclerosing cholangitis), 간 섬유증 (liver fibrosis), 방사선 유발 폐 섬유증(radiation-induced pulmonary fibrosis), 골수 섬유증(myelofibrosis) 또는 복막후 섬유증(retroperitoneal fibrosis)을 포함한다.
- [0590] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 과증식성 질병은 암을 포함한다.
- [0591] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 암을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 이를 필요로 하는

대상체에 본 명세서에 개시된 PD1-4-1BBL 융합 단백질, PD1 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 및/또는 4-1BBL 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함한다.

[0592] 본 명세서에서 사용되는 용어 “암”은 악성 (malignant) 및 전암성 (pre-malignant) 암을 둘 모두를 포함한다.

[0593] 전암성 또는 양성 형태의 암과 관련하여, 선택적으로, 이의 조성물 및 방법은 전암성 암이 악성 형태로 진행되는 것을 정지시키기 위해 적용될 수 있다.

[0594] 본 발명의 몇몇 실시양태의 방법에 의해 치료될 수 있는 암은 임의의 고형 또는 비-고형 암 및/또는 암 전이일 수 있다.

[0595] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 악성 암을 포함한다.

[0596] 본 발명의 몇몇 실시양태의 방법에 의해 치료될 수 있는 암은 임의의 고형 또는 비-고형 암 및/또는 암 전이일 수 있다. 암의 예시는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병을 포함하나, 이들에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 구체적인 예시는 편평 세포암 (squamous cell cancer), 폐암 (소세포 폐암 (small-cell lung cancer), 비소세포 폐암 (non-small-cell lung cancer), 폐 선암종 (adenocarcinoma of the lung) 및 폐 편평 암종 (squamous carcinoma of the lung) 포함), 복막암 (cancer of the peritoneum), 간세포암 (hepatocellular cancer), 위암 (gastric or stomach cancer) (위장암 (gastrointestinal cancer) 포함), 췌장암 (pancreatic cancer), 교모세포종 (glioblastoma), 자궁경부암 (cervical cancer), 난소암 (ovarian cancer), 간암 (liver cancer), 방광암 (bladder cancer), 간세포종 (hepatoma), 유방암 (breast cancer), 결장암 (colon cancer), 결장직장암 (colorectal cancer), 자궁내막암종 또는 자궁암종 (endometrial or uterine carcinoma), 침샘암종 (salivary gland carcinoma), 신장암 (kidney or renal cancer), 간암, 전립선암 (prostate cancer), 외음부암 (vulval cancer), 갑상선암 (thyroid cancer), 간세포성 암종 (hepatic carcinoma) 및 다양한 유형의 두경부암 (head and neck cancer), 및 B-세포 림프종 (B-cell lymphoma) (저등급/소포성 비호지킨 림프종 (low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma; NHL); 소형 림프구성 (SL) NHL (small lymphocytic NHL); 중간 등급/소포성 NHL (intermediate grade/follicular NHL); 중간 등급 미만성 NHL (intermediate grade diffuse NHL); 고등급 면역모세포성 NHL (high grade immunoblastic NHL); 버킷 림프종 (Burkitt lymphoma), 미만성 거대 B 세포 림프종 (Diffused large B cell lymphoma; DLBCL), 고등급 림프모구성 NHL (high grade lymphoblastic NHL); 고등급 소형 비분할 세포 NHL (high-grade small non-cleaved cell NHL); 거대 종양 NHL (bulky disease NHL); 맨틀 세포 림프종 (mantle cell lymphoma); AIDS-관련 림프종 (AIDS-related lymphoma); 발덴스트롬 매크로글로불린혈증 (Waldenstrom's Macroglobulinemia); T 세포 림프종 (T cell lymphoma), 호지킨 림프종 (Hodgkin lymphoma), 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukemia; CLL); 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia; ALL); 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukemia, AML), 급성 전골수성 백혈병 (acute promyelocytic leukemia; APL), 털세포 백혈병 (Hairy cell leukemia); 만성 골수모구성 백혈병 (chronic myeloblastic leukemia; CML); 및 이식-후 림프증식성 질환 (post-transplant lymphoproliferative disorder; PTLD), 및 모종증 (phakomatoses)과 관련된 비정상적 혈관 증식, 부종 (edema) (예를 들면, 뇌종양과 관련된 부종), 및 메이그 증후군 (Meigs' syndrome)을 포함한다. 바람직하게는, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 직장암, 비소세포 폐암, 비호지킨 림프종, 신장 세포암 (renal cell cancer), 전립선암, 간암, 췌장암, 연조직 육종 (soft-tissue sarcoma), 카포시 육종 (Kaposi's sarcoma), 카르시노이드 암종 (carcinoid carcinoma), 두경부암, 흑색종 (melanoma), 난소암, 중피종 (mesothelioma) 및 다발성 골수종 (multiple myeloma)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 치료를 받을 수 있는 암성 병태 (cancerous condition)는 전이성 암을 포함한다.

[0597] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 전암성 암을 포함한다.

[0598] 전암성 암 (또는 전암)은 잘 특성화되어 있고 당업계에 익히 공지되어 있다 (예를 들면, Berman JJ. and Henson DE., 2003. Classifying the precancers: a metadata approach. BMC Med Inform Decis Mak. 3:8 참조). 본 발명의 방법을 통해 치료받을 수 있는 전암성 암의 클래스는 후천성 소형 또는 현미경적 전암성 암, 핵 비정상성 (nuclear atypia)을 갖는 후천성 거대 병변, 암으로 진행되는 유전성 과증식성 증후군과 함께 발생하는 전구 병변, 및 후천성 미만성 과형성증 및 미만성 화생을 포함한다. 소형 또는 현미경적 전암성 암의 예시는 자궁경부의 고등급 편평 상피내 병변 (High grade squamous intraepithelial lesion; HGSIL), 항문 상피내 신생물 (anal intraepithelial neoplasia; AIN), 성대의 이형성증 (dysplasia), (결장의) 이상음와 (aberrant crypts), 전립선 상피내 신생물 (prostatic intraepithelial neoplasia; PIN)을 포함한다. 핵 비정상성을 갖는 후천성 거대 병변의 예시는 관상선종 (tubular adenoma), 이상단백혈증을 갖는 혈관면역모세포 림프선종

(angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia, AILD); 비정형성 수막종 (atypical meningioma), 위 용종 (gastric polyp), 거대 플라크 유사건선 (large plaque parapsoriasis), 골수 이형성증 (myelodysplasia), 유두상 이행 세포 상피내 암종 (papillary transitional cell carcinoma in-situ), 모세포 증가 불응성 빈혈 (refractory anemia with excess blasts), 및 슈나이더 유두종 (Schneiderian papilloma)을 포함한다. 암으로 진행되는 유전성 과증식성 증후군과 함께 발생하는 전구 병변의 예시는 비정형성 모반 증후군 (atypical mole syndrome), C 세포 선종증 (C cell adenomatosis) 및 MEA를 포함한다. 후천성 미만성 과다형성 증 및 미만성 화생의 예시는 AIDS, 비정형 림프 증식 (atypical lymphoid hyperplasia), 골의 파제트병 (Paget's disease), 이식-후 림프증식성 질병, 및 궤양성 대장염 (ulcerative colitis)을 포함한다.

[0599] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 급성 골수성 백혈병, 항문암 (Anal Cancer), 기저 세포 암종 (Basal Cell Carcinoma), B-세포 비호지킨 림프종 (B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma), 담관암 (Bile Duct Cancer), 방광암, 유방암, 자궁경부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 (Chronic Myelocytic Leukemia; CML), 결장직장암, 피부 T-세포 림프종 (Cutaneous T-Cell Lymphoma), 미만성 거대 B-세포 림프종 (Diffuse Large B-Cell Lymphoma), 자궁내막암 (Endometrial Cancer), 식도암 (Esophageal Cancer), 나팔관암 (Fallopian Tube Cancer), 소포성 림프종 (Follicular Lymphoma), 위암, 위식도 (GE) 접합부 암종 (Gastroesophageal Junction Carcinomas), 생식 세포 종양 (Germ Cell Tumors), 배아세포종(정상피종) (Germinomatous (Seminomatous)), 생식 세포 종양, 다형성 교모세포종 (Glioblastoma Multiforme; GBM), 교육종 (Gliosarcoma), 두경부암, 간세포 암종 (Hepatocellular Carcinoma), 호지킨 림프종, 하인두암 (Hypopharyngeal Cancer), 후두암 (Laryngeal Cancer), 평활근육종 (Leiomyosarcoma), 맨틀 세포 림프종, 흑색종, 메르켈 세포 암종 (Merkel Cell Carcinoma), 다발성 골수종, 신경내분비종양 (Neuroendocrine Tumors), 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 구강암 (Oral Cavity (Mouth) Cancer), 구강인두암 (Oropharyngeal Cancer), 골육종 (Osteosarcoma), 난소암, 췌장암, 말초신경초종양 (신경섬유육종) (Peripheral Nerve Sheath Tumor (Neurofibrosarcoma)), 말초T세포 림프종 (Peripheral T-Cell Lymphomas; PTCL), 복막암, 전립선암, 신세포암종 (Renal Cell Carcinoma), 침샘암 (Salivary Gland Cancer), 피부암 (Skin Cancer), 소세포 폐암, 연조직 육종, 편평 세포 암종 (Squamous Cell Carcinoma), 활막 육종 (Synovial Sarcoma), 고환암 (Testicular Cancer), 흉선 암종 (Thymic Carcinoma), 갑상선암, 요관암 (Ureter Cancer), 요도암 (Urethral Cancer), 자궁암 (Uterine Cancer), 질암 (Vaginal Cancer) 또는 외음부암이다.

[0600] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 급성 골수성 백혈병, 방광암, 유방암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 (Chronic myelogenous leukemia), 결장직장암, 미만성 거대 B-세포 림프종, 상피 난소암 (Epithelial Ovarian Cancer), 상피 종양 (Epithelial Tumor), 나팔관암, 소포성 림프종, 다형성 교모세포종, 간세포 암종, 두경부암, 백혈병, 림프종, 맨틀 세포 림프종, 흑색종, 중피종, 다발성 골수종, 비인두암 (Nasopharyngeal Cancer), 비호지킨 림프종, 비-소세포 폐 암종(Non-small-cell lung carcinoma), 난소암, 전립선암, 또는 신세포암종이다.

[0601] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 림프종, 백혈병, 및 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0602] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 림프종, 백혈병, 결장암, 췌장암, 난소암, 폐암, 및 편평 세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0603] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 결장 암종(colon carcinoma)이다.

[0604] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 난소 암종(ovarian carcinoma)이다.

[0605] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 폐 암종이다.

[0606] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 두경부 암종(head and neck carcinoma)이다.

[0607] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 백혈병이다.

[0608] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 백혈병은 급성 비림프구성 백혈병 (acute nonlymphocytic leukemia), 만성 림프구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈병 (acute granulocytic leukemia), 만성 과립구성 백혈병 (chronic granulocytic leukemia), 급성 전골수성 백혈병, 성인 T-세포백혈병 (adult T-cell leukemia), 무백혈성 백혈병 (aleukemic leukemia), 백혈구병성 백혈병 (leukocythemetic leukemia), 호염기성 백혈병 (basophylic leukemia), 모세포 백혈병 (blast cell leukemia), 소 백혈병 (bovine leukemia), 만성 골수성 백혈병, 피부 백혈병 (leukemia cutis), 배아 백혈병 (embryonal leukemia), 호산구성 백혈병 (eosinophilic leukemia), 그로스 백혈병 (Gross' leukemia), 털세포 백혈병 (hairy-cell leukemia), 혈모세포성 백혈병 (hemoblastic

leukemia), 혈구모세포성 백혈병 (hemocytoblastic leukemia), 조직구성 백혈병 (histiocytic leukemia), 줄기 세포 백혈병 (stem cell leukemia), 급성 단구성 백혈병 (acute monocytic leukemia), 백혈구 감소성 백혈병 (leukopenic leukemia), 림프구성 백혈병 (lymphatic leukemia), 림프모구성 백혈병 (lymphoblastic leukemia), 림프구성 백혈병, 림프형성 백혈병 (lymphogenous leukemia), 림프 백혈병 (lymphoid leukemia), 림프육종 세포 백혈병 (lymphosarcoma cell leukemia), 비만세포 백혈병 (mast cell leukemia), 거대핵세포 백혈병 (megakaryocytic leukemia), 미세골수모구성 백혈병 (micromyeloblastic leukemia), 단구성 백혈병 (monocytic leukemia), 골수모구성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수 과립구성 백혈병 (myeloid granulocytic leukemia), 골수단구성 백혈병 (myelomonocytic leukemia), 네겔리 백혈병 (Naegeli leukemia), 형질 세포 백혈병 (plasma cell leukemia), 형질구성 백혈병 (plasmacytic leukemia), 전골수성 백혈병 (promyelocytic leukemia), 리더 세포 백혈병 (Rieder cell leukemia), 쉘링 백혈병 (Schilling's leukemia), 줄기세포 백혈병, 아백혈병성 백혈병 (subleukemic leukemia), 및 미분화 세포 백혈병 (undifferentiated cell leukemia)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0609] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 백혈병은 전골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 또는 만성 골수성 백혈병이다.
- [0610] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 림프종이다.
- [0611] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 림프종은 B 세포 림프종이다.
- [0612] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 림프종은 T 세포 림프종이다.
- [0613] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 상기 림프종은 호지킨 림프종이다.
- [0614] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 림프종은 비호지킨 림프종이다.
- [0615] 특정 실시양태들에 따르면, 비호지킨 림프종은 공격적 NHL (aggressive NHL), 변형성 NHL (transformed NHL), 지연성 NHL (indolent NHL), 재발성 NHL (relapsed NHL), 불응성 비호지킨 림프종 (refractory NHL), 저등급 NHL, 소포성 림프종, 거대 세포 림프종 (large cell lymphoma), B-세포 림프종, T-세포 림프종, 맨틀 세포 림프종, 버킷 림프종, NK 세포 림프종 (NK cell lymphoma), 미만성 거대 B-세포 림프종, 급성 림프모구 림프종 (acute lymphoblastic lymphoma), 및 균상식육종 (mycosos fungoides)/세자리 증후군 (Sezry syndrome)을 포함하는 피부 T 세포 암 (cutaneous T cell cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0616] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 다발성 골수종이다.
- [0617] 적어도 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 다발성 골수종은 카파-형 경쇄 및/또는 람다-형 경쇄를 생성하는 다발성 골수종 암 (multiple myeloma cancers); 원발성 형질 세포 백혈병 (primary plasma cell leukemia; PCL)을 포함하는 공격적 다발성 골수종 (aggressive multiple myeloma); 다발성 골수종으로 진행될 수 있는 단세포군감마 글로불린병증 (monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS), 발덴스트롬 매크로글로불린혈증 (Waldenstrom's macroglobulinemia; WM, 림프형질세포성 림프종 (lymphoplasmacytic lymphoma)으로도 알려짐)과 같은 양성 형질 세포 질환 (benign plasma cell disorders); 또한 다발성 골수종으로 진행될 수 있는 무증상 다발성 골수종 (smoldering multiple myeloma; SMM), 지연성 다발성 골수종 (indolent multiple myeloma), 다발성 골수종의 전암성 형태 (pre-malignant); 원발성 아밀로이드증 (primary amyloidosis)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0618] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 암은 중앙 미세환경에서 중앙 침윤 림프구를 갖는 중앙 및/또는 중앙 미세 환경에서 I형 또는 II형 막 단백질의 수용체 또는 리간드(예를 들면, PDL1 또는 CD47)의 상대적으로 높은 발현을 갖는 중앙의 존재에 의해 정의된다.
- [0619] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 면역 억제와 관련된 질병 또는 약물(예를 들면, mTOR 억제제, 칼시뉴린 억제제, 스테로이드)에 의해 유발된 면역 억제와 관련된 질병을 포함한다.
- [0620] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 HIV, 홍역, 인플루엔자, LCCM, RSV, 인간 리노바이러스 (Human Rhinoviruses), EBV, CMV 또는 파르보 바이러스 (Parvo viruses)를 포함한다.
- [0621] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 감염을 포함한다.
- [0622] 본 명세서에서 사용되는 용어 “감염” 또는 “감염성 질병”은 병원체에 의해 유발되는 질병을 지칭한다. 병원체의 구체적인 예는 바이러스성 병원체 (viral pathogen), 세포내 마이코박테리아 병원체 (intracellular

mycobacterial pathogen) (예를 들면, 마이코박테리움 투베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)), 세포내 박테리아 병원체 (intracellular bacterial pathogen) (예를 들면, 리스테리아 모노사이토제네스 (Listeria monocytogenes))와 같은 세균성 병원체 (bacterial pathogen), 또는 세포내 원생동물 병원체 (intracellular protozoan pathogen) (예를 들면, 레이시마니아 (Leishmania) 및 트리파노소마 (Trypanosoma))를 포함한다.

[0623] 본 발명의 교시에 따라 치료 가능한 감염성 질병을 유발하는 바이러스성 병원체의 구체적인 유형은 레트로바이러스 (retrovirus), 쉼코바이러스 (circovirus), 파보바이러스 (parvovirus), 파포바바이러스 (papovavirus), 아데노바이러스 (adenovirus), 헤르페스바이러스 (herpesvirus), 이리도바이러스(iridovirus), 폭스바이러스 (poxvirus), 헤파드나바이러스 (hepadnavirus), 피코나바이러스 (picornavirus), 칼리시바바이러스 (calicivirus), 토가바이러스 (togavirus), 플라비바이러스 (flavivirus), 레오바이러스 (reovirus), 오르토믹소바이러스 (orthomyxovirus), 파라믹소바이러스 (paramyxovirus), 램도바이러스 (rhabdovirus), 버나바이러스 (bunyavirus), 코로나바이러스 (coronavirus), 아레나바이러스 (arenavirus), 및 필로바이러스 (filovirus)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0624] 본 발명의 교시에 따라 치료할 수 있는 바이러스성 감염의 구체적인 예시는 인간 면역 결핍 바이러스-유도 후천성 면역결핍 증후군 (human immunodeficiency virus (HIV)-induced acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)), 인플루엔자 (influenza), 리노바이러스 감염 (rhinoviral infection), 바이러스성 뇌수막염 (viral meningitis), 엡스타인-바 바이러스 감염 (Epstein-Barr virus (EBV) infection), A, B, 또는 C형 간염 바이러스 감염 (hepatitis A, B or C virus infection), 홍역, 유두종 바이러스 감염/사마귀 (papilloma virus infection/warts), 거대세포바이러스 감염 (cytomegalovirus (CMV) infection), 단순 포진 바이러스 감염 (Herpes simplex virus infection), 황열병 (yellow fever), 에볼라 바이러스 감염 (Ebola virus infection), 광견병 (rabies) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0625] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 면역 세포를 억제하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0626] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 자가면역 질병이다. 이 자가면역 질병은 심혈관계 질병 (cardiovascular diseases), 류마티스 질병 (rheumatoid diseases), 샘 질병 (glandular diseases), 소화기계 질병 (gastrointestinal diseases), 피부 질병 (cutaneous diseases), 간 질병 (hepatic diseases), 신경계 질병 (neurological diseases), 근육계 질병 (muscular diseases), 신장 질병 (nephric diseases), 생식 관련 질병 (diseases related to reproduction), 결합 조직 질병 (connective tissue diseases) 및 전신 질병 (systemic diseases)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0627] 자가면역 심혈관계 질병의 예시는 죽상동맥경화증 (Matsuura E. et al., Lupus. 1998;7 Suppl 2:S135), 심근경색증 (Vaarala O. Lupus. 1998;7 Suppl 2:S132), 혈전증 (Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9), 베게너 육아종 (Wegener's granulomatosis), 타카야수 동맥염 (Takayasu's arteritis), 가와사키 증후군 (Kawasaki syndrome) (Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochenschr 2000 Aug 25;112 (15-16):660), 항-인자 VIII 자가면역 질병 (Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost.2000;26 (2):157), 괴사성 소혈관 혈관염 (necrotizing small vessel vasculitis), 현미경적 다발혈관염 (microscopic polyangiitis), 척-스트라우스 증후군 (Churg and Strauss syndrome), 무면역침착 초점 괴사성 반월상 사구체신염 (pauci-immune focal necrotizing and crescentic glomerulonephritis) (Noel LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May;151 (3):178), 항인지질 증후군 (antiphospholipid syndrome) (Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999;14 (4):171), 항체-유도성 심부전 (antibody-induced heart failure) (Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 1999 Jun 17;83 (12A):75H), 혈소판감소성 자반병 (thrombocytopenic purpura) (Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun;14 (2):114; Semple JW. et al., Blood 1996 May 15;87 (10):4245), 자가면역 용혈성 빈혈 (autoimmune hemolytic anemia) (Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma 1998 Jan;28 (3-4):285; Sallah S. et al., Ann Hematol 1997 Mar;74 (3):139), 샤가스병의 심근 자가면역 (cardiac autoimmunity in Chagas' disease) (Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 1996 Oct 15;98 (8):1709) 및 항-헬퍼 T 림프구 자가면역 (anti-helper T lymphocyte autoimmunity) (Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998;11 (1):9)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0628] 자가면역 류마티스 질병의 예시는 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis) (Krenn V. et al., Histol Histopathol 2000 Jul;15 (3):791; Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A 1994 Jan 18;91 (2):437) 및 강직성 척추염 (ankylosing spondylitis) (Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3 (3): 189)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0629] 자가면역 샘 질병의 예시는 췌장 질병 (pancreatic disease), I형 당뇨병 (Type I diabetes), 갑상선 질병 (thyroid disease), 그레이브스병 (Graves' disease), 갑상선염 (thyroiditis), 자발적 자가면역 갑상선염 (spontaneous autoimmune thyroiditis), 하시모토 갑상선염 (Hashimoto's thyroiditis), 특발성 점액종 (idiopathic myxedema), 난소 자가면역 (ovarian autoimmunity), 자가면역 항-정자 불임 (autoimmune anti-sperm infertility), 자가면역 전립선염 (autoimmune prostatitis) 및 I형 자가면역 다선 증후군 (Type I autoimmune polyglandular syndrome)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 질병은 췌장의 자가면역 질병, 1형 당뇨병 (Castano L. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647; Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34 Suppl:S125), 자가면역 갑상선 질병, 그레이브스병 (Graves' disease) (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29 (2):339; Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92 (1):77), 자발적 자가면역 갑상선염 (Braley-Mullen H. and Yu S, J Immunol 2000 Dec 15;165 (12):7262), 하시모토 갑상선염 (Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Aug;57 (8):1810), 특발성 점액종 (Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug;57 (8):1759), 난소 자가면역 (Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb;37 (2):87), 자가면역 항-정자 불임 (Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. 2000 Mar;43 (3):134), 자가면역 전립선염 (Alexander RB. et al., Urology 1997 Dec;50 (6):893) 및 I형 자가면역 다선 증후군 (Hara T. et al., Blood. 1991 Mar 1;77 (5):1127)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0630] 자가면역 소화기계 질병의 예시는 만성 염증성 장 질병 (chronic inflammatory intestinal diseases) (Garcia Herola A. et al., Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan;23 (1):16), 셀리악병 (celiac disease) (Landau YE. and Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16;138 (2):122), 대장염, 회장염 (ileitis) 및 크론병 (Crohn's disease)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0631] 자가면역 피부 질병의 예시는, 보통 천포창 (pemphigus vulgaris), 수포성 유천포창 (bullous pemphigoid) 및 낙엽성 천포창 (pemphigus foliaceus)와 같으나, 이에 제한되지 않은 자가면역 수포성 피부 질병들 (autoimmune bullous skin diseases)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0632] 자가면역 간 질병의 예시는 간염, 자가면역 만성 활동성 간염 (autoimmune chronic active hepatitis) (Franco A. et al., Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar;54 (3):382), 원발성 담즙성 간경변 (primary biliary cirrhosis) (Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov;91 (5):551; Strassburg CP. et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun;11 (6):595) 및 자가면역 간염 (autoimmune hepatitis) (Manns MP. J Hepatol 2000 Aug;33 (2):326)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0633] 자가면역 신경계 질병의 예시는 다발성 경화증 (Cross AH. et al., J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112 (1-2):1), 알츠하이머병 (Oron L. et al., J Neural Transm Suppl. 1997;49:77), 중증 근무력증 (myasthenia gravis) (Infante AJ. And Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83; Oshima M. et al., Eur J Immunol 1990 Dec;20 (12):2563), 신경병증 (neuropathies), 운동 신경병증 (motor neuropathies) (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7 (3):191); 길랑-바레 증후군 (Guillain-Barre syndrome) 및 자가면역 신경병증 (autoimmune neuropathies) (Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):234), 근무력증, 람베르트-이튼 근무력 증후군 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome) (Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):204); 부종 양성 신경 질병 (paraneoplastic neurological diseases), 소뇌 위축 (cerebellar atrophy), 부종양성 소뇌 위축 (paraneoplastic cerebellar atrophy) 및 근육 강직 증후군 (stiff-man syndrome) (Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci units S A 2001 Mar 27;98 (7):3988); 비-부종양성 근육 강직 증후군 (non-paraneoplastic stiff man syndrome), 진행성 소뇌 위축 (progressive cerebellar atrophies), 뇌염 (encephalitis), Rasmussen 뇌염 (Rasmussen's encephalitis), 근위축성 측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis), 시드넨 무도병 (Sydeham chorea), 질 드 라 투렛증후군 (Gilles de la Tourette syndrome) 및 자가면역 다발내분비병증 (autoimmune polyendocrinopathies) (Antoine JC. and Honnorat J. Rev Neurol (Paris) 2000 Jan;156 (1):23); 면역이상 신경병증 (dysimmune neuropathies) (Nobile-Orazio E. et al., Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419); 후천성 신경근긴장증 (acquired neuromyotonia), 선천성 다발성 관절구축증 (arthrogryposis multiplex congenita) (Vincent A. et al., Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:482), 신경염 (neuritis), 시신경염 (optic neuritis) (Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57 (5):544) 및 신경퇴행성 질병 (neurodegenerative diseases)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0634] 자가면역 근육계 질병의 예시는 근염 (myositis), 자가면역 근염 (autoimmune myositis) 및 원발성 쇼그렌 증후군 (primary Sjogren's syndrome) (Feist E. et al., Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123 (1):92) 및 평활근 자가면역 질병 (smooth muscle autoimmune disease) (Zauli D. et al., Biomed Pharmacother 1999

Jun;53 (5-6):234)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0635] 자가면역 신장 질병의 예시는 신염 (nephritis) 및 자가면역 간질 신염 (autoimmune interstitial nephritis) (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1 (2):140)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0636] 자가면역 생식 관련 질병의 예시는 태아 사산 (fetal loss) (Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0637] 자가면역 결합 조직 질병의 예시는 귀 질병 (ear diseases), 자가면역 귀 질병 (autoimmune ear diseases) (Yoo TJ. et al., Cell Immunol 1994 Aug;157 (1):249) 및 내이 질병의 자가면역 질병 (autoimmune diseases of the inner ear) (Gloddek B. et al., Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0638] 자가면역 전신 질병의 예시는 전신 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus) (Erikson J. et al., Immunol Res 1998;17 (1-2):49) 및 전신 경화증 (systemic sclerosis) (Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6 (2):156); Chan OT. et al., Immunol Rev 1999 Jun;169:107)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0639] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 이식편 거부 질병이다. 이식편의 이식과 관련된 질병의 예시는 이식편 거부, 만성 이식편 거부 (chronic graft rejection), 아급성 이식편 거부 (subacute graft rejection), 초급성 이식편 거부 (hyperacute graft rejection), 급성 이식편 거부 (acute graft rejection) 및 이식편대숙주병 (graft versus host disease)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0640] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병은 알레르기성 질병이다. 알레르기성 질병의 예시는 천식 (asthma), 두드러기 (hives), 두드러기 (urticaria), 꽃가루 알레르기 (pollen allergy), 집먼지 진드기 알레르기 (dust mite allergy), 독 알레르기 (venom allergy), 화장품 알레르기 (cosmetics allergy), 라텍스 알레르기 (latex allergy), 화학적 알레르기 (chemical allergy), 약물 알레르기 (drug allergy), 곤충 물림 알레르기 (insect bite allergy), 동물 비듬 알레르기 (animal dander allergy), 쏘는 식물 알레르기 (stinging plant allergy), 포이즌 아이비 알레르기 (poison ivy allergy) 및 음식 알레르기 (food allergy)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0641] 특정 실시양태들에 따르면, 본 명세서에 개시된 조성물 (예를 들면, 이중이량체 핵산 작제물 또는 시스템 및/또는 이를 발현하는 숙주 세포)은 질병을 치료하기 위해, 진통제 (analgesics), 화학요법제 (chemotherapeutic agents), 방사선요법제 (radiotherapeutic agents), 세포독성 요법 (컨디셔닝) (cytotoxic therapies (conditioning)), 호르몬 요법 (hormonal therapy), 항체 (antibodies) 및 당업계에 익히 공지된 다른 치료 요법 (예를 들면, 수술)을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다른 확립된 또는 실험적 치료 요법과 병용(in combination)하여 대상체에 투여될 수 있다.
- [0642] 특정 실시양태들에 따르면, 본 발명의 몇몇 실시양태의 조성물과 병용하여 투여되는 치료제는 항체를 포함한다.
- [0643] 특정 실시양태들에 따르면, 본 명세서에 개시된 조성물 (예를 들면, 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 및/또는 이를 발현하는 숙주세포)은 골수 세포, 조혈 줄기 세포, PBMC, 제대혈 줄기 세포, 및/또는 유도 만능 줄기 세포와 같으나, 이에 제한되지 않은 입양 세포 (adoptive cell) 이식과 병용하여 대상체에 투여될 수 있다.
- [0644] 특정 실시양태들에 따르면, 본 발명의 몇몇 실시양태의 조성물과 병용하여 투여되는 치료제는 항암제를 포함한다.
- [0645] 본 발명의 특정 실시양태와 함께 사용할 수 있는 항암제는 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); 아스퍼린 (Asperlin); 아자시티딘 (Azacitidine); 아제테파 (Azetepa); 아조토마이신 (Azotomycin); 바티마스타트 (Batimastat); 벤조데파 (Benzodepa); 비칼루타미드 (Bicalutamide); 비산트렌 하이드로클로라이드 (Bisantrene Hydrochloride); 비스나파이드 디메실레이트 (Bisnafide Dimesylate); 비젤신 (Bizelesin); 블레오마이신 설페이트 (Bleomycin Sulfate); 브레퀴나르 나트륨 (Brequinar Sodium); 브로피리

민 (Bropirimine); 부설판 (Busulfan); 각티노마이신 (Cactinomycin); 칼로스테론 (Calusterone); 카라세미드 (Caracemide); 카베타이머 (Carbetimer); 카르보플라틴 (Carboplatin); 카르무스틴 (Carmustine); 카루비신 하이드로클로라이드 (Carubicin Hydrochloride); 카르젤레신 (Carzelesin); 세데핑골 (Cedefingol); 클로람부실 (Chlorambucil); 시롤레마이신 (Cirolemycin); 시스플라틴 (Cisplatin); 클라드리빈 (Cladribine); 크리스나톨 메실레이트 (Crisnatol Mesylate); 사이클로포스파미드 (Cyclophosphamide); 시타라빈 (Cytarabine); 다카르바진 (Dacarbazine); 닥티노마이신 (Dactinomycin); 다우노루비신 하이드로클로라이드 (Daunorubicin Hydrochloride); 데시타빈 (Decitabine); 텍소르마플라틴 (Dexormaplatin); 데자구아닌 (Dezaguanine); 데자구아닌 메실레이트 (Dezaguanine Mesylate); 디아지쿠온 (Diaziquone); 도세탁셀 (Docetaxel); 독소루비신 (Doxorubicin); 독소루비신 하이드로클로라이드 (Doxorubicin Hydrochloride); 드롤록시펜 (Droloxifene); 드롤록시펜 구연산염 (Droloxifene Citrate); 드로모스타놀론 프로피오네이트 (Dromostanolone Propionate); 두아조마이신 (Duazomycin); 에다트렉세이트 (Edatrexate); 에플로르니틴 하이드로클로라이드 (Eflornithine Hydrochloride); 엘사미트루신 (Elsamitrucin); 엔로플라틴 (Enloplatin); 엔프로메이트 (Enpromate); 에피프로피딘 (Epiropidine); 에피루비신 하이드로클로라이드 (Epirubicin Hydrochloride); 에르불로졸 (Erbulozole); 에소루비신 하이드로클로라이드 (Esorubicin Hydrochloride); 에스트라무스틴 (Estramustine); 에스트라무스틴 인산염 나트륨 (Estramustine Phosphate Sodium); 에타니다졸 (Etanidazole); 에토포사이드 (Etoposide); 에토포사이드 포스페이트 (Etoposide Phosphate); 에토프린 (Etoprine); 파드로졸 하이드로클로라이드 (Fadrozole Hydrochloride); 파자라빈 (Fazarabine); 펜레티나이드 (Fenretinide); 플록수리딘 (Floxuridine); 플루다라빈 인산염 (Fludarabine Phosphate); 플루오로우라실 (Fluorouracil); 플루오로시타빈 (Fluorocitabine); 포스키돈 (Fosquidone); 포스트리에신 나트륨 (Fostriecin Sodium); 겐시타빈 (Gemcitabine); 겐시타빈 하이드로클로라이드 (Gemcitabine Hydrochloride); 수산화요소 (Hydroxyurea); 이다루비신 하이드로클로라이드 (Idarubicin Hydrochloride); 이포스파미드 (Ifosfamide); 일모포신 (Ilmofoesine); 인터페론 알파-2a (Interferon Alfa-2a); 인터페론 알파-2b (Interferon Alfa-2b); 인터페론 알파-n1 (Interferon Alfa-n1); 인터페론 알파-n3 (Interferon Alfa-n3); 인터페론 베타-I a (Interferon Beta- I a); 인터페론 감마-I b (Interferon Gamma- I b); 이프로플라틴 (Iproplatin); 이리노테칸 하이드로클로라이드 (Irinotecan Hydrochloride); 란레오티드 아세테이트 (Lanreotide Acetate); 레트로졸 (Letrozole); 류프로라이드 아세테이트 (Leuprolide Acetate); 리아로졸 하이드로클로라이드 (Liarozole Hydrochloride); 로메트렉솔 나트륨 (Lometrexol Sodium); 로무스틴 (Lomustine); 로속산트론 하이드로클로라이드 (Losoxantrone Hydrochloride); 마소프로콜 (Masoprocil); 메이탄신 (Maytansine); 메클로레타민 하이드로클로라이드 (Mechlorethamine Hydrochloride); 메게스트롤 아세테이트 (Megestrol Acetate); 멜렌게스트롤 아세테이트 (Melengestrol Acetate); 멜팔란 (Melphalan); 메노가릴 (Menogaril); 메르캅토퓨린 (Mercaptopurine); 메토트렉세이트 (Methotrexate); 메토트렉세이트 나트륨 (Methotrexate Sodium); 메토프린 (Metoprine); 메투레데파 (Meturedepa); 미틴도마이드 (Mitindomide); 미토카신 (Mitocarcin); 미토크로민 (Mitocromin); 미토길린 (Mitogillin); 미토말신 (Mitomalcin); 미토마이신 (Mitomycin); 마이토스퍼 (Mitosper); 미토탄 (Mitotane); 미톡산트론 하이드로클로라이드 (Mitoxantrone Hydrochloride); 미코페놀산 (Mycophenolic Acid); 노코다졸 (Nocodazole); 노갈라마이신 (Nogalamycin); 오르마플라틴 (Ormaplatin); 옥시수란 (Oxisuran); 파클리탁셀 (Paclitaxel); 페가스파가제 (Pegaspargase); 펠리오마이신 (Peliomycin); 펜타무스틴 (Pentamustine); 페플로마이신 설페이트 (Peplomycin Sulfate); 퍼포스파미드 (Perfosfamide); 피포브로만 (Pipobroman); 피포술티판 (Piposulfan); 피로산트론 하이드로클로라이드 (Piroxantrone Hydrochloride); 플리카마이신 (Plicamycin); 플로메스탄 (Plomestane); 포르피머 나트륨 (Porfimer Sodium); 포르피로마이신 (Porfiromycin); 프레드니무스틴 (Prednimustine); 프로카바진 하이드로클로라이드 (Procarbazine Hydrochloride); 퓨로마이신 (Puromycin); 퓨로마이신 하이드로클로라이드 (Puromycin Hydrochloride); 피라조푸린 (Pyrazofurin); 리보프린 (Riboprine); 로글레티미드 (Rogletimide); 사핑골 (Safingol); 사핑골 하이드로클로라이드 (Safingol Hydrochloride); 세무스틴 (Semustine); 심트라젠 (Simtrazene); 스파포세이트 나트륨 (Sparfosate Sodium); 스파르소마이신 (Sparsomycin); 스피로게르마늄 하이드로클로라이드 (Spirogermanium Hydrochloride); 스피로무스틴 (Spiromustine); 스피로플라틴 (Spiroplatin); 스트렙토니그린 (Streptonigrin); 스트렙토조신 (Streptozocin); 술로페누르 (Sulofenur); 탈리소마이신 (Talisomycin); 택솔 (Taxol); 테코갈란 나트륨 (Tecogalan Sodium); 테가푸르 (Tegafur); 텔록산트론 하이드로클로라이드 (Teloxantrone Hydrochloride); 테모포르핀 (Temoporfin); 테니포사이드 (Teniposide); 테록시론 (Teroxirone); 테스토락톤 (Testolactone); 티아미프린 (Thiamiprine); 티오구아닌 (Thioguanine); 티오테파 (Thiotepa); 티아조푸이린 (Tiazofuirin); 티라파자민 (Tirapazamine); 토포테칸 하이드로클로라이드 (Topotecan Hydrochloride); 토레미펜 구연산염 (Toremifene Citrate); 트레스톨론 아세테이트 (Trestolone Acetate); 트리시리빈 인산염 (Triciribine)

Phosphate); 트리메트렉세이트 (Trimetrexate); 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트 (Trimetrexate Glucuronate); 트립토렐린 (Triptorelin); 튜블로졸 하이드로클로라이드 (Tubulozole Hydrochloride); 우라실 머스타드 (Uracil Mustard); 우레데파 (Uredepa); 바프레티드 (Vapreotide); 베르테포르핀 (Verteporfin); 빈블라스틴 설페이트 (Vinblastine Sulfate); 빈크리스틴 설페이트 (Vincristine Sulfate); 빈데신 (Vindesine); 빈데신 설페이트 (Vindesine Sulfate); 비네피딘 설페이트 (Vinepidine Sulfate); 빈글리시네이트 설페이트 (Vinglycinate Sulfate); 황산빈류로신 (Vinleurosine Sulfate); 비노렐빈 타르트레이트 (Vinorelbine Tartrate); 빈로시딘 설페이트 (Vinrosidine Sulfate); 빈졸리딘 설페이트 (Vinzolidine Sulfate); 보로졸 (Vorozone); 제니플라틴 (Zeniplatein); 지노스타틴 (Zinostatin); 조루비신 하이드로클로라이드 (Zorubicin Hydrochloride) 항암제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 추가적인 항종양제는 Antineoplastic Agents (Paul Calabresi and Bruce A. Chabner) 52장, 및 이에 대한 개요(introduction), 및 Goodman and Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division), 1202-1263에 개시된 항종양제를 포함한다.

[0646] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 항암제는 항체를 포함한다.

[0647] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 항체는 리툭시맙 (rituximab), 세툭시맙 (cetuximab), 트라스투주맙 (trastuzumab), 에드레콜로맙 (edrecolomab), 알렘투주맙 (alentuzumab), 겐투주맙 (gentuzumab), 이브리투모맙 (ibritumomab), 파니투무맙 (panitumumab) 벨리무맙 (Belimumab), 베바시주맙 (Bevacizumab), 비바투주맙 메르탄신 (Bivatuzumab mertansine), 블리나투모맙 (Blinatumomab), 블론투베티맙 (Blontuvetmab), 브렌톡시맙 베도틴 (Brentuximab vedotin), 카투막소맙 (Catumaxomab), 시수투무맙 (Cixutumumab), 다클리주맙 (Daclizumab), 아달리무맙 (Adalimumab), 베즐로톡수맙 (Bezlotoxumab), 세르톨리주맙 페골 (Certolizumab pegol), 시타투주맙 보가톡스 (Citatumumab bogatox), 다라투무맙 (Daratumumab), 디누톡시맙 (Dinutuximab), 엘로투주맙 (Elotuzumab), 에르투막소맙 (Ertumaxomab), 에타라시주맙 (Etaracizumab), 겐투주맙 오조가미신 (Gemtuzumab ozogamicin), 지렌톡시맙 (Girentuximab), 네시투무맙 (Necitumumab), 오비누투주맙 (Obinutuzumab), 오파투무맙 (Ofatumumab), 페르투주맙 (Pertuzumab), 라무시루맙 (Ramucirumab), 실톡시맙 (Siltuximab), 토시투모맙 (Tositumomab), 니볼루맙 (Nivolumab), 펌브롤리주맙 (Pembrolizumab), 두르발루맙 (Durvalumab), 아테졸리주맙 (Atezolizumab), 아벨루맙 (Avelumab), 트라스투주맙 (Trastuzumab) 및 이필리무맙 (ipilimumab)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0648] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 항체는 리툭시맙 및 세툭시맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0649] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 치료제 또는 상기 항암제는 IMiD (예를 들면, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드)를 포함한다.

[0650] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 IMiD는 탈리도마이드, 레날리도마이드 및 포말리도마이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0651] 특정 실시양태들에 따르면, 본 발명의 몇몇 실시양태의 조성물과 병용하여 투여되는 치료제는 항감염제 (예를 들면, 항생제 및 항바이러스제)를 포함한다.

[0652] 특정 실시양태들에 따르면, 본 발명의 몇몇 실시양태의 조성물과 병용하여 투여되는 치료제는 면역 억제제 (예를 들면, GCSF 및 기타 골수 자극제, 스테로이드)를 포함한다.

[0653] 특정 실시양태들에 따르면, 병용 요법은 상가 효과 (additive effect)를 갖는다.

[0654] 특정 실시양태들에 따르면, 병용 요법은 상승 효과 (synergistic effect)를 갖는다.

[0655] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 질병 치료를 위한 치료제를 포장하는 포장재; 및 이종이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 포함하는 숙주 세포;를 포함하는 제조 물품이 제공된다.

[0656] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 제조 물품은 이종이량체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 질병, 예를 들면 면역 세포를 조절하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병의 치료를 위해 식별된다.

[0657] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병을 치료하기 위한 치료제; 이종이량체, 또는 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 발현하는 숙주 세포는 별도의 용기에 포장된다.

[0658] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 질병을 치료하기 위한 치료제; 이종이량체, 또는 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템, 또는 이를 발현하는 숙주 세포는 공동-제형(co-formulation)으로 포장된다.

- [0659] 특정 실시양태들에 따르면, 이중이량체는 이중성 치료학적 모이어티에 부착되거나 이중성 치료학적 모이어티를 포함한다. 상기 치료학적 모이어티는 소분자 화합물 및 폴리펩티드를 포함하는 임의의 분자일 수 있다.
- [0660] 본 발명의 특정 실시양태들과 함께 사용될 수 있는 치료학적 모이어티의 비제한적인 예시는 세포독성 모이어티, 독성 모이어티, 시토키인 모이어티, 번역조절 모이어티, 폴리펩티드, 항체, 약물, 화학물질 및/또는 방사성 동위원소를 포함한다.
- [0661] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 치료학적 모이어티는 본 발명의 몇몇 실시양태의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 치료학적 모이어티를 인코딩하는 핵산 서열과 번역적으로 융합(translationally fusing)함으로써 접합된다.
- [0662] 추가적으로 또는 대안적으로, 치료학적 모이어티는 당업자에게 공지된 임의의 접합 방법을 사용하여 본 발명의 몇몇 실시양태의 이중이량체에 화학적으로 접합(커플링)될 수 있다. 예를 들면, 펩티드는 하기를 사용하여 목적하는 제제에 접합될 수 있다: 3-(2-피리딜디티오) 프로피온산 N 하이드록시숙신이미드 에스테르 (N-숙신이미드 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 라고도 불림) ("SDPD") (Sigma, Cat. No. P-3415; see e.g., Cumber et al. 1985, Methods of Enzymology 112: 207-224), 글루타르알데히드 접합 절차 (glutaraldehyde conjugation procedure) (예를 들면, G.T. Hermanson 1996, "Antibody Modification and Conjugation, in Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego 참조) 또는 카르보디이미드 접합 절차 (carbodiimide conjugation procedure) [예를 들면, 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 and L.J. Mathias 1979, Synthesis 561 참조].
- [0663] 치료학적 모이어티는 예를 들면, 당업계에서 널리 사용되는 표준 화학적 합성 기술을 사용하여 본 발명의 몇몇 실시양태의 이중이량체에 부착될 수 있으며[예를 들면, [hypertexttransferprotocol://worldwideweb\(dot\)chemistry\(dot\)org/portal/Chemistry](http://hypertexttransferprotocol://worldwideweb(dot)chemistry(dot)org/portal/Chemistry)] 참조], 표준 화학적 합성 기술은 예를 들면, 펩티드 결합을 통해 (기능적 모이어티가 폴리펩티드인 경우), 또는 링커 펩티드와 같은 개체 링커 요소 또는 유기 고분자와 같은 기타 화학적 모이어티와 공유 결합을 통해 직접접적으로 임의의 적합한 화학적 결합을 사용하는 것이 있다. 키메라 펩티드는 펩티드의 카르복시 (C) 또는 아미노 (N) 말단에서의 결합을 통해, 또는 직쇄, 분지쇄, 또는 고리형 측쇄, 내부 탄소, 또는 질소 원자 등과 같은 내부 화학기에 대한 결합을 통해 연결될 수 있다.
- [0664] 본 명세서에서, 상호교환적으로 사용되는 용어 "아미노산 서열", "단백질", "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질 성 모이어티"는 천연 펩티드 (분해 생성물, 합성적으로 합성된 펩티드 또는 재조합 펩티드), 펩티도모방체 (통상적으로, 합성적으로 합성된 펩티드), 및 펩티드의 유사체인 펩토이드(peptoid) 및 세미펩토이드(semipeptoid) - 예를 들면, 펩티드가 생체 내에서 보다 안정적이게 하거나 세포 내로 더욱 침투하도록 하는 변형을 가질 수 있음 - 를 포함한다. 이러한 변형은 N 말단 변형, C 말단 변형, 펩티드 결합 변형, 골격 변형, 및 잔기 변형을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 펩티도모방체 화합물의 제조 방법은 당업계에 익히 공지되어 있으며, 예를 들면 Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)은 본 명세서에 전문이 기재된 것처럼 참조로 포함된다. 이 부분에 대한 추가적인 세부사항은 하기와 같다.
- [0665] 펩티드 내의 펩티드 결합 (-CO-NH-)은 예를 들면, N-메틸화 아미드 결합 (-N(CH₃)-CO-), 에스테르 결합 (-C(=O)-O-), 케토메틸렌 결합 (-CO-CH₂-), 설파닐메틸렌 결합 (-S(=O)-CH₂-), α-아자 결합 (-NH-N(R)-CO-) (여기서, R은 임의의 알킬 (예를 들면, 메틸)), 아민 결합 (-CH₂-NH-), 설파이드 결합 (-CH₂-S-), 에틸렌 결합 (-CH₂-CH₂-), 하이드록시에틸렌 결합 (-CH(OH)-CH₂-), 티오아미드 결합 (-CS-NH-), 올레핀 이중 결합 (-CH=CH-), 플루오르화 올레핀 이중 결합 (-CF=CH-), 레트로 아미드 결합 (-NH-CO-), 펩티드 유도체 (-N(R)-CH₂-CO-) (여기서 R은 탄소 원자에 자연적으로 존재하는 "노르말(normal)" 측쇄로 치환될 수 있다.
- [0666] 이 변형들은 펩티드 사슬을 따라 임의의 결합에서 발생할 수 있으며, 동시에 여러 (2-3) 결합에서도 발생할 수 있다.
- [0667] 천연 방향족 아미노산, Trp, Tyr, 및 Phe는 1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린-3-카르복실산 (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid, Tic), 나프틸알라닌 (naphthylalanine), 페닐알라닌의 고리 메틸화 유도체 (ring-methylated derivatives of Phe), 페닐알라닌의 할로겐화 유도체 (halogenated derivatives of Phe) 또는 O-methyl-Tyr와 같은 비천연 방향족 아미노산으로 치환될 수 있다.
- [0668] 본 발명의 몇몇 실시양태의 펩티드는 또한 하나 이상의 변형된 아미노산 또는 하나 이상의 비-아미노산 단량체

(예를 들면, 지방산, 복합 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.

[0669] 용어 "아미노산" 또는 "아미노산들"은 20개의 자연 발생 아미노산; 예를 들면, 하이드록시프롤린, 포스포세린, 및 포스포트레오닌을 포함하는, 흔히 생체 내에서 번역후 변형된 아미노산들; 및 2-아미노아디프산, 하이드록시 라이신, 이소테스모신, 노르-발린, 노르-류신, 및 오르니틴을 포함하나, 이에 제한되지 않는 기타 일반적이지 않은 아미노산들을 포함하는 것으로 이해된다. 또한, 용어 "아미노산"은 D- 및 L-아미노산 둘 모두를 포함한다.

[0670] 하기 표 1 및 2는 본 발명의 몇몇 실시양태와 함께 사용될 수 있는 자연 발생한 아미노산 (표 1), 및 비-통상적이거나 변형된 아미노산 (예를 들면, 합성 아미노산, 표 2)을 나열한다.

[0671] [표 1]

아미노산	세 글자 약어	한 글자 약어
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라진	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
상기 중 어느 하나의 아미노산	Xaa	X

[0672]

[0673] [표 2]

비-통상적인 아미노산	코드	비-통상적인 아미노산	코드
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-(카바밀메틸)글리신	Nasn
D-아스파르트산	Dasp	N-(카복시메틸)글리신	Nasp
D-시스테인	Dcys	N-(티오메틸)글리신	Ncys
D-글루타민	Dgln	N-(2-카바밀메틸)글리신	Ngln
D-글루탐산	Dglu	N-(2-카복시메틸)글리신	Nglu
D-히스티딘	Dhis	N-(이미다졸메틸)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-메틸티오메틸)글리신	Nmet
D-오르니틴	Dorn	N-(3-아미노프로필)글리신	Norn
D-페닐알라닌	Dphe	N-벤질글리신	Nphe
D-프로린	Dpro	N-(하이드록시메틸)글리신	Nser
D-세린	Dser	N-(1-하이드록시메틸)글리신	Nthr
D-트레오닌	Dthr	N-(3-인돌메틸)글리신	Nhtrp
D-트립토판	Dtrp	N-(<i>p</i> -하이드록시페닐)글리신	Ntyr
D-티로신	Dtyr	N-(1-메틸메틸)글리신	Nval

[0674]

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-메틸아스파라트산	Nmasp
D-N-메틸시스테인	Dnmcys	L-N-메틸시스테인	Nmcys
D-N-메틸글루타메이트	Dnmglu	L-N-메틸글루타민	Nmgln
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-메틸프로린	Dnmpro	L-N-메틸프로린	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	Nmnle
L-노르발린	Nva	L-N-메틸노르발린	Nmnva
L-에틸글리신	Etg	L-N-메틸-에틸글리신	Nmetg
L-t-부틸글리신	Tbug	L-N-메틸-t-부틸글리신	Nmtbug

[0675]

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
D- α -메틸아르기닌	Dmarg	L- α -메틸아르기닌	Marg
D- α -메틸아스파라긴	Dmasn	L- α -메틸아스파라긴	Masn
D- α -메틸아스파르테이트	Dmasp	L- α -메틸아스파르테이트	Masp
D- α -메틸시스테인	Dmcys	L- α -메틸시스테인	Mcys
D- α -메틸글루타민	Dmgln	L- α -메틸글루타민	Mgln
D- α -메틸글루탐산	Dmglu	L- α -메틸글루타메이트	Mglu
D- α -메틸 히스티딘	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

[0676]

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- <i>t</i> -부틸글리신	Mtbug
N-사이클로데실글리신	Ncdec	L- α -메틸-호모페닐알라닌	Mhphe
N-사이클로도데실글리신	Ncdod	α -메틸- α -나프틸알라닌	Manap
N-사이클로옥틸글리신	Ncoct	α -메틸페닐실라민	Mpen
N-사이클로프로필글리신	Ncpro	α -메틸- γ -아미노부티레이트	Mgabv
N-사이클로운데실글리신	Ncund	α -메틸-사이클로헥실알라닌	Mchexa
N-(2-아미노에틸)글리신	Naeg	α -메틸-사이클로펜사이클로펜틸알라닌	Mcpen
N-(2,2-디페닐에틸)글리신	Nbhm	N-(N-(2,2-디페닐에틸)카바밀메틸-글리신	Nnbhm
N-(3,3-디페닐프로필)글리신	Nbhe	N-(N-(3,3-디페닐프로필)카바밀메틸-글리신	Nnbhe
1-카르복시-1-(2,2-디페닐에틸아미노)사이클로프로판	Nmbc	1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복실산	Tic
포스포세린	pSer	포스포트레오닌	pThr
포스포티로신	pTyr	O-메틸-티로신	
2-아미노아디프산		하이드록시라이신	

[0677]

[0678]

본 발명의 몇몇 실시양태의 펩티드는 바람직하게는 선형 형태로 사용되지만, 고리화가 펩티드 특성을 심각하게 방해하지 않는 경우, 펩티드의 고리 형태도 사용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0679]

본 발명의 이중이량체는 바람직하게는 이중이량체가 가용성 형태일 것을 요구하는 치료제에 사용되기 때문에, 본 발명의 몇몇 실시양태의 펩티드들은 이들의 하이드록실-함유 측쇄로 인해 펩티드 용해도를 증가시킬 수 있는 세린 및 트레오닌을 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 비천연 또는 천연 극성 아미노산을 포함한다.

[0680]

본 발명의 펩티드의 아미노산은 보존적으로 또는 비-보존적으로 치환될 수 있다.

[0681]

상기 용어 “보존적 치환”은 펩티드의 천연 서열 (native sequence)에 존재하는 아미노산을 유사한 입체 특성을 갖는 자연 또는 비자연적으로 발생하는 아미노산 또는 펩티도모방체로 대체하는 것을 지칭한다. 대체될 천연 아미노산의 측쇄가 극성 또는 소수성인 경우, 보존적 치환은 (대체된 아미노산의 측쇄와 동일한 입체적 특성을 갖는 것 외에) 극성 또는 소수성인 자연 발생 아미노산, 비자연 발생 아미노산, 또는 펩티도모방체 모이어티로 이루어져야 한다.

[0682]

자연 발생 아미노산은 일반적으로 특성에 따라 분류되므로, 자연 발생 아미노산에 의한 보존적 치환은 본 발명에 따라 입체적으로 유사한 비하전된 아미노산에 의한 하전된 아미노산의 대체는 보존적 치환으로 고려될 수 있다는 사실을 염두에 두고 쉽게 결정할 수 있다.

[0683]

비자연 발생 아미노산에 의한 보존적 치환을 생성하기 위해 당업계에 익히 공지된 아미노산 유사체 (합성 아미노산)를 사용하는 것도 가능하다. 자연 발생 아미노산의 펩티도모방체는 숙련된 기술자에게 공지된 문헌에 잘

문서화되어있다.

- [0684] 보존적 치환에 영향을 미칠 때, 치환 아미노산은 측쇄에 원래 아미노산과 동일하거나 유사한 작용기를 가져야 한다.
- [0685] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업계에 익히 공지되어 있다. 어떤 아미노산 변화가 표현형으로 침묵할 가능성이 있는지에 관한 지침은 Bowie et al., 1990, Science 247: 1306 1310에서도 찾을 수 있다. 이 보존적으로 변형된 변이체는 다형성 변이체 (polymorphic variants), 종간 동족체 (interspecies homologs), 및 대립 유전자 (alleles)에 추가되며 이들을 배제되지 않는다. 통상적인 보존적 치환은 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)(예를 들면, Creighton, Proteins(1984) 참조)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 아미노산은 측쇄와 관련된 특성을 기반으로 치환될 수 있으며, 예를 들면 극성 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들면 세린(S) 및 트레오닌(T); 측쇄의 전하를 기반으로 하는 아미노산, 예를 들면 아르기닌(R) 및 히스티딘(H); 및 소수성 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들면 발린(V) 및 류신(L)은 치환될 수 있다. 상술한 바와 같이, 변화는 일반적으로 단백질의 폴딩 또는 활성에 상당한 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환과 같은 사소한 특성을 갖는다.
- [0686] 본 발명에서, 어구 “비보존적 치환”은 상이한 전기화학적 및/또는 입체적 특성을 갖는 또 다른 자연 또는 비자연 발생 아미노산에 의한 모체 서열 (parent sequence)에 존재하는 아미노산의 대체를 지칭한다.
- [0687] 따라서, 치환 아미노산의 측쇄는 치환되는 천연 아미노산의 측쇄보다 유의하게 더 클 (더 작을) 수 있고/있거나 치환되는 아미노산과 상당히 상이한 전자 특성을 갖는 작용기를 가질 수 있다. 이 유형의 비보존적 치환의 예시는 알라닌 대신 페닐알라닌 또는 사이클로헥실메틸 글리신로의 치환, 글리신 대신 이소류신으로의 치환, 아스파르트산 대신 -NH-CH [(-CH₂)₅-COOH] -CO-로의 치환을 포함한다. 본 발명의 범주에 속하는 이 비보존적 치환은 여전히 항박테리아 특성을 갖는 펩티드를 구성하는 것이다.
- [0688] 본 발명의 펩티드의 N 및 C 말단은 작용기에 의해 보호될 수 있다. 적합한 작용기는 Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991에 기재되어 있으며, 이의 교시 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다. 바람직한 보호기는, 예를 들면 화합물의 친수성을 감소시키고 친유성을 증가시킴으로써 그에 부착된 화합물의 세포 내로의 수송을 용이하게 하는 것이다.
- [0689] 특정 실시양태들에 따르면, 아미노산들 중 하나 이상은 예를 들면 작용기의 추가에 의해 변형될 수 있다 (개념적으로 “화학적으로 변형된”으로 간주됨). 예를 들면, 천연 서열에 나타나는 측쇄 아미노산 잔기는 선택적으로 변형될 수 있지만, 하기에 기술된 바와 같이 대안적으로 단백질의 다른 부분은 측쇄 아미노산 잔기에 추가하여 또는 측쇄 아미노산 잔기를 대체하여 선택적으로 변형될 수 있다. 상기 변형은, 예를 들면 화학적 합성 과정에 화학적으로 변형된 아미노산을 추가하는 것이 뒤따르는 경우, 분자의 합성 동안 선택적으로 수행될 수 있다. 그러나 분자에 이미 존재하는 아미노산의 화학적 변형 ("in situ" 변형)도 가능하다. 펩티드 또는 단백질로의 변형은 예를 들면 액소뉴클레아제 결실, 화학적 변형, 또는 이중성 도메인 또는 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 융합에 의한, 유전자 합성, 부위-특이적 (예를 들면, PCR 기반) 또는 무작위 돌연변이유발 (예를 들면, EMS)에 의해 도입될 수 있다.
- [0690] 본 명세서에서 사용되는 용어 “화학적 변형”은 펩티드를 언급할 때, 적어도 하나의 아미노산 잔기가 당업계에 익히 공지된 가공 또는 기타 번역 후 변형과 같은 자연적 과정에 의해, 또는 화학적 변형 기술에 의해 변형되었을 때의 펩티드를 지칭한다. 변형의 비제한적인 예시적인 유형은 카르복시메틸화, 아세틸화, 아실화, 인산화, 글리코실화, 아미드화, ADP-리보실화, 지방 아실화, 파르네실 기, 이소파르네실 기, 탄수화물 기, 지방산 기, 접합을 위한 링커의 첨가, 기능화, GPI 앵커 형성, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 메틸화, 미리스틸화, 페길화, 프레닐화, 인산화, 유비퀴틴화, 또는 임의의 유사한 과정 및 공지된 보호/차단기를 포함한다. 에테르 결합은 세린 또는 트레오닌 하이드록실을 당의 하이드록실에 연결하는데 선택적으로 사용될 수 있다. 아미드 결합은 글루타메이트 또는 아스파르테이트 카르복실기를 당의 아미노기에 연결하는데 선택적으로 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 선택적으로 형성될 수 있다. 지방산 아실 유도체는 예를 들면 유리 아미노기(예를 들면, 라이신)의 아실화에 의해 선택적으로 제조될 수 있다 (Toth et al., Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)).

- [0691] 특정 실시양태들에 따르면, 변형은 PCT 출원 번호 제WO 2006/050262호에 기재된 바와 같이, 펩티드에 사이클로알칸 모이어티를 추가하는 것을 포함하며, 이는 본 명세서에 완전히 기재된 것처럼 참조로 포함된다. 이 모이어티는 생체분자와 함께 사용하도록 고안되었으며 선택적으로 단백질에 다양한 특성을 부여하는데 사용할 수 있다.
- [0692] 또한, 선택적으로 펩티드 상의 임의의 지점이 변형될 수 있다. 예를 들면, 단백질 상의 당화 모이어티의 PEG화는 PCT 출원 번호 WO 2006/050247에 기재된 바와 같이 임의로 수행될 수 있으며, 이는 본 명세서에 완전히 기재된 것처럼 참조로 포함된다. 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 기가 O-연결 및/또는 N-연결 글리코실화에 선택적으로 추가될 수 있다. PEG 기는 선택적으로 분지형 또는 선형일 수 있다. 선택적으로, 임의의 유형의 수용성 중합체는 글리코실 링커를 통해 단백질 상의 글리코실화 부위에 부착될 수 있다.
- [0693] "PEG화된 단백질 (PEGylated protein)"은 단백질의 아미노산 잔기에 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티를 갖는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 이의 단편을 의미한다.
- [0694] "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 커플링제의 존재 또는 부재 하에서, 또는 커플링 또는 활성화 모이어티 (예를 들면, 티올, 트리플레이트, 트레일레이트, 아지르딘, 옥시란, 또는 바람직하게는 말레이미드 모이어티)를 이용한 유도체화의 존재 또는 부재 하에서, 폴리알킬렌 글리콜 화합물 또는 이의 유도체를 의미한다. 말레이미드 모노메톡시 PEG와 같은 화합물은 본 발명의 예시적인 또는 활성화된 PEG 화합물이다. 폴리프로필렌 글리콜과 같은 다른 폴리알킬렌 글리콜 화합물이 본 발명에서 사용될 수 있다. 기타 적절한 폴리알킬렌 글리콜 화합물은 하기 유형의 하전 또는 중성 중합체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 덱스트란, 콜로민산 또는 기타 탄수화물 기반 중합체, 아미노산 중합체 및 비오틴 유도체.
- [0695] 특정 실시양태들에 따르면, 펩티드는 변형된 글리코실화 패턴(즉, 원래 또는 고유 글리코실화 패턴으로부터 변경됨)을 갖도록 변형된다. 본 명세서에서 사용되는 "변경된 (altered)"은 하나 이상의 탄수화물 모이어티가 결실되고/되거나 원래 단백질에 적어도 하나의 글리코실화 부위를 갖는 것을 의미한다.
- [0696] 단백질의 글리코실화는 일반적으로 N-연결 또는 O-연결이다. N-연결은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착하는 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티를 효소적으로 부착하기 위한 인식 서열 (recognition sequence)이다. 따라서, 폴리펩티드에서 이 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 형성한다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스 또는 자일로오스 중 하나가 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신도 사용될 수 있다.
- [0697] 펩티드에 글리코실화 부위를 추가하는 것은 펩티드의 아미노산 서열을 변경 (alter)하여 하나 이상의 전술한 트리펩티드 서열 (N-연결 글리코실화 부위의 경우)을 함유하도록 함으로써 편하게 수행된다. 변경은 원래 펩티드의 서열 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우)에서 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 추가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다. 펩티드의 아미노산 서열은 DNA 수준에서 변화를 도입함으로써 또한 변경될 수 있다.
- [0698] 펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또 다른 수단은 펩티드의 아미노산 잔기에 글리코시드의 화학적 또는 효소적 커플링에 의한 것이다. 사용된 커플링 모드에 따라, 당은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카르복실기, (c) 시스테인과 같은 유리 설프하이드릴기, (d) 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린과 같은 유리 하이드록실기 (e) 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판과 같은 방향족 잔기, 또는 (f) 글루탐인의 아미드기에 부착될 수 있다. 이 방법은 예를 들면 WO 87/05330과 Aplin 및 Wriston, CRC Crit. Rev.Biochem., 22: 259-306(1981)에 기재되어 있다.
- [0699] 펩티드에 존재하는 임의의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로, 효소적으로 또는 DNA 수준에서 변화를 도입함으로써 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 펩티드를 트리플루오로메탄설폰산 또는 동등한 화합물에 노출시켜야 한다. 이 처리는 연결당 (N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당의 절단을 초래하여 아미노산 서열을 손상 없이 보존하도록 한다.
- [0700] 화학적 탈글리코실화는 Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987); and Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981)에 기재되어 있다. 펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138: 350(1987)에 기재된 바와 같이 다양한 엔도- 및 엑소- 글리코시다제의 사용으로 달성될 수 있다.

- [0701] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 펩티드는 검출 가능한 태그 (detectable tag)를 포함한다. 본 발명의 일 실시양태에서 사용되는 용어 “검출 가능한 태그”는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 숙련된 기술자에 의해 검출될 수 있는 임의의 모이어티를 지칭한다. 검출 가능한 태그는 펩티드 서열일 수 있다. 선택적으로 검출 가능한 태그는 화학 작용제 또는 단백질 분해와 같은 효소적 수단에 의해 제거될 수 있다. 본 발명의 몇몇 실시양태의 검출 가능한 태그는 펩티드의 정제를 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 용어 “검출 가능한 태그”는 키틴 결합 단백질 (chitin binding protein, CBP)-태그, 말토스 결합 단백질 (maltose binding protein, MBP)-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (glutathione-S-transferase, GST)-태그, poly(His)-태그, FLAG 태그, V5-tag, c-myc-tag 및 HA-tag와 같은 에피토프 태그, 및 녹색 형광 단백질 (green fluorescent protein, GFP), 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein, RFP), 황색 형광 단백질 (yellow fluorescent protein, YFP), 청색 형광 단백질 (blue fluorescent protein, BFP) 및 시안 형광 단백질 (cyan fluorescent protein, CFP)와 같은 형광 태그; 뿐만 아니라 상기 태그의 유도체, 또는 당업계에 공지된 임의의 태그를 포함한다. 용어 “검출 가능한 태그”는 용어 “검출 가능한 마커”를 포함한다.
- [0702] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 펩티드는 이의 N-말단에 부착된 검출 가능한 태그 (예를 들면, poly(His)-태그)를 포함한다.
- [0703] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 펩티드는 이의 C-말단에 부착된 검출 가능한 태그 (예를 들면, poly(His)-태그)를 포함한다.
- [0704] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 펩티드의 N-말단은 검출 가능한 태그 (예를 들면, poly(His)-태그)를 포함하지 않는다.
- [0705] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 펩티드의 C-말단은 검출 가능한 태그 (예를 들면, poly(His)-태그)를 포함하지 않는다.
- [0706] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 펩티드는 절단 가능한 모이어티 (cleavable moiety)에 융합된다. 따라서, 예를 들면, 회복을 용이하게 하기 위해, 발현된 코딩 서열을 본 발명의 몇몇 실시양태의 펩티드 및 융합된 절단 가능한 모이어티를 인코딩하도록 조작 (engineer)할 수 있다. 일 실시양태에서, 펩티드는 친화성 크로마토그래피에 의해 (예를 들면, 절단 가능한 모이어티에 대해 특이적인 컬럼의 고정화에 의해) 용이하게 분리되도록 설계되었다. 일 실시양태에서, 절단 부위를 펩티드와 절단 가능한 모이어티 사이에서 조작 (engineer)하고, 펩티드는 이 부위에서 융합 단백질을 특이적으로 절단하는 적절한 효소 또는 제제로 처리함으로써 크로마토그래피 컬럼으로부터 방출될 수 있다 [예를 들면, Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); 및 Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990) 참조]. 특정 실시양태들에 따르면, 펩티드는 분리된 펩티드이다.
- [0707] 본 발명의 몇몇 실시양태의 펩티드 및 이를 포함하는 펩티드는 고체상 및 재조합 기술과 같으나, 이에 제한되지 않은 펩티드 합성 분야의 당업자에게 공지된 임의의 기술로 합성 및 정제될 수 있다.
- [0708] 고체상 펩티드 합성의 경우, J. M. Stewart and J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 및 J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1973에서 많은 기술의 요약물을 찾을 수 있다. 고전적인 용액 합성에 대해서는 G. Schroder and K. Lupke, The Peptides, vol. 1, Academic Press (New York), 1965을 참조한다.
- [0709] 일반적으로, 이 방법들은 하나 이상의 아미노산 또는 적절하게 보호된 아미노산을 성장하는 펩티드 사슬에 순차적으로 추가하는 것을 포함한다. 일반적으로 제1 아미노산의 아미노 또는 카르복실기는 적합한 보호기에 의해 보호된다. 보호된 또는 유도체화된 아미노산은 불활성 고체 지지체에 부착되거나 아미드 결합을 형성하기에 적합한 조건 하에 적합하게 보호된 상보적 (아미노 또는 카르복실) 기를 갖는 서열에 다음 아미노산을 첨가함으로써 용액에서 사용될 수 있다. 이어서, 새로 추가된 아미노산 잔기로부터 보호기가 제거되고, 다음 아미노산 (적합하게 보호됨) 등이 추가된다. 모든 원하는 아미노산을 적절한 순서로 연결한 후, 남아있는 보호기 (및 임의의 고체 지지체)를 순차적으로 또는 동시에 제거하여 최종 펩티드 화합물을 제공한다. 이 일반적인 절차를 간단하게 변형함으로써, 예를 들면, (카이랄 중심을 라세미화하지 않는 조건에서) 보호된 트리펩티드를 적절하게 보호된 디펩티드와 커플링함으로써 탈보호 후 펜타펩티드 등을 형성하는 것처럼 성장하는 사슬에 한 번에 하나 이상의 아미노산을 추가할 수 있다. 펩티드 합성에 대한 추가 설명은 미국 특허 번호 제6,472,505호에 기재되어 있다.
- [0710] 본 발명의 몇몇 실시양태의 펩티드 화합물을 제조하는 바람직한 방법은 고체상 펩티드 합성을 포함한다.

- [0711] 대규모 펩티드 합성은 Andersson Biopolymers 2000;55(3):227-50에 기재되어 있다.
- [0712] 특정 실시양태들에 따르면, 펩티드는 생체 외 (in vitro) 발현 시스템을 사용하여 합성된다. 이러한 생체 외 (in vitro) 합성 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고 시스템의 구성요소는 상업적으로 구비가능하다.
- [0713] 특정 실시양태들에 따르면, 펩티드 또는 이를 포함하는 이중이량체는 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. "재조합" 펩티드 또는 단백질을 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 펩티드 또는 단백질을 지칭한다; 즉, 원하는 펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 외인성 DNA 작제물에 의해 형질전환된 세포로부터 생산된다.
- [0714] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 이중이량체를 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드, 및 숙주 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 지시하기 위한 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물 또는 시스템이 제공된다.
- [0715] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 80 및 82 또는 서열 번호: 80 및 84에 제시된 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적인 실시양태를 나타낸다.
- [0716] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호: 86 및 82, 서열 번호: 90 및 92, 또는 서열 번호: 86 및 84에 제시된 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적인 실시양태를 나타낸다.
- [0717] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호: 80 및 82 또는 서열 번호: 80 및 84를 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적인 실시양태를 나타낸다.
- [0718] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호: 86 및 82, 서열 번호: 90 및 92 또는 서열 번호: 86 및 84를 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적인 실시양태를 나타낸다.
- [0719] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호: 147 및 82, 서열 번호: 143 및 139, 서열 번호: 145 및 141, 서열 번호: 86 및 139, 서열 번호: 86 및 141, 서열 번호: 147 및 139, 서열 번호: 149 및 139, 서열 번호: 80 및 139, 서열 번호: 155 및 139, 서열 번호: 80 및 151, 서열 번호: 155 및 151, 서열 번호: 80 및 153, 서열 번호: 157 및 82, 서열 번호: 155 및 153 또는 서열 번호: 159 및 82에 제시된 핵산 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적인 실시양태를 나타낸다.
- [0720] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호: 147 및 82, 서열 번호: 143 및 139, 서열 번호: 145 및 141, 서열 번호: 86 및 139, 서열 번호: 86 및 141, 서열 번호: 147 및 139, 서열 번호: 149 및 139, 서열 번호: 80 및 139, 서열 번호: 155 및 139, 서열 번호: 80 및 151, 서열 번호: 155 및 151, 서열 번호: 80 및 153, 서열 번호: 157 및 82, 서열 번호: 155 및 153 또는 서열 번호: 159 및 82를 포함하며, 각각의 가능성은 본 발명의 한 개별적인 실시양태를 나타낸다.
- [0721] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드"는 RNA 서열, 상보적 폴리뉴클레오티드 서열 (complementary polynucleotide sequence; cDNA), 게놈 폴리뉴클레오티드 서열 (genomic polynucleotide sequence) 및/또는 복합 폴리뉴클레오티드 서열 (composite polynucleotide sequences) (예를 들며, 상기의 조합)의 형태로 분리 및 제공되는 단일 또는 이중 가닥 핵산 서열을 지칭한다.
- [0722] 특정 실시양태들에 따르면, 본 명세서에 개시된 임의의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 서열은 보존적 핵산 치환을 포함할 수 있다. 보존적으로 변형된 폴리뉴클레오티드는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산, 또는 아미노산 서열을 본질적으로 동일하거나 연관된 (예를 들면, 자연적으로 인접한) 서열을 인코딩하지 않는 핵산을 지칭한다. 유전자 암호의 퇴화(degeneracy)로 인해 기능적으로 동일한 많은 핵산들이 대부분의 단백질을 인코딩한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 인코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서, 코돈은 인코딩된 폴리펩티드를 변경하지 않고 기술된 상응하는 코돈 중 다른 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 보존적으로 변형된 폴리뉴클레오티드의 한 종인 "침묵 변이 (silent variation)"이다. 특정 실시양태들에 따르면, 폴리펩티드를 코딩하는 본 명세서에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 서열은 또한 핵산의 침묵 변이를 나타낸다. 당업자는 특정 상황에서 핵산의 각 코돈 (일반적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 및 일반적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 침묵 변이는 발현 생성물과 관련하여 기재된 서열에 내재되어 있다.

- [0723] 포유동물 세포에서 외인성 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 포유동물 세포 발현에 적합한 핵산 작제물에 결합된다. 이러한 핵산 작제물은 구성성 또는 유도성 방식으로 세포에서 폴리뉴클레오티드 서열의 전사를 지지하기 위한 프로모터 서열을 포함한다.
- [0724] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 조절 요소는 이중성 조절 요소다.
- [0725] 본 발명의 몇몇 실시양태의 핵산 작제물 (본 명세서에서 "발현 벡터"로도 지칭됨)은 이 벡터(예를 들면, 서틀 벡터)를 원핵생물, 진핵생물, 또는 바람직하게는 둘 모두에서의 복제 및 통합에 적합하게 하는 추가 서열을 포함한다. 또한, 통상적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 개시 서열, 전사 및 번역 종결자 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수도 있다. 예를 들면, 이러한 작제물은 통상적으로 5' LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 신호, 제2가닥 DNA 합성의 원점, 및 3' LTR 또는 이의 일부를 포함할 것이다.
- [0726] 본 발명의 몇몇 실시양태의 핵산 작제물은 통상적으로 그것이 위치하는 숙주 세포로부터 펩티드의 분비를 위한 신호 서열을 포함한다. 바람직하게는 이러한 목적을 위한 신호 서열은 포유동물 신호 서열 또는 본 발명의 몇몇 실시양태의 폴리펩티드 변이체의 신호 서열이다.
- [0727] 진핵생물 프로모터는 일반적으로 TATA 박스 및 상류 프로모터 요소의 두 가지 유형의 인식 서열을 포함한다. 전사 개시 부위의 상류에 있는 25-30개 염기쌍에 위치한 TATA 박스는 RNA 중합효소가 RNA 합성을 시작하도록 지시하는데 관여하는 것으로 생각된다. 다른 상류 프로모터 요소는 전사가 시작되는 속도를 결정한다.
- [0728] 바람직하게는, 본 발명의 몇몇 실시양태의 핵산 작제물에 의해 사용되는 프로모터는 형질전환된 특정 세포 집단에서 활성이 있다. 세포 유형-특이적 및/또는 조직-특이적 프로모터의 예시는 간 특이적인 알부민 [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], 림프구 특이적인 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 면역글로불린; [Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740], 뉴로필라멘트 프로모터와 같은 뉴런 특이적 프로모터 [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], 췌장-특이적 프로모터 [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] 또는 유청 촉진제와 같은 유선 특이적 촉진제(미국 특허 번호 제4,873,316호 및 유럽 출원 공개 번호 제264,166호)를 포함한다.
- [0729] 인핸서 요소는 연결된 동종성 또는 이중성 프로모터로부터 최대 1,000배까지 전사를 자극할 수 있다. 인핸서는 전사 개시 부위의 하류 또는 상류에 배치될 때 활성이 있다. 바이러스에서 파생된 많은 인핸서 요소는 광범위한 숙주 범위를 가지며 다양한 조직에서 활성을 가진다. 예를 들면, SV40 초기 유전자 인핸서는 많은 세포 유형에 적합하다. 본 발명의 몇몇 실시양태에 적합한 다른 인핸서/프로모터 조합은 폴리오마 바이러스 (polyoma virus), 인간 또는 쥐 사이토메갈로바이러스 (human or murine cytomegalovirus, CMV), 쥐 백혈병 바이러스 (murine leukemia virus), 쥐 또는 라우스 육종 바이러스 (murine or Rous sarcoma virus) 및 HIV와 같은 다양한 레트로바이러스로부터의 장기 반복부로부터 유래된 것을 포함한다. Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983를 본 명세서에 참조로 포함한다.
- [0730] 발현 벡터의 구성에서, 프로모터는 바람직하게는 자연 상태(natural setting)에서 전사 개시 부위로부터의 거리와 이중성 전사 개시 부위로부터의 거리가 대략 동일하게 위치한다. 그러나, 당업계에 공지된 바와 같이, 프로모터 기능의 손실 없이 이 거리의 일부 변동은 수용될 수 있다.
- [0731] 폴리아데닐화 서열은 또한 mRNA 번역의 효율을 증가시키기 위해 발현 벡터에 추가될 수 있다. 정확하고 효율적인 폴리아데닐화를 위해서는 2개의 별개의 서열 요소가 필요하다: 폴리아데닐화 부위의 하류에 위치한 GU 또는 U 풍부한 서열과 상류 11-30개 뉴클레오티드에 위치한 고도로 보존된 6개 뉴클레오티드 서열인 AAUAAA. 본 발명의 몇몇 실시양태에 적합한 종결 및 폴리아데닐화 신호는 SV40에서 유래된 것을 포함한다.
- [0732] 상술한 요소에 더하여, 본 발명의 몇몇 실시양태의 발현 벡터는 통상적으로 클로닝된 핵산의 발현 수준을 증가시키거나 재조합 DNA를 보유하는 세포의 식별을 용이하게 하도록 의도된 다른 특수화된 요소를 함유할 수 있다. 예를 들면, 많은 동물 바이러스는 허용 가능한 세포 유형에서 바이러스 게놈의 추가 염색체 복제를 촉진하는 DNA 서열을 포함한다. 이 바이러스 레플리콘 (replicon)을 포함하는 플라스미드는 플라스미드 위에 또는 숙주 세포의 게놈과 함께 운반되는 유전자에 의해 적절한 요소가 제공될 때까지 에피솜으로 (episomally) 복제된다.
- [0733] 벡터는 진핵생물 레플리콘 (replicon)을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 진핵생물 레플리콘 (replicon)이 존재하는 경우 적절한 선택 가능한 마커를 사용하여 진핵생물 세포에서 벡터를 증폭할 수 있다. 벡터가 진핵생물 레플리콘 (replicon)을 포함하지 않으면, 에피솜 증폭이 불가능하다. 대신에, 재조합 DNA는 프로모터가 원하

는 핵산의 발현을 지시하는 조작 (engineer)된 세포의 게놈에 통합된다.

- [0734] 본 발명의 몇몇 실시양태의 발현 벡터는 예를 들면, 내부 리보솜 진입 부위 (internal ribosome entry site, IRES) 및 프로모터-키메라 폴리펩티드의 게놈 통합을 위한 서열로부터 여러 단백질의 번역을 허용하는 추가적인 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0735] 따라서, 특정 실시양태들에 따르면, 이중이량체에 포함된 단량체 둘 모두는 단일 작제물로부터 발현된다.
- [0736] 다른 특정 실시양태들에 따르면, 이중이량체에 포함된 각각의 단량체는 상이한 작제물로부터 발현된다.
- [0737] 발현 벡터에 포함된 개별 요소는 다양한 구성으로 배열될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들면, 인핸서 요소, 프로모터 등, 및 "머리에서 꼬리까지 (head-to-tail)" 구성으로 배열된 단량체 또는 이중이량체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열조차도 역보체 (inverted complement) 또는 역병렬 가닥 (anti-parallel strand)으로서 상보적 배열로 존재할 수 있다. 이러한 다양한 배열은 발현 벡터의 비-코딩 요소에서 발생할 가능성이 더 높지만, 발현 벡터 내의 코딩 서열의 대안적 배열에서도 예상된다.
- [0738] 포유동물 발현 벡터의 예시는 Invitrogen에서 사용 가능한 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, Promega에서 사용 가능한 pCI, Strategene에서 사용 가능한 pMbac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV, Clontech에서 사용 가능한 pTRES, 및 이의 유도체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0739] 레트로바이러스와 같은 진핵생물 바이러스의 조절 요소를 포함하는 발현 벡터도 사용 가능하다. SV40 벡터는 pSVT7 및 pMT2를 포함한다. 소 유두종 바이러스 (bovine papilloma virus) 유래 벡터는 pBV-1MTHA를 포함하고, 엡스타인 바 바이러스 (Epstein Bar virus) 유래 벡터는 pHEBO 및 p205를 포함한다. 다른 예시적인 벡터는 pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, 및 SV-40 초기 프로모터 (SV-40 early promoter), Sv-40 후기 프로모터 (SV-40 later promoter), 메탈로티오네인 프로모터 (metallothionein promoter), 무린 유방 종양 바이러스 프로모터 (murine mammary tumor virus promoter), 라우스 육종 바이러스 프로모터 (Rous sarcoma virus promoter), 다면체 프로모터 (polyhedrin promoter), 또는 진핵세포에서 발현에 효과적인 다른 프로모터의 지시 하에서 단백질의 발현을 허용하는 임의의 벡터를 포함한다.
- [0740] 상술한 바와 같이, 바이러스는 많은 경우에 숙주 방어 기제를 회피하도록 진화한 매우 전문화된 감염원이다. 일반적으로 바이러스는 특정 세포 유형을 감염시키고 전파한다. 바이러스 벡터의 표적화 특이성은 자연적 특이성을 사용하여 미리 결정된 세포 유형을 특이적으로 표적화함으로써 재조합 유전자를 감염된 세포에 도입한다. 따라서, 본 발명의 몇몇 실시양태에 의해 사용되는 벡터의 유형은 형질전환된 세포 유형에 의존할 것이다. 형질전환된 세포 유형에 따라 적합한 벡터를 선택하는 능력은 당업자의 능력 내에 있으며, 본 명세서에는 선택 고려사항에 대한 일반적인 설명은 제공하지 않는다. 예를 들면, 골수 세포는 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I형 (human T cell leukemia virus type I, HTLV-I)을 사용하여 표적화될 수 있고 신장 세포는 Liang CY et al., 2004 (Arch Virol. 149: 51-60)에 기재된 바와 같이 바쿨로바이러스 오토그래프 칼리포니카 다중뉴클레오폴리하이드로 바이러스 (baculovirus Autographa californica nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)에 존재하는 이중성 프로모터를 사용하여 표적화될 수 있다.
- [0741] 재조합 바이러스 벡터는 양태 감염 및 표적화 특이성과 같은 이점을 제공하기 때문에 단량체 및 이중이량체의 생체 내 (in vivo) 발현에 유용하다. 양태 감염은 예를 들면 레트로바이러스의 수명 주기에 내재되어 있으며, 단일 감염된 세포가 싹을 틔우고 (bud off) 주변 세포를 감염시키는 많은 후손 비리온 (progeny virions)을 생성하는 과정이다. 그 결과 넓은 지역이 빠르게 감염되고 대부분은 원래 바이러스 입자에 의해 최초 감염된 것이 아니다. 이는 감염원이 딸 자손 (daughter progeny)을 통해서만 전파되는 수직형 감염과 대조적이다. 측면으로 (laterally) 퍼질 수 없는 바이러스 벡터도 생성될 수 있다. 이 특성은 특정 유전자를 국소화된 표적 세포에만 도입하는 것을 목적으로 하는 경우에 유용할 수 있다.
- [0742] 다양한 방법을 사용하여 본 발명의 몇몇 실시양태의 발현 벡터를 세포 내로 도입할 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) 및 Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에 기술되어 있으며, 예를 들면, 안정적인 또는 일시적인 형질주입, 리포펙션, 전기천공, 및 재조합 바이

러스 벡터로의 감염을 포함한다. 또한, 양성-음성 선별 방법 (positive-negative selection method)에 대해서는 미국 특허 번호 제5,464,764호 및 제5,487,992호를 참조한다.

- [0743] 바이러스 감염에 의한 핵산 도입은 바이러스의 감염 특성으로 인해 더 높은 형질주입 효율을 얻을 수 있기 때문에 리포펙션 및 전기천공과 같은 다른 방법에 비해 몇 가지 장점을 제공한다.
- [0744] 현재 바람직한 생체 내 (in vivo) 핵산 전달 기술은 아데노바이러스 (adenovirus), 렌티바이러스 (lentivirus), 단순 헤르페스 I 바이러스 (Herpes simplex I virus), 또는 아데노 관련 바이러스 (adeno-associated virus, AAV) 및 지질 기반 시스템 (lipid-based system)과 같은 바이러스 또는 비-바이러스 작제물을 사용한 형질주입을 포함한다. 유전자의 지질 매개 전달에 유용한 지질은 예를 들면 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol이다[Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)]. 유전자 요법에 사용하기 위한 가장 바람직한 작제물은 바이러스, 가장 바람직하게는 아데노바이러스 (adenovirus), AAV, 렌티바이러스 (lentivirus), 또는 레트로바이러스 (retroviruses)이다. 레트로바이러스 작제물과 같은 바이러스 작제물은 적어도 하나의 전사 프로모터/인핸서 또는 위치-정의 요소(들) (locus-defining element(s)), 또는 대체 스플라이싱 (alternate splicing), 핵 RNA 이동 (nuclear RNA export) 또는 메신저의 번역 후 변형과 같은 다른 수단에 의해 유전자 발현을 조절하는 기타 요소들을 포함한다. 이러한 벡터 작제물은 바이러스 작제물에 이미 존재하지 않는 한, 패키징 신호 (packaging signal), 긴 말단 반복부 (long terminal repeats, LTR) 또는 이의 부분, 및 사용되는 바이러스에 적합한 양성 및 음성 가닥 프라이머 결합 부위 (positive and negative strand primer binding sites)를 포함한다. 또한, 이러한 작제물은 통상적으로 작제물이 위치하는 숙주 세포로부터 펩티드 분비를 위한 신호 서열을 포함한다. 바람직하게는 이 목적을 위한 신호 서열은 포유동물 신호 서열 또는 본 발명의 몇몇 실시양태의 폴리펩티드 변이체의 신호 서열이다. 선택적으로, 작제물은 또한 폴리아데닐화를 지시하는 신호, 뿐만 아니라 하나 이상의 제한 부위 및 번역 종결 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 이러한 작제물은 통상적으로 5' LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 신호, 제2가닥 DNA 합성의 원점, 및 3' LTR 또는 이의 일부를 포함할 것이다. 양이온성 지질(cationic lipid), 폴리라이신(polylysine), 및 덴드리머(dendrimer)와 같은 비바이러스성 다른 벡터를 사용할 수 있다.
- [0745] 언급한 바와 같이, 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 것 외에, 본 발명의 몇몇 실시양태의 발현 작제물은 발현된 단량체 또는 이종이량체의 안정성, 생산, 정제, 수율, 또는 독성을 향상시키기 위해 조작 (engineer)된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 몇몇 실시양태의 단량체 또는 이종이량체를 포함하는 융합 단백질 또는 절단 가능한 융합 단백질 및 이종성 단백질의 발현은 조작 (engineer)될 수 있다. 이러한 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피, 예를 들면, 이종성 단백질에 특이적인 컬럼에 대한 고정화에 의해 융합 단백질이 용이하게 분리될 수 있도록 고안될 수 있다.
- [0746] 절단 부위가 본 발명의 몇몇 실시양태의 단량체 또는 이종이량체와 이종성 단백질 사이에 조작 (engineer)되는 경우, 절단 부위를 교란시키는 적절한 효소 또는 시약으로 처리함으로써 단량체 또는 이종이량체가 크로마토그래피 컬럼으로부터 방출될 수 있다 [예를 들면, Booth et al. (1988) Immunol. Lett. 19:65-70; 및 Gardella et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:15854-15859 참조]
- [0747] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 조성물을 포함하는 세포를 고려한다.
- [0748] 따라서, 본 발명의 한 양태에 따르면, 이종이량체 또는 핵산 작제물 또는 시스템을 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0749] 상기 언급된 바와 같이, 다양한 원핵 또는 진핵 세포가 본 발명의 몇몇 실시양태의 이종이량체를 발현하기 위한 숙주-발현 시스템으로서 사용될 수 있다. 이들은, 재조합 박테리아파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코딩 서열을 함유하는 cosmid DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아와 같은 미생물; 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터에 형질전환된 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들면, 콜리플라워 모자이크 바이러스 (cauliflower mosaic virus, CaMV); 담배 모자이크 바이러스 (tobacco mosaic virus, TMV))에 감염되거나 코딩 서열을 포함하는 Ti 플라스미드와 같은 재조합 플라스미드 발현 벡터로 형질전환된 식물 세포 시스템을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 포유동물 발현 시스템은 또한 본 발명의 몇몇 실시양태의 폴리펩티드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0750] 박테리아 작제물의 예시는 E. coli 발현 벡터의 pET 시리즈를 포함한다 [Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89].
- [0751] 본 발명의 교시와 함께 사용될 수 있는 진핵세포의 예시는 포유동물 세포 (mammalian cell), 진균 세포 (fungal

cell), 효모 세포 (yeast cell), 곤충 세포 (insect cell), 조류 세포 (algal cell) 또는 식물 세포 (plant cell)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0752] 효모에서, 미국 특허 번호 제5,932,447호에 기술한 바와 같이, 구성성 또는 유도성 프로모터를 함유하는 다수의 벡터가 사용될 수 있다. 대안적으로, 효모 염색체 내로의 외래 DNA 서열의 통합을 촉진하는 벡터가 사용될 수 있다.
- [0753] 식물 발현 벡터가 사용되는 경우, 코딩 서열의 발현은 다수의 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 예를 들면, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터와 같은 바이러스성 프로모터 [Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514], 또는 TMV에 대한 외피 단백질 프로모터 [Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311]가 사용될 수 있다. 대안적으로, RUBISCO의 작은 서브유닛과 같은 식물 프로모터 [Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680 및 Brogli et al., (1984) Science 224:838-843] 또는 열 충격 프로모터 (heat shock promoter) (예를 들면, soybean hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B) [Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565]가 사용될 수 있다. Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스성 벡터, 직접 DNA 형질전환, 미세주입, 전기천공 및 당업자에게 공지된 기타 기법을 사용하여 이 작제물들을 식물 세포 내로 도입할 수 있다. 예를 들면, Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463를 참조한다.
- [0754] 당업계에 익히 공지된 곤충 및 포유동물 숙주 세포 시스템과 같은 다른 발현 시스템도 본 발명의 몇몇 실시양태에 의해 사용될 수 있다.
- [0755] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 세포는 포유동물 세포이다.
- [0756] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 세포는 인간 세포이다.
- [0757] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 세포는 세포주 (cell line)이다.
- [0758] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 세포는 1차 세포 (primary cell)이다.
- [0759] 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 포함하나, 이에 제한되지 않는 적합한 조직으로부터 유래될 수 있다. 세포는 배아, 태아, 및 성체 단계뿐만 아니라 발달 기원 (developmental origin), 즉 외배엽, 중배엽 및 내배엽 기원을 비롯한 임의의 발달 단계로부터 유래될 수 있다.
- [0760] 포유동물 세포의 비제한적인 예시는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 계통 (monkey kidney CV1 line) (COS, e.g. COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 계통 (human embryonic kidney line) (현탁액 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 HEK293 or HEK293, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 1977); 아기 햄스터 신장 세포 (baby hamster kidney cell) (BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포 (mouse sertoli cell) (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 1980); 원숭이 신장 세포 (monkey kidney cell) (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (African green monkey kidney cell) (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암 세포 (human cervical carcinoma cell) (HeLa, ATCC CCL 2); NIH3T3, Jurkat, 개 신장 세포 (canine kidney cell) (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로쥐 간 세포 (buffalo rat liver cell) (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (human lung cell) (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (human liver cell) (Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양 (mouse mammary tumor) (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 1982); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주 (human hepatoma line) (Hep G2), PER.C6, K562, 및 중국 햄스터 난소 세포 (Chinese hamster ovary cells, CHO)를 포함한다.
- [0761] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 포유동물 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO), HEK293, PER.C6, HT1080, NS0, Sp2/0, BHK, Namalwa, COS, HeLa 및 Vero 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0762] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따르면, 상기 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO), PER.C6 또는 293 (예를 들면, Expi293F) 세포를 포함한다.
- [0763] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 숙주 세포에서 핵산 작제물 또는 시스템을 발현시키는 단계를 포함하는, 이중양량체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0764] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 생산은 포유동물 세포에서 발현하고 32 - 37℃, 5 - 10% CO₂에서 5 - 13일 동안 배양하는 단계를 포함한다.

- [0765] 본 발명의 특정 실시양태와 함께 사용될 수 있는 생산 조건의 비제한적인 예는 하기 실시예 부분에 개시되어 있다.
- [0766] 따라서, 예를 들면 이중이량체를 인코딩하는 발현 벡터는 Expi293F 또는 ExpiCHO 세포와 같은 포유동물 세포에서 발현된다. 이후 형질도입된 세포를 Expi293F 또는 ExpiCHO 세포 제조업체 지침 (Thermo)에 따라 세포 특이적 배양 배지에서 32 - 37°C 5 - 10% CO₂에서 배양한다. 최소 5일 동안 배양한 후 상층액에서 단백질을 수집하고 정제한다.
- [0767] 특정 실시양태들에 따르면, 배양은 배치 (batch), 분할-배치 (split-batch), 유가 (fed-batch) 또는 관류 방식 (perfusion mode)으로 수행된다.
- [0768] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 배양은 유가 (fed-batch) 조건 하에서 수행된다.
- [0769] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 배양은 36.5°C에서 수행된다.
- [0770] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 배양은 32°C로 온도 변화(temperature shift)를 시키면서 36.5°C에서 수행한다. 이 온도 변화는 정지기에 도달하기 전에 세포 대사를 늦추도록 영향을 미칠 수 있다.
- [0771] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 방법은 상기 이량체화 모이어티를 발현된 아미노산 서열, 즉 I형 막 단백질의 아미노산 서열 및 II형 막 단백질의 아미노산 서열에 추가하는 단계를 포함한다.
- [0772] 특정 실시양태들에 따르면, 상기 방법은 이중이량체를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0773] 특정 실시양태들에 따르면, 제조합 이중이량체의 회수는 적절한 배양 시간 후에 수행된다. 특정 실시양태들에 따르면, 제조합 이중이량체를 회수하는 것은 이중이량체를 포함하는 전체 배양 배지를 수집하는 것을 지칭하며, 분리 또는 정제의 추가 단계를 암시할 필요는 없다. 특정 실시양태들에 따르면, 본 발명의 몇몇 실시양태의 이중이량체는 친화성 크로마토그래피 (affinity chromatography), 이온 교환 크로마토그래피 (ion exchange chromatography), 여과 (filtration), 전기영동 (electrophoresis), 소수성 상호작용 크로마토그래피 (hydrophobic interaction chromatography), 겔 여과 크로마토그래피 (gel filtration chromatography), 역상 크로마토그래피 (reverse phase chromatography), 콘카나발린 A 크로마토그래피 (concanavalin A chromatography), 혼합 모드 크로마토그래피 (mix mode chromatography), 금속 친화성 크로마토그래피 (metal affinity chromatography), 렉틴 친화성 크로마토그래피 크로마토포커싱 (Lectins affinity chromatography chromatofocusing) 및 차등 가용화 (differential solubilization)와 같으나, 이에 제한되지 않는 다양한 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 정제할 수 있다.
- [0774] 특정 실시양태들에 따르면, 생산 및 정제 후, 이중이량체의 치료학적 효능은 생체 내에서 (in vivo) 또는 생체 외에서 (in vitro) 분석될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면 세포 생존율, 형질전환 마우스의 생존율, 및 활성화 마커의 발현을 포함한다.
- [0775] 본 발명의 몇몇 실시양태의 조성물(예를 들면, 이중이량체, 이를 인코딩하는 핵산 작제물 또는 시스템 및/또는 세포)은 유기체 그 자체로 (per se), 또는 적합한 담체 또는 부형제와 혼합되는 약제학적 조성물로 투여될 수 있다.
- [0776] 따라서, 본 발명은 몇몇 실시양태에서 본 명세서에 개시된 조성물의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다.
- [0777] 본 명세서에서 용어 "활성 성분"은 생물학적 효과에 대해 책임이 있는 조성물 (예를 들면, 본 명세서에서 개시한 이중이량체, 핵산 작제물 또는 시스템 및/또는 세포)을 지칭한다.
- [0778] 본 명세서에서 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 더욱 용이하게 하기 위해 약제학적 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다. 부형제의 예는 탄산칼슘 (calcium carbonate), 인산칼슘 (calcium phosphate), 다양한 당 및 유형의 전분, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0779] 이하, 어구 "생리학적으로 허용 가능한 담체" 및 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 유기체에 상당한 자극을 일으키지 않고 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 보조제는 상기 어구 하에 포함된다.
- [0780] 본 명세서에서 사용되는 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 생리학적으로 양립 가능한 임의의 모든 용매, 분

산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예를 들면, 주사 또는 주입)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물은 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용 가능한 염"은 모체 화합물 (parent compound)의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 임의의 바람직하지 않은 독성 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다(예를 들면, Berge, SM, et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19 참조). 이러한 염의 예시는 산 부가염 (acid addition salt) 및 염기 부가염 (base addition salt)을 포함한다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 인 등과 같은 무독성 무기산뿐만 아니라 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환된 알칸산, 하이드록시알칸산, 방향족산, 지방족 및 방향족 술폰산 등과 같은 무독성 유기산으로부터 유래된 것을 포함한다. 염기 부가염에는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토금속뿐만 아니라 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과 같은 무독성 유기 아민에서 유래된 것을 포함한다.

[0781] 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 약제학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용 가능한 항산화제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 항산화제의 예시는 하기를 포함한다: (1) 아스코르브산 (ascorbic acid), 시스테인 하이드로클로라이드 (cysteine hydrochloride), 중황산나트륨 (sodium bisulfate), 메타중아황산나트륨 (sodium metabisulfite), 아황산나트륨 (sodium sulfite) 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트 (ascorbyl palmitate), 부틸화 하이드록시아니솔 (butylated hydroxyanisole; BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔 (butylated hydroxytoluene; BHT), 레시틴 (lecithin), 프로필 갈레이트 (propyl gallate), 알파-토코페롤 (alpha-tocopherol) 등과 같은 지용성 항산화제; (3) 시트르산 (citric acid), 에틸렌디아민 테트라아세트산 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 소르비톨 (sorbitol), 타르타르산 (tartaric acid), 인산 (phosphoric acid) 등과 같은 금속 킬레이트제. 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 약제학적 조성물은 또한 세제 및 가용화제 (예를 들면, TWEEN 20 (polysorbate-20), TWEEN 80 (polysorbate-80)) 및 보존제 (예를 들면, Thimersol, 벤질 알코올 (benzyl alcohol)) 및 버핑제 (예를 들면, 유당 (lactose), 만니톨 (mannitol))과 같은 첨가물질을 포함할 수 있다.

[0782] 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예시는 물, 다양한 완충제 함량(예를 들면, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도의 완충 식염수, 에탄올, 폴리올(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은) 및 이의 적합한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다.

[0783] 적절한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다.

[0784] 상기 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다.

[0785] 상술한 살균 절차와 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함함으로써 미생물의 존재 방지를 보장할 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 포함함으로써 주사 가능한 약제학적 형태의 장기간 흡수를 야기할 수 있다.

[0786] 약제학적으로 허용 가능한 담체는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 약제학적 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충적인 활성 화합물 또한 조성물에 포함될 수 있다.

[0787] 치료학적 조성물은 통상적으로 제조 및 저장 조건 하에서 멸균되고 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정렬된 구조로 제형화될 수 있다. 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 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 코팅제를 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들면 당, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨과 같은 다가알코올을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 모노스테아레이트 염 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 조성물에 포함함으로써 주사 가능한 조성물의 장기간 흡수를 야기할 수 있다. 멸균 주사 용액 (Sterile injectable solutions)은 필요에 따라 위에 열거된 성분들을 단독 또는 조합과 함께 활성 화합물을 필요한 양으로 적절한 용매에 혼합한 후, 멸균 정밀

여과 (microfiltration)하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 필요한 위에 열거된 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클 (sterile vehicle)에 혼입함으로써 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조로 사전에 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가로 원하는 성분의 분말을 생성한다.

[0788] 멸균 주사 용액 (Sterile injectable solutions)은 필요에 따라 위에 열거된 성분들을 단독 또는 조합과 함께 활성 화합물을 필요한 양으로 적절한 용매에 혼입한 후, 멸균 정밀여과 (microfiltration)하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 필요한 위에 열거된 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클 (sterile vehicle)에 혼입함으로써 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조로 사전에 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가로 원하는 성분의 분말을 생성한다.

[0789] 단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 약제학적으로 허용 가능한 담체와 조합하는 경우, 100% 중에서, 활성 성분의 양은 약 0.01% 내지 약 99%, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 1% 내지 약 30%의 범위일 것이다.

[0790] 최적의 원하는 반응(예를 들면, 치료 반응)을 제공하기 위해 투여 요법이 조정된다. 예를 들면, 단일 볼루스 (bolus)가 투여될 수 있고, 시간이 지남에 따라 여러 분할 용량이 투여될 수 있거나, 치료 상황의 긴급성에 따라 용량이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성과 투여량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 투여 단위 형태 (dosage unit form)로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 명세서에서 사용되는 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하고; 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 산출하기 위해 계산된 활성 화합물의 미리 결정된 양을 포함한다. 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 투여 단위 형태에 대한 사양 (specification)은 (a) 활성 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정 치료 효과, 및 (b) 개체의 민감성 (sensitivity) 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 혼합하는 기술에 내재된 한계에 의해 지시되고, 이에 직접적으로 의존한다.

[0791] 약물의 제형화 및 투여를 위한 기술은 “Remington’s Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition에서 찾을 수 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0792] 본 발명의 몇몇 실시양태의 약제학적 조성물은 예를 들면 통상적인 혼합 (mixing), 용해 (dissolving), 과립화 (granulating), 당제-제조 (dragee-making), 부양 (levigating), 유화 (emulsifying), 캡슐화 (encapsulating), 포획 (entrapping) 또는 동결건조 (lyophilizing) 공정에 의해 당업계에 익히 공지된 공정에 의해 제조될 수 있다.

[0793] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법 중 하나 이상을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 치료제에 대한 바람직한 투여 경로는 혈관내 전달 (intravascular delivery) (예를 들면, 주사 또는 주입), 정맥내 (intravenous), 근육내 (intramuscular), 피내 (intradermal), 복강내 (intraperitoneal), 피하 (subcutaneous), 척수 (spinal), 경구 (oral), 장 (enteral), 직장 (rectal), 폐 (pulmonary) (예를 들면, 흡입), 비강 (nasal), 국소 (topical) (경피 (transdermal), 협측 (buccal) 및 설하 (sublingual) 포함), 방광내 (intravesical), 유리체내 (intravitreal), 복강내 (intraperitoneal), 질 (vaginal), 뇌 전달 (brain delivery) (예를 들면, 뇌실내 (intra-cerebroventricular), 대뇌 (intra-cerebral) 및 대류 강화 확산 (convection enhanced diffusion)), CNS 전달(예를 들면, 척추강내 (intrathecal), 척수주위 (perispinal) 및 척추 (intra-spinal)) 또는 비경구 (parenteral) (피하, 근육내, 복강내, 정맥내(IV) 및 피내 포함), 경피 (transdermal) (수동적으로 또는 이온삼투요법 (iontophoresis) 또는 전기천공 (electroporation) 사용), 점막 (transmucosal) (예를 들면, 설하 투여, 비강, 질, 직장 또는 설하), 투여 또는 임플란트를 통한 투여, 또는 다른 비경구 투여 경로를 통한 투여, 예를 들면 주사 또는 주입, 또는 기타 당업계에 공지된 전달 경로 및/또는 형태를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 어구 “비경구 투여 (parenteral administration)”는 일반적으로 주사에 의한 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 정맥내 (intravenous), 근육내 (intramuscular), 동맥내 (intraarterial), 척추강내 (intrathecal), 피막내 (intracapsular), 안와내 (intraorbital), 심장내 (intracardiac), 피내 (intradermal), 복강내 (intraperitoneal), 기관내 (transtracheal), 피하 (subcutaneous), 표피하

(subcuticular), 관절내 (intraarticular), 피막하 (subcapsular), 지주막하 (subarachnoid), 척수내 (intraspinal), 경막외 (epidural) 및 흉골내 (intrasternal) 주사 및 주입 또는 생체 침식성 삽입물 (bioerodible inserts)을 사용하고, 각각의 투여 경로에 적절한 투여 형태로 제형화될 수 있다. 특정 실시양태들에서, 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 단백질, 치료제 또는 약제학적 조성물은 복강내 또는 정맥내로 투여될 수 있다.

[0794] 특정 실시양태들에 따르면, 본 명세서에 개시된 조성물은 비경구 주사에 의해 수용액으로 투여된다. 제형은 또한 현탁액 또는 에멀전의 형태일 수 있다. 일반적으로, 비경구 주사를 위한 약제학적 조성물은 효과적인 양의 본 명세서에 개시된 조성물을 포함하고, 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 보존제, 가용화제, 유화제, 보조제 및/또는 담체를 포함한다. 이러한 조성물은 선택적으로 하기 중 하나 이상을 포함한다: 희석제, 멸균수, 다양한 완충제 내용물(예를 들면, Tris-HCl, 아세테이트 (acetate), 포스페이트 (phosphate)), pH, 및 이온 강도의 완충 식염수; 및 세제 및 가용화제 (예를 들면, TWEEN 20 (폴리소르베이트-20), TWEEN 80 (폴리소르베이트-80)), 항산화제 (예를 들면, 아스코르브산 (ascorbic acid), 메타중아황산나트륨 (sodium metabisulfite), 염산시스테인 (cysteine hydrochloride), 중황산나트륨 (sodium bisulfate), 메타중아황산나트륨 (sodium metabisulfite), 아황산나트륨 (sodium sulfite)과 같은 수용성 항산화제; 아스코르빌 팔미테이트 (ascorbyl palmitate), 부틸화 하이드록시아니솔 (butylated hydroxyanisole; BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔 (butylated hydroxytoluene, BHT), 레시틴 (lecithin), 프로필 갈레이트 (propyl gallate), 알파-토코페롤 (alpha-tocopherol)과 같은 지용성 항산화제; 및 시트르산 (citric acid), 에틸렌디아민 테트라아세트산 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 소르비톨 (sorbitol), 타르타르산 (tartaric acid), 인산 (phosphoric acid)과 같은 금속 킬레이트제; 및 보존제 (예를 들면, Thimersol, 벤질 알코올 (benzyl alcohol)) 및 버킹제 (예를 들면, 유당 (lactose), 만니톨 (mannitol)). 비수성 용매 또는 비히클의 예시는 에탄올, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일 및 옥수수 오일과 같은 식물성 오일, 젤라틴 및 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르가 있다. 제형은 동결 건조 또는 진공 건조되어 사용 직전에 재용해/재현탁될 수 있다. 제형은 예를 들면 박테리아 보유 필터를 통한 여과, 살균제를 조성물에 혼입, 조성물 조사, 또는 조성물에 가열함으로써 살균될 수 있다.

[0795] 본 명세서에 개시된 다양한 조성물 (예를 들면, 폴리펩티드)은 국소적으로 적용될 수 있다. 국소 투여는 대부분의 펩티드 제형에 대해 잘 작동하지 않지만 특히 폐, 비강, 구강 (설하, 협측), 질 또는 직장 점막에 적용하는 경우 효과적인 수 있다.

[0796] 본 발명의 조성물은 약 5 마이크론 (micron) 미만의 공기역학적 직경을 갖는 분무 건조 입자 또는 에어로졸로서 전달될 때 흡입하면서 폐로 전달되고 폐 상피 내층을 가로질러 혈류로 전달될 수 있다. 치료 제품의 폐 전달을 위해 설계된 광범위한 기계 장치가 사용될 수 있으며, 이들 모두는 당업자에게 친숙한 분무기, 정량 흡입기 및 분말 흡입기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상업적으로 사용 가능한 장치의 일부 구체적인 예는 Ultravent 분무기(Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); Acorn II 분무기(Marquest Medical Products, Englewood, CO.); Ventolin 정량 흡입기(Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC); 및 Spinhaler 분말 흡입기(Fisons Corp., Bedford, MA)이다. Nektar, Alkermes 및 Mannkind는 모두 본 명세서에 기술된 제형에 기술을 적용할 수 있는 임상 시험에서 승인된 흡입성 인슐린 분말 제제를 가지고 있다.

[0797] 점막에 투여하기 위한 제형은 일반적으로 정제, 젤, 캡슐, 현탁액 또는 에멀전에 혼입될 수 있는 분무 건조된 약물 입자일 것이다. 표준 제약 부형제는 임의의 제형기 (formulator)에서 구할 수 있다. 경구 제형은 씹는껌 (chewing gum), 젤 스트립 (gel strip), 정제 (tablet) 또는 로젠지 (lozenge)의 형태일 수 있다.

[0798] 경피 제형 또한 제조될 수 있다. 이는 통상적으로 연고, 로션, 스프레이 또는 패치일 것이며, 일반적으로 표준 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 경피 제형은 침투 증강제를 포함하는 것을 필요로 할 것이다. 본 발명의 약제학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에게 독성이 없으면서 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 바뀔 수 있다. 선택된 투여량 수준은 본 발명의 사용된 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 투여 기간, 기타 약물 및/또는 사용된 특정 조성물과 병용된 물질, 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강, 및 치료되는 환자의 이전 병력, 및 의학 분야에서 익히 공지된 유사 인자를 포함하는 다양한 약독학적 인자에 따라 달라질 것이다.

[0799] 특정 실시양태들에 따르면, 본 명세서에 개시된 조성물은 치료학적 유효량으로 대상체에게 투여된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효량 (effective amount)" 또는 "치료학적 유효량 (therapeutically effective

amount)"은 치료되는 질환의 하나 이상의 증상을 치료, 억제 또는 완화하거나 달리 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 제공하기에 충분한 용량을 의미한다. 치료학적 유효량의 결정은 특히 본 명세서에 제공된 상세한 개시내용에 비추어 당업자의 능력 범위 내에 있다.

- [0800] 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 제제에 대해, 치료학적 유효량 또는 용량은 생체 외 및 세포 배양 분석으로부터 초기에 추정할 수 있다. 예를 들면, 원하는 농도 또는 역가를 달성하기 위해 용량을 동물 모델에서 공식화할 수 있다. 이러한 정보는 사람에게 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는데 사용할 수 있다. 본 명세서에 기재된 활성 성분의 독성 및 치료 효능은 생체 외, 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 제약 절차에 의해 결정될 수 있다. 이 생체 외 및 세포 배양 분석 및 동물 연구에서 수득한 데이터는 인간에 사용하기 위한 용량 범위를 공식화하는 데 사용할 수 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 용량은 환자의 상태를 고려하여 개별 의사가 선택할 수 있다(예를 들면, Fingl, et al., 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 참조).
- [0801] 활성 성분의 수준이 생물학적 효과(최소 유효 농도, minimal effective concentration, MEC)를 유도하거나 억제하기에 충분하도록 투여량 및 간격을 개별적으로 조정할 수 있다. MEC는 각 제제에 따라 다르지만 생체 외 데이터로부터 추정할 수 있다. MEC를 달성하는 데 필요한 용량은 개인의 특성과 투여 경로에 따라 달라진다. 혈장 농도를 결정하기 위해 검출 분석이 사용될 수 있다.
- [0802] 치료될 상태의 중증도 및 반응성에 따라, 투여는 단일 또는 복수 투여일 수 있으며, 치료 과정은 수일 내지 수 주 또는 치료가 이루어지거나 질병 상태의 감소가 달성될 때까지 계속된다.
- [0803] 투여될 조성물의 양은, 물론 치료되는 대상체, 고통의 중증도, 투여 방식, 처방 의사의 판단 등에 따라 달라질 것이다.
- [0804] 특정 실시양태들에서, 조성물(예를 들면, 이종이량체, 핵산 작제물 또는 시스템 또는 세포)은 예를 들면 치료될 부위에 직접 주사함으로써 국소적으로 투여된다. 일반적으로, 주사는 전신 투여에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 큰 증가된 국소 농도 (localized concentration)을 야기한다. 이종이량체 조성물은 치료될 부위 밖으로 폴리펩티드의 수동 확산을 감소시킴으로써 폴리펩티드 조성물의 증가된 국소 농도를 형성하는 것을 돕기 위해 상술한 바와 같이 매트릭스와 조합될 수 있다.
- [0805] 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계에 공지된 의료 기기로 투여될 수 있다. 예를 들면, 선택적인 실시양태에서, 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 약제학적 조성물은 미국 특허 번호 제5,399,163호; 제5,383,851호; 제5,312,335호; 제5,064,413호; 제4,941,880호; 제4,790,824호; 또는 제4,596,556호에 개시된 장치와 같은 바늘 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 익히 공지된 임플란트 및 모듈의 예는 하기를 포함한다: 제어된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식 가능한 미세 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,487,603호; 피부를 통해 약제를 투여하기 위한 치료 장치를 개시하는 미국 특허 제4,486,194호; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,447,233호; 연속적인 약물 전달을 위한 가변 흐름 이식형 주입 장치를 개시하는 미국 특허 제4,447,224호; 다중 챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제4,439,196호; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제4,475,196호. 이 특허들은 본 명세서에 참조로 포함된다. 많은 다른 이러한 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 당업자에게 알려져 있다.
- [0806] 활성 화합물은 임플란트, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형 (controlled release formulation)과 같이 빠른 방출에 대항하여 화합물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트 (ethylene vinyl acetate), 폴리무수물 (polyanhydrides), 폴리글리콜산 (polyglycolic acid), 콜라겐 (collagen), 폴리오르토에스테르 (polyorthoester), 및 폴리락트산 (polylactic acid)과 같은 생분해성, 생체적합성 폴리머가 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법이 특허를 받았거나 일반적으로 당업자에게 알려져 있다(예를 들면, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조).
- [0807] 중합체 장치 (막대, 실린더, 필름, 디스크) 또는 주입 (미세 입자)의 이식 후 전신적으로 장기간 방출을 위해 제어 방출 중합체 장치를 제조할 수 있다. 매트릭스는 마이크로스피어와 같은 마이크로입자의 형태일 수 있으며, 여기서 펩티드는 고체 중합체 매트릭스 또는 마이크로캡슐 내에 분산되고, 여기서 코어는 중합체 셸과 다른 재료이고, 펩티드는 코어에 분산되거나 현탁되며, 사실상 액체 또는 고체일 수 있다. 본 명세서에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 마이크로입자, 마이크로스피어 및 마이크로캡슐은 상호교환적으로 사용된다. 대안적

으로, 중합체는 나노미터에서 4 센티미터 범위의 얇은 슬래브 또는 필름, 그라인딩 또는 기타 표준 기술에 의해 생성된 분말, 또는 하이드로겔과 같은 겔로 구조될 수 있다.

- [0808] 본 명세서에 개시된 활성제의 전달을 위해 비록 생분해성 매트릭스 가 바람직하지만, 비생분해성 또는 생분해성 매트릭스가 사용될 수 있다. 합성 중합체가 분해 및 방출 프로파일의 더 나은 특성으로 인해 선호되지만, 천연 또는 합성 중합체일 수 있다. 중합체는 원하는 방출 기간에 따라 선택된다. 어떤 경우에는 선형 방출 (linear release)이 가장 유용할 수 있지만, 다른 경우에는 펄스 방출 (pulse release) 또는 "대량 방출 (bulk release)"이 더 효과적인 결과를 제공할 수 있다. 중합체는 하이드로겔 (통상적으로 최대 약 90 중량%의 물을 흡수함) 형태일 수 있고, 선택적으로 다가 이온 또는 중합체와 가교결합될 수 있다.
- [0809] 매트릭스는 용매 증발, 분무 건조, 용매 추출 및 당업자에게 공지된 기타 방법에 의해 형성될 수 있다. 생분해성 마이크로스피어는 예를 들면 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 기술된 바와 같이, 약물 전달을 위한 마이크로스피어 제조를 위해 개발된 임의의 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0810] 상기 장치는 이식 또는 주사 부위를 (이는 일반적으로 전신 치료용 투여량보다 훨씬 적은 투여량일 수 있음) 치료하기 위해 국소 방출용으로 제형화되거나 전신 전달용으로 제형화될 수 있다. 이는 피하, 근육 내, 지방 내로 이식 또는 주사되거나, 연하 (삼킴, swallowing)될 수 있다.
- [0811] 특정 실시양태들에서, 본 발명의 적어도 몇몇 실시양태에 따른 치료학적 화합물이 BBB를 통과하는 것을 보장하기 위해 (원하는 경우), 이들은 예를 들면 리포솜으로 제형화될 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 대해서는, 예를 들면, 미국 특허 번호 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송되어 표적 약물 전달을 향상시키는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다 (예를 들면, VV Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685 참조). 예시적인 표적화 모이어티는 엽산 (folate) 또는 비오틴 (biotin) (예를 들면, Low 등의 미국 특허 번호 제5,416,016호 참조); 만노사이드 (mannoside) (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 항체 (antibody) (PG Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 계면활성제 단백질 A 수용체 (surfactant protein A receptor) (Briscoe et al. (1995) Am. J Physiol. 1233:134); p120(Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)를 포함하며, K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273도 참조한다.
- [0812] 본 발명의 몇몇 실시양태의 조성물은, 원하는 경우 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 FDA 승인 키트와 같은 팩 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 팩은 예를 들면 블리스터 팩 (blister pack)과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치에는 투여 지침이 포함될 수 있다. 팩 또는 디스펜서는 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에서 규정한 형식으로, 컨테이너와 관련된 통지에 의해 수용될 수도 있으며, 여기서 통지는 인간 또는 동물 투여의 조성물 형태에 대한 기관의 승인을 반영한다. 예를 들면, 이러한 통지는 미국 식품의약국 (FDA)이 처방약에 대해 승인한 라벨링 (label) 또는 승인된 제품 삽입서일 수 있다. 적합한 약제학적 담체로 제형화된 본 발명의 제법을 포함하는 조성물은 상술한 바와 같이 또한 제조되고, 적절한 컨테이너에 배치되고, 지시된 상태의 치료를 위해 라벨링될 수 있다.
- [0813] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약"은 $\pm 10\%$ 를 가리킨다.
- [0814] 용어 "포함한다", "포함하는", "포함된다", "포함되는", "갖는" 및 이들의 활용형은 "포함하지만 이들에 제한되는 것은 아님"을 의미한다.
- [0815] 용어 "이루어진"은 "포함하고 제한되는"을 의미한다.
- [0816] 용어 "필수적으로 이루어진"은 조성물, 방법 또는 구조가 추가 성분, 단계 및/또는 부분을 포함할 수 있지만, 추가 성분, 단계 및/또는 부분이 청구된 조성물, 방법, 또는 구조의 기초적이고 신규한 특성을 실질적으로 변경하지 않는 경우에만 포함하는 것을 의미한다.
- [0817] 본 명세서에서 사용되는 단수 형태 "한", "하나" 및 "상기"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 예를 들면, 용어 "화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 이들의 혼합물을 포함하는 복수의 화합물을 포함할 수 있다.

- [0818] 본 출원 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 실시양태들은 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지 편의와 간결함을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없이 제한적으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 범위에 대한 설명은 가능한 모든 하위 범위와 해당 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들면, 1에서 6과 같은 범위의 설명은 1에서 3, 1에서 4, 1에서 5, 2에서 4, 2에서 6, 3에서 6 등과 같은 하위 범위, 뿐만 아니라 예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 및 6의 개별 숫자를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.
- [0819] 수치 범위가 본 명세서에서 표시될 때마다, 표시된 범위 내에서 인용된 숫자 (분수 또는 정수)를 포함하는 것을 의미한다. 제1 표시 번호와 제2 표시 번호 "사이 범위의/~사이의 범위"라는 어구 및 제1 표시 번호에서 제2 표시 번호 "까지"의 "범위의/범위"라는 어구는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용되며 제1 및 제2 표시 번호 및 그 사이의 모든 분수 및 정수를 포함하는 것을 의미한다.
- [0820] 본 명세서에서 사용되는 용어 "방법"은 주어진 과제를 달성하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차로서 알려진 방식, 수단, 기술, 및 절차 또는 화학, 약리학, 생물학, 생화학, 및 의학 분야의 기술자에 의해 알려진 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 용이하게 개발되는 방식, 수단, 기술, 및 절차를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0821] 특정 서열 목록에 대한 참조가 이루어질 때, 이러한 참조는 서열 오류, 복제 오류, 또는 염기 치환, 염기 결실 또는 염기 추가로 발생하는 기타 변경으로 인한 사소한 서열 변이를 포함하는 상보적 서열에 실질적으로 상응하는 서열도 포함하는 것으로 이해되어야 하며, 이러한 변화의 빈도가 50개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로 100개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로 200개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로 500개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로 1000개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 대안적으로 5,000개 뉴클레오타이드 중 1개 미만, 10,000개 뉴클레오타이드 중 1개 미만인 것을 조건으로 한다.
- [0822] **실시예**
- [0823] 상술한 바와 함께, 비제한적인 방식으로 본 발명의 몇몇 실시양태를 예시하는 하기 실시예를 참조한다.
- [0824] 일반적으로, 본 명세서에서 사용되는 명명법과 본 발명에서 사용되는 실험실 절차에는 분자, 생화학적, 미생물학적 및 재조합 DNA 기술이 포함된다. 이러한 기술은 문헌에 자세히 설명되어 있다. 예를 들면, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 번호 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 5,272,057호에 상술한 방법론; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "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); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 사용 가능한 번역분석은 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 기재되어 있다 (예를 들면, 미국 특허 번호 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 제5,281,521호를 참조); "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 상술한 문헌들은 본 명세서에 완전히 기재된 것처럼 참조로 포함된다. 다른 일반적인 참고문헌들은 본 명세서 전반에 제공된다. 그 안에 있는 절차는 당업계에 익히 공지되어 있으며, 독자의 편의를 위해 제공된다. 본 명세서에 포함된 모든 정보는 참조로 포함된다.

[0825]

[0826] 실시예 1

[0827] FC에 의해 연결된 2개 또는 3개의 단백질들을 함유하는 이중이량체-단백질의 선별 변이체(selection variant)

[0828] - FC 사슬에 의해 연결된 PD1의 세포외 도메인 및 4-1BBL (본 명세서에서 “sc3x4-1BBL”로 지칭됨)의 ECD들의 3개의 반복부를 포함하는 단일 사슬 (본 명세서에서 “DSP305”로 지칭됨, 서열 번호: 79 및 81);

[0829] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 PD1, SIRP α, 및 sc3x4-1BBL의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP111”로 지칭됨, 서열 번호: 85 및 81);

[0830] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 PD1, SIRP α 및 sc3xCD40L의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP112”로 지칭됨, 서열 번호: 81 및 146);

[0831] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 LILRB2, SIRP α 및 sc3x4-1BBL의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP215”로 지칭됨, 서열 번호: 138 및 85);

[0832] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 LILRB2, SIRP α 및 sc3xCD40L의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP217”로 지칭됨, 서열 번호: 138 및 146);

[0833] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 SIGLEC10, SIRP α 및 sc3x4-1BBL의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP401”로 지칭됨, 서열 번호: 150 및 79);

[0834] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 TIGIT, PD1 및 sc3x4-1BBL의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP501”로 지칭됨, 서열 번호: 152 및 79);

[0835] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 LILRB2, PD1 및 3xscCD40L의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP222”로 지칭됨, 서열 번호: 138 및 154);

[0836] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 SIGLEC10, PD1 및 3xscCD40L의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP403”로 지칭됨, 서열 번호: 110 및 111);

[0837] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 TIGIT, PD1 및 3xscCD40L의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP503”로 지칭됨, 서열 번호: 152 및 154);

[0838] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 PD1, TIGIT 및 3xsc4-1BBL의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP501V1”로 지칭됨, 서열 번호: 81 및 156); 또는

[0839] - N-말단 신호 펩티드 (서열 번호: 95) 및 hIgG4의 “노브-인트루-홀” 함유 FC (서열 번호: 110 및 111)를 포함하는, FC 사슬에 의해 연결된 PD1, TIGIT 및 3xscCD40L의 ECD들의 조합(본 명세서에서 “TSP503V1”로 지칭됨, 서열 번호: 81 및 158);

[0840] 를 함유하는 이중이량체-단백질의 구조 분석을 하기 매개변수들을 최적화하기 위해 수행했다:

[0841] • 폴딩 (folding) - 표적에 대한 결합을 가능하게 하고, 잠재적인 이황화 스क्र램블링(di-sulfide scrambling) 최소화하는 적절한 폴딩;

[0842] • 무결성 (integrity) - 노출된 단백질 분해 위치 없음;

[0843] • 포유동물 발현 시스템에서의 높은 발현; 및

[0844] · 낮은 면역원성.

[0845] 동족체 X선 구조를 기반으로 각 부분에 대해 상동성 모델링을 수행하였다. PD1의 경우 - PDB ID: 3RRQ, 5GGR, 5GGS, 5JXE 및 4ZQK를 주형으로 사용하였다. hIgG4의 경우 - PDB ID: 4C54, 4C55, 5W5M 및 5W5N을 주형으로 사용하였다. 41BB-L의 경우 - PDB ID: 6CPR, 6A3V 및 6CUO를 주형으로 사용하였다. SIRP α 의 경우 - PDB ID의 2UV3, 2WNG, 4CMM, 6BIT, 2JJS 및 2JJT를 주형으로 사용하였다. 링커 분절은 주로 구조적 위반(structural violation)을 방지하고 가능한 '스페이서' 길이에 대한 타당한 추정치를 가능하게 하기 위해 CHARMM에서 루프 모델링을 사용하여 모델링하였다. CD40L의 경우 - PDB ID: 1ALY, 1I8R, 3LKJ 및 3QD6을 주형으로 사용하였다. LILRB2의 경우 - PDB ID: 2GW5, 4LLA, 2DYP 및 6BCP를 주형으로 사용하였다. SIGLEC10의 경우 - PDB ID: SIGLEC8 동족체의 2N7A 및 2N7B를 주형으로 사용하였다. TIGIT의 경우 - PDB ID: 3QOH, 3RQ3, 3UCR, 3UDW 및 5V52를 주형으로 사용하였다.

[0846] 도 3 및 6은 PD1-Fc-sc3x4-1BBL (도 3) 또는 SIRP α -PD1-Fc-sc3x4-1BBL (도 6) 이중이량체의 확인된 도메인 및 분절에 대해 생성된 3D 모델을 나타내며, 이들의 리간드(CD47, PDL1, 및 4-1BB)가 있는 경우 및 없는 경우를 나타낸다. 도 12a-16c는 이중이량체들의 개략도 및 PD1-SIRP α -Fc-sc3x4-1BBL (도 12a-c), LILRB2-Fc-sc3x4-1BBL (도 13a-c), LILRB2-SIRP α -Fc-sc3x4-1BBL (도 14a-c), SIGLEC10-PD1-Fc-sc3x4-1BBL (도 15a-c) 또는 TIGIT-PD1-Fc-sc3x4-1BBL (도 16a-c) 이중이량체의 확인된 도메인 및 분절에 대해 생성된 3D 모델을 나타낸다. 이 분석은 리간드에 대한 가능한 결합 및 상이한 도메인들 사이에 간섭(interference)이 없음을 예측했다. 구조 분석은 또한 sc3x4-1BBL에서 4-1BBL 아미노산 서열의 3개의 반복부 사이의 내부 (GGGG)x2+GGGG (서열 번호: 96) 링커 및 sc3x4-1BBL에서 CD40L 아미노산 서열의 3개의 반복부 사이의 내부 (GGGG)x3 (서열 번호: 136) 링커가 이러한 결합을 촉진할 것을 나타냈다.

[0847] 실시예 2

[0848] 이중이량체의 제조

[0849] 비교 기능 분석 및 생산 평가를 위해, 여러 이중이량체들을 “노브 (knob)” 인투 “홀 (hole)” 방법 (예를 들면, 미국 특허 번호 제8216805호에 기재됨)을 사용하여 제조하였다: 즉, 본 명세서에서 “DSP305” (서열 번호: 79 및 81), 및 “DSP305_V1 (서열 번호: 79 및 83)”로 지칭되는 PD1-Fc-3xSc4-1BBL 이중이량체들; 본 명세서에서 “TSP111”(서열 번호: 85 및 81), “TSP111_V1”(서열 번호: 89 및 91) 및 “TSP111_V2”(서열 번호: 85 및 83)로 지칭되는 PD1-SIRP α -Fc-3xsc4-1BBL 이중이량체들; 본 명세서에서 “TSP112” (서열 번호: 81 및 146)로 지칭되는 PD1-SIRP α -Fc-3xscCD40L 이중이량체; 본 명세서에서 “DSP214”(서열 번호: 138 및 142) 및 “DSP 214 V1”(서열 번호: 140 및 144)로 지칭되는 LILRB2-PD1-Fc-3xsc4-1BBL 이중이량체들; 본 명세서에서 “TSP215”(서열 번호: 138 및 85) 및 “TSP215 V1”(서열 번호: 140 및 85)로 지칭되는 LILRB2-SIRP α -Fc-3xsc4-1BBL 이중이량체들; 본 명세서에서 “TSP217” (서열 번호: 138 및 146)로 지칭되는 LILRB2-SIRP α -Fc-3xscCD40L 이중이량체; 본 명세서에서 “DSP218” (서열 번호: 138 및 148)로 지칭되는 2xLILRB2-Fc-3xscCD40L 이중이량체; 본 명세서에서 “TSP221” (서열 번호: 138 및 79)로 지칭되는 LILRB2-PD1-Fc-3x4-1BBL 이중이량체; 본 명세서에서 “TSP222” (서열 번호: 138 및 154)로 지칭되는 LILRB2-PD1-Fc-3xscCD40L 이중이량체; 본 명세서에서 “TSP401” (서열 번호: 150 및 79)로 지칭되는 SIGLEC10-Fc-PD1-3xsc-4-1BBL 이중이량체; 본 명세서에서 “TSP403” (서열 번호: 150 및 154)으로 지칭되는 SIGLEC10-PD1-Fc-3xscCD40L 이중이량체; 본 명세서에서 “TSP501” (서열 번호: 152 및 79)로 지칭되는 TIGIT-Fc-PD1-3xsc-4-1BBL 이중이량체; 및 본 명세서에서 “TSP503” (서열 번호: 152 및 154)으로 지칭되는 TIGIT-PD1-Fc-3xscCD40L 이중이량체. 생산된 이중이량체들 중 일부의 개략도는 도 2, 5, 12a, 13a, 14a, 15a, 16a 및 32에 나타난다.

[0850] DSP305, DSP305_V1, TSP111, TSP111_V1, TSP111_V2, TSP112, DSP214, DSP214_V1, TSP215, TSP215_V1, TSP217, DSP218, TSP221, TSP222, TSP401, TSP403, TSP501 또는 TSP503에 대한 코딩 서열로 클로닝된 pcDNA3.4 발현 벡터에 의해 형질주입된 Expi293F 세포에서 생산을 수행하였다. Kozak 서열 및 인공 신호 펩티드 (MESPAQLLFLLLWLPDGVHA, 서열 번호: 95)를 첨가하고, EcoRI 및 HindIII 또는 XbaI 및 EcoRV 제한 효소를 사용하여 서열을 벡터에 클로닝하였다. 세포 배양 상층액에서 단백질을 수집하고, 경우에 따라 단백질 A (PA) Poros MabCapture A 수지 또는 Anion Exchange High Trap Q FF 수지를 사용하여 단백질을 1단계 정제로 정제하였다.

[0851] 생산은 SDS-PAGE로 확인하였다. 구체적으로, 각 시료로부터 35 μ l 상층액 또는 3 μ g PA-정제된 단백질을 β -머캅토에탄올과 함께 또는 β -머캅토에탄올 없이 로딩 완충액 (loading buffer)과 혼합하고 (각각 환원 및 비환원 조건으로), 95°C에서 5분 동안 가열하고, 8% 또는 4-20% 구배 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 SDS-PAGE 상에

서 분리하였다. 겔 상에서 단백질의 이동을 제조업체 지침에 따라 e-Stain machinery (GenScript)로 시각화하였다.

[0852] 도 4, 7 및 17-18b에서 나타난 바와 같이, 비환원 조건에서, 예상되는 이중이량체 분자량 형태의 단백질이 높은 비율로 관찰되었고, 환원 조건에서, 2개의 서브유닛의 발현이 확인되었다. 오직 소량의 이성질체 (2개의 “노브 (knob)” 또는 2개의 “홀 (hole)” 단편들을 포함하는 이량체)만이 검출되었다.

[0853] 동일한 방식으로, 여러 다른 이중이량체, 즉, 본 명세서에서 “TSP501V1” (서열 번호: 81 및 156)로 지칭되는 PD1-TIGIT-3xsc4-1BBL 이중이량체 및 본 명세서에서 “TSP503V1” (서열 번호: 81 및 158)로 지칭되는 PD1-TIGIT-3xscCD40L 이중이량체를 상술한 바에 따라 생산하고 분석하였다.

[0854] 생산된 모든 이중이량체를 각각 실시예 3-13에 따라 추가로 분석하였다.

[0855]

[0856] 실시예 3

[0857] 이중이량체는 모든 도메인을 포함한다

[0858] 재료 - 본 명세서의 실시예 2에서 기재된 바와 같이 제조한 이중이량체.

[0859] 웨스턴 블롯 분석의 경우: Spectra BR 단백질 마커 (Thermo Fisher Scientific, cat# 26634) 또는 3 color Extra Range 단백질 마커 (GenScript, cat# PM2800), Laemmli 로딩 완충액 (Loading buffer) (BioRad, cat# 161-0747) 또는 시료 완충액 (sample buffer) (GenScript cat# M00676), 8% 또는 4-20% 폴리아크릴아미드 겔 (polyacrylamide gel) (BioRad, cat# 556-8094 또는 GenScript cat# M00662 또는 M00656), 항-인간 4-1BBL (BioVision, 5369-100), PD1 (Cell Signaling, cat# 86163), 항-인간 PD1 (GenScript, cat# A01829-40), 비오틴화된 토끼 항-인간 SIRPα (LsBio cat# LS-C370337), 항-인간 LILRB2 (R&D systems cat# MAB2078), 항-인간 SIRPα (cat# LS-X370337), streptavidin-HRP (Pierce cat# TS21126), 항-인간 SIGLEC10 (R&D systems cat# AF2130), 항-인간 TIGIT (MyBioSource cat# MBS9217285, 항-인간 CD40L (MyBioSource cat# MBS840387), 2차 염소 항 토끼 (secondary goat anti rabbit) IgG (H + L)-HRP conjugate (R&D systems, cat# 170-6515), 염소 항 마우스 (goat anti-mouse) IgG HRP- conjugate (Bio-rad cat# 170-6516) 및 ECL Plus 웨스턴 블롯팅 기질 (Pierce, cat# 32132).

[0860] 샌드위치 ELISA의 경우: 항 4-1BBL 항체 (매칭된 쌍 (matched pair)으로부터의 포획 항체; Abnova #H00008744-AP41) 또는 항-CD40L, 항 PD1-비오틴화 항체, 항-인간 SIRPα (cat# LS-C370337), 항-인간 SIGLEC10 (R&D systems cat# AF2130), 항-인간 TIGIT (MyBioSource cat# MBS9217285, 항-인간 CD40L (MyBioSource cat# MBS840387), 스트렙타비딘 단백질, HRP (# 21126, Thermo Scientific), TMB 기질 (1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution, Thermo Scientific #34028).

[0861] 방법 -

[0862] 웨스턴 블롯 분석 - 생산된 이중이량체 (레인당 50-500 ng)를 환원성 또는 비환원성 조건 (각각 β- 머캅토에탄올을 갖거나 갖지 않는 로딩 완충액에서)으로 처리하고, 95℃에서 5분 동안 가열하고, 8% 또는 4 - 20% 구배 SDS- PAGE에서 분리하였다. 이어서, 단백질을 PVDF 막으로 옮기고, 1차 항체 (항-인간 4-1BBL, 항-PD1, 항-SIRPα, 항-인간 LILRB2 항-인간 SIGLEC10, 항-인간 TIGIT 또는 항-인간 CD40L)와 함께 1시간 또는 밤새 배양한 후, HRP-접합된 2차 항체와 함께 1시간 동안 배양하였다. 신호는 ECL 발달(ECL development) 후에 검출되었다.

[0863] 샌드위치 ELISA - 플레이트를 항 4-1BBL 또는 항 CD40L 포획 항체 (PBS 중 2.5 μg/ml)로 코팅하고, 차단 용액 (PBS, 1% BSA, 0.005% Tween)으로 차단하였다. 차단 용액 중 연속 희석한, 생산된 이중이량체를 2시간 동안 코팅된 플레이트에 배양 후, 검출된 항체 (예를 들면, 항-PD1 또는 항 SIRPα 비오틴화된 항체)와 함께 배양하고, 제조업체 지침에 따라 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질로 순차적으로 검출하였다. 플레이트를 620 nm에서의 기준으로, 450 nm에서 플레이트 판독기 (Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 분석하였다.

[0864]

[0865] 결과 -

[0866] 생산된 이중이량체는 모든 도메인을 포함한다. 즉: TSP111은 PD1, SIRPα 및 4-1BBL 도메인을 포함하고 (도 19

의 A-C); TSP112는 PD1 및 SIRP α 도메인을 포함하고 (도 20의 A-B); TSP401은 4-1BBL 및 PD1 도메인을 포함하고 (도 20의 A 및 도 20의 C); TSP501은 4-1BBL 및 PD1 도메인을 포함하고 (도 20의 A 및 20의C); TSP221은 4-1BBL 도메인을 포함하고 (도 20의 C); DSP214는 LILRB2 및 4-1BBL 도메인을 포함하고 (도 21의 A 및 C); DSP214 V1은 4-1BBL 도메인을 포함하고 (도 21의 A); TSP215는 LILRB2, SIRP α 및 4-1BBL 도메인을 포함하고 (도 21의 A-C); TSP215 V1은 SIRP α , 4-1BBL 도메인을 포함하고 (도 21의 A-B); TSP217은 LILRB2 도메인을 포함하며 (도 21의 C); DSP218은 LILRB2 도메인을 포함한다 (도 21의 C).

[0867]

[0868] 실시예 4

[0869]

이종이량체는 세포 표면 상에 발현된 이의 대응 리간드/수용체에 결합한다.

[0870]

PDL1에 대한 PD1 모이어티의 결합 분석

[0871]

인간 PDL1에 대한, PD1 도메인 및 4-1BBL 도메인을 포함하는 이종이량체 (예를 들면, PD1-4-3xsc1BBL, SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL 이종이량체)의 PD1 도메인의 결합은 PDL1을 과발현하는 DLD1-PDL1 세포주를 사용하여 결정하였다. DLD1-WT 세포는 낮은 수준으로 내인성 PDL1을 발현하므로 대조군으로서 역할을 하였다 (도 8a). 이종이량체를 함유하는 상이한 상층액 희석액들과 함께 세포를 배양한 다음, 접합된 항 4-1BBL 항체로 면역-염색하였다. 결합은 유세포 측정으로 분석하였다.

[0872]

재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 PD1 도메인 및 4-1BBL 도메인을 포함하는 이종이량체. DLD1-WT 및 DLD1-PDL1 세포주 (Hendriks et al 2016), 항-인간 CD47 (InhibRx-like, GenScript), AF647 항-인간 CD47 (InhibRx-like, GenScript), APC 항-인간 CD274 (Biolegend, cat#329708), APC 마우스 IgG1, k 동형 (isotype) 대조군 (Biolegend, cat#400122), APC 항 4-1BBL (Biolegend, cat# 311506)

[0873]

방법 - 생산된 이종이량체를 함유하는 상층액을 연속 희석한 후, 4°C에서 20분 동안 세포를 배양한 다음, 4-1BBL에 대한 접합 항체로 면역염색하고, 유세포 측정으로 분석하였다. 일부 경우에, 세포를 상층액과 함께 배양하기 전에 항 CD47 차단제 항체와 함께 사전 배양하였다.

[0874]

결과 - 도 8a에 나타난 바와 같이, PDL1의 낮은 내인성 발현을 입증한 DLD1 WT 세포와 비교하여 DLD1-PDL1 과발현 세포에서 높은 수준의 PDL1 막 발현이 관찰되었다.

[0875]

도 8c에 나타난 바와 같이, DSP305 (서열 번호: 79 및 81)는 용량 의존적 방식 (dose dependent manner)으로 DLD1 PDL1 과발현 세포에 결합하였다.

[0876]

도 9a-b에 나타난 바와 같이, TSP111 (서열 번호: 85 및 81)은 용량 반응 방식 (dose response manner)으로 DLD1 WT 및 PDL1-과발현 세포주 모두에 결합하였다. 두 DLD1 세포주 모두 CD47을 발현하기 때문에 TSP111의-SIRP α 암 (arm)은 주로 세포에서 발현된 CD47을 통해 DLD1 WT 세포에 결합하는 반면, TSP111의-PD1 및 SIRP α 암 (arm)은 모두 세포 표면에 발현되는 PDL1 및 CD47 단백질을 통해 DLD1 PDL1 과발현 세포에 결합한다는 점을 시사한다.

[0877]

도 22a에 나타난 바와 같이, TSP401 (서열 번호: 150 및 79)은 용량 의존적 방식 (dose dependent manner)으로 DLD1 PDL1 과발현 세포에 결합하였다.

[0878]

도 22b에 나타난 바와 같이 TSP501 (서열 번호: 152 및 79)은 용량 의존적 방식 (dose dependent manner)으로 DLD1 PDL1 과발현 세포에 결합하였다.

[0879]

4-1BB에 대한 4-1BBL 모이어티의 결합 분석

[0881]

인간 4-1BB에 대한, 4-1BBL 도메인 및 PD1 또는 LILRB2 도메인을 포함하는 이종이량체 (예를 들면, PD1-4-3xsc1BBL 및 SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL 이종이량체)의 4-1BBL 도메인의 결합은 4-1BB를 과발현하는 HT1080-4-1BB 세포주를 사용하여 결정하였다. HT1080 WT 세포는 음성 대조군으로서 역할을 하였다. 이종이량체를 함유하는 상이한 상층액 희석액들과 함께 세포를 배양한 다음, 접합된 항 PD1 항체 또는 항 LILRB2 항체로 면역-염색하였다. 결합은 유세포 측정으로 분석하였다.

[0882]

재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 4-1BBL 도메인, 및 PD1 또는 LILRB2 도메인을 포함하는 이종이량체. HT1080 WT 및 HT1080-4-1BB 세포 (Wyzgol et al, 2009), 항-인간 CD47 차단제 Ab (InhibRx-like,

GenScript), AF647-라벨링된 항-인간 CD47, 항-인간 4-1BB clone M127 차단제 Ab (BD, cat# 552532), AF647-라벨링된 항-인간 4-1BB 클론 M127, APC 항-인간 CD85d (ILT4) 항체 클론 41D1 (Biolegend cat#338708), APC 마우스 IgG1, k 동형 (isotype) 대조군 (Biolegend, cat#400122), APC-라벨링된 항 PD1 (Biolegend, cat# 329908).

- [0883] 방법 - 생산된 이중이량체를 함유하는 상층액을 연속 희석한 후, 4℃에서 20 - 30분 동안 세포를 배양한 다음, PD1 또는 LILRB2에 대한 항체로 면역-염색하고, 유세포 측정으로 분석하였다. 일부 경우에서, 세포를 상층액과 함께 배양하기 전에, 항 CD47 차단제 항체 또는 항 4-1BB 차단제 항체와 함께 사전 배양하였다.
- [0884] 결과 - 도 8b에 나타난 바와 같이, 4-1BB의 막 발현은 HT1080 WT 세포가 아닌 HT1080 4-1BB 세포의 표면에서 관찰되었다.
- [0885] 도 8d에 나타난 바와 같이, DSP305 (서열 번호: 79 및 81)는 HT1080 4-1BB 과발현 세포에 결합하였다.
- [0886] 도 9b에 나타난 바와 같이, TSP111 (서열 번호: 89 및 91)은 HT1080-4-1BB 세포주 둘 모두에 결합하였다. 2개의 HT1080 세포주 모두 CD47을 발현하기 때문에, TSP111의 4-1BBL 및/또는 SIRP α 팔(arm) 모두 이들의 수용체 (각각 4-1BB, CD47)에 결합하는 것을 시사했다.
- [0887] 도 23에 나타난 바와 같이, TSP401 (서열 번호: 150 및 79) 및 TSP501 (서열 번호: 152 및 79)은 HT1080-4-1BB 과발현 세포에 결합하였다.
- [0888] 도 24에 나타난 바와 같이, DSP214 (서열 번호: 138 및 142)는 HT1080-4-1BB 세포주에 결합하였다. 항-4-1BB 차단제 항체와의 사전 배양은 결합을 완전히 방지하였다.
- [0889] 도 25에 나타난 바와 같이, TSP215 (서열 번호 138 및 85)는 HT1080-4-1BB 세포주에 결합하였다. 항-CD47 차단제 항체 또는 항-4-1BB 차단제 항체와의 사전 배양은 결합을 감소시켰다. 항-CD47 및 항-4-1BB 차단제 항체와의 사전 배양 둘 모두 결합을 완전히 방지하였다.

[0890]

[0891] **CD47에 대한 SIRP α 모이어티의 결합 분석**

- [0892] 인간 CD47에 대한, SIRP α 도메인 및 4-1BBL 도메인을 포함하는 이중이량체 (예를 들면, SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL 이중이량체)의 SIRP α 도메인의 결합은 인간 CD47를 과발현하는 CHO-K1-CD47 세포주를 사용하여 결정하였다. CHO-K1 WT 세포는 음성 대조군으로서 역할을 하였다. 이중이량체를 함유하는 상이한 상층액 희석액들과 함께 세포를 배양한 다음, 접합된 항 4-1BBL 항체로 면역-염색하였다. 결합은 유세포 측정으로 분석하였다.
- [0893] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 TSP111 (서열 번호: 85 및 81), TSP111_V1 (서열 번호: 89 및 91) 및 TSP111_V2 (서열 번호: 85 및 83). CHO-K1 및 CHO-K1-CD47 세포, 항-인간 CD47 차단제 Ab (InhibRx-like GenScript), AF647-라벨링된 항-인간 CD47, APC-라벨링된 마우스 IgG1, k 동형 대조군 (Biolegend, cat#400122), APC 항 4-1BBL (Biolegend, cat# 311506).
- [0894] 방법 - 생산된 이중이량체를 함유하는 상층액을 연속 희석한 후, 4℃에서 20분 동안 세포를 배양한 다음, 4-1BBL에 대한 항체로 면역-염색하고, 유세포 측정으로 분석하였다. 일부 경우에서, 세포를 이중이량체와 함께 배양하기 전에 항 CD47 차단제 항체와 함께 사전 배양하였다.
- [0895] 결과 - 도 9c에 나타난 바와 같이, CHO-K1 WT 세포와 비교하여 CHO-K1 CD47 과발현 세포의 표면 상에서 CD47의 막 발현이 관찰되었다.
- [0896] 도 9d에 나타난 바와 같이, TSP111 (서열번호 85 및 81)은 CHO-K1 WT 세포가 아닌 CHO-K1-CD47에 결합하였다. 항 CD47 차단제 항체와의 사전 배양은 CHO-K1-CD47 세포에 대한 TSP111의 결합을 완전히 제거하였다. 종합하면, 상기 결과는 TSP111의 SIRP α 팔이 이의 리간드(CD47)에 결합한 것을 나타낸다.

[0897]

[0898] **CD40에 대한 CD40L 모이어티의 결합 분석**

- [0899] 인간 CD40에 대한, CD40L 도메인 및 PD1 도메인을 포함하는 이중이량체 (예를 들면, SIRP α-PD1-3xscCD40L 이중이량체)의 CD40L 도메인의 결합은 CD40을 과발현하는 HT1080-CD40 세포주를 사용하여 결정하였다. HT1080 WT 세포는 내인성 CD40을 발현하지 않으므로 음성 대조군으로서 역할을 하였다. 이중이량체를 함유하는 상이한 상층액 희석액들과 함께 세포를 배양한 다음, 접합된 항 PD-1 항체로 면역-염색하였다. 결합은 유세포 측정으로

분석하였다.

- [0900] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 CD40L 도메인 및 PD1 도메인을 포함하는 이중이량체 (예를 들면, TSP112). HT1080 WT 및 HT1080-CD40 세포주 (Wyzgol et al, 2009), APC 항-인간 CD40 항체 (Biolegend, cat# 313008), APC 마우스 IgG1, k 동형 대조군 (Biolegend, cat#400120), APC-라벨링된 항-PD1 항체 (Biolegend, cat# 329908).
- [0901] 방법 - 생산된 이중이량체를 함유하는 상층액을 연속 희석한 후, 4℃에서 20분 동안 세포를 배양한 다음, PD-1에 대한 접합된 항체로 면역-염색하고, 유세포 측정으로 분석하였다.
- [0902] 결과 - 도 26a에 나타난 바와 같이, CD40의 내인성 발현을 나타내지 않은 HT1080 WT 세포와 비교하여, HT1080-CD40 과발현 세포에서 높은 수준의 CD40 막 발현이 관찰되었다.
- [0903] 도 26b에 나타난 바와 같이, TSP112 (서열 번호: 81 및 146)는 용량 의존적 방식 (dose dependent manner.)으로 HT1080-CD40 과발현 세포에 결합하였다.
- [0904]
- [0905] CD155(PVR)에 대한 TIGIT 모이어티의 결합 분석
- [0906] 인간 CD155에 대한, TIGIT 도메인 및 4-1BBL 도메인을 포함하는 이중이량체 (예를 들면, TIGIT-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL 이중이량체)의 TIGIT 도메인의 결합은 CD155를 내인성 발현하는 DLD-1 WT 세포주를 사용하여 결정하였다. U937 세포는 내인성 CD155를 발현하지 않으므로 음성 대조군으로서 역할을 하였다. 이중이량체를 함유하는 상이한 상층액 희석액들과 함께 세포를 배양한 다음, 접합된 항 4-1BBL 항체로 면역-염색하였다. 결합은 유세포 측정으로 분석하였다.
- [0907] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 TIGIT 도메인 및 4-1BBL 도메인을 포함하는 이중이량체 (예를 들면, TSP501). DLD1-WT 세포주 (ATCC, CCL-221), U937 (ATCC, CRL-3253), APC 항-인간 CD155 항체 (Biolegend, cat#337618), APC 마우스 IgG1, k 동형 대조군 (Biolegend, cat#400120), APC 항 4-1BBL 항체 (Biolegend, cat# 311506).
- [0908] 방법 - 생산된 이중이량체를 함유하는 상층액을 연속 희석한 후, 4℃에서 20분 동안 세포를 배양한 다음, 4-1BBL에 대한 접합된 항체로 면역-염색하고, 유세포 측정으로 분석하였다.
- [0909] 결과 - 도 27의 A-B에 나타난 바와 같이, 동형 대조군 항체와 비교하여 DLD-1 WT 세포에서 높은 수준의 CD155 막 발현이 관찰된 반면, U937 세포는 CD155를 발현하지 않았다 (도 27의 B).
- [0910] 도 27의 C에 나타난 바와 같이, TSP501 (서열 번호: 152 및 79) 은 용량 의존적 방식으로 DLD-1 WT 세포에 결합하였고 U937 세포에는 결합하지 않았다.
- [0911]
- [0912] **인간, 마우스 및 시노몰구스 (*cynomolgus*) 원숭이 대응물 (counterpart)에 대한 이중이량체의 결합**
- [0913] 이중이량체의 관련 카운터 리간드/수용체에 대한 결합은 표면 플라즈몬 공명 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 분석으로 결정하였다.
- [0914] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 이중이량체. 시리즈 S 센서 칩 CM5 (GE, cat. # BR100530), Ab 포획 키트, 음성 대조군 단백질, 인간 PDL1-hFc (R&D, cat. # 156-B7-100), 인간 CD47-hFc (R&D, cat # 4670-CD-050), 마우스 CD47-hFc (R&D, cat. # 1866-CD-050), 시노몰구스 CD47-hFc (ACROBiosystems, cat. # CD7-C5252), 인간 4-1BB-hFc (LsBio, cat # LS-G4041-100), 마우스 4-1BB-hFc (R&D, cat. # 937-4B-050), 시노몰구스 4-1BB-hFc (R&D, cat. # 9324-4B-100), 마우스 PDL1, 시노몰구스 PDL1,
- [0915] 방법 - SPR 분석을 Biacore T100 biosensor (GE Healthcare)를 사용하여 수행하였다. 포획 키트의 항체는 제조업체에서 권장하는 표준 아민 커플링 프로토콜을 사용하여 4개의 흐름 채널 (flow-channels)과 커플링하였다. 비제한적인 예로서, SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL 이중이량체의 경우, 칩에 대한 PDL1, CD47 및 4-1BB의 결합을 HBS-EP+ 러닝 완충액 (running buffer) (10mM HEPES pH7.3, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween20)에서 수행하였다: 참조 채널(reference channel) Fc1에 음성 대조군 단백질을 로딩한 반면에, 채널 Fc2-4에는 인간, 마우스 및 시노몰구스 PDL1 단백질을 로딩하였다. 칩이 자동 재생된 후, 칩은 채널 Fc1에 음성 대조군 단백질로 다시 로딩되고, Fc2-4에는 인간, 마우스 및 시노몰구스 4-1BB로 다시 로딩된다. 칩이 자동 재생된 후, 칩은 채

널 Fc1에 음성 대조군 단백질로 다시 로딩되고, Fc2-4에는 인간, 마우스 및 시노몰구스 CD47로 다시 로딩된다. 대응물에 결합 후, SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL-변이체 분석물을 4개 채널 모두에 전달하였다. 이 과정은 50 μl/min의 유속에서 다양한 농도의 “SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL 분석물로 되풀이하여 반복된다. 각 사이클이 끝날 때 포획된 분자를 제거함으로써 활성 표면을 재생하기 위해 3M MgCl2 용액을 주입 (20 μl/분으로 45초)하였다. 결합 매개변수는 BiaEvaluation software v. 3.0.2 (GE Healthcare)에서 Kinetic 1:1 결합 모델을 사용하여 평가하였다. PD1-3xsc4-1BBL의 경우 CD47 없이 동일한 절차를 적용하였다. 동일한 방식으로, 각 이중이량체를 인간 시노몰구스 및 마우스 유래의 카운터-리간드/수용체 재조합 단백질을 사용하여 연구하였다.

[0916] 실시예 5

[0917] 이중이량체들은 이들의 대응 리간드/수용체에 동시에 결합한다

[0918] 이중이량체들의 이들의 대응-리간드/수용체에 대한 결합(예를 들면, PD1-4-3xsc1BBL 및 SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL 이중이량체에서 PD1의 PDL1에 대한 결합, 4-1BBL의 4-1BB에 대한 결합, 및 SIRP α의 CD47에 대한 결합, LILRB2-SIRP α-3xsc4-1BBL 이중이량체에서 4-1BBL의 4-1BB에 대한 결합, LILRB2의 HLA-G에 대한 결합 및 SIRP α의 CD47에 대한 결합)을 샌드위치 ELISA 기반 분석으로 시험하였다. 또한 이 분석은 이중이량체 단백질의 상이한 변이체들의 기능적 특성을 비교하는데 사용된다.

[0919] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 이중이량체. 인간 재조합 PDL1 (GenScript), 인간 재조합 CD47 (GenScript), 인간 재조합 HLA-G (Abcam), 비오틴-접합된 인간 재조합 4-1BB 단백질 (GenScript), 토끼 항-인간 SIRP α 항체 (항-약물 항체 DSP107), HRP-접합된 스트렙타비딘 단백질 (cat#21126, ThermoScientific), TMB-ELISA 기질 용액 (Sigma, Cat# T0440) 및 TMB 정지 용액 (Southern Biotech, cat#0412-01).

[0920] 방법 - 96 웰 플레이트를 재조합 CD47 단백질, PDL1 단백질, HLA-G 단백질 또는 두 단백질의 혼합물과 같은 물량으로 4° C에서 밤새도록 배양하여 사전 코팅하였다. 차단 및 세척 후, 생산된 PD1-4-3xsc1BBL, SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL, 2xLILRB2-3xsc4-1BBL 또는 LILRB2-SIRP α-3xsc4-1BBL 이중이량체를 포함하는 연속 희석된 상층액을 관련된 사전 코팅된 웰에 첨가하였다. 추가 세척 단계 후, 비오틴화된 4-1BB 또는 토끼 항-SIRP α 항체를 첨가하고 각각 이중이량체의 4-1BBL 암 (arm) 또는 SIRP α 암 (arm)에 결합되도록 하였다. 플레이트를 다시 세척하고 스트렙타비딘-HRP 또는 염소 항-토끼 IgG 항체-HRP를 첨가하였다. 플레이트 판독기 (Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 표준 ELISA 프로토콜에 따라 TMB 기질로 검출을 수행하였다.

[0921] 결과 - 도 10a에 나타난 바와 같이, DSP305 (서열 번호: 79 및 81)는 농도 의존적 방식 (concentration dependent manner)으로 PDL1 코팅된 플레이트에 결합하였다.

[0922] 도 10b에 나타난 바와 같이, TSP111 (서열 번호: 85 및 81)은 농도 의존적 방식으로 CD47 및 PDL1 코팅된 플레이트에 모두 결합하고 CD47 및 PDL1의 혼합물로 코팅된 플레이트에도 결합하였다. 흥미롭게도, 혼합 단백질 코팅 플레이트에 대한 결합이 더 높았으며, 이는 두 암 (arm) (SIRP α 및 PD1)이 모두 관여했을 때, 결합이 더욱 강해진다는 점을 시사한다. 대조군 상층액은 어떤 코팅된 플레이트에도 결합하지 않았다.

[0923] 도 28a에 나타난 바와 같이, HLA-G에 대한 DSP214 (서열 번호: 138 및 142)의 결합은 용량 의존적 방식으로 41BB-비오틴을 통해 검출하였으며, 이는 LILRB2 및 4-1BBL 암 (arm)이 그들의 표적에 결합할 수 있음을 시사한다. 음성 대조군 상층액에서는 결합이 관찰되지 않았다.

[0924] 도 28b-c에 나타난 바와 같이, HLA-G 또는 CD47에 대한 TSP215 (서열 번호: 138 및 85)의 결합은 용량 의존적 방식으로 41BB-비오틴을 통해 검출되었으며, 이는 LILRB2, SIRP α 및 41BBL 팔(arm)이 그들의 표적에 결합한다는 점을 시사한다. BSA만으로 코팅된 대조군 플레이트에 대한 결합은 검출되지 않았다.

[0925]

[0926] 실시예 6

[0927] 이중이량체에 의한 4-1BB 또는 CD40의 활성화

[0928] 4-1BB 수용체 활성화

[0929] 4-1BBL 도메인을 포함하는 생산된 이중이량체 (예를 들어, PD1-4-3xsc1BBL, SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL, SIGLEC10-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL 및 TIGIT-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL 이중이량체)에 의한 4-1BB 수용체 매개 신호 전달의 활성화를 4-BBL 과발현 HT1080 세포주 (HT1080-4-1BB)를 사용하여 결정하였다. 이들 세포 표면의 4-1BB 수용체에 4-

1BBL이 결합하면, 신호 전달 경로가 활성화되어 IL8이 분비된다 (Wyzgol et al., 2009, The Journal of Immunology). 이를 위해, 세포를 이중이량체를 함유하는 연속 희석된 상층액의 존재 하에 배재도록 배양하였다. 배양을 위한 단백질 (예를 들어, CD47, PDL1, CD24, CD155 또는 두 개의 관련 단백질이 동일한 몰농도로 혼합된 경우)로 사전 코팅된 96 웰 플레이트에서 수행하였다. 활성화된 HT1080-4-1BB 세포로부터 배양 배지로의 IL8 분비를 ELISA로 결정하였다.

[0930] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 4-1BBL 도메인을 포함하는 이중이량체. 인간 재조합 PDL1 (GenScript), 인간 재조합 CD47 (GenScript), 인간 재조합 PDL1-Fc tagged (ACRO Biosystem, cat#PD1-H5258), 인간 재조합 CD24-His tagged (ACRO Biosystem, cat#CD4-H52H3), 인간 재조합 CD155 His tagged (ACRO Biosystem, cat#CD5-H5223), HT1080-4-1BB 세포, IL-8 ELISA 키트 (Biolegend, cat# 431507), DMEM (Biological industries, cat# 01-055-1A), RPMI (Biological industries, cat#01-100-1A), FBS (Gibco, cat# 10270106), 항 4-1BB 항체 (Biolegend, cat#359810), 동형 (isotype) IgG1, k (Biolegend, cat#400122).

[0931] 방법 - DSP305 및 TSP111의 경우, 재조합 CD47 또는 PDL1 또는 동일한 몰량의 두 단백질의 혼합물과 함께 96 웰 플레이트를 4°C에서 배재도록 배양함으로써 사전 코팅하였다 (TSP401의 경우, PDL1 및 CD24; TSP501의 경우, PDL1 및 CD155). 세척 단계 후, 생산된 PD1-4-3xsc1BBL, SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL, SIGLEC10-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL 또는 TIGIT-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL 이중이량체를 포함하는 연속 희석된 상층액을 관련된 사전 코팅된 웰에 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양한 다음, 37°C에서 24시간 동안 HT1080 4-1BB 세포 (웰당 10000개)를 첨가하였다. 배양 후, 상층액 중 IL8 농도를 제조사의 프로토콜에 따라 IL8 ELISA 키트로 결정하였다. 상층액은 플레이트 판독기 (Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 450 nm, 참조로 540 nm에서 IL-8 농도에 대해 분석하였다. HT1080 4-1BB 세포에 대한 4-1BB 수용체의 발현을 항-41BB 항체로 면역염색한 세포로 결정하였고, 유세포 측정으로 분석을 수행하였다.

[0932] 결과 - 도 8b에 나타난 바와 같이, HT1080-4-1BB 세포는 실제로 관련 수용체 4-1BB를 높은 수준으로 발현한다. 도 11a-c 및 29-ab에 나타난 바와 같이 DSP305 (서열 번호: 79 및 81), TSP111 (서열 번호: 85 및 81), TSP111_V1 (서열 번호: 89 및 91) 또는 TSP111_V2 (서열 번호: 85 및 83), TSP401(서열번호: 150 및 79) 또는 TSP501 (서열번호: 152 및 79)을 포함하는 상층액은 용량 의존적 방식으로 신호 전달을 유발하여 HT1080-41BB 세포로부터 IL8을 분비할 수 있었다.

[0933] IL8 분비는 HT1080-41BB 세포가 형질주입되지 않은 Expi293F 세포의 대조군 상층액의 존재 하에 배양된 경우에는 관찰되지 않았다.

[0934] 흥미롭게도, 세포와 시험된 SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL 이중이량체가 CD47 및 PD1 재조합 단백질의 혼합물로 코팅된 플레이트에 배양된 경우, IL-8 분비가 더욱 높았으며, 이는 두 팔 (arm) (SIRP α 및 PD1)이 모두 참여한 경우 결합이 더욱 강하다는 점을 시사한다.

[0935]

[0936] CD40 수용체의 활성화

[0937] CD40L 도메인을 포함하는 생산된 이중이량체 (예를 들어, PD1-SIRP α-Fc-3xScCD40L, LILRB2-SIRP α-Fc-3xScCD40L 및 LILRB2-Fc-3xScCD40L 이중이량체)에 의한 CD40 수용체 매개 신호 전달의 활성화를 CD40 과발현하는 HT1080 세포주 (HT1080-CD40)를 사용하여 결정하였다. 이들 세포 표면의 CD40 수용체에 CD40L이 결합하면, 신호 전달 경로가 활성화되어 IL8이 분비된다 (Wyzgol et al., 2009, The Journal of Immunology). 이를 위해, 세포를 이중이량체를 함유하는 연속 희석된 상층액의 존재 하에 배재도록 배양하였다. 배양을 위한 단백질 (예를 들어, CD47, PDL1, HLA-G 또는 두 개의 관련 단백질의 조합)로 사전 코팅된 96 웰 플레이트에서 수행하였다. 활성화된 HT1080-CD40 세포로부터 배양 배지로의 IL8 분비를 ELISA로 결정하였다.

[0938] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 이중이량체. 인간 재조합 CD47 (ACRO, cat#CD7-H5227), 인간 재조합 PDL1-Fc tagged (ACRO Biosystem, cat#PD1-H5258), 인간 재조합 HLA-G (Abcam, cat#ab225660), HT1080-CD40 세포, IL-8 ELISA 키트 (Biolegend, cat# 431507), DMEM (Biological industries, cat# 01-055-1A), RPMI (Biological industries, cat#01-100-1A), FBS (Gibco, cat# 10270106), 항-CD40 항체 (Biolegend, cat#313008), 동형 (isotype) IgG1, k (Biolegend, cat#400120).

[0939] 방법 - TSP111을 위해 재조합 CD47 또는 PDL1과 함께 96 웰 플레이트를 4°C에서 배재도록 배양함으로써 사전 코팅하였다 (TSP217의 경우 HLA-G 또는 CD47; 또는 DSP218의 경우 HLA-G). 세척 단계 후, 생산된 PD1-SIRP α-Fc-3xScCD40L, LILRB2-SIRP α-Fc-3xScCD40L 또는 LILRB2-Fc-3xScCD40L 이중이량체를 포함하는 연속 희석된 상

층액을 관련된 사전 코팅된 웰에 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양한 다음, 37°C에서 24시간 동안 HT1080 CD40 세포 (웰당 10000개)를 첨가하였다. 배양 후, 상층액 중 IL8 농도를 제조사의 프로토콜에 따라 IL8 ELISA 키트로 결정하였다. 상층액은 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 450 nm, 참조로 540 nm에서 IL8 농도에 대해 분석하였다. HT1080 CD40 세포에 대한 CD40 수용체의 발현을 항-CD40 항체로 면역 염색한 세포로 결정하였고, 유세포 측정으로 분석을 수행하였다.

[0940] 결과 - 도 26a에 나타낸 바와 같이, HT1080-CD40 세포는 실제로 관련 수용체 CD40을 높은 수준으로 발현한다. 도 30a-b에 도시된 바와 같이, TSP112 (서열 번호: 81 및 146), TSP217 (서열 번호: 138 및 146) 또는 DSP218 (서열 번호: 138 및 148)을 포함하는 상층액은 용량 의존적 방식으로 신호 전달을 유발하여 HT1080-CD40 세포로부터 IL8을 분비할 수 있었다.

[0941]

[0942] 실시예 7

[0943] 리간드-수용체 결합 차단에 대한 이중이량체의 효과

[0944] 이중이량체는 표적 세포에서 발현된 내인성 리간드/수용체와 천연 수용체/리간드의 상호작용을 차단하도록 고안하였다.

[0945] 따라서, 예를 들면 관련 이중이량체의 PD1 부분 (예를 들어, PD1-4-3xsc1BBL 또는 SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL 이중이량체)는 T 세포에서 발현된 내인성 PD1과 종양 세포에서 발현된 PDL1의 상호작용을 차단하도록 고안하였다. 이를 위해, 생산된 이중이량체의 이 상호작용의 차단제로서의 효과를 평가하였다. 플레이트 (Acro Biosystems, cat. #EP101)를 밤새도록 재조합 인간 PDL1로 코팅하였다. 다음으로, 플레이트를 세척하고 상이한 농도의 생산된 이중이량체 (예를 들어, PD1-4-3xsc1BBL 또는 SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL) 또는 양성 대조군 항-PD1 항체와 함께 1시간 동안 배양하였다. 비오틴화된 PD1을 첨가한 후, 추가로 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 플레이트를 세척하고 표준 ELISA 프로토콜에 따라 스트렙트아비딘-HRP 및 TMB 기질로 블롯팅하였다. 플레이트는 620 nm에의 기준으로 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 450 nm에서 분석하였다.

[0946] 유사한 방식으로 CD155-TIGIT, SIGLEC10-CD24, LILRB2-HLA-G, CD47-SIRP α, 4-1BBL-4-1BB 및/또는 LILRB2-HLA-G 결합에 대한 차단 효과를 평가하기 위해 관련 이중이량체의 차단 활성을 연구하였다.

[0947]

[0948] 실시예 8

[0949] 4-1BBL 또는 CD40L 도메인을 포함하는 이중이량체에 의한 PBMC 또는 T 세포의 활성화

[0950] T 세포의 활성화에는 두 가지 신호가 필요하다: 항원 제시 세포 (Antigen Presenting Cell, APC) 상의 주요 조직적합성 복합체 (Major Histocompatibility Complex, MHC)/펩티드 복합체와 T-세포 수용체 (T-Cell Receptor, TCR)의 결합, 및 T 세포에 있는 공동 자극 수용체 (co-stimulatory receptors)와 항원 제시 세포 (APC) 상의 상응하는 리간드의 교차 결합. 4-1BB는 결합 시, CD8+ 및 CD4+ T 세포 모두의 확장, 생존, 분화 및 시토카인 발현을 촉진하는, T 세포 공동 자극 수용체이다. CD40 및 CD40L은 전염증성 면역 반응에서 중추적인 역할을 하는 공동자극 분자이다.

[0951] 활성화된 CD4+ T 세포에 의해 주로 발현되는 CD40L은 항원 제시 세포(APC)의 CD40에 결합하여 APC 활성화를 유도한다. APC는 차례로 세포독성 T 림프구를 프라이밍 (prime)한다.

[0952] T 세포의 활성화를 결정하기 위한 수많은 방법이 당업계에 알려져 있으며, 하기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0953] - T 세포의 표면에 활성화 마커 (예를 들어, CD25, CD69, CD62L, CD137, CD107a, PD1 등) 발현. 활성화 마커의 발현은 세포를 특정 항체로 염색하고 유세포 측정 분석 (flow cytometry analysis, FACS)하여 시험한다.

[0954] - 염증성 시토카인 (예를 들어, IL2, IL6, IL8, INF 감마 등)의 분비. 염증성 시토카인의 분비는 ELISA으로 시험한다.

[0955] - CFSE(카복시플루오레스세인 숙신이미딜 에스테르, carboxyfluorescein succinimidyl ester) 또는 기타 세포 증식 염료로 T 세포를 사전 염색하고 유세포 측정 분석 (FACS)에 의해 결정되는 CFSE 희석액에 의한 세포 편차 (deviation)를 결정함으로써 측정하는 증식 (proliferation). 또한 Incucyte 기계를 사용하여 시간을 초과하여

(overtime) 사진을 찍고 특정 소프트웨어로 사진을 분석하여 증식 여부를 결정한다.

[0956] - 칼신-AM 시약을 사용하여 암세포를 미리-라벨링하고 발광 플레이트 판독기를 사용하여 배양 배지로의 칼신 방출을 측정함으로써 측정되는 표적 세포, 예를 들면 암세포의 사멸. 또한 라벨링된 표적 세포 및 카스파제 민감형광 기질을 사용하는 Incucyte 기계로 사멸 여부를 결정한다.

[0957]

[0958] **실시예 9**

[0959] **이종이량체의 생체 내 (in-vivo) 항종양 효과**

[0960] 생산된 이종이량체 (예를 들어, PD1-4-3xsc1BBL 및 SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL)의 암 치료 효능을 시험하기 위해 3가지 다른 생체 내 (in-vivo) 마우스 모델을 사용하였다.

[0961] 1. 인간 줄기 세포 또는 인간 PBMC 또는 고정화된 인간 PBMC로 및 인간 종양 세포로 접종된 NSG 마우스. 이 모델에서, 이종이량체는 관련 인간 카운터 수용체/리간드 (예를 들어, 종양 및 면역 세포에서 발현되는 PDL1) 및 인간 면역 세포에서 발현되는 4-1BB 또는 CD40과 상호작용한다.

[0962] 2. 인간 종양 세포로 접종된 Nude-SCID 마우스. 이 모델에서, 관련 이종이량체는 마우스 및 인간 CD47 (종양 세포에서 발현됨)과 상호작용하고, 마우스 대식세포 활성화에 대한 이종이량체의 효과를 시험한다.

[0963] 3. 인간 줄기 세포 및 인간 종양 세포를 접종한 NSG 마우스. 이 모델에서, 이종이량체는 종양 및/또는 면역 세포에서 발현되는 관련 카운터 수용체/리간드와 상호작용한다. 예를 들어, SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL의 경우, 이종이량체는 마우스 및 인간 CD47 (종양 및 면역 세포에서 발현됨) 및 인간 T 세포에서 4-1BB와 상호작용한다. 면역 세포 및 종양 성장에 대한 이종이량체의 효과를 시험한다.

[0964] 4. C57BL/6 - MC38 마우스 결장암 또는 기타 암 세포주 또는 인간 관련 대응물(예를 들어, PDL1 및/또는 CD47)을 과발현하는 암세포주로 접종된 인간-4-1BB 녹-인(knock-in) 마우스. 이 모델에서, 마우스 4-1BB 세포의 도메인은 인간 4-1BB의 도메인으로 대체되며, 따라서 이종이량체는 마우스 T 세포에서 발현되는 인간 4-1BB와 상호작용할 수 있다. 이종이량체는 마우스 및 종양 세포에서 발현되는 인간 PDL1 및/또는 CD47과 상호작용한다.

[0965] 5. 시험된 이종이량체의 대리 단백질 (surrogate protein)을 발현하는 동계 (Syngeneic) 마우스 종양 모델. 예를 들어, 이 모델에서 PD1 도메인을 포함하는 이종이량체를 시험할 때 이종이량체는 종양 세포에서 마우스 PDL1과 상호작용한다.

[0966] 모든 모델에서 마우스에 종양 세포를 정맥내 (intravenously, IV), 복강내 (intraperitoneally, IP), 피하 (subcutaneously, SC) 또는 동소적으로 (orthotopically) 접종하였다. 종양을 검출할 수 있으면 (~80 mm³), 생산된 이종이량체 (예를 들어, 4-3xsc1BBL 및 SIRP α-PD1-3xsc4-1BBL 이종이량체)를 다른 용량 및 요법으로 마우스에 정맥내(IV), 복강내(IP), 피하(SC) 또는 동소적으로 처리하였다.

[0967] 체중 및 임상 징후에 대해 마우스를 추적하였다. 종양은 캘리퍼 (caliper)로 일주일에 여러 번 측정하고, 종양 부피는 하기 방정식에 따라 계산하였다: $V = \text{길이} \times \text{너비}^2 / 2$. 마우스 무게는 일상적으로 측정하였다. 전체 실험을 통해 종양 성장 및 생존을 모니터링하였다.

[0968] 종양을 절제하거나 림프절을 배출하고, 특정 항체 염색 및 유세포 측정 분석을 사용한 소화 및 면역 표현형으로 종양에서 면역 세포의 침윤 (infiltration) 및 하위 유형 지정 (sub-typing)을 시험하였다. 추가적으로 또는 대안적으로, 면역 세포의 침윤 또는 종양의 괴사성 등급을 종양 절제, 파라핀 임베딩 (embedding) 및 특정 항체와 면역조직화학 염색을 위한 절편화에 의해 결정된다.

[0969] 희생시킬 때, 마우스 장기를 수확하고 H&E 및 IHC 염색을 위해 파라핀 블록을 임베딩한다.

[0970] 하기 시험을 위해 일반적인 절차에 따라 다양한 시점에 마우스에서 혈액 샘플을 채취한다: PK 분석, 혈장 내 시토크인 측정, 순환 중인 혈액 세포 하위 집단의 유세포 측정 분석 (FACS), 혈액학 시험 (hematology testing), 혈청 화학 시험, 항-약물-항체 (anti-drug-antibody, ADA) 분석 및 중화 항체 분석 (neutralizing antibodies analysis, NAB).

[0971] **실시예 10**

[0972] HT1080-41BB 및 CHO-CD47 세포 공동 배양에서 LILRB2-SIRP α-3xsc4-1BBL 이종이량체에 의한 4-1BB의 활성화

- [0973] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 TSP215. HT1080-41BB 세포, CHO-K1-CD47 세포, IL-8 ELISA 키트 (Biolegend, cat#431507), DMEM (Biological industries, cat#01-055-1A), FBS (Rhenium, cat#10270106), APC 항-41BB (Biolegend, cat#309810), APC 항-CD47 항체 (Biolegend, cat#343124), APC 동형 (isotype) IgG1 (Biolegend, cat#400120).
- [0974] 방법 - CHO-K1-CD47 세포를 96웰 플레이트에 접종했다. 이중이량체를 함유하는 연속 희석된 상층액을 37℃에서 1시간 동안 세포에 첨가한 후, HT1080-41BB 세포를 첨가하고 37℃에서 밤새도록 배양하였다. 상층액에서 IL8 농도는 제조사의 프로토콜에 따라 IL8 ELISA 키트로 결정하였다. 상층액의 IL8 농도를 플레이트 판독기 (Thermo Scientific, Multiscan FC)를 사용하여 450 nm에서, 540 nm에서 참조로 분석하였다. 세포주 상에서 CD47 발현 및 4-1BB 수용체의 발현을 항-CD47 및 항-41BB 항체로 면역염색하여 결정하였다. 유세포 측정으로 분석을 수행하였다.
- [0975] 결과 - 4-BBL 과발현 HT1080 세포주(HT1080-41BB)를 사용하여 생산된 LILRB2-SIRP α -3xsc4-1BBL 이중이량체, TSP215에 의한 4-1BB 수용체 매개 신호 전달의 활성화를 결정하였다. 4-1BBL이 이들 세포 표면의 4-1BB 수용체에 결합하면 가교 결합 (cross-linking)에 따라 신호 전달 경로가 활성화되어 IL8이 분비된다 (Wyzgol et al., 2009, The Journal of Immunology). SIRP α 암 (arm)을 통한 가교 결합을 제공하기 위해 CD47을 과발현하는 CHO-K1 세포(CHO-K1-CD47)를 96웰 플레이트에 접종하였다. TSP215의 연속 희석액을 HT1080-41BB 세포 위쪽에 이어서 첨가하였다. 활성화된 HT1080-4-1BB 세포로부터 배양 배지로의 IL8 분비를 밤새도록 공동 배양한 후 측정하였다.
- [0976] 도 31에 나타낸 바와 같이, TSP215는 용량 의존적 방식으로 IL8 방출을 유발하여 CD47을 통한 가교 결합 후 41BB/41BBL 측을 활성화함을 시사한다.
- [0977]
- [0978] 실시예 11
- [0979] M-CSF 의존성 대식세포 성숙에 대한 관련 이중이량체에서 LILRB2 팔(arm)의 효과
- [0980] 이중이량체의 LILRB2 암 (arm)은 대식세포 및 수지상 세포와 같은 APC에서 발현되는 내인성 LILRB2를 따라 종양 또는 면역 세포에서 발현되는 HLA-G에 의해 유도되는 면역억제 신호를 이들의 상호작용을 경쟁 및 차단함으로써 차단하도록 설계하였다. M1 유사 대식세포는 항종양 활성을 나타내는 반면, M2 대식세포는 종양 진행을 촉진하는 것으로 보고되었다. M-CSF 의존성 대식세포 성숙 동안 길항제 항체로 LILRB2를 차단하면, CD14 및 CD163의 더 낮은 발현과 함께 더 둥글고 단단히 부착된 M1-유사(항종양) 표현형을 이끄는 것으로 나타났다. 생성된 대식세포를 LPS로 자극한 후, 전염증성 시토카인 TNF α 의 분비가 증가하고 항염증성 IL-10의 분비가 감소하는 것을 검출하였다.
- [0981] 이를 위해, CD14 및 CD163의 유세포 측정 기반 검출을 사용하고, LPS 전처리된 대식세포의 자극 후, TNF α 및 IL-10 방출의 측정함으로써 M-CSF 의존성 대식세포 성숙에 대한 생산된 LILRB2 이중이량체의 효과를 평가하였다.
- [0982] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 이중이량체, CD14 또는 CD33 자성 마이크로비드 (magnetic MicroBeads) (Miltenyi Biotec Cat#130-045-501 또는 Cat#130-045-501), RPMI 1640 (Biological Industries, Cat# 01-100-1A), FCS (Gibco, Cat#12657-029, M-CSF (R&D systems, Cat#216-MC), TriPLE (Thermo Fisher Scientific, Cat#12604-013) LPS (Sigma-Aldrich Cat#L1668-5MG), IL-4 (R&D systems, Cat#204-IL), PE 항-인간 CD14 항체 (Biolegend, Cat#367104), FITC 항-인간 CD163 항체 (Biolegend, Cat#333618, IL-10 ELISA (Invitrogen, Cat#88-7106), INF α ELISA (Invitrogen, Cat#88-7346).
- [0983] 방법 - PBMC를 밀도 구배 원심분리에 이어 적혈구의 염화암모늄 용해로 건강한 지원자의 혈액 샘플에서 분리하였다.
- [0984] 분석을 위해 단핵구를 분리된 PBMC에서 추가로 농축하였다 (예를 들어, CD14 또는 CD33 자성 마이크로비드를 사용하는 MACS 분류로). 웰당 20000개의 단핵구를 48 웰 플레이트에 접종하고, 5-7 일동안 생산된 이중이량체의 존재 또는 부재 상태에서 RPMI 1640 배양 배지 + M-CSF (50 ng / ml)가 첨가된 10 % FCS에서 대식세포 (M0)로 분화하였다. 대식세포의 일 부분은 TriPLE로 분리하고 CD14 및 CD163 발현을 위해 염색하였다. 다른 부분은 LPS (50 ng / mL) 및 IL-4 (25 ng / mL)로 밤새 자극하고, 상층액으로의 IL-10 및 INF- α 의 방출을 ELISA로 측정하였다.

[0985]

[0986] 실시예 12

[0987] 대식세포 및 다형핵세포에 대한 SIRP α 또는 LILRB2 도메인을 포함하는 이중이량체의 효과

[0988] 언급한 바와 같이, 종양 세포의 CD47과 내인성 SIRP α 의 상호작용을 차단하고 경쟁함으로써, 대식세포 및 과립구와 같은 APC에 발현되는 내인성 SIRP α 를 향한, CD47 발현 종양 세포에 의해 유도되는 "나를 먹지 마 (don't eat me)" 신호를 차단하도록 이중이량체의 SIRP α 부분을 설계하였다. "나를 먹지 마 (don't eat me)" 신호의 차단은 종양 세포 식균작용(phagocytosis)을 유도한다.

[0989] 종양 및 면역 세포의 HLA-G와 내인성 LILRB2의 상호작용을 차단하고 경쟁함으로써, 대식세포 및 DC와 같은 APC에 발현되는 내인성 LILRB2를 향한, 종양 또는 면역 세포에 발현되는 HLA-G에 의해 유도된 면역억제 신호를 차단하도록 이중이량체의 LILRB2 부분을 설계하였다. HLA-G "나를 먹지 마 (don't eat me)" 신호의 차단은 종양 세포 식균작용을 유도하고, 면역 세포 사이의 억제성 HLA-G-LILRB2 신호를 방지하여 차례로 식균작용을 향상시킨다.

[0990] 인간 대식세포 또는 다형핵 세포 (polymorphonuclear cells, PMN)에 의한 종양 세포 식균작용에 대한 생산된 SIRP α 이중이량체의 효과 및 인간 대식세포 또는 DC에 의한 종양 세포 식균작용에 대한 LILRB2 이중이량체의 효과를 유세포 측정 기반 분석 또는 형광 현미경을 사용하여 평가하였다.

[0991] 재료 - 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 생산된 이중이량체. CD14 자성 마이크로비드 (Miltenyi Biotec Cat#130-045-501), RPMI 1640 (Biological Industries, Cat#01-100-1A), FCS (Gibco, Cat#12657-029, M-CSF (R&D systems, Cat#216-MC), GM-CSF (R&D systems, Cat#7954-GM/CF, LPS (Sigma-Aldrich Cat#L1668-5MG), INF- γ (MBL, Cat#JM-4116-100), IL-4 (R&D systems, Cat#204-IL), CellTrace™ CFSE Cell Proliferation 키트 (Invitrogen, Cat#C34554), PERCP/Cy5.5 항-인간 CD11b 항체 (Biolegend, Cat#301328), PE Cy7 항-인간 HLA-DR 항체 (Biolegend, Cat#361708), APC 항-인간 CD47 항체 (Biolegend, Cat#323124), FITC 항-인간 HLA-G 항체 (Abcam, Cat#ab239334), Rituximab, Cetuximab, 림프종 (예를 들어, SUDHL6, Ramos) 및 고형암 (예를 들어, DLD-1 - 결장암 (colon carcinoma), A549 - 폐암 (lung carcinoma) 및 MDAMB231 - 삼중음성유방암 (triple negative breast cancer))과 같은 다른 암종으로부터 유래된 인간 암 세포주, HLA-G 과발현 암 세포주 및 음성 대조군으로서 HLA-G 발현하지 않는 세포

[0992] 방법 - 다형핵 세포 (PMN)와 PBMC를 밀도 구배 원심분리에 이어 적혈구의 염화암모늄 용해로 건강한 지원자의 혈액 샘플에서 분리하였다. PMN 분석을 위해 암세포를 세포막 또는 세포질 염료로 라벨링하고 분리된 PMN과 혼합하였다. 혼합 배양물에서 생산된 이중이량체를 단독으로 또는 치료 항체 (예를 들어, 리투시맙 (rituximab) 또는 세툽시맙 (cetuximab))와 함께 처리하였다. 다음으로 PMN에 의한 암세포 식균작용을 유세포 측정으로 분석하였다.

[0993] 대식세포 분석의 경우, 단핵구를 분리된 PBMC에서 추가로 농축하였다 (예를 들어, CD14 자성 마이크로비드를 사용하는 MACS 분류로). 단핵구는 RPMI 1640 배양 배지 + GM-CSF (50 ng / ml) 및 M-CSF (50 ng / ml)가 첨가된 10% FCS에서 7일 동안 대식세포(M0)로 분화하였다. 1형 대식세포 (type 1 macrophage, M1)를 생성하기 위해, M0 세포를 추가 24시간 동안 LPS 및 IFN- γ 로 프라이밍 (prime)하였다. 단핵구는 RPMI 1640 배양 배지 + 50 ng / mL GM-CSF 및 20 ng / mL IL-4가 첨가된 10% FCS에서 7일 동안 단핵구 유래 DC로 분화하였다. 암세포를 세포막 또는 세포질 염료로 라벨링하고, 분리되고 생체 외에서 분화된 I형 대식세포 (M1) 또는 DC와 혼합하였다. 혼합 배양물에서 생산된 이중이량체를 단독으로 또는 치료 항체와 함께 처리하였다. 배양 후, 흡입되지 (engulf) 않은 종양 세포를 세척하고, 대식세포를 암 세포와 다른 색으로 항-CD11b 항체 (M1) 또는 항-HLA-DR 항체 (DC)로 염색하였다. 대식세포 또는 DC에 의한 암세포 식균작용을 유세포 측정으로 분석하였다. 다른 실험에서, 식세포 작용을 하기와 같이 Incucyte으로 평가하였다: 다양한 암 세포주의 종양 세포를 세포질 염료로 미리 염색하고 대식세포 또는 DC를 각각 항-인간 CD11b 항체 또는 항-HLA-DR 항체로 염색하였다(세포질 염료와 다른 색상으로). 염색된 종양 세포와 대식세포를 함께 배양하고 형광 현미경으로 이미지를 촬영하였다. 식균작용은 총 대식세포 (단일 신호) 중 종양 세포 흡입 (engulfment) (혼합 신호)에 대해 양성인 대식세포 또는 DC의 비율로 정량화하였다.

[0994]

[0995] 실시예 13

[0996] **TIGIT 도메인을 포함하는 이중이량체에 의한 NK 세포의 세포독성 활성**

[0997] 자연 살해 (Natural killer, NK) 세포는 특정 항원을 B 및 T 세포로 인식하지 않고 직접적인 세포독성 또는 시토크인/케모카인 분비를 유도한다. NK 세포독성은 감염된 세포, 악성종양, 스트레스를 받은 세포에 대한 면역반응에 중요한 역할을 하며 다양한 질병의 병리학적 과정에 관여한다.

[0998] NK 활성화에 대한 생산된 이중이량체의 효과를 결정하기 위해 당업계에서 공지된 수많은 분석이 사용되며, 하기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다:

[0999] - 세포독성 분석 - 공동 배양 분석에서 NK 세포 (이펙터 세포)에 의한 표적 세포의 사멸. 사멸률 (%)은 유세포 측정 (FACS)에 의해 분석된다. 표적 세포를 96 웰 플레이트에 놓고 다양한 이펙터-표적 (E:T) 비율로 미리-라벨링된 1차 NK 세포와 함께 배양하였다. NK 세포를 분석 전에 48시간 동안 1000U/mL IL2와 함께 배양하였다. 4시간 및 24시간 후, 세포를 수확하고 유세포 측정으로 분석하였다. NK 세포가 없는 배양물에서 회수된 표적 세포의 수를 참고로 사용하였다.

[1000] - 세포독성 분석 - 공동 배양 분석에서 NK 세포 (이펙터 세포)에 의한 표적 세포의 사멸. 사멸률 (%)은 라벨링된 표적 세포 및 카스파제 민감성 형광 기질을 사용하여 Incucyte 기계로 결정하였다.

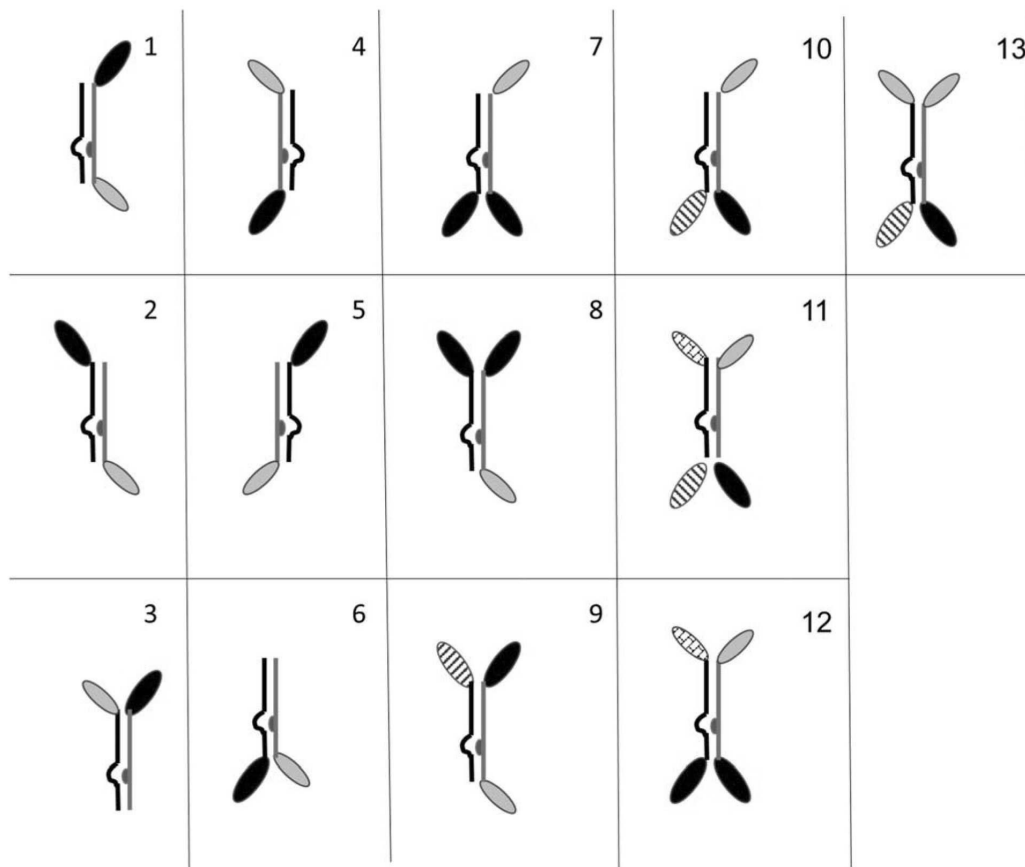
[1001] - 염증성 시토크인의 분비: 1차 NK 세포를 다양한 표적 세포로 24시간 동안 다양한 비율로 자극하였다. 무세포 (cell-free) 배양 상층액에서 인터페론 γ (IFN- γ) 및 과립구-대식세포 집락 자극 인자 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)의 수준을 ELISA 또는 세포계측 비드 분석 (Cytometric Bead Array, CBA)으로 결정하였다.

[1002] 본 발명은 그 특정 실시예와 관련하여 설명되었지만, 많은 대안, 수정 및 변형이 당업자에게 명백할 것이 분명하다. 따라서, 첨부된 청구범위의 정신과 넓은 범위에 속하는 모든 이러한 대안, 수정, 및 변형을 포함하도록 의도하였다.

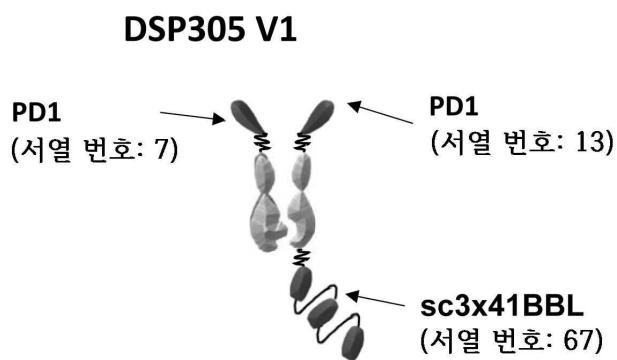
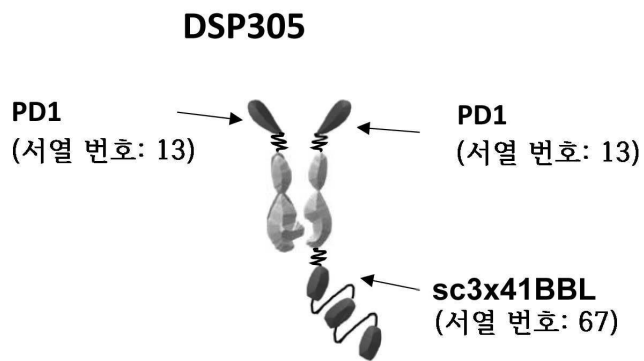
[1003] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 본 명세서에 참조로 포함된다고 표시되는 것과 동일한 정도로, 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다. 또한, 본 출원에서 인용 또는 식별은 이러한 참조가 본 발명에 대한 선행 기술로서 이용 가능하다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 소재목이 사용되는 범위 내에서 반드시 제한적인 것으로 해석되어서는 안 된다. 또한, 본 출원의 우선권 문서(들)는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

도면

도면1



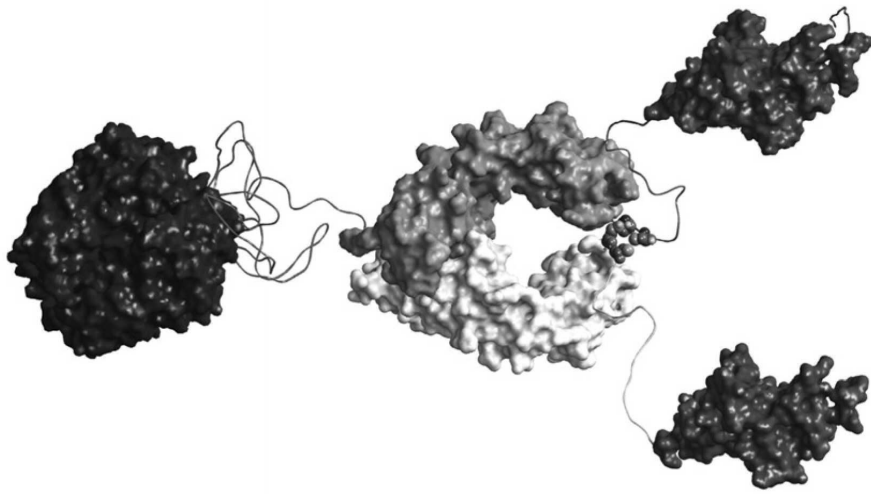
도면2



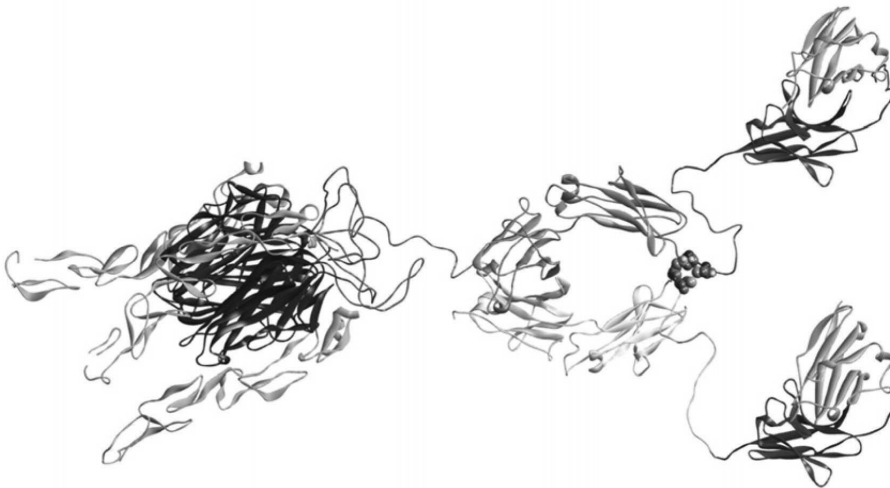
도면3a



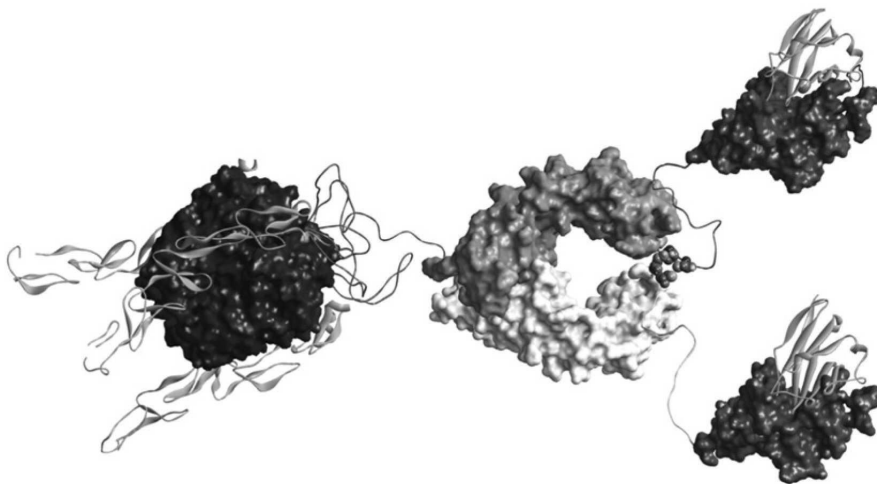
도면3b



도면3c



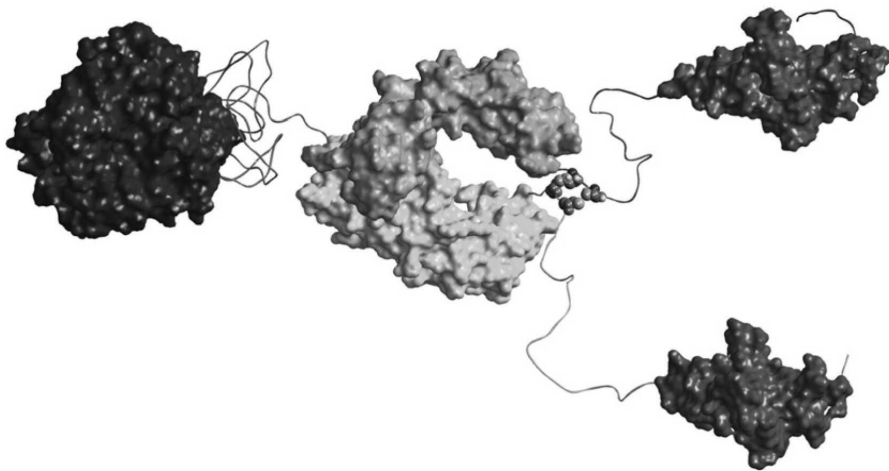
도면3d



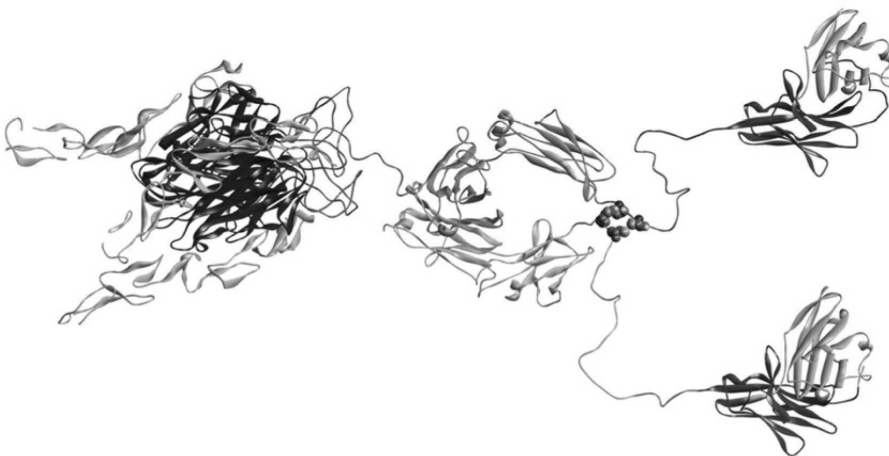
도면3e



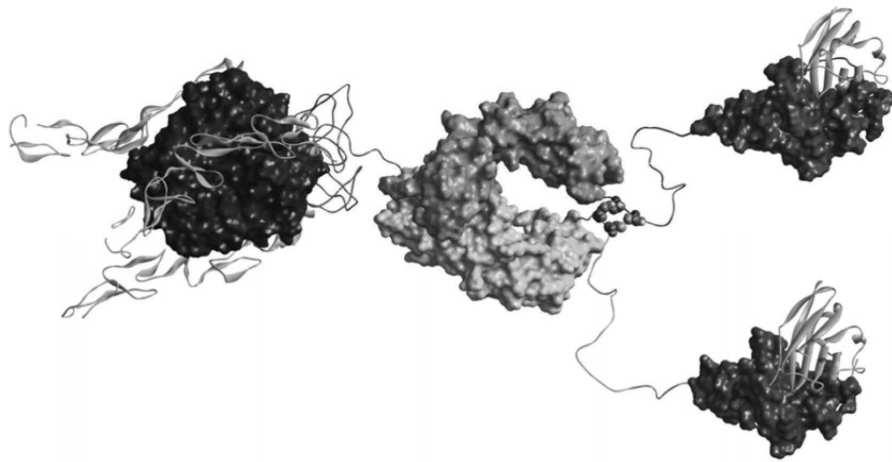
도면3f



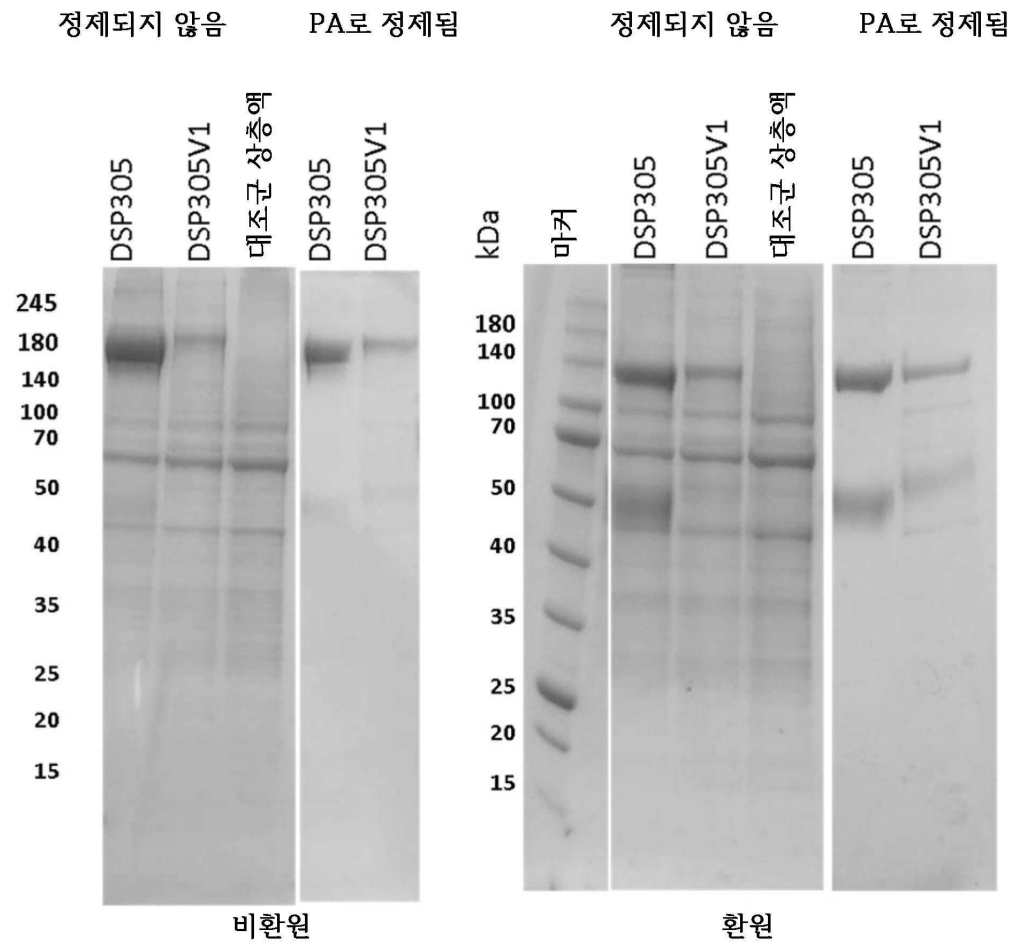
도면3g



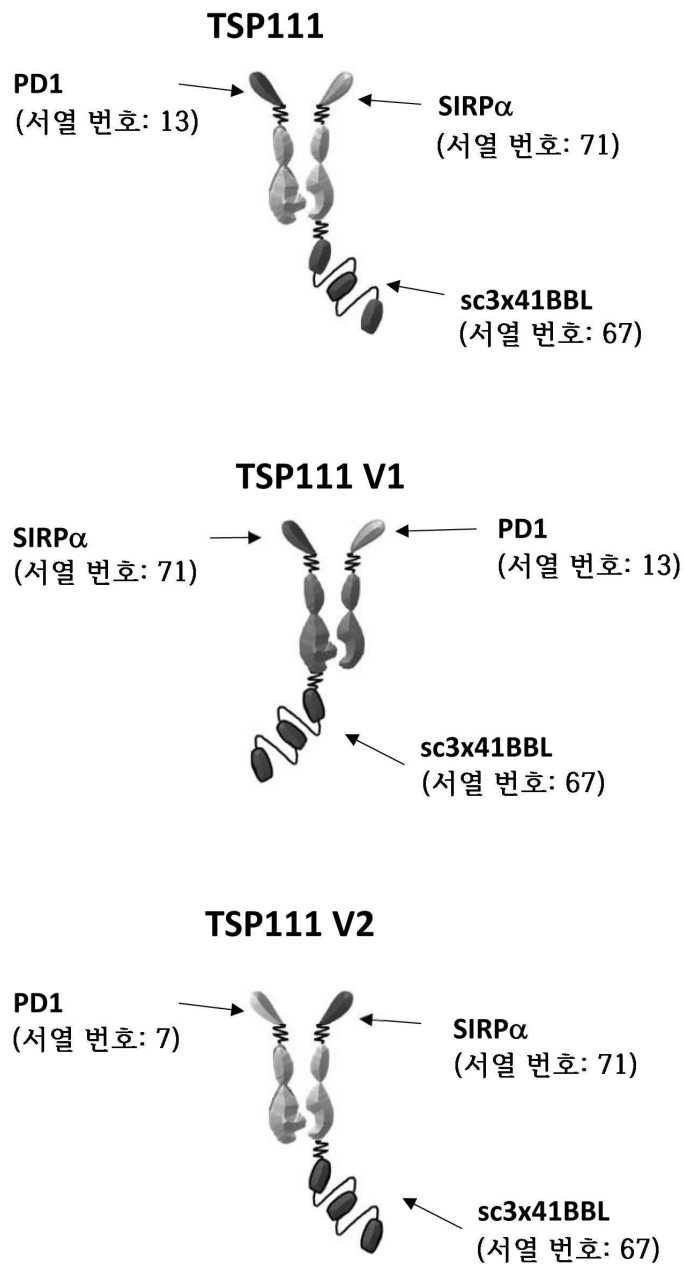
도면3h



도면4



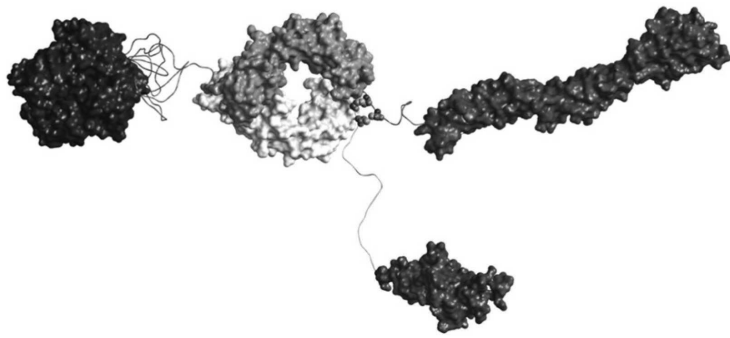
도면5



도면6a



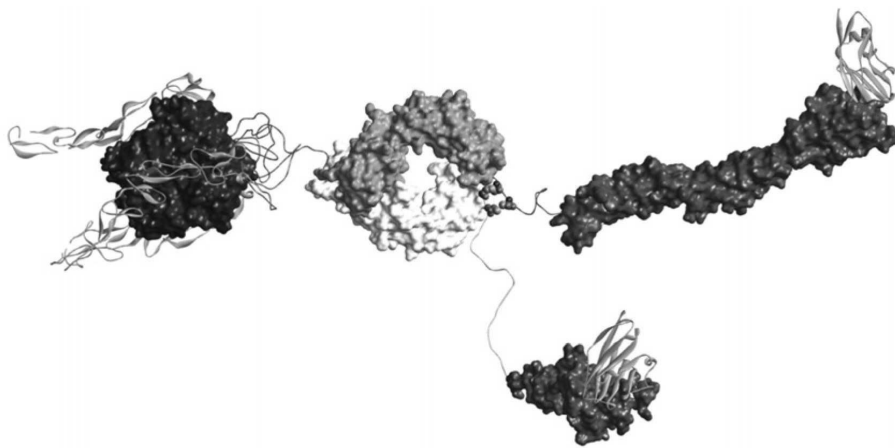
도면6b



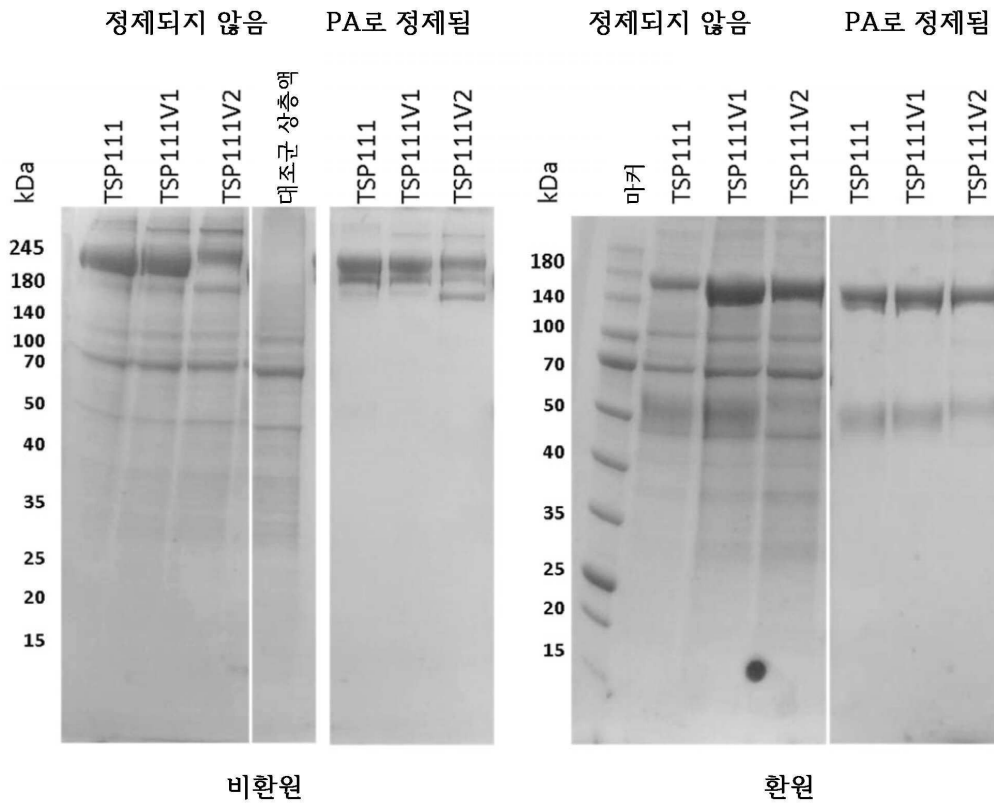
도면6c



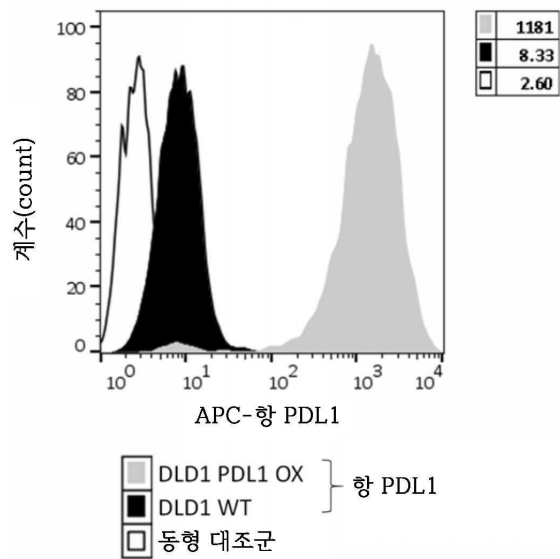
도면6d



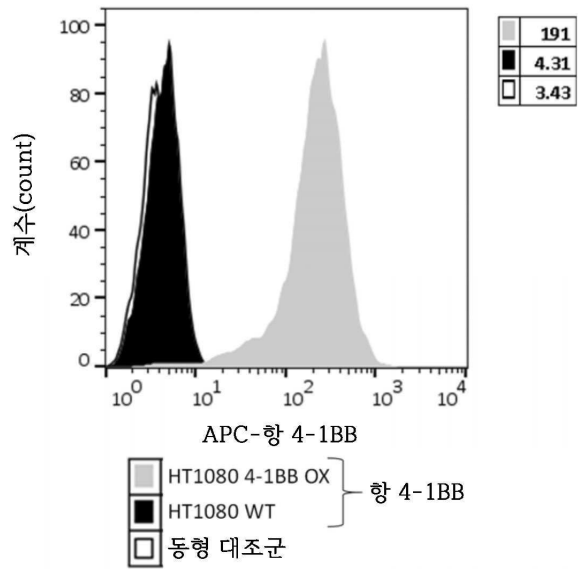
도면7



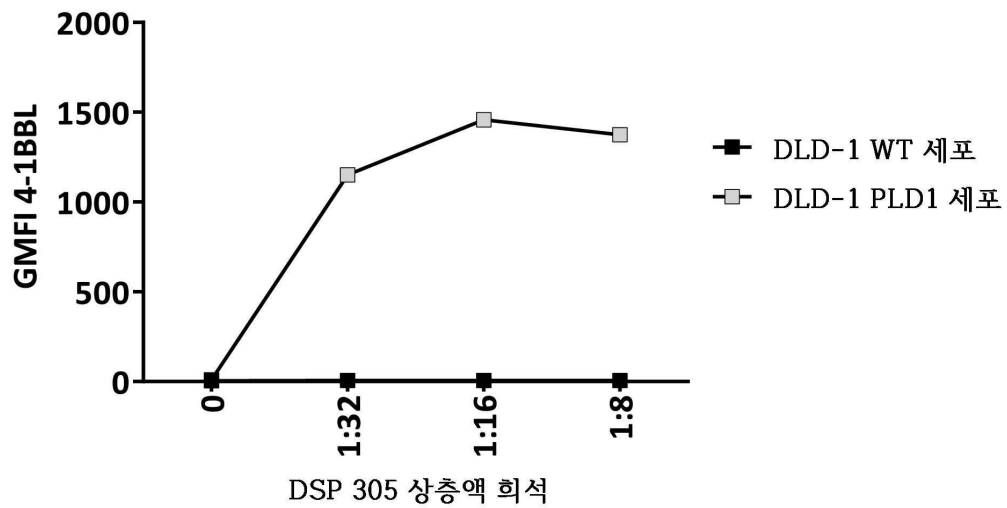
도면8a



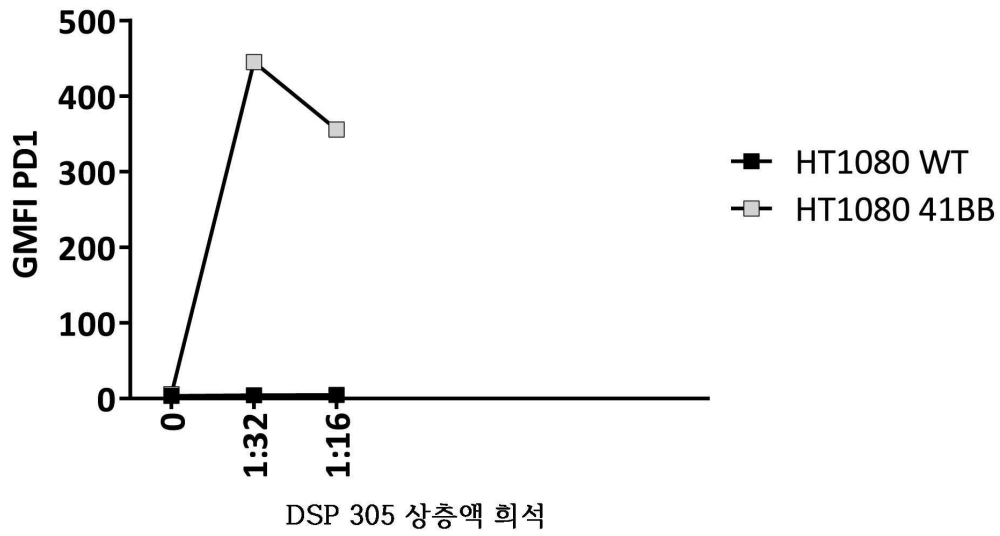
도면8b



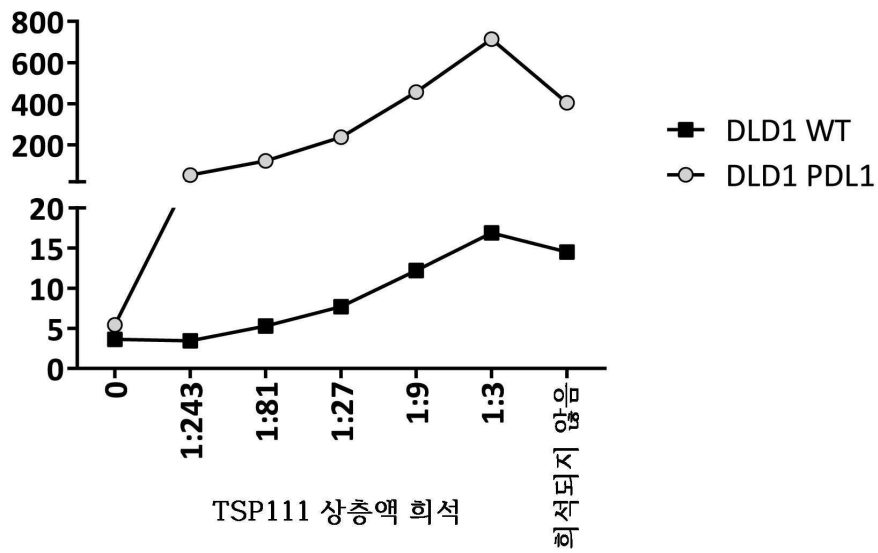
도면8c



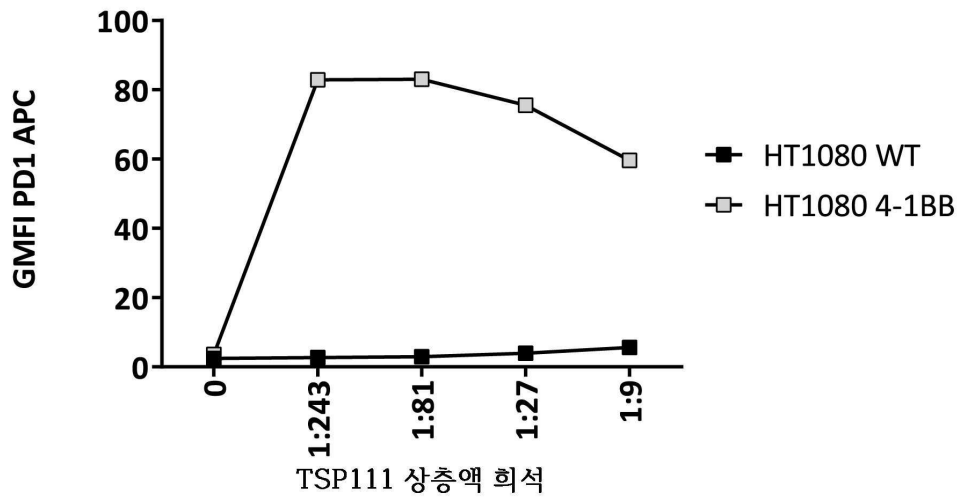
도면8d



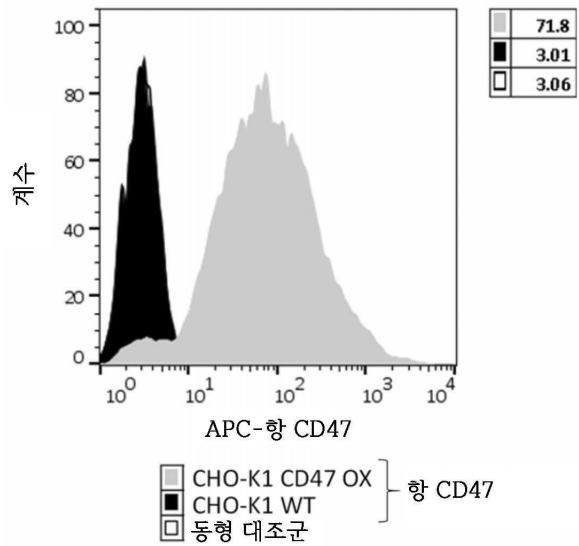
도면9a



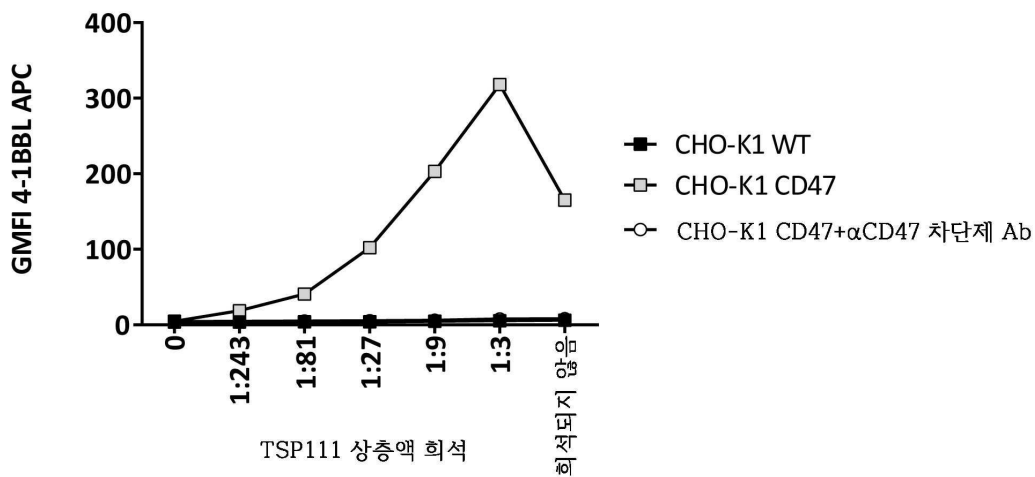
도면9b



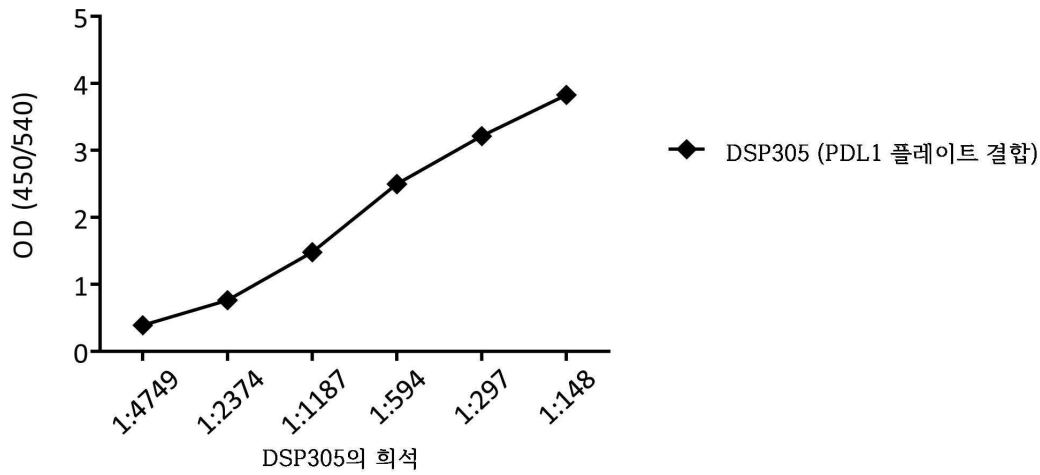
도면9c



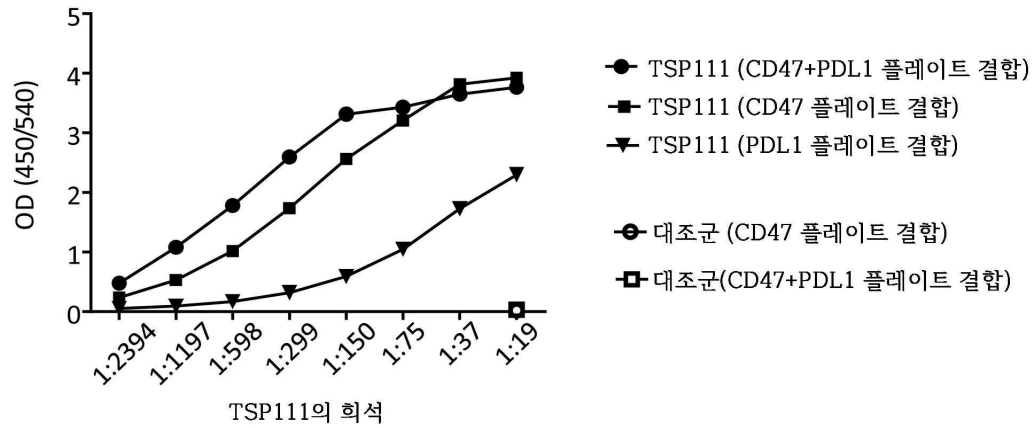
도면9d



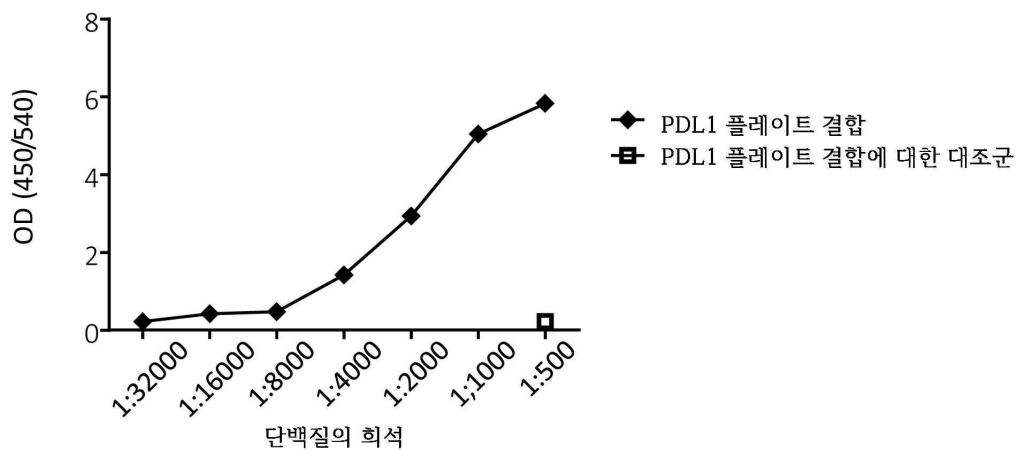
도면10a



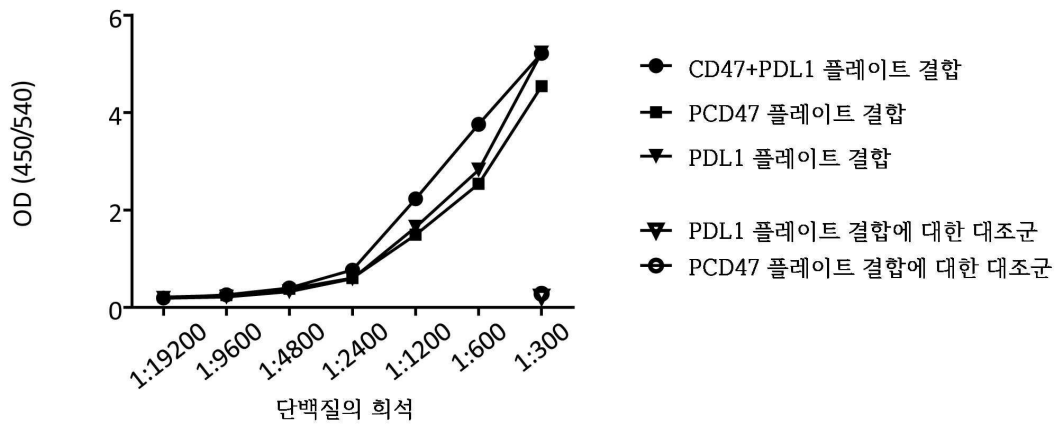
도면10b



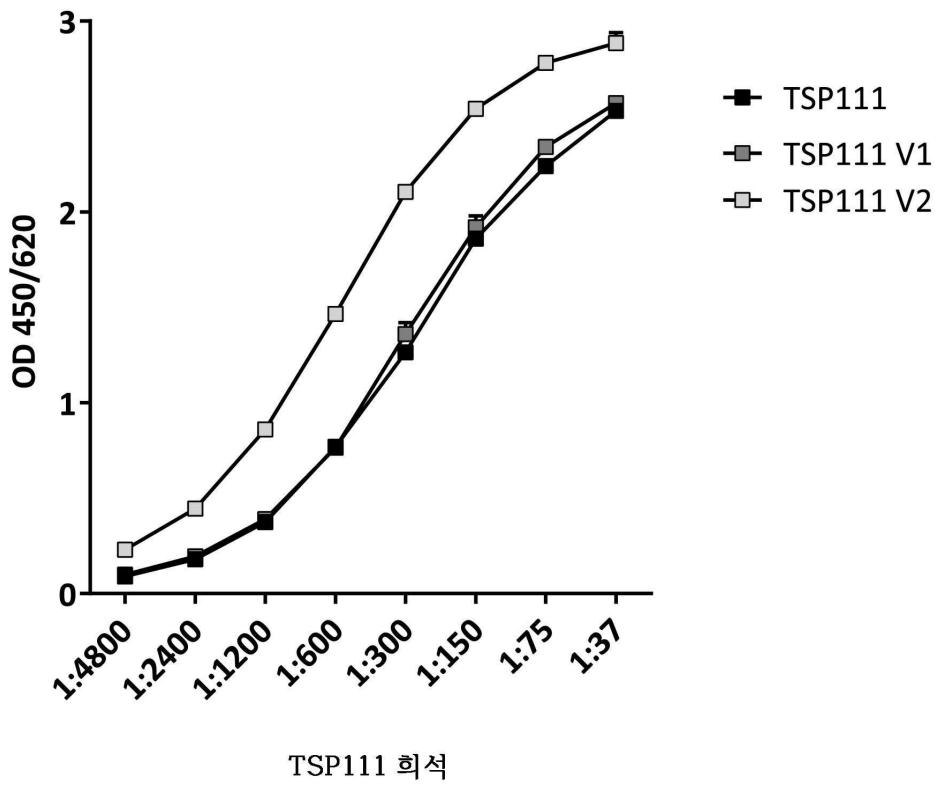
도면11a



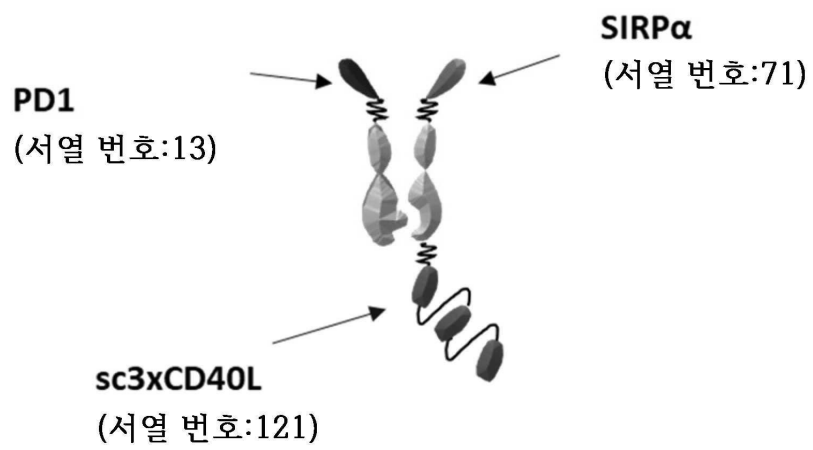
도면11b



도면11c



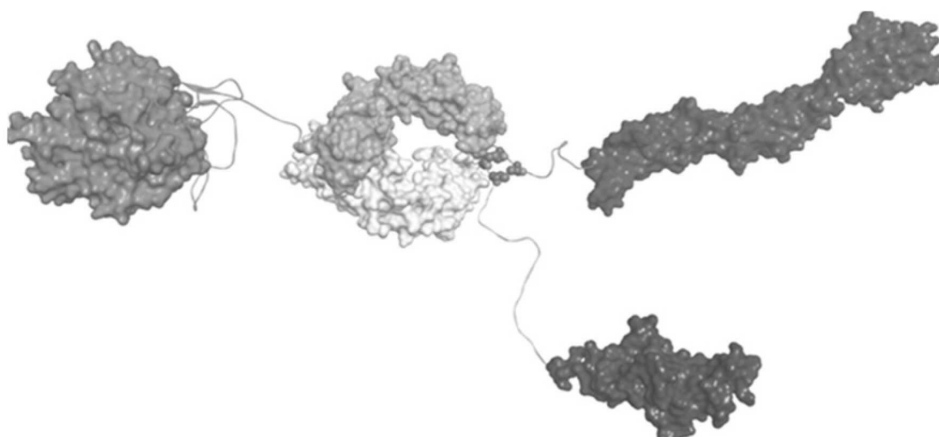
도면12a



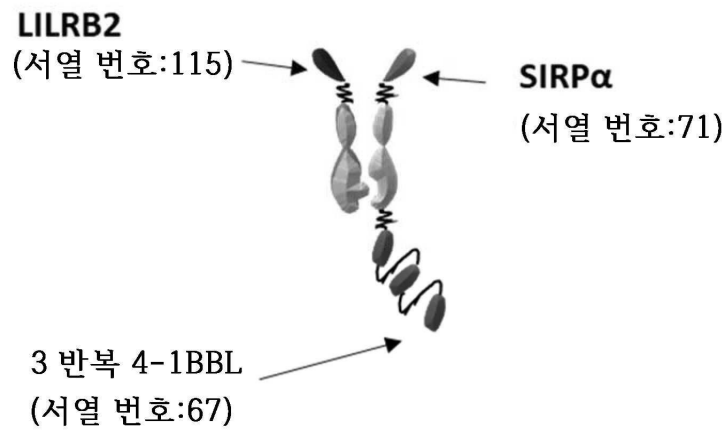
도면12b



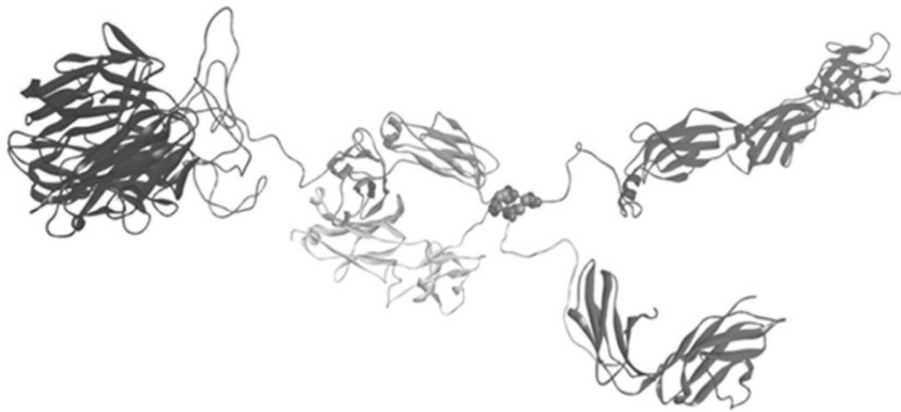
도면12c



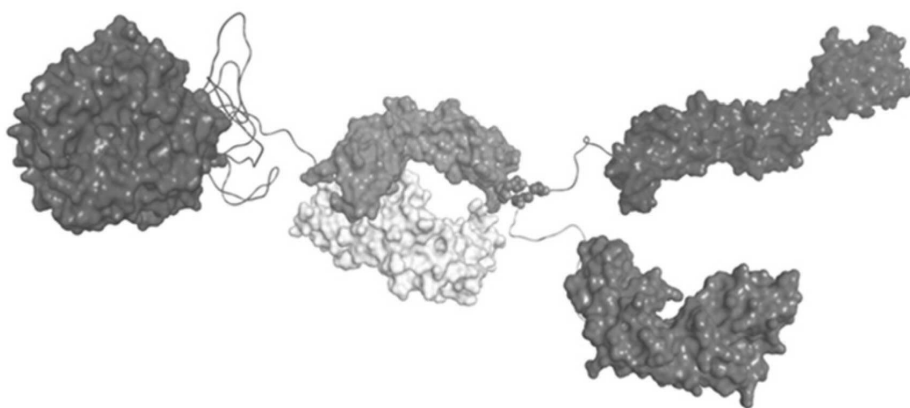
도면13a



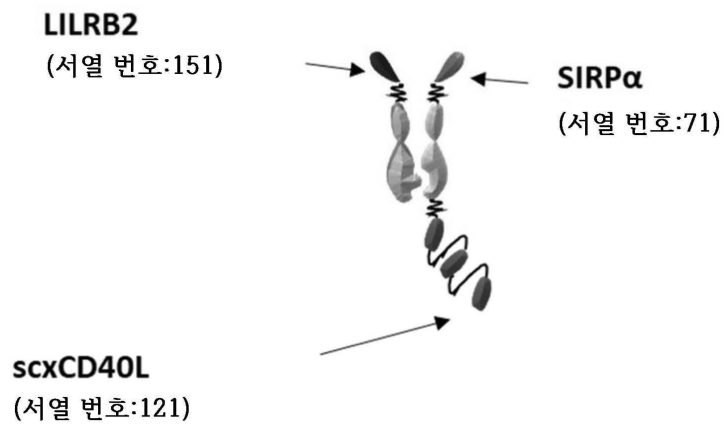
도면13b



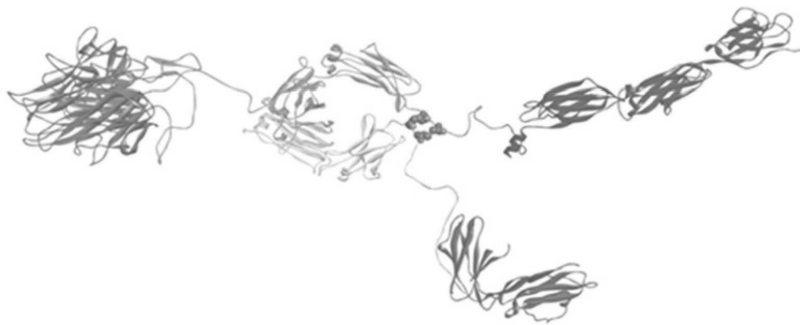
도면13c



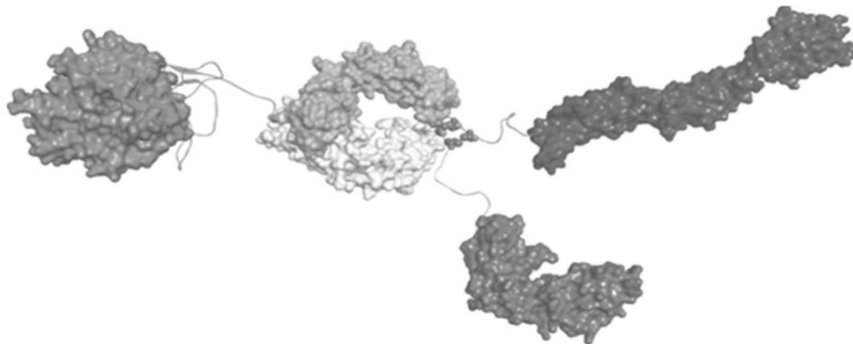
도면14a



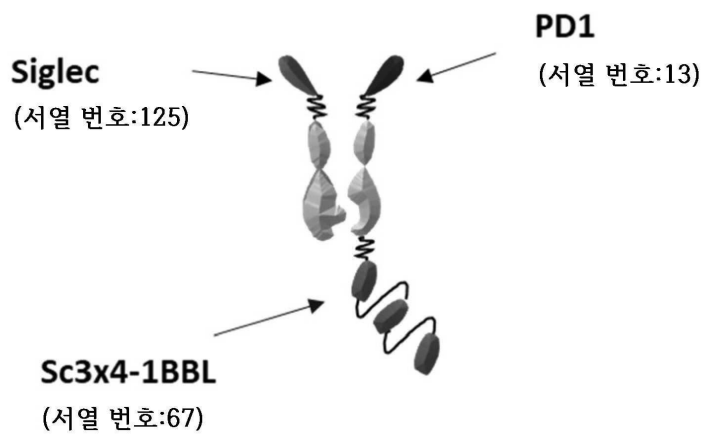
도면14b



도면14c



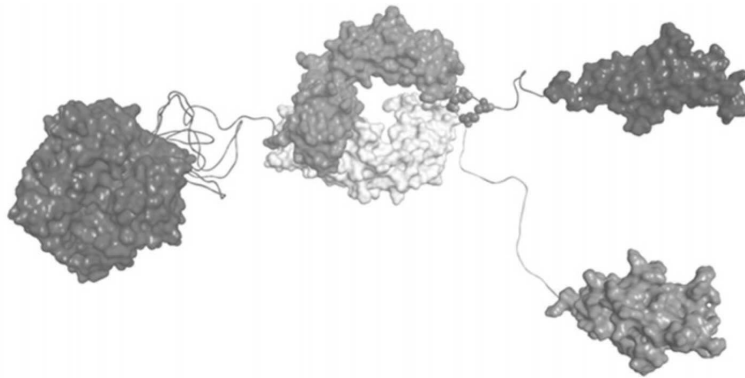
도면15a



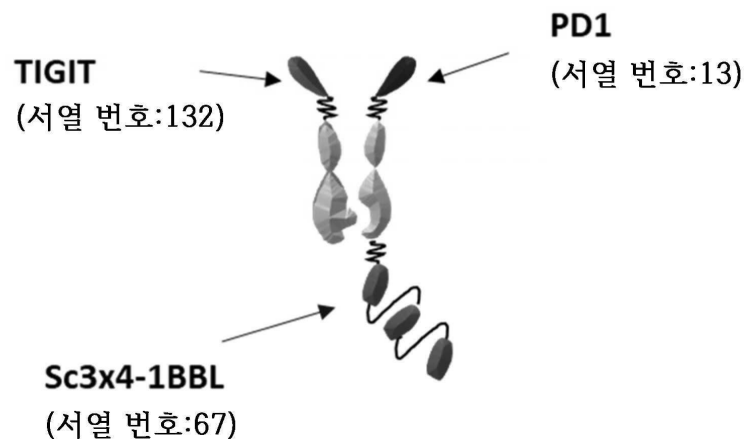
도면15b



도면15c



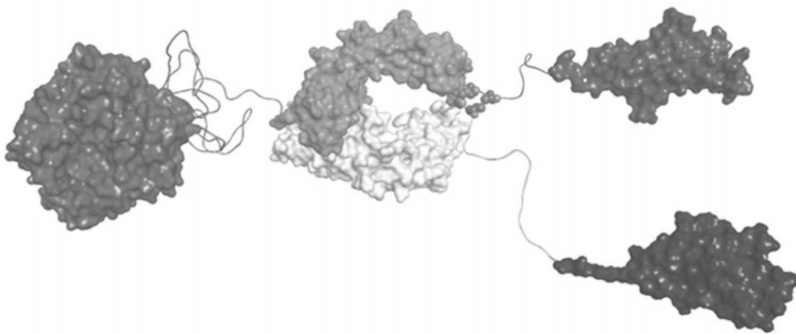
도면16a



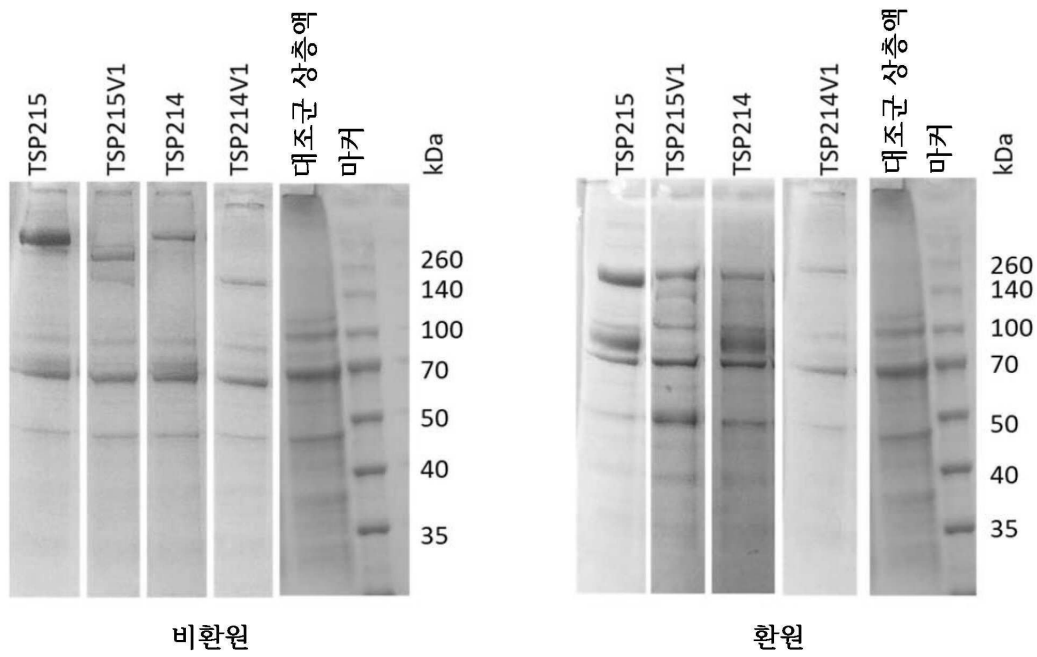
도면16b



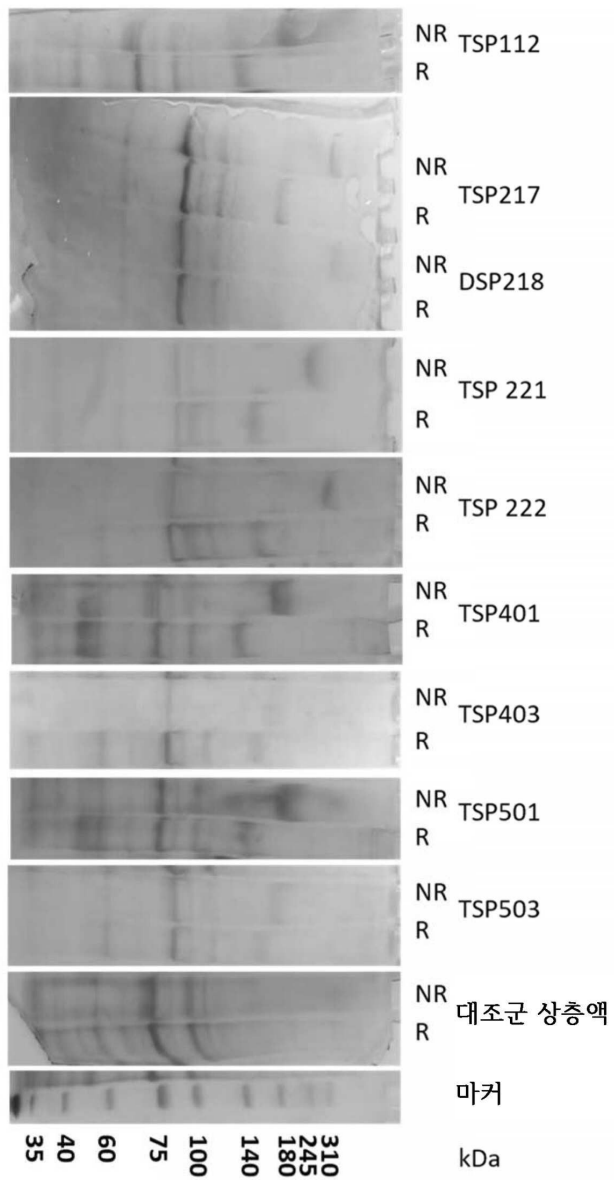
도면16c



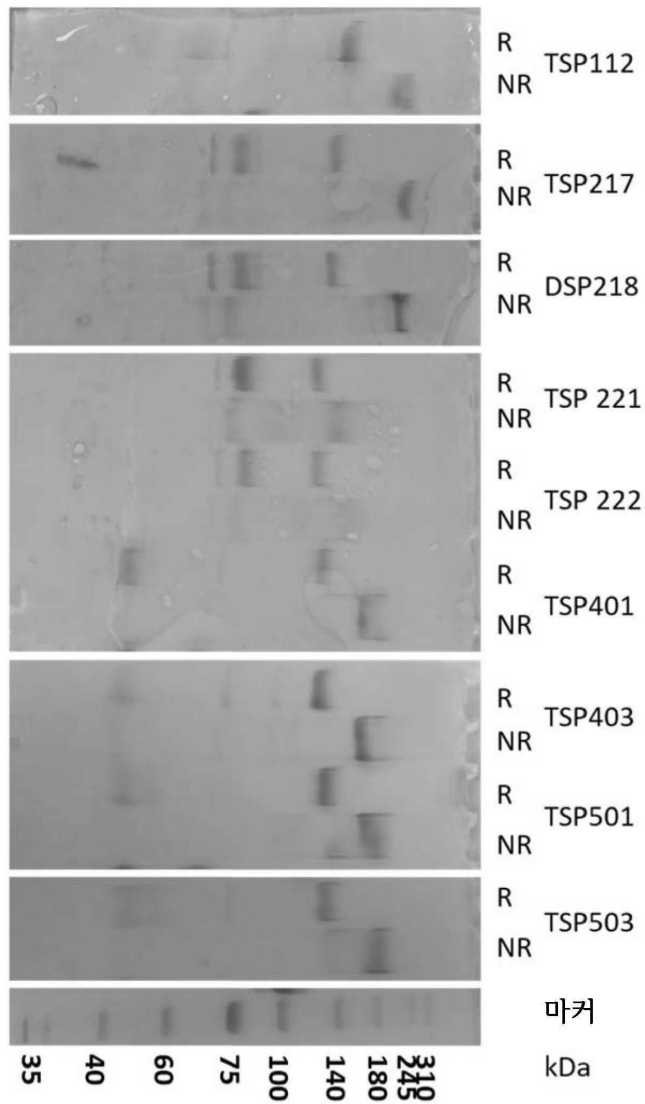
도면17



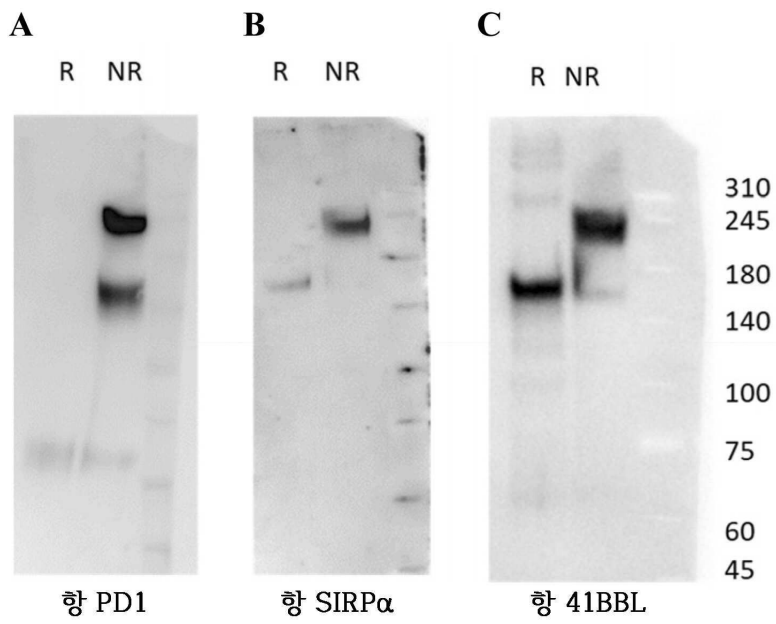
도면18a



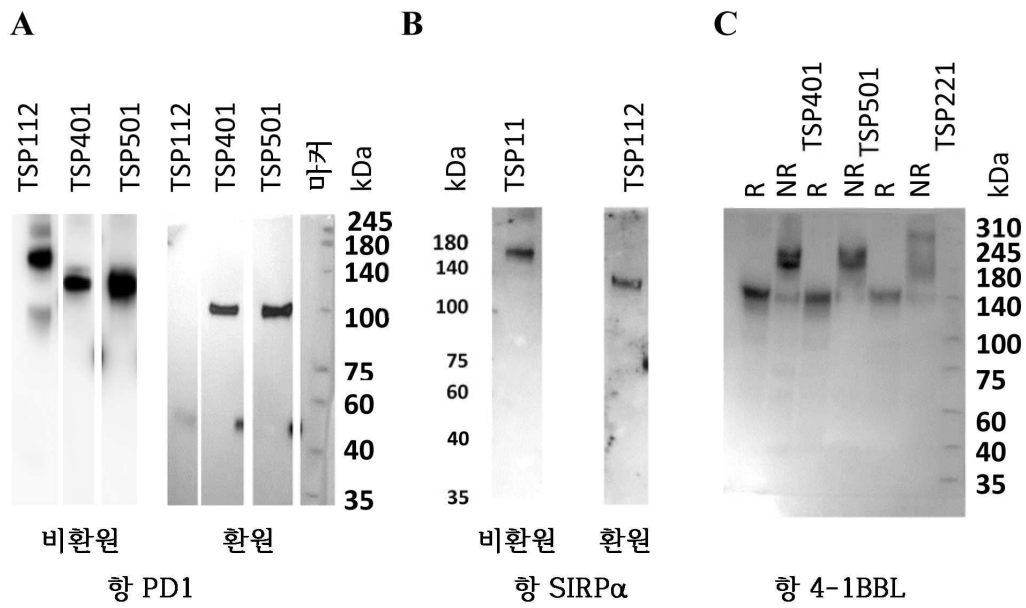
도면18b



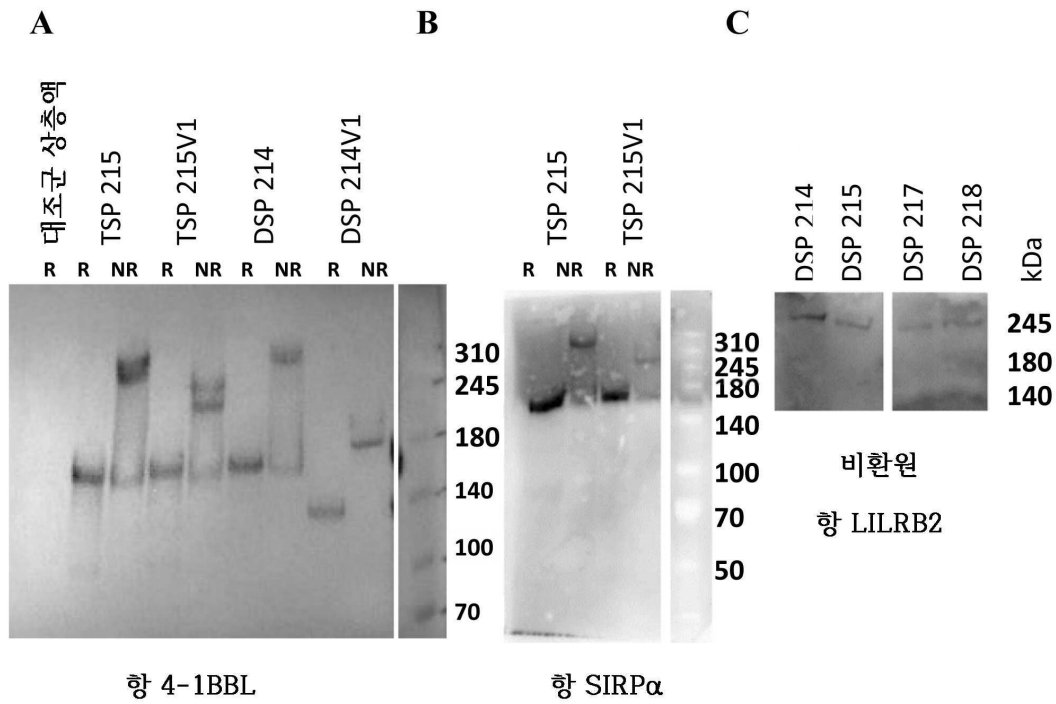
도면19



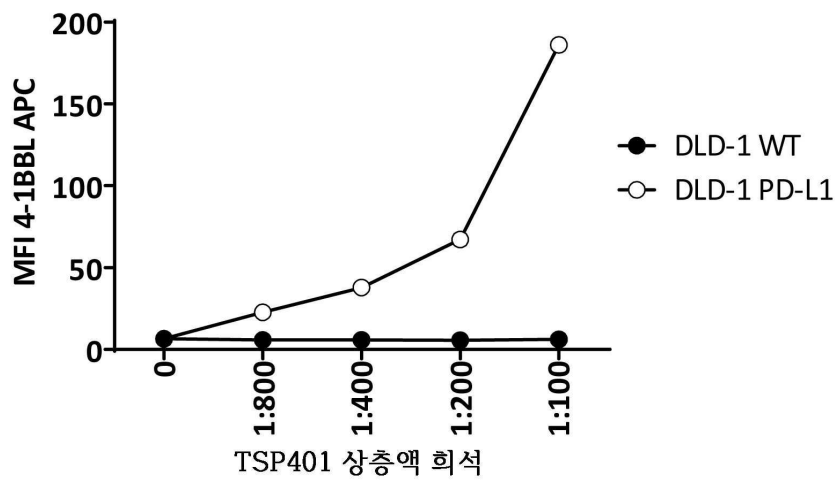
도면20



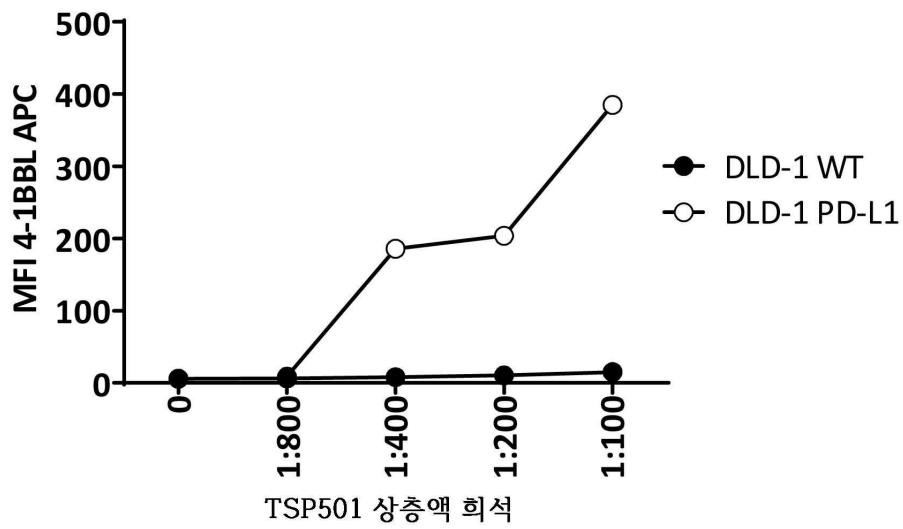
도면21



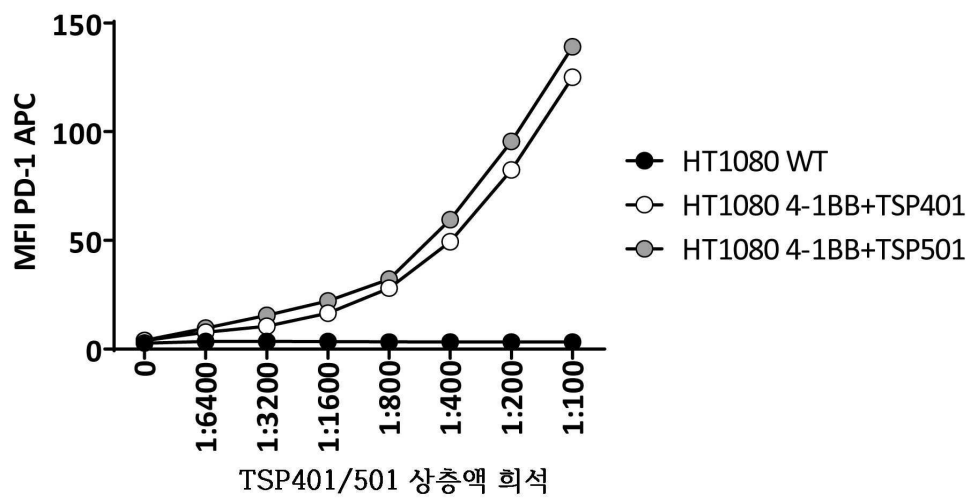
도면22a



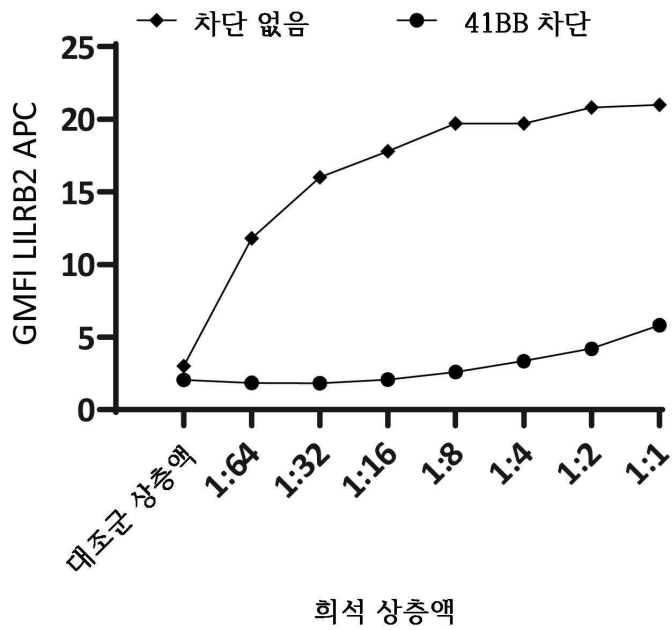
도면22b



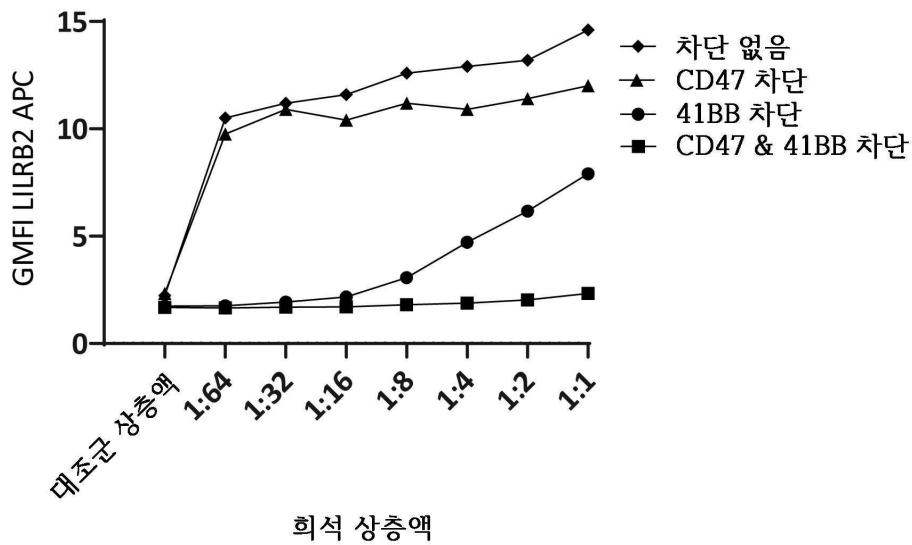
도면23



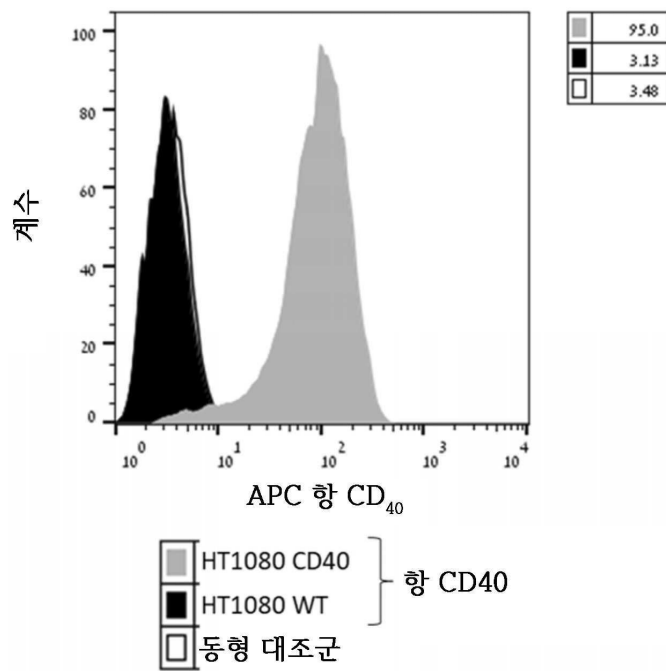
도면24



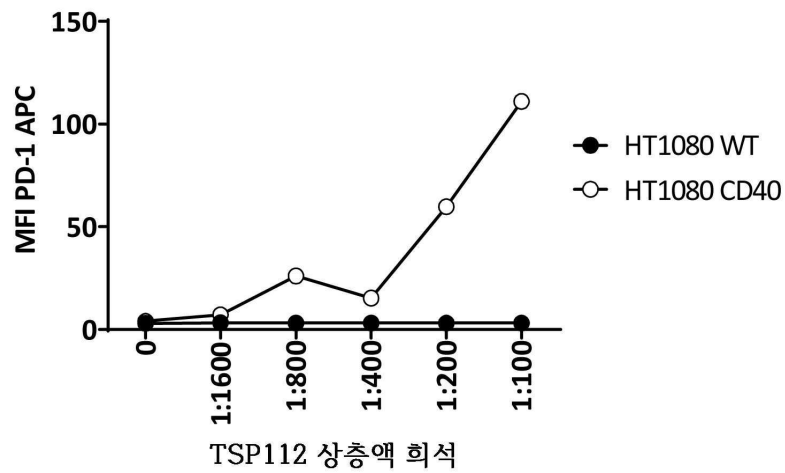
도면25



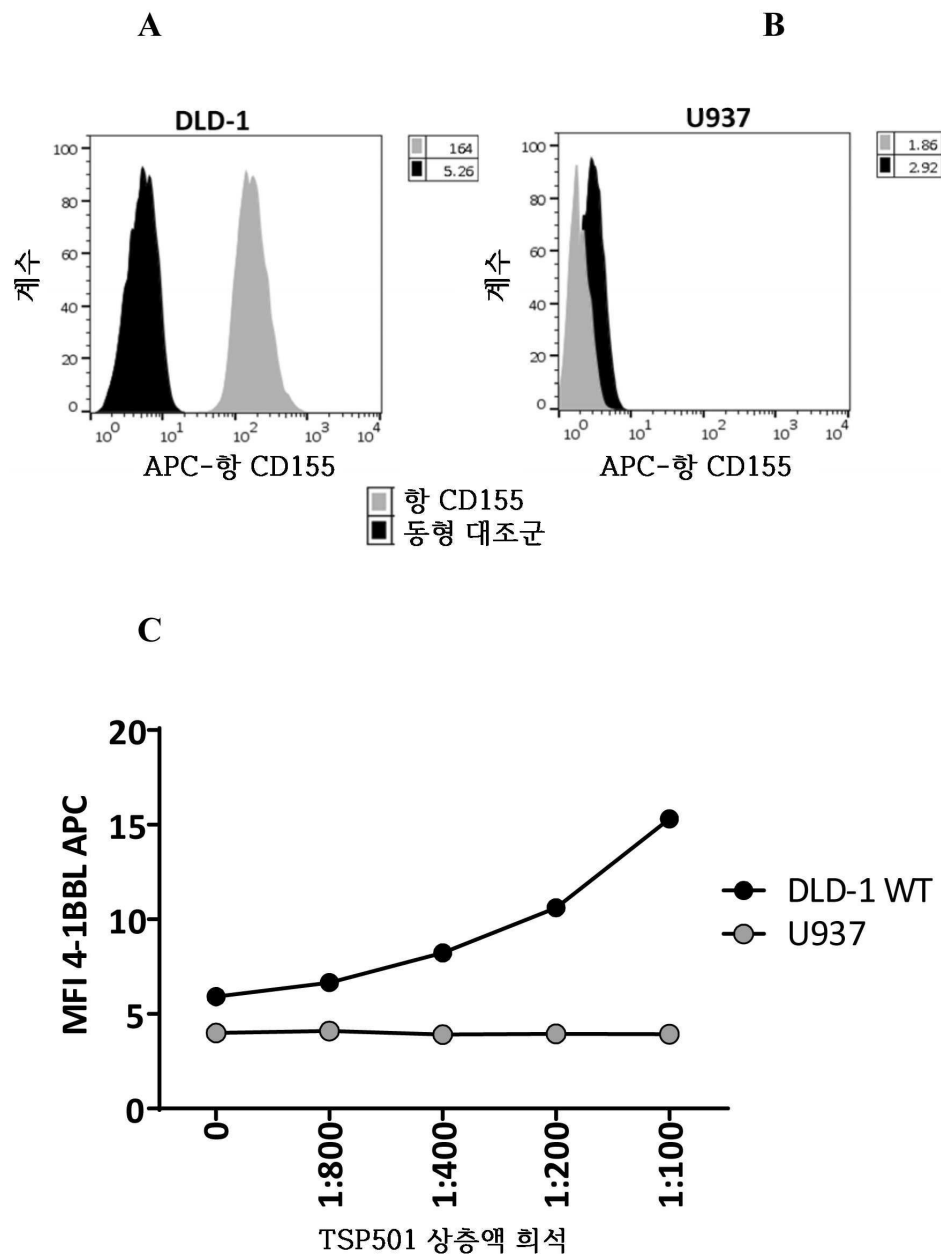
도면26a



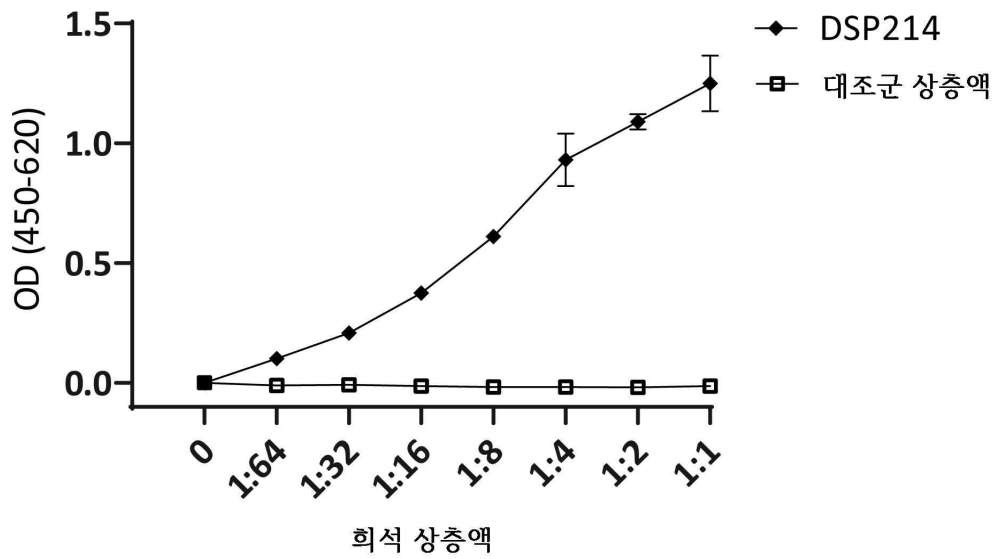
도면26b



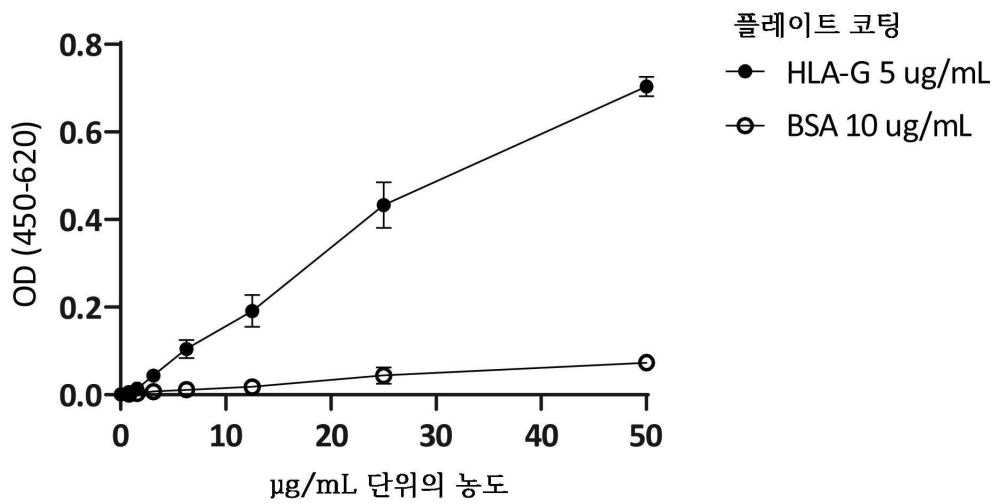
도면27



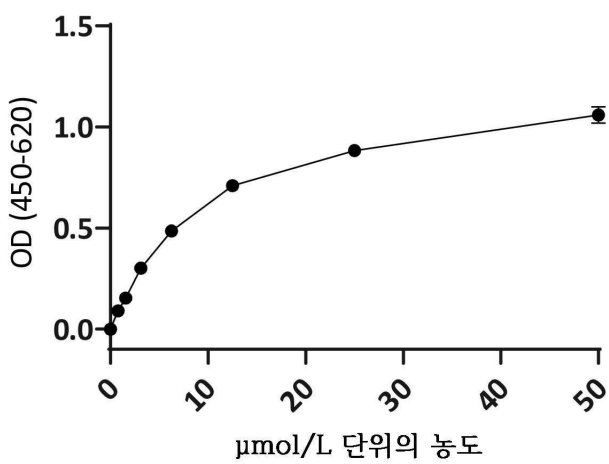
도면28a



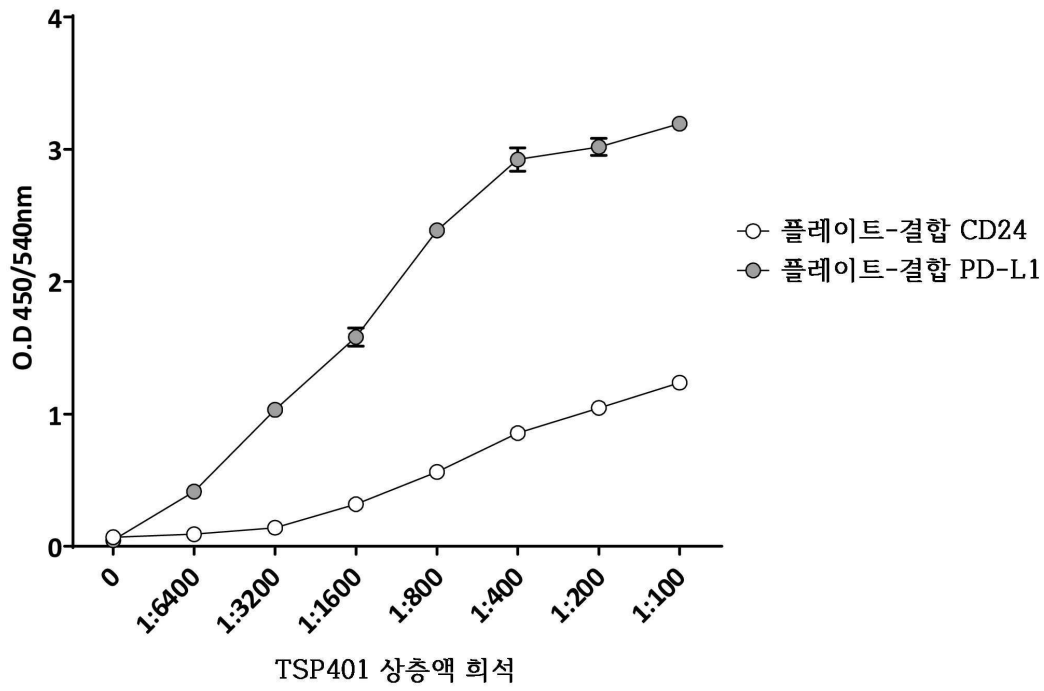
도면28b



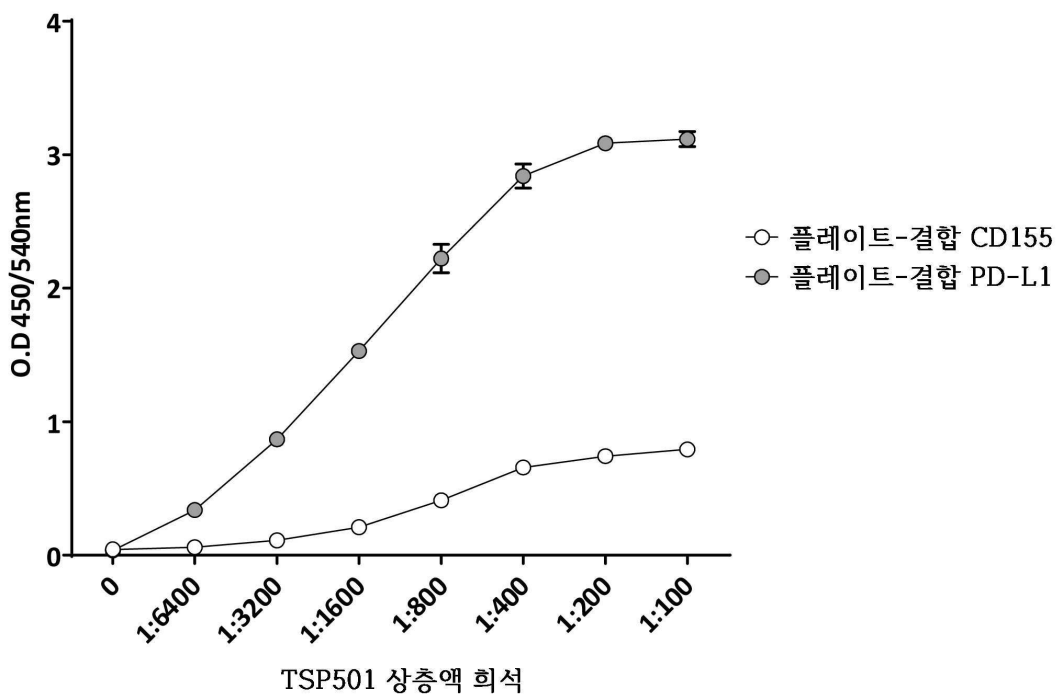
도면28c



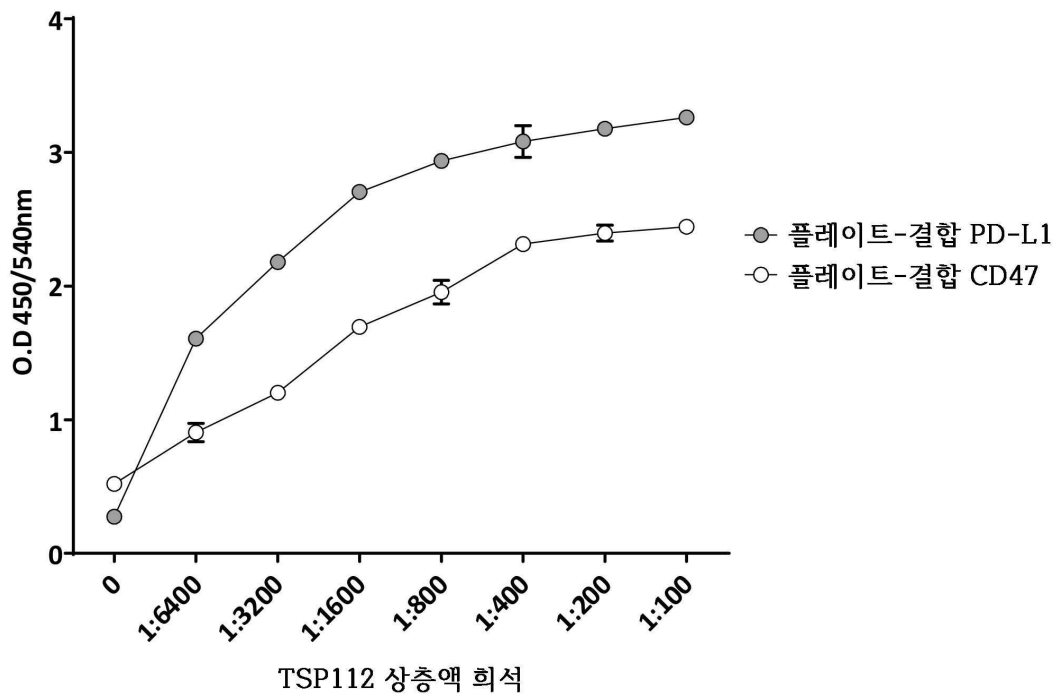
도면29a



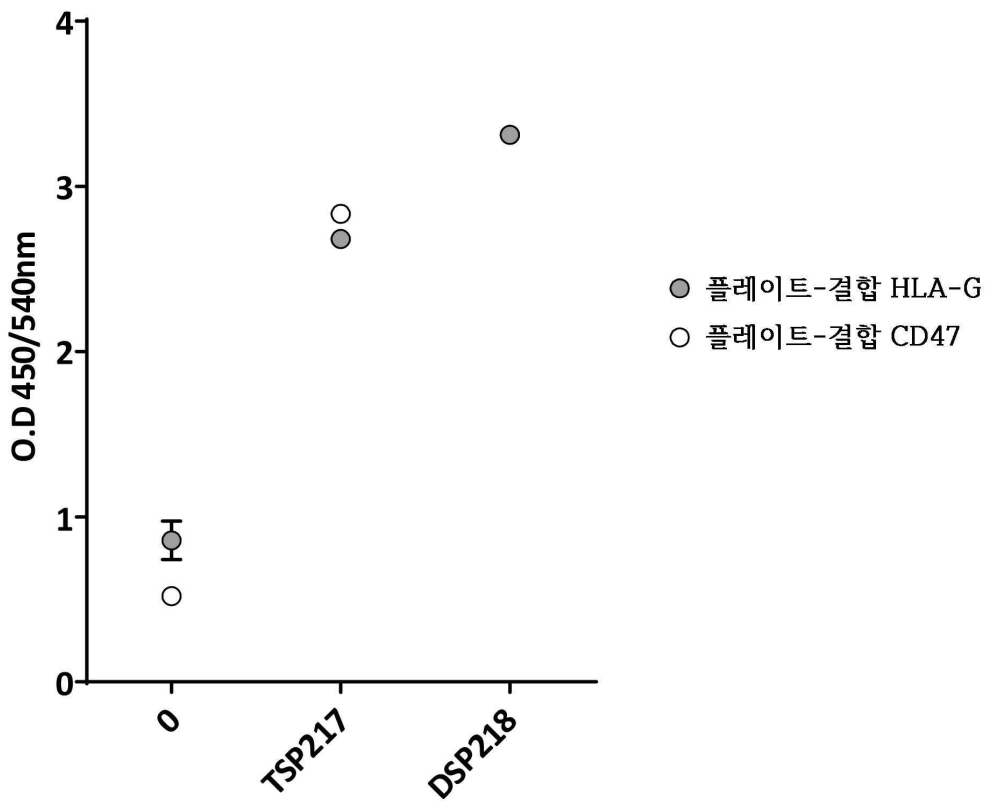
도면29b



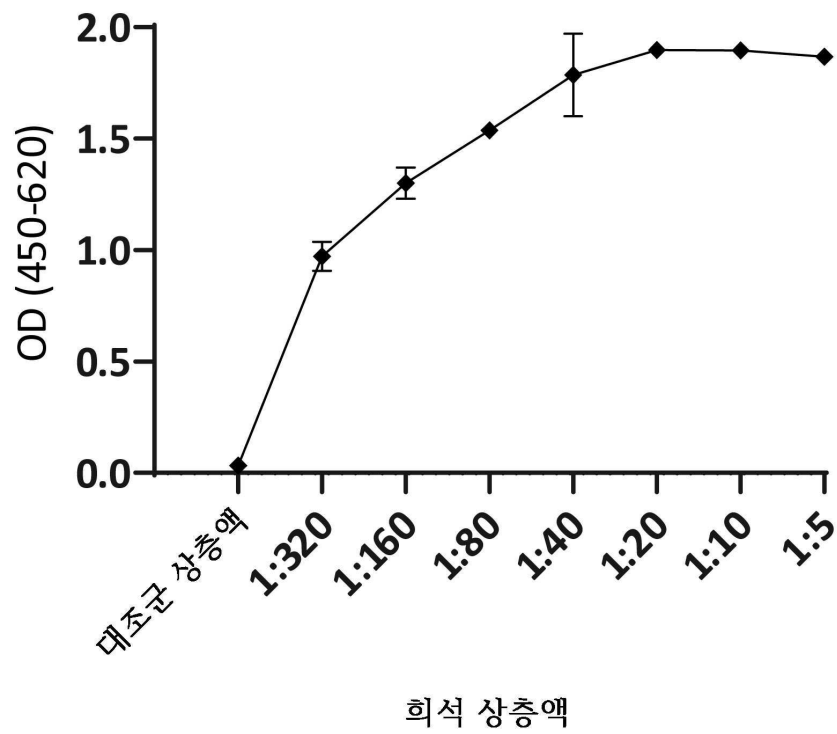
도면30a



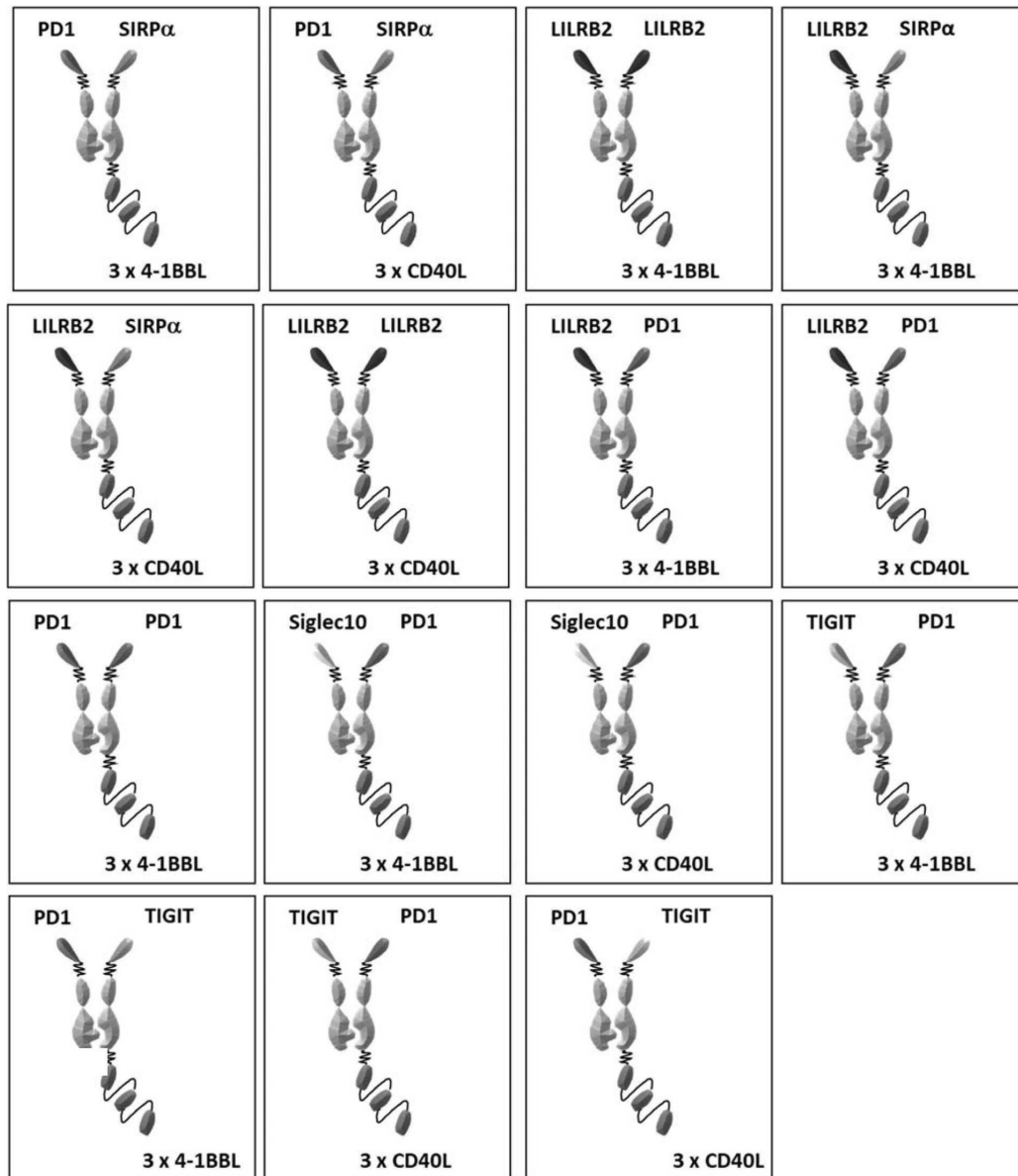
도면30b



도면31



도면32



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> KAHR Medical Ltd.

Thomas Jefferson University

TYKOCINSKY, Mark L.

TAMIR, Ami

BREMER, Edwin

<120> HETERODIMERS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 82913

<150> US 62/872,741

<151> 2019-07-11

<160> 166

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 1

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> 2

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 2

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccttggaacc cccccacctt ctcccagcc 120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240

gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttcctgtt cacacaactg 300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcaggggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgagaa tcaaagagag cctgcgggca 420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgccacag cccaccccag cccctcacc 480
aggccagccg gccagttcca aacctggtg gttggtgtcg tgggcggcct gctgggcagc 540
ctggtgctgc tagtctgggt cctggccgtc atctgctccc gggccgcacg agggacaata 600
ggagccagcg gcaccggcca gccctgaag gaggaccct cagccgtgcc tgtgttctct 660

gtggactatg gggagctgga tttccagtgg cgagagaaga ccccgagcc ccccggtccc 720

tggtgccctg agcagacgga gtagccacc attgtctttc ctagcggaat gggcacctca 780
tccccgccgc gcaggggctc agctgacggc cctcggagtg cccagccact gaggcctgag 840
gatggacact gctcttggcc cctctga 867

<210> 3

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence of PD1 ECD Full with CYS93>Ser substitution

<400> 3

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> 4

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 4

cccgctggt ttctggactc tccagacaga ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgt 60
ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120
gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccctagca accagaccga caagctggcc 180
gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc caggactctc ggttcagagt taccagctg 240

cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300
tatctgtgcg ggcacatctc tctggctccc aaggtcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360
gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgccaccg ctcacccctc accttctcca 420
agacctgctg gccagtttca gacactcgtg 450

<210> 5

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 ECM KNOWN FRAGMENT

<400> 5

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> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 ECM KNOWN FRAGMENT

<400> 6

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> 7

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 150 aa ORIGINAL PD1 DOMAIN

<400> 7

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> 8

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na pf SEQ ID NO 7

<400> 8

ccaggatggt tcttagactc tccagatagg ccttggaatc ccctacatt tagccccgcc 60

ctgctggtgg tgacagaggg cgataacgcc accttcacat gctcttttag caacacctcc 120

gagtctttcg tgctgaattg gtacaggatg agcccttcca accagacaga caagctggca 180

gcatttcctg aggaccgctc ccagccaggc caggattgcc ggttcagagt gacccagctg 240
ccaaatggca gggactttca catgagcgtg gtgcgcgccc ggagaaacga ttccggcaca 300
tacctgtgcg gagcaatctc tctggcacca aaggcacaga tcaaggagtc cctgagggca 360

gagctgaggg tgaccgagag gagggccgag gtccaacag cacacccatc tctagccca 420
aggccagcag gacagttcca aaccctggtg 450

<210> 9

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 150 aa ORIGINAL PD1 DOMAIN with CYS93>Ser substitution

<400> 9

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> 10

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na of SEQ ID NO 9

<400> 10

ccaggatggt tcttagactc tccagatagg ccttggaatc cccctacctt tagccccgcc	60
ctgctggtgg tgacagaggg cgataacgcc accttcacat gctcttttag caacacctcc	120
gagtctttcg tgctgaattg gtacaggatg agcccttcca accagacaga caagctggca	180
gcatttcctg aggaccgctc ccagccaggc caggattctc ggttcagagt gacctcagctg	240
ccaaatggca gggactttca catgagcgtg gtgcgcgccc ggagaaacga ttccggcaca	300
tacctgtgcg gagcaatctc tctggcacca aaggcacaga tcaaggagtc cctgagggca	360
gagctgaggg tgaccgagag gagggccgag gtgccaacag cacacccatc tcctagccca	420

aggccagcag gacagttcca aacctggtg	450

<210> 11

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 140 aa -5-5 in PD1 DOMAIN

<400> 11

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> 12

<211> 419

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na of SEQ ID NO 11

<400> 12

gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtgggtgaca 60

gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tticgtgctg 120

aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180

cgctcccagc caggccagga ttgccggttc agagtgacct agctgcaaaa tggcagggac 240

tttcacatga gcgtgggtgcg cgcccggaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca 300

atctctctgg caccaaaggc acagatcaag gaggccctga gggcagagct gaggggtgacc 360

gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccatttccta gccaaggcc agcaggaca 419

<210> 13

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 140 aa -5-5 in PD1 DOMAIN with CYS93>Ser substitution

<400> 13

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

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> 16

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 15

<400> 16

gactccctg acagacctg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc	60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtctg	120
aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac	180
agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttaccc agctgcctaa cggccgggac	240
ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc	300
atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca	360
gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat ccctcacctt ctccaagacc tgccggccag	420

<210> 17

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 128 aa PD1 segment

<400> 17

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> 18

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 17

<400> 18

ccttggaacc ctccaacctt ctctcccgct ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60

accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc 180

caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240

gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggtcccc 300

aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360

gtgcccaccg ctcateccctc acct

384

<210> 19

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 135 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

Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln

130 135

<210> 20

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 20

ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgct ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc

60

accttcacct gticccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
 tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactgcc gggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgcccaccg ctcatccctc accttctcca agacctgccg gccag 405

<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> 399

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 22

```

gactccctg acagacctg gaacctcca accttctctc ccgtctgct ggtggttacc      60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg    120
aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac    180
agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttaccc agctgcctaa cggccgggac    240
ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc    300

atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca    360
gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat ccttcacct                               399

```

<210> 23

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -10-5 (with CYS93>Ser substitution)

<400> 23

```

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> 24

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 24

ccttggaaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60

accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccctcg tgctgaactg gtacagaatg 120

tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc 180

caggactctc gggtcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240

gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300

aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360

gtgccaccg ctcatccctc accttctcca agacctgctg gccag 405

<210> 25

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -10-12 (with CYS93>Ser substitution)

<400> 25

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> 26

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 26

ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
accttacct gttccttcag caacacctcc gattccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc 180
caggactctc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300

aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
gtgccaccg ctcctccctc acct 384

<210> 27

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-12 (New, from V20) (with CYS93>Ser substitution)

<400> 27

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> 28

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 27

<400> 28

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgtg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagttaccc agctgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctcccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacct 399

<210> 29

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-12

<400> 29

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> 30

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 29

<400> 30

tggaaccctc caaccttctc tcccgctctg ctggtgggta ccgagggcga caatgccacc 60
 ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120
 cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc ttctctgagg acagatctca gccaggccag 180
 gactgtcggg tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
 cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccattctctt ggctcccaag 300
 gtcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360

cccaccgtc atccctcacc t 381

<210> 31

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-12 (New, from V18) (with CYS93>Ser substitution)

<400> 31

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

115 120 125

<210> 32

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 31

<400> 32

tggaaccctc caacattctc tcccgctctg ctggtggtta ccgagggcga caatgccacc 60

ttcacctggt ctttcagcaa cacctccgag tcttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120

cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcctgagg acagatctca gccaggccag 180

gactctcggt tcagagtac ccagctgcct aacggcagag acttcacat gtccgtcgtg 240

cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccatctctct ggctcccaag 300

gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360

cccaccgtc atccctcacc t 381

<210> 33

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-5

<400> 33

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 Ser

115 120 125

Pro Arg Pro Ala Gly Gln

130

<210> 34

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 33

<400> 34

tggaaccctc caaccttctc tcccgctctg ctggtggtta ccgagggcga caatgccacc 60

ttcacctggt ctttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggtg cagaatgtcc 120

cctagcaacc agaccgaaa gctggccgcc ttctctgagg acagatctca gccaggccag 180

gactgtcggg tcagagtac ccagctgcct aacggcagag acttcacat gtccgtcgtg 240

cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccattctctt ggctcccaag 300
gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360

cccaccgtc atccctcacc ttctccaaga cctgtggcc ag 402

<210> 35

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -11-5 (New, from V19) (with CYS93>Ser substitution)

<400> 35

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> 36

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 35

<400> 36

tggaaccctc caaccttctc tcccgtcttg ctggtgggta ccgagggcga caatgccacc 60
ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120

cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc ttctctgagg acagatctca gccaggccag 180
gactctcggt tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccattctctt ggctcccaag 300
gtcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
cccaccgtc atccctcacc ttctccaaga cctgctggcc ag 402

<210> 37

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-7

<400> 37

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> 38

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 37

<400> 38

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120
aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac 180
agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagtgacct agctgcctaa cggcagagac 240
ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300
atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat ccttcacctt ctccaagacc tgct 414

<210> 39

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-7 (New, from V21) (with CYS93>Ser substitution)

<400> 39

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> 40

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 39

<400> 40

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagtgacct agctgcctaa cggcagagac 240

ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctcccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacctt ctccaagacc tgct 414

<210> 41

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -5-9 from (with out CYS93>Ser substitution)136 aa

<400> 41

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> 42

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 41

<400> 42

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtgggtacc 60

gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120

aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac 180

agatctcagc caggccagga ctgtcgggtc agagttaccc agctgcctaa cggccgggac 240

ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300

atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gactctctgc gggccgagct gagagtgaca 360

gaaagacgag ctgaggtgcc caccgtcat cctcacctt ctccaaga 408

<210> 43

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -0-5 from (with out CYS93>Ser substitution)145 aa

<400> 43

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> 44

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 43

<400> 44

ccccgctggt ttctggactc tccagacaga ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgt	60
ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc	120
gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccctagca accagaccga caagctggcc	180
gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc gggtcagagt taccagctg	240
cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca	300
tatctgtgcg gcgccatctc tctggtctcc aaggtcaga tcaaagagtc tctgcgggcc	360
gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgcccaccg ctcatccctc accttctcca	420

agacctgctg gccag 435

<210> 45

<211> 143

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1 -0-7 from (with out CYS93>Ser substitution) 143 aa

<400> 45

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

130 135 140

<210> 46

<211> 429

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 45

<400> 46

cccgctggt ttctggactc tccagacaga ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgct 60

ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120
gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccctagca accagaccga caagctggcc 180
gcctttctcg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc ggttcagagt taccagctg 240
cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300
tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360
gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgcccaccg ctcacccctc accttctcca 420
agacctgct 429

<210> 47

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial sequence

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

<400> 47

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> 48

<211> 765

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 48

atggaatagc cctctgacgc ttacttggac cccgaagccc cgtggcctcc cgcgccccgc 60
gctcgcgcct gccgcgtact gccttgggcc ctggtcgcgg ggctgctgct gctgctgctg 120
ctcgtgccc cctgcgccgt cttcctcgcc tgccttggg ccgtgtccgg ggctcgcgcc 180
tcgcccggt ccgcggccag cccgagactc cgcgagggtc ccgagcttcc gcccgacgat 240

ccgcgggcc tcttggacct gcggcagggc atgtttgcgc agctggtgac ccaaatgtt 300
ctgctgatcg atgggccct gagctggtac agtgaccag gcctggcagg cgtgtccctg 360
acggggggcc tgagctacaa agaggacacg aaggagctgg tgggtggcaa ggctggagtc 420
tactatgtct tctttcaact agagctgcgg cgcgtggtgg ccggcgaggg ctcaggctcc 480
gtttcacttg cgtgcacct gcagccactg cgtctgctg ctggggccgc cgccctggct 540
ttgacctgg acctgccacc cgcctcctcc gaggtcggga actcggcctt cggtttccag 600
ggccgcttgc tgcacctgag tgccggccag cgcctgggag tccatcttca cactgaggcc 660

agggcacgcc atgcctggca gcttaccag ggcgccacag tcttgggact cttccgggtg 720

acccccgaaa tcccagccgg actcccttca ccgaggtcgg aataa

765

<210> 49

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ORIGINAL 41BBL DOMAIN

<400> 49

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> 50

<211> 615

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO: 49

<400> 50

gcctgcccct gggccgtgtc cggggtctgc gcctcgcccg gctccgcggc cagcccgaga 60

ctccgcgagg gtcccagact ttgcccgcac gatcccgcg gcctcttgga cctgcggcag 120

ggcatgtttg cgagctggt ggcccaaaat gttctgtga tcgatgggcc cctgagctgg 180

tacagtgacc caggcctggc aggcgtgtcc ctgacggggg gcctgagcta caaagaggac 240

acgaaggagc tgggtggtggc caaggctgga gtctactatg tcttctttca actagagctg 300

cggcgcgtgg tggccggcga gggctcaggc tccgtttcac ttgcgtgca cctgcagcca 360

ctgcgtctg ctgctggggc cgccgccctg gctttgaccg tggacctgcc accgcctcc 420

tccgaggctc ggaactcggc cttcggtttc cagggccgct tgctgcacct gagtgccggc 480

cagcgctgg gcgtccatct tcacactgag gccagggcac gccatgcctg gcagcttacc 540

cagggcgcca cagtcttggg actcttcgg gtgaccccg aaatcccagc cggactccct 600

tcaccgaggt cggaa 615

<210> 51

<211> 191

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 191 aa 14-0 in 4-1BBL DOMAIN

<400> 51

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
 180 185 190

<210> 52

<211> 573

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na of SEQ ID NO 51

<400> 52

agcgccgcct cccccaggct gcgcgaggga cctgagctgt cccagacga tcctgccggc 60

ctgctggacc ttagacaggg aatgtttgcc cagctggcgc ctcagaacgt gctgctgatt 120

gacggccccc tgtcctggta tagcgatcct ggactggcag gcgtgtctct gacaggcgga 180

ctgagttaca aagaagacac taaagaactg gtcgtcgcca aagccggcgt gtactacgtg 240

ttcttccaac tggagctgag gagggtcgtc gccggcgaag gcagcggctc tgtgagcctg 300

gccctgcacc tgcaaccact gaggagcgcc gccggcgccg ccgcctggc cctgactgtg 360

gacctgccac cagcatcctc tgaggcaagg aattccgcct tcggcttcca gggccggctg 420

ctgcacctgt ctgccggaca gagactgggc gtccacctgc ataccgaagc cagagccagg 480

catgcctggc agctgaccca gggcgccacc gtgctgggcc tgttcagagt gacccagaa 540

attccagcag gactgccttc cccaaggtct gag

573

<210> 53

<211> 197

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 197 aa 41BBL segment

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu

115 120 125

Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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> 54

<211> 591

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 53

<400> 54

gctagagctt ctctggctc tgccgttct cccagactga gagaaggacc tgagctgagc 60

cctgatgac ctgctggact gctggatctg cggcaggga tgtttgtca gttggtggcc 120

cagaactgc tgctgatcga tggccctctg tcttggtact ctgatccagg attggctggc 180

gtgtccctga ctggcggcct gtcttacaaa gaggacacca aagaactggt ggtggccaag 240

gccggcgtgt actacgtgtt ctttcagctg gaactgcgga gagtgggtggc tggcgaagga 300

tctggatctg tgtctctggc cctgcactctg cagcctctga gaagtgtgc aggcgtgct 360

gcactggctc tgacagttga tctgcctcct gcctcctcag aggccagaaa ctccgccttt 420

ggcttccaag gcagactgct gcacctgtcc gctggacaga gactgggagt ccatctgcac 480

acagaggcca gagctagaca cgcttggcag ttgacacagg gcgctacagt gctgggcctg 540

tttagagtga cccctgagat tccagccggc ctgccatctc ctatgctga g 591

<210> 55

<211> 185

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 185 aa 41BBL segment

<400> 55

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

<210> 57

<211> 199

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 199 aa 41BBL segment

<400> 57

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> 58

<211> 597

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 57

<400> 58

```
tctggcgcta gagcttctcc tggctctgcc gcttctccca gactgagaga aggacctgag      60
ctgagccctg atgatctcgc tggactgctg gatctgcggc agggcatgtt tgctcagttg      120
gtggcccaga acgtgctgct gatcgatggc cctctgtcct ggtactctga tccaggattg      180

gctggcgtgt cctgactgg cggcctgtct tacaagagg acaccaaaga actggtggtg      240
gccaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggctggc      300
gaaggatctg gatctgtgtc tctggccctg catctgcagc ctctgagaag tgctgcaggc      360
gctgctgcac tggctctgac agttgatctg cctctgcct cctccgagc cagaaactcc      420
gcctttggct tccaaggcag actgctgcac ctgtccgctg gacagagact gggagtccat      480
ctgcacacag aggccagagc tagacacgct tggcagttga cacagggcgc tacagtgtg      540
ggcctgttta gagtgacccc tgagattcca gccggcctgc catctcctag atctgag      597
```

<210> 59

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-IBBL -21-0 184 aa

<400> 59

```
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> 60

<211> 552

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 59

<400> 60

agagagggcc ctgagctgtc tctgatgat cctgctggac tgctggacct gagacagggc 60
atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgattg atggccctct gtcttggtac 120
tctgatcctg gattggctgg cgtgtccctg actggcggcc tgtcttaca agaggacacc 180
aaagaactgg tggtcgcca ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240
agagtggtag ctggcgaagg atctggatct gtgtctctgg cctgcatct gcagcctctg 300

agaagtgtc caggcgtgc tgcactggct ctgacagttg atctgcctcc tgcctcctcc 360
gaggccagaa actccgcctt tggcttccaa ggcagactgc tgcattgtc tgccggacag 420
agactgggag tgcacctcca tacagaggcc agagctagac acgcttggca gttgacacag 480
ggcgctacag tgctgggcct gtttagagt acacctgaga tcccagcgg cctgccatct 540
ccaagatctg aa 552

<210> 61

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-1BBL -23-0 182 aa

<400> 61

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> 62

<211> 546

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 61

<400> 62

ggccctgagc tgtctctga tgatcctgct ggactgctgg acctgagaca gggcatgttt 60

gctcagctgg tggcccagaa cgtgctgctg attgatggcc ctctgtcctg gtactctgat 120

cctggattgg ctggcgtgtc cctgactggc ggctgtctt acaaagagga caccaaagaa 180

ctggcgtgtc ccaaggccgg cgtgtactac gtgttctttc agctggaact gcggagagtg 240

gtggctggcg aaggatctgg atctgtgtct ctggccctgc atctgcagcc tctgagaagt 300

gctgcaggcg ctgtgcaact ggctctgaca gttgatctgc ctctgcctc ctccagggcc 360

agaaactccg cctttggctt ccaaggcaga ctgtgcatc tgtctgccgg acagagactg 420

ggagtgcacc tccatacaga ggccagagct agacacgctt ggagttgac acagggcgct 480

acagtgtgg gcctgtttag agtgacacct gagatcccag ccggcctgcc atctccaaga 540

tctgaa 546

<210> 63

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-1BBL -14-8 183 aa

<400> 63

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> 64

<211> 551

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 63

<400> 64

gatctgccgc ttctcctaga ctgagagagg gccctgagct gtctcctgat gatcctgctg 60
gactgctgga cctgagacag ggcatgtttg ctcagctggt ggcccagaac gtgctgctga 120
ttgatggccc tctgtcctgg tactctgata ctggattggc tggcgtgtcc ctgactggcg 180

gcctgtctta caaagaggac accaaagaac tgggtggtcg caaggccggc gtgtactacg 240
tgttctttca gctggaactg cggagagtgg tggctggcga aggatctgga tctgtgtctc 300
tggccctgca tctgcagcct ctgagaagtg ctgcaggcgc tgctgcactg gctctgacag 360
ttgatctgcc tctgtcctcc tccgaggcca gaaactccgc ctttggttc caaggcagac 420
tgctgcatct gtctgccgga cagagactgg gactgcacct ccatacagag gccagagcta 480
gacacgcttg gcagttgaca cagggcgcta cagtgtctggg cctgtttaga gtgacacctg 540
agatcccagc c 551

<210> 65

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 4-IBBL -21-8 176 aa

<400> 65

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

<210> 66

<211> 528

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 65

<400> 66

agagagggcc ctgagctgtc tctgatgat cctgctggac tgctggacct gagacagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgattg atggccctct gtcctggtac 120

tctgatcctg gattggctgg cgtgtccctg actggcggcc tgtcttaca agaggacacc 180

aaagaactgg tggtcgcca ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240
agagtggtag ctggcgaagg atctggatct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300
agaagtgtg caggcgctgc tgcactggct ctgacagttg atctgcctcc tgcctcctcc 360

gaggccagaa actccgcctt tggcttccaa ggcagactgc tgcactctgtc tgccggacag 420
agactgggag tgcacctcca tacagaggcc agagctagac acgcttggca gttgacacag 480
ggcgctacag tgctgggcct gtttagagt acacctgaga tcccagcc 528

<210> 67

<211> 601

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 601 aa sc3x4-1BBL (-14-0) internal linker (GGGGS)x2+GGGG

<400> 67

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
 225 230 235 240
 Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly
 245 250 255
 Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
 260 265 270

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

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

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

Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu
465 470 475 480
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> 68

<211> 1803

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 67

<400> 68

agcgccgcct cccctaggct gcgcgaggga ccagagctga gcccagacga tccagcagga 60
 ctgctggacc tgaggcagg aatgttcgca cagctggtgg cccagaacgt gctgctgac 120
 gacggccctc tgtcttggt aagcagatca ggactggcag gcgtgagcct gacagcgga 180
 ctgtctata aggaggatca caaggagctg gtggtggcaa aggcaggcgt gtactacgtg 240

 ttcttccagc tggagctgag gagagtgtg gcaggagagg gatccgacg tgtgagcctg 300
 gccctgcacc tgcagccact gcggagcgcc gcaggagcag ccgccctggc cctgaccgtg 360
 gacctgccac ctgcatctag cgaggcacgg aattctgcct tcggctttca gggcagactg 420
 ctgcacctga gcgccggaca gaggtggga gtgcacctgc acacagaggc aagggaaga 480
 cagcatggc agctgacaca gggagcaacc gtgctgggac tgttcgcgt gacctctgag 540
 atcccagcag gactgccatc ccccggtct gagggcgcg gcgggtccgg aggaggagga 600
 tctggcgcg gcggcagcgc cgcctcccc aggtgcgcg agggacctga gctgtccca 660

 gacgatcctg ccggcctgct ggacctgaga cagggaatgt ttgccagct ggtcgctcag 720
 aacgtgctgc tgattgacgg cccctgtcc tggatagcg atcctggact ggcagcgctg 780
 tctctgacag gcggactgag ttacaaagaa gacactaaag aactggtcgt cgccaaagcc 840
 ggctgtact acgtgttctt ccaactggag ctgaggagg tctcgccgg cgaaggcagc 900
 ggctctgtga gcctggccct gcacctgcaa cactgagga gcgcccgcg cgcgccgcc 960
 ctggccctga ctgtggacct gccaccagca tctctgagg caaggaattc cgccttcggc 1020
 ttccagggcc ggctgtgca cctgtctgcc ggacagagac tgggcgtcca cctgcatacc 1080

 gaagccagag ccagcatgc ctggcagctg acccagggcg ccaccgtgct gggcctgttc 1140
 agagtgacc cagaaattcc agcaggactg ccttcccaa ggtctgagg aggaggagga 1200
 agtggcgag gaggatccgg agggggagg agcgccgct cccaagact gagagaggga 1260
 ccagagctgt cccctgatga ccctgccggg ctgctggacc tgagacaagg catgttcgcc 1320
 cagctggtcg caaaaacgt gctgttaatt gacggccac tgtcttgta ttccgacct 1380
 ggctggcg gcgtgtcct gacaggcggc ctgtcttaca aagaagacac aaaagaactg 1440
 gtcgtcgta aagctggcgt gtactacgtg ttcttcaat tagaactgag aagggtcgtc 1500

 gccggcgagg gcagcgggtc tgtgagcctg gccctgcacc tgcaaccgt gcggagcgcc 1560
 gccggcgtg ccgccctggc cctgacagt gacctgcctc cagcaagctc cagggaagg 1620
 aatagcgct tcggctttca aggcgcctg ctgcacctgt ccgccgaca gcggctgggc 1680
 gtccacctgc acaccgaagc cagagccgc catgcctggc agctgactca gggcgctacc 1740
 gtgctgggc tgttcgcgt gacccagag atccctgcc gcctgcctc cctcggtct 1800
 gag 1803

<210> 69

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> aa sequence of full length SIRP

<400> 69

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys

1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala

145 150 155 160

Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser

165 170 175

Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser

180 185 190

Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser

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

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

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

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

 435 440 445

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

<210> 70

<211> 1512

<212> DNA

<213> Artificial sequence

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

<400> 70

atggagcccg ccggcccgcc ccccgccgc ctcgggcccgc tgctctgcct gctgctcgcc	60
gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac	120
aagtccgtat cagtgcagc tggagagtcg gccattctgc actgcactgt gacctccctg	180
atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac cagcccggga attaatctac	240
aatcaaaaag aaggccactt ccccgggta acaactgttt cagagtcac aaagagagaa	300
aacatggact ttccatcag catcagtaac atcacccag cagatgccgg cacctactac	360
tgtgtgaagt tccgaaagg gagccctgac acggagtta agtctggagc aggcactgag	420
ctgtctgtgc gtgcaaacc ctctgcccc gtggtatcgg gccctgcggc gagggccaca	480
cctcagcaca cagtgcatt caccitcgag tcccacggct tctcacccag agacatcacc	540
ctgaaatggt tcaaaaatgg gaatgagctc tcagacttcc agaccaacgt ggaccccgt	600
ggagagagcg tgcctacag catecacagc acagccaagg tggctgctgac ccgcgaggac	660
gttactctc aagtcactcg cgaggtggcc cagctcacct tgcaggggga ccctcttcgt	720
gggactgcca acttgtctga gaccatccga gtccacca ccttggaggt tactcaacag	780
cccgtgaggg cagagaacca ggtgaatgtc acctgccagg tgaggaagtt ctacccccag	840
agactacagc tgacctggtt ggagaatgga aacgtgtccc ggacagaaac ggcctcaacc	900
gttacagaga acaagtatgg tactacaac tggatgagct ggctcctggt gaatgtatct	960
gccacaggg atgatgtgaa gctcacctgc caggtggagc atgacgggca gccagcggtc	1020
agcaaaagcc atgacctgaa ggtctcagcc caccgaagg agcagggctc aaataccgcc	1080

gctgagaaca ctggatctaa tgaacggaac atctatatgtg tgggtgggtgt ggtgtgcacc 1140
ttgctggtgg ccctactgat ggcggccctc tacctcgtcc gaatcagaca gaagaaagcc 1200

cagggtccca cttctttctac aaggttgcat gagcccgaga agaatgccag agaaataaca 1260
caggacacaa atgatatcac atatgcagac ctgaacctgc ccaaggggaa gaagcctgct 1320
ccccaggtcg cggagcccaa caaccacacg gagtatgcca gcattcagac cagcccgcag 1380
cccgctcgg aggacacct cacctatgct gacctggaca tggtcacac caaccggacc 1440
cccaagcagc cggcccccaa gcctgagccg tccttctcag agtacgccag cgtccaggtc 1500
ccgaggaagt ga 1512

<210> 71

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ORIGINAL SIRPa DOMAIN (343AA)

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala

115 120 125

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

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

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

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

305 310 315 320
Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
325 330 335
Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr

340

<210> 72

<211> 1029

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 71

<400> 72

gaggaggagc tgcaggatgat tcagcctgac aagtcctgat cagttgcagc tggagagtcg	60
gccattctgc actgcactgt gacctccctg atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga	120
ggagctggac cagccccgga attaatctac aatcaaaaag aaggccactt cccccggta	180
acaactgttt cagagtccac aaagagagaa aacatggact tttccatcag catcagtaac	240
atcaccccag cagatgccgg cacctactac tgtgtgaagt tccggaaagg gagccctgac	300
acggagttaa agtctggagc aggcactgag ctgtctgtgc gtgccaaacc ctctgcccc	360
gtggtatcgg gccctgcggc gagggccaca cctcagcaca cagtgcagctt cacctgcgag	420
tcccacggct tctcacccag agacatcacc ctgaaatggt tcaaaaatgg gaatgagctc	480
tcagacttcc agaccaacgt ggaccccgta ggagagagcg tgtcctacag catccacagc	540
acagccaagg tgggtctgac ccgcgaggac gttcactctc aagtcactctg cgaggtggcc	600
cacgtcacct tgcaggggga ccctcttctg gggactgcca acttgtctga gaccatccga	660
gttccacca ccttggaggt tactcaacag cccgtgaggg cagagaacca ggtgaatgtc	720
acctgccagg tgaggaagtt ctacccccag agactacagc tgacctggtt ggagaatgga	780
aacgtgtccc ggacagaaac ggcctcaacc gttacagaga acaaggatgg tacctacaac	840
tggatgagct ggctcctggt gaatgtatct gccacaggg atgatgtgaa gctcacctgc	900
caggtggagc atgacgggca gccagcggtc agcaaaagcc atgacctgaa ggtctcagcc	960
caccgaagg agcagggtc aaataccgcc gctgagaaca ctggatctaa tgaacggaac	1020
atctatatt	1029

<210> 73

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 116 aa SIRPa segment

<400> 73

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

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

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ser Val Arg Ala
 115

<210> 74

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 73

<400> 74

gaagaggaac tgcaagtgat ccagcctgac aagtcctgac tggaggctgc tggcgaaacc 60
 gccacactga gatgtaccgc cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120
 ggcgctggac ctggcagaga gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagtg 180

accacgtgt ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggaac 240
 atcaccctg ctgatgccgg cacctactac tgcgtgaagt tccggaaggg ctcccctgac 300
 gacgtcgagt ttaaattccgg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagct 348

<210> 75

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 343 amino acids sequence of SIRPa with 4 point mutations

<400> 75

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

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Ile Pro
 20 25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60

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

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
85 90 95

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala
115 120 125

Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
130 135 140

Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu
145 150 155 160

Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser
165 170 175

Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val
180 185 190

His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp
195 200 205

Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro
210 215 220

Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr
245 250 255

Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val
260 265 270

Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val

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

Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr

340

<210> 76

<211> 1029

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 75

<400> 76

gaagaggaaa tccaagtgat ccagcctgac aagtcctgac tggaggctgc tggcgaaacc 60
 gccacactga gatgtaccat cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120
 ggcgctggac ctggcagagt gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagtg 180
 accaccgtgt ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggcaac 240
 atcacccctg ctgatgccgg cacctactac tgcataaagt tccggaaggg ctccctgac 300

 gacgtcgagt ttaaatccgg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagctaa accttctgct 360
 cccgtggtgt ctggccctgc cgctagagct acacctcagc acaccgtgtc ttttacctgc 420
 gagtcccacg gcttcagccc tagagacatc acctgaagt ggttcaagaa cggcaacgag 480
 ctgtccgact tccagaccaa cgtggaccct gtgggagagt ccgtgtccta ctccatccac 540
 tctaccgcca aggtggtgct gaccgagag gacgtgcaca gccaagtgat ctgtgaagtg 600
 gccacgtga cctccaggg cgatcctttg agaggcaccg ccaacctgtc cgagacaatc 660
 agagtgcctc ctacactgga agtgaccag cagcctgtgc gggccgagaa tcaagtgaac 720

 gtgacctgcc aagtgcggaa gttctaccct cagagactgc agctgacctg gctggaaaac 780
 ggcaatgtgt ccagaaccga gacagcctcc accgtgaccg agaacaagga tggcacctac 840
 aattggatgt cctggctgct cgtgaactgt tccgtcaca gagatgacgt gaagctgaca 900
 tgccagggtg aacacgatgg ccagcctgcc gtgtctaagt cccacgacct gaaagtgtct 960
 gctcacccca aagagcaggg ctccaatacc gccgtgaga acaccggctc caacgagaga 1020

aacatctac

1029

<210> 77

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 116 amino acids sequence of SIRPa with 4 point mutations

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu

35 40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Arg Ala

115

<210> 78

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 77

<400> 78

gaagaggaaa tccaagtgat ccagcctgac aagtcctgtc tgggtggctgc tggcgaaacc 60

gccacactga gatgtacat cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120

ggcgctggac ctggcagagt gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagtg 180

accaccgtgt ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggcaac 240
atcaccctgt ctgatgccgg cacctactac tgcatacaagt tccggaaggg ctcccctgac 300
gacgtcgagt ttaaataccgg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagct 348

<210> 79

<211> 989

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 989 aa hole chain of DSP305 and DSP105_V1

<400> 79

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 Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
180 185 190

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
195 200 205

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
210 215 220

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
245 250 255

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu
385 390 395 400

Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met
405 410 415

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

420 425 430
 Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly
 435 440 445
 Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly
 450 455 460
 Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly
 465 470 475 480
 Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg
 485 490 495

 Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro
 500 505 510
 Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu
 515 520 525
 Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu
 530 535 540
 Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu
 545 550 555 560

 Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro
 565 570 575
 Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 580 585 590
 Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
 595 600 605
 Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
 610 615 620

 Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
 625 630 635 640
 Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
 645 650 655
 Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
 660 665 670

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
675 680 685

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
690 695 700

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
705 710 715 720

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
725 730 735

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
740 745 750

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
755 760 765

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
770 775 780

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
785 790 795 800

Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
805 810 815

Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
820 825 830

Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
835 840 845

Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
850 855 860

Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
865 870 875 880

Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
885 890 895

Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
900 905 910

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

915	920	925	
Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly			
930	935	940	
Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala			
945	950	955	960
Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr			
965	970	975	
Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu			
980	985		
<210> 80			
<211> 2967			
<212> DNA			
<213> Artificial sequence			
<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 79			
<400> 80			
gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc ccgccctgct ggtggtgaca			60
gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg			120
aattgttaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac			180
cgctcccagc caggccagga ttctcggttc agagtgacct agctgccaaa tggcagggac			240
tttcacatga gcgtggtgcg cgcccggaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca			300
atctctctgg caccaaaggc acagatcaag gagtccctga gggcagagct gagggtgacc			360
gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccatctccta gccaaggcc agcaggacag			420
ggaggaggag gatccggagg aggaggatcc gagtctaagt atggaccacc atgccctcca			480
tgtccagcac ctgagtttga gggaggacct tccgtgttcc tgtttccccc taagccaaag			540
gacacactga tgatctccag gacaccagag gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtctcag			600
gaggatcccg aggtgcagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca caatgccaaag			660
accaagccta gggaggagca gtttaactcc acataccgcg tgggtgtctgt gctgaccgtg			720
ctgcaccagg attggtgtaa cggcaaggag tataagtgt aggtgagcaa taagggcctg			780
ccaagctcca tcgagaagac catctccaag gcaaaggac agccaaggga gcctcaggtg			840
tataactgc caccagcca gtgcgagatg accaagaacc aggtgagcct gtcctgtgcc			900
gtgaagggtc tciacccatc tgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg ccagcccgag			960

aacaattata agaccacacc tccagtgtctg gactccgatg gctctttctt tctgggtgcc 1020
aggctgacag tggataagtc tcgtctggcag gagggcaacg tgttttcttg tagcgtgatg 1080
cacgaggccc tgcacaatca ctacaccag aagtcctgt ctctgagcct gggcaagggc 1140
ggcggcggct ccggaggagg aggaagcgcc gcctcccta ggctgcgca gggaccagag 1200
ctgagcccag acgatccagc aggactgtctg gacctgaggc agggaatgtt cgcacagctg 1260
gtggcccaga acgtgtgtct gatcgacggc cctctgtctt ggtacagcga tccaggactg 1320

gcaggcgtga gcctgacagg cggactgtcc tataaggagg ataccaagga gctgggtggg 1380
gcaaaggcag gcgtgtacta cgtgttcttc cagctggagc tgaggagagt ggtggcagga 1440
gagggatccg gatctgtgag cctggccctg cacctgcagc cactgcggag cggcgagga 1500
gcagccgccc tggccctgac cgtggacctg ccacctgcat ctagcgagc acggaattct 1560
gccttcggct ttcaggcgag actgtgtcac ctgagcgccg gacagaggct gggagtgcac 1620
ctgcacacag aggcaagggc aagacacgca tggcagctga cacaggagc aaccgtgtctg 1680
ggactgttcc gcgtgacccc tgagatcca gcaggactgc catcccccg gtctgagggc 1740

ggcggcgggt ccggaggagg aggatctggc ggcggcggca gcgcgcctc cccaggtctg 1800
cgcgagggac ctgagctgtc cccagacgat cctgccggcc tgctggacct gagacaggga 1860
atgtttgccc agctggtcgc tcagaacgtg ctgtgtattg acggccccct gtcttggtat 1920
agcgtcctg gactggcagg cgtgtctctg acaggcggac tgagttacaa agaagacact 1980
aaagaactgg tcgtcgccaa agccggcgtg tactacgtgt tcttccaact ggagctgagg 2040
agggtcgtc cggcggaagg cagcggtctt gtgagcctgg ccctgcacct gcaaccactg 2100
aggagcgccg ccggcgccgc cgccctggcc ctgactgtgg acctgccacc agcatcctct 2160

gaggcaagga attccgctt cggtctccag ggccggctgc tgcacctgtc tgccggacag 2220
agactgggag tccacctgca taccgaagcc agagccaggc atgcctggca gctgaccag 2280
ggcgccaccg tgctgggcct gttcagagt accccagaaa ttccagcagg actgccttcc 2340
ccaaggtctg agggaggagg aggaagtggc ggaggaggat ccggaggggg agggagcgcc 2400
gcctcccaa gactgagaga gggaccagag ctgtccctg atgacctgc cgggtgtctg 2460
gacctgagac aaggcatgtt cgccagctg gtcgcacaaa acgtgtgtt aattgacggc 2520
ccactgtct ggtattccga cctggcctg gccggcgtgt ccctgacagg cggcctgtct 2580

tacaagaag acacaaaaga actggtcgtc gctaaagctg gcgtgtacta cgtgttcttc 2640
caattagaac tgagaagggt cgtcgccggc gagggcagcg ggtctgtgag cctggccctg 2700
cacctgcaac cgtcgcgag cgccgccggc gctgccgcc tggccctgac agtggacctg 2760
cctccagcaa gctccgagc aaggaatagc gccttcggct ttcaaggccg cctgtgtcac 2820

ctgtccgccg gacagcggct gggcgtccac ctgcacaccg aagccagagc cgcctatgcc 2880
 tggcagctga ctcagggcgc taccgtgctg ggcctgttcc gcgtgacccc agagatccct 2940
 gccggcctgc cctcccctcg gtctgag 2967

<210> 81

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 379 aa knob chain of DSP305

<400> 81

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 Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

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

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

<210> 82

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 81

<400> 82

gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtggtagaca 60
gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120
aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180
cgctcccagc caggccagga ttctcgggtc agagtgaccc agctgccaaa tggcagggac 240

tttcacatga gcgtgggtgcg cgcccggaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca 300
atctctctgg caccaaaggc acagatcaag gagtccctga gggcagagct gagggtagacc 360
gagaggaggg ccgagggtgcc aacagcacac ccattctcta gccaaggcc agcaggacag 420
ggcggaggag gcagcggagg aggaggatcc gagtctaagt acggaccacc atgccctcca 480
tgtctgcac cagagttcga gggaggacca tccgtgttcc tgtttccacc taagcctaag 540
gacacctga tgatctccag aacccccgag gtgacatgcg tggtagtgga cgtgtctcag 600
gaggatcctg aggtgcagtt caattggtac gtggatggcg tggaggtgca caacccaag 660

acaaagcccc gggaggagca gtttaatagc acctacagag tgggtgccgt gctgacagtg 720
ctgcaccagg attggctgaa tggcaaggag tataagtga aggtgagcaa caaggcctg 780
cctagctcca tcgagaagac catctccaag gccaagggcc agccaagaga gccacaggtg 840
tgcacctgc caccaagcca ggaggagatg acaaagaatc aggtgtccct gtgggtgtctg 900
gtgaagggtc tctaccttc cgacatgcc gtggagtggg agtctaacgg ccagccagag 960
aacaattaca agaccacacc tccagtgtg gactctgatg gcagcttctt tctgtattct 1020
cggctgaccg tggataagag cagatggcag gagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg 1080

cacgaggccc tgcacaacca ctatacacag aagtctctga gcctgtccct gggcaag 1137

<210> 83

<211> 389

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 389 aa knob chain of DSP305_V1

<400> 83

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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 165 170 175
 Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 180 185 190
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 195 200 205
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 210 215 220
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 225 230 235 240
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 245 250 255
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 260 265 270
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 275 280 285
 Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

290 295 300
Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
305 310 315 320
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
325 330 335
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
340 345 350
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
355 360 365
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
370 375 380
Leu Ser Leu Gly Lys
385
<210> 84
<211> 1167
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> na sequence encoding SEQ ID NO 83
<400> 84
ccaggatggt tcttgacag ccccgatagg ccttggaatc cccctacctt tccccctgcc 60
ctgctggtgg tgacagaggg cgacaacgcc accttcacat gctcttttag caacacctcc 120
gagtctttcg tgctgaattg gtacaggatg agcccttcca accagacaga taagctggca 180
gcattttcag aggaccgcag ccagcctgga caggattgcc gggtcagagt gacccagctg 240
ccaaatggca gggactttca catgtccgtg gtgcgcgccc ggagaaacga ttctggcaca 300
tacctgtgcg gagcaatcag cctggcacca aaggcacaga tcaaggagtc cctgagggca 360
gagctgaggg tgaccgagag gagggccgag gtgccaacag cacacccatc tcctagccca 420
cgccccgccg gccagttcca gacctggtg ggaggaggag gaagcggagg aggaggatcc 480
gagtctaagt acggaccacc atgccctcca tgtcctgcac cagagtttga gggcgcccca 540
tccgtgttcc tgtttcccc taagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccagag 600
tgacatgcg tggtggtgga cgtgagccag gaggatcctg aggtgcagtt caattgttac 660
gtggatggcg tggaggtgca caacccaag acaaagcccc gggaggagca gtttaattcc 720
acctacagag tgggtgtctgt gctgacagtg ctgcaccagg attggctgaa tggcaaggag 780

tataagtgtg aggtgtccaa caaggcctg cccagctcca tcgagaagac catctctaag 840
gccaagggcc agccaagaga gccacaggtg tgcaccctgc caccatccca ggaggagatg 900
acaaagaatc aggtgtctct gtggtgtctg gtgaagggt tctacccttc tgacatcgca 960

gtggagtggg agagcaacgg acagccagag aacaattaca agaccacacc tccagtgtg 1020
gactctgatg gcagcttctt tctgtatagc cggtgaccg tggataagtc cagatggcag 1080
gagggcaacg tgttcagctg ttccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctatacacag 1140
aagtctctga gcctgtccct gggcaag 1167

<210> 85

<211> 1192

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1192 aa TSP111 and TSP111_V2 "hole" chain

<400> 85

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

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro
20 25 30

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

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60

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

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

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala
115 120 125

Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
130 135 140

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

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

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

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

385	390							395							400				
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly				
405								410				415							
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn				
420								425				430							
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp				
435								440				445							
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro				
450								455				460							
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu				
465				470				475				480							
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Cys	Glu	Met	Thr	Lys	Asn				
485								490				495							
Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile				
500								505				510							
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr				
515								520				525							
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Arg				
530				535				540											
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys				
545				550				555				560							
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu				
565								570				575							
Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
580								585				590							
Ala	Ala	Ser	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp				
595								600				605							
Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asp	Leu	Arg	Gln	Gly	Met	Phe	Ala	Gln	Leu	Val				
610								615				620							
Ala	Gln	Asn	Val	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Leu	Ser	Trp	Tyr	Ser	Asp				
625				630				635				640							

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
645 650 655

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
660 665 670

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
675 680 685

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
690 695 700

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
705 710 715 720

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
725 730 735

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
740 745 750

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
755 760 765

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly
770 775 780

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser
785 790 795 800

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
805 810 815

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
820 825 830

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
835 840 845

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
850 855 860

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
865 870 875 880

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

885	890	895	
Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu			
900	905	910	
Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser			
915	920	925	
Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg			
930	935	940	
Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln			
945	950	955	960
Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu			
965	970	975	
Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser			
980	985	990	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu			
995	1000	1005	
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu			
1010	1015	1020	
Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val			
1025	1030	1035	
Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu			
1040	1045	1050	
Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr			
1055	1060	1065	
Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe			
1070	1075	1080	
Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser			
1085	1090	1095	
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly			
1100	1105	1110	
Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser			
1115	1120	1125	

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

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

Pro Arg Ser Glu

1190

<210> 86

<211> 3577

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na of SEQ ID NO 85

<400> 86

gaggaggagc tgcaggatcat ccagcccgat aagtctgtgc tgggtggcagc aggagagacc 60

gccacactga gatgcaccgc cacaagcctg atcccagtgg gaccaatcca gtggtttagg 120

ggagcaggac ctggaaggga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagggtg 180

accacagtgt ccgacctgac caagcgggaac aatatggatt tttctatcag aatcggcaat 240

atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcagaaaggg cagcccagac 300

gatgtggagt ttaagagcgg agcaggaacc gagctgtccg tgagagccaa gccttctgcc 360

ccagtggatga gcggaccagc agcaagggca accccacagc acacagtgtc cttcacctgt 420

gagagccacg gcttttcccc acgcgatatc aactgaagt ggttcaagaa cggcaatgag 480

ctgagcgaact ttcagaccaa cgtggatccc gtgggcgagt ctgtgagcta ctccatccac 540

tctacagcca aggtgggtgct gaccggggag gacgtgcaca gccaggatcat ctgcgaggtg 600

gcacactgta ccctgcaggg cgatcctctg agaggcacag ccaatctgag cgagaccatc 660

agggtgcccc ctacactgga ggtgaccag cagcccgtga gggcagagaa ccaagtgaat 720

gtgacatgtc aggtgcggaa gttctacct cagagactgc agctgacctg gctggagaac 780

ggcaactgta gccggaccga gacagccagc accgtgacag agaacaagga cggcacatat 840

aattggatgt cttggctgct ggtgaactgt agcggccaca gggacgatgt gaagctgacc 900

tgccaggtgg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgagc	960
gcccacccta aggagcaggg ctccaacaca gccgccgaga ataccggcag caacgagaga	1020
aatatctacg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca	1080
tgccctccat gtccagcacc tgagtttgag ggaggacctt ccgtgttcct gtttccccct	1140
aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgcgt ggtggtggac	1200
gtgtctcagg aggatccga ggtgcagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac	1260
aatgccaaga ccaagcctag ggaggagcag tttaactcca cataccgcgt ggtgtctgtg	1320
ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat	1380
aagggcctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaagggag	1440
cctcaggtgt atacactgcc acccagccag tgcgagatga ccaagaacca ggtgagcctg	1500
tcctgtgccg tgaagggtt ctaccatct gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc	1560
cagcccagaga acaattataa gaccacacct ccagtgtctgg actccgatgg ctctttcttt	1620
ctggtgtcca ggctgacagt ggataagtct cgctggcagg agggcaacgt gttttcttgt	1680
agcgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacaccaga agtccctgtc tctgagcctg	1740
ggcaagggcg gcggcggtc cggaggagga ggaagcgccg cctcccctag gctgcgcgag	1800
ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggactgtctgg acctgaggca gggaatgttc	1860
gcacagctgg tggcccagaa cgtgtgtctg atcgacggcc ctctgtcttg gtacagcgat	1920
ccaggactgg caggcgtgag cctgacaggc ggactgtcct ataaggagga taccaaggag	1980
ctggtggtgg caaaggcagg cgtgtactac gtgttcttcc agctggagct gaggagagtg	2040
gtggcaggag aggatccgg atctgtgagc ctggccctgc acctgcagcc actgcggagc	2100
gccgcaggag cagccgccct ggccctgacc gtggacctgc cacctgcac tagcgaggca	2160
cggaattctg ctttcggtt tcagggcaga ctgctgcacc tgagcgccgg acagaggctg	2220
ggagtgcacc tgcacacaga ggcaagggca agacacgat gccagctgac acagggagca	2280
accgtgtctg gactgttccg cgtgacctt gagatcccag caggactgcc atcccccg	2340
tctgaggcg gcggcggtc cggaggagga ggatctggcg gcggcggcag cgccgcctcc	2400
cccaggctgc gcgagggacc tgagctgtcc ccagacgac ctgccgcct gctggacctg	2460
agacagggaa tgtttgcccc gctggtcgct cagaacgtgc tgctgattga cgccccctg	2520
tcctgttata gcgatcctgg actggcaggc gtgtctctga caggcggact gagttacaaa	2580
gaagacacta aagaactggt cgtcgccaaa gccggcgtgt actacgtgtt cttccaactg	2640

gagctgagga gggtcgtcgc cggcgaaggc agcggctctg tgagcctggc cctgcacctg 2700
 caaccactga ggagcgccgc cggcgccgcc gccctggccc tgactgtgga cctgccacca 2760
 gcatcctctg aggcaaggaa ttccgccttc ggcttccagg gccggctgct gcacctgtct 2820
 gccggacaga gactgggcgt ccacctgcat accgaagcca gagccaggca tgcctggcag 2880
 ctgaccagg gcgccacct gctgggcctg ttcagagtga cccagaaat tccagcagga 2940
 ctgccttccc caaggtctga gggaggagga ggaagtggcg gaggaggatc cggaggggga 3000
 gggagcgccg cctcccaag actgagagag ggaccagagc tgtcccctga tgacctgcc 3060

gggctgctgg acctgagaca aggcattgtc gccagctgg tcgcacaaaa cgtgctgtta 3120
 attgacggcc cactgtcctg gtattccgac cctggcctgg ccggcgtgtc cctgacaggc 3180
 ggctgtctt acaaagaaga caaaaagaa ctggtcgtcg ctaaagctgg cgtgtactac 3240
 gtgttcttcc aattagaact gagaagggtc gtcgccggcg agggcagcgg gtctgtgagc 3300
 ctggccctgc acctgcaacc gctgcggagc gccgccggcg ctgccgccct ggccctgaca 3360
 gtggacctgc ctccagcaag ctccgaggca aggaatagcg cttcggctt tcaaggccgc 3420
 ctgctgcacc tgtccgccgg acagcggctg ggcgtccacc tgcacaccga agccagagcc 3480

cgccatgcct ggcagctgac tcagggcgct accgtgctgg gcctgttccg cgtgacccca 3540
 gagatccctg ccggcctgcc ctcctctcgg tctgagt 3577

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 379 aa TSP111_V1 "hole" chain

<400> 89

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

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 Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 145 150 155 160
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 165 170 175
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 180 185 190
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 195 200 205
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 210 215 220
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 245 250 255
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 260 265 270
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys

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

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

370 375

<210> 90

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na of SEQ ID NO 89

<400> 90

gactctccag atagccttg gaatccccct accttttagcc ccgccctgct ggtgggtgaca 60

gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120

aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180

cgcagccagc caggacagga ttcccgggtt agagtgaccc agctgccaaa tggcagggac 240

tttcatatgt ctgtggtgcg cgcccggaga aacgatagcg gcacatacct gtgcggagca 300

atctccctgg caccaaagcg acagatcaag gagtccctga gggcagagct gagggtgacc 360

gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccatctccta gccaaggcc agcaggacag 420

ggaggaggag gctctggagg aggaggatcc gagtctaagt acggaccacc atgccctcca 480

tgtctgcac cagagttcga gggaggacca tccgtgttcc tgtttccacc taagcctaag 540

gacacctga tgatctccag aacccccgag gtgacatgcg tgggtggtgga cgtgtctcag 600

gaggatcctg aggtgcagtt caattggtac gtggatggcg tggaggtgca caacccaag 660

acaaagcccc gggaggagca gtttaattct acctacagag tggtagagct gctgacagtg 720

ctgcaccagg attggctgaa tggcaaggag tataagtga aggtgagcaa caaggcctg 780

cctagctcca tcgagaagac catctccaag gccaagggcc agccaagaga gccccaggtg 840
 tacacctgc caccagcca gtgcgagatg acaaagaatc aggtgagcct gtctgtgcc 900
 gtgaagggt tctaccctag cgacatcgca gtggagtggg agtccaacgg acagccagag 960

aacaattata agaccacacc tccagtgcgt gactccgatg gctctttctt tctgggtgcc 1020
 cggctgaccg tggataagag cgggtggcag gagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg 1080
 cacgagggcc tgcacaacca ctatacacag aagtcctgt ctctgagcct gggcaag 1137

<210> 91

<211> 1192

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1192 aa TSP111_V1 "knob" chain

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala

115 120 125

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

130 135 140

Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu

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

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

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

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

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

405 410 415

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn

485 490 495

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655
Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe

660 665 670
Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser

675 680 685
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala

690 695 700
Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala

705 710 715 720
Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala

725 730 735
Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His

740 745 750
Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val

755 760 765
Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly

770 775 780
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser

785 790 795 800
Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly

805 810 815
Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn

820 825 830
Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu

835 840 845
Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys

850 855 860
Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu

865 870 875 880
Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu

885 890 895

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
900 905 910

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
915 920 925

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
930 935 940

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
945 950 955 960

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
965 970 975

Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser
980 985 990

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu
995 1000 1005

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu
1010 1015 1020

Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1025 1030 1035

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
1040 1045 1050

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
1055 1060 1065

Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
1070 1075 1080

Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
1085 1090 1095

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
1100 1105 1110

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
1115 1120 1125

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

1130 1135 1140
 Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
 1145 1150 1155
 Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu

1160 1165 1170
 Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
 1175 1180 1185
 Pro Arg Ser Glu

1190

<210> 92

<211> 3576

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> na of SEQ ID NO 91

<400> 92

gaggaggagc tgcaggcat ccagcccgat aagtctgtgc tggtaggcagc aggagagacc	60
gccacactga gatgcaccgc cacaagcctg atcccagtgg gaccaatcca gtggtttagg	120
ggagcaggac ctggaaggga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagggtg	180
accacagtgt ccgacctgac caagcggaac aatatggatt tttctatcag aatcggcaat	240
atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcagaaaggg cagcccagac	300
gatgtggagt ttaagtccgg agcaggaacc gagctgtctg tgagagcaaa gcctagcgcc	360
ccagtgggtg ccggaccagc agcaaggga accccacagc acacagtgtc cttcacctgt	420
gagtcccacg gcttttctcc acgcgatac aactgaagt ggttcaagaa cggcaatgag	480
ctgagcgact ttcagaccaa cgtggatccc gtggcgagt ctgtgagcta ctccatccac	540
tctacagcca agtggtgtgt gaccgggag gacgtgcaca gccaggtcat ctgcgaggtg	600
gcacacgtga ccctgcaggg cgatcctctg agaggcacag ccaatctgtc cgagaccatc	660
agggtgcccc ctacactgga ggtgaccag cagcccgatga gggcagagaa ccaagtgaat	720
gtgacatgtc aggtgcggaa gttctaccct cagagactgc agctgacctg gctggagaac	780
ggcaatgtga gccgcaccga gacagcctcc accgtgacag agaacaagga cggcacatat	840
aattggatga gctggctgtt ggtgaactgt tccgccaca gggacgatgt gaagctgacc	900
tgccaggtgg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgtcc	960

gcccacccta aggagcaggg ctctaacaca gccgccgaga ataccggcag caacgagaga 1020

aatatctacg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca 1080

tgccctccat gtccagcacc tgagtttgag ggaggaccta gcgtgttcct gtttccccct 1140

aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgcgt ggtggtggac 1200

gtgtctcagg aggatccga ggtgcagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 1260

aatgccaaga ccaagcctag ggaggagcag tttactcta cataccgcgt ggtgagcgtg 1320

ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggcaaggagt ataagttaa ggtgagcaat 1380

aagggcctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaaaggag 1440

cctcaggtgt gcacactgcc accctctcag gaggagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1500

tgggtgtctgg tgaagggtt ctaccaagc gacatcgccg tggagtggga gtccaatggc 1560

cagcccgaga acaattacaa gaccacacct ccagtgtcgg actctgatgg cagcttcttt 1620

ctgtattcta ggctgacagt ggataagagc cgctggcagg agggcaacgt gtttagctgt 1680

tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tataccaga agtctctgag cctgtccctg 1740

ggcaaggcg gcggcgagc cggcggagga ggatccgccg cctctcctag gctgaggag 1800

ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggactgtcgg acctgaggca gggaatgttc 1860

gcacagctgg tggcccagaa cgtgtctgtg atcgacggcc ctctgagctg gtactccgat 1920

ccaggactgg caggcgtgtc cctgacaggc ggactgtctt ataaggagga taccaaggag 1980

ctggtggtgg caaaggcagg cgtgtactac gtgttcttcc agctggagct gaggagagt 2040

gtggcaggag agggctctgg aagcgtgtcc ctggccctgc acctgcagcc actgcggagc 2100

gccgcaggag cagccgccct ggccctgacc gtggacctgc cacctgcatc tagcgaggca 2160

cggaattctg ccttcggctt tcagggcaga ctgctgcacc tgagcgccgg acagaggctg 2220

ggagtgcacc tgcacacaga ggcaagggca agacacgcat ggagctgac acaggagca 2280

accgtgtcgg gactgttccg cgtgaccct gagatcccag caggactgcc atctccacgg 2340

agcaggggcg gcggcggtc tggaggagga ggaagcgag gcggcggtc cgccgttct 2400

cccaggctgc gcgagggacc tgagctgtcc ccagacgac ctgccgccct gctggacctg 2460

agacagggaa tgtttgccca gctggtcgtc cagaacgtgc tgctgattga cggccccctg 2520

tcctggtatt ccgatctgg actggcaggc gtgagcctga caggcgccct gagctacaaa 2580

gaagacacta aagaactggt cgtcgccaaa gccggcgtgt actacgtgtt cttccaactg 2640

gagctgagga ggtcgtcgc cggcgaagga tccggcagcg tgtccctggc cctgcacctg 2700

caaccactga ggagcgccgc cggcgccgcc gccctggccc tgactgtgga cctgccacca 2760
 gcatcctctg aggcaaggaa ttccgccttc ggcttcagg gccggctgct gcacctgtct 2820
 gccggacaga gactgggctt ccacctgcat accgaagcca gagccaggca tgcctggcag 2880
 ctgacctagg gcgccacctg gctgggcctg ttcagagtga cccagaaat tccagcagga 2940
 ctgccttctc caaggagcga gggcgccggg ggctccggcg gaggaggctc tggcgccggc 3000
 ggctccggcg cctctccaag gctgcgcgag ggaccagagc tgtcccctga tgacctgcc 3060
 gggctgctgg acctgagaca aggcattgtt gccagctgg tcgcacaaaa cgtgctgtta 3120

attgacggcc cactgtcctg gtatagcgac cctggcctgg ccggcgtgtc tctgacaggc 3180
 ggactgagct acaaagaaga tactaaagaa ctggtcgtgg ccaaagctgg cgtgtactac 3240
 gtgttcttcc aattagaact gagaagggtc gtcgccggcg agggatccgg gagcgtgtcc 3300
 ctggccctgc acctgcaacc gctgcggagc gccgccggcg ctgccgccct ggccctgaca 3360
 gtggacctgc ctccagcaag ctccgaggca aggaatagcg ccttcggctt tcaaggccgc 3420
 ctgctgcacc tgtccgccgg acagcggctg ggcgtccacc tgcacaccga agccagagcc 3480
 cgccatgcct ggcagctgac tcagggcgct accgtgctgg gcctgttcgg cgtgacccca 3540

gagatccctg caggactgcc ctctcctcgg agcgag 3576

<210> 93

<400> 93

000

<210> 94

<400> 94

000

<210> 95

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> artificial signal peptide

<400> 95

Met Glu Ser Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Gly Val His Ala

20

<210> 96

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 96

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 97

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> may repeat 1-4 times

<400> 98

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 99

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 100
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker peptide sequence
 <400> 100
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 101
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker peptide sequence
 <220><221> REPEAT
 <222>

> (1)..(5)
 <223> may repeat 1-3 times
 <400> 101

Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5
 <210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker peptide sequence
 <220><221> REPEAT
 <222> (2)..(6)
 <223> repeat 2-5 times
 <400> 102

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala
 1 5

<210> 103
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 103

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5 10

<210> 104

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 104

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> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 105

Pro Ala Pro Ala Pro

1 5

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 106

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

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 107

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 107

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr

1 5 10

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 108

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe

1 5 10

<210> 109

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 109

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

50 55 60

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

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

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

 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 110
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker peptide sequence
 <400> 110
 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
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

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

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

 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 111
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker peptide sequence
 <400> 111
 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
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

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

 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210
 > 112
 <211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 112

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 113

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> linker peptide sequence

<400> 113

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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 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
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 114
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> linker peptide sequence
 <400>
 114
 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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val
 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
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 115

<211> 398

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-4, AA 22-419 (Q8N423-1 UniParc) AA SEQUENCE

<400> 115

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser

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

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

115 120 125
Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln

130 135 140
Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe

145 150 155 160
Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr

165 170 175
Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu

180 185 190
Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val

195 200 205
Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu Thr Leu Gln Cys

210 215 220
Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu

225 230 235 240
Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser

245 250 255
Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln

260 265 270
Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro

275 280 285
Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro

290 295 300
Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val

305 310 315 320
Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr

325 330 335
Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu

340 345 350
Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala

355 360 365

His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr

370

375

380

Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser

385

390

395

<210> 116

<211> 1194

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-4, AA 22-419 (Q8N423-1 UniParc) NA SEQUENCE

<400> 116

cagaccggca caatcccca gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60

ggctccccc tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta cggctgtat 120

agagagaaga agagcgctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc 180

cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240

tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccttggtgc tggatcatgac cggcgctat 300

ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgtga cctctggcgg cagagtgaca 360

ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420

gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cagcccggg gcagctccag agccatctt 480

tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggteccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540

aacagcccat acgtgtggtc tagccctct gatctgtggt agctgctggt gcctggcgtg 600

agcaagaagc catctctgag cgtgcagcca ggccctgtgg tggcacctgg cgagtctctg 660

accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag 720

agggatctga ggcagctgcc aggcagacag cctcaggcag gactgtcca ggcaaacttt 780

acactgggcc ccgtgagccg gagctacggc ggacagtacc gctgctatgg agcacacaat 840

ctgtctcttg agtgtttcgc cccagcgac ccctggaca tctgatcac cggccagatc 900

aggggcacac catcatcag cgtgcagcca ggaccaaccg tggcctccgg cgagaacgtg 960

acactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacacctttc tgcagacaaa ggcaggagca 1020

gcagacgcac ctctgaggct gcgtccatc cagagtacc caaagtatca ggccgagttt 1080

ccaatgagcc ccgtgacctc cgcccagca ggcacataca gatgctatgg cagcctgaac 1140

agcgaccctt acctgctgag ccacctttcc gagccactgg agctgggtgt gtcc 1194

<210> 117

<211> 198

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-2, AA 22-219 (Q8N423-1 UniParc) AA SEQUENCE

<400> 117

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp

35 40 45

Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile

50 55 60

Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr

65 70 75 80

Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln

130 135 140

Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe

145 150 155 160

Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Leu Glu Leu Leu Val Pro

195

<210> 118

<211> 594

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-2, AA 22-219 (Q8N423-1 UniParc) NA SEQUENCE

<400> 118

cagaccggca caatcccca gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60

ggctccccg tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta ccggctgtat 120

agagagaaga agagcgctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc 180

cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240

tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccttggtgc tggatcatgac cggcgctat 300

ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgtga cctctggcgg cagagtgaca 360

ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggcctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420

gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cagccccggg gcagctccag agccatcttc 480

tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggcccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540

aacagcccat acgtgtggtc tagccctct gatctgctgg agctgctggt gcct 594

<210> 119

<211> 148

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CD40L, AA 114-261 C194S (P29965 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 119

Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu

1 5 10 15

Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe

50 55 60

Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu

65 70 75 80

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

85

90

95

Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu

100

105

110

Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val

115

120

125

Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly

130

135

140

Leu Leu Lys Leu

145

<210> 120

<211> 444

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223

> CD40L, AA 114-261 C194S (P29965 Uniprot) NA SEQUENCE

<400> 120

cagaagggcg atcagaatcc tcagattgcc gcccacgtga tctctgaggc ctctagcaag	60
accacaagcg tgctgcagtg ggcagaaaaa gggtactata caatgtctaa caatctgggtg	120
accctggaga acggcaagca actgaccgtc aaaagacagg gcctgtacta catctacgt	180
caggtgacct tctgcagcaa tagggaggcc tcctctcagg caccttttat cgctctctg	240
agcctgaagt cccagggccg gttcgagaga atcctgttaa gggcagcaaa cactcacagc	300
tccgccaac catgtggaca gcagagcata cacctgggcg gcgtgttcga gctgcaaccg	360

ggagcctccg tgtttgtcaa tgtgaccgac ccattccagg tgtctcacgg caccggttc	420
accagcttcg gcctgctgaa gctg	444

<210> 121

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sc3xCD40L, AA 114-261 C194S (P29965 Uniprot) internal linker
3x(GGGGS) AA SEQUENCE

<400> 121

Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu

1

5

10

15

Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe

50 55 60

Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu

100 105 110

Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val

115 120 125

Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly

130 135 140

Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

145 150 155 160

Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val

165 170 175

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

180 185 190

Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly

195 200 205

Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln

210 215 220

Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser

260 265 270
Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe

275 280 285
Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr

290 295 300
Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
305 310 315 320

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala
325 330 335
Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln

340 345 350
Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu
355 360 365

Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile
370 375 380
Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala
385 390 395 400
Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg

405 410 415
Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly

420 425 430
Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala

435 440 445
Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr

450 455 460
Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
465 470

<210> 122

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CD40L full ECD, AA 47-261 (P29965 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 122

His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp

1 5 10 15

Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser

20 25 30

Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe

35 40 45

Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser

50 55 60

Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly

100 105 110

Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln

115 120 125

Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile

130 135 140

Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu

145 150 155 160

Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser

165 170 175

Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe

180 185 190

Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr

195 200 205

Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu

210 215

<210> 123

<211> 148

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CD40L, AA 114-261 NO MUTATION (P29965 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 123

Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu

1 5 10 15
Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr

20 25 30
Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu

35 40 45
Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe

50 55 60
Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu

65 70 75 80
Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala

85 90 95
Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu

100 105 110
Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val

115 120 125
Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly

130 135 140
Leu Leu Lys Leu

145

<210> 124

<211> 444

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> CD40L, AA 114-261 NO MUTATION (P29965 Uniprot) NA SEQUENCE

<400> 124

cagaagggcg atcagaatcc tcagattgcc gccacgtga tctctgaggc ctctagcaag 60

accacaagcg tgctgcagtg ggcagaaaaa gggtactata caatgtctaa caatctggtg 120

accctggaga acggcaagca actgaccgtc aaaagacagg gcctgtacta catctacgct 180
caggtgacct tctgcagcaa tagggaggcc tcctctcagg caccttttat cgcctctctg 240

tgctgaagt cccagggccg gttcgagaga atcctgttaa gggcagcaaa cactcacagc 300
tccgccaac catgtggaca gcagagcata cacctgggcg gcgtgttcga gctgcaaccg 360
ggagcctccg tgtttgtcaa tgtgaccgac ccatcccagg tgtctcacgg caccggttc 420
accagcttcg gcctgctgaa gctg 444

<210> 125

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10, AA 18-145 NO MUTATION (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 125

Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro Glu

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

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

<210> 126

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10, AA 18-145 NO MUTATION (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 126

```
gatggccggt ttggatcag agtgcaggag tccgtgatgg tgcctgaggg cctgtgcatc      60
agcgtgccat gctccttctc ttaccccaga caggactgga ccggctctac accgcctac      120
ggctattggg ttaaggccgt gaccgagaca acaaagggcg cccctgtggc caciaaccac      180
cagagc                                           186
```

<210> 127

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10, AA 18-145 plus C36S (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 127

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

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

<210> 128

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10, AA 18-145 plus C36S (Q96LC7-1 Uniprot) NA SEQUENCE

<400> 128

```

gatggccggt tttggatcag agtgcaggag tccgtgatgg tgcctgaggg cctgtctatc      60
agcgtgccat gctccttctc ttaccccaga caggactgga ccggtcttac acccgcttac      120
ggctattggt ttaaggccgt gaccgagaca acaaagggcg cccctgtggc caciaaccac      180
cagagcagag aggtggagat gtccacccgg ggcagattcc agctgacagg cgaccccgcc      240
aagggaatt gtagcctggt catcaggac gccagatgc aggatgagtc tcagtacttc      300

tttaggtgg agcgccgcag ctacgtgcgc tataacttta tgaatgatgg cttctttctg      360
aaggtgaccg ccctgacaca gaag                                           384

```

<210> 129

<211> 534

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10 full ECD, AA 17-550 (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 129

```

Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro
1           5           10           15
Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln
           20           25           30

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

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

```

115	120	125	
Lys Pro Asp Val Tyr Ile Pro Glu Thr Leu Glu Pro Gly Gln Pro Val			
130	135	140	
Thr Val Ile Cys Val Phe Asn Trp Ala Phe Glu Glu Cys Pro Pro Pro			
145	150	155	160
Ser Phe Ser Trp Thr Gly Ala Ala Leu Ser Ser Gln Gly Thr Lys Pro			
165	170	175	
Thr Thr Ser His Phe Ser Val Leu Ser Phe Thr Pro Arg Pro Gln Asp			
180	185	190	
His Asn Thr Asp Leu Thr Cys His Val Asp Phe Ser Arg Lys Gly Val			
195	200	205	
Ser Ala Gln Arg Thr Val Arg Leu Arg Val Ala Tyr Ala Pro Arg Asp			
210	215	220	
Leu Val Ile Ser Ile Ser Arg Asp Asn Thr Pro Ala Leu Glu Pro Gln			
225	230	235	240
Pro Gln Gly Asn Val Pro Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Gly Gln Phe Leu			
245	250	255	
Arg Leu Leu Cys Ala Ala Asp Ser Gln Pro Pro Ala Thr Leu Ser Trp			
260	265	270	
Val Leu Gln Asn Arg Val Leu Ser Ser Ser His Pro Trp Gly Pro Arg			
275	280	285	
Pro Leu Gly Leu Glu Leu Pro Gly Val Lys Ala Gly Asp Ser Gly Arg			
290	295	300	
Tyr Thr Cys Arg Ala Glu Asn Arg Leu Gly Ser Gln Gln Arg Ala Leu			
305	310	315	320
Asp Leu Ser Val Gln Tyr Pro Pro Glu Asn Leu Arg Val Met Val Ser			
325	330	335	
Gln Ala Asn Arg Thr Val Leu Glu Asn Leu Gly Asn Gly Thr Ser Leu			
340	345	350	
Pro Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Cys Leu Val Cys Val Thr His Ser			
355	360	365	

Ser Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Gln Arg Gly Gln Val Leu Ser
 370 375 380
 Pro Ser Gln Pro Ser Asp Pro Gly Val Leu Glu Leu Pro Arg Val Gln
 385 390 395 400
 Val Glu His Glu Gly Glu Phe Thr Cys His Ala Arg His Pro Leu Gly
 405 410 415

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

Ser Ser Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ser Ser Leu Ser Leu His Gly Gly
 485 490 495
 Leu Ser Ser Gly Leu Arg Leu Arg Cys Glu Ala Trp Asn Val His Gly
 500 505 510
 Ala Gln Ser Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ile
 515 520 525
 Ser Thr Ala Phe Ser Asn
 530

<210> 130

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, AA 22-134 NO MUTATIONS (Q495A1 Uniprot ID) AA SEQUENCE

<400> 130

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val
 20 25 30

Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn
35 40 45

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60
Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95

Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His

100 105 110

<210> 131

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, ECD AA 22-141 NO MUTATIONS (Q495A1 Uniprot ID) NA
SEQUENCE

<400> 131

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcatc	60
ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag	120
gaccagctgc tggccatctg caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctcctttaag	180
gatagggtgg cacctggacc aggcctgggc ctgaccctgc agagcctgac cgtgaatgac	240
acagcgcagt acttctgtat ctaccacaca taccctgatg gcacctatac aggcagaatc	300
tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcac	336

<210> 132

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, AA 22-134 plus I42A C69S (Q495A1 Uniprot ID) AA SEQUENCE

<400> 132

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

1 5 10 15

Gly Ser Ile Ala Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val

20 25 30
Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Ser Asn
35 40 45

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

<210> 133

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT, AA 22-134 plus I42A C69S (Q495A1 Uniprot ID) NA SEQUENCE

<400> 133

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc 60
ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120
gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctcctttaag 180
gatagggtgg cacctggacc aggcctgggc ctgaccctgc agagcctgac cgtgaatgac 240
acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tctctgatg gcacctatac aggcagaatc 300

tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcac 336

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LINKER amino acid sequence

<400> 134

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 135

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LINKER amino acid sequence

<400> 135

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LINKER amino acid sequence

<400> 136

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LINKER amino acid sequence

<400> 137

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 138

<211> 642

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-4 Fc IgG4 Knob: in TSP 214 and 215 217 218 221 and
222 AA SEQUENCE

<400> 138

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser

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

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

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

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

 Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser
 245 250 255

Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln
260 265 270

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro
275 280 285

Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro
290 295 300

Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
305 310 315 320

Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
325 330 335

Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu
340 345 350

Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
355 360 365

His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
370 375 380

Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys
405 410 415

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
420 425 430

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
435 440 445

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
450 455 460

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
465 470 475 480

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
485 490 495

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

500 505 510
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 515 520 525
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 530 535 540
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 545 550 555 560

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 565 570 575
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 595 600 605
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 610 615 620

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 625 630 635 640
 Gly Lys

<210> 139

<211> 1926

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-4 Fc IgG4 Knob: in TSP 214 and 215 217 218 221 and
 222 NA SEQUENCE

<400> 139

cagaccggca caatcccca gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60
 ggctccccg tgacactgtc ttgccaggc agcctggagg cacaggagta cggctgtat 120
 agagagaaga agagcgctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc 180

 cagtttcaca tcctttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
 tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccctggtgc tggcatgac cggcgcctat 300
 ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgggtga cctctggcgg cagagtgaca 360

ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420

gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cagccccggg gcagctccag agccatcttc 480

tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggteccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540

aacagcccat acgtgtggtc tagccctctt gatctgctgg agctgctggt gcctggcgtg 600

agcaagaagc catctctgag cgtgcagcca ggcctgtggt tggcacctgg cgagtctctg 660

accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag 720

agggatctga ggcagctgcc aggcagacag cctcaggcag gactgtccca ggcaaacttt 780

acactgggcc ccgtgagccg gagctacggc ggacagtacc gctgctatgg agcacacaat 840

ctgtcctctg agtgtttctgc cccagcgac cccctggaca tcctgatcac cggccagatc 900

aggggcacac caitcatcag cgtgcagcca ggaccaaccg tggcctccgg cgagaacgtg 960

acactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacacctttc tgcagacaaa ggcaggagca 1020

gcagacgcac ctctgaggct gcgctccatc cagcagttacc caaagtatca ggccgagttt 1080

ccaatgagcc ccgtgacctc cgcccacgca ggcacatata gatgctatgg cagcctgaac 1140

agcgaccctt acctgctgag ccacctttcc gagccactgg agctggtggt gtccggcggc 1200

ggcggctctg gcggaggagg cagcggagga ggaggatccg agtctaagta cggaccacca 1260

tgcctccat gtctgcacc agagttcgag ggaggacct ccgtgttcct gtttccacct 1320

aagcctaagg acacctgat gatctccaga acccccagg tgacatgcgt ggtggtggac 1380

gtgtctcagg aggatcctga ggtgcagttc aattggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 1440

aacccaaga caaagccccg ggaggagcag tttaatagca cctacagagt ggtgtccgtg 1500

ctgacagtgc tgcaccagga ttggctgaat ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaac 1560

aagggcctgc ctagctccat cgagaagacc atctccaagg ccaagggcca gccaagagag 1620

ccacagggtg gcacctgcc accaagccag gaggagatga caaagaatca ggtgtccctg 1680

tgggtgtctgg tgaagggtt ctacctttcc gacatcgccg tggagtggga gtctaacggc 1740

cagccagaga acaattacaa gaccacacct ccagtgtggt actctgatgg cagcttcttt 1800

ctgtattctc ggtgacctg ggataagagc agatggcagg agggcaacgt gttcagctgc 1860

tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tatacacaga agtctctgag cctgtccctg 1920

ggcaag 1926

<210> 140

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-2 Fc IgG4 Knob: in TSP 214 V1 and 215 V1 AA SEQUENCE

<400> 140

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp

35 40 45

Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile

50 55 60

Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr

65 70 75 80

Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln

130 135 140

Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe

145 150 155 160

Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys

210 215 220

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

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

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

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

 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

 <210> 141
 <211> 1326
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> LILRB2 D1-2 Fc IgG4 Knob: in TSP 214 V1 and 215 V1 NA SEQUENCE

<400> 141

cagaccggca caatcccaa gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag	60
ggctcccccg tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta ccggctgtat	120
agagagaaga agagcgcctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc	180
cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat	240
tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccctggtgc tggatcatgac cggcgcctat	300
ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgggtga cctctggcgg cagagtgaca	360
ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag	420
gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cacgccgggg gcagctccag agccatcttc	480
tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggcccaca ggtgctacgg ctatgacctg	540
aacagcccat acgtgtggtc tagccctctt gatctgctgg agctgctggt gcctggcggc	600
ggcggctctg gcggaggagg cagcggagga ggaggatccg agtctaagta cggaccacca	660
tgccctccat gtccctgacc agagtctgag ggaggacat ccgtgttctt gtttccacct	720
aagcctaagg acacctgat gatctccaga acccccagg tgacatgcgt ggtggtggac	780
gtgtctcagg aggatctga ggtgcagttc aattggtacg tggatggcgt ggaggtcac	840
aacgccaaga caaagccccg ggaggagcag tttaatagca cctacagagt ggtgtccgtg	900
ctgacagtgc tgcaccagga ttggctgaat ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaac	960
aagggcctgc ctagctccat cgagaagacc atctccaagg ccaagggcca gccaagagag	1020
ccacagggtg gcacctgcc accaagccag gaggagatga caaagaatca ggtgtccctg	1080
tgggtgtctgg tgaagggtt ctaccttcc gacatcgccg tggagtggga gtctaacggc	1140
cagccagaga acaattaca gaccacacct ccagtgtggt actctgatgg cagcttcttt	1200
ctgtattctc ggetgacctg ggataagagc agatggcagg agggcaacgt gttcagctgc	1260
tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tatacacaga agtctctgag cctgtccctg	1320
ggcaag	1326

<210> 142

<211> 1252

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-4 -Fc IgG4 Hole-sc3x41BBL: in DSP 214 AA SEQUENCE

<400> 142

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser

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

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

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

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

 Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser
 245 250 255

Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln
260 265 270

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro
275 280 285

Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro
290 295 300

Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
305 310 315 320

Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
325 330 335

Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu
340 345 350

Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
355 360 365

His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
370 375 380

Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys
405 410 415

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
420 425 430

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
435 440 445

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
450 455 460

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
465 470 475 480

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
485 490 495

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

500 505 510
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 515 520 525
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 530 535 540
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 545 550 555 560

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 565 570 575
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp
 595 600 605
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 610 615 620

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 625 630 635 640
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro
 645 650 655
 Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
 660 665 670
 Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
 675 680 685

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
 690 695 700
 Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
 705 710 715 720
 Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
 725 730 735
 Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
 740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

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

980 985 990

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

995	1000	1005
Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln		
1010	1015	1020
Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro		
1025	1030	1035
Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
1040	1045	1050
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu		
1055	1060	1065
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu		
1070	1075	1080
Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val		
1085	1090	1095
Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu		
1100	1105	1110
Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr		
1115	1120	1125
Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe		
1130	1135	1140
Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser		
1145	1150	1155
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly		
1160	1165	1170
Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser		
1175	1180	1185
Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His		
1190	1195	1200
Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala		
1205	1210	1215
Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu		
1220	1225	1230

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

1235

1240

1245

Pro Arg Ser Glu

1250

<210> 143

<211> 3756

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-4 -Fc IgG4 Hole-sc3x41BBL: in DSP 214 AA SEQUENCE NA
SEQUENCE

<400> 143

cagaccggca caatcccaaa gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag	60
ggctcccccg tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta ccggctgtat	120
agagagaaga agagcgctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc	180
cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat	240
tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccctggtgc tggatcatgac cggcgcctat	300
ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgtga cctctggcgg cagagtgaca	360
ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag	420
gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cacgccggg gcagctccag agccatcttc	480
tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tgggccaca ggtgctacgg ctatgacctg	540
aacagcccat acgtgtggtc tagccctct gatctgctgg agctgctggt gcctggcgtg	600
agcaagaagc catctctgag cgtgcagcca ggcctgtgg tggcacctgg cgagtctctg	660
accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag	720
agggatctga ggcagctgcc aggcagacag cctcaggcag gactgtcca ggcaacttt	780
acactgggcc ccgtgagccg gagctacggc ggacagtacc gctgctatgg agcacacaat	840
ctgtcctctg agtgttctgc cccagcgac cccctggaca tcctgatcac cggccagatc	900
aggggacac cattcatcag cgtgcagcca ggaccaaccg tggcctccgg cgagaacgtg	960
acactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacaccttc tgctgacaaa ggcaggagca	1020
gcagacgcac ctctgaggct gcgctccatc cacgagtacc caaagtatca ggccgagttt	1080
ccaatgagcc ccgtgacctc cgcccagca ggcacataca gatgctatgg cagcctgaac	1140
agcgaccctt acctgctgag ccaccttcc gagccactgg agctgggtgt gtccggcggc	1200

ggcggctctg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca	1260
tgccctccat gtccagcacc tgagtttag ggaggacctt ccgtgttcct gtttccccct	1320
aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgctg ggtggtggac	1380
gtgtctcagg aggatccga ggtgcagttc aactggtacg tggatggcgt ggagggtcac	1440
aatgccaaga ccaagcctag ggaggagcag tttaactcca cataccgcgt ggtgtctgtg	1500
ctgaccgtgc tgcaccagga ttggtgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat	1560
aaggggctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaaaggag	1620
cctcagtggt atacactgcc acccagccag tgcgagatga ccaagaacca ggtgagcctg	1680
tcctgtgccg tgaagggtt ctacccatct gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc	1740
cagcccagaa acaattataa gaccacacct ccagtgtctg actccgatgg ctctttcttt	1800
ctggtgtcca ggctgacagt ggataagtct cgttggcagg agggcaacgt gttttcttgt	1860
agcgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacaccaga agtccctgtc tctgagcctg	1920
ggcaagggcg gcggcggtc cggaggagga ggaagcgccg cctcccctag gctgcgcgag	1980
ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggactgtctg acctgaggca gggaatgttc	2040
gcacagctgg tggcccagaa cgtgtgtctg atcgacggcc ctctgtcttg gtacagcgat	2100
ccaggactgg caggcgtgag cctgacaggc ggactgtcct ataaggagga taccaaggag	2160
ctggtggtgg caaaggcagg cgtgtactac gtgttcttcc agctggagct gaggagagtg	2220
gtggcaggag agggatccg atctgtgagc ctggccctgc acctgcagcc actgcggagc	2280
gccgcaggag cagccgccct ggccctgacc gtggacctgc cacctgcatc tagcgaggca	2340
cggaattctg ccttcggctt tcagggcaga ctgctgcacc tgagcgccgg acagaggctg	2400
ggagtgcacc tgcacacaga ggcaagggca agacacgcat ggagctgac acaggagca	2460
acctgtctgg gactgttccg cgtgacctt gagatccag caggactgcc atccccccg	2520
tctgaggcg gcggcggtc cggaggagga ggatctggcg gcggcggcag gccgcctcc	2580
cccagctgc gcgagggacc tgagctgtcc ccagacgac ctgccgcct gctggacctg	2640
agacagggaa tgtttgccca gctggtcgt cagaacgtgc tgcgtattga cggccccctg	2700
tcctggtata gcgatcctgg actggcaggc gtgtctctga caggcggact gaggtaaaa	2760
gaagacacta aagaactggt cgtcgccaaa gccggcgtgt actacgtgtt ctccaactg	2820
gagctgagga gggctgtgc cggcgaaggc agcggctctg tgagcctggc cctgcacctg	2880
caaccactga ggagcgccgc cggcgccgcc gccttgccc tgactgtgga cctgccacca	2940
gcacctctg aggcaaggaa ttccgccttc ggtttccagg gccggctgct gcacctgtct	3000
gccggacaga gactgggcgt ccacctgcat accgaagcca gagccaggca tgcctggcag	3060

ctgaccagg gcgccacct gctgggcctg ttcagagtga cccagaaat tccagcagga 3120
ctgccttccc caaggtctga gggaggagga ggaagtggcg gaggaggatc cggaggggga 3180

gggagcgccg cctccccaag actgagagag ggaccagagc tgtccctga tgacctgcc 3240
gggctgctgg acctgagaca aggcattgtt gccagctgg tcgcacaaaa cgtgctgtta 3300
attgacggcc cactgtcctg gtattccgac cctggcctgg ccggcgtgtc cctgacaggc 3360
ggcctgtctt acaaagaaga caaaaagaa ctggtcgtcg ctaaagctgg cgtgtactac 3420
gtgttcttcc aattagaact gagaagggc gtcgccggcg agggcagcgg gtctgtgagc 3480
ctggccctgc acctgaacc gctgcggagc gccgccggcg ctgccgcct ggccctgaca 3540
gtggacctgc ctccagcaag ctccgaggca aggaatagcg ccttcggctt tcaaggccgc 3600

ctgtgcacc tgtccgccg acagcggctg ggctccacc tgcacaccga agccagagcc 3660
cgccatgcct ggcagctgac tcagggcgt accgtgctgg gcctgttccg cgtgacccca 3720
gagatccctg ccggcctgcc ctccctcgg tctgag 3756

<210> 144

<211> 1052

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-2- Fc IgG4 Hole- sc3x41BBL: in DSP 214 V1 AA SEQUENCE

<400> 144

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp

35 40 45

Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile

50 55 60

Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr

65 70 75 80

Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met

85 90 95

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

100	105	110
Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys Glu Ser Gln Val Ala		
115	120	125
Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln		
130	135	140
Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe		
145	150	155
Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr		
165	170	175
Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu		
180	185	190
Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
195	200	205
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
225	230	235
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
245	250	255
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp		
260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
275	280	285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
305	310	315
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys Glu		
340	345	350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu
450 455 460

Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe
465 470 475 480

Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser
485 490 495

Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu
500 505 510

Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val
515 520 525

Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser
545 550 555 560

Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala
565 570 575

Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu
580 585 590

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala
850 855 860

Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala
865 870 875 880

Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln
885 890 895

Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly
900 905 910

Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
915 920 925

Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln
930 935 940

Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser
945 950 955 960

Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala
965 970 975

Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn
980 985 990

Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
995 1000 1005

Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
1010 1015 1020

Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
1025 1030 1035

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
1040 1045 1050

<210> 145

<211> 3156

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-2- Fc IgG4 Hole- sc3x41BBL: in DSP 214 V1 NA SEQUENCE

<400> 145

cagaccggca caatcccca gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag	60
ggctccccg tgacactgtc ttgccaggc agcctggagg cacaggagta cgggtgtat	120
agagagaaga agagcgctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc	180
cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat	240
tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccctggtgc tggatcatgac cggcgctat	300
ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtggatga cctctggcgg cagagtgaca	360
ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag	420
gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cacgccggg gcagctccag agccatcttc	480
tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggcccaca ggtgctacgg ctatgacctg	540
aacagcccat acgtgtggc tagccctct gatctgctgg agctgctggt gcctggcggc	600
ggcggctctg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca	660
tgccctccat gtccagcacc tgagtttgag ggaggacctt ccgtgttctt gtttcccct	720
aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgctt ggtggtggac	780
gtgtctcagg aggatccga ggtgcagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac	840
aatgccaaga ccaagcctag ggaggagcag tttaactcca cataccgctt ggtgtctgtg	900
ctgacctgac tgcaccagga ttggctgaac ggcaaggagt ataagttaa ggtgagcaat	960
aagggcctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaaaggag	1020
cctcaggtgt atacactgcc acccagccag tgcgagatga ccaagaacca ggtgagcctg	1080
tcctgtgccg tgaagggtt ctaccatct gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc	1140
cagcccagga acaattataa gaccacacct ccagtgtctg actccgatgg ctctttcttt	1200
ctggtgtcca ggtgtacagt ggataagtct cgctggcagg agggcaacgt gttttcttgt	1260
agcgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacaccaga agtccctgtc tctgagcctg	1320
ggcaaggcg gcggcggtc cggaggagga ggaagcgcc cctcccctag gctgcgcgag	1380
ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggactgtctg acctgaggca gggaatgttc	1440
gcacagctgg tggcccagaa cgtgtgtctg atcgacggcc ctctgtcttg gtacagcgat	1500
ccaggactgg caggcgtgag cctgacaggc ggactgtcct ataaggagga taccaaggag	1560
ctggtgtgga caaaggcagg cgtgtactac gtgttcttcc agctggagct gaggagagt	1620
gtggcaggag agggatccg atctgtgagc ctggccctgc acctgcagcc actgcggagc	1680
gccgcaggag cagccgcctt ggccctgacc gtggacctgc cactgcatc tagcgaggca	1740
cggaaattctg ctttcggtt tcagggcaga ctgtgcacc tgagcgccg acagaggctg	1800

ggagtgcacc tgcacacaga ggcaagggca agacacgcat ggcagctgac acagggagca 1860

accgtgctgg gactgttccg cgtgaccctt gagatcccag caggactgcc atccccccgg 1920

tctgagggcg gcggcgggtc cggaggagga ggatctggcg gcggcggcag cggccctcc 1980

cccaggctgc gcgagggacc tgagctgtcc ccagacgac ctcgccgcct gctggacctg 2040

agacagggaa tgtttgccca gctggtcgtc cagaacgtgc tgcgtattga cggccccctg 2100

tcctggtata gcgacccctg actggcaggc gtgtctctga caggcggact gagttacaaa 2160

gaagacacta aagaactggt cgtcgccaaa gccggcgtgt actacgtgtt cttccaactg 2220

gagctgagga gggtcgtcgc cggcgaaggc agcggctctg tgagcctggc cctgcacctg 2280

caaccactga ggagcgcgcg cggcgccgcc gccctggccc tgactgtgga cctgccacca 2340

gcacccctctg aggcgaaggaa ttccgccttc ggcttcagg gccggctgct gcacctgtct 2400

gccggacaga gactgggcgt ccacctgcat accgaagcca gagccaggca tgcctggcag 2460

ctgaccagg gcgccacctg gctgggcctt ttccagagta cccagaaat tccagcagga 2520

ctgccttccc caaggtctga gggaggagga ggaagtggcg gaggaggatc cggaggggga 2580

gggagcgccg cctccccaaag actgagagag ggaccagagc tgtccctga tgacctgcc 2640

gggctgctgg acctgagaca aggcattgtt gccagctgg tcgcacaaaa cgtgctgtta 2700

attgacggcc cactgtcctg gtattccgac cctggcctgg ccggcgtgtc cctgacaggc 2760

ggcctgtctt acaaagaaga caaaaagaa ctggtcgtcg ctaaagctgg cgtgtactac 2820

gtgttcttcc aattagaact gagaagggtc gtcgccggcg agggcagcgg gtctgtgagc 2880

ctggccctgc acctgcaacc gctgcggagc gccgccggcg ctgccgcctt ggccctgaca 2940

gtggacctgc ctccagcaag ctccaggga aggaatagcg ccttcggctt tcaaggccgc 3000

ctgctgcacc tgtccgccg acagcggctg ggcgtccacc tgcacaccga agccagagcc 3060

cgccatgcct ggcagctgac tcaggcgcct accgtgctgg gcctgttccg cgtgacccca 3120

gagatccctg ccggcctgcc ctcccctcgg tctgag 3156

<210> 146

<211> 1076

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> SIRPa -Fc Hole IgG4- sc3xCD40L: in TSP 112 and 217 AA SEQUENCE

<400> 146

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

1

5

10

15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala
115 120 125
Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
130 135 140
Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu
145 150 155 160
Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser
165 170 175
Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val
180 185 190
His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp
195 200 205
Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro
210 215 220
Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
225 230 235 240
Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr
245 250 255
Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val

260 265 270
 Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val
 275 280 285
 Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu

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

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

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

485 490 495
 Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 500 505 510

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
515 520 525

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg
530 535 540

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys

545 550 555 560

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
565 570 575

Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn
595 600 605

Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr

610 615 620

Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn
625 630 635 640

Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly
645 650 655

Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala
660 665 670

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

675 680 685

Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala
690 695 700

Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu
705 710 715 720

Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val
725 730 735

Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly

740 745 750

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly

755 760 765
 Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
 770 775 780
 Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
 785 790 795 800
 Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys

 805 810 815
 Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
 820 825 830
 Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys
 835 840 845
 Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
 850 855 860
 Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val

 865 870 875 880
 Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
 885 890 895
 Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
 900 905 910
 Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 915 920 925
 Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu

 930 935 940
 Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr
 945 950 955 960
 Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu
 965 970 975
 Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe
 980 985 990
 Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu

 995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile

1025 1030 1035

His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe

1040 1045 1050

Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe

1055 1060 1065

Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu

1070 1075

<210> 147

<211> 3228

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> SIRPa -Fc Hole IgG4- sc3xCD40L: in TSP 112 and 217 NA SEQUENCE

<400> 147

gaggaggagc tgcaggatcat ccagcctgat aagtctgtgc tgggtggcagc aggagagaca 60
gccacactgc ggtgcaccgc cacaagcctg atcccagtgg gcccacatca gtgggtcagg 120
ggagcaggac ctggaaggga gctgatctac aaccagaagg agggccactt tccaagagtg 180

accacagtgt ccgacctgac caagcgggaac aatatggatt tctctatcag aatcggcaat 240
atcacacctg ccgagccgg cactactat tgcgtgaagt tcaggaaggg ctcccagac 300
gatgtggagt ttaagagcgg agcaggcacc gagctgtccg tgaggggcaa gccttctgcc 360
ccagtggatga gcggaccagc agccagagcc accccacagc acacagttag ctccacctgt 420
gagagccacg gcttttcccc ccgggacatc accctgaagt ggttcaagaa cggcaatgag 480
ctgtccgact ttcagaccaa cgtggacccc gtgggagagt ctgtgagcta ttccatccac 540
tctacagcca aggtgggtgct gaccgcgag gacgtgcaca gccaggatcat ctgcgaggtg 600

gcacacgtga ccttgcaggg cgatcccctg aggggcacag ccaatctgag cgagacaatc 660
agagtcccc ctacactgga ggtgaccag cagcccgtgc gcgagagaa ccaagtgaat 720
gtgacatgtc aggtgcggaa gttctacct cagagactgc agctgacctg gctggagaac 780
ggcaactgta gccggaccga gacagccagc accgtgacag agaacaagga cggcacatat 840
aattggatgt cttagctgct ggtgaactg agcgcccaca gggacgatgt gaagctgacc 900
tgccaggtgg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgagc 960

gcccacccta aggagcaggg ctccaacaca gccgccgaga ataccggcag caacgagcgg 1020

aatatctacg gaggaggagg ctccggagga ggaggctccg agtctaagta tggaccacca 1080

tgccctccat gtccagcacc tgagtctgag ggaggaccta gcgtgttcct gtttccccct 1140

aagccaaagg acacctgat gatctccaga acaccagagg tgacctgcgt ggtggtggac 1200

gtgtctcagg aggacccga ggtgcagttt aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 1260

aatgccaaga ccaagccccg ggaggagcag ttcaattcca cataccgcgt ggtgtctgtg 1320

ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt ataagttaa ggtgagcaat 1380

aagggcctgc caagctccat cgagaaaacc atcagcaagg caaagggaca gccccgggag 1440

cctcaggtgt atacactgcc accctcccag tgcgagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1500

tcctgtgccg tgaagggtt ttacctatct gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc 1560

cagccccgaga acaattataa gaccacacct ccagtgtctg actccgatgg ctctttcttt 1620

ctggtgtcca ggctgacagt ggataagtct cgctggcagg agggcaacgt gttctcttgt 1680

agcgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacacccaaa agtcctgtc tctgagcctg 1740

ggcaaggcg gcgccggctc cgccggagga ggtcttgccg gcggcggcag cggaggcggc 1800

ggctcccaga agggcgatca gaacccccag atcgccgccc acgtgatctc cgaggcctct 1860

agcaagacca catctgtgct gcagtgggcc gagaagggt actatacaat gagcaacaat 1920

ctggtgacct tggagaacgg caagcagctg acagtgaagc ggcagggcct gtactatctc 1980

tatgccagg tgaccttctg ctccaataga gaggcctct ctcaggcccc ctttatcgcc 2040

tccctgtctc tgaagtctc tggccggtt gagagaatcc tgctgagggc agcaaacaca 2100

cacagctccg ccaagccctg tggccagcag tctatccacc tggcgccgt gttcgagctg 2160

cagccaggag ccagcgtgtt tgtgaatgt accgacccta gccaggtgtc ccacggcacc 2220

ggcttcacca gcttcggcct gctgaagctg ggcggcggcg gctctggcgg aggaggcagc 2280

ggaggaggag gctcccagaa aggcgatcag aacctcaga ttgtgccca cgtgatcagc 2340

gaggcctcta gcaagaccac atccgtgtg cagtgggctg aaaaaggata ctatacaatg 2400

tctaataatc tggtagacct ggagaatggc aagcagctga ccgtcaagag acagggcctg 2460

tattatatct acgccagggt gaccttttgc agcaatcgcg aggcctctc tcaggctcca 2520

ttcatcgcca gcctgtccct gaagtccca ggacagtttg agcgatcct gctgagagcc 2580

gccaatacc acagctccg caagccatgt ggacagcagt ccattcacct gggcgccgtg 2640

ttcgagctgc aaccaggagc cagcgtgtt gtgaatgtga ccgaccctc tcaggtagc 2700

cacggcaccg gcttcaccag cttcggcctg ctgaagctgg gtggaggagg ctctggcggg 2760
 ggcggcagcg gcggaggagg ctcccagaag ggcgatcaga atcctcagat tgccgcccac 2820
 gtgatctctg aggcctctag caagaccaca agcgtgctgc agtgggcaga aaaagggtac 2880
 tatacaatgt ctaacaatct ggtgaccctg gagaacggca agcaactgac cgtcaaaaga 2940
 cagggcctgt actacatcta cgctcaggtg accttctgca gcaataggga ggcctcctct 3000
 caggcacctt ttatgcctc tctgagcctg aagtcctcag gccggttcga gagaatcctg 3060
 ttaagggcag caaacactca cagctccgcc aaacatgtg gacagcagag catacacctg 3120

ggcggcgtgt tcgagctgca accgggagcc tccgtgtttg tcaatgtgac cgacccatcc 3180
 caggtgtctc acggcacggg cttcaccagc ttcggcctgc tgaagctg 3228

<210> 148

<211> 1136

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2-Fc -Fc Hole IgG4- sc3xCD40L: in TSP 218 AA SEQUENCE

<400> 148

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp

35 40 45

Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile

50 55 60

Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr

65 70 75 80

Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln

130 135 140
 Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe
 145 150 155 160

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

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

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

 Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
 355 360 365
 His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
 370 375 380

Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys
 405 410 415

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 485 490 495
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 500 505 510
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 515 520 525
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 530 535 540

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 545 550 555 560
 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 565 570 575
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp
 595 600 605

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 610 615 620
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu

625 630 635 640
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 645 650 655
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala
 660 665 670

 Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln
 675 680 685
 Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu
 690 695 700
 Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile
 705 710 715 720
 Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala
 725 730 735

 Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg
 740 745 750
 Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly
 755 760 765
 Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala
 770 775 780
 Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr
 785 790 795 800

 Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 805 810 815
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro
 820 825 830
 Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser
 835 840 845
 Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu
 850 855 860

 Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu
 865 870 875 880

Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln

930 935 940

Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser

945 950 955 960

His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly

965 970 975

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp

980 985 990

Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys

995 1000 1005

Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys

1040 1045 1050

Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile

1085 1090 1095

His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe

1100 1105 1110

Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe

1115	1120	1125	
Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu			
1130	1135		
<210> 149			
<211> 3408			
<212> DNA			
<213> Artificial sequence			
<220><223> LILRB2-Fc -Fc Hole IgG4- sc3xCD40L: in TSP 218 NA SEQUENCE			
<400> 149			
cagaccggca caatccctaa gccaaccttg tgggccgagc ctgatagcgt gatcacccag	60		
ggctccccag tgacactgag ctgccagggc tccctggagg cacaggagta cggctgtat	120		
agagagaaga agtctgccag ctggatcacc cggatcagac ctgagctggt gaagaacggc	180		
cagttccaca tcccatctat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat	240		
agccgggcca gatggtctga gctgagcgac cccttggtgc tggatcatgac cggagcctat	300		
cccaagccta cactgtctgc ccagccaagc ccagtgggtga cctctggcgg cagagtigaca	360		
ctgcagtgtg agagccaggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag	420		
gagcaccac agtgtctgaa tagccagcca cagccaggg gcagctcccg cgccatcttc	480		
agcgtgggac ccgtgagccc aaaccggaga tggctccacc gctgctacgg ctatgacctg	540		
aacagccctt acgtgtggtc tagcccaagc gatctgctgg agctgctggt gcccggcgtg	600		
agcaagaagc ctccctgtc tgtgcagcct ggaccagtgg tggcacctgg agagtcctg	660		
accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggtttg tgctgtataa ggaggagag	720		
agggatctga ggcagctgcc aggcagacag ccacaggccg gcctgtccca ggccaacttc	780		
accctgggcc cagtgagccg gtcctatggc ggccagtaca gatgctatgg cgccacaat	840		
ctgtcctctg agtgttccgc cccaagcgac cccttgaca tcctgatcac cggccagatc	900		
aggggcacac cttttatcag cgtgcagcca ggacctaccg tggcctccgg cgagaacgtg	960		
acactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacacctttc tgctgacaaa ggcaggagca	1020		
gcagacgcac cactgaggct gcgtccatc cacgagtacc ccaagtatca ggccgagttc	1080		
ccaatgtccc cagtgcctc tgcccacgca ggcacataca ggtgttatgg cagcctgaac	1140		
agcgaccctt acctgctgtc tcaccctagc gagccactgg agctgggtgt gtctggagga	1200		
ggaggcagcg gcggaggagg ctccggaggc ggcggctctg agagcaagta tggaccacct	1260		
tgcccacat gtccagcacc agagttcgag ggaggaccaa gcgtgttcct gtttctcca	1320		

aagcctaagg acaccctgat gatctccgc acccctgagg tgacatgcgt ggtggtggac 1380

gtgtctcagg aggaccccg ggtgcagttt aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 1440

aatgccaaga ccaagccccg ggaggagcag ttcaactcta cctacagagt ggtgagcgtg 1500

ctgacagtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat 1560

aagggcctgc ctagctccat cgagaaaacc atcagcaagg caaagggaca gcccaggag 1620

cctcagggtg ataccctgcc cccttcccag tgcgagatga caaagaacca ggtgtccctg 1680

tcttgtgccg tgaagggtt ttacccatcc gacatcgccg tggagtggga gtctaattggc 1740

cagcccgaga acaattataa gaccacacca cccgtgctgg actccgatgg ctctttcttt 1800

ctggtgagca ggctgaccgt ggataagtcc cgctggcagg agggcaacgt gttcagctgc 1860

tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacacacaga agtctctgag cctgtccctg 1920

ggcaaggcg gcggcggtc tggcgcggc ggagcggcg gcggcggtc cggaggaggc 1980

ggctctcaga agggcgatca gaacccccag atcgccgcc acgtgatcag caggcctct 2040

agcaagacca catccgtgct gcagtgggcc gagaagggt actataccat gagcaacaat 2100

ctggtgacac tggagaacgg caagcagctg accgtgaaga ggagggcct gtactatctc 2160

tacgcccagg tgacattctg ctccaatcgc gaggcctct ctcaggcccc ttttatcgcc 2220

tctctgagcc tgaagtctcc aggcgggttc gagagaatcc tgctgagggc agcaaacacc 2280

cacagctccg ccaagccttg tggccagcag tctatccacc tggcgcggt gttcagctg 2340

cagccaggag ccagcgtgtt tgtgaatgtg acagacccta gccaggtgtc ccacggcacc 2400

ggcttcacca gttcggcct gctgaagctg ggcgcggcg gcagcgggg cggcggtcc 2460

ggagggggag gctctcagaa aggcgatcag aatccacaga ttgtgcca cgtgatctct 2520

gaggcctcta gcaagaccac aagcgtgctg cagtgggctg aaaaaggata ctataccatg 2580

tctaataatc tggtgacact ggagaatggc aagcagctga ctgtcaagag acagggcctg 2640

tattacatct acgtcaggt gacattttgc agcaatagag aggcctctc tcaggctccc 2700

ttcatcgct cctgtctct gaagtcctt ggaggtttg agcgatcct gctgagagcc 2760

gccaatactc acagctccg caagccatgt ggacagcagt ccattcacct gggcgcgctg 2820

ttcgagctgc aaccaggagc cagcgtgttc gtgaatgtga cagaccctc tcaggtgagc 2880

cacggcaccg gttccaccag cttcggcctg ctgaagctgg gtggcgcgcg cagcgcggg 2940

ggcggtccg gagcgagg ctctcagaag ggcgatcaga atcctcagat tgcagcccac 3000

gtgatctccg aggcctctag caagaccaca tctgtgctgc agtgggtga gaaaggtac 3060

tataccatgt ctaacaatct ggtgacactg gagaacggca agcaactgac tgtcaaaaga 3120
cagggcctgt attatatcta cgctcaagtg acattctgca gcaatcgga ggcctcctct 3180
caggcaccct tcacgccag cctgtccctg aagtcacctg gccggttcga gagaatcctg 3240
ttaagagccg ccaatacaca cagctccgcc aaacatgtg gacagcagag catacacctg 3300
ggcggcgtgt tcgagctgca accgggagcc tccgtgtttg tcaatgtgac agacccatcc 3360
caggtgtctc acggcaccgg cttcaccagc ttcggcctgc tgaagctg 3408

<210> 150

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec-Fc Knob IgG4: in TSP 401 and 403 AA SEQUENCE

<400> 150

Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Leu Ser Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro Ala

65 70 75 80

Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp Glu

85 90 95

Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr Asn

100 105 110

Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln Lys

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

165 170 175

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

180 185 190

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

195 200 205

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

<210> 151

<211> 1101

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec-Fc Knob IgG4: in TSP 401 and 403 NA SEQUENCE

<400> 151

gatggccggt ttggatcag agtgcaggag tccgtgatgg tgcctgaggg cctgtctatc 60
agcgtgccat gtcctttctc ttaccccaga caggactgga ccggtcttac acccgcttac 120
ggctattggt ttaaggccgt gaccgagaca acaaaggcg cccctgtggc cacaaccac 180
cagagcagag aggtggagat gtccaccgg gcagattcc agctgacagg cgaccccgcc 240
aagggaatt gtagcctggt catcaggac gccagatgc aggatgagtc tcagtacttc 300
tttaggtgg agcgcggcag ctacgtgcgc tataacttta tgaatgatgg cttctttctg 360

aagtgaccg cctgacaca gaaggagga ggaggctccg gcggaggagg cagcgagtc 420
aagtatggac caccitgcc accatgtcct gcaccagagt tcgaggagg acctagcgtg 480
ttcctgtttc ctcaaagcc aaaggacacc ctgatgatca gcaggactcc tgaggtgaca 540
tgcgtggtgg tggacgtgc ccaggaggac ccgagggtgc agttcaactg gtatgtggat 600
ggcgtggagg tgcacaatgc caagacaaag ccacgggagg agcagtttaa ctctacctac 660
agagtgtga gcgtgctgac agtgctgcac caggattggc tgaacggcaa ggagtataag 720
tgtaaggtgt ctaataaggg cctgcccagc tccatcgaga aaaccatcag caaggcaaag 780

ggacagcccc gggagcctca ggtgtgcacc ctgccccctt cccaggagga gatgacaaag 840
aaccaggtgt ctctgtggtg tctgtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 900
tgggagtcca atggccagc cgagaacaat tacaagacca caccaccgt gctggactcc 960
gatggctctt tctttctgta ttccaggctg accgtggata agtctcgtg gcaggagggc 1020
aacgtgtttt cttgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca atcactatac acagaagtc 1080
ctgtctctga gcctgggcaa g 1101

<210> 152

<211> 351

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT-Fc Knob IgG4: in TSP 501 and 503 AA SEQUENCE

<400> 152

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

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60

Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95

Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

145 150 155 160

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

165 170 175

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

180 185 190

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

260 265 270

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

275 280 285

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

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

305 310 315 320
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

325 330 335
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

340 345 350

<210> 153
<211> 1053
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> TIGIT-Fc Knob IgG4: in TSP 501 and 503 NA SEQUENCE
<400> 153

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc 60

ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120

gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctctttaaag 180

gatagggtgg cacctggacc aggctgggc ctgacctgc agagcctgac cgtgaatgac 240

acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tctctgatg gcacctatac aggcagaatc 300

tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggctc cggaggagga 360

ggctctgaga gcaagtacgg accaccttgc ccacctgtc cagcacctga gttcgaggga 420

ggacctagcg tgttcctgtt tcctccaaag ccaaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 480

cctgaggatga catgcgtggt ggtggacgtg tcccaggagg accccgaggt gcagttcaac 540

tggtatgtgg atggcgtgga ggtgcacaa gccaagacaa agcccaggga ggagcagttt 600

aactccacct accgcgtggt gtctgtgctg acagtgtctc accaggactg gctgaacggc 660

aaggagtata agtgaaggt gtctaataag ggcctgccct cctctatcga gaaaaccatc 720

agcaaggcca agggccagcc aagagagcca caggtgtgca ccctgccacc ttcccaggag 780

gagatgacaa agaaccaggt gtctctgtgg tgtctggtga agggcttcta cccatctgac 840

atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca attacaagac cacaccacc 900

gtgctggaca gcgatggctc cttctttctg tatagccggc tgaccgtgga taagtccaga 960

tggcaggagg gcaacgtgtt ttctgtctct gtgatgcacg aggcctgca caatcactat 1020

acacagaaga gcctgtccct gtctctgggc aag 1053

<210> 154

<211> 873

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1- Fc Hole IgG4-sc3xCD40L: in TSP222 and 403 and 503 AA

SEQUENCE

<400> 154

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 Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

180 185 190

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

195 200 205
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 210 215 220
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 245 250 255
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 260 265 270

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

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

 Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala
 405 410 415
 Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr
 420 425 430
 Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr
 435 440 445

Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys
450 455 460

Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser
465 470 475 480

Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn
485 490 495

Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly
500 505 510

Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr
515 520 525

Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu
530 535 540

Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
545 550 555 560

Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile
565 570 575

Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys
580 585 590

Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys
595 600 605

Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val
610 615 620

Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala
625 630 635 640

Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg
645 650 655

Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
660 665 670

His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val
675 680 685

Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser

690 695 700
Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
705 710 715 720

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

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

Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly
850 855 860

Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
865 870

<210> 155

<211> 2619

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> PD1- Fc Hole IgG4-sc3xCD40L: in TSP222 and 403 and 503 AA

SEQUENCE

<400> 155

gacagcccag atagaccttg gaatccacct accttctccc ccgcctgct ggtggtgaca 60

gagggcgata acgccacatt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc ttttgtctg 120

aattggtaca ggaatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggccgcatt ccctgaggac 180

cgctcccagc caggacagga ttctcggttc agagtgaccc agctgccaaa tggccgggac 240

tttccatga gcgtgggtgag agcccggaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagcc 300

atctctctgg ccccaaagc acagatcaag gagtccctgc gggcagagct gagagtgacc 360

gagaggaggg cagagggtcc cacagcacac ccatctccta gcccacggcc cgcaggacag 420

ggaggaggag gcagcggggg aggaggctcc gagtctaagt acggaccacc atgccctcca 480

tgctctgcac cagagttcga gggaggacca tccgtgttcc tgtttccacc taagcctaag 540

gacaccctga tgatcagccg gaccccagag gtgacatgcg tgggtgtgga cgtgagccag 600

gaggaccccg aggtgcagtt taattggtat gtggatggcg tggaggtgca caacccaag 660

accaagccca gggaggagca gttcaacagc acctaccgcg tgggtgtccg gtgacagtg 720

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tataagtga aggtgtccaa caaggcctg 780

cctagctcca tcgagaaaac catcagcaag gcaaaggac agccacggga gccacaggtg 840

tacacctgc caccaagcca gtgcgagatg acaagaatc aggtgagcct gtcctgtgcc 900

gtgaagggtt ttacccttc cgacatcgcc gtggagtggg agtctaacgg ccagccagag 960

aacaattata agaccacacc tccagtgtg gactccgatg gctctttctt tctggtgtct 1020

aggctgaccg tggataagag ccgctggcag gagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg 1080

cacaggcccc tgcacaacca ctatacaca aagtcctgt ctctgagcct gggcaagggc 1140

ggcggcggca gcggcggagg aggtccgga ggcggcggct ctggcggcgg cggcagccag 1200

aaggcgatc agaatcctca gatcgccgc cactgatca gcaggcctc tagcaagacc 1260

acatcctgc tgcagtgggc cgagaagggc tactatacca tgagaacaa tctggtgaca 1320

ctggagaatg gcaagcagct gaccgtgaag cggcagggcc tgtactatat ctaccccag 1380

gtgacattct gcagcaacag agaggcctcc tctcaggccc cttttatcgc ctctctgagc 1440

ctgaagtctc caggccggtt cgagagaatc ctgctgaggg cagcaaacac ccacagctcc 1500

gccaagcctt gtggccagca gtctatccac ctgggcggcg tgttcgagct gcagccagga 1560

gccagcgtgt ttgtgaatgt gacagacct agccaggtgt cccacggcac cggcttcacc 1620

agcttcggcc tctgaagtgt gggcggcggc ggcagcgggg gcggcggctc cggaggggga 1680

ggctctcaga aaggcgatca gaatccacag attgtgcccc acgtgatctc tgaggcctct 1740

agcaagacca caagcgtgct gcagtgggct gaaaaaggat actataccat gtctaataat 1800

ctggtgacac tggagaatgg caagcagctg actgtcaaga gacagggcct gtattacatc 1860
 tacgctcagg tgacattttg cagcaataga gaggcctcct ctcaggctcc cttcatcgcc 1920
 tcctgtctc tgaagtcctc tggcagggtt gagcgcatcc tgctgagagc cgccaatact 1980
 cacagctccg ccaagccatg tggacagcag tccattcacc tgggcggcgt gttcgagctg 2040
 caaccaggag ccagcgtgtt cgtgaatgtg acagaccctc ctcagggtgag ccacggcacc 2100
 ggcttcacca gcttcggcct gctgaagctg ggtggcggcg gcagcggcgg gggcggctcc 2160
 ggaggcggag gctctcagaa gggcgatcag aatcctcaga ttgcagccca cgtgatctcc 2220

 gaggcctcta gcaagaccac atctgtgctg cagtgggctg agaaaggcta ctataccatg 2280
 tctaacaatc tggtgacact ggagaacggc aagcaactga ctgtcaaaag acagggcctg 2340
 tattatatct acgctcaagt gacattctgc agcaatcggg aggcctcctc tcaggcaccc 2400
 ttcacgcca gctgtccct gaagtcctc ggcgggttcg agagaatcct gttaagagcc 2460
 gccaatcac acagctccgc caaaccatgt ggacagcaga gcatacacct gggcggcgtg 2520
 ttcgagctgc aaccgggagc ctccgtgttt gtcaatgtga cagacccatc ccagggtgtc 2580
 cacggcaccg gcttcaccag cttcggcctg ctgaagctg 2619

<210> 156

<211> 961

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT-Fc Hole IgG4-sc3x4-1BBL: in TSP 501V1 AA SEQUENCE

<400> 156

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

1 5 10 15

Gly Ser Ile Ala Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val

20 25 30

Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Ser Asn

35 40 45

Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala

50 55 60

Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp

65 70 75 80

Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr

85 90 95

Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
115 120 125

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
145 150 155 160

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
165 170 175

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
180 185 190

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
195 200 205

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
210 215 220

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
225 230 235 240

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
245 250 255

Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
260 265 270

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
290 295 300

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

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
325 330 335

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

340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg
 355 360 365

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

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

 Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His
 500 505 510
 Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly
 515 520 525
 Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly
 530 535 540
 Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 545 550 555 560

 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro
 565 570 575
 Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
 580 585 590

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
595 600 605

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
610 615 620

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
625 630 635 640

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
645 650 655

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
660 665 670

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
675 680 685

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
690 695 700

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
705 710 715 720

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
725 730 735

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
740 745 750

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
755 760 765

Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser
770 775 780

Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala
785 790 795 800

Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp
805 810 815

Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser
820 825 830

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

835 840 845
Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly

850 855 860
Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala
865 870 875 880

Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser
885 890 895

Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
900 905 910

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
915 920 925

Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
930 935 940

Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
945 950 955 960

Glu

<210> 157

<211> 2883

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT-Fc Hole IgG4-sc3x4-1BBL: in TSP 501V1 NA SEQUENCE

<400> 157

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaaggagg cagcatcgcc 60

ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag 120

gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctctttaag 180

gatagggtgg cacctggacc aggcctgggc ctgacctgc agacacctgac cgtgaatgac 240

acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tatctgatg gcacctatac aggcagaatc 300

tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggatc cggaggagga 360

ggatccgagt ctaagtatgg accaccatgc cctccatgac cagcacctga gtttgaggga 420

ggaccttccg tgttctgtt tccccctaag ccaaaggaca cactgatgat ctccaggaca 480

ccagaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg tctcaggagg atcccagggt gcagttcaac 540

tggtacgtgg atggcgtgga ggtgcacaat gccaaagacca agcctaggga ggagcagttt	600
aactccacat accgcgtggt gtctgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc	660
aaggagtata agtctaaggt gagcaataag ggcctgcca gctccatcga gaagaccatc	720
tccaaggcaa agggacagcc aaggagcct caggtgtata cactgccacc cagccagtgc	780
gagatgacca agaaccaggt gagcctgtcc tgtgccgtga agggcttcta cccatctgac	840
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca attataagac cacacctcca	900
gtgctggact ccgatggctc tttctttctg gtgtccaggc tgacagtgga taagtctcgc	960
tggcaggagg gcaacgtgtt ttctttagc gtgatgcacg aggccctgca caatcactac	1020
accagaagt ccctgtctct gagcctgggc aaggcgccgc gcggctccgg aggaggagga	1080
agcgccgcct cccctaggct gcgcgaggga ccagagctga gccagacga tccagcagga	1140
ctgctggacc tgaggcagg aatgttcgca cagctggtgg cccagaacgt gctgctgac	1200
gacggccctc tgtcttggtg cagcgatcca ggactggcag gcgtgagcct gacaggcggg	1260
ctgtcctata aggaggatag caaggagctg gtggtggcaa aggcaggcgt gtactacgtg	1320
ttcttcagc tggagctgag gagagtgtg gcaggagagg gatccggatc tgtgagcctg	1380
gccctgcacc tgcagccact gcggagcgcc gcaggagcag ccgccctggc cctgaccgtg	1440
gacctgccac ctgcatctag cgaggcacgg aattctgcct tcggctttca gggcagactg	1500
ctgcaccta gcgccggaca gaggctggga gtgcacctgc acacagaggc aagggaaga	1560
cacgcatggc agctgacaca gggagcaacc gtgctgggac tgttcgcgt gaccctgag	1620
atcccagcag gactgccatc cccccggtct gagggcggcg gcgggtccgg aggaggagga	1680
tctggcggcg gcggcagcgc cgcctcccc aggctgcgcg agggacctga gctgtccca	1740
gacgatcctg ccggcctgct ggacctgaga cagggaatgt ttgccagct ggtcgtcag	1800
aacgtgctgc tgattgacgg cccctgtcc tggatatagc atcctggact ggcaggcgtg	1860
tctctgacag gcggactgag ttacaaagaa gacactaaag aactggtcgt cgccaaagcc	1920
ggcgtgtact acgtgttctt ccaactggag ctgaggaggg tcgtcgccgg cgaaggcagc	1980
ggctctgtga gcctggccct gcacctgcaa cactgagga gcgccgccgg cgccgccgc	2040
ctggccctga ctgtggacct gccaccagca tcctctgagg caaggaattc cgccttcggc	2100
ttccagggcc ggctgtgca cctgtctgcc ggacagagac tgggctcca cctgcatacc	2160
gaagccagag ccaggcatgc ctggcagctg acccaggcg ccaccgtgct gggcctgttc	2220
agagtgacc cagaaattcc agcaggactg ctttcccaa ggtctgagg aggaggagga	2280

agtggcggag gaggatccgg agggggaggg agcgccgcct cccaagact gagagaggga 2340
ccagactgt cccctgatga ccctgccggg ctgctggacc tgagacaagg catgttcgcc 2400
cagctggtcg cacaaaacgt gctgttaatt gacggccac tgccttgta ttccgacct 2460
ggcctggcgg gcgtgtccct gacaggcggc ctgtcttaca aagaagacac aaaagaactg 2520
gtcgtcgcta aagctggcgt gtactacgtg ttcttccaat tagaactgag aagggtcgtc 2580
gccggcgagg gcagcgggtc tgtgagcctg gccctgcacc tgcaaccgtc gcggagcgcc 2640
gccggcgctg ccgccctggc cctgacagtg gacctgcctc cagcaagctc cgaggcaagg 2700

aatagcgct tcggtttca aggccgcctg ctgcacctgt ccgccggaca gcggctgggc 2760
gtccacctgc acaccgaagc cagagccgc catgcctggc agctgactca gggcgtacc 2820
gtgctgggcc tgitccgct gacccagag atccctgccg gcctgccctc cctcgtct 2880
gag 2883

<210> 158

<211> 845

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT-Fc Hole IgG4-sc3xCD40L: in TSP 503V1 AA SEQUENCE

<400> 158

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly

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

115 120 125
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val

130 135 140
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
145 150 155 160
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

165 170 175
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
180 185 190
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

195 200 205
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
210 215 220
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

225 230 235 240
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
245 250 255
Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala

260 265 270
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
275 280 285
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

290 295 300
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
305 310 315 320
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

325 330 335
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly
340 345 350
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

355 360 365

Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val
 370 375 380
 Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu

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

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

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

 580 585 590
 Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala
 595 600 605
 Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg

610 615 620
 Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly
 625 630 635 640
 Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala

645 650 655
 Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr
 660 665 670
 Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 675 680 685
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro
 690 695 700
 Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser

705 710 715 720
 Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu
 725 730 735
 Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu
 740 745 750
 Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser
 755 760 765
 Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg

770 775 780
 Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys
 785 790 795 800
 Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln
 805 810 815
 Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser
 820 825 830
 His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu

835 840 845
 <210> 159
 <211> 2535

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT-Fc Hole IgG4-sc3xCD40L: in TSP 503V1 AA SEQUENCE

<400> 159

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc	60
ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgaccc aggtgaactg ggagcagcag	120
gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctctttaag	180
gatagggtgg cacctggacc aggctgggc ctgaccctgc agagcctgac cgtgaatgac	240
acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tatcctgatg gcacctatac aggcagaatc	300
tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggcag cgggggagga	360
ggctccgagt ctaagtacgg accaccatgc cctccatgtc ctgcaccaga gttcgaggga	420
ggaccatccg tgttctgttt tccacctaaag cctaaggaca ccctgatgat cagccggacc	480
ccagagggtga catgcgtggt ggtggacgtg agccaggagg accccgaggt gcagtttaat	540
tggtatgtgg atggcgtgga ggtgcacaac gccaagacca agcccaggga ggagcagttc	600
aacagcacct accgcgtggt gtccgtgctg acagtgtctg accaggactg gctgaatggc	660
aaggagtata agtgaaggt gtccaacaag ggctgccta gctccatcga gaaaaccatc	720
agcaaggcaa agggacagcc acgggagcca caggtgtaca ccctgccacc aagccagtgc	780
gagatgacaa agaatacaggt gagcctgtcc tgtgccgtga agggctttta cccttccgac	840
atgccgtgg agtgggagtc taacggccag ccagagaaca attataagac cacacctcca	900
gtgtctggact ccgatggctc tttctttctg gtgtctaggc tgaccgtgga taagagccgc	960
tggcaggagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactat	1020
acacaaaagt cctgtctct gagcctgggc aagggcggcg gcggcagcgg cggaggaggc	1080
tccggaggcg gcggctctgg cggcggcggc agccagaagg gcgatcagaa tcctcagatc	1140
gccgcccacg tgatcagcga ggcctctagc aagaccacat ccgtgctgca gtgggccgag	1200
aagggtact ataccatgag caacaatctg gtgacactgg agaatggcaa gcagctgacc	1260
gtgaagcggc agggcctgta ctatatctac gccaggtga cattctgcag caacagagag	1320
gcctcctctc agggcccttt tatgcctct ctgagcctga agtctccagg ccggttcgag	1380
agaatcctgc tgagggcagc aaacacccac agctccgcca agccttgtgg ccagcagttc	1440
atccacctgg gcggcgtgtt cgagctgcag ccaggagcca gcgtgtttgt gaatgtgaca	1500
gacctagcc aggtgtccca cggcaccggc ttcaccagct tcggcctgct gaagctgggc	1560
ggcggcggca gcgggggcgg cggctccgga gggggaggct ctcagaaagg cgatcagaat	1620

ccacagattg ctgccacgt gatctctgag gcctctagca agaccacaag cgtgctgcag 1680
 tgggtgaaa aaggatacta taccatgtct aataatctgg tgacactgga gaatggcaag 1740
 cagctgactg tcaagagaca gggcctgtat tacatctacg ctcaggtgac attttgcagc 1800
 aatagagagg cctcctctca ggctcccttc atcgcctccc tgtctctgaa gtcccctggc 1860
 aggtttgagc gcatcctgct gagagccgcc aatactcaca gctccgcaa gccatgtgga 1920

cagcagtcca ttcacctggg cggcgtgttc gagctgcaac caggagccag cgtgttcgtg 1980
 aatgtgacag acccctctca ggtgagccac ggcaccggct tcaccagctt cggcctgctg 2040
 aagctgggtg gcggcggcag cggcgggggc ggctccggag gcggaggctc tcagaagggc 2100
 gatcagaatc ctcagattgc agcccacgtg atctccgagg cctctagcaa gaccacatct 2160
 gtgctgcagt gggctgagaa aggctactat accatgtcta acaatctggt gacactggag 2220
 aacggcaagc aactgactgt caaaagacag ggctgtatt atatctacgc tcaagtgaca 2280
 ttctgcagca atcgggaggc ctcctctcag gcacccttca tcgccagcct gtccctgaag 2340

tcccctggcc ggttcgagag aatcctgtta agagccgcca atacacacag ctccgcaaaa 2400
 ccatgtggac agcagagcat acacctgggc ggctgttcg agctgcaacc gggagcctcc 2460
 gtgtttgtca atgtgacaga cccatcccag gtgtctcag gcaccggctt caccagcttc 2520
 ggctgtctga agctg 2535

<210> 160

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TIGIT full length (Q495A1 Uniprot ID) AA SEQUENCE

<400> 160

Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala

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

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

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

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

<210> 161

<211> 598

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 D1-4, full length (Q8N423-1 UniParc) AA SEQUENCE

<400> 161

Met Thr Pro Ile Val Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15
Pro Arg Thr His Val Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp

20 25 30
 Ala Glu Pro Asp Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser
 35 40 45
 Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys
 50 55 60

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

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

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

 Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro
 260 265 270

Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg
275 280 285

Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser
290 295 300

Glu Cys Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln
305 310 315 320

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

Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His
340 345 350

Thr Phe Leu Leu Thr Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu
355 360 365

Arg Ser Ile His Glu Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser
370 375 380

Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu
385 390 395 400

Asn Ser Asp Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu
405 410 415

Val Val Ser Gly Pro Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly Pro
420 425 430

Ile Ser Thr Pro Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly
435 440 445

Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly
450 455 460

Ile Leu Val Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe
465 470 475 480

Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln
485 490 495

Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro
500 505 510

Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln

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

Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr
 580 585 590
 Ala Thr Leu Ala Ile His
 595

<210> 162

<211> 697

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Siglec 10 full length (Q96LC7-1 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 162

Met Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gly Ser Gln Ala
 1 5 10 15
 Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro

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

85 90 95
 Ala Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp
 100 105 110
 Glu Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr

115 120 125
 Asn Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln
 130 135 140
 Lys Pro Asp Val Tyr Ile Pro Glu Thr Leu Glu Pro Gly Gln Pro Val

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

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

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

 340 345 350
 Gln Ala Asn Arg Thr Val Leu Glu Asn Leu Gly Asn Gly Thr Ser Leu
 355 360 365

Pro Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Cys Leu Val Cys Val Thr His Ser
 370 375 380
 Ser Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Gln Arg Gly Gln Val Leu Ser
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Pro Ser Asp Pro Gly Val Leu Glu Leu Pro Arg Val Gln
 405 410 415
 Val Glu His Glu Gly Glu Phe Thr Cys His Ala Arg His Pro Leu Gly
 420 425 430
 Ser Gln His Val Ser Leu Ser Leu Ser Val His Tyr Ser Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Gly Pro Ser Cys Ser Trp Glu Ala Glu Gly Leu His Cys Ser Cys
 450 455 460
 Ser Ser Gln Ala Ser Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Trp Leu Gly Glu
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asp Ser Phe Glu Val Thr Pro
 485 490 495
 Ser Ser Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ser Ser Leu Ser Leu His Gly Gly
 500 505 510
 Leu Ser Ser Gly Leu Arg Leu Arg Cys Glu Ala Trp Asn Val His Gly
 515 520 525
 Ala Gln Ser Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ile
 530 535 540
 Ser Thr Ala Phe Ser Asn Gly Ala Phe Leu Gly Ile Gly Ile Thr Ala
 545 550 555 560
 Leu Leu Phe Leu Cys Leu Ala Leu Ile Ile Met Lys Ile Leu Pro Lys
 565 570 575
 Arg Arg Thr Gln Thr Glu Thr Pro Arg Pro Arg Phe Ser Arg His Ser
 580 585 590
 Thr Ile Leu Asp Tyr Ile Asn Val Val Pro Thr Ala Gly Pro Leu Ala
 595 600 605
 Gln Lys Arg Asn Gln Lys Ala Thr Pro Asn Ser Pro Arg Thr Pro Leu

610 615 620
Pro Pro Gly Ala Pro Ser Pro Glu Ser Lys Lys Asn Gln Lys Lys Gln
625 630 635 640
Tyr Gln Leu Pro Ser Phe Pro Glu Pro Lys Ser Ser Thr Gln Ala Pro
645 650 655
Glu Ser Gln Glu Ser Gln Glu Glu Leu His Tyr Ala Thr Leu Asn Phe

660 665 670
Pro Gly Val Arg Pro Arg Pro Glu Ala Arg Met Pro Lys Gly Thr Gln
675 680 685
Ala Asp Tyr Ala Glu Val Lys Phe Gln
690 695

<210> 163

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CD40L full length (P29965 Uniprot) AA SEQUENCE

<400> 163

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95
Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser

115 120 125
 Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 130 135 140

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

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

<210> 164

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> TIGIT Full ECD AA SEQUENCE

<400> 164

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

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

50

55

60

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

65

70

75

80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr

85

90

95

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

100

105

110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro

115

120

<210> 165

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> LILRB2 Full ECD AA SEQUENCE

<400> 165

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser

1

5

10

15

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

20

25

30

Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp

35

40

45

Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile

50

55

60

Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr

65

70

75

80

Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met

85

90

95

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

100

105

110

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

115	120	125	
Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln			
130	135	140	
Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe			
145	150	155	160
Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr			
165	170	175	
Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu			
180	185	190	
Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val			
195	200	205	
Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu Thr Leu Gln Cys			
210	215	220	
Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu			
225	230	235	240
Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser			
245	250	255	
Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln			
260	265	270	
Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro			
275	280	285	
Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro			
290	295	300	
Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val			
305	310	315	320
Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr			
325	330	335	
Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu			
340	345	350	
Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala			
355	360	365	

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

Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val
 435 440

<210> 166

<211> 1422

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sc3xCD40L, AA 114-261 C194S (P29965 Uniprot) internal linker
 3x(GGGGS) NA SEQUENCE

<400> 166

cagaaggcgc atcagaaccc ccagatcgcc gccacgtga tctccgaggc ctctagcaag	60
accacatctg tgctgcagtg ggccgagaag ggctactata caatgagcaa caatctggtg	120
accctggaga acggcaagca gctgacagtg aagcggcagg gcctgtacta tatctatgcc	180
caggtgacct tctgctccaa tagagaggcc tcctctcagg cccctttat cgctccctg	240
tctctgaagt ctctggccg gttcgagaga atcctgctga gggcagcaaa cacacacagc	300
tccgccaagc cctgtggcca gcagtcctatc cacctggcgc gcgtgttcga gctgcagcca	360
ggagccagcg tgtttgtgaa tgtgaccgac cctagccagg tgtccacgg caccgcttc	420
accagcttcg gcctgctgaa gctgggcggc ggcggtcttg gcggaggagg cagcggagga	480
ggaggctccc agaaaggcga tcagaaccct cagattgctg cccacgtgat cagcgaggcc	540
tctagcaaga ccacatccgt gctgcagtgg gctgaaaaag gatactatac aatgtcta	600
aatctggtga cctggagaa tggcaagcag ctgaccgtca agagacaggg cctgtattat	660
atctacgcc aggtgacctt ttgcagcaat cgcgaggcct cctctcaggc tccattcatc	720
gccagcctgt cctgaagtc cccaggcagg tttagcgca tctgctgag agccgccaat	780
accacagct ccgccaagcc atgtggacag cagtccattc acctgggcgg cgtgttcgag	840
ctgcaaccag gagccagcgt gtctgtgaat gtgaccgacc cctctcaggt gagccacggc	900

accggcttca ccagcttcgg cctgctgaag ctgggtggag gaggtcttgg cgggggcggc	960
agcggcggag gaggtccca gaaggcgat cagaatcctc agattgccgc ccacgtgatc	1020
tctgaggcct ctagcaagac cacaagcgtg ctgcagtggg cagaaaaagg gtactataca	1080
atgtctaaca atctggtgac cctggagaac ggcaagcaac tgaccgtcaa aagacagggc	1140
ctgtactaca tctacgtca ggtgaccttc tgcagcaata gggaggcctc ctctcaggca	1200
ccttttatcg cctctctgag cctgaagtcc ccaggccggt tcgagagaat cctgttaagg	1260
gcagcaaaca ctcacagctc cgccaaacca tgtggacagc agagcataca cctgggcggc	1320
gtgttcgagc tgcaaccggg agcctccgtg ttgtcaatg tgaccgaccc atcccaggtg	1380
tctcacggca ccggcttcac cagcttcggc ctgctgaagc tg	1422